

## 論文審査の結果の要旨

リン酸化プロテオームによる放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の  
セリン/スレオニンキナーゼ PkaE の機能解析

Phosphoproteomic Analysis of Serine/Threonine Protein Kinase PkaE  
of *Streptomyces coelicolor* A3(2)

論文提出者 平方 利幸 (Hirakata, Toshiyuki)

放線菌 *Streptomyces* は、抗生物質などの多種多様な二次代謝物質を生産する重要な微生物であり、かつ、原核生物であるにも関わらず真核生物型セリン/スレオニンキナーゼを持つ二次代謝研究及び形態分化研究のモデル生物である。*Streptomyces coelicolor* A3(2)のセリン/スレオニンキナーゼは 34 種類存在することが知られているが、その全体像は解明していない。そこで申請者は *S. coelicolor* A3(2)のセリン/スレオニンキナーゼの一つである PkaE を対象にして、リン酸化シグナルネットワークの解明、及び PkaE による二次代謝、形態分化制御機構を解明するために本研究を行った。

まず申請者は、PkaE の二次代謝産物制御に関する機能を確認するため、*S. coelicolor* A3(2)野生株及び *pkaE* 破壊株の色素性抗生物質アクチノロージン生産量を比較した。その結果、GYM 寒天培地下において、*pkaE* 破壊株では統計的に有意にアクチノロージン生産量低下が見られた。一方 YMPG 寒天培地下では、*pkaE* 破壊株においてアクチノロージン生産量の増加が見られた。これら

のことから、PkaE がアクチノロージン産生制御に関与し、培地組成等の外部環境によってその制御機能が変化することが示唆された。更に、PkaE による形態分化への関与を確認するため電子顕微鏡解析を行ったところ、*pkaE* 破壊株の孢子（96 時間培養時点）において細胞膜の異常が観察されたことから、PkaE が孢子形成における形態分化調節にも関与していることが確認された。

次に申請者は、PkaE の二次代謝及び形態分化に対する影響をプロテオームレベルで明らかにするために、LC-MS/MS による比較プロテオーム解析を行った。*S. coelicolor* A3(2)野生株及び *pkaE* 破壊株を GYM 固形培地で 60 時間培養した菌体を用い、抽出したタンパクをトリプシン消化したものをサンプルとして使用した (n=3)。両株間で計量できたタンパク質を比較し、two-tailed Student's t-test で  $p < 0.05$  であるタンパク質を抽出した結果、362 種類の有意に群間差があるタンパク質が抽出された。抽出された 362 種類のタンパクを用いパスイエイ解析を行い、PkaE がアクチノロージン生合成経路に関与する 6 種類の酵素を特定した。また、*pkaE* 破壊株においてダウンレギュレーションしていた 87 種類のタンパク質を用いて Gene Ontology 解析を行ったところ、「cell membrane components」や「antibiotic biosynthetic process」がタンパク質群の特徴として特定でき、PkaE の細胞膜形成や抗生物質生合成への関与がプロテオームの観点からも明らかとなった。

更に、PkaE が関与するリン酸化シグナル伝達ネットワークタンパクを特定するため、LC-MS/MS による比較リン酸化プロテオーム解析を行った。申請者は、網羅的にリン酸化ペプチドを検出するため、種々の事前検討の結果、TiO<sub>2</sub> 処理を 2 回行うリン酸化ペプチド濃縮法を確立し、*S. coelicolor* A3(2)におけるリン酸化ペプチド精製条件の最適化を行った。*S. coelicolor* A3(2)野生株及び *pkaE* 破壊株を GYM 固形培地で 28 °C、60 時間培養したものをサンプルとして使用し (n=3)、得られた LC-MS/MS データを解析した結果、101 種

類のリン酸化ペプチド、52種類のリン酸化タンパク質が特定された。このうち、*pkaE*破壊株においてリン酸化が抑制されたタンパク質 ( $p < 0.05$ かつ Fold change が 0.66 以下) は6種類であり、この中にはアクチノロージン産生、胞子形成に関与することが知られている BldG、FtsZ も含まれていた。最後に、PkaE の直接的基質を確認するため、*in vitro* phosphorylation assay を行ったところ、PkaE が FtsZ を直接的にリン酸化することを確認した。

本研究では、放線菌の代表的菌株である *S. coelicolor* A3(2)の真核生物型セリン/スレオニンキナーゼ PkaE が胞子細胞膜形成と色素性抗生物質アクチノロージン産生に関わる重要な因子であることを明らかにした。また微生物に広く保存されている FtsZ の制御因子として PkaE が直接関与していることも見出した。本知見は、他の放線菌のセリン/スレオニンキナーゼ研究に影響を与えると考えられる。以上、申請者の研究は、博士(薬科学)の学位を授与するのに相応と判断する。

令和2年8月27日

主査 明治薬科大学 教授

杉田 隆 印

副査 明治薬科大学 教授

長浜 正巳 印

副査 明治薬科大学 教授

森田 雄二 印