

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中村 一成

放線菌は多種多様な二次代謝産物の生産能を持つことで知られている。二次代謝産物の生合成遺伝子群や生合成経路に関する報告に比べると、生合成遺伝子の発現制御機構に関する報告は少ない。本論文は *Streptomyces griseus* が生産する黄色色素グリキサゾンの生合成制御機構に焦点を当て、二次代謝制御のモデルとして解析することを目的としている。本論文は序論全 4 章、本論全 4 章および総括から構成される。

序論第 1 章では放線菌について概説し、二次代謝産物の生産制御機構について今日までの知見をまとめている。また二次代謝産物の生合成遺伝子群の経路特異的転写活性化因子として放線菌ゲノム中に数多く見出されている SARP 型転写因子に関する詳細も詳述されている。序論第 2 章ではグリキサゾンに関して既存の知見について簡潔にまとめている。黄色色素グリキサゾンは *S. griseus* が生産する二次代謝産物であり、生合成遺伝子群、生合成経路が既に決定されている。生産制御機構も部分的に解明されており、微生物ホルモン A-factor とリン酸飢餓の刺激を受けて SARP 型経路特異的転写因子 GriR が発現し、生合成酵素をコードする一連の遺伝子を転写活性化することでグリキサゾンが生産される。さらに、生合成遺伝子群から離れた位置に存在する *griZ* および *griUVW* オペロンもグリキサゾン生産制御に関わっているが、その機構は明らかにされていない。序論第 3 章では、所属研究室が保有する 2 種類の *S. griseus* 野生株、ADYP 株とゲノム株に関して表現型の違いについて述べ、その原因について推論している。ゲノム株と比較して ADYP 株は高いグリキサゾン生産能と若干低い形態分化能を有している。序論第 4 章では本論文の目的と構成を述べている。

本論第 1 章では、*griR* 上流領域に対する AdpA の結合の有無の検討および GriR の結合位置の決定を行っている。所属研究室における ChIP-seq 解析により *griR* 上流領域に AdpA が結合する可能性が示唆されたが、本論文ではゲルシフト実験を用いて AdpA が結合しないことを示した。また、*griC* および *griJ* 上流領域における GriR の結合位置は前任者によって推定されていたが、本論文では DNase I フットプリント実験を行うことで結合位置を正確に決定した。特に *griJ* 上流に結合する GriR の個数は、これまで推定されていた 4 個ではなく、5 個であることを見出した。

本論第 2 章では、*griZ* に関する解析について述べている。*griZ* に関して、転写解析を行い *griZ* 破壊株において *griUVW* オペロンの転写量が上昇していることを示した。また前任者によって GriZ のリガンドがグリキサゾンであることが示唆されていたが、その可能性を

否定した。そして *griZ*、*griU* の二重破壊株がグリキサゾン生産能を回復したことから、*griU* が *griZ* の下流にあってグリキサゾン生産制御に関わる遺伝子であることを示した。

本論第 3 章では、GriU に関する解析について述べている。転写解析や *griR* の過剰発現実験の結果から GriU の作用点が *griR* 上流の制御機構と、*griR* が翻訳されてから *griC*、*griJ* の転写活性化を行うまでの過程の 2 ヶ所に存在し、特に後者の *griR* の翻訳後制御が重要であることを明らかにした。そして組換え GriU タンパク質を用いた *in vitro* 系における解析の結果、GriU が、DNA と結合している GriR とタンパク質間相互作用し DNA-GriR-GriU 3 者複合体を形成することで、GriR-RNA ポリメラーゼ間の結合を妨げ、GriR の転写活性化能を阻害していることを示し、GriU が GriR に対する抗転写活性化因子であることを明らかにした。

本論第 4 章では、ADYP 株の原因遺伝子が *SGR1728* であることを示している。ADYP 株およびゲノム株の全ゲノム配列を解読し、7 遺伝子 8 ヶ所の変異点を決定し、それら全てについて解析を行った結果、*SGR1728* がグリキサゾン生産能および形態分化能に関する原因遺伝子であることを見出した。

総括においては、本研究の結果を総括するとともに、今後の展望について述べている。

以上、本論文は放線菌 *S. griseus* におけるグリキサゾン生産制御機構に関する解析結果をまとめたものであり、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。