

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 学 術 ）	氏名	Yosi Nindita
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目 Structural and evolutionary analysis of <i>Streptomyces</i> linear replicons (放線菌線状レプリコンの構造および進化に関する解析)			
論文審査担当者			
主 査	准 教 授	荒 川 賢 治	印
審査委員	教 授	山 田 隆	印
審査委員	教 授	田 中 伸 和	印
審査委員	教 授	秋 庸 裕	印
審査委員	名誉教授	木 梨 陽 康	印
〔論文審査の要旨〕 放線菌は抗生物質をはじめ多くの二次代謝産物を生産し、それらは医薬・農薬・研究試薬などとして人間生活に役立っている。本論文では放線菌の特徴である線状レプリコンについて、 <i>Streptomyces rochei</i> と <i>Streptomyces coelicolor</i> を材料として研究を遂行した。 第一章として研究背景、第二章には実験手法について記している。 第三章では3つの線状プラスミド pSLA2-L (210,614 bp), -M (113,463 bp), -S (17,526 bp) を有する放線菌 <i>S. rochei</i> 7434AN4 株の線状染色体構造に着目し、その線状構造がプラスミド pSLA2-L もしくは pSLA2-M によって保たれていることを明らかにしたこと、さらにはその責任遺伝子について特定した成果について述べている。7434AN4 株について pSLA2-L の 0.4 kb 右末端プローブを用いてサザン解析をしたところ、染色体末端を含む 5 kb BamHI 断片が検出出来た。しかし、線状プラスミドをもたない変異株 2-39 株を同様に解析したところ、染色体末端が検出できず、染色体の環状化が示唆された。そこで次世代シーケンサーを用いて野生株 7434AN4 株とプラスミド欠失株 2-39 株との塩基配列比較を行ったところ、2-39 株において染色体両側を包含するジャンクション領域が見つかり、環状化を確認できた。本知見がプラスミドの欠失によるものか明らかにするため、プロトプラスト変異法を用いて新たなプラスミド欠失株を取得した。得られた2株について同様にサザン解析したところ、予想通り 2-39 株と同様に染色体末端を検出できなかった。そこで pSLA2-L, -M に存在する末端複製関連遺伝子オペロン <i>tpg-tap</i> に着目した。これらは pSLA2-S および線状染色体に見いだせず、両プラスミドの <i>tpg-tap</i> が線状染色体の線状構造維持に関わっていると考え、以下の一連の実験を行った；①51252 株(pSLA2-L をもつ)への pSLA2-M 由来 <i>tpg-tap</i> 遺伝子(プラスミド pYN15)の導入、②pSLA2-L の除去、③ pYN15 の除去。その結果、③の段階にて pYN15 が失われると染色体末端の欠失化が生じ			

ることが分かった。以上により、*tpg tap* が *S. rochei* 7434AN4 株染色体の線状構造維持に必須であることを明らかに出来た。染色体両末端 3.1 kb 領域が pSLA2-L, -M の右末端とほぼ同一の塩基配列であることは、両者がお互いに組み換えを起こしながら生成したことを示唆した。

第四章では、放線菌のモデル菌株として知られている *S. coelicolor* A3(2) で初めて発見された染色体環状化について解析している。放線菌の線状染色体は不安定で容易に末端欠失を起こし、それにもなあってアーム置換、環状化など様々な構造変化を起こすが、*S. coelicolor* A3(2) についてはこれまで報告されていなかった。本株に熱変性を施したところ、変異株 No.4 株において青色色素 actinorhodin の生産が失われ、その原因が *eshA* 遺伝子の欠失にあることを見いだした。*eshA* 遺伝子は染色体右末端から 130 kb の位置にコードされており、欠失の原因の一つとして染色体末端の環状化が考えられた。そこで本株の構造解析をパルスフィールドゲル電気泳動(CHEF)により行ったところ、両末端の *AseI* 断片が消失して新たなバンドが検出できた。さらに欠失領域の特定のため、コスミドをプローブとしたサザン解析を行ったところ、親株と No.4 株間に差異が認められた。そこで No.4 株における両末端の融合領域を絞り込み、該当領域のシーケンス解析を行ったところ、非相同的末端結合による環状化が強く示唆された。本変異により、右端から 851 kb, 左端から 237 kb 欠失していることが明らかとなった。

第五章で本論文の総括を行なっている。

本研究により、放線菌におけるダイナミックなゲノム構造変化が明らかとなった。これらの結果は、放線菌の線状レプリコンの構造、機能および進化に関する研究の発展に大いに貢献すると思われる。

このような研究成果から、本論文の著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判断する。