

博士論文

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)における

AfsK-AfsR-AfsS シグナル伝達経路の機能解析

氏 名            辛   利 弥

## 第 1 部 序論

### 第 1 章 *Streptomyces* の特徴

- 1. 1. *Streptomyces* の分類学的な位置づけ . . . . . 4
- 1. 2. *Streptomyces* 研究の意義 . . . . . 4
- 1. 3. *Streptomyces* 研究の現状 . . . . . 5

### 第 2 章 *S. coelicolor* A3(2) の二次代謝

- 2. 1. *S. coelicolor* A3(2) の生産する二次代謝化合物 . . . . . 6
- 2. 2. *S. coelicolor* A3(2) の二次代謝制御 . . . . . 7
- 2. 3.  $\gamma$ -ブチロラクトン環低分子化合物による制御 . . . . . 8

### 第 3 章 *S. coelicolor* A3(2) の二次代謝に関与する AfsK-AfsR-AfsS 制御系

- 3. 1 二次代謝をグローバルに制御する AfsR . . . . . 9
- 3. 2 AfsR をリン酸化する真核生物型 Ser/Thr キナーゼ AfsK . . . . . 11
- 3. 3 二次代謝を活性化する因子 AfsS . . . . . 12
- 3. 4 AfsK-AfsR-AfsS 制御系モデル . . . . . 14

### 第 4 章 本研究の目的および本論文の構成 . . . . . 15

## 第 2 部 本論

### 第 1 章 *afsS* 遺伝子座の機能解析

- 1. 1 背景・目的 . . . . . 16
- 1. 2 結果
  - 1. 2. 1. Act 生産活性化に必要な *afsS* 遺伝子座の絞り込み . . . . . 17
  - 1. 2. 2. Act 生産活性化に必要な 5'-UTR 領域の絞り込み . . . . . 19
  - 1. 2. 3. 5'-UTR に存在するヘアピン構造の重要性の解析 . . . . . 21
  - 1. 2. 4. 異種 *Streptomyces* の *afaS* 遺伝子座の機能比較 (5'-UTR) . . . . . 23
  - 1. 2. 5. 異種 *Streptomyces* の *afaS* 遺伝子座の機能比較 (ORF) . . . . . 26
  - 1. 2. 6. 5'-UTR のヘアピン構造と ORF の相互作用確認 . . . . . 28
  - 1. 2. 7. 5'-UTR のヘアピン構造に結合するタンパク質取得の試み . . . . . 30
  - 1. 2. 8. 5'-UTR が遺伝子発現に与える影響の解析 . . . . . 32
- 1. 3 考察 . . . . . 34
- 1. 4 実験方法 . . . . . 39

第 2 章	リン酸化による AfsR 活性化の機能解析	
2.1	背景・目的	49
2.2	結果	
2.2.1.	Ser/Thr キナーゼ阻害剤存在下におけるリン酸化模倣変異型 AfsR の機能	50
2.2.2.	二重変異型 AfsR の表現型	52
2.2.3.	変異型 <i>afsR</i> の発現をタンパク質レベルで確認した	54
2.2.4.	リン酸化 AfsR 検出の試み	56
2.2.5.	リン酸化模倣変異型 AfsR の EMSA	58
2.2.6.	変異型 AfsRΔTPR の表現型	60
2.2.7.	変異型 AfsRΔTPR の EMSA	63
2.2.8.	T536ΔDTPR と T536EΔTPR の <i>in vitro</i> における機能解析	65
2.3.	考察	67
2.4	実験方法	73
第 3 部	総括	83
第 4 部	実験材料と方法	
第 1 章	使用した菌株／ベクターおよび培地	
1.1	本論文中で使用した菌株	85
1.2	本論文中で使用したベクター	86
1.3	本論文中で使用した培地	88
第 2 章	本論文中で使用した基本的な実験方法	90
参考文献		93
謝辞		102

## 第 1 部 序論

### 第 1 章 *Streptomyces* の特徴

#### 1. 1. *Streptomyces* の分類学的な位置づけ

放線菌は、古典的にはカビのような放射状の菌糸を形成する細菌として分類されていた。現在では 16S rRNA の配列比較をはじめとする分子系統解析により、菌糸を形成しない結核菌 *Mycobacterium* やグルタミン酸生産菌 *Corynebacterium* など放線菌として分類されている (Stackebrandt *et al.*, 1997)。 *Streptomyces* は分類学的にはグラム陽性高 GC 含量細菌に属している。

#### 1. 2. *Streptomyces* 研究の意義

*Streptomyces* は土壌中に生息している放線菌である。複雑な形態分化と多様な二次代謝を行う点が一般的な細菌と異なる。孢子から出芽した細胞は、生育初期では基底菌糸を伸ばして栄養成長を行う。基底菌糸は隔壁を形成しておらず、一つの細胞に多数の染色体 DNA が含まれている。生育後期ではカビに似た気中菌糸を空气中に伸ばす。さらに生育が進むと、気中菌糸に隔壁が形成され数珠上の孢子となる。このような細胞構造や形態分化は原核生物としては特異であり、基礎生物学的な興味から研究が行われてきた (Hopwood, 1999)。

放線菌には二次代謝を行うものが多いが、その中でも *Streptomyces* は極めて二次代謝産物の生産能力が高い。*Streptomyces* の生産する豊富な二次代謝産物は、抗生物質をはじめとして免疫抑制剤や抗がん剤などの医薬品へと応用されてきた (図 1. 1. 1.)。発酵工業や医薬産業などの応用的な視点からも *Streptomyces* の研究は重要である。

生物活性	名称	用途	由来生物
抗生物質作用	apramycin	動物薬	<i>S. tenebrarius</i>
	chloramphenicol	医薬品／動物薬	<i>S. venezuelae</i>
	kanamycin	医薬品／動物薬	<i>S. kanamyceticus</i>
	streptomycin	医薬品／動物薬	<i>S. griseus</i>
	validamycin	農薬	<i>S. hygrosopicus</i>
抗寄生虫作用	avermectin	医薬品／動物薬	<i>S. avermitilis</i>
免疫抑制作用	rapamycin	医薬品	<i>S. hygrosopics</i>
	tacrolimus (FK506)	医薬品	<i>S. tsukubaensis</i>
抗がん作用	adriamycin (doxorubicin)	医薬品	<i>S. peucetius</i>
	bestatin (ubenimex)	医薬品	<i>S. olivoreticuli</i>
	bleomycin	医薬品	<i>S. verticillus</i>
	mitomycinC	医薬品	<i>S. caespitosus</i>

図 1. 1. 1. *Streptomyces* 由来の生理活性物質の一例



### 1. 3. *Streptomyces* 研究の現状

英国の Hopwood らにより分子遺伝学的な手法が確立されて以来、*Streptomyces* に関する研究が盛んに行われてきた。2002 年にモデル放線菌である *Streptomyces coelicolor* A3(2) の全ゲノム配列が決定され、ゲノムレベルでの研究も進められてきた (Bentley *et al.*, 2002)。大腸菌 *Escherichia coli* や枯草菌 *Bacillus subtilis* などの一般的な細菌ゲノムサイズが 4~5 Mbp ほどであるのに対し、*Streptomyces* はおよそ 2 倍の 8~10 Mbp ほどある。これは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 12 Mbp に迫る大きさである。複雑な形態分化や二次代謝を維持するために必要な遺伝子の存在は、ゲノムサイズの大きさに現れていると言える。

*Streptomyces* はゲノムスケールでの研究対象として必要な情報が整いつつある。現在では、173 種の *Streptomyces* についてゲノムプロジェクトが存在しており、18 種は全ゲノム配列の解読が完了している (Genomes Online Database, 2013 年 12 月現在)。解読が完了していない種についても、多くはドラフト配列として NCBI 等のオンラインデータベース上に公開されている。

従来から行われているスクリーニング手法では、1 種の *Streptomyces* から発見される生理活性物質は数種であるが、ゲノム上には 20 以上の二次代謝関連クラスターが存在している (Nett *et al.*, 2009)。そのため、研究室における培養条件では発現していない二次代謝の活性化により、新規な生理活性物質の発見を期待できる。

## 第 2 章 *S. coelicolor* A3(2)の二次代謝

### 2. 1. *S. coelicolor* A3(2)の生産する二次代謝化合物

*S. coelicolor* A3(2)は二次代謝産物としてアクチノロージン (Act)、ウンデシルプロディギオシン (Red)、カルシウム依存性抗生物質、メチレノマイシンを生産することが知られている。それぞれの構造を図 1. 2. 1.に示した。メチレノマイシン生合成遺伝子群は線状プラスミド SCP1 にコードされているが (Kirby *et al.*, 1977; Bentley *et al.*, 2004)、その他の生合成遺伝子群は染色体 DNA 上にコードされている (Bentley *et al.*, 2002)。Act と Red は色素性抗生物質であり、通常の培地で Act は濃青色、Red は赤色を示す。これらの色素性抗生物質の生産は視覚的に観察できるため、*Streptomyces* の二次代謝研究において、*S. coelicolor* A3(2)の Act や Red の生産をモデルとして研究が行われてきた (Hopwood, 1999)。

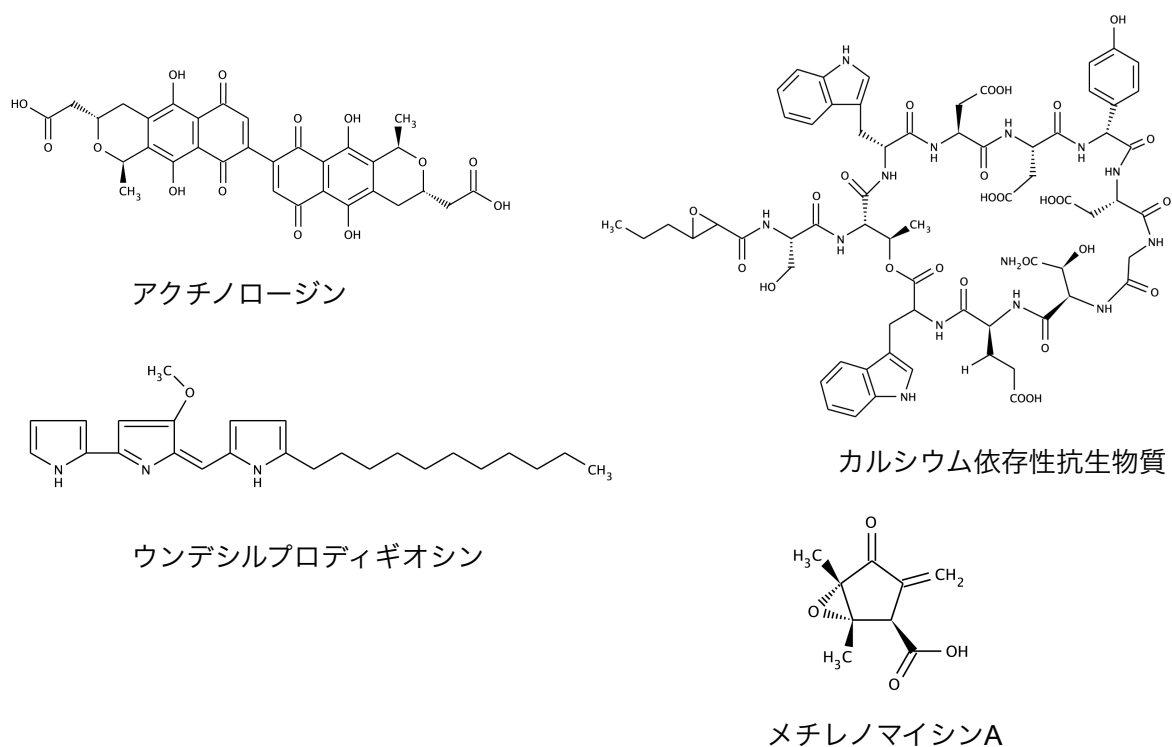


図 1. 2. 1. *S. coelicolor* A3(2)の生産する二次代謝産物  
(カルシウム依存性抗生物質は類縁体の 1 つを示した)

## 2. 2. *S. coelicolor* A3(2)の二次代謝制御

通常、抗生物質の生合成遺伝子はクラスターを形成していることが知られている。生合成遺伝子クラスター中には、経路特異的転写活性化因子 (pathway-specific transcriptional activator) をコードする制御遺伝子が含まれており、各生合成遺伝子クラスターのマスタースイッチとして機能している。Act 生合成クラスターでは *actII-orf4* (Gramajo *et al.*, 1993)、Red 生合成クラスターでは *redD* (Narva *et al.*, 1990) が経路特異的転写活性化因子をコードしている。

一方、*S. coelicolor* A3(2)においては、これらの「経路特異的」制御因子とは別に二次代謝をグローバルに制御している遺伝子についても報告されている。二次代謝が全般的に阻害された変異株では *absA* (Adamidis *et al.*, 1990)、*absB* (Adamidis *et al.*, 1992) *afsB* (Horinouchi *et al.*, 1986; Aigle *et al.*, 2000) などが取得されている。

*absA* は二成分制御系の応答制御因子と相同性を有するタンパク質をコードする。*absA* を破壊すると色素生産が上昇することから、二次代謝を負に制御していると考えられている (Brian *et al.*, 1996)。*absB* は大腸菌の RNaseIII と相同性を持つタンパク質をコードしており (Aceti *et al.*, 1998)、*in vivo* においてリボヌクレアーゼとして機能することも確認されていることから (Gravenbeek *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008)、RNA レベルでの二次代謝制御の存在が示唆されている。マイクロアレイを用いた転写解析により、二次代謝産物生産に関わる多数の遺伝子の発現が *absB* 破壊株で減少していることが示された。この時、ActII-orf4 や RedD などの生合成クラスター内に位置する制御因子 CSRs (cluster-situated regulators) は相互に交差制御を行っており、これらの制御因子による二次代謝制御が「経路特異的」ではないことも示唆された (Huang *et al.*, 2005)。

色素生産を誘導させることを指標にクローニングされた遺伝子として、二次代謝をグローバルに制御する *afsR*、*afsS* が挙げられるが、これについては第 3 章にまとめる。*abaA* (Fernandez-Moreno *et al.*, 1992) は、コピー数 40~100 の高コピー数プラスミド pIJ486 を用いて *Streptomyces lividans* に導入すると Act を生産させる遺伝子としてクローニングされた *S. coelicolor* A3(2)の遺伝子である。*abaA* の遺伝子破壊を行うと、メチレノマイシン以外の二次代謝産物は全て生産量が減少したことから、二次代謝をグローバルに制御しているものと考えられる。

また、ppGpp 合成酵素をコードする *relA* の破壊により Act や Red の生産が減少することが報告されている (Sun *et al.*, 2001)。ppGpp は放線菌の二次代謝及び形態分化の開始に重要なシグナル分子として働くことが古くから示唆されていた (Ochi, 1987)。前述の *afsB* 変異株における変異点は、主要シグマ因子をコードする *hrdB* であることが明らかにされたが、*afsB* 変異株においても、細胞内の ppGpp 濃度の変化が二次代謝へ関与することが示唆されている (Wang *et al.*, 2010)。

さらに、RNA ポリメラーゼの  $\beta$  サブユニットの変異やリボソーム RNA の変異により、二次代謝産物の生産量が上昇することも報告されている (Xu *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2000)。その理由は明らかではないが、二次代謝制御が一次代謝とも密接に関わっている可能性を示す結果として興味深い。

### 2. 3. $\gamma$ -ブチロラクトン環低分子化合物による制御

*Streptomyces* 属における二次代謝制御の大きな特徴の一つに、当研究室で研究が進められてきた A-ファクター (図 1. 2. 2.) に代表される「微生物ホルモン」と呼ばれる  $\gamma$ -ブチロラクトン環をもつ低分子化合物による制御機構の存在が挙げられる。A-ファクターは *Streptomyces griseus* の微生物ホルモンであるが、例外的に二次代謝だけでなく形態分化も制御している。*S. coelicolor* A3(2)においても、Act および Red の生産を誘導する  $\gamma$ -ブチロラクトン化合物 SCB1 が同定された (Takano *et al.*, 2000, 2001)。また、SCB1 は I 型ポリケタイド合成酵素を含む生合成遺伝子クラスター中の経路特異的制御遺伝子の転写を、受容体タンパク質 ScbR を介して直接制御されていることが報告されている (Takano *et al.*, 2005)。

SCB1 およびその受容体タンパク質 ScbR を介した制御は、*S. griseus* の A-ファクター制御と比較して非常に複雑なものであることが示唆されており、その詳細はまだ不明な点が多い。 $\gamma$ -ブチロラクトン環をもつ低分子化合物は細胞膜を自由に透過できるため、すみやかに菌糸ネットワーク全体にその影響が及ぶ。このため、 $\gamma$ -ブチロラクトン環低分子化合物による制御は、1 本の菌糸ネットワークにおいて、二次代謝の生産を同調させるために重要であると考えられる。

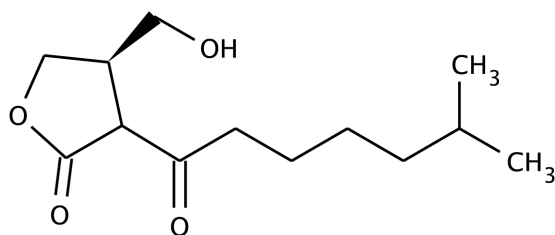


図 1. 2. 2. A-ファクターの構造

### 第 3 章 *S. coelicolor* A3(2)の二次代謝に関与する AfsK-AfsR-AfsS 制御系

当研究室では *S. coelicolor* A3(2)の二次代謝をグローバルに制御する転写因子をコードする *afsR* 遺伝子を取得し、その制御系について長年研究を行ってきた。本章では本研究の背景として、これまでの研究結果をまとめる。

#### 3. 1 二次代謝をグローバルに制御する AfsR

*S. lividans* を宿主として、*S. coelicolor* A3(2)の染色体 DNA ライブラリーを用いたショットガンクローニングを行うことによって、Act 生産を引き起こす遺伝子として、*afsR* は取得された (Horinouchi *et al.*, 1983, 1984, 1990)。その後の研究により、*afsR* は *S. coelicolor* A3(2)の Act や Red といった二次代謝産物の生産を正に制御するグローバルな制御因子をコードしていることが明らかになっている (Horinouchi, 2003)。すなわち、*afsR* の過剰発現により Act 生産の増大が観察され、破壊により色素生産が激減する。一方、*afsR* を高コピーベクターで *S. lividans* に導入すると、通常の培養条件では観察されない Act や Red の生産が引き起こされる。従って、*afsR* は *S. lividans* において「眠っていた」色素生産遺伝子クラスターを活性化する。

AfsR は 993 アミノ酸残基からなるマルチドメインタンパク質であり、N 末端側から次の①～⑤のドメイン構造を有する (図 1. 3. 1.; Yeats *et al.*, 2003; Leipe *et al.*, 2004;)。

- ① OmpR 型の Helix-Loop-Helix (HLH) を含む DNA 結合ドメイン
- ② 転写活性化に必要なと考えられるドメイン (BTAD : bacterial transcriptional activator domain)
- ③ STAND (signal transduction ATPase with numerous domains) 型 ATPase ドメインとそれに付随する Gxp ドメイン
- ④ STAND タンパク質に特徴的な HETHS (herical third domain of STAND proteins) ドメイン
- ⑤ タンパク質同士の相互作用に関与すると推測される 8 個の TPR (tetrapeptide repeat, 34 アミノ酸の繰り返し構造) を含む領域

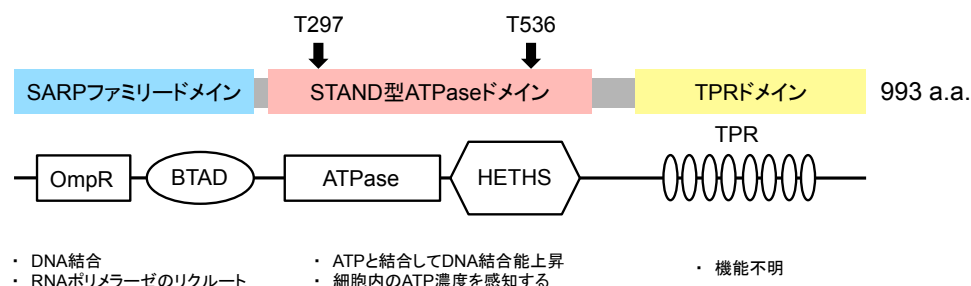


図 1. 3. 1. AfsR のドメイン構造

OmpR 型の DNA 結合ドメインと転写活性化に関わるドメイン (BTAD) は、放線菌の二次代謝制御に関与する転写因子のファミリー (SARP: *Streptomyces antibiotics regulatory protein*) に共通して存在する基本ドメインである。*S. coelicolor* A3(2)では、AfsR の他に、Act の生合成クラスターを制御する ActII-orf4 (Arias *et al.*, 1999) や Red の生合成クラスターを制御する RedD (Narva *et al.*, 1990) が知られている。

AfsR の標的遺伝子として、*afsR* のすぐ下流に存在する *afsS* が同定されている (Lee *et al.*, 2002)。*afsR* 破壊株では、*afsS* の転写は全く検出されない。AfsR は *afsS* のプロモーター領域 (-10, -35 領域を含む領域) に結合するが、この領域には通常 RNA ポリメラーゼもしくはリプレッサーが結合する。このプロモーター領域に AfsR が二量体として結合し、RNA ポリメラーゼをリクルートする転写活性化モデルが示された (Tanaka *et al.*, 2007)。

AfsR の ATPase ドメインの ATP 結合モチーフを破壊すると、*in vitro* では DNA 結合能を保持していたが、*in vivo* では Act 生産能を失うことが示された (Lee *et al.*, 2002)。その後、*Streptomyces cacaoi* の AfsR ホモログである PolY において、STAND 型 ATPase ドメインに ATP が結合することで DNA 結合能が上昇すること、ATP 結合モチーフを破壊することで ATP 結合による DNA 結合能の上昇が消失することが示唆されている (Li *et al.*, 2010)。しかしながら、ATP 結合能を保持したまま ATPase 活性を欠失した変異型 AfsR は取得されおらず (田中晶子, 平成 21 年度博士論文)、ATPase 活性自体の役割はよくわかっていない。STAND 型 ATPase ドメインが細胞内の ATP 濃度を感知することで、AfsR の活性を調節しているのではないかと考えられている (Li *et al.*, 2010)。

AfsR は 3. 2. で述べる真核生物型 Ser/Thr キナーゼ AfsK によって、Thr 残基にリン酸化を受けると考えられている。AfsR のリン酸化はその活性に重要であり、リン酸化 AfsR は DNA 結合能が上昇することが *in vitro* において示されているが (Lee *et al.*, 2002)、この結果については再検討が必要であることを示唆するデータも得られている (田中晶子, 平成 21 年度博士論文)。リン酸化による AfsR 活性化の機構については未解明な点が残されている。一方、AfsR を AfsK で *in vitro* リン酸化し、そのリン酸化部位を決定する試みが行われてきたが、その同定には至っていない (益子まり, 平成 15 年度修士論文)。リン酸化スレオニンを模倣する酸性アミノ酸置換型 AfsR の解析から T297 と T536 がリン酸化部位の候補として示されているが (田中晶子, 平成 21 年度博士論文)、それらの Thr が真のリン酸化部位であるのか検証が不十分であった。

### 3. 2 AfsR をリン酸化する真核生物型 Ser/Thr キナーゼ AfsK

異なる放線菌である *S. griseus* において過剰生産させ精製した AfsR は、*S. coelicolor* A3(2) の菌体抽出液によってリン酸化されることが *in vitro* において示された。AfsR をリン酸化するキナーゼ (AfsK) は *S. coelicolor* A3(2) の細胞膜に弱く結合していることが明らかになったが、これを精製するには至らなかった。*afsR* 下流の塩基配列を解読したところ、真核生物型 Ser/Thr キナーゼと高い相同性を有するタンパク質が見出された (図 1. 3. 2.)。原核生物では機能的に関連のある遺伝子がゲノム上の近傍に存在することが一般的に知られていること、*afsK* を破壊すると色素生産が減少すること、*afsK* を過剰発現した大腸菌の粗抽出タンパク質に AfsR のリン酸化活性が見られたことから、AfsK による AfsR のリン酸化が示唆された (Matsumoto *et al.*, 1994)。

AfsK は 799 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端側にキナーゼドメインを有する。AfsK は自身の Ser/Thr 残基をリン酸化する活性を有しており、この自己リン酸化により活性型となる。AfsK のリン酸化部位は T168 であることが明らかとなった (Tomono *et al.*, 2006)。活性型 AfsK は AfsR の Thr 残基をリン酸化する。*afsR* 破壊株では、*afsK* 破壊株に比べ顕著な色素生産の減少が観察される。一方、*afsK* 破壊株の細胞抽出液においても AfsR をリン酸化する活性が検出されることから、AfsK 以外にも AfsR をリン酸化するキナーゼの存在が示唆されている。真核生物型 Ser/Thr キナーゼと相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子は *S. coelicolor* A3(2) のゲノムに約 40 個あるが、そのうち AfsL および PkaG は *in vitro* において AfsR をリン酸化できることが示されている (Sawai *et al.*, 2004)。

AfsK の上流に存在する KbpA (図 1. 3. 2.) はリン酸化されていない AfsK にのみ結合し、AfsK のリン酸化の調節に機能している (Umeyama *et al.*, 2001)。

近年、AfsK が菌糸の先端成長に関与する DivIVA をリン酸化し、菌糸の枝分かれを制御することが報告された。(Hempel *et al.*, 2012)。AfsK が形態制御と二次代謝制御に関与し、*Streptomyces* の重要な生理現象を制御するハブの様な役割をする点が興味深い。

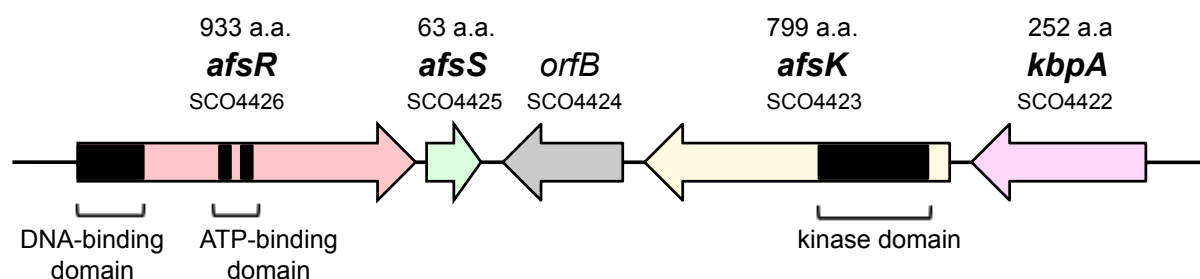


図 1. 3. 2. AfsK-AfsR-AfsS シグナル伝達経路関連遺伝子の染色体上での並び

### 3.3 二次代謝を活性化する因子 AfsS

*afsR* の直下流領域のみを高コピーベクターで *S. lividans* に導入すると、*afsR* を導入した時と同様、通常の培養条件では観察されない Act や Red の生産が劇的に引き起こされる。この領域には 63 アミノ酸のタンパク質をコードする ORF が存在しており、*afsS* と命名された。*afsS* 破壊株では、*afsR* 破壊株ほどではないが、明らかな色素生産能の低下が観察され、*afsS* が *S. coelicolor* A3(2) の色素生産に関与することが示されている。*S. coelicolor* A3(2) の *afsS* 破壊株を用いたマイクロアレイ解析の結果より、*afsS* を破壊すると Act 生合成遺伝子クラスターの転写が著しく低下することが示されている (Lian *et al.*, 2008)。しかしながら、AfsS から Act 生合成遺伝子クラスターの発現に至るシグナル伝達経路は不明である。

他の *Streptomyces* ゲノム上にも *afsS* 様遺伝子が存在しているが、遺伝子配列やアミノ酸配列自体の保存性はほとんどない。*afsR* ホモログが菌種間で高く保存されているのとは対照的である。配列の相同性がほとんどないため、本論文では *afsS* ホモログではなく、「*afsS* 様遺伝子」と呼ぶ。*afsS* 様遺伝子は、ゲノム上で *afsR* ホモログに隣接して存在しており、プロモーター領域に AfsR の結合配列が高く保存されている。*afsS* 様遺伝子がコードする ORF (AfsS 様タンパク質) のアミノ酸配列には次の特徴がある。

- ① 全長が 60 から 150 残基ほどの比較的小さなタンパク質である。
- ② 7 残基からなる繰り返し配列が 2 から 6 カ所存在する。
- ③ 親水性のアミノ酸が多く含まれ、システインや芳香族性のアミノ酸は極めて少ない。

代表的な *Streptomyces* の AfsS 様タンパク質の配列と特徴的な繰り返し配列を示した (図 1.3.3. A B)。

特徴的な繰り返し配列のアスパラギン酸およびヒスチジン残基をアラニンに置換することで、その機能を失うことが明らかにされている (高野雄治, 平成 16 年度修士論文)。

*Streptomyces noursei* の *afsS* 様遺伝子である *ssmA* は特定の炭素源の培地において nystatin 生産に対して正に機能すること、高コピーベクターで *S. lividans* に導入すると色素生産を引き起こすことが明らかにされている (Sekurova *et al.*, 1999)。しかしながら、*S. lividans* に導入した際の表現型については再検討の余地があることを本論文で後述する。

AfsS 様タンパク質は、既知のタンパク質と相同性がなく、いままでに知られている機能性ドメインも持たない。そのため、新規のメカニズムを通じて二次代謝の活性化に関与していることが考えられる。NMR による立体構造解析が行われた結果、AfsS は分子全体が高い運動性を有しており、一定の立体構造を取らないことが明らかにされた (宮川拓也ら, 2009)。一方、*S. griseus* の AfsS 様タンパク質である Orf4 に対し NMR による構造解析を行ったところ、リング状の構造が観察された (図 1.3.3.C)。しかしながら、この構造が AfsS 様タンパク質の機能と関連があるのかはよくわかっていない。

従来の構造生物学では、タンパク質は特定の立体構造をとり、その構造を通して特異的な



機能を発揮すると考えられてきた。しかしながら、近年、天然変性タンパク質とよばれる一定の立体構造を持たないタンパク質の機能が明らかになりつつある。一定の構造をとらない変性領域が他分子との相互作用を通じてフォールディングされる場合があることが報告されている (Wright *et al.*, 1999)。AfsS も単独では一定の立体構造を取らず、他の分子種との相互作用を通じて、折りたたみと機能発揮が行われる可能性がある。

AfsS と相互作用するタンパク質の存在を想定し、Two-Hybrid 法やファージディスプレイ法などの遺伝学的手法を用いた AfsS 相互作用タンパク質の取得が行われたが、その取得には至らなかった (鈴木あやの, 平成 14 年度修士論文)。さらに、*S. coelicolor* A3(2)粗抽出タンパク質と精製 AfsS の *in vitro* クロスリンク実験、*S. coelicolor* A3(2)で過剰生産させた AfsS の *in vivo* クロスリンク実験などの生化学的手法でも行われたが、AfsS 結合タンパク質の取得には至っていない (辛利弥, 平成 22 年度修士論文)。

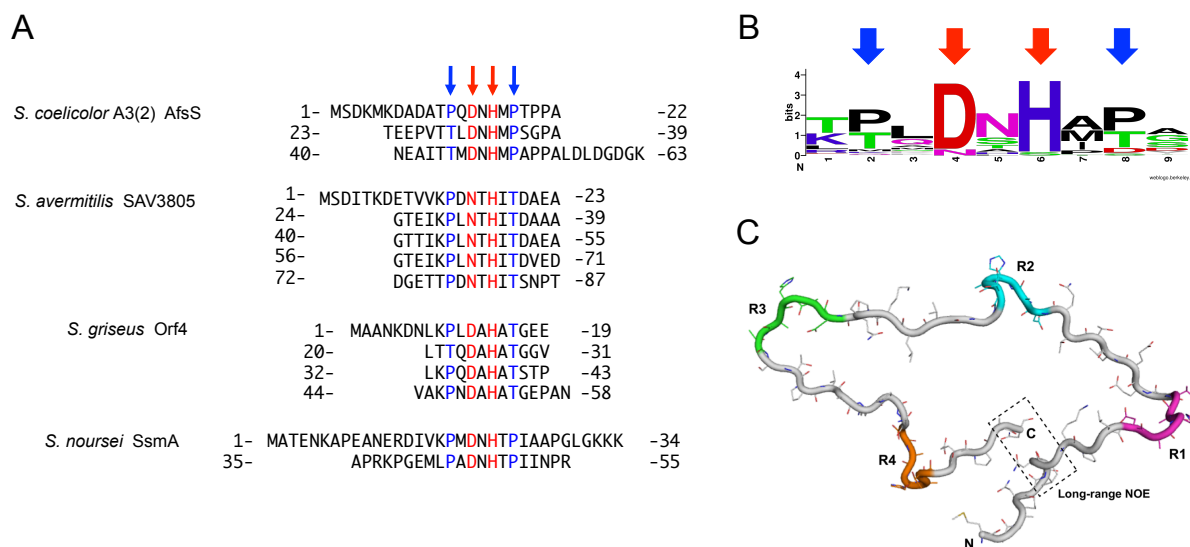


図 1. 3. 3. AfsS 様タンパク質の特徴

(A) AfsS 様タンパク質の配列

(B) 特徴的な繰り返し配列のコンセンサス WebLogo (Crooks *et al.*, 2004; <http://weblogo.berkeley.edu/>) を使用し、15 種の AfsS 様タンパク質の繰り返し配列からコンセンサス配列を作製した。

(C) *S. griseus* の AfsS 様タンパク質 Orf4 で観察された構造 (宮川拓也ら, 2009) 4 カ所存在する繰り返し配列がターン構造をとるリング状の構造が見られた。ターン構造を色付きで示した。

### 3. 4 AfsK-AfsR-AfsS 制御系モデル

これまでの解析をまとめて、AfsK-AfsR-AfsS 制御系のモデルとして図 1. 3. 4.が提唱されている。細胞膜に緩く結合した AfsK は外界から二次代謝開始の何らかのシグナルを感知し、Thr 残基を自己リン酸化し活性型となる。AfsK の活性化の調節には AfsK 結合タンパク質 KbpA (AfsK binding protein A) が関与する。自己リン酸化した活性型 AfsK は、細胞質に存在する AfsR の Thr 残基をリン酸化する。AfsR をリン酸化する主要なキナーゼは AfsK であるが、AfsK 以外にも AfsR をリン酸化できるキナーゼは存在し、AfsL や PkaG がその候補として考えられる (Sawai *et al.*, 2004)。リン酸化により活性型となった AfsR は *afsS* プロモーターに結合し、*afsS* の転写を活性化する。AfsS は色素生産を何らかの形で活性化するがその機構は不明である。*afsS* 破壊株で観察される色素生産の減少は *afsR* 破壊株よりもその度合いが小さいことから、AfsR の標的遺伝子は *afsS* 以外にも存在すると考えられる。

AfsK-AfsR-AfsS 制御系は *S. coelicolor* A3(2)における二次代謝制御系の一つであり、決してこの一つの系がその全てではない。他にも二次代謝制御遺伝子が報告されており、様々な制御系が複雑に絡み合って、巧妙にその二次代謝を調節していると考えられる。

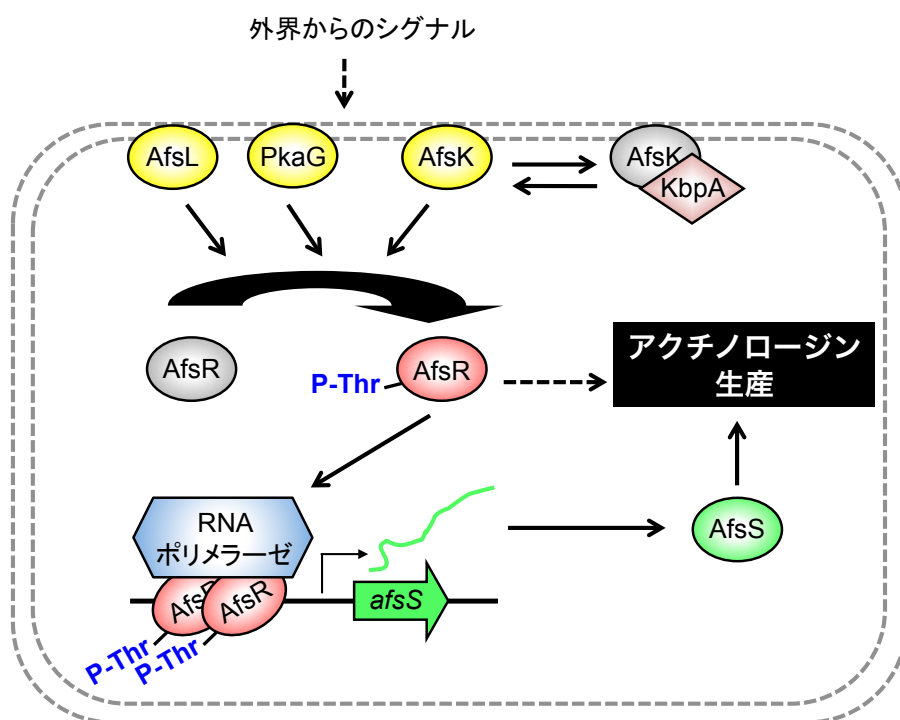


図 1. 3. 4. AfsK-AfsR-AfsS 制御系のモデル図

## 第 4 章 本研究の目的および本論文の構成

本論文において、博士課程の 3 年間で行った研究についてまとめた。

本研究では、Act 生産に重要な役割を担っている AfsK-AfsR-AfsS シグナル伝達経路の分子機構を明らかにすることを目的とし、「*afsS* 遺伝子座の機能解析」と「リン酸化による AfsR 活性化の機能解析」に取り組んだ。

### 第 2 部

#### 第 1 章 *afsS* 遺伝子座の機能解析

AfsS の機能に重要である繰り返し配列を破壊した変異型 *afsS* を含む *afsS* 遺伝子座を *S. lividans* に導入したところ、通常の培養条件下では見られない Act 生産が生じるという予想外の現象が観察された。この発見をきっかけとして、5'UTR と ORF を独立して検証することで、今まで知られていなかった *afsS* 遺伝子座の新たな機能について示す。

#### 第 2 章 リン酸化による AfsR 活性化の機能解析

リン酸化による AfsR 活性化は以下の点が未解明である。これらを明らかにすることを目指した。

1. リン酸化を受ける Thr の部位
2. リン酸化により活性型になる分子機構

先行研究において示唆されていた T297 と T536 が真のリン酸化部位であるのか、複数の視点から行った検証結果について示す。

さらに、リン酸化模倣変異型 AfsR を用いて *in vivo* および *in vitro* の解析を行い、リン酸化により AfsR が活性化される分子機構についての検証結果を示す。

### 第 3 部

本論文の総括と AfsK-AfsR-AfsS 制御系研究の展望について述べる。

## 第 2 部 本論

### 第 1 章 AfsS 遺伝子座の機能解明

#### 1. 1 背景・目的

AfsS のアミノ酸配列中に存在する繰り返し配列の中で保存性の高い Asp および His 残基を Ala に置換すると、Act 生産能が失われることが示されている（高野雄治, 平成 16 年度修士論文）。

*S. lividans* は *S. coelicolor* A3(2) の近縁種であり、完全な Act 遺伝子クラスターを有しているが、通常の培養条件では色素生産を行わない。その理由については、*S. lividans* と *S. coelicolor* A3(2) の比較ゲノム解析も行われているが明らかにはなっていない (Jayapal *et al.*, 2007)。

*S. lividans* に、繰り返し配列を Ala 置換により破壊した変異型 *afsS* (AAA) を含む *afsS* 遺伝子座を高コピーベクター pIJ486 で導入したところ、Act 生産が生じることを偶然発見した (図 2. 1. 1.A B)。そこで、本研究では *afsS* 遺伝子座が ORF をコードする *afsS* に依存せず、*S. lividans* に Act 生産を引き起こす原因の解明を目指した。

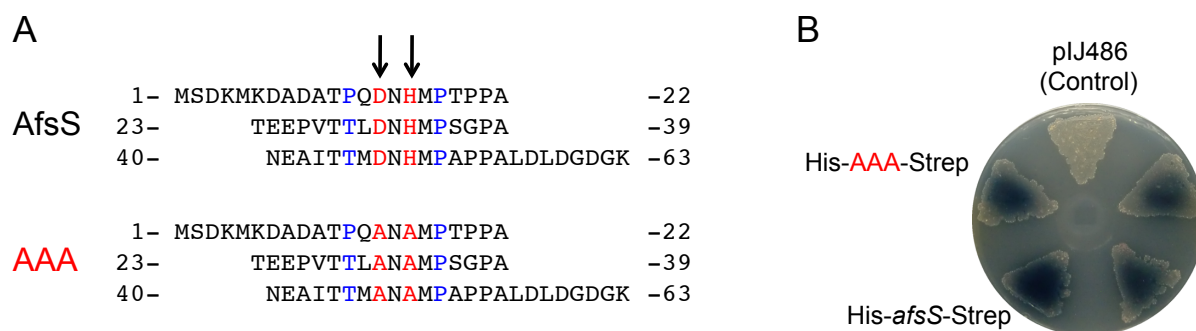


図 2. 1. 1. 繰り返し配列を破壊した *afsS* を含む *afsS* 遺伝子座の機能

(A) Asp および His 残基を Ala に置換して繰り返し配列を破壊した 置換した残基を矢印で示した。

(B) *S. lividans* に高コピーベクターで繰り返し配列を Ala 置換した *afsS* 遺伝子座を導入した 別の実験の目的で、*afsS* にはポリヒスチジンタグと Strep タグが付加されている。

## 1. 2 結果

### 1. 2. 1 Act 生産活性化に必要な *afsS* 遺伝子座の絞り込み

*afsR* の終止コドン下流から、*afsS* 終止コドンまでの 405 bp の *afsS* 遺伝子座全長 (PUS) を pIJ486 にサブクローニングし、*S. lividans* に導入した (図 2. 1. 2. A)。その結果、コントロールベクターでは見られない Act 生産が生じた。

同様に、切り縮めを行った *afsS* 遺伝子座を pIJ486 にサブクローニングし、*S. lividans* に導入した際の表現型を観察した (図 2. 1. 2. B)。ORF 領域を欠失した *afsS* 遺伝子座 (PU) でも PUS を導入した際と同様の Act 生産が生じた。一方、プロモーター領域のみ (P) を導入しても Act 生産を活性化しないことから、サブクローニングした領域から生じた転写のリードスルーがプラスミド上の配列を転写していることが Act 生産活性化を引き起こしている可能性は無いと考えられる。プロモーターとリボソーム結合部位 (ribosome binding site, RBS) を含む ORF 領域を接続 (PS) して導入したが、Act 生産は生じなかった。この結果は、5'非翻訳領域 (5' untranslated region, 5'UTR) が存在することが Act 生産に必要であることを示している。さらに、プロモーター領域を欠失した *afsS* 遺伝子座 (US) を導入しても Act 生産は見られなかった。これは、*afsS* 遺伝子座の転写が Act 生産の活性化に必要であることを示唆している。

以上の結果から、*afsS* 遺伝子座の 5'UTR が転写されることで、*S. lividans* の Act 生産を活性化していると結論付けた。

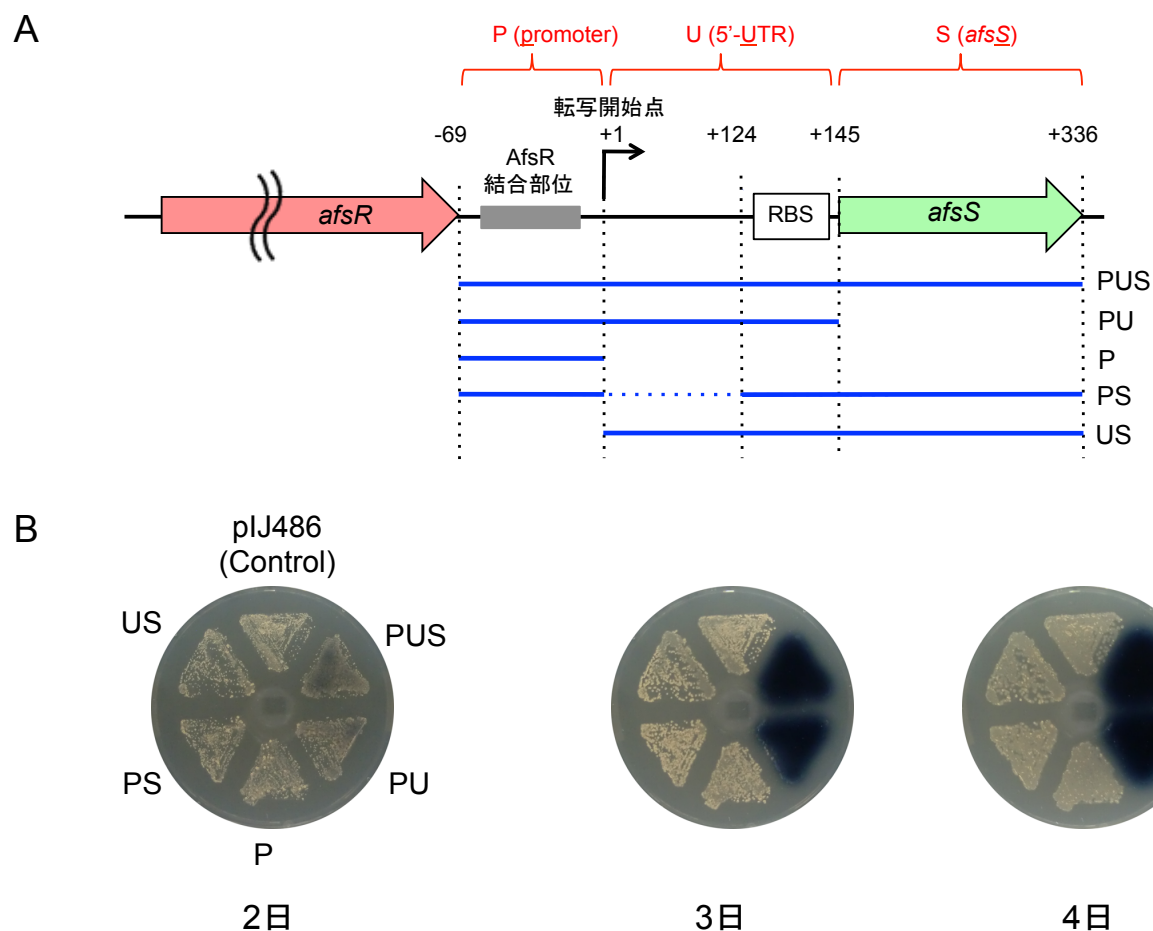


図 2. 1. 2. 切り縮めを行った *afsS* 遺伝子座を *S. lividans* に導入した

(A) pIJ486 にサブクローニングした *afsS* 遺伝子座

(B) 切り縮めを行った *afsS* 遺伝子座を *S. lividans* に導入して表現型を観察した *S. lividans* を pIJ486、pIJ486-PUS、pIJ486-PU、pIJ486-P、pIJ486-PS、pIJ486-US で形質転換し、YEME プレート上で培養した。

### 1. 2. 2. Act 生産活性化に必要な 5'UTR 領域の絞り込み

一般に、複雑な転写後制御を受ける真核生物に比べ、原核生物の 5'UTR は比較的短いと言われている。実際、いくつかのバクテリアのトランスクリプトーム解析の結果から、転写が生じた mRNA の 5'UTR は、半数以上が 40 base 未満であることが報告されている (McGrath *et al.*, 2007; Passalacqua *et al.*, 2009)。一方、*afsS* の 5'UTR は 144 bp であるため平均的なバクテリアの 5'UTR よりも長く、何らかの機能を有している可能性が考えられた。そこで、Act 生産活性化に必要な 5'UTR の領域を特定した。

1. 2. 1 の表現型観察に用いた YEME プレート培地には 34% スクロースが含まれており、浸透圧ストレスが原因と考えられる生育速度の遅延が見られていた。種々の条件検討を行った結果、10.3% スクロースを含む R5-培地で良好な生育と色素生産が見られた (data not shown)。そのため、以後の表現型観察では R5-培地を用いた。

5'UTR 領域を上流から 20 bp ずつ切り縮めた断片 (F1-F4) と下流から 20 bp ずつ切り縮めた断片 (R1-R4) を作製し、高コピーベクター pIJ6021 の *tipA* プロモーター下流にサブクローニングした (図 2. 1. 3. A)。これらのベクターを *S. lividans* に導入し、その表現型を観察した (図 2. 1. 3. B)。その結果、上流側を 20 bp (F1)、40 bp (F2) 切り縮めても Act 生産活性化能を示したが、60 bp (F3)、80 bp (F4) 切り縮めると Act 生産活性化能を失っていた。また、下流側を 20 bp (R1) 切り縮めても Act 生産活性化能を示したが、40 bp (R2)、60 bp (R3)、80 bp (R4) 切り縮めると Act 生産活性化能を失っていた。

5'UTR の転写が生じることが Act 生産活性化に重要であることが前節の実験より示唆されていたため、5'UTR は RNA レベルで機能を発揮していることが考えられた。そこで、144 base の 5'UTR 領域に対して二次構造予測を行った (図 2. 1. 3. C)。その結果、強力なヘアピン構造が 1 カ所存在することが予測された。ヘアピン構造が予測される領域と、切り縮めを行った際に Act 生産活性化能を保持していた領域が概ね一致していた (図 2. 1. 3. A)。上流から 60 bp 切り縮めた 5'UTR (F3) は、ヘアピン構造の全長を有しているにもかかわらず Act 生産活性化能を失っていた。F3 の二次構造予測を行っても、ヘアピン構造は予測された (data not shown)。F3 は他の切り縮めパターンよりもヘアピン構造に近接した領域まで切り縮めを行っているため、生体内ではヘアピン構造に何らかの影響を与えているのかもしれない。

以上の結果から、5'UTR のヘアピン構造が予測される領域が *S. lividans* に Act 生産の活性化を引き起こしていることが示唆された。

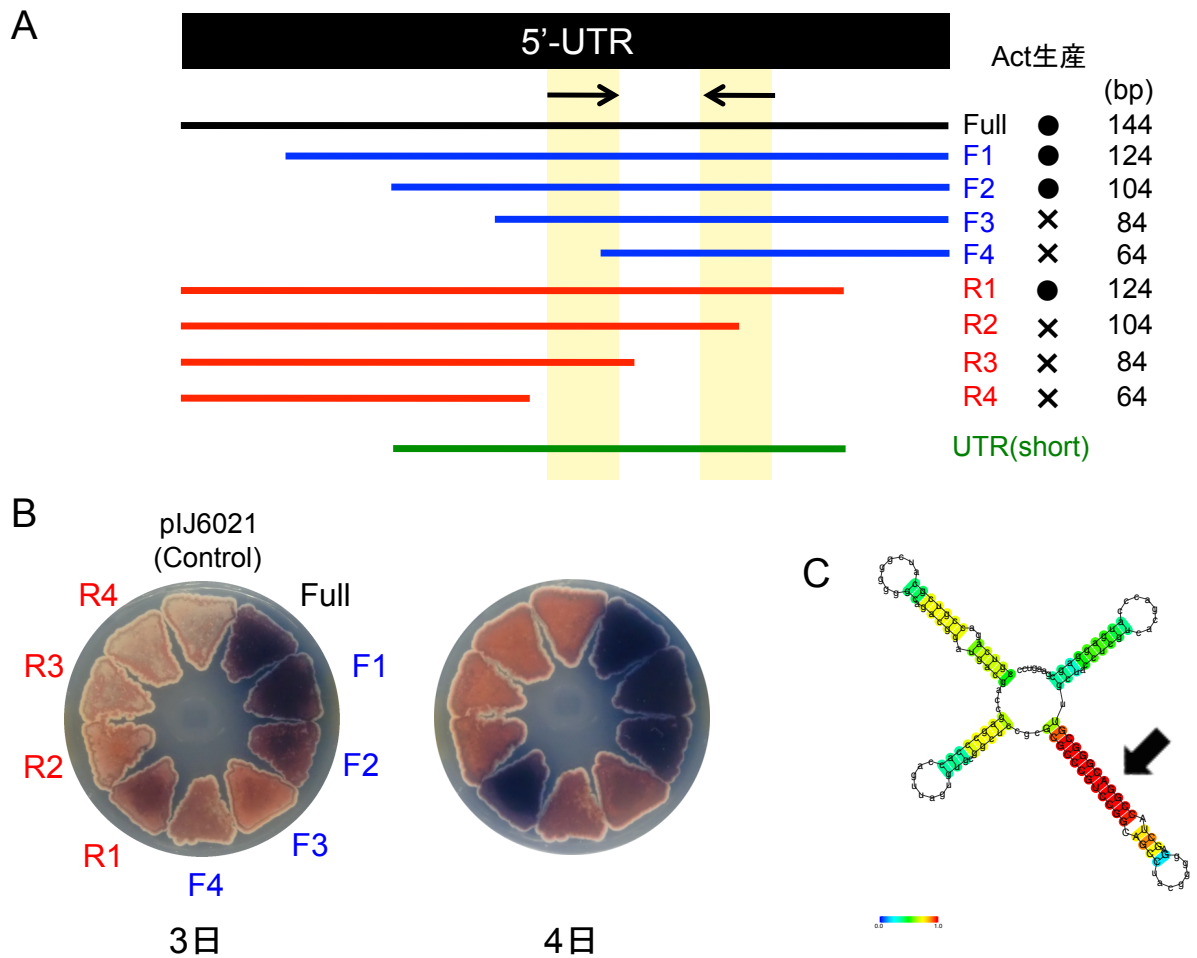


図 2. 1. 3. 切り縮めを行った *afsS* 遺伝子の 5'UTR を *S. lividans* に導入した

(A) pIJ6021 にサブクローニングした *afsS* 遺伝子座の 5'UTR 強力なヘアピン構造を取ると予測される領域を矢印で示した。

(B) 切り縮めを行った *afsS* 遺伝子の 5'UTR を *S. lividans* に導入して表現型を観察した *S. lividans* を pIJ6021、pIJ6021-UTR(Full)、pIJ6021-F1~F4、pIJ6021-R1~R4 で形質転換し、R5-プレート上で培養した。pIJ6021 の *tipA* プロモーターからは、基底レベルの転写が生じることが報告されている (Takano *et al.*, 1995)。チオストレプトンによる転写誘導を行わずに切り縮めた 5'UTR を発現させた。

(C) *afsS* 遺伝子の 5'UTR の高次構造予測 5'UTR 全長 (144 base) を CentroidFold (Sato *et al.*, 2009; <http://www.ncrna.org/>) で二次構造予測した。強力なヘアピン構造が予測された部位を矢印で示した。



### 1. 2. 3 5'UTR に存在するヘアピン構造の重要性の解析

前節の切り縮め実験より、ヘアピン構造を取ると予測される領域を切り縮めることで Act 生産活性化能を失うことが明らかになった。さらに、ヘアピン構造が重要であることを直接示すため、置換変異により二次構造を破壊した 5'UTR を用いて検証を行った。

5'UTR のヘアピン構造の機能のみ評価するため、前節の切り縮め実験で重要であることが明らかとなった 84 bp の領域 (UTR(short)) をもとにヘアピン破壊型 UTR を作製した (図 2. 1. 3. A, 図 2. 1. 4. A)。さらに、上流のヘアピン構造を構成する領域に 5 塩基の置換を導入した UTR ( $\Delta$ HP-1)、下流のヘアピン構造を構成する領域に 5 塩基の置換を導入した UTR ( $\Delta$ HP-2)、上流と下流のヘアピン構造を構成する領域にそれぞれ 5 塩基の置換を導入した UTR (UTR(double)) を作製した (図 2. 1. 4. A B)。この時、 $\Delta$ HP-1 および  $\Delta$ HP-2 ではヘアピン構造が解消されること、UTR(double)では強力なヘアピン構造が再生されることが予測された (図 2. 1. 4. C)。

これらの UTR(short)およびヘアピン破壊型 UTR を pIJ486 にサブクローニングし、*S. lividans* に導入した (図 2. 1. 4. D)。この時、UTR 領域の機能のみを評価するため、主要  $\sigma$  因子 *hrdB* のプロモーターを転写に利用した。その結果、UTR(short)を導入した際には、培養 3 日目で Act 生産が見られた。一方、ヘアピン構造が破壊されていると考えられる  $\Delta$ HP-1 および  $\Delta$ HP-2 を導入し、培養 5 日目まで観察したが Act 生産は見られなかった。二重変異の導入によりヘアピン構造が再生されていると考えられる UTR(double)では、培養 3 日目で Act 生産が見られた。Act 生産の活性化は、UTR(short)と UTR(double)に差が見られなかった。

また、UTR(short)と UTR(double)では、培養 1 日目で赤色色素ウンデシルプロディギオシン (Red) の生産活性化も見られた。一方、コントロールベクター、 $\Delta$ HP-1、 $\Delta$ HP-2 では培養 3 日目から Red 生産が見られた。

以上の結果より、*afsS* 遺伝子座の 5'UTR が *S. lividans* の Act 生産を活性化するためには、ヘアピン構造が必須であることが明らかになった。さらに、*afsS* 遺伝子座の 5'UTR は Red 生産の活性化にも関与することが示された。

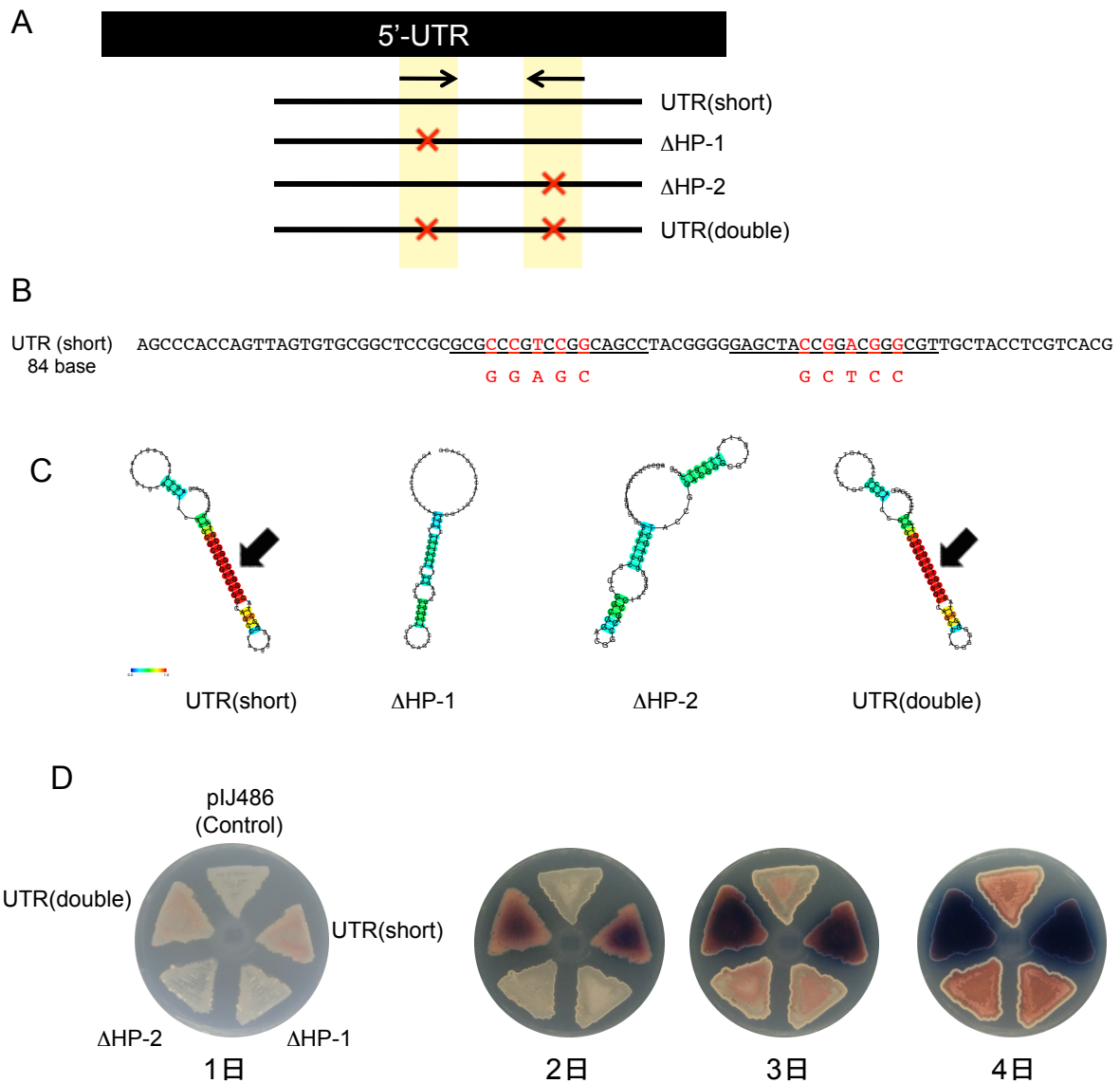


図 2. 1. 4. ヘアピン構造を破壊した 5'UTR を *S. lividans* に導入した

(A) pIJ486 にサブクローニングした 5'UTR(short)およびヘアピン破壊型 5'UTR 強力なヘアピン構造を取ると予測される領域を矢印で示した。

(B) 5'UTR (short) とヘアピン破壊型 5'UTR の DNA 配列 導入した置換変異を赤字で、強力なヘアピン構造が予想された配列を下線で示した。

(C) ヘアピン構造を破壊した 5'UTR の高次構造予測 5'UTR (short) とヘアピン破壊型 5'UTR を CentroidFold (Sato *et al.*, 2009; <http://www.ncrna.org/>) で二次構造予測した。強力なヘアピン構造が予測された部位を矢印で示した。

(D) ヘアピン構造を破壊した *afsS* 遺伝子の 5'UTR を *S. lividans* に導入して表現型を観察した *S. lividans* を pIJ486、pIJ486-UTR(short)、pIJ486-ΔHP1、pIJ486-ΔHP2、pIJ486-UTR(double)で形質転換し、R5-プレート上で培養した。

#### 1. 2. 4 異種 *Streptomyces* の *afaS* 遺伝子座の機能比較 (5'UTR)

*afsS* の 5'UTR を pIJ486 で *S. lividans* に導入すると Act 生産を誘導することから、異種 *Streptomyces* の *afsS* 様遺伝子の 5'UTR においても同様の機能を有しているのか興味を持たれた。

*afsS* 遺伝子座は、*afsR* ホモログの下流に位置しており、小さなタンパク質をコードする *afsS* 様遺伝子とその 5'UTR から成る (図 2. 1. 5. A)。*afsS* 様遺伝子がコードするタンパク質は、60 から 150 残基ほどの比較的小さなタンパク質であること、7 残基からなる繰り返し配列を複数有すること、などの特徴が見られる。しかし、その DNA 配列は *Streptomyces* 間でギャップやミスマッチが多数存在しており、配列の保存性は極めて低い (図 2. 1. 5. B)。一方、5'UTR は配列の保存性が比較的高く、強力なヘアピン構造を取ることが予測される領域が必ず存在していることから、この領域が *Streptomyces* の生理作用に重要な役割を果たしていると考えられた (図 2. 1. 5. B)。

そこで、*S. avermitilis*、*S. coelicolor* A3(2)、*S. griseus* 由来の全長 5'UTR を *S. lividans* に導入し、Act 生産に及ぼす影響を観察した。この時、転写条件をそろえるため、*S. coelicolor* A3(2)由来の *hrdB* プロモーターの下流に 5'UTR を接続した。

pIJ486 で導入した際には、*S. avermitilis* 由来の 5'UTR では培養 2 日目から、*S. coelicolor* A3(2)由来の 5'UTR は培養 3 日目から Act 生産が見られ、*S. avermitilis* 由来の 5'UTR の方が *S. coelicolor* A3(2)由来の 5'UTR よりも Act の生産時期が 1 日ほど早かった (図 2. 1. 6. B)。一方、*S. griseus* 由来の 5'UTR では Act 生産が見られなかったが、Red 生産の上昇が見られた。なお、*S. avermitilis* および *S. coelicolor* A3(2)由来の 5'UTR は、培養 3～5 日の間に青色の Act に覆われているため確認できないが、培養 2 日目で Red 生産を誘導していることから、Red 生産活性化能も 3 種の *Streptomyces* 由来 5'UTR は有していると考えられる。

また、低コピーベクター pKUM10 で 3 種の *Streptomyces* 由来の 5'UTR を導入したが、培養 5 日目まで観察しても、いずれの 5'UTR も Act 生産を活性化しなかった (図 2. 1. 6. C)。5'UTR が *S. lividans* の Act 生産を誘導するためには、高コピーベクター条件下での転写量が必要であると考えられる。

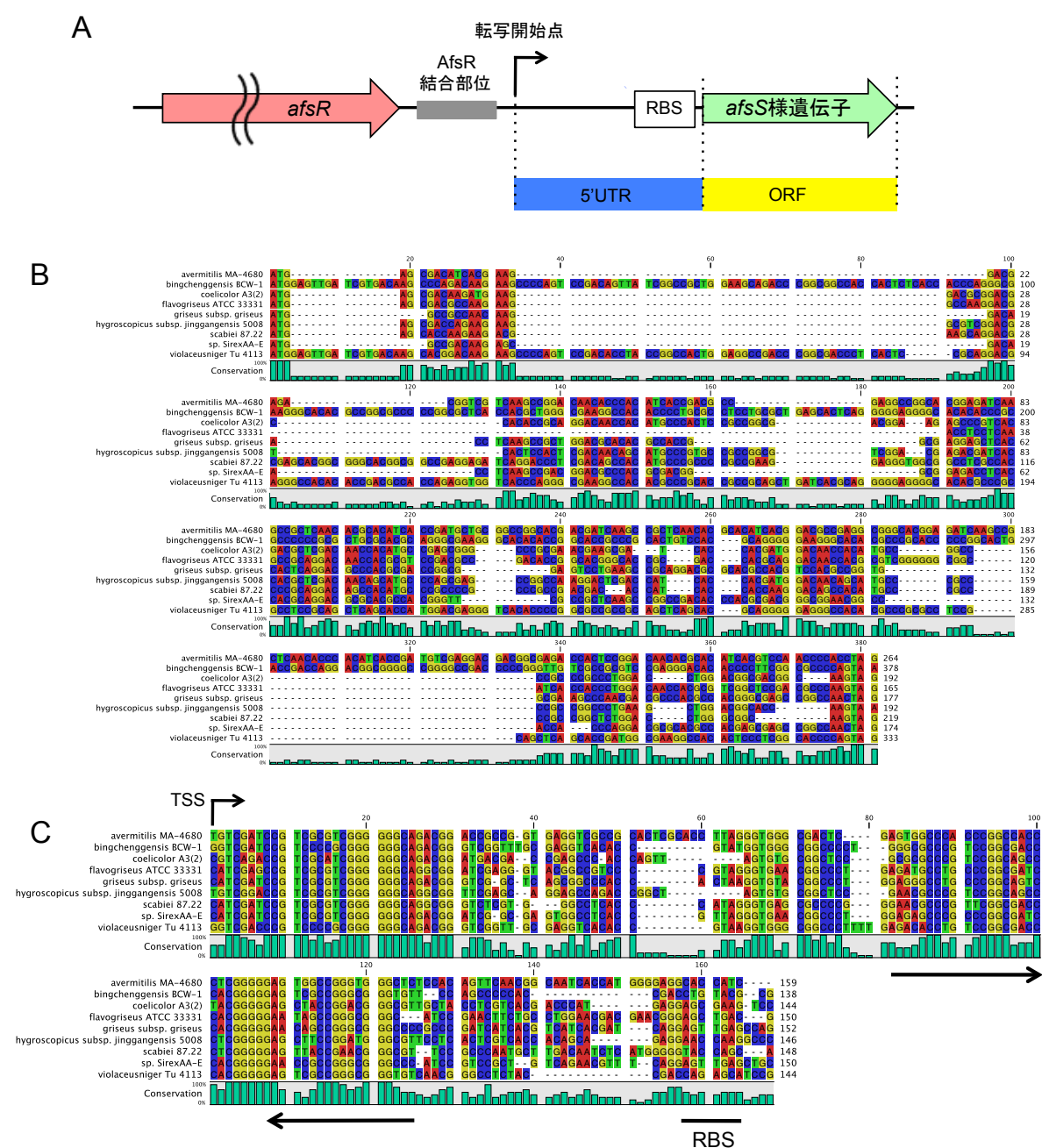


図 2. 1. 5. *Streptomyces* の *afsS* 遺伝子座の比較

(A) *afsS* 遺伝子座の概念図 5'UTR と ORF をコードする領域の位置関係を示した

(B) *Streptomyces* の ORF をコードする DNA 配列を比較した

(C) *Streptomyces* の 5'UTR を比較した 転写開始点(TSS)は *S. coelicolor* A3(2)の配列情報を元に予測した。強力なヘアピン構造を取ると予測される領域を矢印で示した。

*S. avermitilis* MA-4680, *S. bingchenggensis* BCW-1, *S. coelicolor* A3(2), *S. flavogriseus* ATCC 33331, *S. griseus* subsp. *griseus*, *S. hygroscopicus* subsp. *jinggangensis* 5008, *S. scabiei* 87.22, *Streptomyces* sp. SirexAA-E, *S. violaceusniger* Tu 4113 について多重配列アライメントを行った。

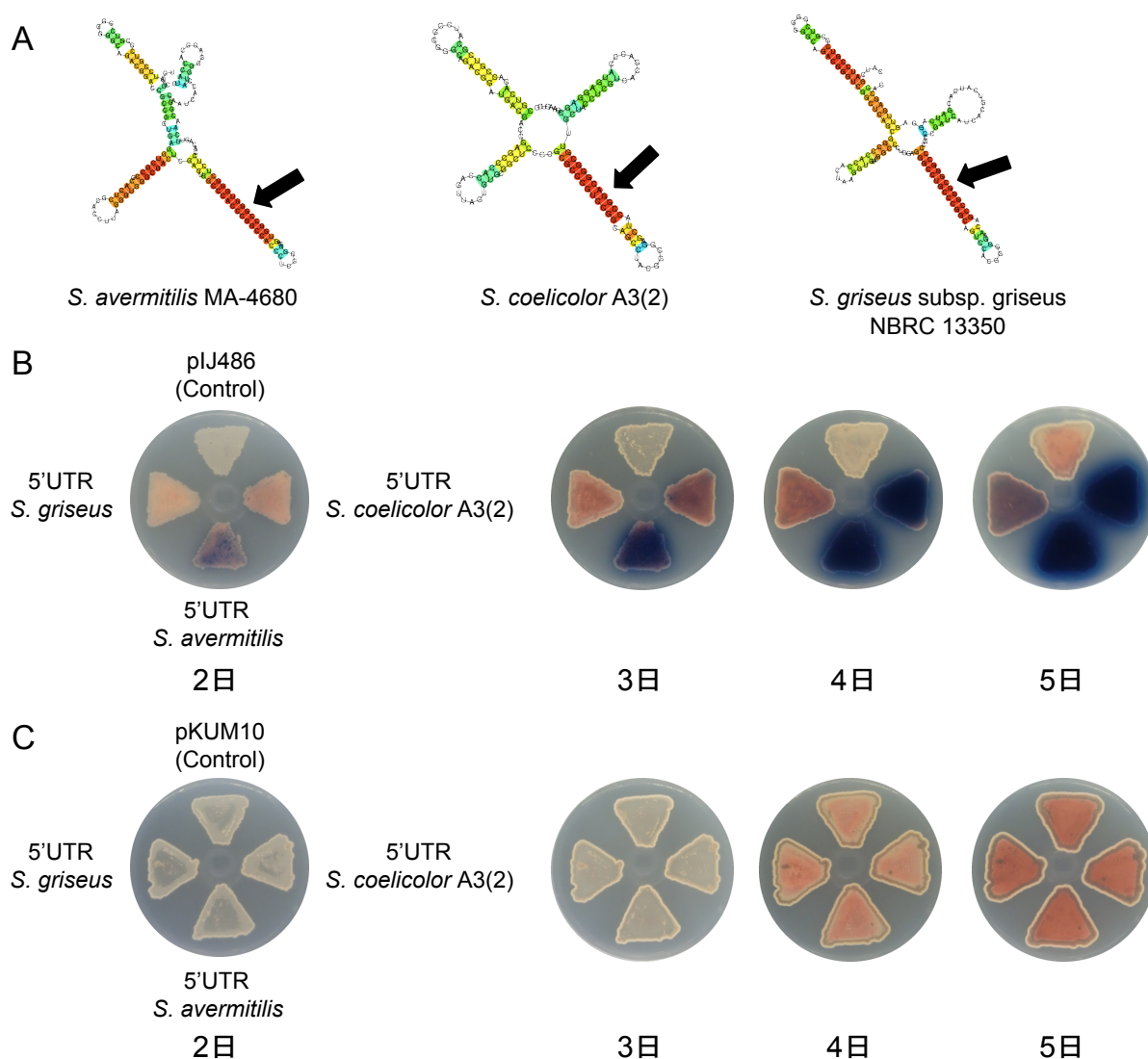


図 2. 1. 6. 3 種の *Streptomyces* 由来 5'UTR を *S. lividans* に導入した

(A) 3 種の *Streptomyces* 由来 5'UTR の二次構造予測 *S. avermitilis*, *S. coelicolor* A3(2), *S. griseus* の 5'UTR を CentroidFold (Sato *et al.*, 2009; <http://www.ncrna.org/>) で二次構造予測した。強力なヘアピン構造が予測された部位を矢印で示した。

(B) pIJ486 で 5'UTR を *S. lividans* に導入した *S. lividans* を pIJ486、pIJ486-UTR(ave)、pIJ486-UTR(coe)、pIJ486-UTR(gri)で形質転換し、R5-プレート上で培養した。

(C) 低コピーベクターで 5'UTR を *S. lividans* に導入した *S. lividans* を pKUM10、pKUM10-UTR(ave)、pKUM10-UTR(coe)、pKUM10-UTR(gri)で形質転換し、R5-プレート上で培養した。

### 1. 2. 5 異種 *Streptomyces* の *afaS* 遺伝子座の機能比較 (ORF)

3 種の *Streptomyces* 間で 5'UTR の Act 生産活性化能に差異が見られたが、ORF をコードする領域の機能についても差異が見られるのか興味を持たれた。*afsS* および *afsS* 様遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は 3 種の *Streptomyces* 間で配列の保存性が極めて低い、特徴的な繰り返し配列を有している (図 2. 1. 7. A B)。そこで、これらの ORF 領域を *S. lividans* に pIJ486 で導入し、その表現型を観察した (図 2. 1. 7. C)。*afsS* 遺伝子座のプロモーター領域や 5'UTR の DNA 配列は異種 *Streptomyces* 間で異なる。そのため、主要  $\sigma$  因子をコードする *hrdB* のプロモーターと 5'UTR を *afsS* および *afsS* 様遺伝子の発現に使用し、プロモーターによる発現量の差や 5'UTR の Act 生産活性化能の影響を受けないようにした。

その結果、*S. coelicolor* A3(2) および *S. giseus* 由来の ORF を導入した際には、培養 4 日目で Act 生産が見られた。一方、*S. avermitilis* の ORF を導入した際には、5 日目まで培養しても Act 生産が見られなかった。

さらに、*S. coelicolor* A3(2) 由来の ORF を導入した際には、培養 2 日目で Red の生産が見られたが、同じ時期に *S. giseus* 由来の ORF では見られなかった。この結果は、*S. coelicolor* A3(2) 由来の ORF と *S. giseus* 由来の ORF では、Red 生産活性化においては機能的な差異が存在することを示している。

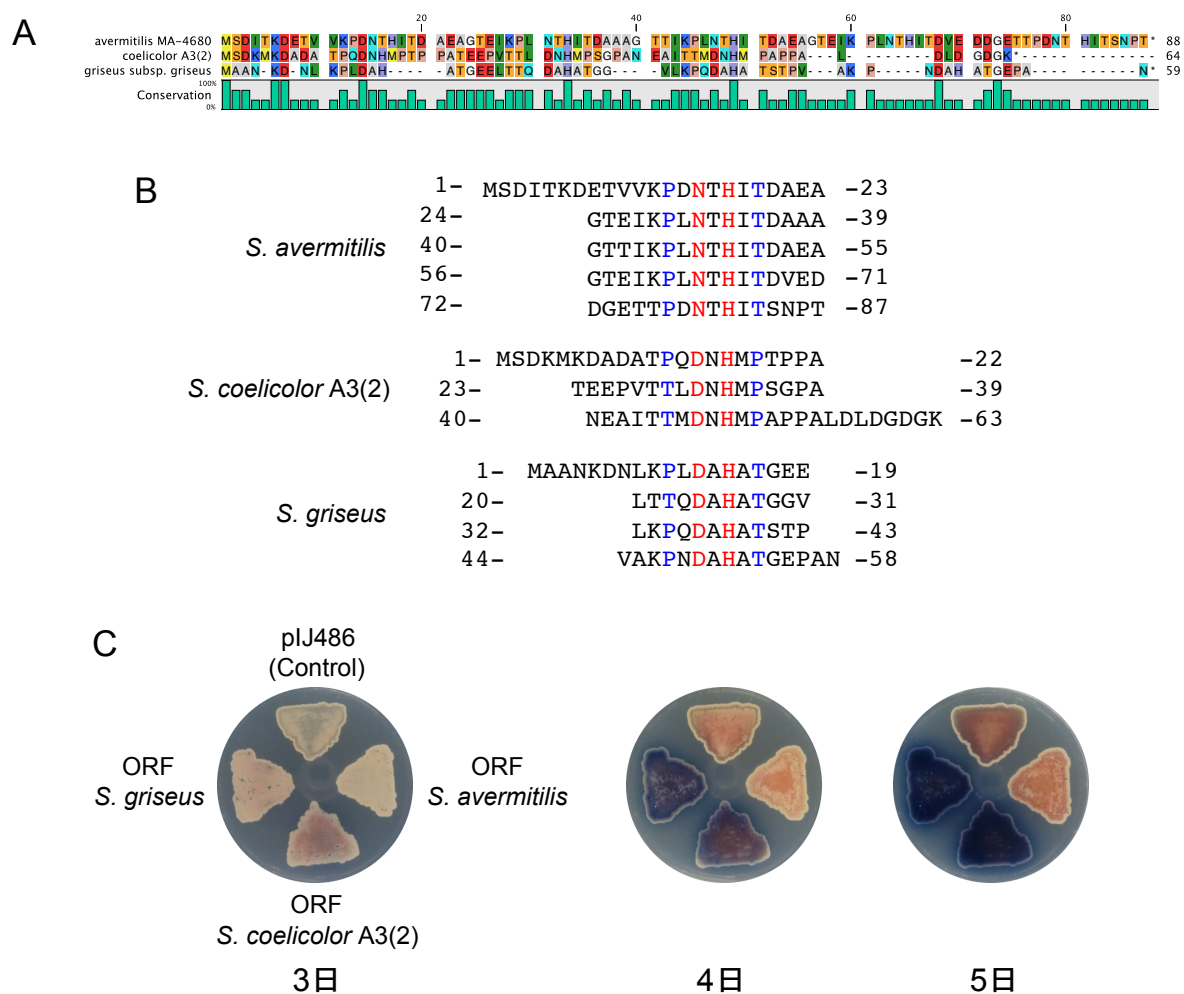


図 2. 1. 7. 3 種の *Streptomyces* 由来 ORF を *S. lividans* に導入した

(A) ORF のアミノ酸配列を比較した

(B) ORF の繰り返し配列を比較した

(C) pIJ486 で ORF を *S. lividans* に導入した *S. lividans* を pIJ486、pIJ486-ORF(ave)、pIJ486-ORF(coe)、pIJ486-ORF(gri)で形質転換し、R5-プレート上で培養した。

### 1. 2. 6. 5'UTR と ORF の相互作用確認

AfsS は 63 アミノ酸残基の非常に小さいタンパク質であるため、単独で複雑な機能を担っているとは考えにくい。そのため、AfsS と結合するタンパク質の存在を想定し、その取得が試みられてきたが、AfsS 結合タンパク質は取得されていない（鈴木あやの, 平成 14 年度修士論文; 辛利弥, 平成 22 年度修士論文）。既知の機能的なドメインは存在していないが、核酸などの分子と相互作用している可能性も考えられた。しかし、AfsS のターゲットとなる核酸についての手がかりは得られていなかった。

1. 2. 4 および 1. 2. 5. において、*S. coelicolor* A3(2)由来の 5'UTR または ORF のどちらか一方を pIJ486 により *S. lividans* に導入しても Act 生産活性化能が見られたが、*S. lividans* のゲノム上にも *afsS* 遺伝子座が存在しているため、真に単独で機能していると証明されたわけではない。過剰発現した際の表現型に関連があるため、5'UTR と *afsS* が結合し、協調的に機能を発揮する可能性も考えられた。そこで、AfsS と 5'UTR 由来のヘアピン構造をとる RNA の結合を EMSA で確認した。

N 末端側にポリヒスチジンタグを付加した AfsS を大腸菌で過剰生産し、アフィニティー精製を行った（図 2. 1. 7. A）。また、UTR(short)をコードする DNA をテンプレートとし、*in vitro* 転写により放射能ラベルした RNA プローブを作製した（図 2. 1. 4. C）。この RNA プローブと精製した AfsS の EMSA を行った（図 2. 1. 7. B）。

その結果、AfsS を 63 pmol まで増加させても、シフトバンドは見られなかった。そのため、5'UTR と AfsS が結合する可能性は極めて低いと結論付けた。なお、RNA プローブの分解が見られないことから、AfsS に非特異的なヌクレアーゼ活性はないと考えられる。



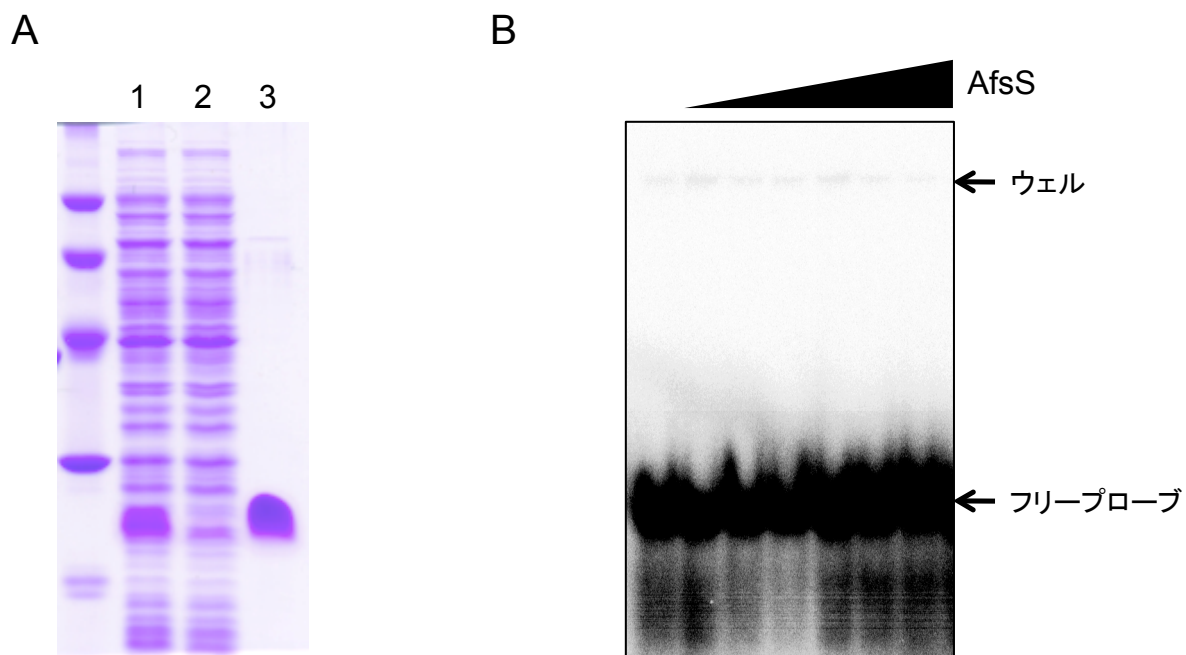


図 2. 1. 7. 5'UTR と AfsS の結合を確認した

(A) **His-AfsS の精製** BL21(DE3)を pET15b-*afsS* で形質転換し過剰発現を行った。大腸菌の粗抽出タンパク質に対してポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行った。その後、各画分を SDS-PAGE に供した。レーン 1：可溶性画分、レーン 2：フロースルー画分、レーン 3：溶出画分。

(B) **精製 AfsS と UTR(short)の EMSA** 左側のレーンから、0 pmol、0.26 pmol、0.77 pmol、2.3 pmol、6.9 pmol、21 pmol、63 pmol の精製 AfsS を EMSA に供した。

### 1. 2. 7 5'UTR のヘアピン構造に結合するタンパク質取得の試み

*afsS* 遺伝子座の 5'UTR を *S. lividas* に pIJ486 で導入した際に、non-coding RNA として機能することが示された。non-coding RNA は他の RNA と塩基対を形成することにより mRNA の翻訳効率や安定性を変化させ、遺伝子の発現に関与することがバクテリアにおいて知られている (Gottesman, 2005)。さらに、大腸菌 *Escherichia coli* では、RNA シャペロン Hfq が non-coding RNA と標的 RNA の塩基対形成を促進することが知られている (Valentin-Hansen *et al.*, 2004)。しかし、*Streptomyces* を含む放線菌では *E. coli* の Hfq ホモログに相当する遺伝子は見出されていない (Sun *et al.*, 2002)。5'UTR のヘアピン構造の領域が機能を発揮する際にも、RNA シャペロンに相当する RNA 結合タンパク質が塩基対形成を促進しているのではないかと考えた。そこで、5'UTR のヘアピン構造に結合するタンパク質の取得を試みた。

ヘアピン構造を有する UTR(short)とヘアピン構造を破壊した UTR( $\Delta$ HP-1)をコードする DNA をテンプレートとし、*in vitro* 転写により放射能ラベルした RNA プローブを作製した (図 2. 1. 4. C)。これらの RNA プローブと *S. lividans* から調製した粗抽出タンパク質を用いて、EMSA を行った (図 2. 1. 8.)。弱い非特異的な結合を防ぐため、RNA の競合剤として yeast tRNA またはヘパリンを加えた。

培養 1 日目の粗抽出タンパク質と RNA プローブで EMSA を行ったところ、yeast tRNA 存在下でも見られるシフトバンドを 1 本、ヘパリン存在下でも見られるシフトバンドを 1 本生じた。また、yeast tRNA およびヘパリン存在下において、ウェルに詰まった様なシフトバンドが 1 本見られた。しかし、UTR(short)と UTR( $\Delta$ HP-1)のシフトパターンに差は見られなかった。

培養 2 日目および 3 日目の粗抽出タンパク質と RNA プローブで EMSA を行ったところ、yeast tRNA 存在下でも見られるシフトバンドを 1 本、ヘパリン存在下でも見られるシフトバンドを 1 本生じた。しかし、培養 1 日目と同様に、UTR(short)と UTR( $\Delta$ HP-1)のシフトパターンに差は見られなかった。

以上の結果から、今回行った EMSA の条件下ではヘアピン構造に特異的に結合するタンパク質を検出することはできなかった。

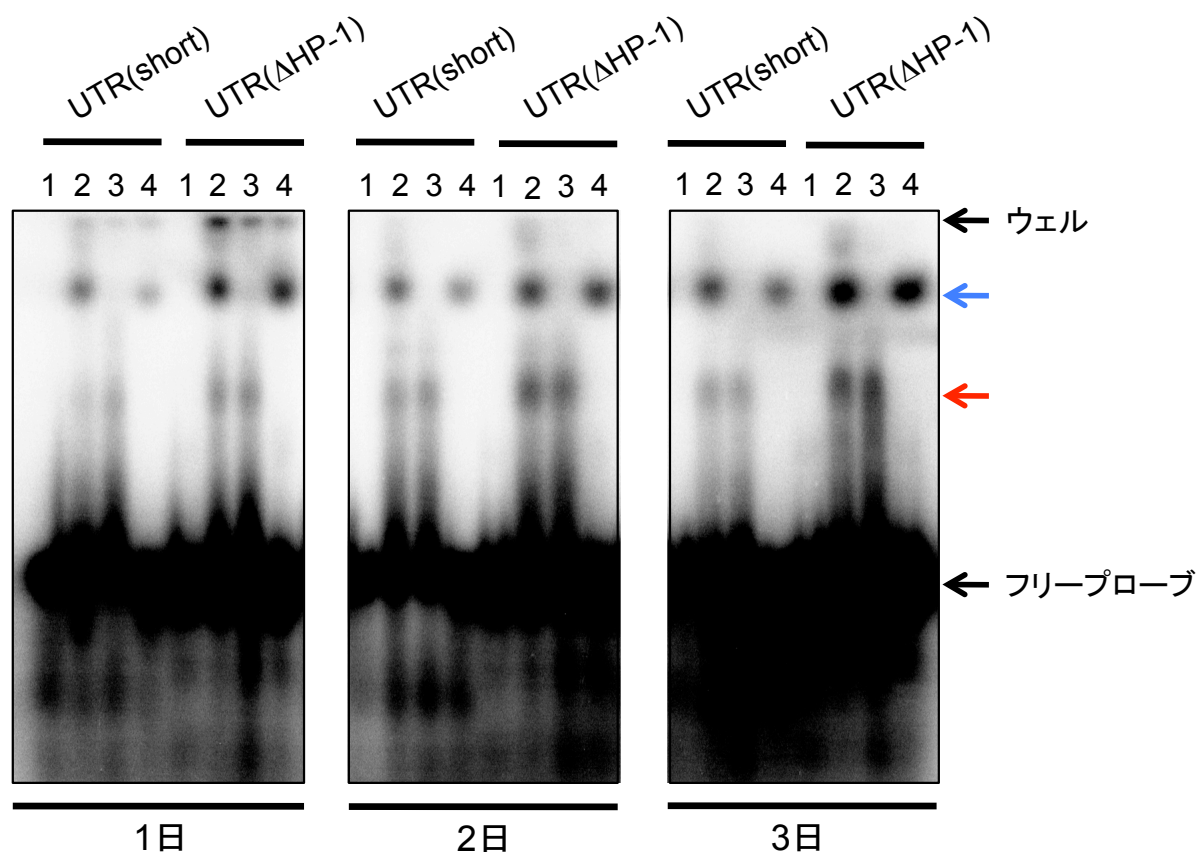


図 2. 1. 8. 5'UTR のヘアピン構造と結合するタンパク質の検出 R5-液体培地で培養した *S. lividans* を培養 1~3 日目で回収し、粗抽出タンパク質を調製した。粗抽出タンパク質、RNA プローブ、RNA 競合剤 (yeast tRNA またはヘパリン) を EMSA に供した。yeast tRNA 存在下でも見られたシフトバンドを赤矢印、ヘパリン存在下でも見られたシフトバンドを青矢印で示した。

レーン 1 : RNA プローブ

レーン 2 : RNA プローブ, 粗抽出タンパク質 (40  $\mu$ g)

レーン 3 : RNA プローブ, 粗抽出タンパク質 (40  $\mu$ g) , yeast tRNA (0.1 mg/ml)

レーン 4 : RNA プローブ, 粗抽出タンパク質 (40  $\mu$ g) , ヘパリン (1 mg/ml)

#### 1. 2. 8. 5'UTR が遺伝子発現に与える影響の解析

UTR(short)が non-coding RNA として mRNA の翻訳効率や安定化に影響を与えるのであれば、標的となる mRNA がコードするタンパク質の存在量が増加すると考えた。そこで、二次元電気泳動によるプロテオーム解析を行い、UTR(short)を導入した際に発現量が増加するタンパク質の検出を試みた。

*hrdB* プロモーター下流に接続した UTR(short)を pIJ486 で *S. lividans* に導入し液体培養すると、培養 2～3 日目で Act 生産を行う (data not shown)。そのため、UTR(short)導入による遺伝子発現量の変化は、Act 生産よりも早い時期で生じていると考えられた。そこで、培養 1 日目および 2 日目の菌体を回収し、調製した粗抽出タンパク質を二次元電気泳動に供した (図 2. 1. 9.)。その結果、多数のタンパク質スポットが検出されたが、培養 1 日目と 2 日目ともにコントロールベクターを導入した際と UTR(short)を導入した際のタンパク質の出現パターンに明らかな差異は見られなかった。CBB 染色でタンパク質スポットが検出されるためには、ある程度のタンパク質量が必要である。そのため、UTR(short)の標的となっている遺伝子は発現量が少ないため、検出できなかった可能性がある。

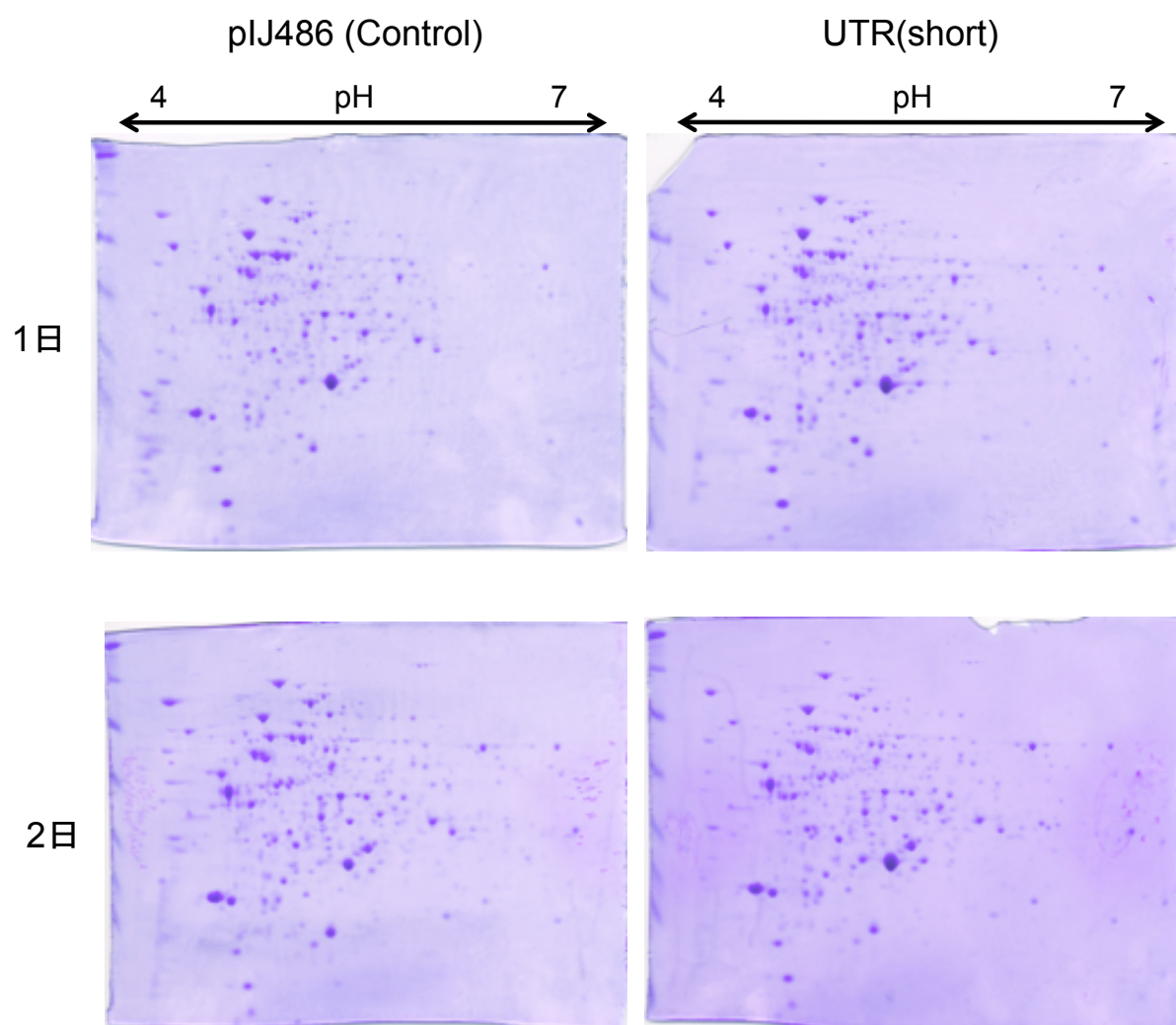


図 2. 1. 9. UTR(short)を pIJ486 で導入した際のプロテオーム解析 *S. lividans* を pIJ486、pIJ486-UTR(short)で形質転換した。R5-液体培地で 1～2 日培養し、菌体を回収した。菌体を超音波破碎し、粗抽出タンパク質 450  $\mu\text{g}$  を二次元電気泳動に供した。一次元目は pH4-7 の等電点電気泳動、二次元目は 10% Tricine-SDS-PAGE で展開した。

### 1. 3 考察

#### 5'UTR を高コピーベクターで *S. lividans* に導入した際の表現型

本研究により、*afsS* 遺伝子座に存在する 5'UTR のヘアピン構造が Act 生産活性化能を示すことを初めて明らかにした。また、Act 生産ほど顕著ではないが、Red 生産活性化能も示した (図 2. 1. 4., 図 2. 1. 6.)。このことから、5'UTR のヘアピン構造が転写されることで生じる色素生産活性化は、グローバルな制御機構に関与していると考えられる。

*Streptomyces noursei* のゲノム DNA 断片を高コピーベクターで *S. lividans* に導入し、Act 生産を誘導する DNA 断片として *afsS* 様遺伝子 *ssmA* を含む *afsS* 遺伝子座がクローニングされた (Sekurova *et al.*, 1999)。しかし、論文で検証された DNA 断片の切り縮め実験では、*ssmA* とその 5'UTR を同時に導入した際の表現型を観察しているため、*ssmA* の機能のみで Act 生産が活性されるのか検証が必要である。実際、*ssmA* の 5'UTR にも強力なヘアピン構造が予測された (data not shown)。

*S. coelicolor* A3(2)由来の 5'UTR を pIJ486 で *S. griseus* に導入し、ストレプトマイシンの生産を調べたが、コントロールベクターを導入した株と生産量に違いは見られなかった (data not shown)。ストレプトマイシン以外の二次代謝産物の生産が変化している可能性もあり、さらなる検証が必要である。また、後述するが、5'UTR の導入により *S. lividans* の二次代謝が活性化されるのは特定の培地条件下であるため、*S. griseus* の二次代謝産物の検出にも最適な培地条件の検討が必要かもしれない。

#### 5'UTR が *S. lividans* の Act 生産を活性化するために必要な条件

本研究では、pIJ486 による高コピー条件下で 5'UTR を *S. lividans* に導入した際の Act 生産活性化について詳細な検証を行った。一方、低コピーベクター pKUM10 で 5'UTR を導入した際には、Act 生産を活性化することはできなかった (図 2. 1. 6.)。pIJ486 は細胞中に 100 ~ 200 コピー (Ward *et al.*, 1986)、pKUM10 は細胞中に 1 ~ 4 コピー (Bibb *et al.*, 1977; Kakinuma *et al.*, 1991; Yamazaki *et al.*, 2003) 存在していると考えられている。5'UTR が通常は色素生産を行わない *S. lividans* に Act 生産を誘導するためには、おそらく高レベルでの転写が必要である。

また、5'UTR を高コピーベクターで *S. lividans* に導入した際の Act 生産は、培地条件に依存する。実験に用いた YEME 培地では 34%、R5-培地では 10.3%のスクロースが含まれており、いずれも培地からスクロースを除いた培地では Act 生産が見られなかった (data not shown)。*S. lividans* の近縁種である *S. coelicolor* A3(2)では、培地中のスクロースによる浸透圧ストレスが Act 生産を促進することが示唆されている (Elibol *et al.*, 1998)。おそらくは、

スクロースによる高浸透圧ストレス条件が、Act 生産の誘導に必要である。

### 3 種の *Streptomyces* 由来 5'UTR を導入した際の表現型の差異

3 種の *Streptomyces* 由来の 5'UTR を高コピーで導入した際には、いずれも Red 生産活性化が見られたが、*S. griseus* 由来の 5'UTR では Act 生産活性化は見られなかった(図 2. 1. 6. B)。そこで、Act 生産活性化が見られた *S. avermitilis* と *S. coelicolor* A3(2)由来の 5'UTR と、Act 生産活性化が見られなかった *S. griseus* 由来の 5'UTR を比較した(図 2. 1. 6. A)。しかし、ヘアピン構造をとる特徴はあるが、Act 生産活性化能と二次構造に関連を見つけることはできなかった。*S. avermitilis* や *S. griseus* 由来の 5'UTR ではヘアピン構造以外の部位も Act 生産活性化に影響を与える可能性もあり、切り縮め実験などの解析を行う必要がある。切り縮め実験により、*S. avermitilis* 由来の 5'UTR を導入した際に *S. coelicolor* A3(2)由来の 5'UTR よりも早い時期で Act 生産が誘導される原因も明らかにできると考えられる。

### ヘアピン構造が Act 生産活性化する機構の解明 (標的となる遺伝子の探索)

*S. coelicolor* A3(2)由来 5'UTR のヘアピン構造が non-coding RNA として機能することが明らかになった (図 2. 1. 4.)。non-coding RNA は塩基対を形成することで機能を発揮する例が知られている (Gottesman, 2005)。5'UTR が塩基対を形成する標的 RNA について予想するため、84 bp の UTR(short)をクエリーとして、*S. lividans* のゲノム配列に対して BLAST 解析を行った。ヘアピンを構成する塩基対の上流部位が 9 カ所の領域とヒットしたが、いずれも一次代謝酵素や hypothetical protein などのコード領域内側であり、二次代謝制御に関連することが既知な遺伝子は含まれていなかった (data not shown)。non-coding RNA は配列が 100%一致しなくても機能するため (Gottesman, 2005)、配列検索でヒットしない領域が標的である可能性は十分にある。塩基対を形成する RNA の探索からヘアピン構造による Act 活性化の分子機構解明を行うのは困難であると考えられた。そこで、UTR(short)を導入した際に発現量に変化する遺伝子をプロテオーム解析で探索した (図 2. 1. 9.)。しかし、コントロールベクターを導入した際と発現パターンが変化するタンパク質スポットは検出されなかった。二次元電気泳動でスポットが観察されるためにはある程度のタンパク質量が必要であるため、細胞内に存在量の少ないタンパク質の発現変化を検出するのは困難である。マイクロアレイ解析やトランスクリプトーム解析など、RNA レベルの存在量の変化を解析することで、ヘアピン構造と塩基対を形成する標的の手がかりを得ることができると考えられる。

### ヘアピン構造が Act 生産活性化する機構の解明 (RNA 結合タンパク質の探索)

大腸菌においては、ヘアピン構造を取る non-coding RNA は RNA シャペロン Hfq により標的 RNA と塩基対を形成することが報告されている (Valentin-Hansen *et al.*, 2004)。一方、*Streptomyces* では Hfq ホモログは見出されていない (Sun *et al.*, 2002)。そこで、5'UTR のヘアピン構造が non-coding RNA として他の RNA と塩基対を形成することを仮定し、Hfq 様の RNA 結合タンパク質の取得を試みた。しかし、機能に重要であるヘアピン構造に特異的に結合するタンパク質は見出されなかった (図 2. 1. 8.)。Hfq は RNA の A/U 塩基に富んだ 1 本鎖領域に結合するとの報告がある (Schumacher *et al.*, 2002)。*afsS* 遺伝子座の 5'UTR は A/U リッチではないが、ヘアピン構造を破壊した RNA の 1 本鎖領域に Hfq 様タンパク質が結合している可能性もある。その場合、ヘアピン構造の破壊により塩基対形成能が失われ、Act 生産の誘導を行えなくなったのかもしれない。yeast tRNA およびヘパリンを競合剤として加えた際に、それぞれシフトバンドが見られるため、これらのシフトを生じているタンパク質の同定を行うことは、5'UTR のヘアピン構造が Act 生産を活性化する機構を解明する手がかりになると考えられる。また、*S. lividans* の粗抽出タンパク質と混合しても、RNA プローブの分解が見られないことから、これらの RNA 結合タンパク質が RNA プローブの安定化に関与している可能性もある (図 2. 1. 8.)。

### 5'UTR にヘアピン構造が存在することの生理学的意義

5'UTR が機能を発揮する際にプロセッシングを受けている可能性を考え、S1 スクレアーゼマッピング解析を行ったが、切断された mRNA を検出することはできなかった (data not shown)。同一の転写単位において、5'UTR と ORF をコードする領域が切り離されて機能している可能性は低いと考えられる。

5'UTR のヘアピン構造は下流に存在する *afsS* 様遺伝子の発現調節を行うことが本来の機能である可能性もある。大腸菌において、3'側に U 塩基の連続した領域を伴うヘアピン構造が p 因子非依存ターミネーターとして機能することが知られている (Farnham *et al.*, 1981)。一方、*Streptomyces hygroscopicus* の *hyg* 遺伝子において、連続した U 塩基が存在しないヘアピン構造がターミネーターとして機能することも報告されており (Zalacain *et al.*, 1986)、GC リッチな *Streptomyces* ではヘアピン構造のみでもターミネーターとして機能することがある。そのため、5'UTR のヘアピン構造が *afsS* 遺伝子座の転写終結点として機能する可能性は考えられる。転写が終結している証拠は得られていないが、抗転写終結因子が結合することで、ORF 領域まで転写が伸長されているのかもしれない。

また、ヘアピン構造自体に RBS (ribosome binding site) は含まれていないが、RBS 近傍に存在するヘアピン構造により ORF の翻訳効率が調節されている可能性がある。大腸菌においては、non-coding RNA が結合することで 5'UTR の構造が変化し、翻訳効率が調節される



例が報告されている (Waters *et al.*, 2009)。この可能性については、ヘアピン構造を破壊した際の *afsS* の翻訳効率を検証する必要がある。

ヘアピン構造が non-coding RNA として塩基対を形成することで機能を発揮する可能性については前述した。一方、高コピーベクターから転写された 5'UTR のヘアピンが、他の遺伝子の mRNA に存在している転写終結制御や翻訳調節に必要な因子を競合的に奪うことで、間接的に Act 生産活性化が引き起こされている可能性もある。

### 3 種の *Streptomyces* 由来 ORF を導入した際の表現型の差異

3 種の *Streptomyces* 由来の ORF を *hrdB* のプロモーターと 5'UTR で導入した際には、*S. coelicolor* A3(2)および *S. griseus* 由来の ORF で Act 生産を活性化したが、*S. avermitilis* 由来の ORF では Act 生産活性化は見られなかった(図 2. 1. 7. C)。 *S. coelicolor* A3(2)および *S. griseus* 由来の ORF では、繰り返し配列中に Asp と His が存在しているが、*S. avermitilis* では Asn と His に置換されている (図 2. 1. 7. B)。 *S. coelicolor* A3(2)の AfsS では、3 カ所存在する繰り返し配列の Asp と His を Ala に置換すると Act 生産活性化能が無くなることが示されている (高野雄治, 平成 16 年度修士論文)。また、NMR による構造解析から、*S. griseus* 由来の ORF は、繰り返し配列の部位でターンを形成するリング状の構造が観察されている (図 1. 3. 3. C; 宮川拓也ら, 2009)。繰り返し配列の置換により立体構造が変化し、Act 生産活性化能の差異を生じている可能性が考えられる。繰り返し配列の Asn を Asp に置換した *S. avermitilis* 由来の ORF を *S. lividans* に導入し、表現型を観察する必要がある。

*S. coelicolor* A3(2)の ORF と結合するタンパク質の取得が試みられているが、いずれもその取得には至っていない (鈴木あやの, 平成 14 年度修士論文; 辛利弥, 平成 22 年度修士論文)。異種 *Streptomyces* 間での機能比較を行うことで、*afsS* 様遺伝子がコードするタンパク質の機能に必須な構造を明らかにし、分子機構解明の手がかりを得ることを期待できる。

### *S. coelicolor* A3(2)由来の *afsS* 遺伝子座は二機能性 RNA として機能する

*afsS* 遺伝子座の 5'UTR および ORF を高コピーベクターで *S. lividans* に導入した結果をまとめた (表 2. 1. 1.)。 *hrdB* プロモーターと高コピーベクターを用いた人為的な条件下で引き起こされた現象ではあるが、*S. coelicolor* A3(2)由来の *afsS* 遺伝子座において同じ転写単位に存在する non-coding RNA と ORF が独立して同じ生理的機能を有することは興味深い。その様な例は、大腸菌の糖アナログストレス条件下で転写活性化される *sgrST* のみ知られている (Vanderpool *et al.*, 2011)。227 base の転写単位の 5'側に 43 アミノ酸残基のタンパク質をコードする *sgrT* が、3'側に 20 base ほどの non-coding RNA 領域 (*sgrS*) が存在する。どちらも、単独で機能させても糖アナログストレスの軽減に機能する。SgrT の作用機構は不

明であるが、*sgrS* は糖トランスポーターをコードする mRNA と塩基対を形成し発現を抑制することが示されている。

一方、*S. avermitilis* や *S. griseus* 由来の *afsS* 遺伝子座については、5'UTR と ORF の両方が Act 生産活性化を示したわけではないが、どちらか一方は Act 生産活性化能を有していた。*S. avermitilis* や *S. griseus* においても、これらの領域を高コピーベクターにより過剰発現させると二次代謝を活性化するかもしれない。

	5'UTR	ORF
<i>S. avermitilis</i>	◎	×
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	○	○
<i>S. griseus</i>	×	○

表 2. 1. 1. *S. lividans* に高コピーベクターで導入した際の Act 生産活性化

## 1. 4. 実験方法

基本的な実験方法については第 4 部「実験材料と方法」に示した。

### 【ベクターの構築】

全ての PCR 産物は配列に誤りが無いことを DNA シークエンス解析により確認した。

#### **pIJ486-PUS**

*S. coelicolor* A3(2)ゲノム DNA をテンプレートとして、afsS pro-F と afsS-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と Hind III で切断し、pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-PUS** とした。pUC19-PUS を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-PUS** とした。

#### **pIJ486-PU**

pUC19-PUS をテンプレートとして、afsS pro-F と afsS UTR-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と Hind III で切断し、pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-PU** とした。pUC19-PU を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-PU** とした。

#### **pIJ486-P**

pUC19-PUS をテンプレートとして、afsS pro-F と afsS pro-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と BamH I で切断し、pUC19 (EcoR I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-P** とした。pUC19-P を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-PU** とした。

#### **pIJ486-PS**

pUC19-PUS をテンプレートとして、afsS RBS-F と afsS-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と Hind III で切断し、pUC19-P (BamH I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-PS** とした。pUC19-PS を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-PS** とした。

### **pIJ486-US**

pUC19-PUS をテンプレートとして、afsS TSS -F と afsS -R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と Hind III で切断し、pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-US** とした。pUC19-US を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-US** とした。

### **pIJ6021-UTR(Full)**

pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR del 1-F と UTR del 1-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と EcoR I で切断し、pUC19 (BamH I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-UTR(Full)** とした。pUC19-UTR(Full) を Nde I と EcoR I で切断し、得られた断片を pIJ6021 (Nde I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ6021-UTR(Full)** とした。

### **pIJ6021-F1**

pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR del 2-F と UTR del 1-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と EcoR I で切断し、pUC19 (BamH I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-F1** とした。pUC19-F1 を Nde I と EcoR I で切断し、得られた断片を pIJ6021 (Nde I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ6021-F1** とした。

### **pIJ6021-F2**

pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR del 3-F と UTR del 1-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と EcoR I で切断し、pUC19 (BamH I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-F2** とした。pUC19-F2 を Nde I と EcoR I で切断し、得られた断片を pIJ6021 (Nde I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ6021-F2** とした。

### **pIJ6021-F3**

pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR del 4-F と UTR del 1-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と EcoR I で切断し、pUC19 (BamH I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-F3** とした。pUC19-F3 を Nde I と EcoR I で切断し、得られた断片を pIJ6021 (Nde I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ6021-F3** とした。

#### **pIJ6021-F4**

pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR del 5-F と UTR del 1-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と EcoR I で切断し、pUC19 (BamH I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-F4** とした。pUC19-F4 を Nde I と EcoR I で切断し、得られた断片を pIJ6021 (Nde I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ6021-F4** とした。

#### **pIJ6021-R1**

pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR del 1-F と UTR del 2-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と EcoR I で切断し、pUC19 (BamH I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-R1** とした。pUC19-R1 を Nde I と EcoR I で切断し、得られた断片を pIJ6021 (Nde I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ6021-R1** とした。

#### **pIJ6021-R2**

pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR del 1-F と UTR del 3-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と EcoR I で切断し、pUC19 (BamH I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-R2** とした。pUC19-R2 を Nde I と EcoR I で切断し、得られた断片を pIJ6021 (Nde I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ6021-R2** とした。

#### **pIJ6021-R3**

pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR del 1-F と UTR del 4-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と EcoR I で切断し、pUC19 (BamH I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-R3** とした。pUC19-R3 を Nde I と EcoR I で切断し、得られた断片を pIJ6021 (Nde I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ6021-R3** とした。

#### **pIJ6021-R4**

pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR del 1-F と UTR del 5-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と EcoR I で切断し、pUC19 (BamH I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-R4** とした。pUC19-R4 を Nde I と EcoR I で切断し、得られた断片を pIJ6021 (Nde I / EcoR I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ6021-R4** とした。

### **pIJ486-UTR(short)**

*S. coelicolor* A3(2)ゲノム DNA をテンプレートとして、hrdB pro-F と hrdB pro-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と BamH I で切断し、pUC19 (EcoR I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-hrdB pro** とした。pUC19-PUS をテンプレートとして、UTR short-F と UTR short-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と Hind III で切断し、pUC19-hrdB pro (BamH I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-UTR(short)** とした。pUC19-UTR(short)を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-UTR(short)** とした。

### **pIJ486-ΔHP1**

pUC19-UTR(short)をテンプレートとして、UTR del HP1-F と UTR del HP1-R により Inverse PCR を行った。得られた変異導入断片を T4 ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、T4 DNA リガーゼで環化した。得られたプラスミドを **pUC19-ΔHP1** とした。pUC19-ΔHP1 を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-ΔHP1** とした。

### **pIJ486-ΔHP2**

pUC19-UTR(short)をテンプレートとして、UTR del HP2-F と UTR del HP2-R により Inverse PCR を行った。得られた変異導入断片を T4 ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、T4 DNA リガーゼで環化した。得られたプラスミドを **pUC19-ΔHP2** とした。pUC19-ΔHP2 を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-ΔHP2** とした。

### **pIJ486-UTR(double)**

pUC19-ΔHP1 をテンプレートとして、UTR del HP2-F と UTR del HP2-R により Inverse PCR を行った。得られた変異導入断片を T4 ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、T4 DNA リガーゼで環化した。得られたプラスミドを **pUC19-UTR(double)** とした。pUC19-ΔHP2 を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-UTR(double)** とした。

### **pIJ486-UTR(ave)**

*S. avermitilis* ゲノム DNA をテンプレートとして、UTR(ave)-F と UTR(ave)-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と Hind III で切断し、pUC19-hrdB pro (BamH I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-UTR(ave)** とした。pUC19-UTR(ave) を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-UTR(ave)** とした。

### **pIJ486-UTR(coe)**

pUC19-PUS テンプレートとして、UTR(coe)-F と UTR(coe)-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と Hind III で切断し、pUC19-hrdB pro (BamH I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-UTR(coe)** とした。pUC19-UTR(coe) を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-UTR(coe)** とした。

### **pIJ486-UTR(gri)**

*S. griseus* ゲノム DNA をテンプレートとして、UTR(gri)-F と UTR(gri)-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と Hind III で切断し、pUC19-hrdB pro (BamH I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-UTR(gri)** とした。pUC19-UTR(gri) を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-UTR(gri)** とした。

### **pKUM10-UTR(ave)**

pUC19-UTR(ave) を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pKUM10 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pKUM10-UTR(ave)** とした。

### **pKUM10-UTR(coe)**

pUC19-UTR(coe) を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pKUM10 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pKUM10-UTR(coe)** とした。

### **pKUM10-UTR(gri)**

pUC19-UTR(gri) を EcoR I と Hind III で切断し、得られた断片を pKUM10 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pKUM10-UTR(gri)** とした。

### **pIJ486-ORF(ave)**

*S. coelicolor* A3(2)ゲノム DNA をテンプレートとして、hrdB pro(+UTR)-F と hrdB pro(+UTR)-Rにより PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と Hind III で切断し、pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-hrdB pro(+UTR)**とした。*S. avermitilis* ゲノム DNA をテンプレートとして、ORF(ave)-F と ORF(ave)-Rにより PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と Hind III で切断し、pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-ORF(ave)-1**とした。pUC19-hrdB pro(+UTR)を Nde I と Hind III で切断し得られた断片と、pUC19-ORF(ave)-1 を Nde I と EcoR I で切断し得られた断片を pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-ORF(ave)-2**とした。pUC19-ORF(ave)-2 を EcoR I と Hind III で切断し得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-ORF(ave)**とした。

### **pIJ486-ORF(coe)**

pUC19-PUS をテンプレートとして、ORF(coe)-F と ORF(coe)-Rにより PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と Hind III で切断し、pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-ORF(coe)-1**とした。pUC19-hrdB pro(+UTR)を Nde I と Hind III で切断し得られた断片と、pUC19-ORF(coe)-1 を Nde I と EcoR I で切断し得られた断片を pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-ORF(coe)-2**とした。pUC19-ORF(coe)-2 を EcoR I と Hind III で切断し得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-ORF(coe)**とした。

### **pIJ486-ORF(gri)**

*S. griseus* ゲノム DNA をテンプレートとして、ORF(gri)-F と ORF(gri)-Rにより PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と Hind III で切断し、pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-ORF(gri)-1**とした。pUC19-hrdB pro(+UTR)を Nde I と Hind III で切断し得られた断片と、pUC19-ORF(gri)-1 を Nde I と EcoR I で切断し得られた断片を pUC19 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pUC19-ORF(gri)-2**とした。pUC19-ORF(gri)-2 を EcoR I と Hind III で切断し得られた断片を pIJ486 (EcoR I / Hind III) にサブクローニングした。このプラスミドを **pIJ486-ORF(ave)**とした。

### **pET15b-afsS**

先行研究で作製されたベクター（幸利弥，平成 21 年度修士論文）



### 【AfsS の過剰生産】

*E. coli* BL21(DE3)を pET15b-*afsS* で形質転換した。コロニーを爪楊枝でつつき、アンピシリンを添加した LB 培地で一晚培養した。2x YT 培地に 1%植菌し、37°C で O.D.<sub>600</sub>=0.6 まで培養した。培地を室温まで冷却し、IPTG を終濃度 1 mM 添加した。その後、26.5°C で一晚培養した。

### 【AfsS の定量】

先行研究において報告したが、AfsS はアミノ酸組成に著しい偏りがあるため、Bradford 法で定量できない(辛利弥, 平成 21 年度修士論文)。AfsS タンパク質の定量は 2-D Quant Kit (GE healthcare 社)を使用した。検量線の作製にはキットに添付の BSA を使用した。操作は、製品添付のプロトコルに従って行った。

### 【EMSA (RNA プローブ)】

#### 粗抽出タンパク質の調製

*S. livdans* を TSB プレート上で 5 日間培養して孢子形成させた。孢子形成したプレート片を 5 mm 角に切り取り、TSB 培地において 3 日間前培養した。前培養した菌体を回収し、R5-培地で洗浄した。前培養した菌体が 1%となるように R5-培地へ植菌した。培養開始から 1 日後、または 2 日後に菌体を回収した。菌体に Protein buffer を加えて、超音波破碎した。得られた粗抽出タンパク質は Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD 社)を用いて定量を行った。

#### Protein buffer

20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 10% グリセロール, pH7.5

#### RNA プローブの作製

pUC19-UTR(short)を BamH I と EcoR I で切断し、得られた断片をテンプレートとし、UTR probe-F と UTR probe-R で PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物は UTR(short)に T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を付加した 105 bp の DNA 断片である。FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス社)を用いて PCR 産物をゲル精製した。得られた DNA を *in vitro* 転写のテンプレート DNA とした。同様に、pUC19-UTR(double)を用いて *in vitro* 転写のテンプレート DNA を作製した。

100 ng テンプレート DNA, 1850 kBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP, 10 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM UTP, 40 U Recombinant RNase Inhibitor (タカラバイオ社), 20 U T7 RNA ポリメラーゼ (Roche 社) を 20  $\mu$ l 中で調製し、37°C で 1 時間インキュベートした。5 U Recombinant DNase I (タカラバイオ社)を加え、37°C で 15 分間インキュベートし、RNA の合成を停止

させた。溶液の 1/2 量の 7.5 M 酢酸アンモニウムと 2.5 倍量のエタノールを加え、-80°C で 10 分間インキュベートした。遠心して RNA ペレットを回収し、DEPC 水 10 µl に溶解した。ホルムアミド 10 µl を加え、65°C で 15 分間インキュベートした。氷上で急冷し、10x Loading dye (タカラバイオ社) を加えた。8%変性アクリルアミドゲルで泳動し、84 base の RNA プローブを small RNA Gel Extraction Kit (タカラバイオ社) で回収した。RNA プローブは使用前に 90°C で 3 分間インキュベートし、氷上で急冷することで変性させた。変性を行っても RNA プローブの主要な高次構造は再生されることを電気泳動で確認できた (data not shown)。

#### 8%変性アクリルアミドゲル

40%アクリルアミドストック (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=19:1) 5 ml, Urea 10.5 g, 10x TBE buffer 1.25 ml, DEPC 水 10.6 ml, 10% APS 100 µl, TEMED 20 µl

#### 10x TBE buffer

890 mM Tris, 890 mM ホウ酸, 20 mM EDTA, pH は調整しない

#### **電気泳動**

40 µg 菌体粗抽出タンパク質と 100 cps RNA プローブを Binding buffer で 20 µl とした。必要があれば、終濃度 1 mg/ml yeast RNA または 1 mg/ml ヘパリンを加えた。氷上で 20 分間インキュベートした。以後の操作は室温で行った。10%ネイティブアクリルアミドゲルにおいて、150V(13 V/cm)で 30 分間プレランを行った。その後、サンプルをアプライして 150V(13 V/cm)で 2 時間泳動した。

#### Binding buffer

20 mM Tris, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 10% グリセロール, pH 7.5

#### 10%ネイティブアクリルアミドゲル

40%アクリルアミドストック (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=60:1) 5 ml, 10x TBE buffer 1ml, DEPC 水 14 ml, 10% APS 100 µl, TEMED 20 µl

### **【二次元電気泳動】**

#### **粗抽出タンパク質の調製**

*S. lividans* を pIJ486 または pIJ486-UTR(short)で形質転換した。その後、TSB プレート上で 5 日間培養して孢子形成させた。孢子形成したプレート片を 5 mm 角に切り取り、TSB

培地において 3 日間前培養した。前培養した菌体を回収し、R5-培地で洗浄した。前培養した菌体が 1% となるように R5-培地へ植菌した。培養開始から 1 日後、または 2 日後に菌体を回収した。菌体に 2D lysis buffer を加えて、超音波破碎した。得られた粗抽出タンパク質を TCA / アセトン沈殿し、得られたペレットをゲル膨潤 buffer に溶解した。得られたタンパク質サンプルを 2-D Quant Kit で定量した。

#### 2D lysis buffer

50 mM Tris, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl, Recombinant DNase I (タカラバイオ社) ※, RNaseA (Sigma-Aldrich 社) ※, pH 7.5

※量は厳密でない。Buffer 500 µl に対して、10~20 U Recombinant DNase I、10~20 µg RNaseA を加えた。

#### ゲル膨潤 buffer

8M Urea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 0.001% BPB

#### **等電点電気泳動**

タンパク質サンプル 450 µg をゲル膨潤 buffer で 250 µl に調製した。その溶液を Immobiline DryStrip pH 4-7, 13 cm (GE healthcare 社) へ加え、一晚膨潤させた。膨潤させたゲルを 200 V で 10 分間、400 V で 10 分間、1000 V で 1 時間、1500 V で一晚、定電圧で泳動した。

#### **二次元目の泳動前処理**

等電点電気泳動が終了した Immobiline DryStrip に SDS 平衡化 buffer を加え、15 分間振とうした。同様の操作をもう 1 回行った。DriStrip 固定液で Immobiline DryStrip を二次元目のゲル上に固定した。

#### SDS 平衡化 buffer

50 mM Tris, 6M Urea, 30% glycerol, 2% SDS, 1% DTT, pH6.8

#### DriStrip 固定液

0.8% agarose, 0.02% BPB

## 【使用したプライマー】

第1章で使用したプライマーを下表に示した。

Name	Sequence (5' to 3')
afsS pro-F	CGGAATTCACCCGGCCGTCGACC
afsS-R	CCCAAGCTTCTACTTGCCGTCGCC
afsS UTR-R	CCCAAGCTTGGACTTCGCTCCTCA
afsS pro-R	CGGGATCCGAGATGACAGTGCCA
afsS RBS-F	CGGGATCCACCCATGAGGAGCGA
afsS TSS -F	CGGAATTCGTCAGACCGTCGCA
UTR del 1-F	TTTGGATCCCATATGTAGCGTCAGACCGTCGCA
UTR del 1-R	AAAGAATTTCGGAATTCGCTCCTCA
UTR del 2-F	TTTGGATCCCATATGTAGGGGCAGACGGATGAC
UTR del 2-R	AAAGAATTCCGTGACGAGGTAGCA
UTR del 3-F	TTTGGATCCCATATGTAGAGCCCACCAGTTAGT
UTR del 3-R	AAAGAATTCCGTCCGGTAGCTCCC
UTR del 4-F	TTTGGATCCCATATGTAGGCTCCGCGCGCCCGT
UTR del 4-R	AAAGAATTTCGGCTGCCGACGGGC
UTR del 5-F	TTTGGATCCCATATGTAGAGCCTACGGGGGAGC
UTR del 5-R	AAAGAATTTCGAGCCGCACACTAAC
hrdB pro-F	TTTGAATTCCCGCCTTCCGCCGGA
hrdB pro-R	AAAGGATCCTCCCTCCGCGGCTGT
UTR short-F	TTTGGATCCAGCCCACCAGTTAGT
UTR short-R	AAAAAGCTTCGTGACGAGGTAGCA
UTR del HP1-F	GCGGACGGCCAGCCTACGGGGGAG
UTR del HP1-R	CGCGCGGAGCCGCAC
UTR del HP2-F	GCCGTCCGCCGTTGCTACCTCGTC
UTR del HP2-R	TAGTCCCCCGTAGG
UTR(ave)-F	TTTGGATCCTGTGTCGATCCGTCGCG
UTR(ave)-R	AAAAAGCTTGATGGTGCCTCCCCA
UTR(coe)-F	TTTGGATCCCGTCAGACCGTCGCA
UTR(coe)-R	AAAAAGCTTGGACTTCGCTCCTCA
UTR(gri)-F	TTTGGATCCCATCGATCCGTCGCG
UTR(gri)-R	AAAAAGCTTCTGGCTCAACTCCTG
hrdB pro(+UTR)-F	TTTAAGCTTCCGCCTTCCGCCGGA
hrdB pro(+UTR)-R	AAAGAATTCCATATGCAACCTCTCGGAACG
ORF(ave)-F	TTTAAGCTTCATATGAGCGACATCACG
ORF(ave)-R	AAAGAATTCAGGGCCTGGAGAGCG
ORF(coe)-F	TTTAAGCTTCATATGAGCGACAAGATG
ORF(coe)-R	AAAGAATTCGGGAGCCGGTCTCCT
ORF(gri)-F	TTTAAGCTTCATATGGCCGCCAACAAG
ORF(gri)-R	AAAGAATTCGGGAACGGCTGTCCG
UTR probe-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGCCCACCAGTTAGT
UTR probe-R	CGTGACGAGGTAGCA

## 第2章 リン酸化による AfsR 活性化の機能解析

### 2.1 背景・目的

先行研究において行われた AfsR のリン酸化部位の絞り込み実験について、簡潔にまとめた (図 2. 2. 1. B)。 *in vitro* において、AfsK はリン酸化部位に特異性はないが、Ser よりも Thr をリン酸化する傾向があった。そこで、AfsR ホモログ間で保存性の高い Thr 残基に着目し、各種変異型 AfsR の解析が行われた。その結果、リン酸化 Thr の電荷を模倣すると考えられる酸性アミノ酸置換型 AfsR (T297D、T297E、T536D、T536E) は WT と同等以上の Act 生産能を有していた (図 2. 2. 1. C)。この結果から、T297 と T536 がリン酸化部位として示唆されていた。しかしながら、T297 と T536 が真のリン酸化部位であることを示す検証や、T297 と T536 のリン酸化の関連性についての検証は不十分であった。また、リン酸化による AfsR 活性化の分子機構についても未解明な点が多く残されていた。

そこで、本研究では T297 および T536 がリン酸化部位であることを証明するためのさらなる検証を行うとともに、リン酸化模倣変異型 AfsR の解析により AfsR 活性化の分子機構を解明することを目指した。

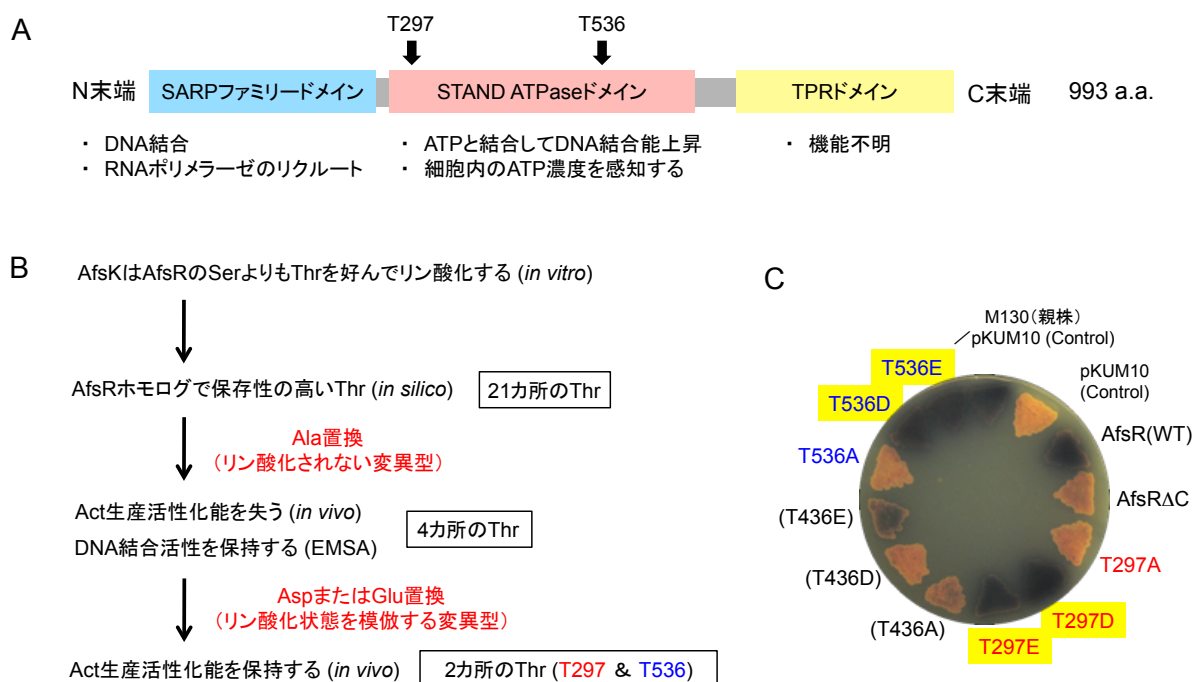


図 2. 2. 1. 先行研究のまとめ

(A) AfsR のドメイン構造と T297 および T536 の位置関係

(B) 先行研究におけるリン酸化部位の絞り込みのまとめ

(C) リン酸化模倣変異型 *afsR* の表現型  $\Delta afsR$  に変異型 *afsR* を導入し表現型を観察した。TSB 培地上で 3.5 日培養した。(田中晶子, 平成 21 年度博士論文より一部改変)

## 2. 2 結果

### 2. 2. 1. Ser/Thr キナーゼ阻害剤存在下におけるリン酸化模倣変異型 AfsR の機能

*S. griseus* において、プレート培地上で Ser/Thr キナーゼ阻害剤を与えると色素生産や形態分化に影響が生じることが示されていた (Hong *et al.*, 1993)。その報告から、Ser/Thr キナーゼ阻害剤スタウロスポリンを用いて T297 および T536 が真のリン酸化部位であるのか示す実験を行うことを考えた。スタウロスポリン存在下において、リン酸化模倣変異型 AfsR は恒常的に活性型となっているため Act 生産を行い、野生型 AfsR (WT) はリン酸化阻害のため活性型になれず Act 生産を行わないと仮説を立てた。そこで、変異型 *afsR* を  $\Delta afsR$  に導入し、スタウロスポリンを添加したプレート培地上で Act 生産を観察した。

表現型観察を行う前に、培地に添加するスタウロスポリン濃度の検討を行った。 $\Delta afsR$  に pTYM19 で野生型 *afsR* を導入し、スタウロスポリンの濃度を 0~171.2 nM の範囲でプレート培地に加え、培養を行った。その結果、21.4~42.8 nM の範囲で生育の阻害作用を示さず、Act 生産を抑制する作用が見られた (data not shown)。そこで、31.1 nM のスタウロスポリンを培地に添加し、変異型 *afsR* の機能解析を行うことにした。また、この際にスタウロスポリンを溶解させるために使用した 0.6% DMSO が Act 生産に影響を与えないことを確認した (data not shown)。

先行研究では、低コピーベクター pKUM10 により変異型 *afsR* を  $\Delta afsR$  に導入し、表現型観察を行っていた (田中晶子, 平成 21 年度博士論文)。pKUM10 は pKU209 の派生ベクターであり、細胞中に 1~4 コピー存在していると考えられる (Bibb *et al.*, 1977; Kakinuma *et al.*, 1991; Yamazaki *et al.*, 2003)。多コピー条件下での導入実験は本来の遺伝子機能を必ずしも反映しているわけではないため、本研究では厳密に 1 コピーで維持されるゲノム融合型ベクター pTYM19 (Onaka *et al.*, 2003) により変異型 *afsR* を  $\Delta afsR$  に導入した。

コントロール培地上では T297D、T536D、T536E を導入した株では培養 2 日目から Act 生産が見られたが、WT または T297E を導入した株で培養 3 日目から Act 生産が見られた (図 2. 2. 2.)。T297D、T536D、T536E を導入した株が WT よりも Act 生産の時期が早くなること、T297E が他の 3 種のリン酸化模倣変異型 *afsR* よりも Act 生産の時期が遅いことは以前にも報告されている (田中晶子, 平成 21 年度博士論文)。また、T297A または T536A を導入した株では培養 5 日目でわずかな Act 生産が見られた。T297A や T536A は培養期間を延長すると弱い Act 生産活性化能を有していることも報告されている (田中晶子, 平成 21 年度博士論文)。*afsR* を pTYM19 により 1 コピーで  $\Delta afsR$  に導入しても、pKUM10 で導入した際の表現型と差は見られなかった。

スタウロスポリン添加培地上では、WT、T297A、T297E、T536A を導入した株は 5 日目まで培養しても Act 生産は見られなかった (図 2. 2. 2.)。一方、T536D または T536E を導

入した株では培養 2 日目で Act 生産が見られた。T297D を導入した株は培養 3 日目から Act 生産量がみられたが、その生産量は T536D または T536E を導入した株よりも少なかった。さらに培養期間を 4~5 日に延長すると、T297D、T536D、T536E の間に Act 生産の違いは見られなくなった。T297E はコントロール培地上で Act 生産する時期が T297D、T536D、T536E よりも遅く、スタウロスポリン存在下で Act 生産能を示さないことから、完全にはリン酸化状態を模倣できていないのかもしれない。リン酸化スレオニンと酸性アミノ性は、マイナス電荷の強さや密度が異なるため、全く同じ性質を有するわけではないと考えられる。

以上の結果より、T297D、T536D、T536E がスタウロスポリンの活性を回避することが示され、T297 および T536 がリン酸化部位として強く示唆された。また、高い Act 生産活性化能を有していることから、T536D および T536E は T297D よりも活性型 AfsR の性質をより強く示していると考えられる。

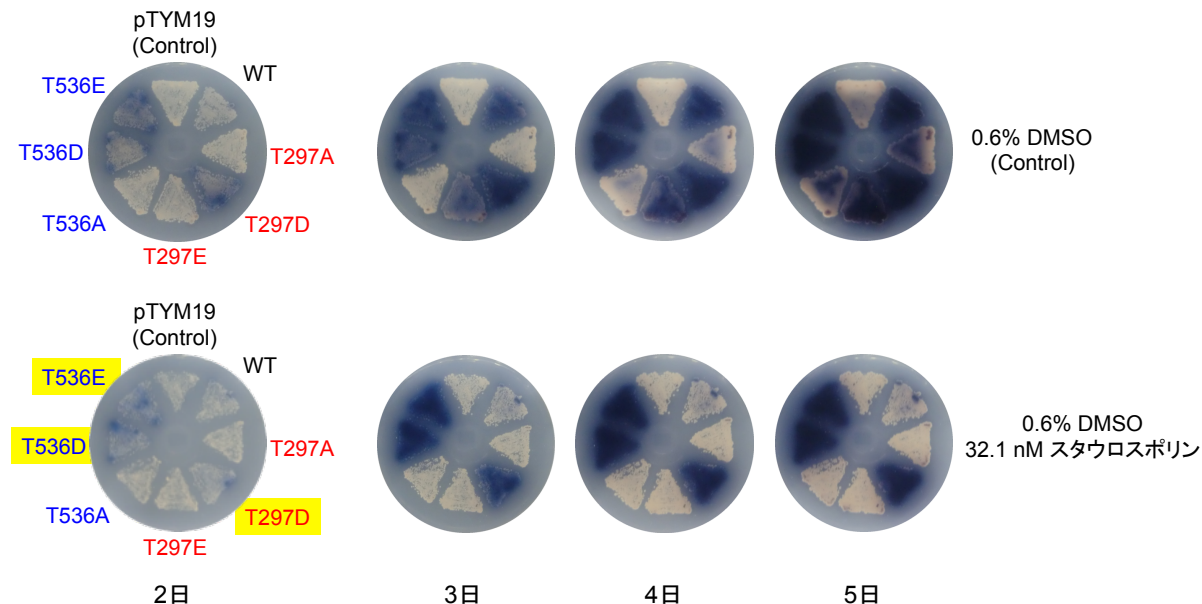


図 2. 2. 2. スタウロスポリン存在下における変異型 *afsR* の機能

$\Delta afsR$  を pTYM19、pTYM19-*afsR*、pTYM19-T297A、pTYM19-T297D、pTYM19-T297E、pTYM19-T536A、pTYM19-T536D、pTYM19-T536E で形質転換し、SMMS 培地上で培養した。SMMS には終濃度 0.6% DMSO および 32.1 nM スタウロスポリンを添加した。 $\Delta afsR$  に導入した際に、スタウロスポリン存在下でも Act 生産能を有していた変異型 AfsR を黄色のパネルで示した。

### 2. 2. 2. 二重変異型 AfsR の表現型

T297 または T536 のどちらから一方がリン酸化状態を模倣していれば AfsR は活性型になることが明らかになった。しかし、スタウロスポリンの存在しない通常の培養条件下では、T297 と T536 の両方がリン酸化されている可能性があり、両残基がリン酸化された際の活性変化に興味を持たれた。そこで、T297 と T536 の二重酸性アミノ酸置換変異型 AfsR を作製し、 $\Delta$ afsR 株に導入してその機能を解析した (図 2. 2. 3.)。

その結果、WT、T297D、T536D、T297D/T536D を導入した株では、いずれも培養 2 日目で Act 生産が見られた。WT、T297D、T536D と T297D/T536D の間で Act の生産時期に違いが見られず、T297 と T536 を同時にリン酸化模倣状態にしても、明らかな活性上昇は見られなかった。ただし、この結果では T297D や T536D のリン酸化を模倣していないもう一方の Thr 残基がリン酸化されることで活性型となり、T297D/T536D との差が見られない可能性もある。また、スタウロスポリン存在下で T297 または T536 のどちらから一方がリン酸化状態を模倣していれば AfsR は活性型になることを 2. 2. 1. で示したが、阻害剤存在下であっても、リン酸化状態を模倣していないもう一方の Thr がわずかにリン酸化され、T297 と T536 の両残基がリン酸化状態になることで初めて活性型になる可能性もあった。

そこで、片方の Thr を Ala 置換によりリン酸化されないようにしたリン酸化模倣変異型 T297D/T536A と T297A/T536D を導入した際の表現型を観察した。その結果、T297D/T536A と T297A/T536D を導入した株では培養 2 日目で Act 生産が見られ、T297D および T536D を導入した株と Act 生産能に差は見られなかった (図 2. 2. 3.)。この結果は、片方の Thr がリン酸化されるだけで AfsR は活性型となる可能性を示している。

一方、T297D/T536A と T297A/T536D を導入した株では Act 生産が見られたが、T297A や T536A を導入した株では培養 4 日目でも Act 生産は見られなかった。この結果は、片方の Thr のリン酸化のみでも AfsR は活性型になるという仮説に反する。考えられる可能性については考察で述べる。



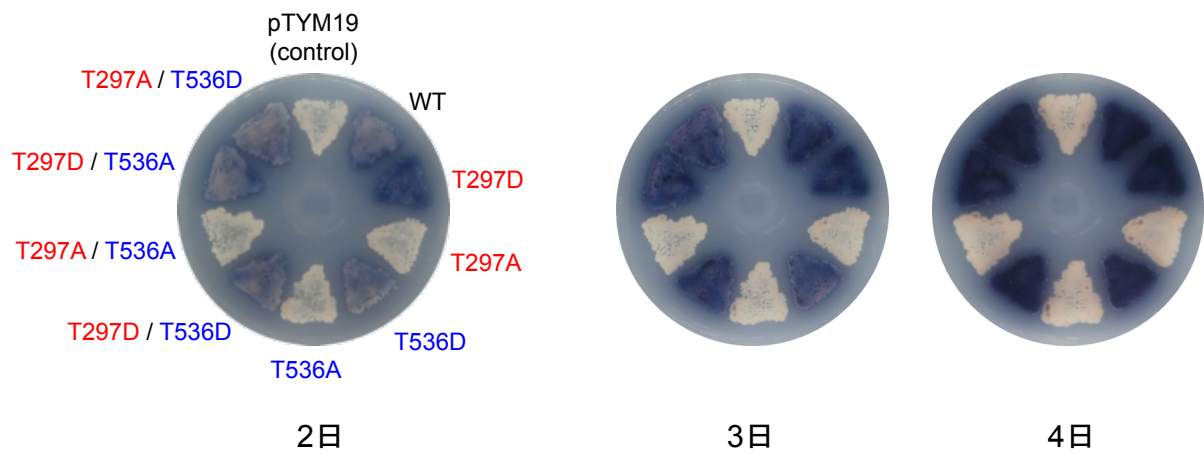


図 2. 2. 3. 二重変異型 *afsR* の機能

$\Delta afsR$  を pTYM19、pTYM19-*afsR*、pTYM19-T297D、pTYM19-T297A、pTYM19-T536D、pTYM19-T536A、pTYM19-T297D/T536D、pTYM19-T297A/T536A、pTYM19-T297D/T536A、pTYM19-T297A/T536D で形質転換し、SMMS 培地上で培養した。

### 2. 2. 3. 変異型 *afsR* の発現をタンパク質レベルで確認した

2. 2. 1.において、T297A および T536A の Act 生産活性化能が減少していたが、変異導入によりタンパク質の安定性が低下したために機能低下を引き起こしている可能性が考えられた。そこで、変異型 *afsR* の発現をタンパク質レベルで確認した。

野生型および変異型 *afsR* を  $\Delta afsR$  に導入し、プレート培地上で培養した。回収した菌体から粗抽出タンパク質を調製し、抗 AfsR ポリクローナル抗体によるウェスタンブロット解析を行った (図 2. 2. 4.)。その結果、WT は培養 12~24 時間で検出され、培養 48 時間では検出されるバンドの強度が低下した。T297A は培養 24 時間で WT よりも存在量が減少していた。さらに、T297A と T536A は培養 48 時間でバンドが完全に消失した。これらの結果から、T297A と T536A は菌体内での安定性が WT よりもわずかに低いことが明らかになった。

予想外なことに、スタウロスポリン存在下でも Act 生産能を有していた T297D、T536D、T536E は WT が検出された培養 12~24 時間で検出されなかった。また、スタウロスポリン存在下では機能を失ったがコントロール培地上では Act 生産能を有していた T297E は、培養 24 時間で存在量が減少しており、WT よりもバンドが消失する培養時期が早くなった。

以上の結果から、Act 生産能の高い変異型 AfsR は早い生育段階で分解が生じていることが明らかになった。菌体を回収した培養条件において、リン酸化模倣変異型 AfsR を導入した株は Act 生産を行っているため、リン酸化模倣変異型 AfsR は確かに Act 生産に関与していると考えられる。以上の結果は、活性型 AfsR は役割を終えると速やかに分解される可能性を示唆している。

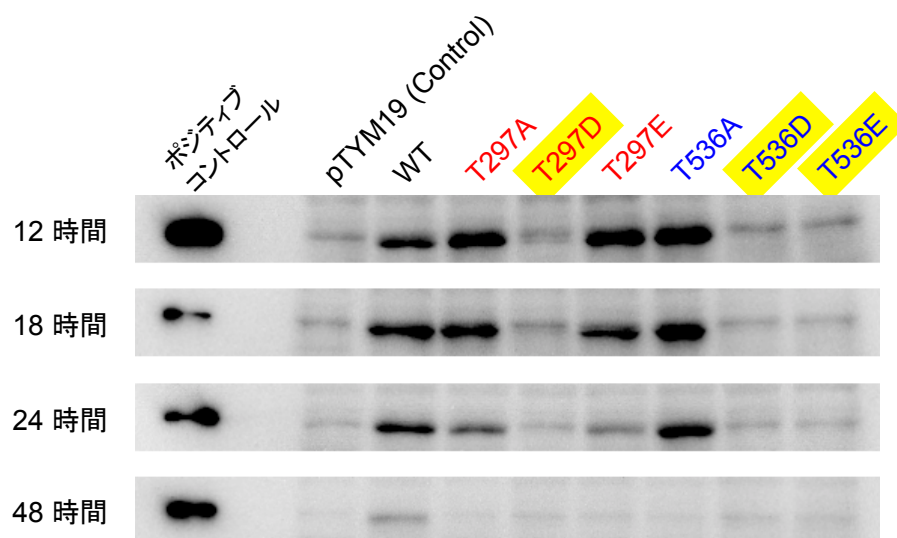


図 2. 2. 4. 変異型 *afsR* の発現をウェスタンブロット解析で確認した  $\Delta afsR$  を pTYM19、pTYM19-*afsR*、pTYM19-T297A、pTYM19-T297D、pTYM19-T297E、pTYM19-T536A、pTYM19-T536D、pTYM19-T536E で形質転換し、SMMS プレート培地上で培養した。プレート培地上から回収した菌体に PBS (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 0.2% PMSF, pH 7.2)を加えて超音波破碎し、得られた可溶性画分を粗抽出タンパク質とした。1 レーンあたり粗抽出タンパク質 20  $\mu\text{g}$  を泳動した。ポジティブコントロールとして、ポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行った His-AfsR 10 ng を泳動した。検出は抗 AfsR ポリクローナル抗体を用いて行った。 $\Delta afsR$  に導入した際に、スタウロスポリン存在下でも Act 生産能を有していた変異型 AfsR を黄色のパネルで示した。

#### 2. 2. 4. リン酸化 AfsR 検出の試み

以前に、AfsK の N 末端のキナーゼドメイン (AfsKN) で AfsR を *in vitro* リン酸化し、リン酸化部位の決定が試みられたが、その決定には至っていない (益子まり, 平成 15 年度修士論文)。その後、AfsKN は *in vitro* において、非特異的にタンパク質をリン酸化する性質があることが明らかにされた (田中晶子, 平成 21 年度博士論文)。そこで本研究では、*in vivo* においてリン酸化された AfsR を取得し、リン酸化部位の決定を直接行うことを検討した。

WT 株は SMMS 液体培地において、培養 2～3 日目で Act 生産を行う (data not shown)。そのため、リン酸化による AfsR 活性化は、Act 生産よりも早い時期で生じていると考えられた。そこで、培養 1 日目および 2 日目の菌体を回収し、調製した粗抽出タンパク質から免疫沈降により AfsR を回収した。回収した AfsR に対し、Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化 AfsR の検出を試みた。Phos-tag はリン酸基特異的に結合する分子である。Phos-tag をアクリルアミドに架橋させたゲルで SDS-PAGE を行うと、リン酸化されたタンパク質は泳動度の低下したシフトバンドとして検出される。

その結果、培養 1 日目および培養 2 日目で WT 株から回収した AfsR を検出することはできたが、リン酸化 AfsR に相当するシフトバンドは検出できなかった (図 2. 2. 5. A)。

Phos-tag SDS-PAGE はタンパク質の性質によってリン酸化されていてもシフトバンドが明瞭に検出されないこともある。そこで、T297 および T536 の抗リン酸化ペプチド抗体を作製し、免疫沈降で回収した AfsR を検出することを考えた。作製した抗体はリン酸化ペプチドに高い特異性を有しており、抗 T297p ペプチド抗体は 0.13 pmol、抗 T536p ペプチド抗体は 0.37 pmol の検出限界を示した (図 2. 2. 5. C)。免疫沈降で回収した 1 pmol の AfsR をウェスタンブロット解析に供したが、抗リン酸化ペプチド抗体に特異的なバンドは検出されなかった (data not shown)。抗リン酸化ペプチド抗体の検出限界より、リン酸化されている AfsR は AfsR 全量の 1/3～1/10 以下であると見積もられた。

2. 2. 3.において、リン酸化模倣変異型 AfsR は速やかに分解されることが明らかになっている。リン酸化 AfsR は速やかに分解されるために存在量が極めて少なく、検出することができないのかもしれない。

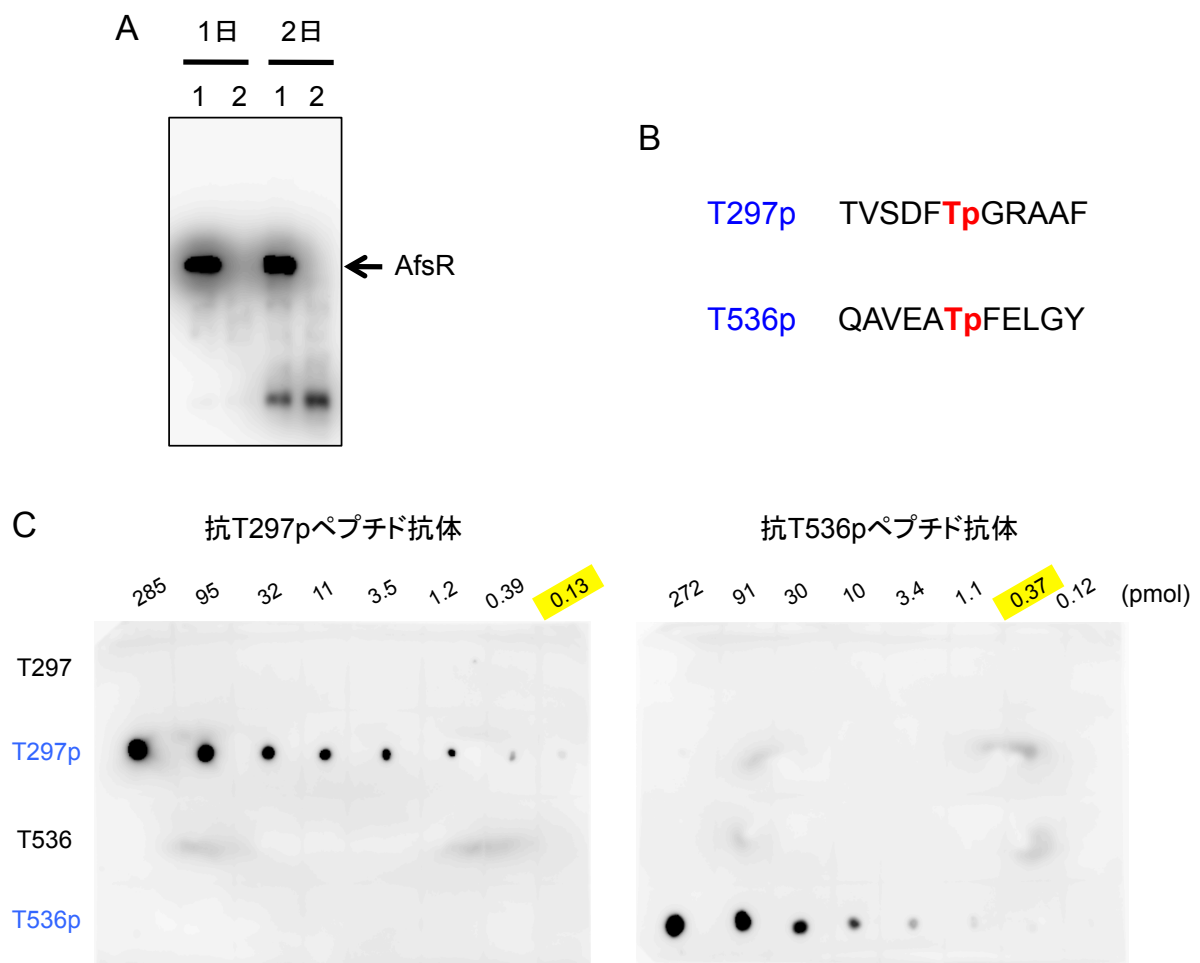


図 2. 2. 5. 免疫沈降で回収した AfsR を Phos-tag SDS-PAGE に供した

(A) Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化 AfsR の検出 WT および  $\Delta afsR$  を SMMS 液体培地で 1~2 日培養した。回収した菌体に PBST (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Tween20, Protease Inhibitor Mix [GE ヘルスケア社], ホスファターゼ阻害剤カクテル溶液 I [和光純薬社], pH 7.5) を加え、超音波破碎して粗抽出タンパク質を調製した。粗抽出タンパク質から抗 AfsR ポリクローナル抗体を用いて AfsR を回収した。回収したタンパク質を 5% Phos-tag SDS-PAGE により分離し、ウェスタンブロット解析に供した。

検出は抗 AfsR ポリクローナル抗体を用いて行った。レーン 1 : WT 株 レーン 2 :  $\Delta afsR$  株

(B) 抗体の作製に用いた抗原ペプチドのアミノ酸配列

(C) 抗リン酸化ペプチド抗体の検出感度の検定 合成ペプチドをメンブレンにスポットし、抗リン酸化ペプチド抗体で検出した。検出限界のペプチド量を黄色のパネルで示した。

## 2. 2. 5. リン酸化模倣変異型 AfsR の EMSA

2. 2. 1. において、リン酸化模倣変異型 *afsR* は恒常的に活性化されていることが示されたが、その分子機構について興味を持たれた。その機構として、活性型 AfsR の DNA 結合力が上昇する可能性を考えた。そこで、リン酸化模倣変異型 AfsR と WT の DNA 結合力に差が見られるのか検証するため、EMSA を行うことを考えた。そのために、N 末端側にポリヒスチジンタグを付加した AfsR および変異型 AfsR を大腸菌で過剰生産させた (図 2. 2. 6. A)。その結果、WT、T297A、T297D、T297E、T536A は過剰生産させたタンパク質の一部が不溶性画分に見られたが、大部分は可溶性画分に生産させることができた。一方、T536D と T536E は大部分が不溶性画分に見られた。一部が可溶性画分に生産されている可能性を考え、ポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行ったが、T536D と T536E は得られなかった (data not shown)。また、Chaperone Plasmid Set (タカラバイオ社) を用いて分子シャペロンとの共発現も試みたが、T536D と T536E を可溶性画分に生産させることはできなかった (data not shown)。

可溶性画分に過剰生産させることのできた WT、T297D、T297E について、ポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行い、高い精製度でタンパク質を得ることができた (図 2. 2. 6. B)。これらのタンパク質と *afsS* のプロモーター領域を含む DNA プローブを用いて EMSA を行った。

AfsR の EMSA において、室温で電気泳動を行ったところ、ウェルに詰まった様なスメア状のバンドが生じた (図 2. 2. 6. C)。この現象は、以前にも報告されていた (田中晶子, 平成 21 年度博士論文)。そこで、4°C で電気泳動を行ったところ、室温で電気泳動を行った時よりも泳動度が大きく、シャープなシフトバンドを検出できた。そのため、以後の EMSA を 4°C で行った。

WT、T297D、T297E を EMSA に供したところ、タンパク質量を増加させるとフリープローブの減少とシフトバンドの上昇が見られた (図 2. 2. 6. C)。しかし、WT と T297D および T297E において、シフトバンドの上昇の程度に差は見られなかった。

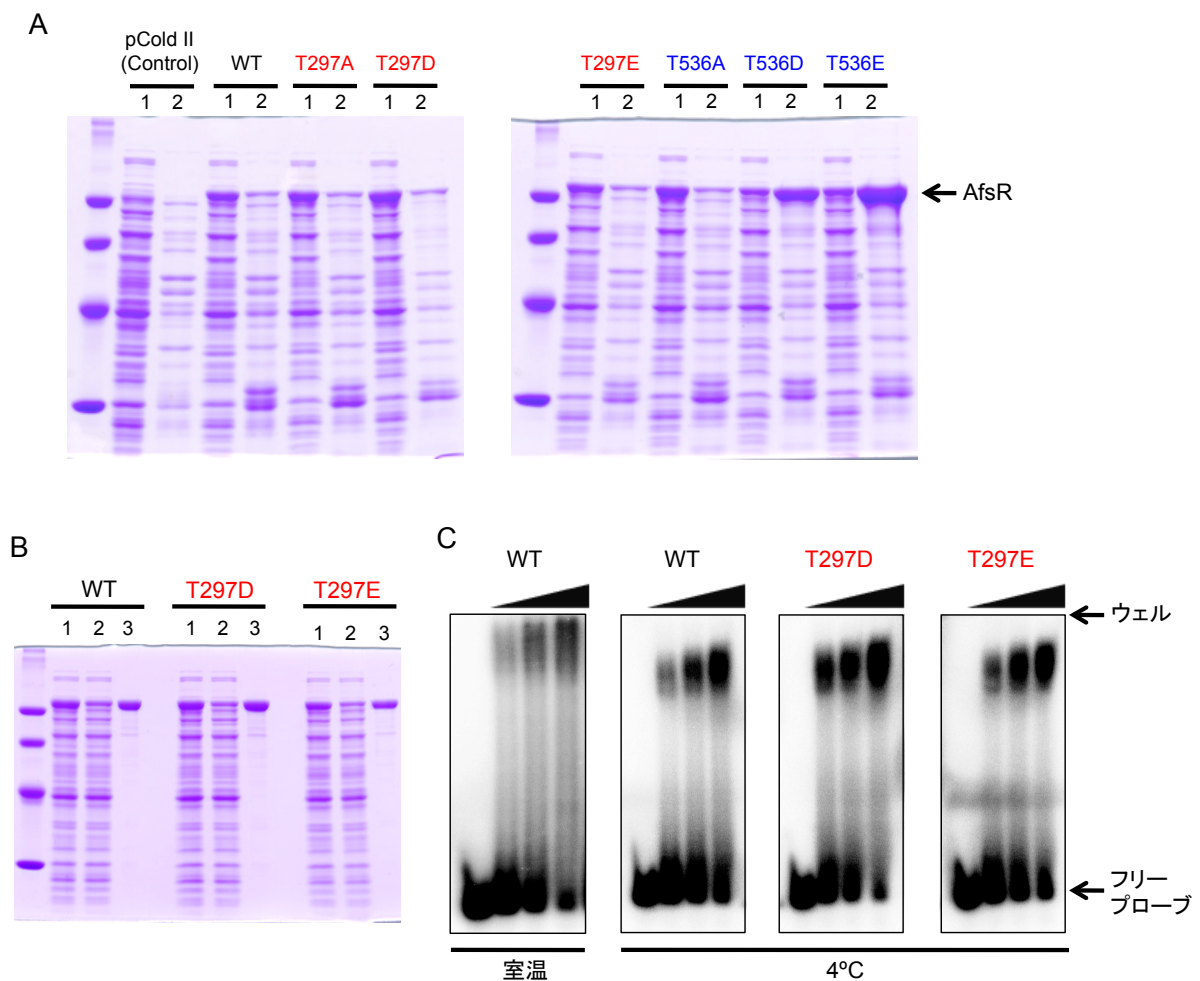


図 2. 2. 6. 変異型 AfsR の *in vitro* における機能解析

(A) 大腸菌で変異型 AfsR を過剰生産させた BL21(DE3)を pCold II、pCold II-*afsR*、pCold II-T297A、pCold II-T297E、pCold II-T297D、pCold II-T536A、pCold II-T536D、pCold II-T536E で形質転換し、過剰発現を行った。その後、菌体の粗抽出タンパク質を SDS-PAGE に供した。レーン 1：可溶性画分、レーン 2：不溶性画分。

(B) 野生型 AfsR および変異型 AfsR を精製した 過剰発現を行った大腸菌の粗抽出タンパク質に対してポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行った。その後、各画分を SDS-PAGE に供した。レーン 1：可溶性画分、レーン 2：フロースルー画分、レーン 3：溶出画分。

(C) 野生型 AfsR および変異型 AfsR の EMSA アフィニティー精製を行った各種 AfsR を EMSA に供した。電気泳動は室温または 4°C で行った。左側のレーンより 0 pmol、1 pmol、2 pmol、4 pmol の各種 AfsR を加えたサンプルを泳動した。

## 2. 2. 6 変異型 *afsR*ΔTPR の表現型

Ser/Thr キナーゼ阻害剤存在下でも Asp 置換型と Glu 置換型がともに高い Act 生産活性化能を保持していたことから、T536 は T297 よりも重要なリン酸化部位である可能性が考えられた。しかし、T536D と T536E は可溶性画分に過剰生産できなかつたため、*in vitro* における解析を行うことができなかった。そこで、変異型 AfsR の切り縮めにより、大腸菌の可溶性画分に過剰生産を行うことを検討した。

C 末端側 (R619 から K993) に存在する TPR ドメインを欠失させた野生型 *afsR* (WTΔTPR) を pKUM10 で Δ*afsR* に導入すると、全長の *afsR* を導入した株と同等の Act 生産が見られることが報告されていた (Tanaka *et al.*, 2007)。そこで、大腸菌での過剰発現を検討する前段階として、*afsR*ΔTPR を 1 コピーで導入しても *afsR* と同様の機能を示すのか検証を行った。野生型および変異型 *afsR*ΔTPR を pTYM19 により Δ*afsR* に導入し、野生型および変異型 *afsR* を導入した株と表現型を比較した (図 2. 2. 7.)。

WT を導入した株では培養 2 日目から Act 生産が見られたが、WTΔTPR を導入した株では培養 4 日目で Act 生産が見られた。この結果より、TPR ドメインの欠失により Act 生産能が低下することが明らかになった。先行研究で WTΔTPR が WT と同等の Act 生産能を示したのは、低コピーベクターの影響で本来よりも発現量が上昇したためであると考えられる。T297D を導入した株では培養 2 日目、T297E を導入した株では培養 3 日目で Act 生産が見られたが、T297DΔTPR および T297EΔTPR を導入した株では培養 4 日目で Act 生産が見られた。TPR ドメインの欠失により Act 生産能が低下する傾向は WT と同様であった。

T536D および T536E を導入した株は培養 2 日目に Act 生産が見られた。注目すべきことに、T536DΔTPR および T536EΔTPR を導入した株は培養 2 日目で非常に強い Act 生産が見られ、さらには培養 1 日目で著しい生育阻害が見られた。本来は二次代謝が生じない培養初期に強い二次代謝の活性化が生じたため、生育阻害作用が見られたと考えられる。TPR ドメインの欠失により Act 生産能が上昇するのは WT、T297D、T297E と全く逆の結果である。この結果は、T536 のリン酸化が非常に重要であることを示唆しているのかもしれない。

さらに、*afsR*ΔTPR および変異型 *afsR*ΔTPR の発現をタンパク質レベルで確認した。*afsR*ΔTPR および変異型 *afsR*ΔTPR を Δ*afsR* に導入し、プレート培地上で培養した。回収した菌体のタンパク質に対し、抗 AfsR ポリクローナル抗体によるウェスタンブロット解析を行った (図 2. 2. 8. A)。その結果、WTΔTPR、T297AΔTPR、T297DΔTPR、T297EΔTPR、T536AΔTPR では培養 2 日目および 4 日目でバンドが検出された。一方、T536DΔTPR および T536EΔTPR では、いずれの培養日数においてもバンドが検出されなかった。2. 2. 3. において、リン酸化模倣変異型 AfsR はウェスタンブロットでバンドが検出されなかったが、その結果と同様の傾向が見られた。

TPR を欠失した変異型 AfsR が分解されることで、*afsS* の転写とは異なる機構により間接



的に Act 生産の活性化が行われている可能性が考えられた。そこで、ウェスタンブロット解析を行った際の菌体サンプルから RNA を回収し、RT-PCR 解析により *afsS* の転写を確認した (図 2. 2. 8. B)。その際に、恒常的に転写を生じていることが知られている *hrdB* を内在性コントロールとして利用した。

その結果、表現型観察の際に強い Act 生産能を示した T536DΔTPR および T536EΔTPR を導入した株では、いずれの培養日数においても、WTΔTPR や他の変異型 AfsRΔTPR よりも強い *afsS* の転写が検出された。このことから、T536DΔTPR および T536EΔTPR は *afsS* の転写を強く活性化することで著しい Act 生産の活性化を生じていることが確認された。

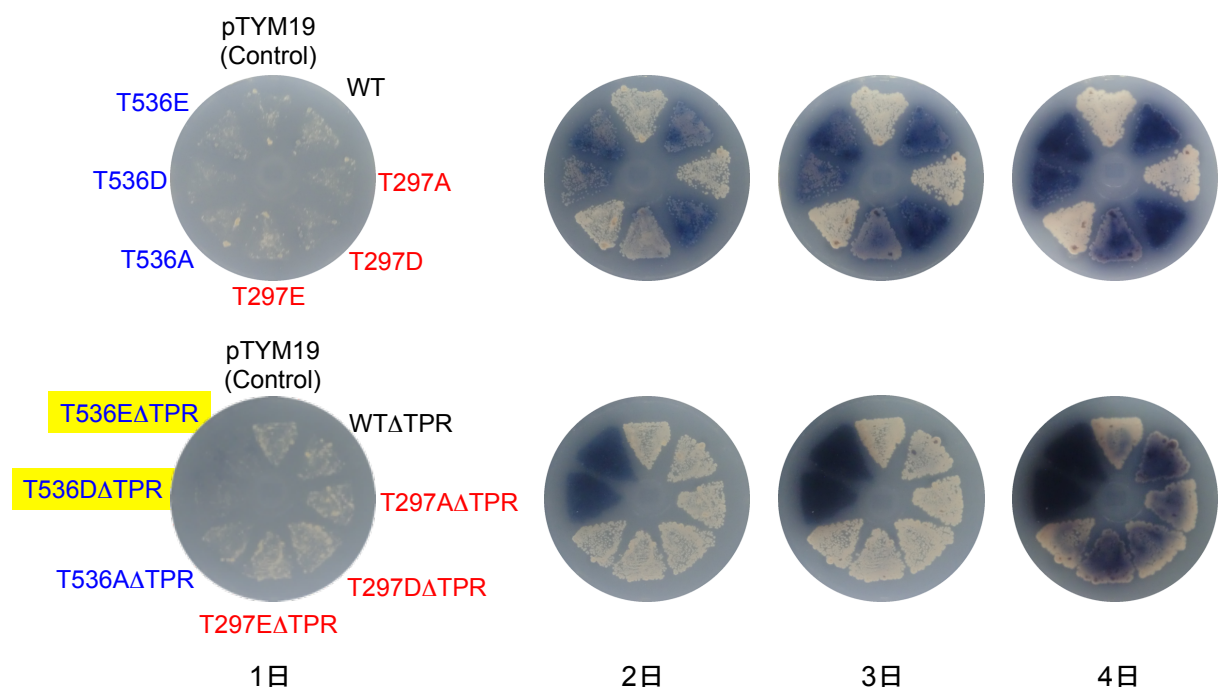


図 2. 2. 7. 変異型 *afsR*ΔTPR の表現型

Δ*afsR* を pTYM19、pTYM19-*afsR*、pTYM19-T297A、pTYM19-T297D、pTYM19-T297E、pTYM19-T536A、pTYM19-T536D、pTYM19-T536E、pTYM19-*afsR*ΔTPR、pTYM19-T297AΔTPR、pTYM19-T297DΔTPR、pTYM19-T297EΔTPR、pTYM19-T536AΔTPR、pTYM19-T536DΔTPR、pTYM19-T536EΔTPR で形質転換し、SMMS 培地上で培養した。Δ*afsR* に導入した際に、高い Act 生産能を有していた変異型 AfsRΔTPR を黄色のパネルで示した。

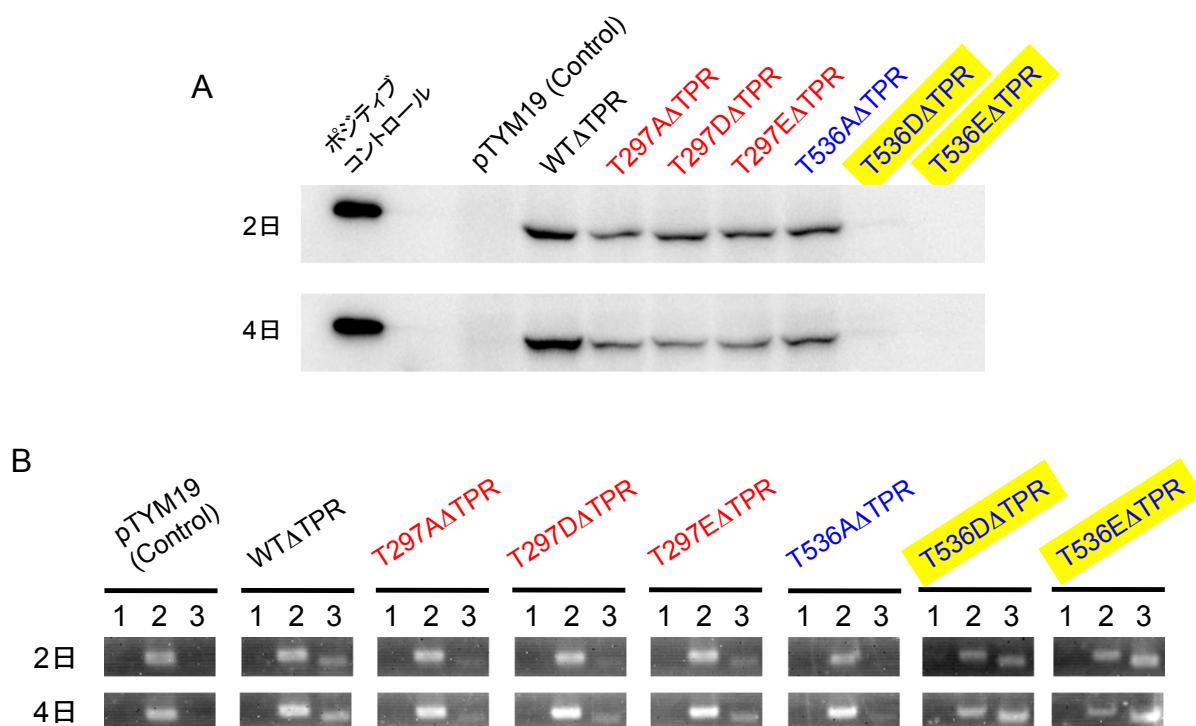


図 2. 2. 8. 変異型 *afsR*ΔTPR の発現と *afsS* 転写活性の確認

Δ*afsR* を pTYM19-*afsR*ΔTPR 、 pTYM19-T297AΔTPR 、 pTYM19-T297DΔTPR 、 pTYM19-T297EΔTPR 、 pTYM19-T536AΔTPR 、 pTYM19-T536DΔTPR 、 pTYM19-T536EΔTPR で形質転換し、SMMS プレート培地上で培養した。プレート培地上から回収した菌体を超音波破碎し、得られた菌体抽出液を RNAqueous Kit (Applied Biosystem 社) のスピнкаラムに供した。スピнкаラムに結合した RNA を回収し、cDNA を作製した。また、スピнкаラムのフロースルー画分を TCA 沈殿し、ウェスタンブロット解析に供した。Δ*afsR* に導入した際に、高い Act 生産能を有していた変異型 AfsRΔTPR を黄色のパネルで示した。

(A) 変異型 *afsR*ΔTPR の発現をウェスタンブロット解析で確認した 1 レーンあたりフロースルー画分 20 μg を泳動した。ポジティブコントロールとして、ポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行った His-AfsRΔTPR 10 ng を泳動した。検出は抗 AfsR ポリクローナル抗体を用いて行った。

(B) *afsS* 転写活性を RT-PCR で確認した cDNA をテンプレートとし、PCR を行った。内在性コントロールとして *hrdB* の転写を確認した。

レーン 1 : RT なし, *hrdB* を増幅

レーン 2 : RT あり, *hrdB* を増幅

レーン 3 : RT あり, *afsS* を増幅

### 2. 2. 7. 変異型 AfsRΔTPR の EMSA

2. 2. 6.において、T536DΔTPR および T536EΔTPR が強い Act 生産能を有していることが明らかになった。*in vitro*における解析を行うために、変異型 AfsRΔTPR を大腸菌の可溶性画分に過剰生産させることができるか検証を行った。

野生型および変異型 AfsR の TPR ドメインを含まない N 末端領域 (M1 から E618) をコードする領域を pCold II にサブクローニングし、大腸菌による過剰発現を行った (図 2. 2. 9. A)。その結果、WTΔTPR および全ての変異型 AfsRΔTPR において、大部分を可溶性画分に生産させることができた。T536DΔTPR と T536EΔTPR は他の変異型 AfsRΔTPR よりも不溶性画分に生産されやすい傾向が見られたが、ポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行うと高い精製度でタンパク質を得ることができた (図 2. 2. 9. B)。これらのタンパク質と *afsS* のプロモーター領域を含む DNA プローブを用いて EMSA を行った (図 2. 2. 9. C)。

その結果、T536DΔTPR および T536EΔTPR は WTΔTPR よりも強いシフトバンドを生じた (図 2. 2. 9. C)。このことから、T536DΔTPR および T536EΔTPR は WTΔTPR よりも強い DNA 結合能を有しているため、 $\Delta afsR$  に導入した際にも WTΔTPR よりも強い Act 生産能を示したと考えられる。しかしながら、 $\Delta afsR$  に導入した際に T536DΔTPR および T536EΔTPR の Act 生産能が T536D および T536E よりも著しく高い理由については不明である。詳細については、考察で述べる。

以上の結果から、TPR ドメインの欠失という人為的な条件下ではあるが、T536 のリン酸化により DNA 結合能が上昇することで AfsR が活性化される可能性が示唆された。

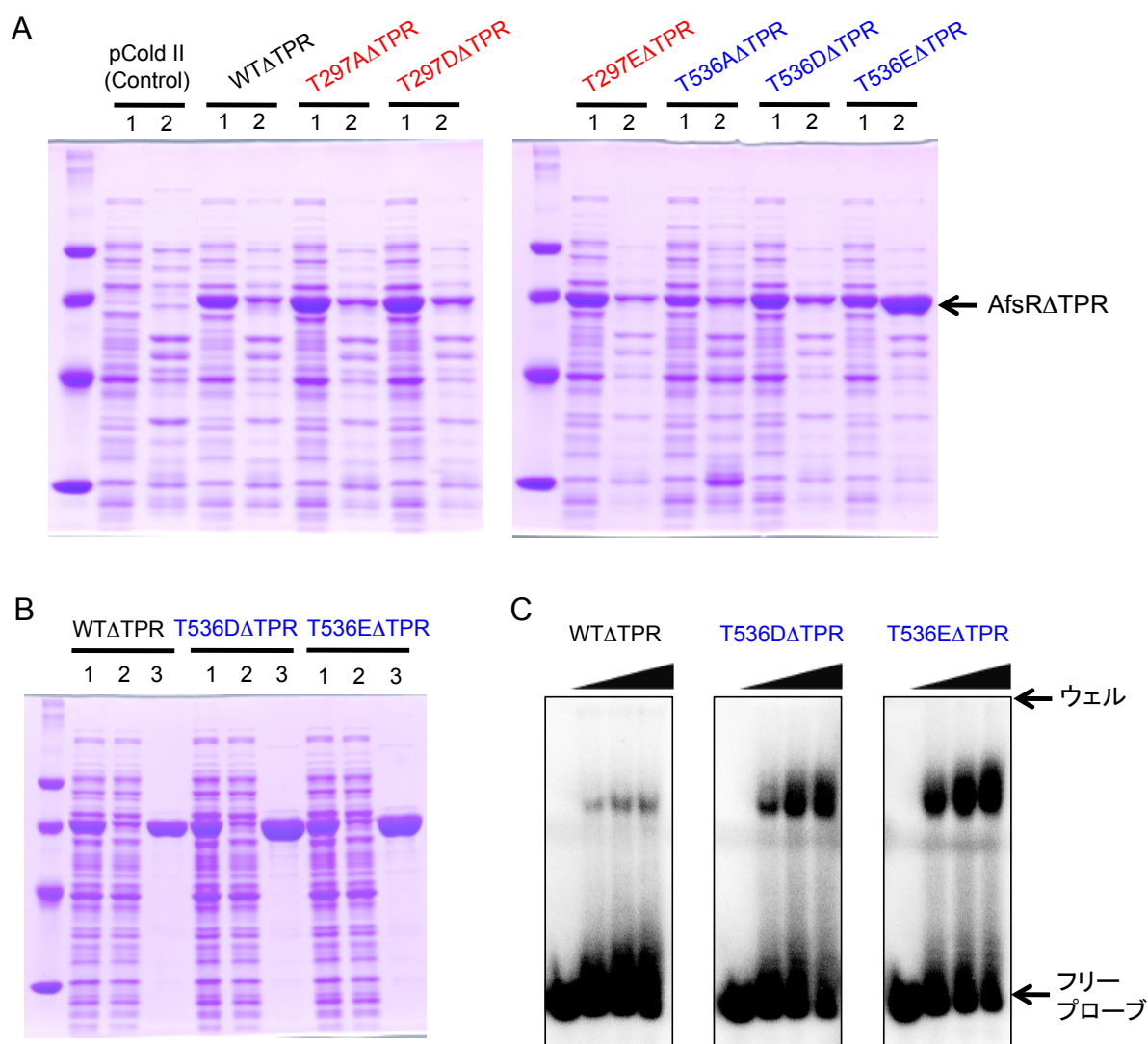


図 2. 2. 9. 変異型 AfsRΔTPR の *in vitro* における機能解析

(A) 大腸菌で変異型 AfsRΔTPR を過剰生産させた BL21(DE3)を pCold II、pCold II-*afsR*ΔTPR、pCold II-T297AΔTPR、pCold II-T297EΔTPR、pCold II-T297DΔTPR、pCold II-T536AΔTPR、pCold II-T536DΔTPR、pCold II-T536EΔTPR で形質転換し、過剰発現を行った。その後、菌体の粗抽出タンパク質を SDS-PAGE に供した。レーン 1：可溶性画分、レーン 2：不溶性画分。

(B) 野生型 AfsRΔTPR および変異型 AfsRΔTPR を精製した 過剰発現を行った大腸菌の粗抽出タンパク質に対してポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行った。その後、各画分を SDS-PAGE に供した。レーン 1：可溶性画分、レーン 2：フロースルー画分、レーン 3：溶出画分。

(C) 野生型 AfsRΔTPR および変異型 AfsRΔTPR の EMSA アフィニティー精製を行った各種 AfsRΔTPR を EMSA に供した。電気泳動は 4°C で行った。左側のレーンより 0 pmol、1 pmol、2 pmol、4 pmol の各種 AfsR を加えたサンプルを泳動した。

## 2. 2. 8. T536DΔTPR と T536EΔTPR の *in vitro* における機能解析

T536DΔTPR および T536EΔTPR は WTΔTPR よりも強い DNA 結合能を有していたが、その機構について興味を持たれた。リン酸化模倣変異型 AfsR は多量体化しやすい傾向があることがゲル濾過クロマトグラフィーの結果から示唆されていたが（田中晶子，平成 21 年度博士論文）、タンパク質の精製度や多量体の検出方法に検討の余地があった。そこで、先行研究と異なる条件でタンパク質精製と多量体検出を試みた。

N 末端にポリヒスチジンタグを付加した WTΔTPR、T536DΔTPR、T536EΔTPR を大腸菌の可溶性画分に過剰生産させ、ポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行った。本研究では  $\text{Co}^{2+}$  をチャージした TALON レジン（Clontech 社）を用いることで、精製度の高いタンパク質を得ることができた（図 2. 2. 10. A）。

精製タンパク質を Blue-Native PAGE に供したところ、大部分はウェルに詰まった様なバンドとして検出されたが、複数のバンドを分離できた（図 2. 2. 10. B）。複数のバンドが検出されたのは、分子半径の異なる AfsRΔTPR、おそらくは多量体になった状態の AfsRΔTPR が検出されたためであると考えられる。

精製タンパク質に *in vitro* クロスリンカー BS<sup>3</sup> を加えて架橋形成をおこない、WTΔTPR、T536DΔTPR、T536EΔTPR の多量体形成の度合いを比較した（図 2. 2. 10. C）。AfsRΔTPR の分解産物と思われるバンドも一部生じているが、BS<sup>3</sup> 処理を行った際に複数のバンドが検出された。これらの BS<sup>3</sup> 処理特異的に出現するバンドは、Blue-Native PAGE の結果と合わせて考えると、多量体を形成した AfsRΔTPR であると考えられる。しかし、WTΔTPR、T536DΔTPR、T536EΔTPR において、検出される多量体のバンドに明らかな差異は見られなかった。

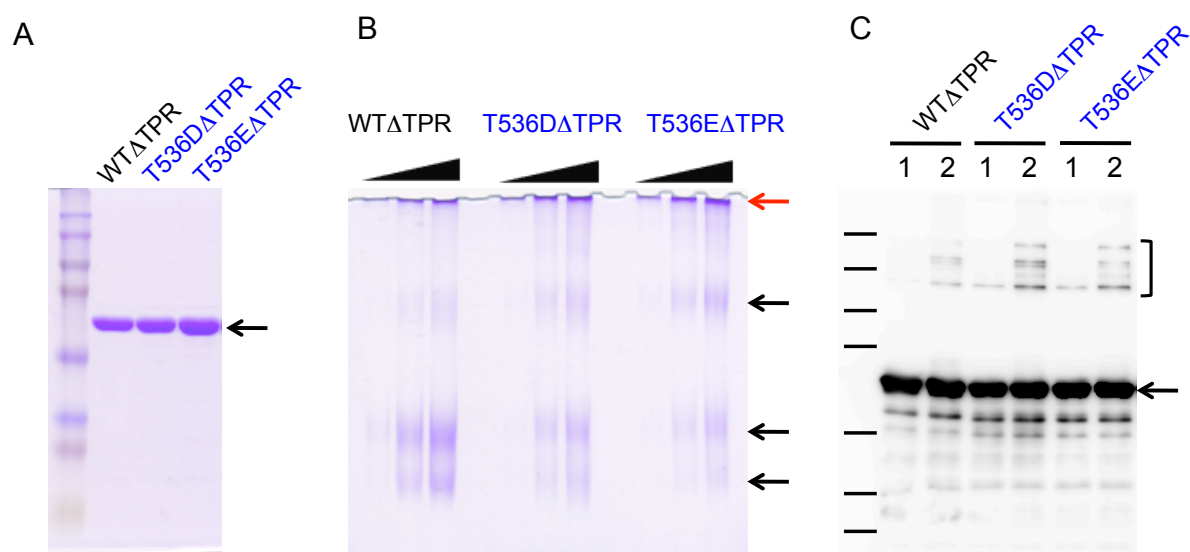


図 2. 2. 10. T536DΔTPR と T536EΔTPR の多量体化の確認

(A) WTΔTPR および変異型 AfsRΔTPR を精製した 過剰発現を行った大腸菌の粗抽出タンパク質に対してポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製を行った。AfsRΔTPR の位置を矢印で示した。

(B) Blue-Native PAGE による解析 精製を行った WTΔTPR および変異型 AfsRΔTPR を 6% Blue-Native PAGE に供した。左側のレーンから 1 μg、3 μg、5 μg の精製タンパク質を電気泳動した。AfsRΔTPR の位置を黒矢印、ウェルの位置を赤矢印で示した。

(C) *in vitro* クロスリンクによる解析 精製を行った WTΔTPR および変異型 AfsRΔTPR に BS<sup>3</sup> を混ぜ、架橋形成を行った。その後、ウェスタンブロット解析に供した。検出は抗 AfsR ポリクローナル抗体を用いて行った。AfsRΔTPR の位置を矢印で示した。

レーン 1 : 精製タンパク質

レーン 2 : 精製タンパク質 + BS<sup>3</sup>

## 2. 3. 考察

### AfsR のリン酸化部位を決定する方法について

菌体から免疫沈降で回収した AfsR に対し、Phos-tag SDS-PAGE を行いリン酸化 AfsR の検出を試みたが、リン酸化 AfsR と考えられるシフトバンドは検出されなかった(図 2. 2. 5.)。

また、T297 および T536 のリン酸化ペプチド抗体を作製し、同様に免疫沈降で回収した AfsR の検出を試みたが、T297 および T536 がリン酸化された AfsR を検出することはできなかった (data not shown)。リン酸化ペプチド抗体の検出感度より、リン酸化されている AfsR は AfsR 全量の 1/3～1/10 以下であると見積もられた。

リン酸化模倣変異型 AfsR の発現をウェスタンブロット解析で確認したところ、野生型 AfsR が検出される培養時期に検出されなかった (図 2. 2. 4.)。この結果は、リン酸化により活性型となった AfsR は速やかに分解されることを示唆している。*S. coelicolor* A3(2)のリン酸化タンパク質が網羅的に同定されているが、リン酸化 AfsR は検出されていない(Parker *et al.*, 2010)。本研究の結果と合わせて考えると、リン酸化 AfsR は速やかに分解されるため存在量が極めて少なく、検出できなかったと考えられる。以上のことから、*in vivo*においてリン酸化された AfsR を回収し、リン酸化部位を決定するのは困難であると結論付けた。そのため、リン酸化模倣変異型 AfsR の機能解析を行うことによりリン酸化部位の決定や分子機構の解明を行うことは妥当な手法である。

先行研究では、AfsK の N 末端のキナーゼドメイン (AfsKN) を用いて AfsR を *in vitro* リン酸化したが、リン酸化部位に特異性が無く、その部位を決定するには至らなかった (益子まり, 平成 15 年度修士論文; 田中晶子, 平成 21 年度博士論文)。AfsKN は、①安定化のために C 末端を欠失していること、②大腸菌の不溶性画分に生産させた後にリフォールディングして実験に使用していること、などがリン酸化の部位特異性を失った原因として考えられる。全長の AfsK を安定に生産し回収する条件の検討やリフォールディング条件の検討により、部位特異的な *in vitro* リン酸化とその部位の決定を行う方法も考えられる。

### T297 および T536 は真のリン酸化部位であるのか？

スタウロスポリン存在下で、T297D、T536D、T536E は活性を有していることを示した (図 2. 2. 2.)。リン酸化を阻害した条件下でも活性を示したことから、これらのリン酸化模倣変異型 AfsR は恒常的に活性化状態になっていることが強く示唆された。T297E はスタウロスポリン存在下で活性を失ったが、酸性アミノ酸がリン酸化 Thr を完全に模倣していないためであると考えられる。これらの結果は T297 および T536 がリン酸化部位であることを強く示唆している。

変異型 *afsR* の発現をウェスタンブロット解析で確認したところ、T297D、T536D、T536E は WT が検出された培養時間でも検出されなかった (図 2. 2. 4.)。スタウロスポリンの存在下でも活性を有していた T297D、T536D、T536E が検出されないことは、リン酸化により活性型となった AfsR は役割を終えると速やかに分解される可能性を示唆している。酸性アミノ酸置換により AfsR の安定性が大きく変化することも、T297 および T536 がリン酸化部位であることを示していると考えられる。

また、大腸菌において過剰生産を行った際に、T536D および T536E は不溶性画分に生産され、種々の条件検討を試みたが可溶性画分へ生産させることができなかった (図 2. 2. 6.)。T536 の酸性アミノ酸置換により AfsR の性質が大きく変化することも、T536 がリン酸化部位であることを示しているのかもしれない。

TPR ドメインを欠失した野生型 AfsR (WTΔTPR) は Act 生産能が低下した (図 2. 2. 7.)。一方、T536DΔTPR および T536EΔTPR では Act 生産能を有しており (図 2. 2. 7.)、WTΔTPR よりも高い DNA 結合能を示した (図 2. 2. 9.)。活性が低下した AfsRΔTPR の T536 をリン酸化模倣状態にすると機能が回復されることは、T536 がリン酸化部位として機能することを示していると考えられる。

以上のように、T297 および T536 がリン酸化部位であることを示唆する証拠を得ることができた。さらに、T536 をリン酸化模倣状態にすると性質が大きく変化することを示す複数の証拠を得られており、T536 がリン酸化部位であることが強く示唆された。一方で、T297 のリン酸化を否定するわけではない。T297 と T536 のリン酸化の差異については後述する。

T297 や T536 が真のリン酸化部位であるのか、構造生物学的な視点でも検証が必要である。AfsR の X 線結晶構造解析が試みられているが、その構造解明に至っていない (池谷三和, 平成 17 年度修士論文)。しかしながら、タンパク質の精製条件や結晶化条件に検討の余地がある。野生型およびリン酸化模倣変異型 AfsR の立体構造解明により、リン酸化による構造変化と性質変化を説明する手がかりになると考えられる。

### **T297 と T536 のリン酸化模倣変異型 AfsR の差異**

スタウロスポリン存在下において、T297 と T536 の酸性アミノ酸置換型 AfsR の機能に差異が見られた。T536 は Asp 置換と Glu 置換の両方が Act 生産能を示したが、T297 では Asp 置換のみ Act 生産能を示した (図 2. 2. 2.)。また、ウェスタンブロット解析における変異型 AfsR の検出においても、T536 は Asp 置換と Glu 置換の両方が検出されなかったが、T297 では Asp 置換のみ検出されなかった (図 2. 2. 4.)。酸性アミノ酸はリン酸化スレオニンの電荷状態を完全に模倣しているわけではない。T536 よりも T297 が位置している部位の方が構造変化のために厳密な電荷変化を要求するのかもしれない。

また、大腸菌において過剰生産させた際に、T297D および T297E は可溶性画分に生産さ



れたが、T536D および T536E は不溶性画分に生産された (図 2. 2. 6.)。酸性アミノ酸に置換した際の性質が異なることから、リン酸化で生じる AfsR の構造変化は T297 と T536 で異なると考えられる。

WTΔTPR は Act 生産能が低下することが示されたが、T297DΔTPR および T297EΔTPR についても同様の Act 生産能の低下が見られた (図 2. 2. 7.)。一方、T536DΔTPR および T536EΔTPR では Act 生産能を有していた。活性が低下した AfsRΔTPR は T536 をリン酸化模倣状態にすると機能が回復されるが、T297 をリン酸化模倣状態にしても機能は回復されない。この結果からも、T297 と T536 はリン酸化による活性化機構に差異があることが考えられる。

### T297 のリン酸化による AfsR 活性化

T297D および T297E は、大腸菌において可溶性画分に過剰生産させることができたため、EMSA に供した (図 2. 2. 6.)。しかしながら、T297D および T297E は WT と DNA 結合能に差は見られなかった。T297 のリン酸化は DNA 結合能の上昇とは異なる機構で AfsR を活性化型に変化させていると考えられる。AfsR は RNA ポリメラーゼをリクルートすることで *afsS* の転写を活性化するモデルが提唱されている (Tanaka *et al.*, 2007)。T297 のリン酸化により RNA ポリメラーゼとの親和性が上昇し、*afsS* の転写を活性化している可能性が考えられる。これを検証するには、T297D と RNA ポリメラーゼと *afsS* プロモーターを含む DNA プローブを用いて EMSA を行うことで、三者複合体の形成効率を解析する手法が考えられる。

### T536 のリン酸化による AfsR 活性化

T536D および T536E は大腸菌において可溶性画分に過剰生産させることができなかったため、可溶性画分に過剰生産できた T536DΔTPR および T536EΔTPR を EMSA に供した (図 2. 2. 9.)。その結果、T536DΔTPR および T536EΔTPR は WTΔTPR よりも高い DNA 結合能を保持していた。全長の AfsR と T536D および T536E でも同様の DNA 結合能の差が生じているのかは議論の余地がある。しかし、Δ*afsR* に導入した際に、TPR ドメインの有無にかかわらず、WT よりも T536 の酸性アミノ酸置換型 AfsR の方が高い Act 生産能を示す傾向は一致している (図 2. 2. 2., 図 2. 2. 7.)。そのため、T536DΔTPR および T536EΔTPR の EMSA より、T536 のリン酸化により DNA 結合能が上昇すると考えても問題ないと結論づけた。

DNA 結合能が上昇する機構について、多量体形成が促進されている可能性を考えた。そこで、*in vitro* クロスリンクにより多量体の検出を行った (図 2. 2. 10.)。しかし、WTΔTPR と T536DΔTPR および T536EΔTPR に多量体形成の効率に差が見られなかった。DNA 存在下で多量体化の効率に差が生じるのか検証するため、*afsS* プロモーターを含む DNA を加えて

*in vitro* クロスリンクを行ったが、多量体形成の効率は変化しなかった (data not shown)。*in vitro* クロスリンクは、架橋の標的になるアミノ酸側鎖が架橋剤の及ぶ距離内に存在している必要がある。実験に使用した BS<sup>3</sup> は 11.4 Å 以内にある 1 級アミン (N 末端のアミノ基またはリジン側鎖のアミノ基) 同士に共有結合を形成する性質がある。BS<sup>3</sup> 以外の架橋剤でも同様の検証を行い、WTΔTPR と T536DΔTPR および T536EΔTPR に多量体形成の差が見られるのかは検証する必要がある。

一方で、T536 のリン酸化では多量体形成の効率は変化せず、立体構造の変化により DNA との親和性が上昇する可能性もある。WTΔTPR と T536DΔTPR および T536EΔTPR の X 線結晶構造解析を行い、構造を比較することで活性化の分子機構解明のための手がかりを得ることができると考えられる。

### **T297 と T536 のリン酸化の関連性**

T297 と T536 の両残基がリン酸化された際の活性変化に興味を持たれた。2 つの Thr のリン酸化の関連について、①片方の Thr のリン酸化で活性型になるが両残基のリン酸化で加算的に活性上昇する、②両方の Thr がリン酸化されることで初めて活性型になる、の 2 通りのモデルが考えられる。

①を検証するため、T297 と T536 を同時にリン酸化模倣状態にした T297D/T536D を *ΔafsR* に導入したが、WT、T297D、T536D を導入した株と Act 生産能に違いは見られなかった (図 2. 2. 3.)。この結果では T297D や T536D のリン酸化を模倣していないもう一方の Thr 残基がリン酸化されることで活性型となり、T297D/T536D との差が見られない可能性もある。また、実験に用いた SMMS 培地は Act 生産が非常に良好な条件であるため、Act 生産能が上昇していても活性の違いが表現型として見えていない可能性も考えられる。Act 生産が良くない培地条件で表現型観察することで、1 カ所の Thr をリン酸化模倣状態にしたときと 2 カ所の Thr を同時にリン酸化模倣状態にしたときの活性の違いが検出される可能性がある。

②を検証するため、片方の Thr を Ala 置換によりリン酸化されないようにしたリン酸化模倣変異型 T297D/T536A と T297A/T536D を導入した際の表現型を観察した (図 2. 2. 3.)。その結果、T297D および T536D を導入した株と Act 生産能に差は見られなかった。この結果は、片方の Thr がリン酸化されるだけで AfsR は活性型となる可能性を示している。しかしながら、その活性の強さについては議論の余地がある。1 カ所のリン酸化では 2 カ所のリン酸化よりも活性化の度合いが低く Act 生産能を持たないが、本来存在しているはずの微量なリン酸化 AfsR よりも多量なリン酸化模倣変異型 AfsR が生産されることで、活性化が不十分な 1 カ所のリン酸化模倣置換でも Act 生産能を示している可能性もある。

また、T297D/T536A と T297A/T536D を導入した株では Act 生産が見られたが、T297A や T536A を導入した株では Act 生産は見られなかった。細胞内に存在しているリン酸化 AfsR

がごく微量である可能性については前述したが、Ala 置換により AfsR 自体の活性が低下しているために、もう一方の Thr がリン酸化された Ala 置換型 AfsR が微量生じて、Act 生産能を示さない可能性がある。また別の可能性として、Ala 置換を導入した Thr がリン酸化を受けなくなるだけでなく、Ala 置換による立体構造の変化がもう一方の Thr のリン酸化を阻害していることも考えられる。

以上をまとめると、本研究で行った実験条件下では T297 と T536 をそれぞれリン酸化模倣状態にしても加算的な活性上昇は見られなかった。また、両残基のリン酸化が活性化に必須であるのかは議論の余地が残された。

## **TPR ドメインの機能**

先行研究においては、低コピーベクターを用いて  $\Delta afsR$  に導入した結果、WT と WT $\Delta$ TPR に Act 生産能の違いは見られていなかった (Tanaka *et al.*, 2007)。本研究では、ゲノム融合型ベクターを用いて  $\Delta afsR$  に導入した結果、WT $\Delta$ TPR は WT よりも Act 生産能が低下していることを示した (図 2. 2. 7.)。

T536 $\Delta$ TPR および T536D $\Delta$ TPR が Act 生産能を有していることから、WT $\Delta$ TPR も T536 がリン酸化されれば Act 生産能を回復すると考えられるが、実際には Act 生産能は低下したままである (図 2. 2. 7.)。TPR ドメインを欠失することにより、リン酸化が生じなくなったためであると考えられる。

TPR ドメインは、34 アミノ酸残基からなる TPR (tetra~~t~~ricopeptide ~~r~~ep~~e~~at) が 3~16 個並列した領域である (Zeytuni *et al.*, 2012)。TPR の予測アルゴリズム TPRpred (Karpenahalli *et al.*, 2007; <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred>) により、AfsR の TPR ドメインには TPR が 8 つ見出された。TPR ドメインを介した相互作用によりシャペロン複合体 (Scheufler *et al.*, 2000) やユビキチンリガーゼ複合体 (Peters, 2006) のような、生体内で重要な構造物が形成される例が知られている。また、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のユビキチンリガーゼ複合体構成因子 Cut9 (Zhang *et al.*, 2010) や赤痢菌 *Shigella flexneri* の病原性因子結合シャペロン IpgC (Lunelli *et al.*, 2009) のように、ホモダイマーの形成に関与する例も報告されている。AfsR の TPR ドメインも他のタンパク質と相互作用していることが考えられる。TPR ドメインとキナーゼが相互作用することで適切なリン酸化が行われる可能性がある。

また、T536D $\Delta$ TPR および T536E $\Delta$ TPR を  $\Delta afsR$  に導入した株では、T536D および T536E を導入した株よりも著しく高い Act 生産能と生育阻害が見られた (図 2. 2. 7.)。本来は二次代謝を生じない培養初期から Act 生産を行うことにより、生育阻害が生じていると考えられる。生育阻害を生じることから、T536D $\Delta$ TPR および T536E $\Delta$ TPR を有することが菌体の生存に有利に働くとは考えにくく、アーティファクトな活性化が生じていると言える。*in vitro*

において、T536DΔTPR および T536EΔTPR は WTΔTPR よりも DNA 結合能が高いことを示した (図 2. 2. 9.)。それに加え、*in vivo* においては、かさ高い C 末端側の TPR ドメインが無くなることで RNA ポリメラーゼと結合しやすくなるのかもしれない。

## 2. 4. 実験方法

基本的な実験方法については第 4 部「実験材料と方法」に示した。

### 【ベクターの構築】

全ての PCR 産物は配列に誤りが無いことを DNA シークエンス解析により確認した。

#### **pTYM19-*afsR***

pKUM10-*afsR*（田中晶子，平成 21 年度博士論文）を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-*afsR*** とした。

#### **pTYM19-T297A**

pKUM10-T297A（田中晶子，平成 21 年度博士論文）を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297A** とした。

#### **pTYM19-T297D**

pKUM10-T297D（田中晶子，平成 21 年度博士論文）を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297D** とした。

#### **pTYM19-T297E**

pKUM10-T297E（田中晶子，平成 21 年度博士論文）を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297E** とした。

#### **pTYM19-T536A**

pKUM10-T536A（田中晶子，平成 21 年度博士論文）を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T536A** とした。

#### **pTYM19-T536D**

pKUM10-T536D（田中晶子，平成 21 年度博士論文）を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T536D** とした。

#### **pTYM19-T536E**

pKUM10-T536E（田中晶子，平成 21 年度博士論文）を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T536E** とした。

#### **pTYM19-T297D/T536D**

pKUM10-T297D/T536D（田中晶子，平成 21 年度博士論文）を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297D/T536D** とした。

#### **pTYM19-T297A/T536A**

pKUM10-T297A/T536A（田中晶子，平成 21 年度博士論文）を EcoR I と BamH I で切断し、得られた断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297D/T536D** とした。

#### **pTYM19-T297D/T536A**

pTYM19-T297D を EcoR I と Pst I で、pTYM19-T536A を PstI と BamH I で切断し、得られた 2 断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297D/T536A** とした。

#### **pTYM19-T297A/T536D**

pTYM19-T297A を EcoR I と Pst I で、pTYM19-T536D を PstI と BamH I で切断し、得られた 2 断片を pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297A/T536D** とした。

**pCold II-*afsR***

**pCold II-T297A**

**pCold II-T297E**

**pCold II-T297D**

**pCold II-T536A**

**pCold II-T536D**

**pCold II-T536E**

先行研究において作製された（田中晶子，平成 21 年度博士論文）。

**pTYM19-*afsR*ΔTPR**

pTYM19-*afsR* をテンプレートとして、*afsR* pro-F と *afsR* del TPR-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と BamH I で切断し、pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-*afsR*ΔTPR** とした。

**pTYM19-T297AΔTPR**

pTYM19-T297A をテンプレートとして、*afsR* pro-F と *afsR* del TPR-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と BamH I で切断し、pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297AΔTPR** とした。

**pTYM19-T297DΔTPR**

pTYM19-T297D をテンプレートとして、*afsR* pro-F と *afsR* del TPR-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と BamH I で切断し、pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297DΔTPR** とした。

**pTYM19-T297EΔTPR**

pTYM19-T297E をテンプレートとして、*afsR* pro-F と *afsR* del TPR-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と BamH I で切断し、pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T297EΔTPR** とした。

**pTYM19-T536AΔTPR**

pTYM19-T536A をテンプレートとして、*afsR* pro-F と *afsR* del TPR-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と BamH I で切断し、pTYM19（EcoR I / BamH I）にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T536AΔTPR** とした。

### **pTYM19-T536DΔTPR**

pTYM19-T536D をテンプレートとして、afsR pro-F と afsR del TPR-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と BamH I で切断し、pTYM19 (EcoR I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T536DΔTPR** とした。

### **pTYM19-T536EΔTPR**

pTYM19-T536E をテンプレートとして、afsR pro-F と afsR del TPR-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を EcoR I と BamH I で切断し、pTYM19 (EcoR I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pTYM19-T536EΔTPR** とした。

### **pCold II-*afsR*ΔTPR**

pTYM19-*afsR*ΔTPR を Nde I と BamH I で切断し、得られた断片を pCold II (Nde I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pCold II-*afsR*ΔTPR** とした。

### **pCold II-T297AΔTPR**

pTYM19-T297AΔTPR を Nde I と BamH I で切断し、得られた断片を pCold II (Nde I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pCold II-T297AΔTPR** とした。

### **pCold II-T297EΔTPR**

pTYM19-T297EΔTPR を Nde I と BamH I で切断し、得られた断片を pCold II (Nde I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pCold II-T297EΔTPR** とした。

### **pCold II-T297DΔTPR**

pTYM19-T297DΔTPR を Nde I と BamH I で切断し、得られた断片を pCold II (Nde I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pCold II-T297DΔTPR** とした。

### **pCold II-T536AΔTPR**

pTYM19-T536AΔTPR を Nde I と BamH I で切断し、得られた断片を pCold II (Nde I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pCold II-T536AΔTPR** とした。

### **pCold II-T536DΔTPR**

pTYM19-T536DΔTPR を Nde I と BamH I で切断し、得られた断片を pCold II (Nde I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pCold II-T536DΔTPR** とした。



### **pCold II-T536EΔTPR**

pTYM19-T536EΔTPR を Nde I と BamH I で切断し、得られた断片を pCold II (Nde I / BamH I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pCold II-T536EΔTPR** とした。

### **pHSG299-*afsS* up**

*S. coelicolor* A3(2)ゲノム DNA をテンプレートとして、*afsS* up-F と *afsS* up-R により PCR 増幅を行った。得られた断片を BamH I と KpnI で切断し、pHSG299 (BamH I / Kpn I) にサブクローニングした。このプラスミドを **pHSG299-*afsS* up** とした。

## 【Phos-tag SDS-PAGE】

### 菌体の培養

WT (M130) および  $\Delta$ *afsR* を TSB プレートへ植え継ぎ、5 日間培養して孢子形成させた。孢子形成したプレート片を 5 mm 角に切り取り、TSB 培地において 3 日間前培養した。前培養した菌体を回収し、SMMS 培地で洗浄した。前培養した菌体が 1% となるように SMMS 培地へ植菌した。培養開始から 1 日後、または 2 日後に菌体を回収した。

### AfsR の免疫沈降

培地 100 ml から回収した菌体に PBST 3 ml を加えて超音波破碎した。4°C、15000 rpm で 10 分間遠心し、上清を粗抽出タンパク質とした。粗抽出タンパク質に抗 AfsR ポリクローナル抗体 5  $\mu$ g を加え、4°C で 1 時間攪拌した。Dynabeads Protein G (Life Technologies 社) の懸濁液 50  $\mu$ l を PBST で平衡化し、粗抽出タンパク質に加え、さらに 4°C で 1 時間攪拌した。フロースルーを除去し、PBST 200  $\mu$ l でビーズを 3 回洗浄した。1x SDS-PAGE Sample buffer 30  $\mu$ l を加え、100°C で 5 分間加熱した。得られた上清を Phos-tag SDS-PAGE に供した。

### PBST

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Tween20, Protease Inhibitor Mix (GE ヘルスケア社), ホスファターゼ阻害剤カクテル溶液 I (和光純薬社), pH 7.5

### ゲルの作製・泳動

通常の SDS-PAGE の 5% stacking gel に終濃度 20  $\mu$ M Phos-tag アクリルアミド (和光純薬社) と終濃度 40  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub> を加えた。サンプルの調製や泳動条件は通常の SDS-PAGE と同じ手順で行った。

### 転写

Phos-tag SDS-PAGE が終了したゲルを前処理 buffer で 10 分間振とうし、Mn<sup>2+</sup> の除去を行った。同様の操作をさらに 2 回行った。その後、通常通りウェスタンブロット解析を行った。

### 前処理 buffer

終濃度 10 mM EDTA を SDS-PAGE の running buffer に加えた。

## 【抗リン酸化ペプチド抗体の作製と検出感度の検定】

### 抗リン酸化ペプチド抗体の作製

ペプチドの合成、抗血清の取得、抗リン酸化ペプチド抗体の精製は日本バイオサービス社に依頼した。作製手順について、簡潔に述べる。

T297、T297p、T536、T536p を合成した。T297p および T536p を抗原とし、ウサギから抗血清を回収した。抗血清から T297p および T536p に特異的に結合する抗体を回収し、粗精製ペプチド抗体とした。粗精製ペプチド抗体から T297 および T536 と結合する抗体を除去した。T297 および T536 を抗原とする ELISA において結合シグナルが見られなくなるまで除去操作を繰り返した。得られた抗体を抗リン酸化ペプチド抗体とした。

#### T297

TVSDFTGRAAF

#### T297p

TVSDFTpGRAAF

#### T536

QAVEATFELGY

#### T536p

QAVEATpFELGY

### ドットブロットによる検出感度の検定

条件検討の結果、合成ペプチドを 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  に溶解した。その後、ペプチド希釈液で各ペプチドの希釈系列を作製した。

Immobilon-P Membrane (Millipore 社) を適切な大きさに切り取り使用した。メンブレンをメタノールに浸した。さらに、はじかなくなるまで D.W. になじませた。希釈したペプチドをメンブレン上に 1  $\mu\text{l}$  滴下し、メンブレンが乾くまで放置した。ブロッキング液中で 1 時間振とうした。その後、TBST 中で 10 分間振とう操作を 3 回行った。一次抗体液中で 1 時間振とうした。その後、TBST 中で 10 分間振とう操作を 3 回行った。二次抗体液中で 1 時間振とうした。その後、TBST 中で 10 分間振とう操作を 3 回行った。Clarity Western ECL Substrate (BIO-RAD 社) で検出を行った。

#### ペプチド希釈液

0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 0.1 mg/ml BSA

#### ブロッキング液

3% BSA を TBST に加えた。

### TBST

10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20, pH 7.5

### 一次抗体液

TBST に 1/10000 倍量のペプチド抗体を加えた

### 二次抗体液

TBST に 1/0000 倍量の Peroxidase labeled Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (KPL 社)を加えた

### **【AfsR および AfsRΔTPR の過剰生産】**

*E. coli* BL21(DE3)を pCold 系ベクターで形質転換した。コロニーを爪楊枝でつつき、アンピシリンを添加した LB 培地で一晚培養した。2x YT 培地に 1%植菌し、37°C で O.D.<sub>600</sub>=0.6 まで培養した。培地を氷上で冷却し、IPTG を終濃度 0.5 mM 添加した。その後、15°C で一晚培養した

### **【AfsR および AfsRΔTPR の EMSA】**

先行研究の実験条件を参考にした（田中晶子，平成 21 年度博士論文）。

### **DNA プローブの作製**

pHSG299-*afsS* up をテンプレートとして、*afsS* pro probe-F と *afsS* pro probe-R により PCR 増幅を行った。得られた 100 bp の断片を FastGene Gel/PCR Extraction Kit（日本ジェネティクス社）を用いてゲル精製した。ゲル精製 DNA, 1850 kBq [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, 10 U T4 Polynucleotide Kinase（タカラバイオ社）を 50  $\mu$ l 中で調製し、37°C で 1 時間インキュベートした。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社)を用いて、未反応の [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP を除去し、DNA を回収した。

### **電気泳動**

DNA プローブ 100 cps、精製 AfsR（精製 AfsRΔTPR）、poly(dI-dC)-poly(di-dC) 1  $\mu$ g、0.1% BSA 4  $\mu$ l を Binding buffer で 40  $\mu$ l に調製し、30°C で 30 分間インキュベートした。以後の操作は、室温または 4°C で行った。ゲルを 36 mA で 30 分間プレランした。サンプルをアプライし、36 mA で 2 時間泳動した。泳動が終了したゲルは、70°C で 1 時間乾燥させた。イメージングプレートに一晚コンタクトさせた後に検出した。

### Binding buffer

10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10%グリセロール, pH 7.4

#### 6%ネイティブアクリルアミドゲル

40%アクリルアミドストック (アクリルアミド: ビスアクリルアミド=79:1) 3 ml, 10x TAE for GS 2 ml, D.W. 15 ml, 10% APS 150  $\mu$ l, TEMED 20  $\mu$ l

#### 10x TAE for GS

400 mM Tris, 200 mM CH<sub>3</sub>COONa, 10 mM EDTA, 酢酸で pH 7.8 に合わせた

### **【Blue-Native PAGE】**

Wittig *et al.* (2006)を参考にした

#### ゲルの作製 (6%)

アクリルアミドストック 1.45 ml, 1 M イミダゾール (pH7.0) 0.3 ml, D.W. 10.25 ml, 10% APS 48  $\mu$ l, TEMED 24  $\mu$ l

#### アクリルアミドストック

48% acrylamide, 1.5% *N,N'*-methylene-bis acrylamide

#### 電気泳動

精製タンパク質と Loading dye を混合した。ゲル、陽極 buffer、陰極 buffer-1 をセットし、サンプルをアプライした。以後の泳動操作は 4°C で行った。100 V でサンプルがゲルに入るまで泳動した。その後、15 mA でフロントラインがゲルの 1/3 に到達するまで泳動した。陰極 buffer-1 を陰極 buffer-2 に交換し、15 mA でフロントラインがゲルの下端に到達するまで泳動した。

#### Loading dye

5% glycerol, 0.01% Ponceau S

#### 陽極 buffer

25 mM イミダゾール, pH 7.0

#### 陰極 buffer-1

50 mM Tricine, 7.5 mM イミダゾール, 0.02% Coomassie blue G-250, pH7.0

#### 陰極 buffer-2

50 mM Tricine, 7.5 mM イミダゾール, 0.002% Coomassie blue G-250, pH7.0

### 【*afsS* の転写確認】

作製した cDNA ライブラリーをテンプレートとし、*afsS* RT-F と *afsS* RT-R により *afsS* を PCR 増幅した。また、*hrdB* RT-F と *hrdB* RT-R により内在性コントロール *hrdB* を PCR 増幅した。

### 【*in vitro* クロスリンク】

あらかじめ精製 AfsRΔTPR を PBSG で透析した。1 μM 精製 AfsRΔTPR に終濃度 50 μM BS<sup>3</sup> 溶液を加え、室温で 30 分間攪拌した。終濃度 10 mM Tris-HCl (pH8.0)を加え、室温で 15 分間攪拌して、架橋反応を停止させた。

### 50 mM BS<sup>3</sup> 溶液

BS<sup>3</sup> (Thermo Scientific 社) 2 mg に PBS 70 μl を加えた。

### PBS

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.2

### PBSG

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 10% グリセロール, pH 7.2

### 【使用したプライマー】

第 2 章で使用したプライマーを下表に示した。

Name	Sequence (5' to 3')
<i>afsS</i> up-F	TTTGGATCCGGAGCGCGCCGCCCTCTACC
<i>afsS</i> up-R	GGGGTACCGGACTTCGCTCCTCATGGGT
<i>afsS</i> pro probe-F	TCGCAGTGTGGCGCGGTGAAC
<i>afsS</i> pro probe-R	GACGGTCTGACGGAGATGACAG
<i>afsR</i> pro-F	TTTGAATTCGCAGTACATCCGCAA
<i>afsR</i> del TPR-R	AAAGGATCCTCATTCGTCCTCCGTTCCGC
<i>afsS</i> RT-F	CGTCAGACCGTCGCA
<i>afsS</i> RT-R	CTACTTGCCGTCGCC
<i>hrdB</i> RT-F	GTGTCGGCCAGCACA
<i>hrdB</i> RT-R	GCCTTCCTGCTGGTC

### 第 3 部 総括

本研究では、Act 生産に重要な役割を担っている AfsK-AfsR-AfsS シグナル伝達経路の分子機構を明らかにすることを目的とし、「*afsS* 遺伝子座の機能解析」と「リン酸化による AfsR 活性化の機能解析」に取り組んだ。その結果を以下にまとめる。

AfsS の機能に重要である繰り返し配列を破壊した変異型 *afsS* を含む *afsS* 遺伝子座を *S. lividans* に導入したところ、Act 生産が誘導されるという予想外の現象が観察された。この発見をきっかけとして、*afsS* 遺伝子座の詳細な機能解析を行った。

結果として、5'UTR に存在するヘアピン構造の転写が Act 生産活性化を引き起こしていることが明らかになった。また、Act 生産ほど顕著ではないが、Red 生産にも関与するグローバルな二次代謝活性化作用があることが示された。

他の *Streptomyces* の *afsS* 遺伝子座においても 5'UTR のヘアピン構造は必ず存在しており、何らかの生理的役割があると考えられた。*S. avermitilis* と *S. griseus* の 5'UTR についても *S. lividans* に導入したところ、*S. avermitilis* 由来の 5'UTR は Act 生産活性化能を示した。一方、*afsS* 様遺伝子をコードする ORF 領域を 5'UTR と独立に *S. lividans* に導入したところ、*S. coelicolor* A3(2)と *S. griseus* 由来の ORF は Act 生産活性化能を示した。高発現条件下で *S. coelicolor* A3(2)由来の *afsS* 遺伝子座を *S. lividans* に導入すると、5'UTR と ORF がそれぞれ Act 生産活性化能を有しており、「二機能性 RNA」として機能することが示された。一方で、*S. avermitilis* や *S. griseus* 由来の *afsS* 遺伝子座では、5'UTR と ORF の一方のみが Act 生産活性化能を示した。Act 生産活性化能を示した 5'UTR や ORF を元の *Streptomyces* で過剰発現させると、何らかの表現型が観察できるかもしれない。

5'UTR のヘアピン構造が Act 生産の活性化を行う分子機構に興味を持たれた。non-coding RNA として、他の RNA と塩基対を形成する可能性が考えられた。その際に、RNA シャペロン様タンパク質が介在していると仮説を立てた。ヘアピン構造がその機能に重要であることから、ヘアピン構造特異的に結合するタンパク質の探索を試みたが、その様なタンパク質は検出されなかった。また、5'UTR の導入により発現が変化する *S. lividans* の遺伝子について、プロテオーム解析により探索を行ったが、顕著に発現が変動するタンパク質スポットは見出されなかった。マイクロアレイ解析やトランスクリプトーム解析など、RNA レベルの存在量の変化を解析することで、ヘアピン構造と塩基対を形成する標的の手がかりを得られると考えている。網羅的解析を足がかりとして、新規の二次代謝制御機構の解明を期待できる。

リン酸化による AfsR 活性化について、①リン酸化を受ける Thr の部位、②リン酸化により活性型になる分子機構、が不明であった。リン酸化模倣変異型 AfsR の機能解析を行うことで、これらを解明することを試みた。

Ser/Thr 阻害剤スタウロスポリン存在下で、WT は Act 生産能を失っていたが、T297D、T536D、T536E は活性を有していた。このことから、T297 と T536 がリン酸化部位であることが強く示唆された。また、スタウロスポリンの阻害作用を回避した T297D、T536D、T536E は、ウェスタンブロット解析で WT の発現が見られた培養時期にバンドが検出されなかった。T297 や T536 をリン酸化模倣状態にすることで性質が大きく変化することから、これらの Thr が AfsR の活性変化に重要な残基であると考えられた。

免疫沈降で回収した AfsR を Phos-tag SDS-PAGE に供したが、リン酸化 AfsR は検出されなかった。さらに、抗リン酸化ペプチド抗体による解析から、リン酸化 AfsR の存在量は AfsR 全体の 1/3～1/10 以下であると見積もられた。ウェスタンブロット解析で確認したところ、リン酸化模倣変異型 AfsR は野生型 AfsR が検出される培養時期に検出されなかったことから、リン酸化により活性型となった AfsR は速やかに分解されることが示唆された。これらの結果から、*in vivo* においてリン酸化された AfsR を回収し、リン酸化部位を直接決定するのは困難であると結論付けた。種々の条件検討を行い、AfsR を *in vitro* リン酸化し、リン酸化部位を直接決定する手法が考えられる

T297 や T536 が真のリン酸化部位であるのか、構造生物学的な視点でもさらなる検証が必要である。野生型およびリン酸化模倣変異型 AfsR の立体構造解明により、リン酸化による構造変化と性質変化を説明する手がかりになると考えられる。

大腸菌において可溶性画分に過剰生産させることができた T297D および T297E を EMSA に供した。しかし、T297D および T297E は WT と DNA 結合能に差は見られなかった。T297 のリン酸化は DNA 結合能の上昇とは異なる機構で AfsR を活性型に変化させていると考えられる。T297 のリン酸による活性化機構として、RNA ポリメラーゼとの親和性上昇などの可能性がある。

T536D および T536E は大腸菌において可溶性画分に過剰生産させることができなかったため、可溶性画分に過剰生産できた T536DΔTPR および T536EΔTPR を EMSA に供した。その結果、T536DΔTPR および T536EΔTPR は WTΔTPR よりも高い DNA 結合能を保持していた。このことから、T536 のリン酸化により DNA 結合能が上昇することが示唆された。DNA 結合能上昇の機構については、多量体化や構造変化による親和性上昇が考えられた。

T297 と T536 のリン酸化については、本研究で行った条件下ではそれぞれの Thr をリン酸化模倣状態にした時の加算的な活性上昇は見られなかった。また、一方の Thr のリン酸化のみで活性上昇する可能性が示されたが、その活性上昇の度合いには議論の余地が残った。

ゲノム融合型ベクターを用いて Δ*afsR* に導入した結果、WTΔTPR は WT よりも Act 生産能が低下していることを示した。T536DΔTPR および T536EΔTPR が Act 生産能を有していることから、WTΔTPR も T536 がリン酸化されれば Act 生産能を回復すると考えられるが、実際には Act 生産能は低下したままであった。TPR ドメインを欠失することにより、キナーゼとの適切な相互作用ができず、リン酸化されなくなった可能性が考えられた。



## 第 4 部 実験材料と方法

### 第 1 章 使用した菌株／ベクターおよび培地

#### 1. 1 本論文中で使用した菌株

##### 【大腸菌】

###### *Escherichia coli* JM109

*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*(rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>), *e14<sup>-</sup>* (*mcrA<sup>-</sup>*), *supE44*, *relA1*,  
 $\Delta$  (*lac-proAB*)/F' [*traD36*, *proAB<sup>+</sup>*, *lac I<sup>q</sup>*, *lacZ*  $\Delta$  M15]

ベクターの構築に使用した

###### *Escherichia coli* JM110

*dam*, *dcm*, *supE44*, *hsdR17*, *thi*, *leu*, *rpsL1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *thr*, *tsx*,  
 $\Delta$  (*lac-proAB*)/F' [*traD36*, *proAB<sup>+</sup>*, *lac I<sup>q</sup>*, *lacZ*  $\Delta$  M15]

*dam*, *dcm* メチラーゼ遺伝子変異株。 *E. coli* JM109 で構築したプラスミドを放線菌に導入する前に、本株に導入して再取得した。それにより、大腸菌型のメチラーゼ修飾を外した。

###### *E. coli* BL21(DE3)

F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdSB*(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>), *gal*( $\lambda$  *cI* 857, *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7gene1*), *dcm*(DE3)  
pET ベクターおよび pCold ベクターを用いたタンパク質の大量発現に使用した

##### 【放線菌】

###### *Streptomyces coelicolor* A3(2) M130

SCP1<sup>-</sup>, SCP2<sup>-</sup>, *hisA1*, *uraA1*, *strA*

当研究室で親株として用いている株

###### *S. coelicolor* A3(2) $\Delta$ *afsR*

梅山が構築した *S. coelicolor* A3(2) M130 の *afsR* 破壊株 (Lee *et al.*, 2002)

ネオマイシン耐性遺伝子 *aphII* を逆向きに挿入した。野生株に比べ、形態分化能に差は見られないが、色素生産の劇的な減少、遅れがみられる。

###### *S. lividans* TK21

表現型観察、粗抽出タンパク質の作製、放線菌のベクター構築に使用した

## 1. 2 本論文中で使用したベクター

### 【大腸菌】

#### pUC19

Yanisch-Perron *et al.* (1985)

ベクターの構築に使用した

#### pHSG299

Takeshita *et al.* (1987)

ベクターの構築に使用した

#### pKUM10

Yamazaki *et al.* (2003)

pKU205（放線菌：1 ゲノムあたり 1-4 コピー数）の派生ベクター

大腸菌-*Streptomyces* シャトルベクター

表現型観察に使用した

#### pTYM19

Onaka *et al.* (2003)

φC31 由来インテグラーゼにより放線菌ゲノムに組み込まれる

大腸菌-*Streptomyces* シャトルベクター

表現型観察に使用した

#### pET-15b

Novagen 社

N 末端にヒスチジン 6 残基よりなる His タグを付加する

タンパク質を大腸菌で過剰生産させる際に使用した

#### pCold II

タカラバイオ社

N 末端にヒスチジン 6 個残基よりなる His タグを付加する

N 末端にアミノ酸 5 残基よりなる TEE タグを付加する

コールドショック誘導性 *cspA* プロモーターにより低温条件下でタンパク生産する

タンパク質を大腸菌で過剰生産させる際に使用した

## 【放線菌】

### pIJ486

Ward *et al.* (1986)

1 ゲノムあたり 50-100 コピー数

表現型観察に使用した

### pIJ6021

Takano *et al.* (1995)

pIJ486 (1 ゲノムあたり 50-100 コピー数) の派生ベクター

チオストレプトン誘導性プロモーター $P_{tipA}$ の下流にマルチクローニングサイト

表現型観察に使用した

### 1. 3 本論文中で使用した培地

#### 【大腸菌】

プレートは終濃度 2% の Agar powder を加えた。液体培養、プレート培養ともに必要時に終濃度 50 µg/ml のアンピシリンまたはカナマイシンを加えた。

#### LB 培地

1% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl

#### 2x YT 培地

1.6% Bacto-tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl

#### 【放線菌】

プレートは終濃度 2.2% の Agar powder を加えた。液体培養では必要時に終濃度 5 µg/ml のチオストレプトンを加えた。

#### TSB 培地 (日水製薬)

2% Peptone, 0.5% NaCl, 0.25% glucose, 0.25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.3±0.2

*S. coelicolor* A3(2)および *S. lividans* の培養に使用した

#### YEME 培地

0.3% yeast extract, 0.5% Bacto-peptone, 0.3% Bacto-malt extract, 1% glucose, 34% sucrose, pH 7.0~7.2

オートクレーブ後、別にオートクレーブ滅菌した下記の成分をそれぞれ加えた。

0.25% glycine, 5 mM MgCl<sub>2</sub>,

*S. coelicolor* A3(2)および *S. lividans* のプロトプラスト作成時に使用した

*S. lividans* の表現型観察に使用した

#### R5 培地

sucrose 10.3 g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.025 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.012 g, glucose 1 g, Difco-Casamino acid 0.01g, Trace element solution 0.2 ml, Difco-yeast extract 0.5 g, TES 0.573 g, 100 ml にメスアップしてオートクレーブ滅菌した。その後、別にオートクレーブ滅菌した下記の成分をそれぞれ加えた。

0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 ml, 5 M CaCl<sub>2</sub> 400 µl, 20% L-proline 1.5 ml, 1N NaOH 700 µl

プロトプラスト再生培地として使用した

#### Trace element solution

ZnCl<sub>2</sub> 40 mg, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 200 mg, CuCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 10 mg, MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O 10 mg,

Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O 10 mg, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 10 mg

1 L にメスアップしてオートクレーブ滅菌した。

#### R5-培地

sucrose 10.3 g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.025 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.012 g, glucose 1 g, Difco-Casamino acid 0.01g, Trace element solution 0.2 ml, Difco-yeast extract 0.5 g, TES 0.573 g, pH 7.2

条件検討を行った結果、R5 培地から KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、L-proline を除いた組成の培地プレート上で、*afsS* 遺伝子座を導入した *S. lividans* の良好な生育と Act 生産が見られた。

*S. lividans* の表現型観察に使用した

#### SMMS 培地

Difco-Casamino acid 0.2 g, TES 0.573 g, pH7.2

100 ml にメスアップしてオートクレーブ滅菌した。その後、別にオートクレーブ滅菌した下記の成分をそれぞれ加えた。

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 ml, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 ml, 1 M MgSO<sub>4</sub> 0.5 ml, 25% グルコース 3.6 ml,

Trace element solution 0.1 ml, Growth factor (for M130) 0.75 ml

*S. coelicolor* A3(2)の表現型観察に使用した

#### Growth factor (for M130)

ヒスチジン 0.5 g, ウラシル 75 mg

50 ml にメスアップしてオートクレーブ滅菌した。

## 第 2 章 本論文で使用した基本的な実験方法

### 【ポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製】

2x YT 培地 30 ml 分の菌体に Lysis buffer 800  $\mu$ l を加え、超音波破碎した。4°C、15000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。TALON Metal Affinity Resin (Clontech 社) を懸濁させて 200  $\mu$ l とった。Lysis buffer で平衡化した TALON Metal Affinity Resin と回収した上清を混ぜ、4°C で 1 時間攪拌した。TALON Metal Affinity Resin を Wash buffer 800  $\mu$ l で 3 回洗浄した。Elution buffer 200  $\mu$ l で 3 回溶出した。

#### Lysis buffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0

#### Wash buffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 8.0

#### Elution buffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, pH 8.0

### 【cDNA の作製】

RNAqueous Kit (Applied Biosystem 社) を使用して、回収した菌体から RNA を抽出した。抽出は製品添付のプロトコルに従って行った。抽出した RNA に Ribonuclease Inhibitor (Takara 社) と Recombinant DNase I (Takara 社) を加えて、37°C で 1 時間インキュベートした。Acid-Phenol:Chloroform (Applied Biosystem 社) を加えてボルテックスし、上清を回収した。もう一度、この操作を行った。回収した上清に対し、1/2 量の 7.5M 酢酸アンモニウム (Sigma 社) と等量の 2-プロパノールを加えて、-80°C で 10 分間インキュベートした。4°C、15000 rpm で 15 分間遠心してペレットを回収した。70%エタノールでペレットを洗浄し、DEPC 水に溶解させた。ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen 社) を使用し、抽出した RNA 1  $\mu$ g から cDNA を作製した。cDNA の作製は random hexamer プライマーを用いて、製品添付のプロトコルに従って行った。

## 【SDS-PAGE】

Solution A : 29.2% acrylamide, 0.8% *N, N'*-methylene-bis acrylamide

Solution B : 1.5 M Tris, pH 8.8

Solution C : 0.5 M Tris, pH 6.8

stacking gel

Solution A 0.45 ml, Solution C 0.75 ml, D.W. 1.8 ml, 20% SDS 60  $\mu$ l, 10% APS 18  $\mu$ l, TEMED 12  $\mu$ l

12.5% separation gel

Solution A 2.5 ml, Solution B 1.5 ml, D.W. 2 ml, 20% SDS 120  $\mu$ l, 10% APS 24  $\mu$ l, TEMED 12  $\mu$ l

4 x SDS-PAGE buffer

250 mM Tris, 8% SDS, 40% glycerol, 8%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.04% BPB, pH 6.8

running buffer

28 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.4

30 mA 定電流で泳動した。

## 【Tricine-SDS-PAGE】

Solution A : 48% acrylamide, 1.5% *N, N'*-methylene-bis acrylamide

Solution B : 3 M Tris, 3% SDS, pH 8.45

stacking gel

Solution A 0.25 ml, Solution B 0.75 ml, D.W. 2 ml, 10% APS 18  $\mu$ l, TEMED 12  $\mu$ l

10% separation gel

Solution A 1.5 ml, Solution B 2.5 ml, D.W. 3.5 ml, 10% APS 30  $\mu$ l, TEMED 15  $\mu$ l

3 x Tricine-SDS-PAGE buffer

150 mM Tris, 12% SDS, 30% glycerol, 6%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.05% CBB(G-250), pH 6.8

running buffer (陰極)

100 mM Tricine, 100 mM Tris, 1% SDS, pH の調製はしない (約 pH 8.3 になる)

running buffer (陽極)

100 mM Tris, pH 8.9

150 V 定電圧で泳動した。

SDS-PAGE、Tricine-SDS-PAGE とともにマーカーとして LMW Marker Kit (GE healthcare 社)、または Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE healthcare 社) を目的に応じて使用した。

### 【TCA／アセトン沈殿】

サンプルと等量の 20% TCA を加えた。-20℃で一晩インキュベートした。4℃、15000 rpm で 15 分間遠心した。上清を除去し、冷アセトンを加えてボルテックスした。4℃、15000 rpm で 15 分間遠心した。上清を除去し、ペレットを乾燥させた。

20% TCA : 20% TCA をアセトンに溶解した

### 【ウェスタンブロット (セミドライ方式)】

Immobilon-P Membrane (Millipore 社) をゲルサイズに合わせて 6 cm x 8.5 cm に切り取り使用した。メンブレンをメタノールに浸した。さらに、水をはじかなくなるまで転写 buffer に浸した。転写装置に濾紙とメンブレンとゲルを重ねてセットした。100 mA 定電流で 30 分間転写した。その後、適切な検出法を行った。

#### 転写 buffer

10 mM *N*-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS), 5% methanol, pH 11



## 参考文献

本論文で引用した文献を以下に示す。

- Aceti, D.J. & W.C. Champness, (1998) Transcriptional regulation of *Streptomyces coelicolor* pathway-specific antibiotic regulators by the *absA* and *absB* loci. *Journal of Bacteriology* **180**: 3100-3106.
- Adamidis, T. & W. Champness, (1992) Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. *Journal of Bacteriology* **174**: 4622-4628.
- Adamidis, T., P. Riggle & W. Champness, (1990) Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *Journal of Bacteriology* **172**: 2962-2969.
- Aigle, B., A. Wietzorrek, E. Takano & M.J. Bibb, (2000) A single amino acid substitution in region 1.2 of the principal a factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2) results in pleiotropic loss of antibiotic production. *Molecular Microbiology* **37**: 995-1004.
- Arias, P., M.A. Fernandez-Moreno & F. Malpartida, (1999) Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *Journal of Bacteriology* **181**: 6958-6968.
- Bentley, S.D., S. Brown, L.D. Murphy, D.E. Harris, M.A. Quail, J. Parkhill, B.G. Barrell, J.R. McCormick, R.I. Santamaria, R. Losick, M. Yamasaki, H. Kinashi, C.W. Chen, G. Chandra, D. Jakimowicz, H.M. Kieser, T. Kieser & K.F. Chater, (2004) SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* **51**: 1615-1628.
- Bentley, S.D., K.F. Chater, A.M. Cerdeno-Tarraga, G.L. Challis, N.R. Thomson, K.D. James, D.E. Harris, M.A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C.W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B.G. Barrell, J. Parkhill & D.A. Hopwood, (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.

- Bibb, M.J., R.F. Freeman & D.A. Hopwood, (1977) Physical and genetical characterisation of a second sex factor, SCP2, for *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular & General Genetics* **154**: 155-166.
- Brian, P., F.J. Riggle, R.A. Santos & W.C. Champness, (1996) Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *Journal of Bacteriology* **178**: 3221-3231.
- Crooks, G.E., G. Hon, J.M. Chandonia & S.E. Brenner, (2004) WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* **14**: 1188-1190.
- Elibol, M. & F. Mavituna, (1998) Effect of sucrose on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Process Biochemistry* **33**: 307-311.
- Farnham, P.J. & T. Platt, (1981) Rho-independent termination: dyad symmetry in DNA causes RNA polymerase to pause during transcription *in vitro*. *Nucleic Acids Research* **9**: 563-577.
- Fernandezmoreno, M.A., A.J. Martintriana, E. Martinez, J. Niemi, H.M. Kieser, D.A. Hopwood & F. Malpartida, (1992) *abaA*, a new pleiotropic regulatory locus for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* **174**: 2958-2967.
- Gottesman, S., (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends in Genetics* **21**: 399-404.
- Gramajo, H.C., E. Takano & M.J. Bibb, (1993) Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Molecular Microbiology* **7**: 837-845.
- Gravenbeek, M.L. & G.H. Jones, (2008) The endonuclease activity of RNase III is required for the regulation of antibiotic production by *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **154**: 3547-3555.
- Hempel, A.M., S. Cantlay, V. Molle, S.B. Wang, M.J. Naldrett, J.L. Parker, D.M. Richards, Y.G. Jung, M.J. Buttner & K. Flardh, (2012) The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: E2371-E2379.

- Hong, S.K., A. Matsumoto, S. Horinouchi & T. Beppu, (1993) Effects of protein kinase inhibitors on in vitro protein phosphorylation and cellular differentiation of *Streptomyces griseus*. *Molecular & General Genetics* **236**: 347-354.
- Hopwood, D.A., (1999) Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology-Uk* **145**: 2183-2202.
- Horinouchi, S., (2003) AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **30**: 462-467.
- Horinouchi, S. & T. Beppu, (1984) Production in Large Quantities of Actinorhodin and Undecylprodigiosin Induced by *afsB* in *Streptomyces lividans*. *Agricultural and Biological Chemistry* **48**: 2131-2133.
- Horinouchi, S., O. Hara & T. Beppu, (1983) Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin, and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology* **155**: 1238-1248.
- Horinouchi, S., M. Kito, M. Nishiyama, K. Furuya, S.K. Hong, K. Miyake & T. Beppu, (1990) Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **95**: 49-56.
- Horinouchi, S., H. Suzuki & T. Beppu, (1986) Nucleotide sequence of *afsB*, a pleiotropic gene involved in secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and "*Streptomyces lividans*". *Journal of Bacteriology* **168**: 257-269.
- Huang, J., J. Shi, V. Molle, B. Sohlberg, D. Weaver, M.J. Bibb, N. Karoonuthaisiri, C.J. Lih, C.M. Kao, M.J. Buttner & S.N. Cohen, (2005) Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* **58**: 1276-1287.
- Jayapal, K.P., W. Lian, F. Glod, D.H. Sherman & W.S. Hu, (2007) Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. *Bmc Genomics* **8**: 12.
- Kakinuma, S., Y. Takada, H. Ikeda, H. Tanaka, S. Omura & D.A. Hopwood, (1991) Cloning of large DNA fragments, which hybridize with actinorhodin biosynthesis genes, from kalafungin and nanaomycin A

- methyl ester producers and identification of genes for kalafungin biosynthesis of the kalafungin producer. *Journal of Antibiotics* **44**: 995-1005.
- Karpenahalli, M.R., A.N. Lupas & J. Soding, (2007) TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SELI-like repeats from protein sequences. *Bmc Bioinformatics* **8**: 8.
- Lee, P.C., T. Umeyama & S. Horinouchi, (2002) *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* **43**: 1413-1430.
- Leipe, D.D., E.V. Koonin & L. Aravind, (2004) STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: Multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology* **343**: 1-28.
- Li, R., G. Liu, Z.J. Xie, X.H. He, W.Q. Chen, Z.X. Deng & H.R. Tan, (2010) PolY, a transcriptional regulator with ATPase activity, directly activates transcription of *polR* in polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi*. *Molecular Microbiology* **75**: 349-364.
- Lian, W., K.P. Jayapal, S. Charaniya, S. Mehra, F. Glod, Y.S. Kyung, D.H. Sherman & W.S. Hu, (2008) Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Genomics* **9**: 56.
- Lunelli, M., R.K. Lokareddy, A. Zychlinsky & M. Kolbe, (2009) IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9661-9666.
- Matsumoto, A., S.K. Hong, H. Ishizuka, S. Horinouchi & T. Beppu, (1994) Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**: 47-56.
- McGrath, P.T., H. Lee, L. Zhang, A.A. Iniesta, A.K. Hottes, M.H. Tan, N.J. Hillson, P. Hu, L. Shapiro & H.H. McAdams, (2007) High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. *Nature Biotechnology* **25**: 584-592.
- 宮川拓也, 大西康夫, 田之倉優, 堀之内末治, (2009) 放線菌における有用物質生産制御因子の

構造・機能解析. 蛋白質 核酸 酵素 **54**: 1696-1701

Narva, K.E. & J.S. Feitelson, (1990) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* **172**: 326-333.

Nett, M., H. Ikeda & B.S. Moore, (2009) Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports* **26**: 1362-1384.

Ochi, K., (1987) Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. *Journal of Bacteriology* **169**: 3608-3616.

Okamoto-Hosoya, Y., T.A. Sato & K. Ochi, (2000) Resistance to paromomycin is conferred by *rpsL* mutations, accompanied by an enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Antibiotics* **53**: 1424-1427.

Onaka, H., S. Taniguchi, H. Ikeda, Y. Igarashi & T. Furumai, (2003) pTOYAMAcos, pTYM18, and pTYM19, actinomycete *Escherichia coli* integrating vectors for heterologous gene expression. *Journal of Antibiotics* **56**: 950-956.

Parker, J.L., A.M.E. Jones, L. Serazetdinova, G. Saalbach, M.J. Bibb & M.J. Naldrett, (2010) Analysis of the phosphoproteome of the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) by protein/peptide fractionation, phosphopeptide enrichment and high-accuracy mass spectrometry. *Proteomics* **10**: 2486-2497.

Passalacqua, K.D., A. Varadarajan, B.D. Ondov, D.T. Okou, M.E. Zwick & N.H. Bergman, (2009) Structure and Complexity of a Bacterial Transcriptome. *Journal of Bacteriology* **191**: 3203-3211.

Peters, J.M., (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**: 644-656.

Sato, K., M. Hamada, K. Asai & T. Mituyama, (2009) CENTROIDFOLD: a web server for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Research* **37**: W277-W280.

- Sawai, R., A. Suzuki, Y. Takano, P.C. Lee & S. Horinouchi, (2004) Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **334**: 53-61.
- Scheufler, C., A. Brinker, G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F.U. Hartl & I. Moarefi, (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**: 199-210.
- Schumacher, M.A., R.F. Pearson, T. Moller, P. Valentin-Hansen & R.G. Brennan, (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *Embo Journal* **21**: 3546-3556.
- Sekurova, O., H. Sletta, T.E. Ellingsen, S. Valla & S. Zotchev, (1999a) Molecular cloning and analysis of a pleiotropic regulatory gene locus from the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC11455. *FEMS Microbiology Letters* **177**: 297-304.
- Sekurova, O., H. Sletta, T.E. Ellingsen, S. Valla & S. Zotchev, (1999b) Molecular cloning and analysis of a pleiotropic regulatory gene locus from the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC11455. *Fems Microbiology Letters* **177**: 297-304.
- Stackebrandt, E., F.A. Rainey & N.L. WardRainey, (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 479-491.
- Sun, J.H., A. Hesketh & M. Bibb, (2001) Functional Analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* **183**: 3488-3498.
- Sun, X.G., I. Zhulin & R.M. Wartell, (2002) Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Research* **30**: 3662-3671.
- Takano, E., R. Chakraborty, T. Nihira, Y. Yamada & M.J. Bibb, (2001) A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* **41**: 1015-1028.
- Takano, E., H. Kinoshita, V. Mersinias, G. Bucca, G. Hotchkiss, T. Nihira, C.P. Smith, M. Bibb, W. Wohlleben & K. Chater, (2005) A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a

- pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* **56**: 465-479.
- Takano, E., T. Nihira, Y. Hara, J.J. Jones, C.J.L. Gershtater, Y. Yamada & M. Bibb, (2000) Purification and structural determination of SCB1, a gamma-butyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Biological Chemistry* **275**: 11010-11016.
- Takano, E., J. White, C.J. Thompson & M.J. Bibb, (1995) Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* **166**: 133-137.
- Takeshita, S., M. Sato, M. Toba, W. Masahashi & T. Hashimoto-gotoh, (1987) High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ*-complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* **61**: 63-74.
- Tanaka, A., Y. Takano, Y. Ohnishi & S. Horinouchi, (2007) AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: A model for transcriptional activation by SARPs. *Journal of Molecular Biology* **369**: 322-333.
- Tomono, A., M. Mashiko, T. Shimazu, H. Inoue, H. Nagasawa, M. Yoshida, Y. Ohnishi & S. Horinouchi, (2006) Self-activation of serine/threonine kinase AfsK on autophosphorylation at threonine-168. *Journal of Antibiotics* **59**: 117-123.
- Umeyama, T. & S. Horinouchi, (2001) Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK-binding protein. *Journal of Bacteriology* **183**: 5506-5512.
- Valentin-Hansen, P., M. Eriksen & C. Udesen, (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Molecular Microbiology* **51**: 1525-1533.
- Vanderpool, C.K., D. Balasubramanian & C.R. Lloyd, (2011) Dual-function RNA regulators in bacteria. *Biochimie* **93**: 1943-1949.
- Wang, G.J., Y. Tanaka & K. Ochi, (2010) The G243D mutation (*afsB* mutation) in the principal sigma factor sigma(HrdB) alters intracellular ppGpp level and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **156**: 2384-2392.

- Ward, J.M., G.R. Janssen, T. Kieser, M.J. Bibb & M.J. Buttner, (1986) Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Molecular & General Genetics* **203**: 468-478.
- Waters, L.S. & G. Storz, (2009) Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* **136**: 615-628.
- Wittig, I., H.P. Braun & H. Schagger, (2006) Blue native PAGE. *Nature Protocols* **1**: 418-428.
- Wright, P.E. & H.J. Dyson, (1999) Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of Molecular Biology* **293**: 321-331.
- Xu, J., Y. Tozawa, C. Lai, H. Hayashi & K. Ochi, (2002) A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Genetics and Genomics* **268**: 179-189.
- Xu, W.J., J.Q. Huang & S.N. Cohen, (2008) Autoregulation of AbsB (RNase III) expression in *Streptomyces coelicolor* by endoribonucleolytic cleavage of *absB* operon transcripts. *Journal of Bacteriology* **190**: 5526-5530.
- Yamazaki, H., Y. Takano, Y. Ohnishi & S. Horinouchi, (2003) amfR, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Molecular Microbiology* **50**: 1173-1187.
- Yeats, C., S. Bentley & A. Bateman, (2003) New knowledge from old: *In silico* discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiology* **3**: 3.
- Zalacain, M., A. Gonzalez, M.C. Guerrero, R.J. Mattaliano, F. Malpartida & A. Jimenez, (1986) Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygrosopicus*. *Nucleic Acids Research* **14**: 1565-1581.
- Zeytuni, N. & R. Zarivach, (2012) Structural and Functional Discussion of the Tetra-Trico-Peptide Repeat, a Protein Interaction Module. *Structure* **20**: 397-405.



Zhang, Z.G., K. Kulkarni, S.J. Hanrahan, A.J. Thompson & D. Barford, (2010) The APC/C subunit Cdc16/Cut9 is a contiguous tetratricopeptide repeat superhelix with a homo-dimer interface similar to Cdc27. *Embo Journal* **29**: 3733-3744.

## 謝辞

今年で醗酵学研究室の活動に参加して5年目となりました。修士論文を必死に書き上げたのが、つい先日の出来事に思えます。修士の間熱心に取り組んでいた研究テーマの変更や進路選択の苦難に「もうダメだ！がんばれない！」と思い詰めた局面が何度もありました。それを乗り越え、今の自分があることに感慨深い思いが湧いてきます。

大西康夫先生は、私にとって感謝してもし尽くせない存在であります。予想通りのデータが全く取れず落ち込むことが多々ありましたが、ゼミの進捗報告のたびに暖かいお言葉を頂いていたことが思い出されます。時には数時間にも及ぶ真剣なディスカッションにお付き合い頂き、仕事に情熱を注ぐプロ意識を教えていただいたように思います。また、私自身、醗酵学研究室に来る前の学部生の時に、資金的に厳しく思うように研究活動ができない経験をしたことがあります。研究資金を獲得し、研究室に集うポスドクや学生に最大限の研究環境を提供する苦労は並大抵ではないことと思います。思い浮かんだ実験を自由にやらせていただけたことに、とても充実感を感じておりました。

この5年間で出会った多くの方々のお顔が脳裏によぎるため、個々のお名前は申し上げません。ゼミの度に鋭いご指摘や有益なアドバイスをくださった、ポスドクや先輩方にも感謝しております。研究が全く前に進まず悩むことが度々ありましたが、ゼミの際に様々な角度からのアドバイスや励ましのお言葉を頂き、ここまで研究を続けてくることができました。ゼミで優秀な先輩方が議論する姿はいつも私の理想で、とても勉強になっておりました。

数々の研究室の雑務をこなしてくれた後輩の方々の存在にも、感謝の念を抱いております。彼らが、日々自分の時間を使い研究室の環境を整えてくださるおかげで、私を含め回りの人達が目の前の研究に集中できるのだと思っております。

故 堀之内末治先生から続く歴代の AfsK-AfsR-AfsS 制御系研究に携わってこられた先達の方々にも感謝致します。特に、長年続けられている AfsR のリン酸化に関するテーマは一癖も二癖もあり、懸命に取り組んだはずの研究が全く結実しなかった先輩が何人もいらっしゃることを理解しています。先人から蓄積されたデータを用い、あり得る可能性を選択し、博士論文としてまとめることができたと考えています。前任者の田中晶子さんには、リン酸化部位に関する研究の先鞭をつけて頂き、その後の AfsR リン酸化の研究が大きく前進したことに敬服しております。

最後に、己の限界を突破することを教えてくれた醗酵学研究室に感謝します。

2013 年 12 月 25 日