

第三章 AdpA の自己転写抑制機構の解析

2.3-1 背景および目的

A-ファクターはその特異的受容体 ArpA と結合し、*adpA* プロモーター領域に結合した ArpA を解離させることによって *adpA* の転写を活性化させる。この AdpA は、A-ファクターが引き起こす様々な生理的变化を担う重要な「鍵」となる因子であることは前章までに述べてきたことから十分理解できるだろう。しかし、気中菌糸形成から胞子形成も含めた形態分化、および二次代謝に関する多数の遺伝子の転写を活性化する AdpA の発現制御は、単純に A-ファクターと ArpA によるものだけなのであろうか？様々な現象、時系列の遺伝子群を活性化させるからには AdpA の細胞内濃度は厳密に制御されていることが予想される。*adpA* の転写開始を決定するのは A-ファクターと ArpA による制御系であることは間違いないが、転写開始後にも別の発現調節があるのではないだろうか。実際、*adpA* をコードする領域の配列を見ると、*adpA* は転写開始点から翻訳開始点まで 263 bp という長い非翻訳 5'領域を持ち、またその上流には 764 bp という長い、ORF も tRNA もコードしていない DNA 領域を持っており、このような特異な構造からも特別な調節機構の存在が推察され、興味を持たれた。また、AdpA は C 末ドメインに AraC ファミリーに属する 2 つのヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフからなる DNA 結合ドメインを持つ一方、N 末側には ThiJ/Pfpl/DJ-1 ファミリーと相同性のあるダイマー形成ドメインをもっており、ダイマーを形成している (Ohnishi *et al.*, 2005) (図 2.3-1)。この 2 つのドメインが AdpA の特徴的な構造であるが、N 末端ドメインを形成する ThiJ/Pfpl/DJ-1 ファミリーはダイマーのみならずヘキサマーをとることも報告されており、また依然として機能に関してはっきりしない点もある (Bandyopadhyay and Cookson, 2004; Du *et al.*, 2000)。AdpA においても単にダイマー形成のみならず他にも機能を持つ可能性がある。

以上の理由から AdpA の別の発現制御に注目した。翻訳調節や翻訳後調節ももちろん考えられるが、ここでは転写調節に注目し、*adpA* の発現調節機構を詳しく調べることにより AdpA はその標的遺伝子の転写を活性化するのに対して、自身に対しては転写抑制を行っていることを明らかにしていった。

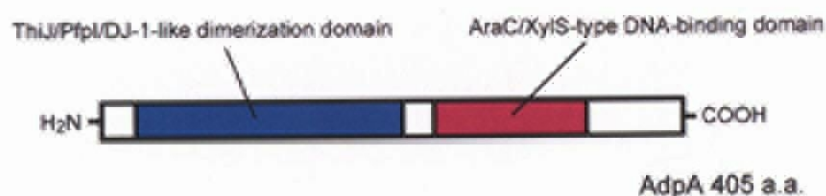


図 2.3-1 AdpA の構造

2.3-II 結果

adpA 遺伝子破壊株では *adpA* プロモーター活性が上昇する

A-ファクターカスケード上流に位置する ArpA については、前章において遺伝子破壊株および MK2 株を作製し、それらの株における *adpA* の転写量を調べることによって *adpA* の転写に及ぼす影響を明らかにした。では、その下流に位置する AdpA、あるいは AdpA 標的遺伝子がコードする蛋白質はどのような影響を持つのか？*adpA* の転写への関与を調べるため、プレート培養した野生株と *adpA* 遺伝子破壊株 ($\Delta adpA$ 株) の菌体から RNA を抽出し、SI マッピング法により *adpA* の転写量を比較した (図 2.3-2)。その結果、 $\Delta adpA$ 株では野生株に比べて *adpA* の転写量が増加していることが明らかになった。基底菌糸である培養 24 時間で $\Delta adpA$ 株における *adpA* の転写量は特に増加しており、また基底菌糸と気中菌糸が混じった状態である培養 48 時間でも *adpA* の転写量の増加は見られた。しかしながら、気中菌糸と胞子が混じった状態である 72 時間培養では野生株においても $\Delta adpA$ 株においても *adpA* の転写は消失していた。この 72 時間における転写消失の機構にも興味は持たれるが、24 時間および 48 時間培養菌体で見られた *adpA* の転写増加に着目することにした。これは $\Delta adpA$ 株で見られたことから、AdpA 自身、または AdpA が転写活性化する標的遺伝子の産物が *adpA* プロモーターに抑制的に働いていることが予想された。

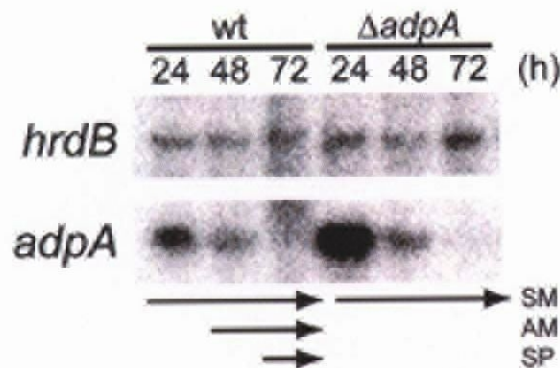


図 2.3-2 SI マッピング法による野生株と *adpA* 破壊株における *adpA* の転写量比較

YMPD 固体培地上でそれぞれの時間培養した菌体から RNA を抽出し、SI マッピング法により *adpA* の転写量を比較した。*hrdB* は恒常的に発現しているシグマ因子であり、RNA 量のコントロールである。SM: 基底菌糸、AM: 気中菌糸、SP: 胞子、を示す。

adpA の上流 3 カ所に AdpA は結合する

AdpA が直接自身のプロモーターに働くことで転写を抑制しているのであれば、AdpA は *adpA* 遺伝子上流に結合するはずである。そこで、ゲルシフトアッセイにより AdpA の結合を調べた (図 2.3-3)。probe A (-155~-10、転写開始点を+1 とする)、probe B (+6~+150)、probe C (-77~+47)、probe D (-465~-136)、probe E (+103~+495)、probe F (-155~+76) の 6 つを用意し、AdpA との結合を調べたところ、まず probe A と強い結合が見られた。この結合の強さは AdpA 標的遺伝子上流への AdpA 結合で見られるものと同程度である。probe B について調べると、結合は見られたものの、probe A に比べて非常に弱い結合であった。probe C、probe D、probe E については結合が見られなかったが、probe C に関しては AdpA を多量に入れた場合に AdpA との結合を示す位置にわずかにシフトバンドが見られた。興味深いことに、probe F に関してはシフトバンドが 2 つ見られた。下のシフトバンドが probe F と AdpA ダイマー 1 つの複合体を示すもの、上のシフトバンドは probe F と AdpA ダイマー 2 つの複合体を示すものであることが予想された。また、AdpA ダイマーは 1 カ所の結合部位に 1 つ結合することから、probe F の内部の 2 カ所にそれぞれ AdpA ダイマーが 1 つずつ結合し、かつ、2 本のシフトバンドが見られたことから各々の結合部位に対する AdpA ダイマーのアフィニティにはかなりの差があると考えられた。

以上から、*adpA* は自身の転写抑制に関与し、かつ AdpA は自身の遺伝子上流に結合することが明らかとなった。さらに詳細に解析を行うことによってこれらの関係を調べた。

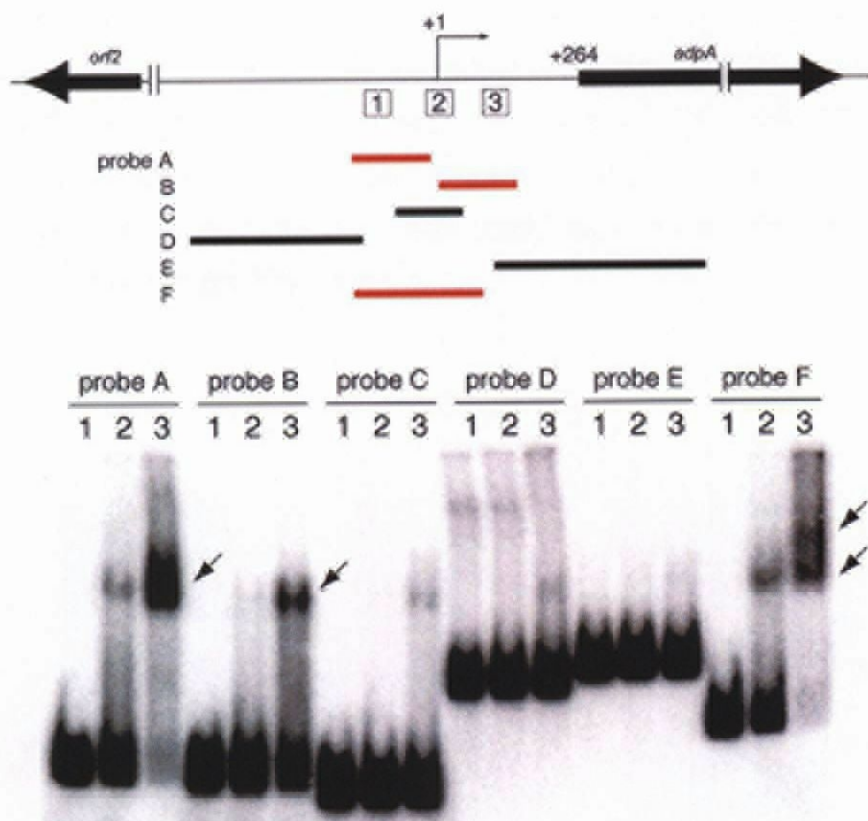


図 2.3-3 ゲルシフトアッセイによる AdpA の結合解析

用いたプローブは、probe A (-155~-10)、probe B (+6~+150)、probe C (-77~+47)、probe D (-465~-136)、probe E (+103~+495)、probe F (-155~+76) であり、上に *adpA* 上流領域の概略図とプローブの位置 (結合が見られたプローブは赤色) を示した。□で示した番号の位置は AdpA 結合部位 (後述) の site 1、site 2、site 3 を示す。矢印でシフトバンドを示した。

DNase I フットプリント法による AdpA 結合部位の決定

ゲルシフトアッセイにより示された AdpA 結合部位の位置を正確に決定するため、DNase I フットプリント法を行った。probe A における AdpA 結合部位を調べると、センス鎖においては -128~-85 の領域に結合が見られた。この領域中には AdpA 結合コンセンサス配列が 2カ所、-126~-117 (5'-TGACCGGATA-3') および -88~-97 (5'-TGGCTTAAAA-3')、が見られた (図 2.3-4 および図 2.3-10)。この結合部位を site 1 と呼ぶことにする。また、-112、-110、-100、-99 の位置はハイパーセンシティブサイトとなっているのが見られた。ハイパーセンシティブサイトは AdpA との複合体を形成した結果おこる DNA のゆがみ等で表面に露出し、DNase I と接触しやすくなったために DNase I による切断がより多くなって出現するものである。このような現象は DNA 結合蛋白を用いた DNase I フットプリント法においてはよく見られるものであり、これ

まで AdpA 標的遺伝子上流をプローブとしたアッセイでも見られたものである。site 1 のアンチセンス鎖について調べると、-87 ~ -128 の位置が結合領域であることがわかった。ハイパーセンシティブサイトは-126、-114、-113、-112、-102 に見られた。センス鎖、アンチセンス鎖ともに、これまでの AdpA 標的遺伝子における AdpA 結合部位では、1 領域のハイパーセンシティブサイトが見いだされるのみだったが、*adpA* 上流の site 1 は多数の領域が見られ、これまでとは異なる結合様式を示唆するものであった。

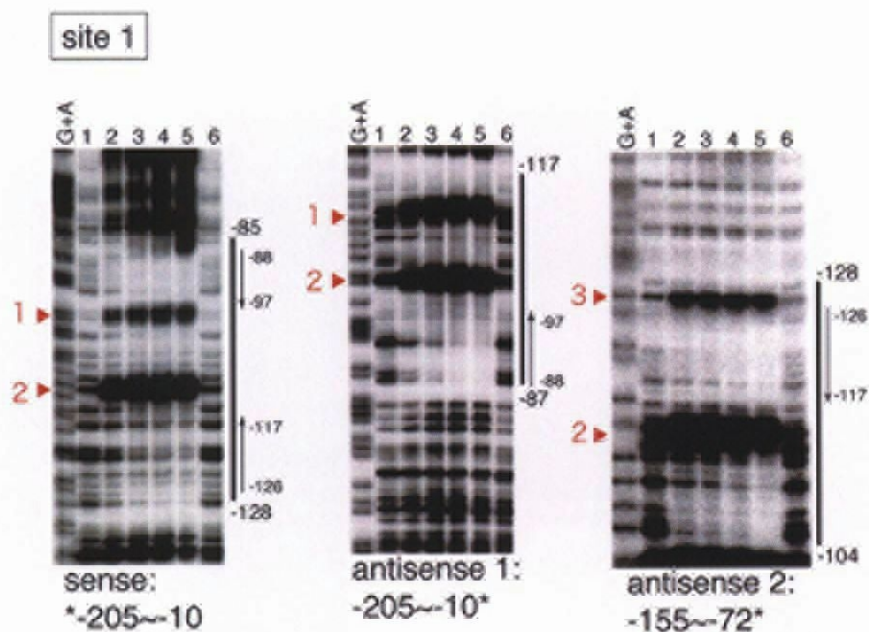


図 2.3-4 DNase I フットプリント法による *adpA* 上流の AdpA 結合部位決定 (site 1)

加えた AdpA の量は、レーン 1 : 0 μ g、レーン 2 : 0.04 μ g、レーン 3 : 0.1 μ g、レーン 4 : 0.2 μ g、レーン 5 : 0.4 μ g、レーン 6 : 0 μ g。下に用いたプローブの領域を示した。*は 32 P ラベルした側を示す。矢印は AdpA 結合コンセンサス配列の位置と方向。▼は DNase I ハイパーセンシティブサイトを示す (1 と 2 はセンス鎖、アンチセンス鎖ともほぼ同じ位置)。

次に、probe B における結合部位を調べた (図 2.3-5 および図 2.3-10)。その結果、センス鎖の +66~+94、およびアンチセンス鎖の+99~+66 に AdpA が結合していることがわかった。この結合領域を site 3 と呼ぶことにする。結合コンセンサス配列はアンチセンス鎖に 1 カ所、+85 ~ +76 (5'-TGGCGTGAAG-3') に見いだされた。また、アンチセンス鎖の+71、+72 の 2 塩基においてハイパーセンシティブサイトとなっているのが見られた。

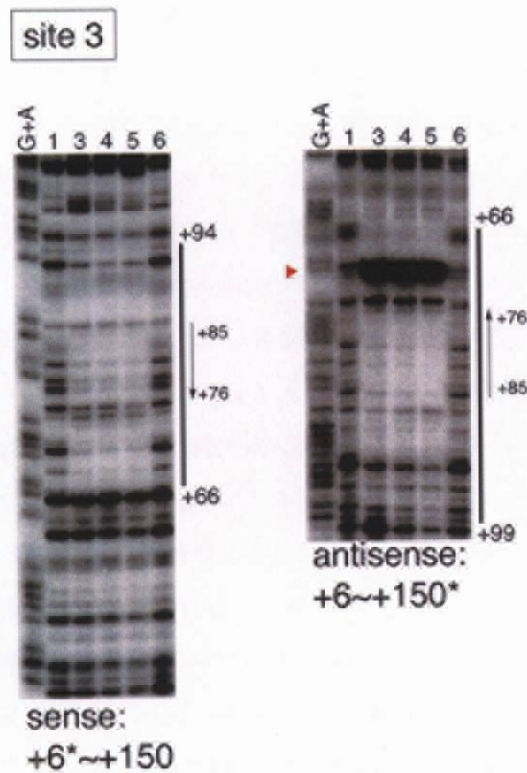


図 2.3-5 DNase I フットプリント法による *adpA* 上流の AdpA 結合部位決定 (site 3)

加えた AdpA の量は、レーン 1 : 0 μ g、レーン 3 : 0.1 μ g、レーン 4 : 0.2 μ g、レーン 5 : 0.4 μ g、レーン 6 : 0 μ g。下に用いたプローブの領域を示した。*は 32 P ラベルした側を示す。矢印は AdpA 結合コンセンサス配列の位置と方向。▼は DNase I ハイパーセンシティブサイトを示す。

site 1 と site 3 には AdpA が独立に結合する。しかしながら、以下に述べる site 2 は site 1 に AdpA が結合するときのみ AdpA が結合する、今までに見られない AdpA 結合を示した。上述のとおり、ゲルシフトアッセイ (図 2.3-3) の結果、probe A には AdpA ダイマーが 1 つ強く結合、probe C にはほんのかすかに AdpA ダイマーが 1 つ結合しているのが見られた。しかし、probe A と probe C の領域を両方含む probe F には強いアフィニティで 2 つ AdpA ダイマーが結合していることが示唆された。上記の DNase I フットプリント法による解析により、site 1 は -128 ~ -85 であることがわかったが、site 1 への AdpA 結合が、probe C の領域内の AdpA 結合を高めた結果、probe F では 2 つの AdpA ダイマーが強く結合しているのが見られたのではと考えた。予想通り、probe C を用いた DNase I フットプリント法では見られない AdpA 結合領域が、site 1 を含むプローブを用いることによって検出することができるようになった (図 2.3-6)。site 1 依存的に AdpA が結合するこの領域を site 2 と呼ぶ。このような「協調的結合」は他の AdpA 標的への AdpA 結合の例では見られなかった、*adpA* 上流への結合独特のものである。

site 2 としたこの領域は、-59 ~ +37 という異常に長い領域であった (ただし、結合領域を検出できたのはアンチセンス鎖のみである。site 1 を含む長いプローブを用いなければならないため、ゲル泳動上でセンス鎖の結合領域は技術的に検出不可能であった。そのため、以下の解析ではセンス鎖にもアンチセンス鎖と同じ領域で AdpA が結合しているとして進めている)。この長い site 2 領域を細かく見ると、結合領域はさらに -59 ~ -37、-36 ~ -16、-9 ~ +37 (それぞれ順に、site 2A、site 2B、site 2C とする) に分けることができた。これらは、それぞれ 1 つずつ AdpA 結合コンセンサス配列と相同な配列を含んでおり、site 2A: -56 ~ -47 (5'-TGGCCGGACA-3')、site 2B: -32 ~ -23 (5'-AGGCAGGAAC-3')、site 2C: +17 ~ +8 (5'-TGGCCCGTCC-3') であった (図 2.3-10)。また、フットプリント法を行った図 2.3-6 から分かるように、AdpA のアフィニティは site 2C > site 2A > site 2B であった。site 2C は AdpA 量の少ないレーン 2, 3 で結合が検出され、レーン 4, 5 でより強い結合が見られるのに対し、site 2A ではレーン 3 ~ 5 で同様に結合が検出される。site 2B ではレーン 4, 5 でのみ結合が検出されるからである。このアフィニティの差は、site 2A、2B、2C が含む AdpA 結合配列の、コンセンサス配列との相同性と一致する。site 2C では 8 塩基保存されているのに対し、site 2A、site 2B では 7 塩基保存されている。さらに、site 2B では保存されていない 2 塩基のうち 1 塩基はコンセンサス配列でもより保存性が高い塩基であった (図 2.3-7)。

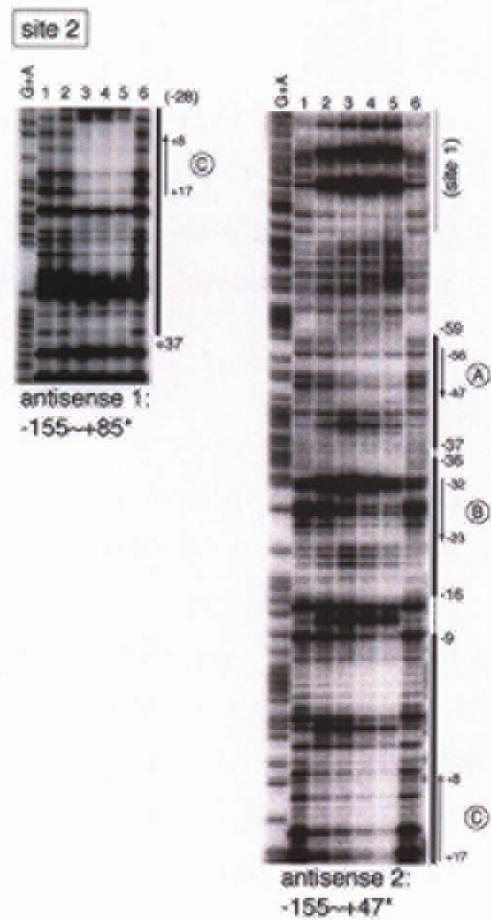


図 2.3-6 DNase I フットプリント法による *adpA* 上流の AdpA 結合部位決定 (site 2)

加えた AdpA の量は、レーン 1 : 0 μg 、レーン 2 : 0.04 μg 、レーン 3 : 0.1 μg 、レーン 4 : 0.2 μg 、レーン 5 : 0.4 μg 、レーン 6 : 0 μg 。下に用いたプローブの領域を示した。*は ^{32}P ラベルした側を示す。結合領域は実線で示したが、結合がない、もしくは弱くなっている箇所は点線で示してある。site 2A、site 2B、site 2C をそれぞれ○で囲った A、B、C で示した。

consensus	TGGCSNGWWY
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
site 1 (+)	TGACCCGATA
site 1 (-)	TGGCTTAAZA
site 2A (+)	TGGCCGGACA
site 2B (+)	AGGCAGGAAC
site 2C (-)	TGGCCCGTCC
site 3 (+)	TGGCGTGAAG

図 2.3-7 *adpA* 上流領域の AdpA 結合コンセンサス配列の比較

結合コンセンサス配列は 5'-TGGCSNGWWY-3' (S : G または C、W : A または T、Y : T または C、N : いずれの塩基でもよい)。AdpA 結合コンセンサスで特に高い保存性がある塩基を黒、次に保存性が高い塩基を灰色で (Yamazaki *et al.*, 2004) 示している。

AdpA の結合様式は、AdpA ダイマーの片方、または両方のサブユニットがそれぞれ結合コンセンサス配列に結合する、というもの (図 2.3-II 参照) であり、site 2 は3つにわけられるものの、各々1 つずつコンセンサス配列を持っていた。site 1 に AdpA ダイマー1 つが結合した後、それを受けて site 2 に AdpA ダイマー1 つのみが結合する様式についてはこれまでのモデルでは予想できなかった。そこで site 2 における AdpA の結合様式を調べるため、site 2A、2B、2C それぞれのコンセンサス配列の塩基を置換して AdpA が結合しない変異配列を作製し、それをプローブとすることにより DNase I フットプリント法を行った。置換した配列については図 2.3-8 に示した。その結果 (図 2.3-9)、site 2A、2B、2C どれに変異を入れても、変異を入れた部位への結合がなくなるのみで他の部位への結合に変化は見られなかった。このことから、site 2 への AdpA 結合は「site 1 に1 つ結合した AdpA ダイマーに助けられて、別の AdpA ダイマー1 つが 2A、2B、2C のいずれか1カ所を選んで結合する」ということが言える。その中でも、特にアフィニティの強い site 2C に AdpA は結合する傾向が強いと考えられる。

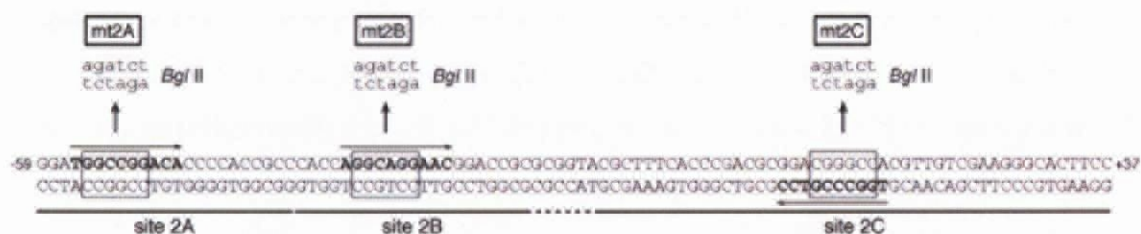


図 2.3-8 site 2 への変異導入

site 2A、site 2B、site 2C のそれぞれの配列と結合コンセンサス配列 (太字および矢印で示した)、変異導入を行った配列を示した。変異導入後はどれも *Bgl*III サイトになる。

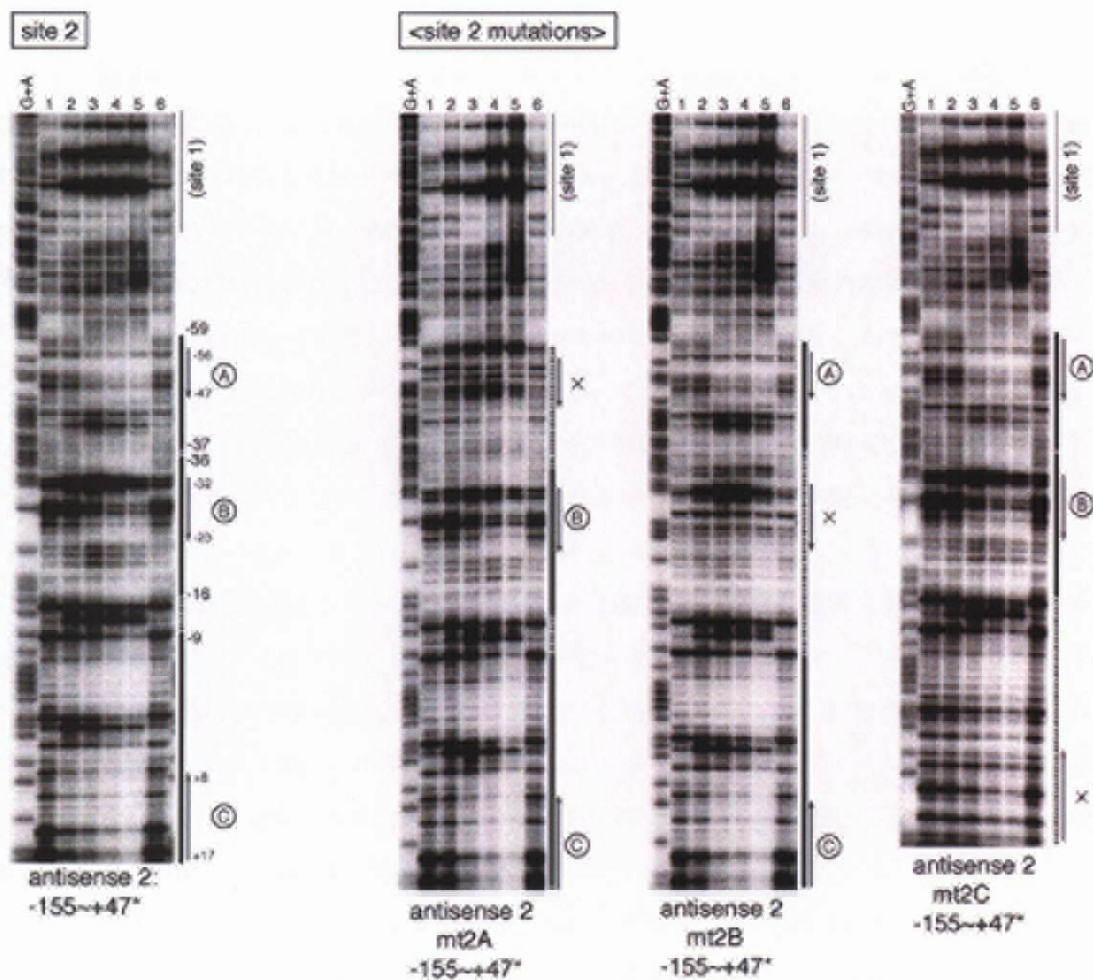


図 2.3-9 site 2 内のそれぞれの AdpA 結合コンセンサス配列への変異導入の影響

加えた AdpA の量は、レーン 1 : 0 μg 、レーン 2 : 0.04 μg 、レーン 3 : 0.1 μg 、レーン 4 : 0.2 μg 、レーン 5 : 0.4 μg 、レーン 6 : 0 μg 。下に用いたプローブの領域を示した。*は ^{32}P ラベルした側を示す。一番左に野生型のプローブで行った図 (図 2.3-6 と同じ) を比較のために載せた。変異型はそれぞれ、例えば site 2A の結合コンセンサス配列に変異を導入したものは mt2A とし、変異を導入したコンセンサス配列は配列の位置・方向を示す矢印の横に X を記すことで示した。結合領域は実線で示したが、結合がない、もしくは弱くなっている箇所は点線で示してある。

site 1、2、3における AdpA 結合コンセンサス配列の位置と方向

以上の解析により決定した *adpA* 上流領域の AdpA 結合部位について、全体の配列を図 2.3-10 に示す。これまで同定された AdpA の標的遺伝子上流には Type I または Type II のいずれかで結合する (図 2.3-11、Yamazaki *et al.*, 2004)。図 2.3-12 には *adpA* および AdpA 標的遺伝子について、AdpA 結合領域の位置と結合コンセンサスの位置・方向を示した。これら 3 つの図を比較すると、*adpA* 上流の site 3 にはタイプ II で結合、site 2 にも A、B、C のいずれかを選んで AdpA が 1 つ結合するのでタイプ II で結合すると考えられる。しかし、site 1 への AdpA の結合様式はタイプ I、II のいずれにも当てはまらない。2 つの結合コンセンサス配列は互いに向き合っており、Type I とは逆になっている。ゲルシフトアッセイで示されたように、シフトバンドは AdpA ダイマーが 1 つ結合した位置にシフトした。したがって、AdpA ダイマーは site 1 に 2 つは結合していない、すなわち、site 1 の 2 つのコンセンサス配列にタイプ II の様式で 2 つの AdpA ダイマーが結合しているのではない。さらに、site 1 の片方のコンセンサス配列を変異配列に置換するだけで site 1 への AdpA の結合が劇的に減少した (data not shown) ことから、1 つの AdpA ダイマーが結合するのに site 1 の両方のコンセンサス配列が必要であることが判明した。一方、DNase I フットプリント法で site 1 の AdpA 結合領域を決定した際、ハイパーセンシティブサイトが数多くみられた。ハイパーセンシティブサイトは蛋白質と DNA が結合した際の特異的な構造を示す指標であり、site 1 への AdpA 結合はこれまでの例とは異なっていることを示している。以上のことから、site 1 への AdpA 結合はこれまでの AdpA 標的遺伝子上流への結合とは異なるタイプ、いわば「Type III」の結合様式で結合していると考えられる。

このことは、以下のことから矛盾しない。AdpA が Type I の様式で結合するとき、2 つのコンセンサスの間のスペースの長さにはかなり自由がある (Yamazaki *et al.*, 2004)。すなわち、AdpA のダイマー形成に関わる N 末端領域と DNA 結合に関わる C 末端を結ぶリンカーはかなり柔軟な構造を持っており、ダイマーはかなり自由に構造を変えて DNA 結合をできるものと考えられる。また AdpA は AraC ファミリーに属するが、AraC 蛋白質も同様に柔軟なリンカーを持っている (Matthews, 1992; Schleif, 1987; Schleif, 2003)。AraC が結合するダイレクトリピート配列の間に 10 bp または 21 bp の配列を挿入しても、ダイレクトリピートを逆にしてインバーテッドリピートにしても、AraC は特異的な結合を失わない (Carra and Schleif, 1993)。これらのことは AdpA ダイマーの 1 つのサブユニットが 1 つの結合配列に対応して結合する場合、Type I の様式も、その全く逆向きの Type III の様式もとりうる、ということを示す実験結果と一致するものである。そして、転写活性化に関わる場合の Type I とは異なり、逆の Type III という site 1 での特殊な結合様式は、site 1 に結合した AdpA が何らかの相互作用によって site 2 へ AdpA をリクルートするという新たなモデルを説明するのに合致するものである。同時に site 1 と site 2 で AdpA 同士が相互作用し合い、DNA ループのような特殊な構造をとった状態で安定化し、転写

抑制を行っていると考えられる。site 3 は同じように site 2 の近くにありながら、このような機能は持っていない（後述）。

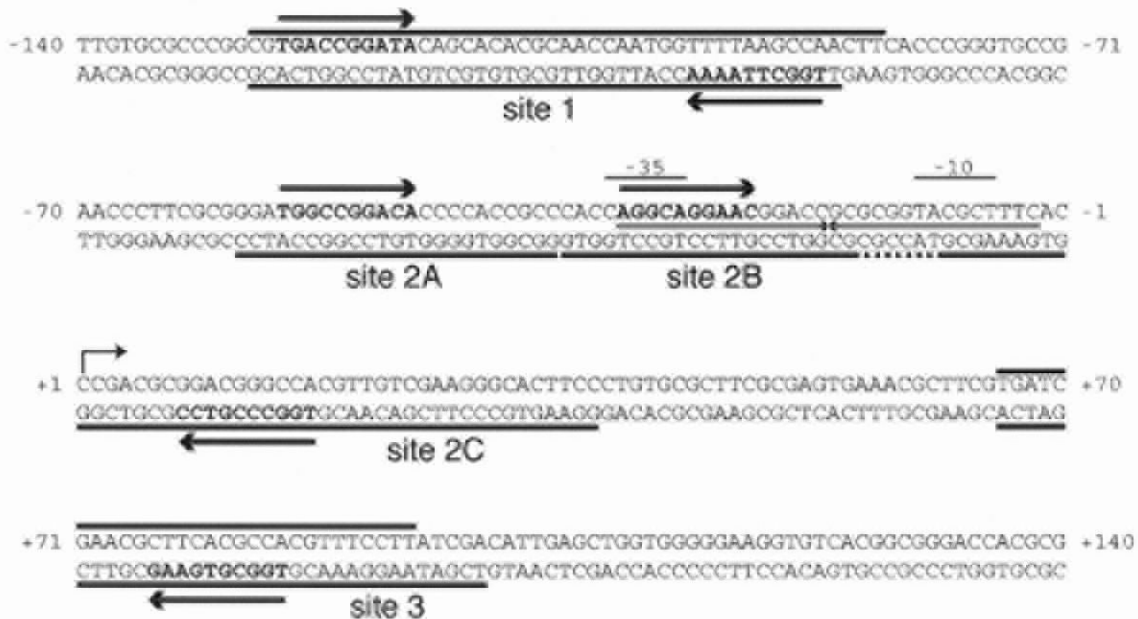


図 2.3-10 *adpA* のプロモーター周辺配列および AdpA 結合部位

転写開始点を+1として示している。プロモーターの-35および-10領域を示し、AdpA結合領域を示した。結合領域中の結合コンセンサス配列は太字と矢印で示した。

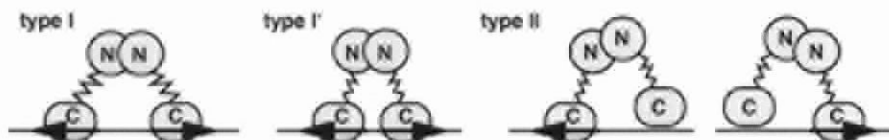


図 2.3-11 これまで明らかにされている AdpA の結合様式

AdpA はダイマーで標的遺伝子上流の AdpA 結合部位に結合する。Type I: 結合領域にコンセンサス配列が 2 つ、互いに逆向きにある場合。1 つのコンセンサス配列に 1 つの AdpA サブユニットが、C 末端にある DNA 結合ドメインを用いて結合する。Type I': Type I と同様だが、コンセンサス配列間の距離が短い場合。Type I はコンセンサス間の距離が 13-14 bp だが、Type I' の場合は 2 bp と距離が短い。これは N 末端領域と C 末端領域を結ぶリンカーが非常に柔軟なものであるためと考えられる。Type II: 結合領域にコンセンサス配列が 1 つだけある場合。AdpA はどちらか片方のサブユニットを用いてコンセンサス配列に結合する。

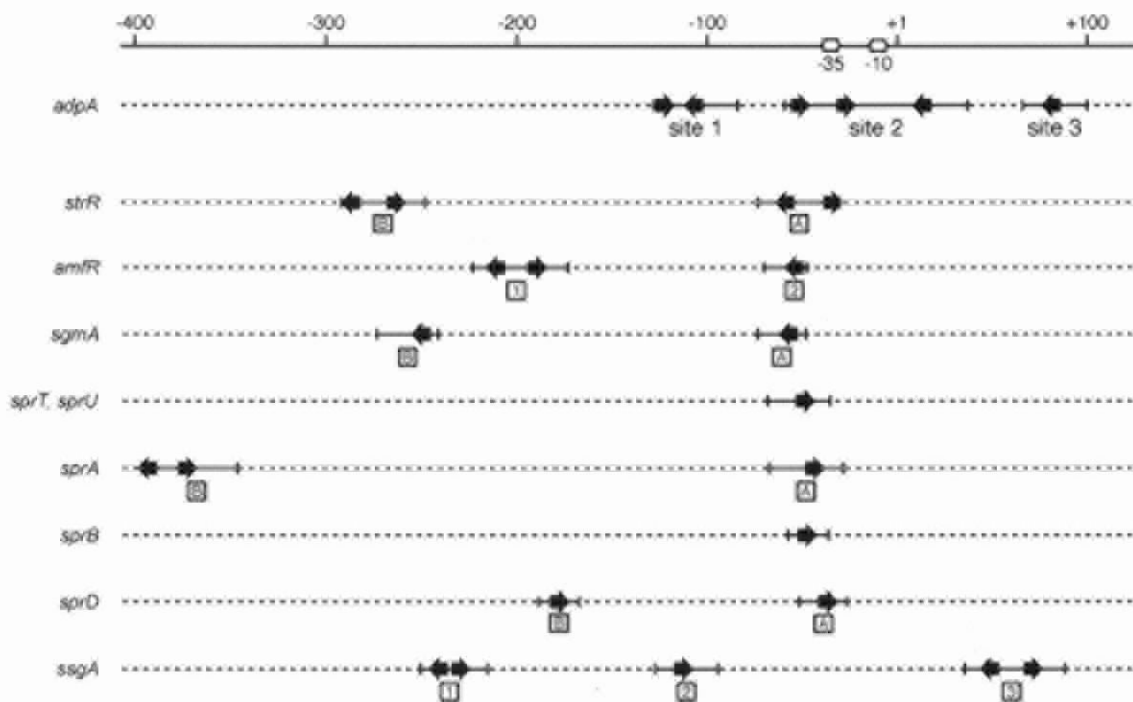


図 2.3-12 *adpA* およびこれまで AdpA による直接的転写活性化が証明された標的遺伝子の上流に位置する AdpA 結合領域

それぞれ転写開始点を+1として AdpA 結合領域を示した。結合領域の下にはそれぞれの結合部位の呼び名（結合部位が複数ある場合、*sgmA* の A-site であれば A と記す。）を記してある。

結合領域内の矢印は結合コンセンサス配列の位置・向きを表す。

AdpA 結合部位への変異導入

adpA 上流への AdpA 結合が実際自身の転写抑制に働くのかを調べるため、以上の AdpA 結合配列に変異を導入し、転写への影響を調べることにした。site 1 の 2 つのコンセンサス配列に変異導入したもの (mt1)、site 3 の 1 つのコンセンサス配列に変異導入したもの (mt3)、mt1 と mt3 を組み合わせたもの (mt13) の 3 種を作製した (図 2.3-13 および図 2.3-14)。なお、site 2 はプロモーター周辺にあり変異導入そのものがプロモーター活性に影響を与える可能性が高いこと、および site 1 に AdpA が結合したときのみ site 2 に AdpA が結合するので mt1 が site 2 に AdpA が結合しない変異にもなることから、作製しなかった。

変異導入配列に対し site 1~3 を含む probe 1 (-155~+148)、site 1, 2 を含む probe 2 (-155~+76)、site 2, 3 を含む probe 3 (-77~+148) を作製し、ゲルシフトアッセイを行うことにより変異の確認を行った (図 2.3-15)。probe 1 を用いたゲルシフトアッセイでは、シフトバンドが 3 ヶ所、それぞれ AdpA ダイマーが 1 分子、2 分子、3 分子結合したものに对应する位置に見られた。レーン 2 で見られるシフトバンドが site 1 に AdpA ダイマー 1 分子が結合したものであり、レーン 3

で見られるシフトバンド 2 本が site 2 または site 3 の片方、および両方にさらに AdpA ダイマーが結合したものである。これらのシフトバンドは mt13 変異で全て見られなくなった。probe 2 を用いたゲルシフトアッセイでは、レーン 2 で site 1、レーン 3 で site 1 と site 2 にそれぞれ AdpA ダイマーが結合したシフトバンドが見られ、mt1 変異で見られなくなった。これは site 1 への AdpA 結合依存的に site 2 への AdpA 結合が起こることを示す結果でもある。probe 3 を用いたゲルシフトアッセイではレーン 3 で site 3 に AdpA ダイマーが 1 分子結合したシフトバンドが見られ、mt3 変異ではシフトバンドが見られなくなった。これは site 3 への AdpA のアフィニティが site 1 に比べ弱いこと、site 3 への AdpA 結合は site 2 への AdpA 結合を促さないこと、を示す結果でもある。なお、ここで AdpA 量をさらに増やしてもシフトバンドの数、位置ともに変わらないことは確認している。

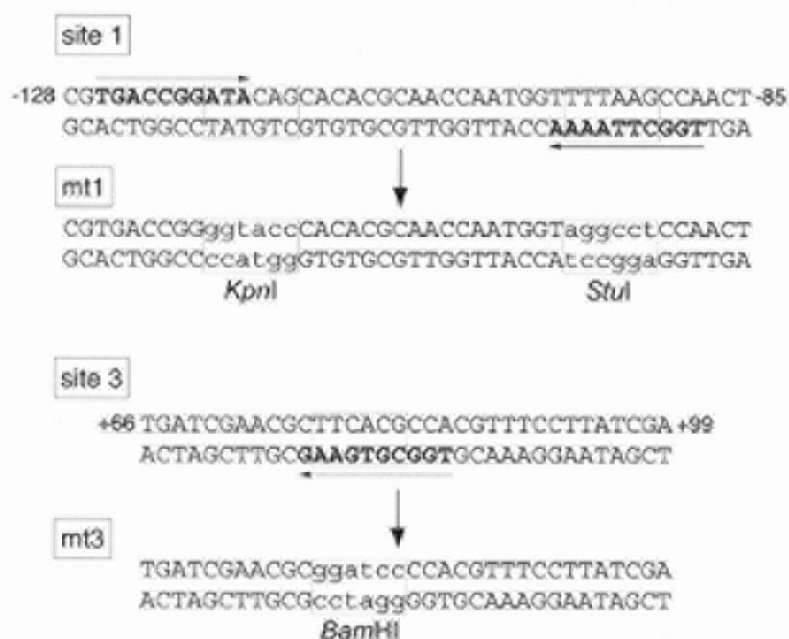


図 2.3-13 site 1 および site 3 への変異導入

site 1、site 3 それぞれの結合領域の塩基配列を示し、結合コンセンサス配列を太字と矢印で示した。変異を入れた領域は□で囲み、変異後の配列を小文字（制限酵素サイトになる）で示した。

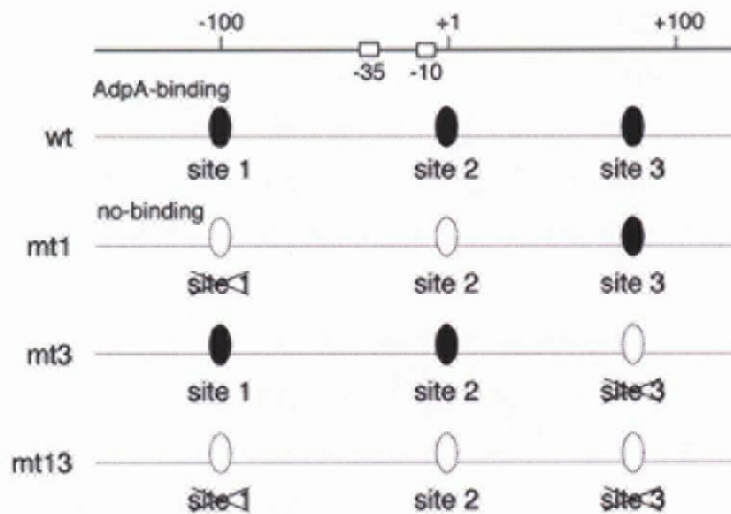


図 2.3-14 mt1、mt3、mt13 の変異導入概略図

adpA のプロモーター周辺と変異導入の位置関係を示した。変異を導入したサイトは×で表し、AdpA の結合は黒丸、非結合は白丸で示した。site 1 への変異導入で site 2 の AdpA 結合も失われる。

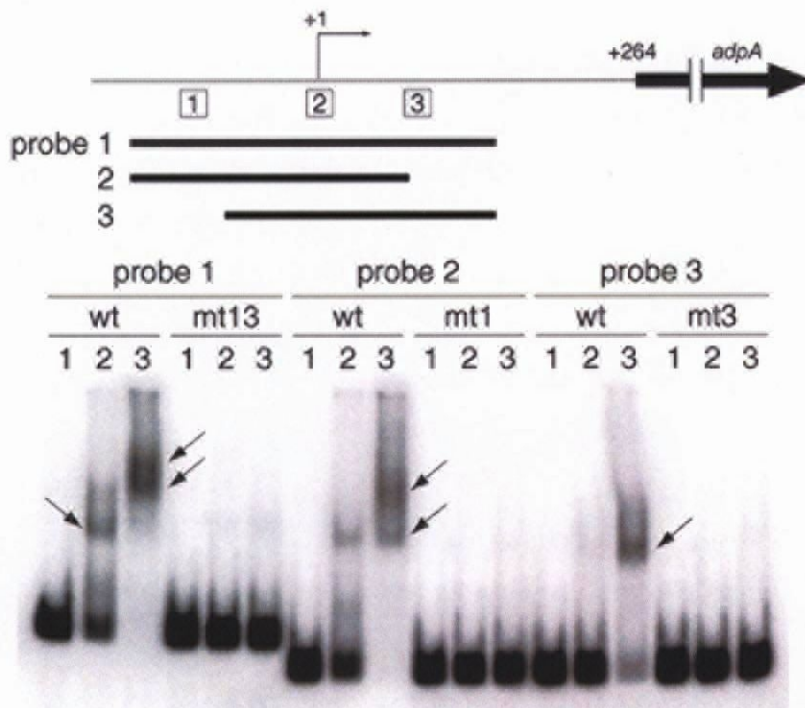


図 2.3-15 変異導入プローブを用いたゲルシフトアッセイによる AdpA 結合解析

用いたプローブは、probe 1 (-155~+148)、probe 2 (-155~+76)、probe 3 (-77~+148)。それぞれ野生型の場合と変異導入の場合のプローブを用いた。加えた AdpA の量は、レーン 1 : 0 μ g、レーン 2 : 0.04 μ g、レーン 3 : 0.2 μ g。シフトバンドの位置を矢印で示した。

AdpA 結合部位への変異導入が *in vivo* において *adpA* の転写に及ぼす影響

以上のように作製した *mt1* および *mt3* 変異を染色体に組み込んだ変異株を作製し、*adpA* の転写量を調べることにした。変異株の作製は第二章で MK2 株を作製したときと同じ手法で行った。なお、*mt13* 変異を導入した株の作製も試みたが、おそらく変異株は致死になるために取得することができなかった。取得した *mt1* 株、*mt3* 株はそれぞれ野生株と同様に生育し、形態分化を行っていた。

プレート培養した野生株、*mt1* 株、*mt3* 株を 24 時間、48 時間、72 時間で菌体を回収し、抽出した RNA を用いて SI マッピングを行い *adpA* の転写量を調べた (図 2.3-16)。培養 48 時間で転写量に大きな差が見られ、*mt1* 株、*mt3* 株ともに野生株より多くの *adpA* の転写量を示した。特に、*mt1* 株は *mt3* 株よりも転写量が多くなっていた。すなわち、AdpA が結合しなくなったことで脱転写抑制が起こった結果であるといえる。24 時間培養では *mt1* 株、*mt3* 株における *adpA* の転写量は野生株と同程度か少し多い程度であったが、これは細胞内の AdpA 濃度が抑制効果を発揮するまで到達していないためと考えられる。また $\Delta adpA$ 株では 24 時間における *adpA* の転写量が特に多かった (図 2.3-2) が、これは $\Delta adpA$ 株では AdpA が全くない状態のために生体内の状態は著しく異なっており、それが何らかの形で影響を及ぼしたことが考えられる。培養 72 時間においては *mt1* 株、*mt3* 株いずれでも転写が消失していた。

以上より、AdpA は細胞内濃度が一定以上になると自身の遺伝子上流に結合し、自身の転写を抑制することによって過剰な発現を抑える、ということが示された。また、取得を試みたものの取得できなかった *mt13* 株では過剰量の AdpA が発現したために生育に悪影響を及ぼし、致死になったのものと考えられる。

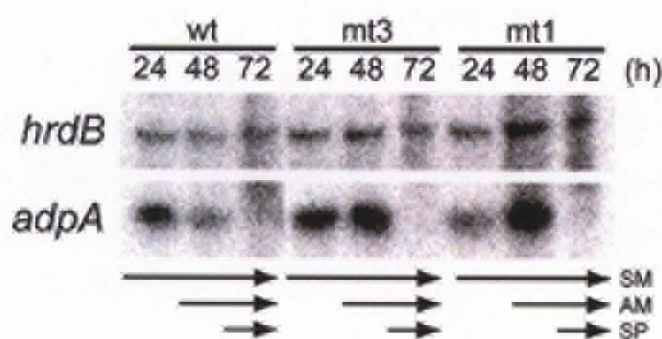


図 2.3-16 SI マッピング法による野生株と AdpA 結合部位変異導入株における *adpA* の転写量の比較

図 2.3-2 と同様にしてそれぞれの株を培養・回収、RNA 抽出をし、SI マッピングを行った。*hrdB* は恒常的に発現しているシグマ因子であり、RNA 量のコントロールである。SM: 基底菌糸、AM: 気中菌糸、SP: 胞子、を示す。

AdpA 結合部位への変異導入が *in vitro* において *adpA* の転写に及ぼす影響

さらに、*in vitro* 転写系を用いることによって上述した *in vivo* の結果を確認することにした。*adpA* の-274~+185 の領域を、野生型 (*adpA*-wt)、mt1 変異型 (*adpA*-mt1)、mt3 変異型 (*adpA*-mt3) それぞれをプローブとして用い、また、コントロールとして AdpA により転写の影響を受けない *hrdB* の-238~+150 をプローブとして用いて *in vitro* 転写アッセイを行った(図 2.3-17)。その結果、コントロールの *hrdB* は AdpA の添加による転写抑制は受けなかったが、*adpA*-wt は AdpA の添加により転写が抑制された。一方、*adpA*-mt1 では転写抑制が *adpA*-wt ほど見られなくなり、変異導入により脱転写抑制が起こっていた。しかし、*adpA*-mt3 では *adpA*-wt との差が見られなかった。これは site 3 への AdpA 結合アフィニティが弱いためと、*in vitro* と *in vivo* の DNA 構造の違いなどによるものであると思われる。

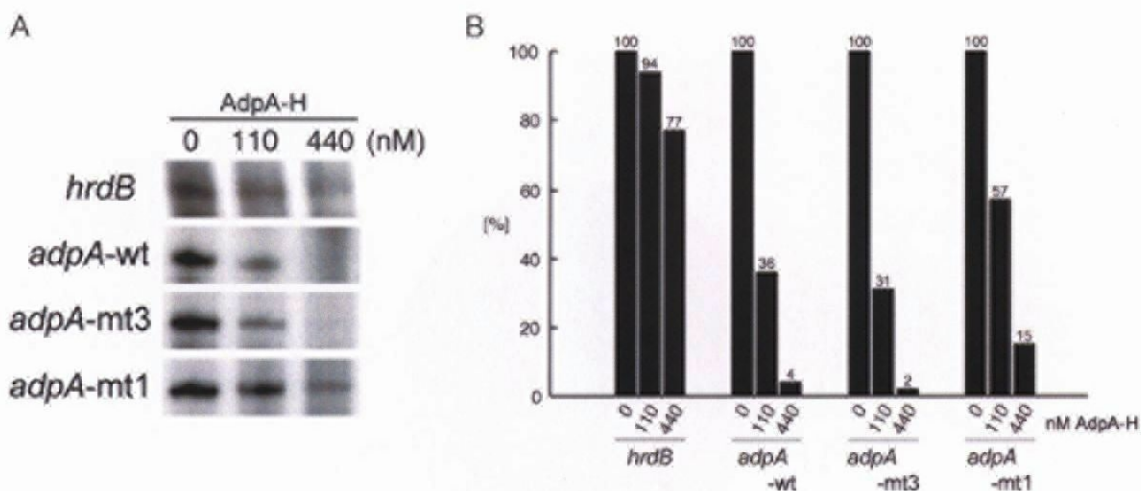


図 2.3-17 *in vitro* 転写アッセイを用いた AdpA 自己転写抑制の解析

(A) *in vitro* 転写アッセイによる AdpA 自己転写抑制。*hrdB* プロモーターをネガティブコントロールとし、野生型 *adpA* プロモーター (*adpA*-wt)、変異導入型 *adpA* プロモーター (*adpA*-mt3 および *adpA*-mt1) を用いて *in vitro* 転写を行った。それぞれ AdpA (AdpA-H) を反応系に加えたときの影響を比較した。(B)(A)の結果のバンドの濃さを Image Analyzer によって数値化・グラフ化することにより比較した。

AdpA 結合部位への変異導入がストレプトマイシン生産に及ぼす影響

最後に、*in vivo* における *adpA* の脱転写抑制による転写量増加を、形質を調べることも確認した。AdpA はストレプトマイシン生産の経路特異的転写因子である StrR をコードする遺伝子の転写活性化を行う。*adpA* をプロモーターを変えずに高コピーベクターに組み込み野

生株に導入すると、コピー数を反映してストレプトマイシン生産量が増加するのが観察されている (Ohoishi *et al*, 1999)。同様に、*adpA* の転写量が増加している *mt1* 株や *mt3* 株でもストレプトマイシン生産量の増加が見られるはずである。

野生株、*mt1* 株、*mt3* 株をそれぞれ5日間プレート培養し、指示菌として枯草菌を重層してストレプトマイシン生産を検出した。その結果、*mt1* 株、*mt3* 株ともに野生株より多くのストレプトマイシンを生産していることがわかり、特に *mt1* 株は多量のストレプトマイシンを生産していた (図 2.3-18)。標品を用いた検量線により生産量を算出すると野生株はコロニーあたり 10 μg 生産していたのに対し、*mt3* 株では 20 μg 、*mt1* 株では 100 μg ものストレプトマイシンを生産していた。この結果は *in vivo*、*in vitro* で示された、*site 1* (および *site 2*) と *site 3* への *AdpA* 結合は独立に自身の転写に抑制的にはたらくこと、*site 1* (および *site 2*) への *AdpA* 結合がより強い転写抑制効果を持つこと、と一致するものであった。



図 2.3-18 *AdpA* 自己転写抑制変異株のストレプトマイシン生産能の比較

野生株 (*wt*) と *adpA* 上流 *AdpA* 結合部位変異導入株 (*mt1* および *mt3*) をそれぞれグルコース無添加 Bennett 培地につまようじで点植菌し、28°C において5日間培養した。その後 *Bacillus subtilis* の胞子液を重層し、37°C で一晩培養してできた阻害円をストレプトマイシン生産量として検出した。同様にして標品のストレプトマイシンを用いてアッセイを行い、添加量と阻害円の大きさから検量線を作成して生産量を算出した。

2.3-III 討論

自己転写抑制のメカニズム

AdpA はこれまで形態分化・二次代謝に関する遺伝子群の「転写活性化」因子としての役割が示されていた。しかし、本研究により新たに自身に対しては「転写抑制」の役割を持っていることが明らかとなった。では、同じ分子の機能がどのようにして切り替わっているのだろうか？*adpA* の上流には AdpA 結合部位が 3 カ所見つかった。site 1 は AdpA とのアフィニティが強く、3 つある結合部位の中では細胞内 AdpA 濃度が高まってきて最初に AdpA が結合する部位と考えられる。そしてさらに細胞内 AdpA 濃度が高まると site 2 には site 1 依存的に AdpA が結合する。site 1 に結合した AdpA がなければ site 2 には AdpA は結合できないことから、単に site 1 に結合した AdpA が site 2 に AdpA をリクルートするだけでなく、これらの AdpA 分子同士は相互作用して結合した複合体を安定化していると考えられる。この際、site 1 と site 2 の AdpA ダイマーの相互作用により周囲の DNA は折れ曲がり、DNA ループが形成されているだろう。DNA ループの形成はプロモーターの構造を変化させ、RNA ポリメラーゼが近づけないような構造となり、結果として転写を阻害する。site 1 はプロモーターからかなり上流にあり、単独では転写抑制に関与しないと考えられるが、この site 2 との相互作用が転写抑制に強く関与しているであろう。site 2 はプロモーター直上に位置しており、RNA ポリメラーゼによる転写開始・伸長を妨げるような位置でもある。

site 1 と site 2 への協調的な AdpA 結合およびそれに続く転写抑制の例は入リプレッサーの例に似ている (Griffith *et al*, 1986; Hochschild and Ptashne, 1986)。入リプレッサーは最初に強いアフィニティの結合部位に結合し、次いで協調的にもう 1 カ所の、単独では非常に弱いアフィニティを示す結合部位に別の入リプレッサー分子が結合する。さらに、DNA に結合したこれら 2 つの入リプレッサー分子は C 末端側のドメイン同士で相互作用し、DNA を折り曲げ、DNA ループを形成して転写抑制を達成する。

DNA ループ形成に関しては、DNA 結合蛋白質が結合する DNA の面は同じ側に位置しなくてはならない (Hochschild and Ptashne, 1986; Lee and Schleif, 1989; Müller *et al*, 1996)。協調的結合を行う入リプレッサー、AraC、LacI はいずれも DNA の同じ面に結合し、蛋白質分子の間で相互作用が起こる。site 1 と site 2 に結合した AdpA は DNA の同じ面にあると考えられる。また、DNA に結合した蛋白質が互いに相互作用するために許容される結合部位間の距離についてだが、長すぎると距離が遠くなり相互作用を行いにくく、短いと DNA の自由度が低くなり DNA ループ形成に支障がでると考えられる。しかし、AraC は 500 bp より短い距離であれば結合部位間の距離を長くしても DNA ループを形成することができ (Lee and Schleif, 1989)、また AraR は 42 bp という短い距離であっても 2 つの結合部位で DNA ループを形成する (Mota *et al*, 2001)。

AdpA の場合、site 1 と site 2A の間は 58.5 bp であり、site 1 と site 2C の間は 129.5 bp であるので、これらの例にそえば結合部位の間の距離も DNA ループ形成には問題ない。以上の理由から、site 1 に結合した AdpA は site 2 に別の AdpA 分子をリクルートしつつ相互作用し安定化していると考えられるが、この際、ダイマー形成に用いていると考えられる、N 末端側の ThiJ/Pfpl/DJ-1 ファミリーに属するドメインを利用していると考えられる。ThiJ/Pfpl/DJ-1 ファミリーのドメインをもつ *Pyrococcus horikoshii* の PH704 は 3 つのダイマーが会合してヘキサマーを形成する (Du *et al.*, 2000) ことから妥当なモデルと言える。

アフィニティの弱い site 3 についてであるが、これは転写開始点よりもかなり下流に位置する。したがって、AdpA の細胞内濃度がかかなり高まったときに site 3 にも AdpA が結合し、RNA ポリメラーゼの転写伸長を妨げることで転写抑制を行っているだろう。ただし、実験で示されたように site 1 および 2 よりは転写抑制への寄与は低い。

このようにして、AdpA は標的遺伝子の転写活性化に代わり、自身には転写抑制作用を持つ。AdpA は濃度が高まってまず転写には直接影響しない site 1 に結合し、さらに濃度が高まったときに site 2 や site 3 に結合して転写抑制を達成する。すなわち、標的遺伝子の転写活性化に十分な濃度でも、濃度がそれほど高くないとき自己抑制は働かない。これらの仕組みは、AdpA 濃度が生体内の秩序を乱すほどに高まらないよう調節する、AdpA 濃度のセンサーとしても適しているといえる。

A-ファクター制御カスケード内における *adpA* の転写調節モデル

adpA の転写は ArpA、A-ファクター、AdpA によって調節される複雑な制御によって成り立っていることが明らかになった。*adpA* の上流領域には図 2.3-19 のように ArpA と AdpA が重なって関与している。

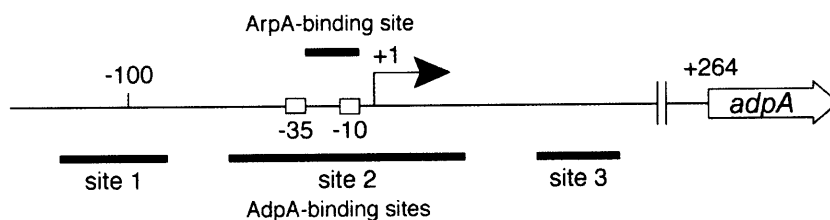


図 2.3-19 *adpA* 上流領域の ArpA および AdpA に対するオペレーター領域の概略図

adpA の転写開始点を +1 としてプロモーター領域、翻訳開始点 (+264) を示し、ArpA および AdpA が結合する領域を示した。

さらに *adpA* の転写調節について時間軸にそってモデルをまとめたのが図 2.3-20 である。stage 1 :

生育初期、A-ファクター濃度は閾値に達しておらず、ArpA が *adpA* のプロモーターに結合し転写を抑制している。stage 2：生育が進み A-ファクター濃度が閾値に達すると A-ファクターは ArpA と結合し、*adpA* プロモーターから ArpA は解離する。*adpA* の転写が開始・活性化する。stage 3：AdpA は形態分化・二次代謝に関与する様々な遺伝子の転写活性化を行う。また AdpA はある程度の濃度に達すると自身の遺伝子上流の site 1 に結合するが、*adpA* の転写活性は高く維持されている。stage 4：転写・翻訳された AdpA が蓄積し細胞内濃度が高くなると自身の遺伝子上流の site 2 および site 3 にも結合し、*adpA* の転写が抑制される。

このようにして AdpA は厳密な発現調節を可能にして過剰発現しないよう調節されている。

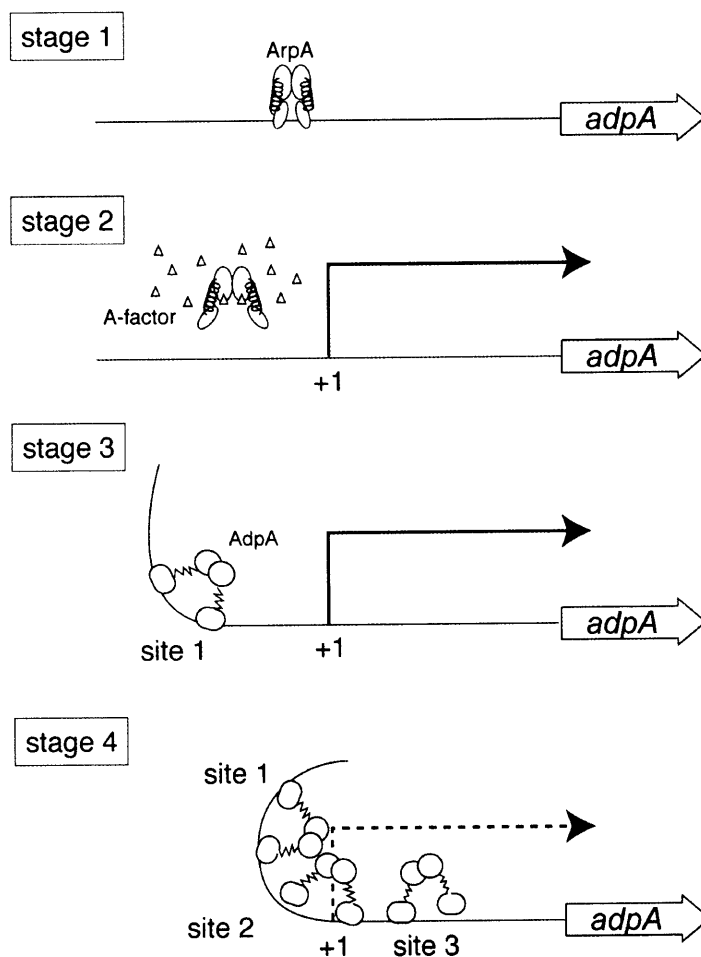


図 2.3-20 時系列にそった *adpA* プロモーターの調節機構

しかしながら、以上のモデルでは *adpA* の転写調節について完全には説明できない点もある。図 2.3-2 のように、 $\Delta adpA$ 株では AdpA が全くないにもかかわらず培養 48 時間で *adpA* の転写が抑制されている。このメカニズムについてはいまだ不明であり、さらに別の *adpA* 転写調節機

構の存在を示すものである。mt1 株、mt3 株でも遅れて 72 時間で *adpA* の転写は強く抑制されており (図 2.3-16)、自己抑制とは別の、同じ機構が働いていると考えられる。 $\Delta adpA$ 株は AdpA が発現しないので生体内の状態は著しく異なり、その影響でこの別の抑制機構が早く働いているのだろう。また、野生株でも培養後期 (72 時間) における転写抑制は、自己転写抑制を離れてこの別の抑制機構によっていると考えられる。つまり、AdpA の自己転写抑制は、ArpA による抑制が解除されて AdpA の発現が活性化している状態での細胞内 AdpA 濃度調節であり、最終的な発現の抑制・収束はまた別の機構によるものだと考えられる。

図 2.3-21 に本研究までで明らかになった A-ファクターカスケード上流の因子間の制御様式についてまとめた。

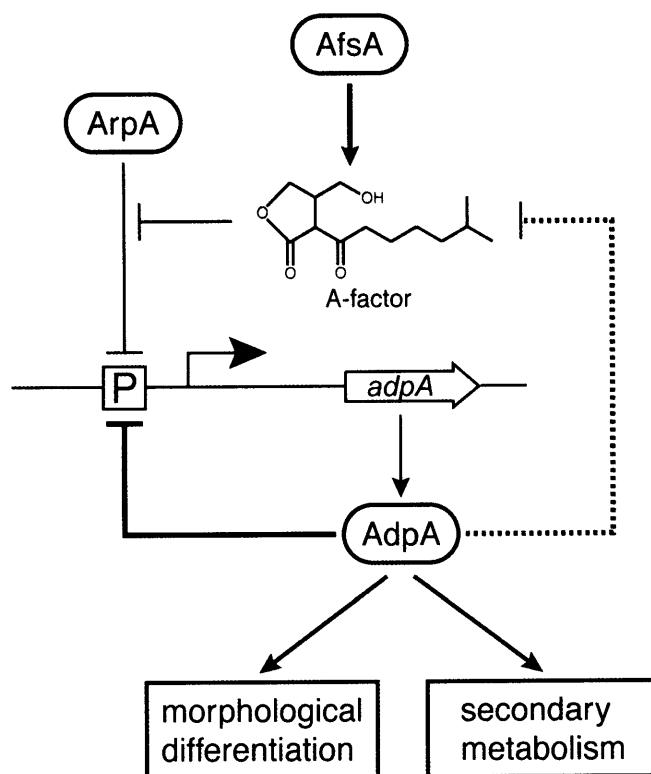


図 2.3-21 A-ファクター制御カスケード全体の AdpA による調節モデル

adpA は A-ファクター受容体 ArpA によって転写を抑制されている。AfsA の関与により A-ファクターの生合成が行われる。A-ファクターシグナルによる抑制解除にともなって、カスケードの鍵となる転写活性化因子 AdpA はシグナルを二次代謝・形態分化といった表現型に伝達する。それと同時に AdpA は A-ファクター生産を負に調節し (第二章参照)、また自身の転写を抑制することによって厳密に発現調節を行っている。P: *adpA* プロモーター。

AdpA の自己転写抑制の生物学的重要性

A-ファクターは閾値に達すると、ArpA によって止められているカスケードのスイッチをオンにし、速やかに形態分化・二次代謝へのシグナル伝達がスタートする。ここで ArpA の次のシグナル伝達因子は AdpA であり、二章で述べたように AdpA が少なくとも ArpA 標的として最も主要な因子である。よって、シグナルの速やかな伝達のために細胞内 AdpA も速やかに上昇する。一方、AdpA により形態分化や生理的分化とも言うべき二次代謝が誘導され、細胞内では劇的な生理状態の変化が起こる。速やかに細胞内濃度が上昇した AdpA がそのまま過剰な発現を続けると、このような状態変化の厳密な制御ができずに生体内に悪影響を及ぼす。これは mt1 株、mt3 株は取得できたにもかかわらず自己抑制が完全にはずれて AdpA が大過剰に発現すると考えられる mt13 株を取得できなかったことから推測される。このように、AdpA の自己抑制は、生体内の恒常性を維持しつつも形態分化・二次代謝という劇的な変化を遂げるのに必要な厳密な制御機構といえる。

一方で、AdpA は *Streptomyces* 属で保存された転写因子であると考えられており、*S. coelicolor* A3(2)のオルソログである AdpAc/BldH は AdpA と同様に形態分化に必須の転写活性化因子であることが明らかにされている (Takano *et al.*, 2003)。そこで、さらに全ゲノム解析が終了した *S. avermitilis* から見つかった AdpA オルソログを含め、3 種類の AdpA 遺伝子上流配列を比較してみた。すると、AdpA 結合領域の塩基配列は site 2A、site 2B を除いて良く保存されていた。本研究の結果から site 1 と site 2C、site 3 があればこの自己抑制機構が働くには十分であると言える。そして実際、*S. griseus* の AdpA を用いゲルシフトアッセイを行うことにより、AdpAc/BldH をコードする遺伝子上流領域のプロンプとの結合を調べてみると結合が確認された (data not shown)。*S. griseus* の AdpA と AdpAc/BldH の DNA 結合ドメインは 100%アミノ酸配列が一致していることから、AdpAc/BldH でも認識して結合する配列は同じであると考えられる。すなわち、AdpAc/BldH も自身の遺伝子上流に結合して自己転写抑制を行っていることが推察され、AdpA はそのアミノ酸配列だけでなく、自己転写抑制機能とセットで保存されていると考えられる。

2.3-IV 材料および方法

以下、特に記載のないものはこれまで述べた実験と同様の材料・方法である。以下の記述で名前のみ記したプライマーの位置、配列等については表 2.3-1 にまとめた。

S1 マッピング法による転写解析

RNA 抽出法、および S1 マッピング法は前章までと同じ方法である。*hrdB* の転写は *hrdB*-F と *hrdB*-R* の組み合わせ (*のプライマーを ³²P ラベルした)、*adpA* の転写は S1-F と S1-R* の組み合わせを用いて作製したプローブを用いて検出した。

ゲルシフトアッセイ

AdpA の調製方法、プローブの作製方法、反応条件などは前章までと同様である。プローブ作製に用いたプライマーの組み合わせについて記述する。

probe A : gs-F1+gs-R1、probe B : gs-F2+gs-R2、probe C : gs-F3+gs-R3、probe D : gs-F4+gs-R4、probe E : gs-F5+gs-R5、probe F : gs-F6+gs-R6、probe 1 : gs-F1+gs-R7、probe 2 : gs-F1+gs-R6、probe 3 : gs-F3+gs-R7

DNase I フットプリント法

AdpA の調製方法、プローブの作製方法、反応条件などは前章までと同様である。プローブ作製に用いたプライマーの組み合わせについて記述する。なお、以下のプライマーのうち*は ³²P ラベルしたプライマーであることを示す。

site 1-sense : fp-F1*+gs-R1

site 1-antisense 1 : gs-F1+fp-R1*

site 1-antisense 1 : gs-F1+fp-R2*

site 2-antisense 1 : gs-F1+fp-R3*

site 2-antisense 2 : gs-F1+fp-R3*

site 3-antisense : gs-F2+gs-R2*

AdpA 結合部位 (site 1 および site 3) への変異導入

site 3 における *AdpA* 結合コンセンサス配列中の TTCACG を、GGATCC (*Bam*HI 切断配列) に PCR を用いて以下の要領により置換した。まず、変異導入配列を付加したプライマーを用いて上流及び下流の配列を増幅した。up-F と 5'-CGCGGATCCGCGTTTCGATCACGAAGCGTT-3' (+76 ~+57、下線は *Bam*HI 切断配列)、5'-CGCGGATCCCCACGTTTCCTTATCGACAT-3' (+83 ~+102、

下線は *Bam*HI 切断配列) と *gs-R5* のプライマーによりそれぞれ増幅し、*Sph*I (-593 位) と *Bam*HI、*Bam*HI と *Sac*I (+371 位) で切断後、両断片を *Bam*HI を介して結合したものを pUC19 の *Sph*I-*Sac*I サイトにクローニングした。PCR エラーがないことは塩基配列解読により確認した。この変異導入配列を *mt3* と呼び、プラスミドを *pMT3* と呼ぶことにする。

同様に、*site 1* における 2 つの *AdpA* 結合コンセンサス配列中の TTTAAG および ATACAG を、それぞれ AGGCCT (*Stu*I 切断配列) および GGTACC (*Kpn*I 切断配列) に置換した。最初に *Stu*I 切断配列への配列置換を行った後、その配列を鋳型として *Kpn*I 切断配列への配列置換を行うことで 2 つの変異導入を行った。用いたプライマーの組み合わせは、*Stu*I 切断配列への配列置換は up-F と 5'-AAGGCCTACCAATTGGTTGCGTGTGCTG-3' (-97~-116、下線は *Stu*I 切断配列)、5'-AAGGCCTCCAACCTCACCCGGGTGCCG-3' (-90~-71、下線は *Stu*I 切断配列) と *gs-R5* である。 *Kpn*I 切断配列への配列置換は up-F と 5'-CGGGGTACCCCGGTCACGCCGGGCGCAC-3' (-120~-139、下線は *Kpn*I 切断配列)、5'-CGGGGTACCCACACGCAACCAATGGTAGG-3' (-113~-94、下線は *Kpn*I 切断配列) と *gs-R5* である。この変異導入配列を *mt1* と呼び、プラスミドを *pMT1* と呼ぶことにする。

また、*mt1* と *mt3* 両方が導入された変異配列 (*mt13*) をもつプラスミド (*pMT13*) の作製は、*mt1* と *mt3* を *Nru*I (+47 位) サイトを利用して組み合わせることにより行った。

mt1、*mt3*、*mt13* の染色体への導入方法は *sgmA* における *AdpA* 結合部位への変異導入や、*arpA::W119A* 変異導入の場合と同じである。ここでは変異導入用プラスミド構築について記しておく。変異導入を行ってクローン化された *Sph*I-*Sac*I 断片 (-593~+371) を *Sph*I-*Sac*I で切り出し、上流 2.6 kb の *Pst*I-*Sph*I 断片および下流 2.7 kb の *Sac*I-*Xba*I 断片と結合し pUC19 の *Sac*I-*Xba*I サイトに組み込んだ。このマルチクローニングサイトにある *Hind*III サイトに、Tn5 よりカナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子である *aphII* (Beck *et al.*, 1982) を 1.4 kb の *Hind*III 断片として切り出したものを挿入して変異導入用プラスミドとした。このプラスミドを *E. coli* JM110 株にて大量調製し、形質転換を行い染色体に組み込んだ後、さらに 2 回目の組み換えを起こさせて変異株を選択・取得した。

AdpA 結合部位 (*site 2*) への変異導入

site 1 および *site 3* の場合と同様であるので、用いたプライマーの組み合わせについてのみに記す。

site 2A における *AdpA* 結合コンセンサス配列、GGCCGG (-55~-50) を AGATCT (*Bg*III 切断配列) に以下のプライマーの組み合わせを用いた PCR により変異導入配列を作製した。up-F と 5'-GAAGATCTATCCCGCGAAGGGTTCCGGCA-3' (-56~-75、下線は *Bg*III 切断配列)、5'-GAAGATCTACACCCACCGCCACCAGG-3' (-49~-30、下線は *Bg*III 切断配列) と *gs-R5*。

この変異導入配列を mt2A と呼び、プラスミドを pMT2A と呼ぶことにする。

site 2B における AdpA 結合コンセンサス配列、GGCAGG (-31~-26) を AGATCT (*Bg*II 切断配列) に以下のプライマーの組み合わせを用いた PCR により変異導入配列を作製した。up-F と 5'-GAAGATCTTGGTGGGCGGTGGGGTGTCC-3' (-32~-51、下線は *Bg*II 切断配列)、5'-GAAGATCTAACGGACCGCGCGGTACGCT-3' (-25~-6、下線は *Bg*II 切断配列) と gs-R5。この変異導入配列を mt2B と呼び、プラスミドを pMT2B と呼ぶことにする。

site 2C における AdpA 結合コンセンサス配列、CGGGCC (+11~+16) を AGATCT (*Bg*II 切断配列) に以下のプライマーの組み合わせを用いた PCR により変異導入配列を作製した。up-F と 5'-GAAGATCTTCCGCGTCGGGTGAAAGCGT-3' (+10~-10、下線は *Bg*II 切断配列)、5'-GAAGATCTACGTTGTCTGAAGGGCACTTC-3' (+17~+36、下線は *Bg*II 切断配列) と gs-R5。この変異導入配列を mt2C と呼び、プラスミドを pMT2C と呼ぶことにする。

in vitro 転写実験

RNA ポリメラーゼホロ酵素は *S. griseus* IFO13350 の培養後期菌体から調製したものをを用いた (Yamazaki *et al*, 2003)。[α -³²P]CTP (30 TBq/mmol) は Amersham Pharmacia Biotech. から購入したものをを用い、Hopwood らによるマニュアル (Kieser *et al*, 2000) に従って行った。 *adpA* の鋳型プローブとしては rf-F と rf-R プライマーを用いて PCR 増幅したプローブ (-274~+185, 459 bp) をを用いた。コントロールとした *hrdB* の鋳型プローブとしては hrdB-F2 と hrdB-R2 プライマーを用いて PCR 増幅したプローブ (-238~+150, 388 bp) をを用いた (*hrdB* の転写開始点については Shinkawa *et al*, 1995 を参照)。

RNA ポリメラーゼ (63 nM) を 0.5 pMol の鋳型 DNA、0-440 nM AdpA とともに transcription buffer (40 mM Tris-HCl (pH7.9), 10 mM MgCl₂, 0.6 mM EDTA, 0.4 mM potassium phosphate, 1.5 mM DTT, 0.75 mg/ml BSA, 20% (v/v) glycerol) にて合計 37 μ l とし、30°C で 5 分間インキュベート。2 μ l の RTP mix (ATP, GTP, UTP それぞれ 33 mM) と 1 μ l の [α -³²P]CTP (0.37 MBq) を加えることで転写反応を開始させ、30°C で 2 分間インキュベートした。その後 1 μ l のヘパリン (終濃度 0.1 mg/ml) を加え 30°C で 5 分間インキュベートし、2 μ l の cold CTP (終濃度 1 mM) を加えて 30°C で 10 分間インキュベートすることで未反応の伸長反応を完全に終わらせ、氷上に移すことで反応を止めた。反応液は 10 μ l の precipitation mix (0.1 mg/ml tRNA, 0.4 M sodium acetate (pH6.0)) と 60 μ l のイソプロパノールにてイソプロパノール沈殿し、80%エタノールリンス後、run-off loading buffer (80% (v/v) formamide, 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) xylene cyanol, 0.1% (w/v) bromophenol blue) に溶解した。サンプルは 90°C で 2 分間熱処理後、6% polyacrylamide gel (S1 マッピングと同じ組成) で電気泳動し Image Analyzer で検出した。

表 2.3-1 使用したプライマー

Gene	Primer	Positions	Sequence(5' to 3')
<i>hrdB</i>			
	hrdB-F	+193 to +170	TCGATGAGCGCCATCACAGACTCG
	hrdB-R	-121 to -98	TCGGCCCATTTTCGTCACGTATGAG
	hrdB-F2	-238 to -214	TACCCGCGCCGCGCGAGCACTGACC
	hrdB-R2	+150 to +127	GGAGCGTACGGGATGTGCTGGCCG
<i>adpA</i>			
	S1-F	+54 to +31	ACTCGCGAAGCGCACAGGGAAGTG
	S1-R	-223 to -200	AGCCCCCGCATCCCTCCGCGGCGA
	gs-F1	-155 to -136	GCCTTCAGGCGACGGTTGTG
	gs-R1	-10 to -29	TACCGCGCGGTCCGTTCTG
	gs-F2	+6 to +25	GCGGACGGGCCACGTTGTGCG
	gs-R2	+150 to +131	TCTACTGCGTCGCGTGGTCC
	gs-F3	-77 to -58	GGTGCCGAACCCTTCGCGGG
	gs-R3	+47 to +28	AAGCGCACAGGGAAGTGCCC
	gs-F4	-465 to -446	CCCTCACCCGGTCCCTGTTG
	gs-R4	-136 to -117	GCGCCCGCGTGACCGGATA
	gs-F5	+103 to +122	TGAGCTGGTGGGGGAAGGTG
	gs-R5	+495 to +476	CGGTGAGTTCGAGCCCACCG
	gs-F6	-155 to -136	GCCTTCAGGCGACGGTTGTG
	gs-R6	+76 to +57	GCGTTCGATCACGAAGCGTT
	gs-F7	-274 to -255	CGGTCCGTAATCCGGCCCTG
	gs-R7	+281 to +262	GGCGGAGTCCTGGCTCATGA
	gs-F8	-77 to -58	GGTGCCGAACCCTTCGCGGG
	gs-R8	+43 to +24	GCACAGGGAAGTGCCCTTCG
	fp-F1	-205 to -186	GCGATCCGAACACGCCATCG
	fp-R1	-72 to -91	GGCACCCGGGTGAAGTTGGC
	fp-R2	+85 to +66	TGGCGTGAAGCGTTCGATCA
	fp-R3	+47 to +28	AAGCGCACAGGGAAGTGCCC
	up-F	-704 to -685	GGCGGTGAAGCTCTGTCCGG

rf-F	-274 to -255	CGGTCGGTAATCCGGCCCTG
rf-R	+185 to +166	GCACGTGTCCCCAGTCTCCG

第三部 総括

第一章では、*S. griseus* の栄養増殖には関与しないトリプシン型分泌プロテアーゼ SprT、SprU および分泌メタロプロテアーゼ SgmA は A-ファクター制御カスケード内の AdpA レギュロンの構成員であることを明らかにした。他にキモトリプシン型分泌プロテアーゼも AdpA により発現が促されていることが明らかになっている (Tomono *et al.*, 2005)。さらに本研究では SSI ファミリー阻害蛋白質 SgiA も AdpA により発現制御を受けていることを明らかにした。AdpA により発現が促された分泌プロテアーゼに対し、同じく AdpA により発現が促されたプロテアーゼ阻害蛋白質がその活性を抑制しており、これらの転写レベル、翻訳後レベルでの複雑な調節によって細胞外のプロテアーゼ活性が調節されているのは興味深い。プロテアーゼについては AdpA 以外の転写制御も示唆された。しかしながら、細胞外プロテアーゼの生物学的意味を明らかにするには至らなかった。決定的な証拠は得られていないものの、私はやはりその機能としてはアポトーシス様の菌糸分解を介した形態分化への関与を考えている。この点については、菌糸分解の現象についてミクロな形質観察ができるようになればプロテアーゼの関与にも触れつつ、新たな生物学的な意義を見いだせるかもしれない。現在の放線菌の形質観察方法は肉眼での形態観察というマクロな方法が大部分である。しかし近年は GFP や免疫染色、化学染色法を利用した顕微鏡観察が放線菌の系でも発達してきており、このような形質観察法を導入し形態分化の過程で起きている現象を詳細に観察できるようになれば、これまで見いだせなかったユニークな形質を見いだせるかもしれない。

また、AdpA の新規標的遺伝子取得という意味でも本研究ではカスケードの研究を前進させた。しかしながら、少なくとも AdpA 依存的な黄色色素生産に関与する標的遺伝子はいまだに同定されていないことも含め、AdpA の標的遺伝子は他にも多数存在することが考えられる。折しも醗酵学研究室では *S. griseus* の全ゲノム解析が完了しようとしている。今後はゲノム情報を最大限に利用した研究により、AdpA を介して広がるカスケード下流の構成因子の新規同定は推進されるであろう。そしてさらには二次代謝・形態分化の他の制御系と A-ファクター制御カスケードとの相互作用はもちろんのこと、本研究のプロテアーゼと阻害蛋白質の間の調節のような AdpA 標的間での相互作用も見つかってくると考えられる。大規模な研究によって新たなネットワークが見えてくるに違いない。

第二章、第三章では ArpA の詳細な機能解析とともにカスケード内における AdpA の重要性を示し、さらに AdpA の新たな転写制御機構を見いだした。A-ファクターシグナルを伝達する ArpA は *adpA* のみを制御し、二次代謝と形態分化を支配する。γ-ブチロラクトンシグナルの制御系と AdpA による制御系が一体となった *S. griseus* の制御系は、γ-ブチロラクトンシグナル受容体の機能も含め、他の *Streptomyces* とは異なっていることが本研究での比較により明ら

かとなった。これは二次代謝と形態分化の主要な制御系を進化という視点から考察する上でも興味深いのではないだろうか。そしてカスケードの鍵となる AdpA は自身の転写抑制を行うことでシグナル伝達の調節を行っていることを明らかにした。これはカスケード構成因子の厳密な発現調節機構を明らかにしたものであり、また AdpA の転写因子としての新規な機能を示したものである。しかし一方では本研究内でも示された通り、まだ明らかにされていない調節機構がカスケード内でははたらいっている。カスケードの動き・調節を詳細に説明できるようになるには、さらなる研究の展開が必須である。図 3-1 に本研究をまとめた。

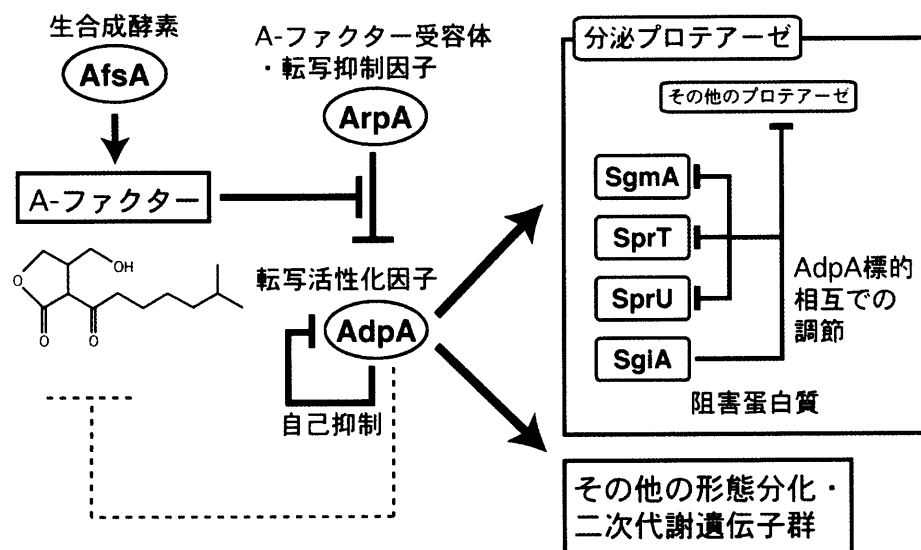


図 3-1 本研究のまとめ

本論文では触れていないが、私は A-ファクターの生合成機構についても遺伝学的・酵素学的なアプローチから本研究と並行して取り組んできており、現在も解析を進めている。A-ファクター制御カスケードの制御システムがどのようなにはたらき、調節されて形態分化と二次代謝を制御しているか、については本研究を含めたこれまでの研究により明らかになってきている。一方で、菌体密度や栄養条件、その他様々な環境因子を集約して二次代謝・形態分化の引き金を引く根本となる、A-ファクターの生合成機構はいまだ不明である。これが明らかになれば A-ファクター制御カスケードの理解にむけて大きな一歩になることは間違いない。また、A-ファクター制御カスケードは遺伝子発現制御に重点を置いて研究が推進されているが、A-ファクターの生合成も二次代謝も「基質」が必要であり、遺伝子発現制御に限らない、細胞内の化学的な代謝の動きがカスケードの調節に関与してくるはずである。カスケード起点の理解に加え、このような違った側面からカスケードを解析し考察する上でも生合成研究は重要である。

参考文献

Ando, N., Ueda, K. and Horinouchi, S. A *Streptomyces griseus* gene (*sgaA*) suppresses the growth disturbance caused by high osmolality and a high concentration of A-factor during early growth. *Microbiology* **143** (Pt 8), 2715-2723 (1997a).

Ando, N., Matsumori, N., Sakuda, S., Beppu, T. and Horinouchi, S. Involvement of *afsA* in A-factor biosynthesis as a key enzyme. *J. Antibiot.* **50**, 847-852 (1997b).

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingstone, R. E., Moore, D. O., Seidman, J. S., Smith, J. A. and Struhl, K. *Current protocols in molecular biology*. (JohnWiley&Sons,Inc., New York,N.Y., 1987).

Bandyopadhyay, S. and Cookson, M. R. Evolutionary and functional relationships within the DJ1 superfamily. *BMC Evol. Biol.* **4**, 6 (2004).

Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. and Schaller, H. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* **19**, 327-336 (1982).

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., and Hopwood, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147 (2002).

Bentley, S. D., Brown, S., Murphy, L. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Parkhill, J., Barrell, B. G., McCormick, J. R., Santamaria, R. I., Losick, R., Yamasaki, M., Kinashi, H., Chen, C. W., Chandra, G., Jakimowicz, D., Kieser, H. M., Kieser, T. and Chater, K. F. SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **51**, 1615-1628 (2004).

Brown, K. L., Wood, S. and Buttner, M. J. Isolation and characterization of the major vegetative RNA polymerase of *Streptomyces coelicolor* A3(2); renaturation of a sigma subunit using GroEL. *Mol. Microbiol.* **6**, 1133-1139 (1992).

Carra, J. H. and Schleif, R. F. Variation of half-site organization and DNA looping by AraC protein. *EMBO J.* **12**, 35-44(1993).

Du, X., Choi, I.-G., Kim, R., Wang, W., Jancarik, J., Yokota, H. and Kim, S.-H. Crystal structure of an intracellular protease from *Pyrococcus horikoshii* at 2 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14079-14084 (2000).

Fernandez, M. and Sanchez, J. Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *Microbiology* **148(Pt 2)**, 405-412 (2002).

Folcher, M., Gaillard, H., Nguyen, L. T., Nguyen, K. T., Lacroix, P., Bamas-Jacques, N., Rinkel, M. and Thompson, C. J. Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **276**, 44297-44306 (2001).

Griffith, J., Hochschild, A. and Ptashne, M. DNA loops induced by cooperative binding of λ repressor. *Nature* **322**, 750-752 (1986).

Hara, O. and Beppu, T. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus* - the role of A-factor. *J. Antibiot.* **35**, 349-358 (1982).

Hashimoto, K., Nihira, T., Sakuda, S. and Yamada, Y. IM-2, a butyrolactone autoregulator, induces production of several nucleoside antibiotics in *Streptomyces* sp. FRI-5. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 449-455 (1992).

Hochschild, A. and Ptashne, M. Cooperative binding of λ repressors to sites separated by integral turns of the DNA helix. *Cell* **44**, 681-687 (1986).

Horinouchi, S., Kumada, Y. and Beppu, T. Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* **158**, 481-487 (1984).

Horinouchi, S. and Beppu, T. A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **12**, 859-864 (1994).

Horinouchi, S., Onaka, H., Yamazaki, H., Kameyama, S. and Ohnishi, Y. Isolation of DNA fragments bound by transcriptional factors, AdpA and ArpA, in the A-factor regulatory cascade. *Actinomycetologica* **14**, 11-16 (2000).

Horinouchi, S. AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 462-467(2003).

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. and Omura, S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**, 526-531 (2003).

Ishikawa, J. and Hotta, K. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 251-253 (1999).

Jones, L. J., Carballido-Lopez, R. and Errington, J. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**, 913-922 (2001).

Kieser, H., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. and Hopwood, D. A. *Practical Streptomyces Genetics* (The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom, 2000).

Kim, D. W., Chater, K., Lee, K. J. and Hesketh, A. Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **187**, 2957-2966 (2005).

Kim, J.-M. and Hong, S.-K. *Streptomyces griseus* HH1, an A-factor deficient mutant, produces diminished level of trypsin and increased level of metalloproteases. *J. Microbiol.* **38**, 160-168 (2000).

Kim, I.-S., and Lee, K.-J. Physiological roles of leupeptin and extracellular proteases in mycelium development of *Streptomyces exfoliatus* SMF13. *Microbiology* **141**, 1017–1025 (1995a).

Kim, I.-S., Kang, S.-G. and Lee K.-J. Physiological importance of trypsin-like protease during morphological differentiation of streptomycetes. *J. Microbiol.* **33**, 315–321 (1995b).

Kim, I.-S., and Lee, K.-J. Trypsin-like protease of *Streptomyces exfoliatus* SMF13, a potential agent in mycelial differentiation. *Microbiology* **142**, 1797–1806 (1996).

Kim, I.-S., Kim, Y.-B. and Lee, K.-J. Characterization of the leupeptin-inactivating enzyme from *Streptomyces exfoliatus* SMF13 which produces leupeptin. *Biochem. J.* **331**, 539–545 (1998).

Kim, J.-C., Cha, S.-H., Jeong, S.-T., Oh, S.-K. and Byun, S.-M. Molecular cloning and nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* trypsin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 707–713 (1991).

Kinoshita, H., Ipposhi, H., Okamoto, S., Nakano, H., Nihira, T. and Yamada, Y. Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J. Bacteriol.* **179**, 6986-6993 (1997).

Kitani, S., Yamada, Y. and Nihira, T. Gene replacement analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (FarA) reveals that FarA acts as a novel regulator in secondary metabolism of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J. Bacteriol.* **183**, 4357-4363 (2001).

Khokhlov, A. S., Tovarova, I. I., Borisova, L. N., Pliner, S. A., Schevchenko, L. A., Kornitskaya, E. Y., Ivkina, N. S. and Rapoport, I. A. The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl Akad Nauk SSSR* **177**, 232-235 (1967).

Kojima, S., Kumazaki, T., Ishii, S. and Miura, K. Primary structure of *Streptomyces griseus* metalloendopeptidase II. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1392-1398 (1998).

Kuramoto, A., Lezhava, A., Taguchi, S., Momose, H. and Kinashi, H. The location and deletion of the genes which code for SSI-like protease inhibitors in *Streptomyces* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**, 37-42 (1996).

Lee, D. H. and Schleif, R. F. *In vivo* DNA loops in *araCBAD*: size limits and helical repeat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 476-480 (1989).

Lezhava, A., Kameoka, D., Sugino, H., Goshi, K., Shinkawa, H., Nimi, O., Horinouchi, S., Beppu, T. and Kinashi, H. Chromosomal deletions in *Streptomyces griseus* that remove the *afsA* locus. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 478-483 (1997).

Lin, Y. S., Kieser, H. M., Hopwood, D. A. and Chen, C. W. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* **10**, 923-933 (1993).

Matthews, K. S. DNA looping. *Microbiol. Rev.* **56**, 123-136 (1992).

Mendez, C., Brana, A. F., Manzanal, M. B. and Hardisson, C. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 446-450 (1985).

Miguélez, E. M., Hardisson, C. and Manzanal, M. B. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J. Cell Biol.* **145**, 515-525 (1999).

Miguélez, E. M., Hardisson, C. and Manzanal, M. B. Streptomycetes: a new model to study cell death. *Int. Microbiol.* **3**, 153-158 (2000).

Miyake, K., Horinouchi, S., Yoshida, M., Chiba, N., Mori, K., Nogawa, N., Morikawa, N. and Beppu, T. Detection and properties of A-factor-binding protein from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **171**, 4298-4302 (1989).

Miyake, K., Kuzuyama, T., Horinouchi, S. and Beppu, T. The A-factor-binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation. *J. Bacteriol.* **172**, 3003-3008 (1990).

Mota, L. J., Sarmiento, L. M. and de Sá-Nogueira, I. Control of the arabinose regulon in *Bacillus subtilis* by AraR *in vivo*: crucial roles of operators, cooperativity, and DNA looping. *J. Bacteriol.* **183**, 4190-4201 (2001).

Müller, J., Oehler, S. and Müller-Hill, B. Repression of *lac* promoter as a function of distance, phase and quality of an auxiliary *lac* operator. *J. Mol. Biol.* **257**, 21-29 (1996).

Murao, S., Sato, S., and Muto, N. Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 1737-1744 (1972).

Nakai, R., Horinouchi, S. and Beppu, T. Cloning and nucleotide sequence of a cellulase gene, *casA*, from an alkalophilic *Streptomyces* strain. *Gene* **30**, 229-238 (1988).

Nakano, H., Takehara, E., Nihira, T. and Yamada, Y. Gene replacement analysis of the *Streptomyces virginiae barA* gene encoding the butyrolactone autoregulator receptor reveals that BarA acts as a repressor in virginiamycin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **180**, 3317-3322 (1998).

Natsume, R., Ohnishi, Y., Senda, T., and Horinouchi, S. Crystal structure of a γ -butyrolactone autoregulator receptor protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Mol. Biol.* **336**, 409-419 (2004).

Nguyen, K. T., Tenor, J., Stettler, H., Nguyen, L. T., Nguyen, L. D. and Thompson, C. J. Colonial differentiation in *Streptomyces coelicolor* depends on translation of a specific codon within the *adpA* gene. *J. Bacteriol.* **185**, 7291-7296 (2003).

Nicieza, R. G., Huergo, J., Connolly, B. A. and Sanchez, J. Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation. Analogies with the biochemical processes described in late steps of eukaryotic apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 20366-20375 (1999).

Nihira, T. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. Signal transduction mechanism through γ -butyrolactone autoregulators and their receptors. *Kagaku to Seibutsu* **40**, 275-281 (2002).

Nishiyama, M., Matsubara, N., Yamamoto, K., Iijima, S., Uozumi, T. and Beppu, T. Nucleotide sequence of the malate dehydrogenase gene of *Thermus flavus* and its mutation directing an increase in enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **261**, 14178-14183 (1986).

- Obata, S., Taguchi, S., Kumagai, I., and Miura, K.** Molecular cloning and nucleotide sequence determination of gene encoding *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI). *J. Biochem.* **105**, 367-371 (1989).
- Okamoto, S., Nakamura, K., Nihira, T. and Yamada, Y.** Virginiae butanolide binding protein from *Streptomyces virginiae*. Evidence that VbrA is not the virginiae butanolide binding protein and reidentification of the true binding protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 12319-12326 (1995).
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H. and Horinouchi, S.** The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* : identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* **34**, 102-111 (1999).
- Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J., Tomono, A. and Horinouchi, S.** AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 431-439 (2005).
- Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T. and Horinouchi, S.** Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **177**, 6083-6092 (1995).
- Onaka, H. and Horinouchi, S.** DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequences. *Mol. Microbiol.* **24**, 991-1000 (1997).
- Retzlaff, L. and Distler, J.** The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol. Microbiol.* **18**, 151-162 (1995).
- Robbins, P. W., Trimble, R. B., Wirth, D. F., Hering, C., Maley, F., Maley, G. F., Das, R., Gibson, B. W., Royal, N. and Biemann, K.** Primary structure of the *Streptomyces* enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* **259**, 7577-7583 (1984).
- Sarath, G., De La Motte, R. S. and Wagner, F. W.** Protease assay methods, p. 25-55. In Beynon, R. J. and Bond, J. S. (ed.), *Proteolytic enzymes: a practical approach*. IRL Press, Oxford, England (1989).

Schneider, D., Bruton, C. J. and Chater, K. F. Duplicated gene clusters suggest an interplay of glycogen and trehalose metabolism during sequential stages of aerial mycelium development in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* **263**, 543-553 (2000).

Schleif, R. Gene regulation: why should DNA loop? *Nature* **327**, 369-370 (1987).

Schleif, R. AraC protein: a love-hate relationship. *Bioessays* **25**, 274-282 (2003)..

Shinkawa, H., Hatada, Y., Okada, M., Kinashi, H. and Nimi, O. Nucleotide sequence of a principal sigma factor gene (*hrdB*) of *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* **118**, 494-499 (1995)..

Strohl, W. R. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* **20**, 961-974 (1992).

Stratigopoulos, G., Gandeche, A. R. and Cundliffe, E. Regulation of tylosin production and morphological differentiation in *Streptomyces fradiae* by TylP, a deduced γ -butyrolactone receptor. *Mol. Microbiol.* **45**, 735-744 (2002).

Sugiyama, M., Onaka H., Nakagawa, T. and Horinouchi, S. Site-directed mutagenesis of the A-factor receptor protein: Val-41 important for DNA-binding and Trp-119 important for ligand-binding. *Gene* **222**, 133-144 (1998).

Taguchi, S., Kikuchi, H., Kojima, S., Kumagai, I., Nakase, T., Miura, K. and Momose, H. High frequency of SSI-like protease inhibitors among *Streptomyces*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 522-524 (1993).

Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Miura, K. and Momose, H. Comparative studies on the primary structures and inhibitory properties of subtilisin-trypsin inhibitors from *Streptomyces*. *Eur. J. Biochem.* **220**, 911-918 (1994).

Taguchi, S., Odaka, A., Watanabe, Y. and Momose, H. Molecular characterization of a gene encoding extracellular serine protease isolated from a subtilisin inhibitor-deficient mutant of *Streptomyces albobriseolus* S-3253. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 180-186 (1995a).

Taguchi, S. Communication between protease and protease inhibitor in the *Streptomyces* world. *Actinomycetologica* **9**, 216-227 (1995b).

Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Kumazawa, Y., Kohriyama, H., Suzuki, M., Miura, K. and Momose, H. Molecular phylogenetic characterization of *Streptomyces* protease inhibitor family. *J. Mol. Evol.* **44**, 542-551 (1997).

Takano, E., Nihira, T., Hara, Y., Jones, J. J., Gershater, C. J., Yamada, Y. and Bibb, M. Purification and structural determination of SCB1, a γ -butyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Biol. Chem.* **275**, 11010-11016 (2000).

Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y. and Bibb, M. J. A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **41**, 1015-1028 (2001).

Takano, E., Tao, M., Long, F., Bibb, M. J., Wang, L., Li, W., Buttner, M. J., Bibb, M. J., Deng, Z. X. and Chater, K. F. A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **50**, 475-486 (2003).

Tomono, A., Tsai, Y., Yamazaki, H., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. Transcriptional control by A-factor of *strR*, the pathway-specific transcriptional activator for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**, 5595-5604 (2005a).

Tomono, A., Tsai, Y., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. Three chymotrypsin genes are members of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**, 6341-6353 (2005b).

Tsuyuki, H., Kajiwara, K., Fujita, A., Kumazaki, T. and Ishii, S. Purification and characterization of *Streptomyces griseus* metalloendopeptidases I and II. *J. Biochem.* **110**, 339-344 (1991).

Ueda, K., Umeyama, T., Beppu, T. and Horinouchi, S. The aerial mycelium-defective phenotype of *Streptomyces griseus* resulting from A-factor deficiency is suppressed by a Ser/Thr kinase of *S. coelicolor* A3(2). *Gene* **169**, 91-95 (1996).

van den Ent, F., Amos, L. A. and Lowe, J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**, 39-44 (2001).

Vujaklija, D., Ueda, K., Hong, S. K., Beppu, T. and Horinouchi, S. Identification of an A-factor-dependent promoter in the streptomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 119-128 (1991).

Vujaklija, D., Horinouchi, S. and Beppu, T. Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *strR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **175**, 2652-2661 (1993).

Waki, M., Nihira, T., Yamada, Y. Cloning and characterization of the gene (*farA*) encoding the receptor for an extracellular regulatory factor (IM-2) from *Streptomyces* sp. strain FRI-5. *J. Bacteriol.* **179**, 5131-5137 (1997).

Wildermuth, H. Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 43-50 (1970).

Yamada, Y., Sugamura, K., Kondo, K., Yanagimoto, M. and Okada, H. The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **40**, 496-504 (1987).

Yamazaki, H., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor ($\sigma^{A_{USA}}$) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **182**, 4596-4605 (2000).

Yamazaki, H., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. Transcriptional switch on of *ssgA* by A-factor, which is essential for spore septum formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **185**, 1273-1283 (2003a).

Yamazaki, H., Takano, Y., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. *amfR*, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **50**, 1173-1187 (2003b).

Yamazaki, H., Tomono, A., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. DNA-binding specificity of AdpA, a transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **53**, 555-572 (2004).

Yang, K., Han, L., Vining, L. C. Regulation of jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: involvement of a repressor gene, *jadR2*. *J. Bacteriol.* **177**, 6111-6117 (1995).

謝辞

私は卒論生として醜酵学研究室に配属され、修士課程、博士課程と計6年間醜酵学研究室で研究を行ってきました。その充実した研究室生活の中で鍛えられ、本研究を遂行することができましたが、恵まれた環境と研究テーマに巡り会えたのは非常に幸福なことでした。醜酵学研究室教授、堀之内末治先生に厚く御礼申し上げます。堀之内先生には恵まれた環境とテーマを頂いただけでなく、実際の研究の現場では、微生物に関する膨大な知識をもとに様々な現象、実験データを俯瞰した、貴重なアドバイスを頂きました。研究の進め方に関しても非常に厳しく教育をして頂いたおかげで大きく成長することができたと思います。また、お酒の席を通じて研究だけでなく様々な教養溢れるお話を頂いたおかげで、自分の無知を痛感するとともに知的好奇心を刺激され、学んだことも数多くありました。人生の中でもこれまでで最も「知」について自ら考えさせられた期間でした。

醜酵学研究室助教授、大西康夫先生とは、地下の12号室で6年間、同じ部屋で研究させていただきました。卒論生としての1年目は直接ご指導頂いたのを始め、日々の研究生活であった発見や問題について気になったことはよく報告、相談に行かせて頂きました。その度ごとに詳細な議論を重ね、アドバイス等を頂きました。データの解釈等、自分の中で行き詰まっていたことが先生との議論で非常にクリアになったことが幾度となくありました。研究以外にも日常生活の身近な、様々なことでお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

醜酵学研究室助手、鮎信学先生には私が卒論生の時から修士課程までは学生の先輩として、よくかわいがって頂きました。研究に対する真摯な姿勢、取り組み方、熱い志からは、尊敬する先輩として今でも多くの刺激を頂いています。また、私が博士課程に進学し、助手になられても以前と同じように接して頂いており、大変嬉しく、有り難く思っております。

理化学研究所、吉田稔先生には醜酵学研究室助教授としておられた、私が卒論生、修士1年生の2年間に特にお世話になりました。ゼミでの鋭い質問、意見には常に感服され続けました。理化学研究所に移られてからもゼミではたびたびご一緒することができ、真核生物の最先端の研究現場の一端を見せて頂くことで視野が大きく広がったと思います。ありがとうございました。

醜酵学研究室のたくさんの先輩方、同期、後輩たちには、大変お世話になるとともに様々な刺激をもらい、そのおかげで自分がここまでこれたのだと思っています。研究面から日常生活面、全てでお世話になりました。一緒にお酒を飲んでいろいろな話をして、リフレッシュしてまた研究に取り組むことができる、そのようなすばらしいサイクルの中で非常に楽しい研究室生活を送ることができました。たくさんの方々にお世話になり、一人一人お名前を挙げて行くと限りがありません。A-ファクター関連の近いテーマで研究をさせて頂いた山崎美佳さんには、私がA-ファクター関連の仕事をはじめた卒論生の後半から、懇切丁寧に教えて頂く機会が幾度と

なくありました。そのおかげで今の研究が展開できたと思っており、大変感謝しております。ここでお名前を挙げさせていただきます。それから、後輩として私について研究を共に行った、イ・ソッキさん、宮久郁夫君、平野節さん、チ・ウォンジェさんたちに感謝します。私は色々と至らない点もありましたが、私を素直に信用して、熱心の実験に取り組む姿にはこちらも初心を思い起こされ、新鮮な気持ちで研究に取り組むことができました。ありがとうございました。

最後に、福島の実家を離れて自分の好きな研究の道を歩み、やりたいようにやっている私のことを特にとがめることなく、それどころか多くのバックアップをして頂いている、両親と家族に感謝致します。

平成18年1月6日

加藤 淳也