

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 26 年度博士課程入学
氏名 江 年
指導教員名 大西 康夫

論文題目

放線菌 *Streptomyces griseus* の黄色色素生産と主要シグマ因子発現の制御機構
に関する研究

背景と目的

Streptomycin 生産菌として知られている放線菌 *Streptomyces griseus* は、低リン酸培地において黄色色素 grixazone を生産する。Grixazone の生産には、*S. griseus* の形態分化と二次代謝を誘導する微生物ホルモン A-factor が必要であるが、A-factor シグナルおよびリン酸飢餓シグナルは、SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein) ファミリーの経路特異的転写活性化因子 GriR を介して、grixazone 生合成遺伝子群に伝えられる。GriR は生合成酵素群をコードする *griC* オペロンおよび *griJ* オペロンのプロモーター上流に結合し、その転写を活性化する。一方、GriU は grixazone の生産を負に制御する因子として変異株の解析から同定されたタンパク質であり、grixazone 生合成遺伝子クラスターとは異なる遺伝子座にコードされている。GriU は 293 アミノ酸からなり、NAD 結合ドメインと相同性を有するドメインをもつがその分子機能は不明である。*griU* を過剰発現すると *griR* を強制発現した変異株であっても grixazone の生産が抑制されるため、GriU は何らかの形で GriR の転写活性化能を阻害していると考えられたが、その詳細は不明であった。そこで、本研究では、GriU の機能を解明することを目指した。

シグマ因子は RNA ポリメラーゼ複合体の構成因子の 1 つであり、プロモーター配列を認識して遺伝子の転写を開始させる役割を担っている。主要シグマ因子はハウスキーピング遺伝子群の転写に用いられており、大腸菌において通常の生育時、主要シグマ因子をコードする遺伝子は主要シグマ因子自身を含む RNA ポリメラーゼによって転写されることが明らかになっている。一方、*Streptomyces* 属放線菌で高く保存された ECF (extracytoplasmic function) ファミリーシグマ因子である ShbA (sigma factor for *hrdB*) は、*S. griseus* において主要シグマ因子をコードする *hrdB* の転写を担うことが明らかになっている。したがって、ShbA は *S. griseus* の生育に重要であるが、ECF ファミリーシグマ因子である ShbA が主要シグマ因子遺伝子を制御す

るというユニークな制御系の生理的意義や、*shbA* の転写を開始させるシグマ因子が何であるかは未解明である。そこで、本研究では、ShbA による主要シグマ因子遺伝子制御の生理的意義および *shbA* 遺伝子の発現に関わるシグマ因子を解明することを目的とした。

in vitro における GriU の機能解析

大腸菌を用いて組換え GriR および GriU を調製した。GriR が結合することが明らかにされている *griC* プロモーターの上流領域をプローブとしてゲルシフト実験を行ったところ、GriU はこの DNA 断片には結合しないこと、および GriU の存在量の増加に伴い GriR-DNA 複合体の移動度が徐々に大きくなることが観察された。なお、大過剰量の GriU を加えた場合には、GriR-DNA 複合体形成が一部阻害された。一方、TetR ファミリーの転写因子である GriZ と GriU を用いて、GriZ 結合配列を含む DNA 断片をプローブとしてゲルシフト実験を行った結果、GriU が存在しても GriZ と DNA の結合に由来するシフトバンドの移動度には変化がなかった。このことから、GriU は GriR-DNA 複合体の移動度に特異的に影響を与えることが示唆された。そこで、pull-down assay により GriR と GriU の相互作用を調べたところ、GriU は DNA の有無とは関係なく GriR と結合することが示された。また、GriR-DNA 複合体形成後に大過剰の非標識 DNA を加える競合ゲルシフト実験において、GriU は GriR-DNA 複合体の安定性に影響を及ぼさないことが示された。さらに、GriR を DNA に結合させた後に GriU を添加し、ただちに泳動を行った場合でも GriU は GriR-DNA 複合体の移動度に影響を与えることがわかった。

GriR の転写活性化に及ぼす GriU の影響を *in vitro* 転写実験にて解析した。この解析を行うにあたり、C 末端にヒスチジン残基を 6 つ付加した RNA ポリメラーゼ β' サブユニットをコードするように *rpoC* 遺伝子を改変した *S. griseus* 株を作製し、Ni-NTA open column を用いて RNA ポリメラーゼを精製した。また、*griC* プロモーターの上流領域から ORF の一部までの領域をテンプレートとして用いた。その結果、RNA ポリメラーゼ単独では *griC* プロモーターからの転写産物は検出されなかったが、反応系に GriR を添加することによって、*griC* プロモーターからの転写が検出された。これにより、GriR が *griC* プロモーターからの転写を活性化することを *in vitro* で証明した。次に、この系に GriU を添加し、転写への影響を調べたが、GriR の 16 倍量（モル比）の GriU を加えた場合においても GriR によって活性化される *griC* プロモーターからの転写産物量に変化はなく、GriU が GriR による転写活性化を阻害することを示す結果は得られなかった。

これまで、GriU が GriR-DNA 複合体の移動度に与える影響が GriU による GriR の転写活性化能の抑制に寄与していると考えてきたが、以上の結果を踏まえると、大過剰の GriU の存在下において GriR の DNA への結合が阻害される現象こそが GriU による GriR の転写活性化能の抑制の本質であると考えられる。つまり、GriU が大量に生産された時、細胞内の大部分の GriR は GriU と結合してしまい、DNA に結合して転写活性化因子として働く GriR の機能が著しく弱められてしまうと考えられる。

in vivoにおける GriU の機能解析

ermE プロモーターを導入した強制発現用ゲノム組み込み型ベクターpTYM19epに *griU* をクローニングし、野生株へ導入したが、*grixazone* の生産の抑制は観察されなかった。作製した株における *griU* の発現量は *grixazone* の生産を抑制するには不十分であると考えられる。

一方、GriU が他の *Streptomyces* 属放線菌においても SARP ファミリーの転写制御因子の転写活性化能を阻害する可能性があると考え、*Streptomyces lividans* と *Streptomyces coelicolor* A3(2)で異種発現を行った。*griU* をクローニングした高コピー数ベクターpIJ486 (*pIJ486-griU*) を *S. lividans* と *S. coelicolor* A3(2)へ導入した結果、*S. lividans* と *S. coelicolor* A3(2)では *griU* を過剰発現しても、二次代謝産物の生産に影響は見られなかった。

ShbA による主要シグマ因子遺伝子制御の生理的意義の解明に向けた取り組み

shbA 破壊株のコロニーは野生株に比べて小さく、表面にしわが寄っており、栄養豊富な培地では気中菌糸や胞子を形成しないため、野生株のコロニーと容易に区別することができる。そこで、*shbA* 破壊株からサプレッサー変異株を取得し、その変異点を同定することで、ShbA による主要シグマ因子遺伝子制御に関して新たな知見を得ることを目指した。野生株と同等な生育を示すサプレッサー変異株を 91 株取得し、そのうち 26 株の *hrdB* プロモーター領域の配列を解析したところ、いずれの株も *hrdB* プロモーター領域に変異があり、これらの株では σ^{HrdB} 自身を含む RNA ポリメラーゼによって *hrdB* が転写されるようになっている可能性が高いことが明らかになった。

一方、*hrdB* の転写が ECF ファミリーシグマ因子 ShbA によって制御される生理的意義を解明するため、野生株と *shbA* 破壊株をそれぞれ親株として、ゲノム上の *hrdB* プロモーターを σ^{HrdB} 依存性プロモーターである *rpoB* プロモーターに置換した株を作製した。両株において *hrdB* は σ^{HrdB} によって転写されるため、これらの株を *hrdB* 自己制御株と命名した。*shbA* 破壊株を親株とする *hrdB* 自己制御株を栄養豊富な YMPD 固体培地上で培養したところ、生育と形態分化の異常は野生株と同レベルまで回復した。一方、野生株および *shbA* 破壊株由来の 2 つの *hrdB* 自己制御株のストレプトマイシン生産量は野生株と同等であったが、野生株と異なりメラニン様の色素生産が観察された。このことから、*hrdB* 自己制御株では、野生株では抑えられているメラニン様の色素生産に関連する遺伝子の発現が誘導されていることが示唆されたが、その生理的意義は不明である。主要シグマ因子遺伝子が自己制御ではなく他のシグマ因子によって制御されていることの利点は、何らかの環境変化に応じて、ハウスキーピング遺伝子の転写を一斉に停止できる点にあると予想される。今後、作製した *hrdB* 自己制御株を用いて、各種ストレス応答について調べるのが重要であると考えている。

shbA を制御するシグマ因子の探索

shbA の転写開始点は p1 と p2 の 2 つあり、p1 は開始コドンの最初の塩基から 142 塩基上流に位置し、p2 は開始コドンの最初の塩基と同じ位置であることが既に明らかになっていた。しかしながら、p1、p2 がそれぞれ独立したプロモーターを持つかどうかは不明であった。そこで、p1 と p2 の推定プロモーターのそれぞれ、あるいは両者ともに -10 配列と予想される配列に変異を導入した *shbA* をクローニングしたベクターを *shbA* 破壊株に導入し、低分解能 S1 ヌクレアーゼマッピングによって *shbA* の転写解析を行った。その結果、*shbA* は p1 と p2 の 2 つの転写開始点に対応する独立した 2 つのプロモーターを有し、それぞれから転写が開始されていることが示された。

p1 と p2 上流のプロモーター配列はともに σ^{HrdB} が認識するプロモーターのコンセンサス配列とよく似ているため、 σ^{HrdB} がこれらのプロモーターを認識して転写を開始させる可能性が高いと考え、組換え σ^{HrdB} と市販の大腸菌由来 RNA ポリメラーゼコア酵素を用いて *shbA* プロモーター周辺領域配列をテンプレートとして *in vitro* 転写実験を行った。その結果、*in vitro* で *shbA* の p1 プロモーターは σ^{HrdB} によって認識されることが示された。

結論

本研究では grixazone 生産を制御するタンパク質 GriU の機能解析を行った。*in vitro* で GriU は GriR と特異的に結合することが示された。しかしながら、*in vitro* 転写系において、GriU が GriR の転写活性化能を抑制する結果は得られなかったことや、GriU-GriR-DNA の三者複合体の形成に否定的な結果が得られたことから、これまで考えられていた「GriU は DNA に結合した GriR に結合して、GriR による RNA ポリメラーゼのリクルートを阻害する」というモデルは正しくない可能性が高いことが明らかになった。細胞内で大量生産された GriU によって、DNA に結合して転写活性化因子として機能できる GriR 分子が大幅に減少することが、GriU による GriR の転写活性化能の抑制の原因であると考えられる。

一方、本研究では主要シグマ因子 σ^{HrdB} が *shbA* の転写（少なくとも p1 プロモーターからの転写）を担うことを見出した。すなわち、*shbA* と *hrdB* はそれぞれの遺伝子産物が互いの遺伝子の転写を開始させるシグマ因子をコードしており、正のフィードバックループを形成していることが明らかになった。このような制御系はこれまでに報告されておらず、*Streptomyces* 属放線菌に特有のものである可能性が高いため、その生理的意義の解明は非常に興味深い。