



| | |
|--------------|--|
| Title | Functional analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (FarA) involved in the secondary metabolism of <i>Streptomyces lavendulae</i> FRI- 5 |
| Author(s) | 木谷, 茂 |
| Citation | 大阪大学, 2001, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.11501/3184320 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|--|
| 氏名 | 木谷 茂 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(工学) |
| 学位記番号 | 第16192号 |
| 学位授与年月日 | 平成13年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻 |
| 学位論文名 | Functional analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (FarA) involved in the secondary metabolism of <i>Streptomyces lavendulae</i> FRI-5 (放線菌 <i>Streptomyces lavendulae</i> FRI-5 の二次代謝生産制御機構におけるオートレギュレータリセプターの機能解析) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 原島 俊 |
| | (副査) 教授 室岡 義勝 教授 小林 昭雄 教授 吉田 敏臣 教授 二井 将光 教授 萩 関助 教授 仁平 教授 ト部 格 教授 健一 教授 達治 教授 卓也 教授 福井 希一 教授 塩谷 捨明 教授 金谷 茂則 |

論文内容の要旨

本論文は、放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5において二次代謝生産制御を司っているブタノライド型オートレギュレーターとそのリセプターについて、in vitro 及び in vivo の両面から解析を進めることにより、これらの機能を解明し、放線菌におけるオートレギュレータリセプターの普遍性について論じたものであり、全体を 5 章で構成している。

第1章は、緒論であり、放線菌における二大特徴、つまり有用生理活性物質生産と形態分化についてその制御因子を中心に論じており、またこれら制御因子の一つであるブタノライド型オートレギュレーターとそのリセプターの役割に関して様々な放線菌における現在の研究状況を述べている。

第2章では、*S. lavendulae* FRI-5におけるオートレギュレータリセプター (FarA) の機能を in vitro において解析を行っている。その結果、FarA の DNA 結合能はそのリガンドであるオートレギュレーターにより調節され、自身の転写を制御していることを明らかにしている。また、この転写の調節方法は他の放線菌と類似していることも明らかにしている。

第3章では、in vivo における遺伝子の機能解析には、遺伝子破壊株の作製・解析が必要であり、そのためには菌株に対する遺伝子導入方法が必須であることを踏まえ、*S. lavendulae* FRI-5において大腸菌を用いた接合伝達法を検討・確立している。また、この検討により染色体 DNA 上の特異的な部位への外来 DNA 導入は、代表的な表現型に対し全く影響を及ぼさないことを示している。

第4章では、確立した大腸菌を用いた接合伝達法を利用して FarA の破壊株を作製・解析し、二次代謝産物生産制御における FarA の役割について in vivo において検討している。その結果、FarA は核酸系抗生物質の生産に対しては抑制的に機能している一方、オートレギュレーターの生産に対しては促進的に機能していることを破壊株の解析により示している。また、抗結核剤 D-cycloserine の生産に対しては、リガンド未結合状態の FarAのみが機能するのではなく、そのリガンドと共に転写因子として機能している可能性を新規の機能として明らかにしている。

第5章は結論であり、本研究で得られた諸結果を総括している。また、この総括により放線菌オートレギュレーターとそのリセプターの機能の普遍性について述べている。

論文審査の結果の要旨

土壌微生物である放線菌は、基礎生物学的に重要な「胞子形成等の形態分化」並びに実用面または応用面において重要な「抗生物質生産等の二次代謝」という二つの重大な特徴を有している。この二つの形質を制御する因子として放線菌オートレギュレーターが見出され、それに関する研究が行われているが、オートレギュレーターとその信号伝達系路に着目した研究はまだ黎明期にあり知見が極めて限られているのが現状である。本論文では、複雑な二次代謝生産制御機構を有する放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 のオートレギュレーターとそのリセプター (FarA) に着目し、in vitro と in vivo 両面からの解析を通じて、信号伝達経路最上部に位置する FarA の機能についてまとめたものである。得られた知見を要約すると以下の通りである。

- (1) FarA の DNA 結合能を in vitro で検討した結果、FarA は自身の遺伝子上流領域に対し特異的な結合能を示し、またその結合能はオートレギュレーターにより調節されていることを見出している。決定された FarA 結合 DNA 配列は、他菌株で発見されている他のリセプター結合配列と有為な相同意を示し、オートレギュレーター リセプターが結合する配列が部分的パリンドローム構造を持つことを示している。
- (2) 大腸菌を用いた接合伝達法を開発する上で、様々な条件、すなわち培地成分の種類、胞子に対する熱処理の有無、処理温度等を考慮した結果、*S. lavendulae* FRI-5 における唯一の形質転換法として接合伝達法を確立することに成功している。また、この接合伝達法に際して染色体 DNA 上の部位特異的な外来 DNA 導入は、*S. lavendulae* FRI-5 の表現型に変化をもたらさないことを確認し、*S. lavendulae* FRI-5 の遺伝子破壊実験及び、その相補実験が可能であることを明らかにしている。
- (3) 確立した接合伝達法により *S. lavendulae* FRI-5 の二次代謝産物生産制御機構の解明において最も重要である FarA 破壊株の作製に成功している。その破壊株の解析から、FarA はオートレギュレーター感受性に必須で、また二次代謝生産に正負両方向の制御を行っていることを明らかにしている。この解析から明らかにされた FarA の機能は、既存の放線菌オートレギュレーター リセプターの機能と一部類似するものの、オートレギュレーター リセプターとの複合体が正負両方向の制御因子としての役割をもつという全く新しい知見を得ている。

以上のように、本論文は放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 におけるオートレギュレーター リセプターの機能を明らかにすべく必要な手法を開発後、in vitro または in vivo において実験的に検証している。本研究で得られた成果は、実用工業放線菌株をも含めたオートレギュレーターまたはそのリセプターの研究に大きな進展を与え、抗生物質等の生産性向上または新規産物の発見などに多くの知見を与えるものと期待される。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。