

## 審査の結果の要旨

氏名 毛利 佳弘

放線菌は原核生物でありながらその多くは複雑な形態分化を示すことで知られる一群のグラム陽性細菌であるが、その中でも希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は特に複雑な形態分化を示す。*A. missouriensis* は栄養豊富な環境下で菌糸生長するが、貧栄養下では数百の胞子を内包した多数の孢子嚢を形成する。孢子嚢は水に溶出した土壌中の何らかのシグナルを感知すると開裂し、遊走子を放出する。遊走子はべん毛回転による運動性を示し、走化性により新たな栄養源へと拡散するが、発芽に適した環境に至ると運動を停止し、菌糸生長を開始する。*A. missouriensis* は孢子嚢を形成して休眠する点、べん毛による運動性を示す点で特徴的であり、その形態分化は形態学・進化・生存戦略の観点から興味深いが、その制御の分子機構はほとんど研究されていなかった。本論文は、*A. missouriensis* の孢子嚢形成および休眠孢子形成の制御機構の解明を目的として、これらの制御機構において重要な働きをする2つの転写制御因子（AmBldD、TcrA）の機能解析と標的遺伝子の同定を行った研究をまとめたものであり、研究背景等について記述した序論および全三章からなる本論より構成される。

本論第一章では、孢子嚢形成を制御する転写制御因子 AmBldD に関して、遺伝子破壊株の表現型解析、発現解析、生化学的解析を行うとともに、AmBldD の標的遺伝子の同定を行っている。AmBldD が栄養生長菌糸で特異的に発現し、c-di-GMP 濃度依存的に DNA に結合することが明らかになった。一方、ChIP-seq 解析により、ゲノム上の AmBldD 結合部位を網羅的に解析し、346 箇所の AmBldD 結合部位を同定している。さらに、RNA-seq 解析から予測した転写開始点を考慮して、207 個の AmBldD の標的遺伝子候補を同定し、そこから選抜した 27 遺伝子の転写解析により、12 個の AmBldD の標的遺伝子が同定された。また、これらに加えて、本論第二章で解析している *tcrA*、*fliA1*、*fliA3* も AmBldD の標的遺伝子であることが明らかになった。以上の結果より、AmBldD は孢子嚢形成だけでなく、べん毛形成や休眠維持も制御していることが強く示唆された。

本論第二章では、遊走子のべん毛形成と休眠維持を制御する転写制御因子 TcrA の発現解析、生化学的解析を行い、TcrA の標的遺伝子の同定を行っている。べん毛遺伝子の転写開始点の再

決定を行い、TcrA がべん毛遺伝子の 11 個の転写単位のうち 5 個のプロモーター領域に結合し、転写を直接活性化していることを明らかにした。一方、TcrA の DNA 結合能は 52 番目のアスパラギン酸残基のリン酸化により調節されていることを明らかにした。さらに、野生株と *tcrA* 破壊株の RNA-seq 解析により同定された「TcrA により活性化される遺伝子」のプロモーター領域の配列解析により TcrA 結合配列を発見し、それらの配列に対する *in vitro* での TcrA の結合能を調べることで、64 個の TcrA 標的遺伝子を同定した。また、「TcrA により活性化される遺伝子」により構成される 155 転写単位のうち 130 個のプロモーター領域にシグマ因子 FliA によって認識されると考えられる 5'-CTCA(G/A)-n<sub>14-16</sub>-GCCGA(A/T)-3'からなる配列が存在することを明らかにした。以上の結果により、TcrA および 3 つの FliA (FliA1-3) が関与する孢子嚢成熟期における遺伝子発現制御ネットワークの存在が示され、その詳細が考察されている。

本論第三章では、野生株、*tcrA* 破壊株、*hbkA* 破壊株 (HhkA は TcrA のリン酸化に関与すると考えられるハイブリッドセンサーヒスチジニキナーゼ) の孢子嚢形成期における RNA-seq 解析と、野生株の孢子嚢形成過程および孢子嚢開裂過程の RNA-seq 解析における遺伝子発現量の相関分析を行うことにより、TcrA と HhkA の機能時期についての考察がなされている。その結果、TcrA が孢子嚢形成初期に HhkA 非依存的に転写活性化を行うことが示唆された。また、第二章で同定した TcrA の標的遺伝子は、孢子嚢形成後期および孢子嚢開裂期において、HhkA 依存的に転写活性化を受けることが示された。さらに、5'-CTCA(G/A)-n<sub>14-16</sub>-GCCGA(A/T)-3'と一致率が高いプロモーター配列を持つ遺伝子ほど孢子嚢形成初期に強く発現することを示した。

以上、希少放線菌における形態分化制御機構の根幹を明らかにした本研究は、学術上応用上寄与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。