

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 21 年度博士課程 進学
氏 名 大谷啓志
指導教員名 大西康夫

論文題目 放線菌の主要シグマ因子を制御する ECF シグマ因子に関する研究

Streptomyces griseus をはじめとする *Streptomyces* 属放線菌は複雑な形態分化を行うという特徴がある。形態分化のメカニズムを明らかにするため、形態分化を行わない変異株を取得し、原因遺伝子を明らかにするという方法で形態分化に関わる遺伝子の研究が長年行われてきた。しかしながらこの方法では同様の機能を持つ遺伝子が複数ある場合、それらを同定することは難しい。また生育にも影響を与える遺伝子も見落とされてしまう可能性が高い。そのため形態分化に重要な遺伝子がまだ存在する可能性が高く、これらを同定するには従来の方法とは異なるアプローチが必要であった。

近年、*S. griseus*、*Streptomyces coelicolor* A3(2)、*Streptomyces avermitilis* の全ゲノム配列が決定された。*Streptomyces* 属放線菌のゲノムは 8 Mb を越える大きさで、7,000 以上の Open reading frame がコードされている。比較ゲノム解析の結果、形態分化に関わる遺伝子の多くはこれら 3 種に高く保存されていた。そのため *Streptomyces* 属放線菌に高く保存される遺伝子は形態分化等 *Streptomyces* 属放線菌の生命現象に重要な役割を担うものである可能性がある。本研究では *Streptomyces* 属放線菌 3 種に高く保存されたシグマ因子に着目し、解析を行った。

Streptomyces 属放線菌に高く保存されたシグマ因子の解析

細菌の RNA ポリメラーゼは 5 種類のタンパク質 (α_2 , β , β' , σ , ω) からなる 6 サブユニットで構成される。このうち σ サブユニット (シグマ因子) は転写開始の際のプロモーターの認識に必須である。*Streptomyces* 属放線菌のゲノムには 50 以上という非常に多くのシグマ因子がコードされるが、未解析のものが多く残されている。BLAST 検索を行い先に述べた *Streptomyces* 属放線菌 3 種にアミノ酸一次配列が 90% 以上の相同性で保存されるシグマ因子を探索した (表 1)。その結果 6 つのシグマ因子が見出され、このうち 2 つ SGR2758 と SGR3370 は機能解析が行われていないものであった。そのため SGR2758 と SGR3370 に着目し、解析を行った。SGR2758 は *Mycobacterium tuberculosis* で解析されているシグマ因子 σ^D と 47% のアミノ酸一次配列相同性を示すことから、SGR2758 も σ^D と呼ぶ。

表 1 *Streptomyces* 属放線菌に高く保存されるシグマ因子

		アミノ酸一次配列相同性 (%)	
	機能	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	<i>S. avermitilis</i>
σ^{HrdB}	主要シグマ因子	90	91
σ^{WhiG}	胞子形成開始	93	93
σ^{R}	チオール酸化ストレス応答	90	91
σ^{D}	不明	92	94
SGR3370	不明	92	93
σ^{AdsA}	気中菌糸形成	91	91

σ^D は *S. griseus* の生育に重要

σ^D と SGR3370 の機能を明らかにするため、それぞれをコードする遺伝子の破壊株を作製した。 ΔSGR337 株は野生株と比べて形態分化や生育に大きな差は見られなかったが、 ΔsigD 株は野生株に比べて生育速度が著しく遅く、形態分化も行わなかった。また ΔsigD 株が形成する基底菌糸は培地中に入り込むことが出来ず、空中に伸長していた。これらの結果から σ^D は生育に非常に重要なシグマ因子であることが明らかになった。そのため σ^D に関して更なる解析を行った。

sigD 発現量は定常期に上昇

σ^D が機能する時期を明らかにするため、*sigD* の発現解析を行った。定量 PCR 解析を行ったところ、*sigD* mRNA 量は固体、液体両培養時で定常期に上昇した。また σ^D タンパク質量も定常期で上昇することがウェスタン解析より明らかにな

った。 $\Delta sigD$ 株は培養の初期から生育に欠損が現れることから、 σ^D は定常期で栄養増殖とは異なる新たな役割を果たしている可能性が考えられた。

σ^D は主要シグマ因子を制御する

σ^D によって制御される遺伝子を探索するため、トランスクリプトーム解析を行った。トランスクリプトーム解析には *sigD* 転写量を減少させた株を作製し、本株と野生株の培養初期の転写プロファイルを DNA マイクロアレイ解析によって比較した。その結果、209 の遺伝子が σ^D によって正に制御されることが明らかになった。この中には転写や翻訳をはじめとする生育に必須な遺伝子が多く含まれていた。 $\Delta sigD$ 株に見られる生育速度やコロニー形態の異常はこれら生育に必須な遺伝子の発現量の減少が原因であると考えられる。

トランスクリプトーム解析で見出された生育に必須な遺伝子は主要シグマ因子 σ^{HrdB} を含む RNA ポリメラーゼによって転写される。そのためトランスクリプトーム解析で見出された遺伝子のうち、*hrdB* が σ^D の標的遺伝子であると予想した。定量 PCR 解析、ウェスタンブロッティング解析を行い、野生株と $\Delta sigD$ 株の *hrdB* mRNA 量、 σ^{HrdB} タンパク質量を比較したところ、*hrdB* mRNA 量、 σ^{HrdB} タンパク質量どちらも野生株に比べて $\Delta sigD$ 株で著しく減少していた。続いて *in vitro* 転写アッセイを行ったところ、 σ^D は *hrdB* プロモーターを認識した。さらに *in vivo* で σ^D が *hrdB* プロモーターに強く結合することが Chromatin affinity precipitation アッセイによって確認された。さらに $\Delta sigD$ 株で *hrdB* の転写量を増加させたところ、 $\Delta sigD$ 株の生育が野生株のレベルまで回復した。これらの結果から、 σ^D は *hrdB* の転写を直接制御することが明らかになり、 $\Delta sigD$ 株の示す表現型は *hrdB* 転写量の著しい低下が原因であることが強く示唆された。

σ^D による *hrdB* 転写制御は定常期移行に重要

ほとんどの細菌では主要シグマ因子遺伝子のプロモーターは主要シグマ因子自身によって認識される。しかしながら *S. griseus* では ECF シグマ因子 σ^D が生育を通して *hrdB* を制御することが明らかになった。そのため *S. griseus* の主要シグマ因子遺伝子発現制御系が他の細菌と異なる点に興味を持たれた。

そこで、他の細菌と同様に *hrdB* が σ^{HrdB} を含む RNA ポリメラーゼによって転写される株 (*hrdB* 自己制御株) を作製し、その株での *hrdB* 発現パターンと生育速度を野生株と比較した。野生株では *hrdB* 転写量は定常期で上昇し、 σ^{HrdB} タンパク質量は生育を通して一定であった。これは定常期における細胞内プロテアーゼ活性の上昇や翻訳活性の低下に依るものであると考えられる。一方、*hrdB* 自己制

御株では *hrdB* 転写は σ^{HrdB} によって制御されるため、*hrdB* 転写量は生育を通して一定であり、その結果として σ^{HrdB} タンパク質量は定常期で減少した。*hrdB* 自己制御株の生育速度は定数増殖期では野生株と同程度であったが、定常期への移行に異常が見られ、野生株では菌体量が維持されている培養時間でも溶菌のため菌体量が減少した。さらに定常期は抗生物質生産等の二次代謝を行う時期であるが、*hrdB* 自己制御株ではストレプトマイシン生産量が著しく低下していた。

結論

本研究で *S. griseus* では他の細菌とは異なり主要シグマ因子遺伝子 *hrdB* が ECF シグマ因子 σ^{D} によって転写制御されることを示した。これは ECF シグマ因子が生育を通して主要シグマ因子を制御する初めての例である。さらに σ^{D} による *hrdB* 転写制御が栄養増殖のみならず定常期移行や二次代謝にも重要であることを示した（図1）。*Streptomyces* 属放線菌の定常期移行に関するメカニズムはほとんど未解明であり、本研究の結果を基に更なる解析を行うことで、細胞分化のモデル微生物であり抗生物質生産でも重要な *Streptomyces* 放線菌の生命現象に関する研究がさらに発展することが期待される。

本研究では変異株取得とその解析という従来のスクリーニング法ではなく、ゲノム情報を基に新たな遺伝子の探索を行った。その結果、 σ^{D} という *S. griseus* の生育に非常に重要なシグマ因子を発見するに至った。そのため本研究で採ったアプローチは今まで見過ごされてきた重要な遺伝子を発見するのに有効であり、ゲノム情報を基にした遺伝子スクリーニングは今後の分子生物学研究において重要なアプローチであると思われる。

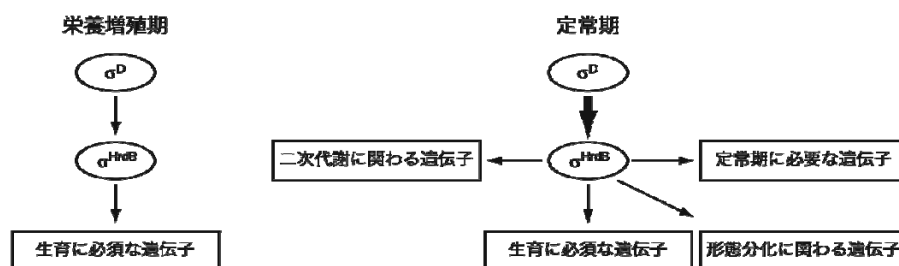


図 1 σ^{D} による *hrdB* 転写制御系のモデル図

Otani, H., Higo, A., Horinouchi, S. and Ohnishi, Y. An alternative sigma factor governs the principal sigma factor in filamentous bacterium *Streptomyces griseus*. 投稿中