

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 23 年度博士課程 進学  
氏 名 辛 利 弥  
指導教員名 大西 康夫

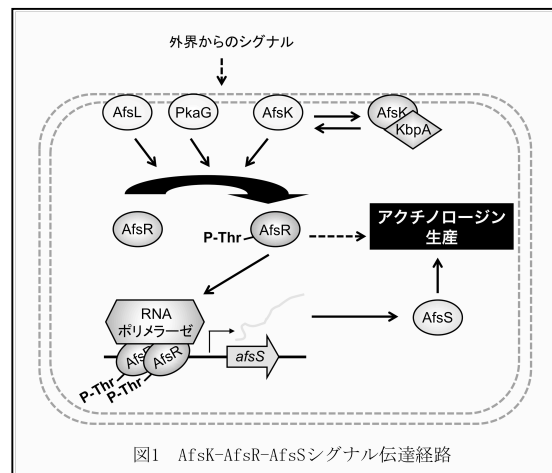
### 論文題目

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

#### 【背景】

放線菌 *Streptomyces* は二次代謝産物の生産能が極めて高く、その代謝産物は抗生物質や抗腫瘍剤などの医薬品に利用されてきた。*Streptomyces* の二次代謝制御についての研究は、*Streptomyces coelicolor* A3(2) の色素性抗生物質アクチノロージン (Act) をモデルとして研究が行われてきた。AfsK-AfsR-AfsS シグナル伝達経路は、主要な Act 生産制御機構である (図 1)。セリン/スレオニンキナーゼ AfsK は外界からのシグナルを受け、転写活性化因子 AfsR をリン酸化すると考えられている。リン酸化により活性型となった AfsR は機構未知な Act 生産活性化因子をコードする *afsS* のプロモーター領域に結合し、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ことが示唆されている。

本研究では、*afsS* 遺伝子座の新たな



機能を明らかにすると共に、AfsR のリン酸化による活性化機構の解析を行い、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していくことを目的とした。

#### 【*afsS* 遺伝子座の機能解析】

*afsS* 遺伝子座は *afsR* の下流に存在し、63 残基のタンパク質をコードする領域である。*afsS* 遺伝子座に存在する ORF は異種間で DNA 配列の相同性が全く無いため、*afsS* 様遺伝子と呼ぶ。一方、*afsS* 様遺伝子の 5' UTR (5' untranslated region) は DNA 配列が比較的高く保存されている。*afsS* 様遺伝子がコードするタンパク質は、①60~80 残基ほどの小さいタンパク質であること、②7 残基ほどの繰り返し配列を複数含むことが特徴である。AfsS は Asp や His を含む繰り返し配列を 3 カ所有しており、Asp と His を Ala 置換すると Act 生産活性化能を失う。通常の培養条件で色素生産を行わない *S. lividans* に、Ala 置換型 *afsS* を含む *afsS* 遺伝子座を高コピーベクターで導入したところ、Act 生産が見られることを発見した。そこで、*afsS* 遺伝子座が *S. lividans* に Act 生産を引き起こす原因の解明を行った。

#### 1. *S. lividans* に Act 生産を引き起こす *afsS* 遺伝子座の絞り込み

切り縮めを行った *afsS* 遺伝子座を高コピーベクターで *S. lividans* に導入したところ、*afsS* 上流の 5' UTR が Act 生産活性化を引き起こしていることが示された。さらに、切り縮めを行った 5' UTR の導入実験を行ったところ、強力なヘアピン構造をとると予測される領域が重要であることが示された。変異導入によりアピン構造を破壊した 5' UTR を導入しても *S. lividans* は Act 生産を行わなかったが、二重変異を導入しヘアピン構造を再生した 5' UTR では Act 生産を行った。この結果から、5' UTR のヘアピン構造が *S. lividans* における Act 生産誘導に重要であることが示された。

#### 2. 他の *Streptomyces* における *afsS* 遺伝子座の機能比較

二次構造予測を行ったところ、他菌の *afsS* 様遺伝子の 5' UTR にもヘアピン構造をとると予測される領域が存在していた。そこで、他菌の *afsS* 遺伝子座の機能についても解析を行った。*S. avermitilis* 由来の 5' UTR を高コピーベクターで *S. lividans* に導入したところ Act 生産を行ったが、*S. griseus* 由来の 5' UTR では Act 生産を行わなかった。一方、主要σ因子をコードする *hrdB* のプロモーターと 5' UTR により *afsS* を *S. lividans* に導入したところ、*afsS* の ORF 単独でも Act 生産を活性化した。同様に他菌の *afsS* 様遺伝子の ORF を導入したところ、*S. griseus* 由来の ORF は Act 生産を活性化したが、*S. avermitilis* 由来の ORF は Act 生産を活性化しなかった。*afsS*

遺伝子座の 5' UTR と ORF の機能に差異があることから、それぞれ独立した機構で Act 生産の誘導を生じると考えられる。本研究により、高コピーベクターで導入された *afsS* 遺伝子座が、一つの転写単位に non-coding RNA として機能する領域と ORF をコードする領域が存在する「二機能性 RNA」として機能することが示唆された。

#### 【リン酸化による AfsR 活性化の機能解析】

リン酸化による AfsR 活性化の分子機構は全く不明であったが、AfsR ホモログ間で保存性の高い 21 個の Thr 残基にアミノ酸置換を導入した実験により、T297 および T536 が被リン酸化部位であることが示唆されていた。そこで、これらの Thr 残基が被リン酸化部位であることを証明するとともに、リン酸化による AfsR 活性化機構の解明を目指した。

#### 1. リン酸化模倣変異型 AfsR の *in vivo* における機能解析

リン酸化 Thr の電荷を模倣する酸性アミノ酸置換の導入により恒常的に活性化されていると考えられるリン酸化模倣変異型 AfsR (T297D、T297E、T536D、および T536E) を用いて、T297 と T536 がリン酸化部位であるのか検証を行った。野生型 *afsR* およびリン酸化模倣変異型 *afsR* を *afsR* 破壊株に導入し、Ser/Thr キナーゼ阻害剤スタウロスポリンを添加した培地上で表現型を観察した。その結果、スタウロスポリンを添加した培地においては、野生型 *afsR* を導入した *afsR* 破壊株は Act 生産を行わなかったが、3 種のリン酸化模倣変異型 AfsR (T297D、T536D、T536E) 遺伝子を導入した株では Act 生産が引き起こされた。T297 と T536 のどちらかがリン酸化を模倣した状態になっていれば、Ser/Thr キナーゼ阻害剤の存在下であっても、AfsR は活性化型として機能したことから、T297 と T536 のリン酸化による AfsR 活性化が強く示唆された。

#### 2. リン酸化模倣変異型 AfsR の *in vitro* における機能解析

リン酸化模倣変異型 AfsR が Act 生産を活性化する機構を解明するため、*in vitro* における変異型 AfsR の機能解析を試みた。

大腸菌において過剰生産させたところ、野生型 AfsR、T297D および T297E 変異 AfsR は可溶性画分に検出されたが、T536D および T536E 変異 AfsR では不溶性画分に検出された。これらの結果は T536 のリン酸化によって AfsR の細胞内での性状が大きく変化する可能性を示唆している。大腸菌で可溶性画分に過剰生産することのできた野生型 AfsR、T297D および T297E 変異 AfsR を精製し、EMSA (electrophoresis mobility shift assay) に供した。その結果、野生型 AfsR と T297D および T297E 変異 AfsR の DNA 結合能に差は見られなかった。

T536DおよびT536E変異AfsRは大腸菌の可溶性画分に発現させることができなかつたため、AfsRのC末端側に存在するTPR(tetratricopeptide repeat)ドメインを欠失した野生型AfsR(WTΔTPR)および2種のリン酸化模倣変異型AfsR(T536DΔTPRおよびT536EΔTPR)を作製した。大腸菌にて過剰生産を行ったところ、WTΔTPR、T536DΔTPRおよびT536EΔTPRを可溶性画分に発現させることができた。精製を行ったWTΔTPR、T536DΔTPRおよびT536EΔTPRをEMSAに供したところ、T536DΔTPRおよびT536EΔTPRではWTΔTPRよりも強いシフトバンドが観察された。この結果は、T536がリン酸化されることでAfsRは活性型となり、DNA結合能が上昇することを示唆している。

### 3. TPRドメインを欠失したリン酸化模倣変異型AfsRのin vivoにおける機能解析

TPRドメインを欠失したAfsR遺伝子(野生型およびリン酸化模倣変異型)を $afsR$ 破壊株に導入し、その表現型を観察したところ、WTΔTPR株ではAct生産活性化能が低下したが、T536DΔTPR株およびT536EΔTPR株ではAct生産活性化能が上昇した。AfsRはTPRドメインの欠失によりリン酸化される効率が低下するが、T536DΔTPRおよびT536EΔTPRではリン酸化模倣により恒常的に活性型となっているため、Act生産活性化能が上昇したのと考えられる。ウェスタンブロット解析を行ったところ、WTΔTPRが検出される生育時期(培養48時間)においてT536DΔTPR株およびT536EΔTPR株ではAfsRは検出されなかった。この時、RT-PCR解析を行ったところ、WTΔTPR株では微弱な $afsS$ の転写しか見られなかったが、T536DΔTPR株およびT536EΔTPR株では強い $afsS$ の転写が検出された。これらの結果は、リン酸化により活性型となったAfsRは、 $afsS$ の転写を活性化する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。

#### 【総括・展望】

本研究では、AfsK-AfsR-AfsSシグナル伝達経路を構成する $afsS$ 遺伝子座において、 $afsS$ 様遺伝子の5'UTRにnon-coding RNAとしての新たな機能があることを示すことができた。5'UTRがAct生産を活性化する機構については不明であるが、トランスクリプトーム解析などの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につながると考えている。

T536のリン酸化によりAfsRのDNA結合能が上昇することが示唆された。その分子機構については、多量体形成の促進やコンホメーション変化によるDNAとの親和性上昇が考えられる。また、T297およびT536のリン酸化では、AfsRの活性変化に差異があることを示したが、T297のリン酸化による活性化を否定したわけではない。さらなる解析が必要であるが、リン酸化によるAfsRの活性化に関する重要な知見が得られた。