

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 辛 利弥

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いる。本論文は、主要な Act 生産制御機構である AfsK-AfsR-AfsS シグナル伝達経路の分子機構解明を目的としている。外界からの刺激を受けたセリン/スレオニンキナーゼ AfsK は転写活性化因子 AfsR をリン酸化し、活性型となった AfsR は Act 生産活性化因子 AfsS の転写を活性化することがこれまでの研究により示唆されていた。

本論文は、序論全 4 章、本論 2 章、総括から構成されるが、序論では本研究の背景と目的が述べてられている。

本論第 1 章では、*afsS* 遺伝子座を高発現条件下で異種放線菌 *Streptomyces lividans* に導入した際の機能解析を行っている。通常の培養条件下で Act 生産を行わない *S. lividans* に、繰り返し配列を Ala 置換により破壊した変異型 *afsS* 遺伝子を導入することで Act 生産が誘導されることが発見された。この発見を発端として、*S. lividans* に Act 生産を引き起こす *afsS* 遺伝子座の機能解析が行われた。

切り縮めを行った *afsS* 遺伝子 (制御領域を含む) を *S. lividans* に導入したところ、5' 非翻訳領域 (5' UTR) の転写により Act 生産が誘導されることが明らかになった。切り縮めを行った 5' UTR を *S. lividans* に導入したところ、Act 生産を誘導した切り縮めパターンには強力なヘアピン構造が予測される領域が含まれていた。さらに、変異導入によりヘアピン構造が破壊された 5' UTR を *S. lividans* に導入しても Act 生産は見られなかったが、二重変異によりヘアピン構造を再生した 5' UTR を導入すると Act 生産が誘導された。以上のことから、*afsS* 遺伝子座に含まれる 5' UTR のヘアピン構造が *S. lividans* の Act 生産誘導に重要であることが明らかにされた。

異種 *Streptomyces* 間での *afsS* 遺伝子座の機能比較も行われた。*S. coelicolor* A3(2) と *S. avermitilis* 由来の 5' UTR を *S. lividans* に導入したところ Act 生産を誘導したが、*S. griseus* 由来の 5' UTR は Act 生産を誘導しなかった。一方、*S. coelicolor* A3(2) と *S. griseus* 由来の *afsS* 様遺伝子を *S. lividans* に導入したところ Act 生産を誘導したが、*S. avermitilis* 由来の *afsS* 様遺伝子は Act 生産を誘導しなかった。以上のことから、*Streptomyces* 間で *afsS* 遺伝子座に存在する 5' UTR と *afsS* 様遺伝子で機能に差異が見られることが明らかにされた。

本論第 2 章では、リン酸化模倣変異型 AfsR の機能解析により、リン酸化による AfsR 活

性化の機構解明が行われた。所属研究室における先行研究より、T297 と T536 をリン酸化模倣状態にした変異型 AfsR (T297D、T297E、T536D、T536E) が取得されていた。セリン/スレオニンキナーゼ阻害剤スタウロスポリンを用いて、T297 と T536 が真のリン酸化部位であるのか検証が行われた。その結果、T297D、T536D、T536E を導入した *afsR* 破壊株はスタウロスポリン存在下でも Act 生産が見られ、これらの変異型 AfsR はリン酸化が生じない条件でも恒常的に活性化されていることが明らかになった。このことから、T297 と T536 がリン酸化部位として強く示唆された。さらに、*afsR* 破壊株に導入された T297D、T536D、T536E は役割を終えると速やかに分解されることが明らかにされ、T297 と T536 が AfsR の性質変化に重要な残基であることが示された。

大腸菌の可溶性画分に過剰生産できた野生型 AfsR (WT)、T297D、T297E を精製し、EMSA に供したところ、DNA 結合能に差は見られなかった。このことから、T297 のリン酸化による活性化機構は DNA 結合能の上昇ではないことが示唆された。

大腸菌の可溶性画分に過剰生産できなかった T536D および T536E について、TPR ドメインの欠失による安定化が行われた。大腸菌の可溶性画分に過剰生産できた野生型 AfsR Δ TPR (WT Δ TPR)、T536D Δ TPR、T536E Δ TPR を精製し、EMSA に供したところ、T536D Δ TPR および T536E Δ TPR は WT Δ TPR よりも強い DNA 結合能を示した。このことから、T536 のリン酸化による活性化機構は DNA 結合能の上昇であることが示唆された。さらに、*afsR* 破壊株に WT Δ TPR、T536D Δ TPR、T536E Δ TPR を導入したところ、TPR ドメインの欠失のため WT Δ TPR 導入株では Act 生産が減少したが、T536D Δ TPR および T536E Δ TPR 導入株では Act 生産が行われた。このことから、T536 が AfsR の性質変化に重要な残基であることが強く示された。

総括において、本研究の結果を総括するとともに、今後の展望について述べている。

以上、本論文はモデル放線菌 *S. coelicolor* A3(2) の Act 生産制御機構である AfsK-AfsR-AfsS シグナル伝達経路に新たな知見をもたらすものであり、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。