The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cloning, sequencing and characterization of nusG gene from Streptomyces coelicolor A3 (2)
Author(s)	Chunya, Puttikhunt
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39157
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【7】

氏　　名	Chunya（チャンヤ） Puttikhunt（プッティカン）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学 位 記 番 号	第　11853　号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科醗酵工学専攻
学 位 論 文 名	Cloning, sequencing and characterization of *nusG* gene from *Streptomyces coelicolor* A 3(2) （*Streptomyces coelicolor* A 3(2)由来 *nusG* 遺伝子のクローニング、塩基配列決定及び性質決定）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 山田 靖宙 教 授 大嶋 泰治　教 授 菅 健一　教 授 吉田 敏臣 教 授 今中 忠行　教 授 卜部 格　教 授 塩谷 捨明

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は，大腸菌における転写制御因子として重要な働きをするタンパク質NusGに相当する放線菌の *nusG* 遺伝子の構造，性質に関する研究成果を記述したものであり，緒論と結論を含む6章からなっている。

第1章では，放線菌の形態分化と二次代謝調節に関して，現在までの報告をまとめ，これらに関する遺伝子群についての既知の知見を紹介し，代表的放線菌として *Streptomyces coelicolor* A 3(2)のこの分野における重要性について述べている。

第2章では，放線菌 *Streptomyces virginiae* より初めて得た *nusG* 遺伝子に相当する遺伝子 *VbrA* をプローブとするSouthern解析により，73種の放線菌中75%にあたる55種が *NusG* 類縁遺伝子を持ち，その放線菌における広い分布を明らかにしている。同様に *rplK* 遺伝子をプローブとしてSouthern解析を行い，*nusG* と *rplK* が大腸菌と同様に隣接していることを示している。

第3章では，放線菌での *nusG* 遺伝子の重要性を明らかにするため，最も遺伝学的研究が進んでいる *Streptomyces coelicolor* A 3(2)より *nusG* 遺伝子のクローニングを試み，1.7kbのＰＣＲ産物及び5kbの *Bam* HI断片としてクローニングに成功している。この中に含まれる3kbの *Sma* I断片の塩基配列決定の結果，3つの完全なオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）と2つの部分ＯＲＦを見いだしている。3つの完全ＯＲＦは，大腸菌の *secE, nusG, rplK* と高い相同性を示し，のこりの2つの5’側と3’側の部分ＯＲＦはそれぞれ好熱性バチルスのアスパラギン酸アミノ基転移酵素と *rplA* に高い相同性を示すことを指摘している。また，*secE*−*nusG*−*rplK, A* という遺伝子配列は大腸菌のそれと一致することを明らかにしている。

第4章では，*nusG* mRNAの経時変化測定の結果，*nusG* の転写は培養初期より開始され，定常期には減少することを明らかにしている。一方，リボゾームタンパク質L11をコードする *rplK* では常に一定の転写が起こることを指摘している。さらにプロモーター検索法及びプライマー伸長法による5’転写開始点の決定により，*secE, nusG*及び *rplK* 遺伝子は各々自身のプロモーターを持つことを示している。

第5章では，*S. coelicolor* 染色体上の *nusG* 遺伝子を相同組み換え法で破壊し，*nusG* は本菌生育に必須の遺伝子であることを明らかにしている。また，組み換え型NusGタンパク質を大腸菌内で大量発現し，精製後，抗体が特異的に反応することを確認した後，Western blot法により *S. coelicolor* A 3(2)の無細胞抽出液を解析して本菌体内にNusGタンパク質が生産されていることを確認している。同時に，native NusG及び組み換え型NusGタンパク質は，

非変性条件下4量体として存在することを明らかにしている。

第6章では，本論文で得られた成果を要約している。

論文審査の結果の要旨

*Streptomyces*属放線菌は抗生物質その他の有用二次代謝物質を数多く生産する醗酵工業上重要な微生物である。また，原核生物でありながら基底菌糸，気菌糸及び胞子形成という形態分化を行う基礎生物学的見地から見ても興味ある生物である。本論文は放線菌におけるこの様な生理的，形態的分化に関わると考えられる*nusG*遺伝子の分布，構造，性質に関する研究をまとめたものであり，その成果を要約すると次の通りである。

(1) *nusG*遺伝子の放線菌73種における分布を調べ，75%にあたる55種が*nusG*類縁遺伝子を持ち，その分布が広いことを明らかにした。また，*nusG*−*rplK*という大腸菌の*nusG*遺伝子周辺構造と類似した構造が放線菌にも広く存在し，*nusG*が大腸菌の場合と同様，転写・翻訳に関わる遺伝子である可能性を指摘している。

(2) 放線菌における*nusG*遺伝子の重要性を明らかにするため，最も遺伝的研究が進んでいる*Streptomyces coelicolor* A 3(2)を選択し，この菌株の*nusG*遺伝子をクローニング，その塩基配列を決定している。さらに，この遺伝子の周辺構造として大腸菌と同様に，*secE*−*nusG*−*rplK*−*rplA*の遺伝子配列があることを明らかにしている。また，*secE*の上流に好熱性バチルス由来のアスパラギン酸アミノ基転移酵素類似のＯＲＦがあることを見いだしている。

(3) *nusG* mRNAの経時変化を測定し，*nusG*遺伝子の転写は培養初期より開始され，定常期には減少することを見いだしている。また，その下流のリボソームタンパク質L11をコードする*rplK*は常に転写されていることを明らかにしている。さらに，*secE*−*nusG*−*rplK*は各々自身のプロモーターを持つことを示している。

(4) *S. coelicolor* A 3(2)におけるNusGの役割を明らかにするため，*nusG*遺伝子の破壊実験を行い，この遺伝子が本菌の生育に必須であることを見いだした。また，組み換え型NusGタンパク質を大腸菌で大量発現し，精製後，その抗体との反応を確認して，Western blot法により*S. coelicolor* A 3(2)菌体中にNusGタンパク質が生産されていることを確認している。さらに，NusGタンパク質は4量体で存在することを示唆している。

以上のように本論文は放線菌の転写にかかわる重要な*nusG*遺伝子の構造，性質を明らかにしたものであり，放線菌の基礎生理学及び二次代謝物質生産に役立つ多くの知見を得ている。これらの成果は微生物学，応用生物工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。