

# 目次

<序論> .....	5
A. 放線菌ならびに <i>Streptomyces</i> 属の特徴 .....	5
A.1 放線菌の特徴（基礎生物学的／応用的研究の観点から） .....	5
A.2 放線菌の形態分化およびそのこれまでの研究 .....	6
A.3 放線菌の特徴（生態学・代謝研究の観点から） .....	8
B. カタボライト抑制 .....	9
B.1 カタボライト抑制の定義 .....	9
B.2 カタボライト抑制研究の起こり .....	9
B.3 これまでに明らかになっているカタボライト抑制機構の例 .....	10
B.3.1 PTS の概要 .....	10
B.3.2 PTS によるグルコース抑制 .....	12
C. 放線菌のカタボライト抑制に関するこれまでの知見 .....	13
D. 本研究の目的および本論文の構成 .....	16
<本論> .....	24
使用菌株、ベクター、および培地組成 .....	24
使用菌株 .....	24
ベクター .....	25
培地組成 .....	28
第 1 章 <i>S. griseus</i> における銅排出系遺伝子の解析 .....	31
1.1 背景 .....	31
1.1.1 銅シャペロンおよび銅輸送型 P 型 ATPase について .....	31
1.1.2 原核微生物における銅シャペロンおよび銅輸送型 P 型 ATPase の転写制御因子 ..	32
1.1.3 <i>Streptomyces</i> 属に対する銅の影響 .....	33
1.1.4 本研究に至った経緯 .....	34
1.2 材料と方法 .....	37

1.2.1	pAS2 のサブクローニング.....	37
1.2.2	低解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングによる転写量解析.....	38
1.2.3	高解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングによる転写開始点の決定.....	40
1.2.4	各種遺伝子破壊株の作製.....	40
1.2.5	遺伝子破壊株の銅感受性測定.....	43
1.2.6	CsoR 生産.....	43
1.2.7	電気泳動移動度遅延アッセイ.....	44
1.3	結果.....	46
1.3.1	形態分化の促進には <i>copA1</i> のみの導入で充分である.....	46
1.3.2	<i>copA1</i> パラログ <i>copA2</i> も培地中への銅イオン添加によってその転写が誘導される .....	46
1.3.3	<i>copZ</i> , <i>copA1</i> , <i>copA2</i> は <i>S. griseus</i> において過剰な銅イオンに対する耐性を付与する .....	46
1.3.4	<i>csoR</i> オルソログ破壊株において <i>copZ-copA1</i> と <i>copA2</i> は恒常的に転写される.....	47
1.3.5	銅イオンの添加により <i>csoR</i> の転写も促進される.....	48
1.3.6	<i>copZ-copA1</i> , <i>copA2</i> , <i>csoR</i> の転写開始点決定.....	48
1.3.7	大腸菌異種発現系を用いた CsoR 生産と電気泳動移動度遅延アッセイによる CsoR の DNA 結合能の観察.....	49
1.4	考察.....	51
1.5	図表.....	54
第 2 章	<i>S. griseus</i> におけるセロオリゴ糖利用系遺伝子の解析.....	63
2.1	背景.....	63
2.2	材料と方法.....	66
2.2.1	UV 照射による <i>S. griseus</i> のランダム変異株胞子の取得（著者修士論文の再掲）	66
2.2.2	$\beta$ -ガラクトシダーゼに対してグルコース抑制の解除された変異株のスクリーニン グ（著者修士論文の再掲）.....	66

2.2.3	ペプチドグリカン分解能アッセイ .....	66
2.2.4	低コピープラスミド pIJ922 を用いた <i>S. griseus</i> 野生株 DNA ライブラリの調製 ....	66
2.2.5	GRD1 株変異点の探索 .....	66
2.2.6	取得 DNA 断片の解析 .....	67
2.2.7	GRD1 株にグルコース抑制解除を生じさせた変異点である <i>cebR</i> ( <i>SGR4739</i> ) の破壊株ならびに相補株の構築 .....	67
2.2.8	逆転写反応を用いたオペロン性の解析 .....	68
2.2.9	異種生産 CebR の精製 .....	69
2.2.10	ゲル濾過による CebR 分子量測定 .....	70
2.2.11	低解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングによる転写量解析 .....	70
2.2.12	高解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングによる転写開始点の決定 .....	71
2.2.13	定量的 RT-PCR による転写量測定 .....	71
2.2.14	電気泳動移動度遅延アッセイ .....	73
2.3	結果 .....	75
2.3.1	GRD 変異株群の単離 .....	75
2.3.2	ショットガンクローニング法による GRD1 変異点の決定 .....	76
2.3.3	<i>cebR</i> 破壊株の作製とその表現型 .....	77
2.3.4	<i>ceb</i> 領域遺伝子群のオペロン性の解析 .....	77
2.3.5	CebR の性質 .....	77
2.3.6	CebR-H の CebR-box 配列に対する結合性試験 .....	78
2.3.7	CebR-box をそのプロモーター領域に持つ遺伝子に対し CebR が与える影響 .....	78
2.3.8	<i>cebE</i> と <i>cebR</i> の転写解析 .....	79
2.3.9	CebR と DNA の結合に対し各種糖が与える影響 .....	80
2.3.10	<i>cebR</i> 破壊株は生育糖源特異的に形態分化不全となる .....	81
2.4	考察 .....	82
2.4.1	<i>S. griseus</i> における CebR の機能 .....	82

2.4.2	<i>S. griseus</i> において CebR が形態分化に影響を与えるのはなぜか .....	84
2.4.3	まとめ .....	87
2.5	図表.....	88
第 3 章	<i>S. griseus</i> のグルコースカタボライト抑制において Glk が果たす役割の解析.....	101
3.1	背景.....	101
3.1.1	Glk 立体構造について .....	101
3.1.2	他の構造既知蛋白と Glk との比較 .....	102
3.1.3	本研究の概略.....	105
3.2	材料と方法 .....	108
3.2.1	<i>glk</i> 破壊株の構築 .....	108
3.2.2	各種 <i>glk</i> を安定的に発現する <i>S. griseus</i> 株の作製.....	108
3.3	結果.....	114
3.3.1	<i>glk</i> 破壊株はグルコースを唯一の炭素源とする無機塩培地で生育しなかった .....	114
3.3.2	<i>Rhglk</i> の導入により見かけ上グルコース資化能は回復しグルコース抑制能は回復しなかった .....	114
3.3.3	<i>Sg-Rh</i> キメラ <i>glk</i> 発現株は中程度のグルコースカタボライト抑制を呈した.....	114
3.3.4	ATP 非結合型変異 <i>Sgglk</i> 発現株グルコースカタボライト抑制能を失ってしまった .....	115
3.3.5	ある種の糖源の添加は $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するグルコースカタボライト抑制に補助的に作用する .....	116
3.4	考察.....	118
3.5	図表.....	120
<総括>	.....	130
<参考文献>	.....	132
<謝辞>	.....	139



## <序論>

本研究の題目は「放線菌のグルコースカタボライト抑制機構に関する研究」である。ここで述べる通り、放線菌におけるカタボライト抑制機構は、基礎生物学的・応用生物学的・生態学的知見から大いに興味の持たれる研究対象でありながらいまだほとんど明らかになっていない。ここでは序論として、まず A. 放線菌および本研究の題材である *Streptomyces* 属について特に本研究に関連する分野を中心に概説し、次に B. モデル細菌である大腸菌における研究成果の紹介を中心にカタボライト抑制機構についての現在までの知見を概説する。続いて C. 放線菌のカタボライト抑制機構に関するこれまでの知見、ならびに未知であり解明が必要とされる点について論じ、最後に D. 本研究の目的ならびに構成について述べる。

### A. 放線菌ならびに *Streptomyces* 属の特徴

#### A.1 放線菌の特徴（基礎生物学的／応用的研究の観点から）

現在までに正式に発表された原核生物（細菌と古細菌の合計）種は約 1000 属、5000 種であるが、このうち放線菌（Actinomycete）に分類されるものは約 100 属、1000 種を占める。放線菌とは高 GC 含有型グラム陽性細菌の総称であり、多くは土壤中に生息している。放線菌群が他の細菌群と区別されて独立したカテゴリーとして扱われる理由は、その「複雑な形態分化」と「多種多様な二次代謝産物の生産」という 2 大特徴によるところが大きい。放線菌は原核微生物でありながら、その形態分化は真核微生物であるカビに似て複雑であり、菌糸状に生育してその先端に様々な形の胞子を着生する。このことから、放線菌は原核生物のなかで最も複雑で進化の先端に位置するものであると考えられており、真核生物における分化研究の格好のモデルとされている。またその一方で、二次代謝産物として多種多様な有用物質を生産することから、古くから工業面・医薬面で大いに利用されてきた。結核の特効薬として莫大な数の人命を救ったストレプトマイシンはあまりにも有名であるが、現在利用されている抗生物質のうち放

線菌由来のものが約 60%を占めるという事実もまた放線菌の人類に対する恩恵の大きさを物語  
るものである。以上、「複雑な形態分化」と「多種多様な二次代謝産物の生産」という 2 大特徴  
により、放線菌は今日の基礎研究、応用研究の両面において非常に重要な菌群として位置づけ  
られている。本研究の題材である *Streptomyces griseus* の属する *Streptomyces* 属は、これまでに報  
告されている放線菌種のうち半数以上を占めるものである。

## A.2 放線菌の形態分化およびそのこれまでの研究

先に述べた通り、放線菌を特徴付けるものの 1 つが「複雑な形態分化」である。放線菌の形  
態分化様式の例として、本論文の題材である *S. griseus* の生活環を図 0.1 として示す。*Streptomyces*  
属は寒天培地上において、胞子の発芽後、基底菌糸を培地表面に張り巡らせる。続いて自身に  
より基底菌糸を分解し、これを栄養源としながら空中に向かって気中菌糸をのばす。その後、  
気中菌糸に対して等間隔に隔壁が生じ、それまで菌体中に複数コピー存在していた染色体 DNA  
を 1 コピーずつ取り込んで数珠状に連なった胞子を形成し、更に 1 つずつに分かれて成熟胞子  
となる。

放線菌におけるこれら一連の形態分化メカニズムの研究は、*Streptomyces coelicolor* A3(2)を中  
心に多くの放線菌群について行われてきた。形態分化研究のうち最も基本的な手法は、まず形  
態分化異常の生じた変異株を分離し、次にその変異点を決定し、続いてその同定された変異遺  
伝子について解析を行う、というものである。放線菌においては、基底菌糸形成後に気中菌糸  
形成の生じない変異株は bald ("無毛の") あるいは *bld* 変異株と呼ばれ、そのコードする遺伝子  
は *bld* 遺伝子と命名されてきた。また、気中菌糸は形成できるもののその後胞子形成に至らない  
変異株は white ("白い")。 *S. coelicolor* A3(2)の成熟胞子は、これに特有な灰色色素を指標に気中菌  
糸（白色である）と区別されていたため）あるいは *whi* 変異株と呼ばれ、そのコードする遺伝子  
は *whi* 遺伝子と命名されてきた。 *S. coelicolor* A3(2)ならびに *S. griseus* においてこれまでに決定  
されている *bld*, *whi* ならびにこれらに準ずる形質に関与する遺伝子を表 0.1、表 0.2 としてそれぞ  
れ掲載した。このうち特に *bld* 遺伝子群については、そのうち多くが細胞外分泌型シグナルカス

ケードを形成していると考えられる点で一層興味が持たれる。*bld* 変異株研究の早期より、異なる *bld* 株同士を固体培地上近傍にて生育させると、方向性を持った形態の相補、すなわち一方のみ気中菌糸形成が回復する、という、いわゆる細胞外相補 (extracellular complementation) 現象が観察されていた。仮に気中菌糸形成不全株 A と B を近傍にて生育させたとき、A のみ気中菌糸形成の回復が見られるのであれば、B は気中菌糸形成により近い (=下流の) シグナルを A に対し補っていることになるから、カスケードの順序については A が上流、B が下流ということになる。この概念を拡張して、これまでに *bld* 株群は、上流から下流に向かって以下のような細胞外分泌型シグナルカスケードを形成することが示されている。

$$bldJ / bldK(L?) / bldA, H / bldG / bldC / bldD, M / ram$$

これまでに明らかになった *bld* カスケードの模式図を図 0.2(a)として近年の総説より抜粋し掲載する。*whi* カスケードの模式図を図 0.2(b)として掲載する。

本研究の題材である放線菌 *S. griseus* においては、上記 *S. coelicolor* A3(2)に対するものとは異なった研究視点からその形態分化に関する研究が開始された。*S. griseus* はストレプトマイシンの工業的生産株として利用されるが、その工業的利用の場において、放線菌の 2 大特徴である形態分化と二次代謝が生育のある段階で同時に生じるという現象が観察されていた。このことは、何らかの共通因子によってこれら 2 大特徴が制御されていることを示唆するものであった。著者の所属研究室を中心とした長年の解析により、これら 2 大特徴に共通する制御因子は「微生物ホルモン」と呼ぶべき低分子化合物であることが証明された。放線菌 *Streptomyces* 属における微生物ホルモンは  $\gamma$ -ブチロラクトン化合物であり、それによってもたらされる多種多様な遺伝子制御に関する研究の先駆けとなったのは、*S. griseus* によって生産される A-ファクター (2-isocaprolyl-(3R)-hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolactone) について本研究室でなされたものであった。本研究室で明らかとなった A-ファクターによる遺伝子群制御機構は以下のようなものである (概要を図 0.3 として模式的に示した)。

- ・ A-ファクターは、AfsA によって一次代謝産物を原料に生産される。
- ・ 細胞の生育が進むと A-ファクター合成が亢進し、細胞内 A-ファクター濃度が増加する。
- ・ 細胞内 A-ファクター濃度が閾値を超えると、A-ファクター特異的受容体である ArpA

に A-ファクターが結合する。ArpA は TetR ファミリーに属する転写制御因子であり、A-ファクター非存在時には制御カスケード上において自身の下流に存在する *adpA* のプロモーター領域に結合することで *adpA* の転写を抑制している。

- ・細胞内濃度の閾値を超えた A-ファクターが ArpA に結合すると、ArpA は構造を変化させて DNA への結合能を失い、*adpA* プロモーター領域から解離する。
- ・以上の結果、*adpA* の転写が亢進する。
- ・AdpA は AraC ファミリーに属する転写制御因子であり、二次代謝・形態分化に関わる多様な遺伝子群を転写活性化する。

この *adpA* は、上述した *S. coelicolor* A3(2)における *bld* カスケードのうち、*bldH* に該当するものであることが後の研究により判明した。*S. coelicolor* A3(2)においても *adpA* (*bldH*) の破壊株はその名の通り気中菌糸形成を行えなくなるものの、*S. griseus* とは異なり二次代謝には影響が見られないことがわかっている。その後進んだ他の *Streptomyces* 属の研究結果を踏まえても、*S. griseus* は *adpA* (*bldH*) による制御が非常に発達した種であるとみなすことができ、この高度に確立された一元的シグナルカスケードを有するという特徴も *S. griseus* 研究に大きな魅力を与える点である。*S. griseus* において AdpA によって制御を受ける遺伝子群である AdpA レギュロンは多岐にわたり、全ゲノム解読 (Ohnishi *et al.*, 2008) を経て現在なお新たなレギュロンが同定され続けている。

### A.3 放線菌の特徴（生態学・代謝研究の観点から）

生態学的観点から見ると、放線菌は土壌における分解者として大きな地位を占める生物種であるとみなすことができる。乾燥土壌 1 g 当たりには  $10^5$ - $10^8$  オーダーの放線菌が存在するとされ (McCarthy and Williams, 1992)、そのうち大多数を *Streptomyces* 属が占めると報告されている (Xu *et al.*, 1996)。ゆえに、土壌において *Streptomyces* 属が獲得すべき栄養源は、植物体、動植物の死骸、およびこれらの分解産物など、低分子から高分子に至るまで多岐にわたることになる。よって、*Streptomyces* 属がその進化の過程において、例えば大腸菌や枯草菌といった他の微

生物種と比べ特異かつ多様な炭素源利用経路／シグナル経路を得ている可能性が大いに考えられる。近年隆盛を迎えている全ゲノム解読から、上記の予想を裏付ける結果が得られている。2002 年に明らかとなった *S. coelicolor* A3(2)ゲノム配列からは、分泌酵素（加水分解酵素、キチナーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ）をコードすると予想される遺伝子が 172、ABC トランスポーター（薬剤排出の他に、糖、核酸、オリゴペプチド等の取り込みに関わるものも多数存在すると考えられる）をコードすると予想される遺伝子が 81 見いだされた（Bentley *et al.*, 2002）。これらの遺伝子数は、一般的な原核微生物ゲノムにおけるその数に比べおよそ 5~10 倍である（Bertram *et al.*, 2004）。同様の傾向は同じく全ゲノム配列解読ならびに遺伝子アノテーションの完了した近縁種である *Streptomyces avermitilis* や *S. griseus* においても見られ、*Streptomyces* 属が広範な基質に対して分解能を有することを示すものである。

## B. カタボライト抑制

### B.1 カタボライト抑制の定義

上述の *Streptomyces* 属は極端な例であるが、一般的に微生物の生育環境における栄養源は単一ではなく多岐にわたる。これらが無作為に利用することは、例えば 1 つの栄養源に対して 1 つの利用酵素が必要であると仮定すると、酵素生産に必要なエネルギー効率から考えても生存戦略上得策でない。こういった環境への適応戦略として、微生物は一般に「より利用しやすい栄養源を優先的に利用し、その間、より利用しにくい栄養源に対する利用酵素を転写レベルで抑制する」機構を有している。この機構はカタボライト抑制と呼ばれる（Magasanik, 1961）。

### B.2 カタボライト抑制研究の起こり

カタボライト抑制の研究は、グルコースと他の糖の混合培地にて細菌を生育させた場合にグルコースが優先利用される、という、複数の研究者によりなされた観察から端を発している。中でも Monod は、グルコースとキシロースの両者を炭素源として含む液体培地にて大腸菌 *Escherichia coli* を培養した際、1.まずグルコースを優先的に利用して対数増殖的に生育し、2.グ

ルコースが枯渇するとそののちわずかな定常期を経て（この間にキシロース利用遺伝子群に対するグルコースによる抑制が解除されると考えられる）、3.キシロースの利用により再び対数増殖的な生育を開始する、という現象を見いだし、ジオキシー（2 段階生育）現象と命名したことで名高い。この発見は、のちに原核生物におけるオペロン説（Jacob and Monod, 1961）、更には史上初めて明らかとなったシグナル伝達系である cAMP receptor protein (CRP) - cAMP 転写制御モデル（Pastan and Perlman, 1970）の提唱の礎となった。

### B.3 これまでに明らかになっているカタボライト抑制機構の例

先に述べた *E. coli* の例を初めとして、多くの微生物においてはグルコースが「利用しやすい糖」の最上位に位置するものであると認識されている。六炭糖であるグルコースは、解糖系の代表的な出発物質であると同時に光合成の最終産物であり、「非生物界と生物界との架け橋」と形容されるほど生命にとって重要な地位を占める物質であることから、多くの生物がグルコースを優先的に利用することは驚くべきことではない。これまでの研究により、グラム陰性細菌のモデルである大腸菌、および低 GC 含有型グラム陽性細菌のモデルである枯草菌を題材とし、グルコースによるカタボライト抑制（以下グルコース抑制）機構が解明されつつある。かつてこの機構は、先に述べた CRP-cAMP 転写制御モデルにより矛盾なく説明できるとされてきた。しかしながらその後の詳細な研究により、このモデルだけでは矛盾が生じることがわかり、他のシステムの存在が予想された。近年、大腸菌ならびに枯草菌においては、グルコース抑制に重大な役割を示しているのは糖取り込み系の 1 つである PTS（後述）の構成因子であるということが示された。この項では、過去の研究により明らかになった原核微生物における PTS の機構、ならびに PTS とグルコース抑制との関係について概説する。

#### B.3.1 PTS の概要

PTS とは、原核微生物における糖の細胞内取り込み機構の 1 つであり、「ホスホエノールピルビン酸から糖へのリン酸基転移システム（phosphoenolpyruvate (PEP) → sugar phosphotransferase

system)」の略称である。PTS によって取り込まれる糖は PTS 糖と呼ばれ、通常グルコースを含む多くの単糖がここに含まれる。一方 PTS に依存せずパーミアーゼ等によって取り込まれる糖は非 PTS 糖と呼ばれ、ラクトース、マルトースといったオリゴ糖に代表される。PTS は Roseman らに 1964 年に提唱され (Kundig *et al.*, 1964)、その後の研究により以下の事実が明らかになっている。

- ・ 構成成分は、enzyme I (EI) , histidine-phosphorylatable protein (HPr) , enzyme II (EII) の 3 種である。このうち EI, HPr は全 PTS 糖に共通の成分であり、一方で EII は 1 種の糖に対し 1 種必要である。例えばグルコースに対する EII は EII<sup>glc</sup>、フルクトースに対する EII は EII<sup>frc</sup> と表記される。
- ・ 解糖系中間体であるホスホエノールピルビン酸 (PEP) がリン酸基供与体となり、リン酸基を次のように転移して糖のリン酸化を行う。



- ・ EII は複数蛋白質もしくは複数ドメインから構成され、「糖の細胞内への取り込み」と「糖へのリン酸基の転移」を同時に直接行っている。例として大腸菌におけるグルコース特異的 EII においては、ドメイン B と C が膜蛋白 EIICB<sup>glc</sup> として同一ポリペプチド上に存在し、ドメイン A が細胞質局在性可溶蛋白 EIIA<sup>glc</sup> として存在している。両者が協同して、「グルコースの細胞内への取り込み」と「グルコースへのリン酸基の転移」を行っている。

大腸菌におけるグルコース PTS の概要を図 0.4 に示した (後に詳述)。ゲノム中に PTS 構成因子をコードする遺伝子が何種類存在するかは微生物種によって大きく異なる。大腸菌 *Escherichia coli* ゲノムは 38 の PTS 関連遺伝子をコードしており、これらで 22 の異なる基質を認識すると考えられている。その一方で *Mycoplasma genitalium* は EI と HPr の他に 2 つのトランスポーターしか持たず、更には *Chlamydia trachomatis* などではゲノム中に EI や HPr に相同性の高い蛋白をコードする遺伝子は見いだされるものの対応するトランスポーターは見いだされていない。また、*Mycobacterium tuberculosis* は PTS の構成因子を 1 つも有さないことが明らかになっている (Siebold *et al.*, 2001)。

### B.3.2 PTS によるグルコース抑制

1996 年、Inada らは *E. coli* を題材とし、脱リン酸化状態にある EIICB<sup>glc</sup> がラクトース取り込みを阻害することを示した (Inada *et al.*, 1996)。この現象については以下の通り生理的な意義付けがなされる。グルコースが十分に供給される環境下ではグルコースのリン酸化が亢進する。従ってグルコースへのリン酸供与体である EIICB<sup>glc</sup> については脱リン酸化が亢進する。よって、脱リン酸化 EIICB<sup>glc</sup> がラクトース取り込みを阻害することは、グルコース抑制の生理的意義から鑑みて極めて合理的な機構といえる。PTS によるグルコース抑制の代表例として、ラクトース透過酵素である LacY に対するグルコース抑制の模式図を図 0.4 に示した。

更に 1998 年、Kimata らは、*E. coli* において PTS によるグルコース抑制をグローバルに制御する因子として Mlc を同定した (Kimata *et al.*, 1998)。詳細な研究により、Mlc に関して以下の点が明らかにされた (Tanaka *et al.*, 1999、Plumbridge, 2002、Tanaka *et al.*, 2000、Lee *et al.*, 2000、Nam *et al.*, 2001、Tanaka *et al.*, 2004)。Mlc は以下に述べる通りグローバルな負の転写制御因子として機能している。

- ・ グルコース非存在下では Mlc は細胞質に局在し、PTS の各糖共通因子 (HPr と EI をコードする *ptsHI*)、グルコース PTS の構成遺伝子 (EIICB<sup>glc</sup> をコードする *ptsG*)、マンノース PTS の各構成遺伝子 (*manXYZ*)、マルトース利用酵素群の調節遺伝子、および *mlc* 自身の転写を負に制御する。
- ・ グルコース存在下では、膜局在蛋白である EIICB<sup>glc</sup> はリン酸基をグルコースに受け渡すために自身は脱リン酸化状態になる。脱リン酸化 EIICB<sup>glc</sup> は Mlc に対して親和性を持つため、EIICB<sup>glc</sup> にリクルートされる形で Mlc が膜に局在し、上記の転写抑制が解除される。

膜蛋白は外界にある栄養物質の感知と取り込みを行い得るが、これが同時にカタボライト抑制を制御するというこのモデルは非常に合目的的である。更に近年、結晶構造解析により、*E. coli* 由来 Mlc の結晶構造が決定され (Schiefner *et al.*, 2005)、引き続き Mlc と EIICB<sup>glc</sup> との共結晶も解析がなされた (Nam *et al.*, 2008)。これらをはじめとする研究により、*E. coli* 生育環境中のグ



ルコースの多少が Mlc を介したカタボライト抑制へと至る経緯が分子レベルで明らかになりつつある。

## C. 放線菌のカタボライト抑制に関するこれまでの知見

放線菌のグルコース抑制機構はほとんど明らかになっていない

先に述べた通り、グラム陰性細菌である大腸菌のグルコース抑制機構は精力的に研究され、徐々にその全貌が明らかになりつつある。また、低 GC 含量グラム陽性細菌である枯草菌においても同様に PTS を利用したグルコース抑制機構が見いだされており、大腸菌と共通する点が非常に多いことが報告されている。しかしながらその一方で、高 GC 含量グラム陽性細菌である放線菌においては、グルコース抑制を含めたカタボライト抑制全般に関してはほとんど知見が得られていない。本項では、放線菌のグルコース抑制機構についてこれまで得られている知見を概説する。

カタボライト抑制現象は *Streptomyces* 属においても一般的に観察される (Hodgson *et al.*, 1982, Smith *et al.*, 1998a, Smith *et al.*, 1998b, Wong *et al.*, 1991, Mattern *et al.*, 1993, Servin-Gonzalez *et al.*, 1994, Virolle *et al.*, 1994, Delic *et al.*, 1992)。前項にて述べた通り、*Streptomyces* 属が土壌を生育環境とし、土壌中に存在する多種多様な栄養源を資化する必要があることを考えれば、*Streptomyces* 属が独特のカタボライト抑制経路を有していても不思議はない。*Streptomyces* 属と生育炭素源との関係について特筆すべきは、「放線菌の 2 大特徴である形態分化・二次代謝がカタボライト抑制能と密接に関連する」という点である。過去の研究により、形態分化とカタボライト抑制との関連について以下のような観察がなされている。

- ・ bald 変異株（基底菌糸から気中菌糸への形態分化能を失った変異株。上述）のうち多くは、同時にカタボライト抑制能も失っている (Pope *et al.*, 1996)。
- ・ bald 変異株のうちいくつかは、生育させる際の炭素源を変更（たとえばグルコースをマンニトールに変更）することで気中菌糸形成能を回復する。

これらのことから放線菌においては、いわゆるカタボライト抑制が、二次代謝や形態分化といった細胞活性を広範に制御する複雑なカスケードと連携していることが示唆される。しかしながら以下に述べる通り、その詳細はほとんど明らかになっていない。先に述べた通り、大腸菌や枯草菌では、カタボライト抑制のうち最も代表的であると考えられるグルコース抑制が、PTS を介して実現されている。では放線菌 *Streptomyces* 属ではどうであろうか？ *Streptomyces* 属にもフルクトースおよび *N*-アセチルグルコサミン輸送のための PTS は存在することが示されている (Titgemeyer *et al.*, 1995、Wang *et al.*, 2002、Rigali *et al.*, 2004)。しかしながらグルコース輸送のための PTS については、存在しないであろうことが複数のグループにより報告されている (Garcia-Dominguez *et al.*, 1989、Titgemeyer *et al.*, 1995)。以下に列挙した事実から、*Streptomyces* 属のグルコース抑制機構は大腸菌と同様の PTS 構成因子によるものではなく、これと大きく異なる「非 PTS 型グルコース抑制機構」であろうことが示唆されている。

- ・ PTS の主要構成因子である HPr をコードする遺伝子を除去した株でもグルコース抑制が生じる (Butler *et al.*, 1999)。
- ・ グルコース特異的 EII の役割を満たすと予想される蛋白をコードする遺伝子が *Streptomyces* 属内に存在しない。*S. coelicolor* A3(2)において、放射性同位体ラベルしたリン酸化 HPr と細胞抽出液とを混合するとリン酸基の転移が生じるが、転移した蛋白を解析しても EII<sup>glc</sup>に該当するものは得られない (Titgemeyer *et al.*, 1995)。

前述の通り、大腸菌および枯草菌では EIICB<sup>glc</sup> と EIIA<sup>glc</sup> によって「細胞内へのグルコース取り込み」と「グルコースへのリン酸基の転移」が同時に直接行われる。しかしながら *Streptomyces* 属は、グルコース透過膜蛋白 (GlcP) とグルコースキナーゼ (Glc) とを別個に備えており、各々が見かけ上独立に作用している (van Wezel *et al.*, 2005)。なお、両者はいずれもグルコース資化に必須である。

では、PTS に代わり放線菌においてグルコース抑制に重要な役割を果たしている因子は何であろうか？ 同年代になされた以下 2 つの報告により、その重要因子は放線菌内唯一のグルコース資化酵素であるグルコースキナーゼ Glc であろうことが示唆された。1994 年、Kwakman と Postma は、*glc* 領域上の変異によってグルコース資化能を失った *S. coelicolor* A3(2)変異株におい

て、グルコース抑制が生じなくなることを示した (Kwakman and Postma, 1994)。更に同じく 1994 年、Angell らは、*glk* 欠損 *S. coelicolor* A3(2) にグラム陰性菌 *Zymomonas mobilis* Cp4 株由来 *glk* を導入した (放線菌 Glk は後述する ROK ファミリーに属するが、*Z. mobilis* Cp4 Glk は非 ROK ファミリーに当時分類されていた)。その結果、細胞抽出液におけるグルコースキナーゼ活性は復帰したにもかかわらず、グルコース抑制能は失われたままであった (Angell *et al.*, 1994)。Angell らは更に、*glk* 欠損 *S. coelicolor* A3(2) にランダムな変異を導入し、グルコース資化能の復帰した株を得た。この復帰株は *glk* 以外の領域に変異の生じた変異株であることが実験的に確認されたことから、これは他の炭素源に対する資化酵素 (本来はグルコース以外に基質特異性を持つ糖キナーゼなど) に変異が生じた結果グルコースの資化が可能となった、いわゆる *trans* 型の復帰変異株であると考えられる。この株でもやはり、グルコース抑制は生じなかった (Angell *et al.*, 1994)。以上の報告から、放線菌におけるグルコース抑制に重要な役割を果たしているのは Glk であり、解糖系中間産物や他の解糖系酵素などの他の因子では説明できないことが示された。なお、上記 Kwakman と Postma の報告と同様の現象は、著者の所属研究室においても *S. griseus* を題材として次のように 2 例確認されている。

- ・ *S. griseus* VHK2 株は、Kang らがバナジウム酸耐性株取得を目的としたスクリーニングを行った際に取得されたものであるが、この株は培地中に高濃度のグルコースが存在しても形態分化に至るものであった。本株は、グルコース資化能を完全に失っていた。のちの徐らの解析により、本株は第 147 アミノ酸であるグリシンがアルギニンに変異した G147R Glk をコードする株であることがわかった。
- ・ *S. griseus* GRD2 株は、著者が修士論文研究において「 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するグルコース抑制が解除された変異株」取得を目的としたスクリーニングを行った際に取得されたものである。本株もまた、グルコース資化能を完全に失っていた。のちの解析により、本株は第 80 アミノ酸であるアスパラギンがヒスチジンに変異した N80H Glk をコードする株であることがわかった (第 2 章にて後述)。

Glk の属する ROK ファミリーとは、Repressors, Open reading frames, Kinases の頭文字から命名されたものである。その名の通り、いくつかの転写制御因子、キナーゼ、機能未知遺伝子が、

異なった機能を持つにもかかわらず保存配列を有する点に進化的興味から着目し、これらを 1 ファミリーとして分類したものである (Titgemeyer *et al.*, 1994)。従ってキナーゼである Glk が同時に転写制御機能を有していても不思議はない。ところがバイオインフォマティクスによる解析の結果、*Streptomyces* 属の Glk には、直接転写制御を行う際に不可欠な DNA 結合配列が存在しないことが示されている。これは、第 3 章に述べる結晶構造解析からも確かめられている。このことから、*Streptomyces* 属の Glk は DNA への直接結合による制御ではなく、例えば DNA 結合能を持つ他の蛋白と相互作用することによってグルコース抑制を実現していることが予想されてきた (Angell *et al.*, 1992、Parche *et al.*, 2000)。なお、これまでグルコース抑制を受ける代謝酵素をコードする遺伝子が多数決定され、そのうちいくつかのものはグルコース抑制を受けるのに必要なプロモーター配列が決定されているが、これらには統一性が見いだされない (Delic *et al.*, 1992、Virolle *et al.*, 1994、van Wezel *et al.*, 1997、Nguyen *et al.*, 1997、Rodriguez *et al.*, 2005)。このことは、もし Glk がグルコース抑制現象に対する鍵因子であるのであれば、Glk が直接 DNA に結合して転写制御を行うのではなく、他の（もしかすると複数種類にわたる）因子を介して転写制御を行うことを示唆するものである。

放線菌のグルコース抑制に関してこれまで得られている知見を図 0.5 として模式的に示す。

## D. 本研究の目的および本論文の構成

前述の通り、放線菌 *Streptomyces* 属のカタボライト抑制機構はほぼ未知であり、それ自体が「非 PTS 型カタボライト抑制機構」として興味深い研究対象である。そのみならず、カタボライト抑制と形態分化や二次代謝が挙動を同じくすることから、放線菌のカタボライト抑制機構研究は基礎生物学的にも応用微生物学的にも大きな意義を持つ可能性がある。著者は、他の炭素源資化酵素の抑制だけでなく、形態分化・二次代謝の抑制も含めた *Streptomyces* 属のカタボライト抑制機構解明を目的とし、3 方向からのアプローチを試みた。これらを 3 章にわたって記述する。3 章の概要は以下の通りである。

- ・ 第 1 章：高コピー導入することで、通常形態分化が抑制されるような高濃度のグルコ

ースを含む寒天培地上においても旺盛な形態分化を行うことができるようになる遺伝子断片を *S. griseus* 野生株クロモソームから探索した。その結果、金属である銅の輸送に関係する遺伝子を含む断片が候補として選抜された。これについて解析を行った。

- ・ 第 2 章：*glk* 以外に変異点を持つグルコース抑制解除株の取得を目的とした変異株スクリーニング系を構築し、実際に探索を行った。得られた候補株の変異点を決定し、当該遺伝子について解析を行った。
- ・ 第 3 章：*S. griseus* のグルコースカタボライト抑制鍵因子である *Glk* に対し、蛋白工学的手法を用いてその役割の解明を試みた。

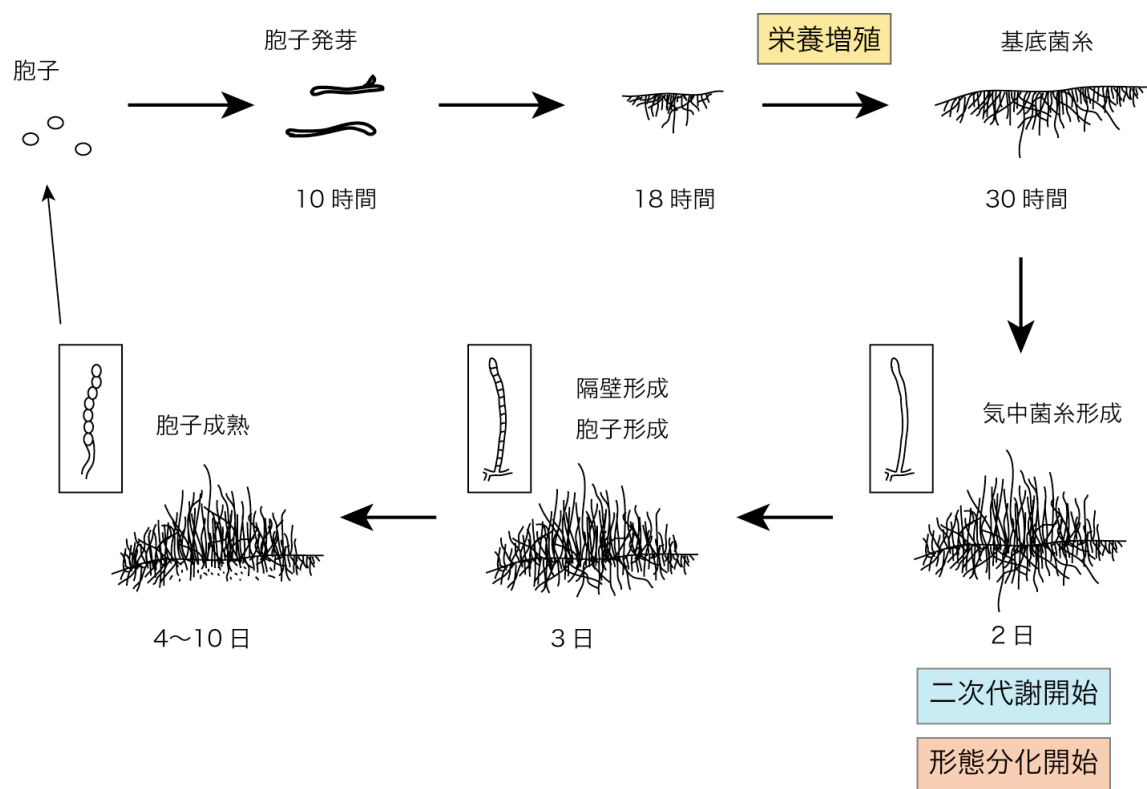


図 0.1 *Streptomyces* 属の生活環の代表例として、*S. griseus* の生活環を示す。

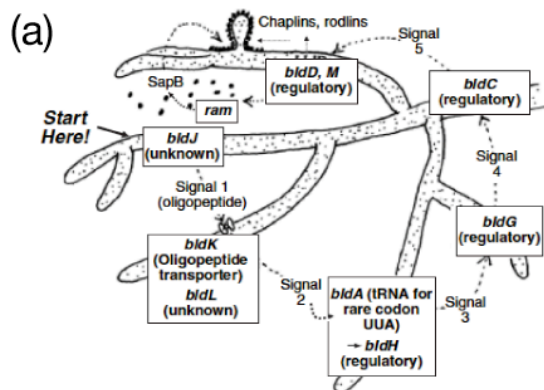


Fig. 3. Extracellular signalling dependent on *bld* genes leading to the production of surface proteins involved in aerial growth in *Streptomyces coelicolor*. The figure has been updated from that of Chater (1998).

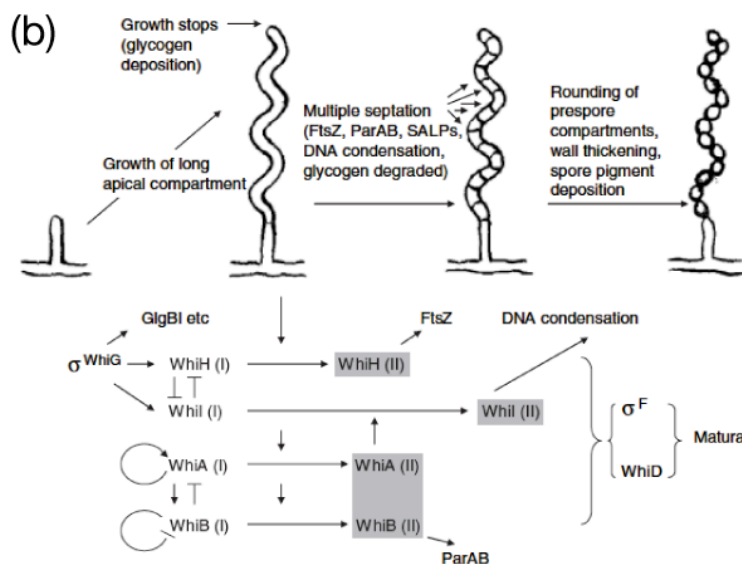


Fig. 4. Regulation of aerial hyphal differentiation into spore chains in *Streptomyces coelicolor*. The regulatory scheme uses information from Kelemen *et al.* (1996, 1998), Ryding *et al.* (1998), Tan *et al.* (1998), Flardh *et al.* (1999), Ainsa *et al.* (1999), Noens *et al.* (2005) and Jakimowicz *et al.* (2006).

図 0.2 *S. coelicolor* A3(2)において現在まで知見が蓄積されてきている形態分化カスケードの模式図。Chater and Chandra, 2006 より転載。(a) *bld* 遺伝子群による形態分化カスケード。(b) *whi* 遺伝子群による形態分化カスケード。

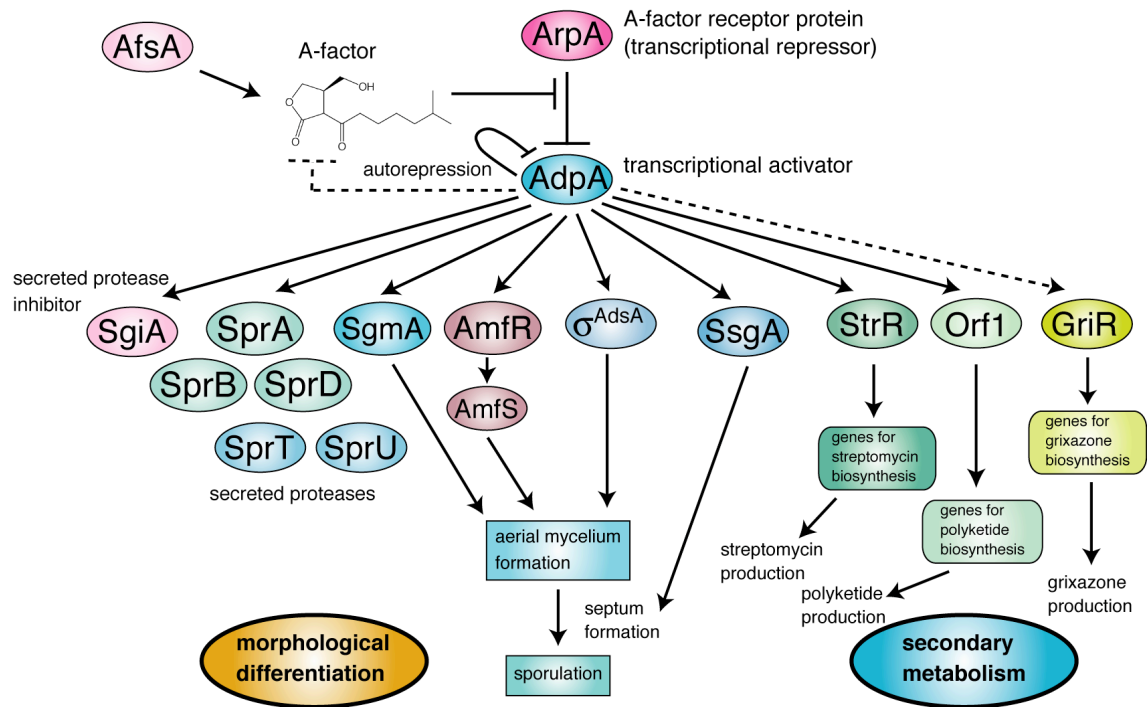
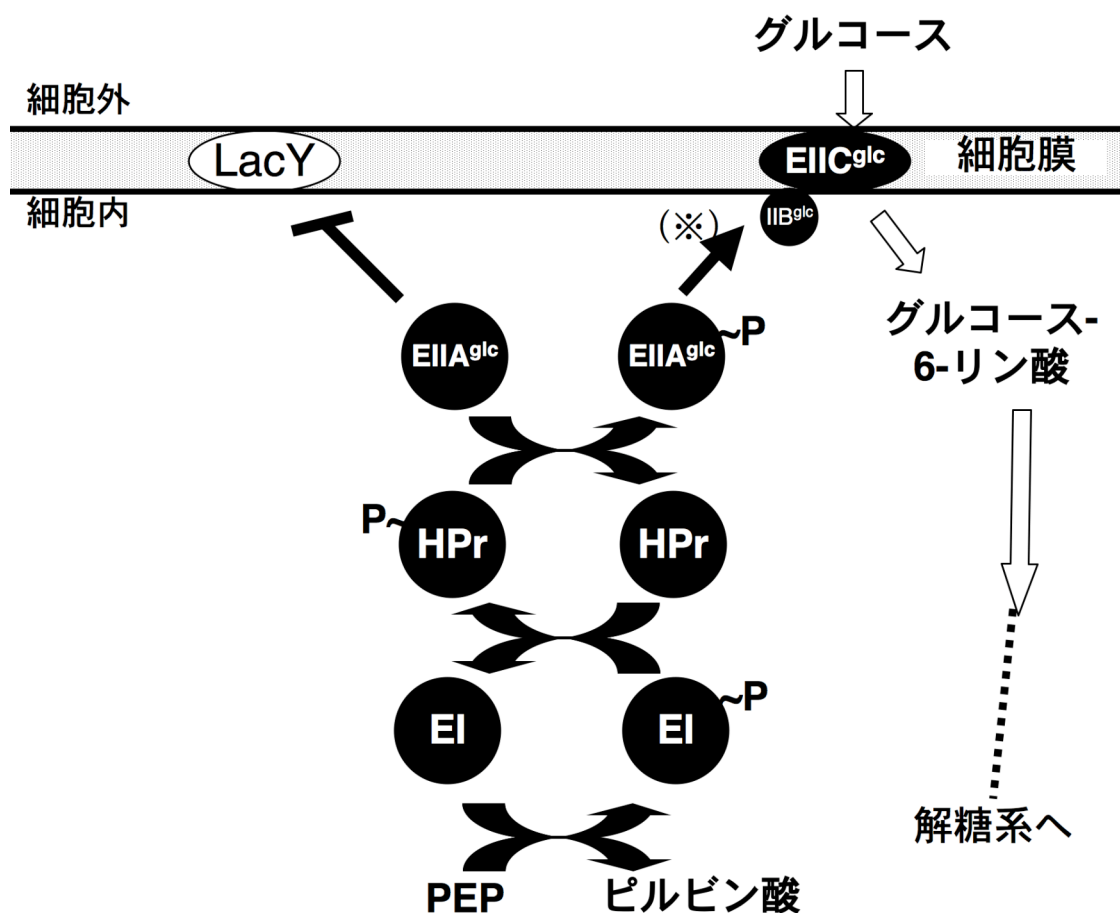


図 0.3 *S. griseus* における A-ファクター制御カスケード。





**図 0.4** 大腸菌のグルコース PTS およびその構成因子による代表的なグルコース抑制機構の概略。PTS は糖取り込みと糖リン酸化とを同時に行う機構である。リン酸化に用いられるリン酸基は、上図に示した通り、解糖系中間体である PEP から EI、HPr、EII を経由して糖まで伝達される。大腸菌では PTS の構成因子がグルコースカタボライト抑制を担うことが知られている。グルコースが環境中に豊富に存在する条件では、上記(※)印で示したリン酸基転移が活発に進行し、脱リン酸化 EIIA<sup>glc</sup> が増加する。脱リン酸化 EIIA<sup>glc</sup> がラクトース透過酵素である LacY を阻害することで、ラクトース資化に対するグルコースカタボライト抑制が成立する。

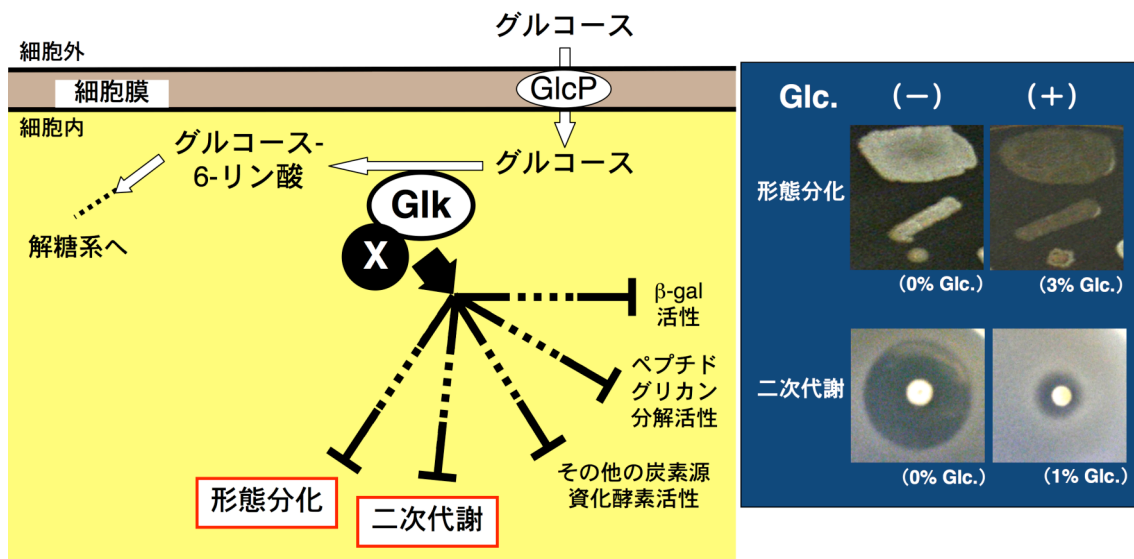


図 0.5 *Streptomyces* 属におけるグルコースカタボライト抑制機構について、これまで得られている知見をまとめた模式図。グルコースカタボライト抑制の対象として、他の炭素源資化酵素の他に、形態分化や二次代謝が含まれることが特徴的である。*Streptomyces* 属においては、大腸菌や枯草菌の場合と異なり、グルコース用 PTS が存在しない。グルコースカタボライト抑制に対してはグルコースキナーゼ Glk が重大な役割を担うことが複数の研究者により示されているが、それ以外はほとんど明らかになっていない。Glk に未知蛋白（上記 X）が相互作用することで抑制機能が発揮されることが考えられている。

**表0.1** 気中菌糸形成に必要な遺伝子 (bald型 (または*bld*型) 遺伝子)

遺伝子名	遺伝子産物	ホモログの分布
<i>bldA</i>	ロイシンtRNA	全生物界
<i>bldB</i>	DNA結合蛋白 (MerR型?)	放線菌
<i>bldC</i>	DNA結合蛋白	放線菌
<i>bldD</i>	転写因子	放線菌
<i>bldG</i>	anti-anti-シグマ因子?	細菌
<i>bldH (adpA)</i>	転写因子	細菌
<i>bldJ</i>	未同定、存在のみ示唆	
<i>bldK</i>	オリゴペプチド透過酵素	細菌
<i>bldL</i>	未同定、存在のみ示唆 ( <i>bldK</i> と似た機能?)	
<i>bldM (whiK)</i>	2成分制御系レスポンスレギュレーター	細菌
<i>bldN (whiN, adsA)</i>	ECFシグマ因子	細菌
<i>ramR (amfR)</i>	2成分制御系レスポンスレギュレーター	細菌
<i>ramCSAB (amfTSBA)</i>	ランチビオティック合成と排出	<i>Streptomyces</i>
<i>chpA-H</i>	疎水性の細胞壁結合蛋白	孢子形成放線菌
<i>citA</i>	クエン酸合成酵素 (培地の酸性化を引き起こし <i>bld</i> 形態に至る)	全生物界
<i>acoA (sacA)</i>	アコニターゼ (培地の酸性化を引き起こし <i>bld</i> 形態に至る)	全生物界
<i>cya</i>	アデニル酸シクラーゼ (培地の酸性化を引き起こし <i>bld</i> 形態に至る)	全生物界
<i>clpP1</i>	Clpプロテアーゼサブユニット	細菌
<i>catB</i>	カタラーゼ	細菌
<i>dasR</i>	GntR型転写因子	細菌
<i>brgA</i>	未同定、存在のみ示唆	
<i>xdhR</i>	TetR型転写因子	細菌
<i>crr</i>	PTS構成因子 Enzyme IIA	細菌
<i>ptsI</i>	PTS中央構成因子 Enzyme I	細菌
<i>ptsH</i>	PTS中央構成因子 HPr	細菌
<i>cebR</i> (本論文)	LacI型転写因子	細菌

Elliot et. al, 2008を一部改変。

**表0.2** 孢子形成に必要な遺伝子 (white型 (または*whi*型) 遺伝子)

遺伝子名	遺伝子産物	ホモログの分布
<i>whiA</i>	機能未知	グラム陽性細菌
<i>whiB</i>	転写因子?	放線菌
<i>whiD (wblD)</i>	転写因子?	放線菌
<i>whiE</i>	ポリケタイド合成酵素	
<i>whiG</i>	シグマ因子	細菌
<i>whiH</i>	GntR型転写因子	細菌
<i>whiI</i>	2成分制御系レスポンスレギュレーター	細菌
<i>whiJ</i>	未同定、存在のみ示唆	
<i>sigF</i>	シグマ因子	細菌
<i>ftsZ</i>	チューブリン様細胞分裂蛋白	細菌
<i>ssgA-F</i>	転写因子?	孢子形成放線菌
<i>ssgR</i>	IcIR型転写因子	細菌
<i>samR</i>	IcIR型転写因子	細菌
<i>agl3R</i>	GntR型転写因子	細菌
<i>bkdR</i>	AsnC型転写因子	細菌

Elliot et. al., 2008を一部改変。

## <本論>

### 使用菌株、ベクター、および培地組成

#### 使用菌株

##### 大腸菌株

###### ○ *E. coli* JM109

遺伝子工学実験における汎用種。*dam*, *dcm* メチラーゼを有している。大腸菌を用いた実験のうち、特に記述のない場合は全てこの菌株を使用した。

###### ○ *E. coli* JM110

*dam*, *dcm* メチラーゼ遺伝子変異株。*E. coli* JM109 で構築したプラスミドを放線菌に導入する前に、本株へ導入して再取得した。このことによってメチラーゼによるメチル化修飾を受けていないプラスミド DNA を得た。

###### ○ *E. coli* BL21(DE3)Gold

ストラタジーン社製。pET ベクターまたは pCold ベクターによるタンパク質大量発現用宿主として用いた。

##### 放線菌株

###### ○ *Streptomyces griseus* IFO13350

著者の所属研究室において用いられている野生株。ゲノム解読が終了している (Ohnishi *et al.*, 2008)。財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation, Osaka (IFO)) より分譲。

###### ○ *S. griseus* $\Delta$ *arpA*

A-ファクター受容蛋白である ArpA (Onaka *et al.*, 1995) をコードする遺伝子を除去した株 (Kato

et al., 2004)。A-ファクター生産に依存せずに AdpA レギュロンが転写活性化している。

### その他の菌株

#### ○ *Bacillus subtilis* ATCC No. 6633

ストレプトマイシンアッセイにおける阻止円観察用指示菌として胞子を使用した。American Type Culture Collection より分譲。

### ベクター

#### 大腸菌用ベクター

#### ○ pUC18

ノバジェン社製。アンピシリン耐性遺伝子を有す。マルチクローニングサイトには *lacZ* の向きに対して HindIII-SphI-PstI-SalI/HincII-XbaI-BamHI-SmaI-KpnI-SacI-EcoRI 配列が並ぶ。

#### ○ pUC19

ノバジェン社製。pUC18 に対して、マルチクローニングサイトの塩基配列が逆であるもの。

#### ○ pTS1

ニッポンジーン社製。アンピシリン耐性遺伝子を有す。マルチクローニングサイトには、*lacZ* の向きに対して

NsiI-KpnI-MluI-SnaBI-BglII-SmaI-EcoRI-HincII-HindIII-StuI-BamHI-NheI-PstI-SacI-BssHII 配列が並ぶ。HincII サイトに対する平滑末端断片のクローニング用として販売され、*S. griseus* ゲノム配列解読時にクロモソーム断片を本ベクターに連結することでゲノムライブラリが作製された。

#### ○ pT7Blue

ノバジェン社製。アンピシリン耐性遺伝子を有す。マルチクローニングサイトには、*lacZ* の

向きに対して

EcoRI-SacI-KpnI-SmaI/AvaI-BamHI-EcoRV-NdeI-SpeI-XbaI-SalI/HincII/AccI-Sse8387I/PstI-SphI-HindIII 配列が並ぶ。EcoRV サイトに対する PCR 産物の TA クローニング用。

○ pET-26b(+)

ノバジェン社製。カナマイシン耐性遺伝子を有す。T7 promoter, *lac* operator, T7 terminator を有し、蛋白質の C 末端側にヒスチジンタグを付加して発現させるためのベクター。

○ pCold I / pCold IV

タカラ社製。大腸菌の有するコールドショック遺伝子 *cspA* の promoter により蛋白合成を行わせる。*cspA* promoter の下流には転写を厳密に制御するための *lac* operator が挿入されている。IPTG で *lac* operator による制御を解除させた上で低温にさらすことにより *cspA* promoter 下流の転写が誘導される。本ベクターを用いて低温で発現誘導することにより、宿主大腸菌由来蛋白の合成は抑制され、目的蛋白を高効率で得ることができる。pCold IV は目的蛋白に融合タグ等を付加しない。pCold I は、TEE (Translation Enhancing Element)、ヒスチジンタグ、Factor Xa 切断サイトをこの順に目的蛋白 N 末端側に付加する。

○ pTYM18 / pTYM19

富山県立大学の尾仲宏康博士により分与。*p5a ori* を持つことにより *E. coli* においてはプラスミドとして増幅する一方で、*int\** (放線菌ファージ *phiC31* 由来インテグラーゼをコードする遺伝子) を持つことにより *S. griseus* においてはゲノム上 1 箇所に存在するアタッチメントサイトに組み込まれる。この性質を利用し、*S. griseus* における安定した 1 コピーの遺伝子導入に用いた。pTYM18 はカナマイシン／ネオマイシン耐性遺伝子を持ち、pTYM19 はアンピシリン耐性遺伝子とチオストレプトン耐性遺伝子を持つ (Onaka *et al.*, 2003)。

## 放線菌用ベクター

### ○ pIJ486

John Innes Center, Norwich, England の D. A. Hopwood 氏より分与。チオストレプトン耐性遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子を有す。1 ゲノムあたり 40-100 コピー数 (Ward *et al.*, 1986)。

### ○pIJ702

John Innes Center, Norwich, England の D. A. Hopwood 氏より分与。チオストレプトン耐性遺伝子を有す。1 ゲノムあたりおよそ 200 コピー数。*S. antibioticus* 由来チロシナーゼ生産遺伝子群 (*melC1*, *melC2*) をコードしており、pIJ702 導入菌株では黒色のメラニン生産が観察される。しかしながら SphI, BglIII, SacI (いずれも pIJ702 においてはユニーク制限酵素サイト) を用いて DNA 断片を挿入すると、チロシナーゼが生産されなくなる。従ってメラニンが生産されなくなるため、DNA 断片挿入の有無がコロニー色で判別できる (Katz *et al.*, 1983)。この特長を生かし、ショットガンクローニングにおける DNA ライブラリ構築の際に用いた。

### ○ pIJ702Δ*melC*

著者の所属研究室の古庄が作製。チロシナーゼ生産遺伝子群を除去した pIJ702。コントロールベクターとして用いた。pIJ702 によるメラニン過剰生産が菌体の生育を阻害することが知られているため、pIJ702 そのものを形態分化および二次代謝のコントロールベクターとして用いることは避けた。作製法は以下の通り。pIJ702 をテンプレートとし、*melC2* のすぐ下流からチオストレプトン耐性遺伝子内 N 末側までの 0.6 kbp 断片を下記のプライマーを用いて PCR 増幅し、pUC19 の BamHI-SphI サイトにクローニングした。これを EcoRV-BglIII で切断し、生じた 0.6 kbp 断片を pIJ702 の EcoRV-BglIII サイトにライゲーションしたものを pIJ702 Δ*melC* とした。

Primer (FW) : 5'-CGCGGATCCGAGCGGAAGGCCAAGACATTCGGC-3'

Primer (RV) : 5'-CGCGCATGCAGATCTGAATTCCTGACGAATCGAGGTCGAGGAACCG-3'

構築制限酵素サイト : BamHI    SphI    BglIII    EcoRI

○ pIJ922

John Innes Center, Norwich, England の D. A. Hopwood 氏より分与。チオストレプトン耐性遺伝子を有す。1 ゲノムあたり 1 コピーが安定に保持されることが示されている (Lydiate *et al.*, 1985)。

### 培地組成

#### 大腸菌培養用

寒天固体培地作製時は終濃度 2.0%寒天末添加。液体培地、寒天固体培地ともに必要時に終濃度 50 µg/ml のアンピシリン、終濃度 20 µg/ml のカナマイシンを添加した。

○ Difco™ 2×YT 培地

BD 社製。

○ Difco™ LB (Luria-Bertani) 培地

BD 社製。

#### 放線菌培養用

寒天固体培地作製時は終濃度 2.0%の寒天末添加 (IS 培地の際は、寒天末による微量異種糖源の混入が問題となることがあったため、必要に応じ Agar noble (BD 社製) で代用した)。プラスミド取得またはクロモソーム取得を目的とした液体培養時は終濃度 1%のグリシン添加。必要時に液体培養では終濃度 5 µg/ml のチオストレプトンまたは 1 µg/ml のネオマイシン添加。プレート培養では終濃度 5 µg/ml のチオストレプトンまたは 10 µg/ml のネオマイシン添加。

○ YMP

1.4 g エルリッヒカツオエキス (キョクトー社製)、0.752 g 粉末肉エキス (キョクトー社製), 2.0 g Bacto™ yeast extract (BD 社製)、4.0 g Bacto™ peptone (BD 社製)、5.0 g NaCl、2.0 g MgSO<sub>4</sub>・



7H<sub>2</sub>O を脱イオン水に溶解し、pH を 7.0-7.2 にして 1 l に Fill-up し、オートクレーブした培地。  
必要に応じ、別個に滅菌した糖源溶液を添加した。

○ R2YE

プロトプラスト再生用培地 (Hopwood *et al.*, 1985)。

○ Bennet

ストレプトマイシン生産能解析用培地。1.4 g エルリッヒカツオエキス (キョクトー社製)、  
0.752 g 粉末肉エキス (キョクトー社製)、1.0 g Bacto™ yeast extract (BD 社製)、2.0 g NZ amine Type  
A (和光純薬社製) を脱イオン水に溶解し、pH を 7.0-7.2 にして 1 l に Fill-up し、オートクレー  
ブした培地。

○ IS (Inorganic Solution)

無機塩固体培地として用いた。0.7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.01 g  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.3 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> を脱イオン水に溶解し、1 l に Fill-up し、20 g の寒天末を加えオート  
クレーブした。寒天末に微量に混入した糖の影響を避けるため、寒天末は適宜 Agar noble に変更  
した。必要に応じ別個にオートクレーブした各種糖源を添加した。

○ MM (Minimal Medium)

無機塩液体培地として用いた。2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2.4 g Trizma (Tris base)、1 g NaCl、0.5 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、  
0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.1 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.34 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 ml trace element solution (Hopwood *et al.*,  
1985) を脱イオン水に溶解し、HCl にて pH を 7.2 にして 1 l に Fill-up し、オートクレーブした。  
必要に応じ別個にオートクレーブした各種糖源を添加した。

○ SNA (soft nutrient agar)

Hopwood *et al.*, 1985 による。薬剤耐性株選択用およびストレプトマイシン生産能解析用重層培

地。薬剤耐性選択時は終濃度 500  $\mu\text{g/ml}$  チオストレプトンまたは 500  $\mu\text{g/ml}$  ネオマイシン添加。

## 第 1 章 *S. griseus* における銅排出系遺伝子の解析

### 1.1 背景

著者は修士論文研究において、*S. griseus* のグルコースカタボライト抑制解明に着目した形態分化・二次代謝に関する遺伝子を探索する過程で、これに該当する可能性のある遺伝子として、銅輸送系遺伝子群（銅シャペロンならびに銅輸送型 P 型 ATPase）に着目し、その研究を開始した。ここでは、銅シャペロン-銅輸送型 P 型 ATPase に関する過去の知見を概説したのち、本遺伝子群に着目するに至った経緯、ならびに本章の目的を記述する。

#### 1.1.1 銅シャペロンおよび銅輸送型 P 型 ATPase について

本章の話題の中心である銅シャペロンおよび銅輸送型 P 型 ATPase について過去の知見を記述する。これらは哺乳動物から原核微生物に至るまで広く分布する銅輸送システムである。

まず、生体内における銅の役割について概説する。銅は多くの酵素において活性中心として働く必須金属である。代表的な銅蛋白としては、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、シトクロム *c* オキシダーゼといった広く保存されたものの他、アミノオキシダーゼやチロシナーゼといったその反応が特異なものも数多く存在する (McGuirl and Dooley, 1999, O'Halloran and Culotta, 2000)。しかしながら一方で、銅は他の重金属と同様、フェントン反応によるラジカル分子種の発生源となるため、特に無機銅の状態では非常に有毒である (Vulpe and Packman, 1995, Dameron and Harrison, 1998)。このため、銅は銅輸送専用の蛋白によって厳密に制御されていると考えられる。

このような銅輸送専用蛋白の代表例として知られるのが銅シャペロンと銅輸送型 P 型 ATPase である。銅シャペロンは可溶性小型蛋白であり、真核生物、古細菌、グラム陽性細菌によく保存されている（グラム陰性細菌では報告がない）。一方 7 回膜貫通型の膜蛋白である銅輸送型 P 型 ATPase はグラム陽性・陰性を問わず原核微生物から古細菌、真核生物まで全生物界に分布している。銅シャペロン・銅輸送型 P 型 ATPase の両者はいずれもその N 末端側に MXCXXC となる銅結合ドメインを持ち、このドメインで銅イオンを授受できると考えられている。発見の

歴史は銅輸送型 P 型 ATPase の方が早く、ヒトの銅代謝に関する遺伝病であるウィルソン病ならびにメンケス病の原因遺伝子がいずれも銅輸送型 P 型 ATPase であることが 1993 年に相次いで報告されたことが初出である (Vulpe *et al.*, 1993、Chelly *et al.*, 1993、Mercer *et al.*, 1993)。原核微生物ではその後程なくして、*Enterococcus hirae* の有する蛋白のうちメンケス病蛋白のホモログが銅の輸送に関与していることが報告された (Odermatt *et al.*, 1993)。一方で銅シャペロンの最初の報告は出芽酵母における Atx1 が初出である。この蛋白については、銅存在環境下においてのみ銅輸送型 P 型 ATPase である Ccc2 と相互作用することが示された (Pufahl *et al.* 1997)。

銅シャペロンと銅輸送型 P 型 ATPase が協調して銅の"運搬" ("排出"ではなく) を行っている例は真核生物において多数の報告がなされている。モデル真核微生物である出芽酵母の銅シャペロンとしては上述の Atx1 の他に Cox17 と CCS が知られており、各々がゴルジ体の膜上銅輸送型 P 型 ATPase である Ccc2、ミトコンドリア内銅蛋白全般、スーパーオキシドジスムターゼに対して銅の輸送を行っていることが明らかになっている (Pufahl *et al.*, 1997、Rae *et al.*, 1999、Glerum *et al.*, 1996、Carr *et al.* 2002)。一方、原核微生物においては、銅輸送型 P 型 ATPase、もしくはこれと銅シャペロンのペアが銅の取り込みもしくは特定酵素への運搬を行っている例は報告されておらず、いずれも生体内の過剰濃度の銅を排出する役割を担っていると考えられている。過剰濃度の排出系としての銅シャペロン-銅輸送型 ATPase については、近年古細菌を題材に、その両者が持つ銅結合ドメイン間で直接銅イオンが受け渡されることの証明がなされた (Gonzalez-Guerrero and Arguello, 2008)。

### 1.1.2 原核微生物における銅シャペロンおよび銅輸送型 P 型 ATPase の転写制御因子

グラム陰性細菌における銅輸送型 P 型 ATPase や、グラム陽性細菌における銅輸送型 P 型 ATPase と銅シャペロンのペア (これらは往々にしてオペロンを形成している) については、それらの転写が生育環境中の過剰の銅により誘導されるという現象が観察されていた。これら遺伝子の「過剰濃度の銅を排出する」という役割上、この誘導現象は合目的的といえる。グラム陰性細菌においては、その銅輸送型 P 型 ATPase は MerR 型転写制御因子 CueR によって制御されているという報告が *E. coli* (Stoyanov *et al.*, 2001)、*Pseudomonas putida* (Adaikkalam *et al.*, 2002)、

*Rhizobium leguminosarum* (Reeve *et al.*, 2002) においてなされている。MerR は *E. coli* にて水銀耐性遺伝子の転写制御因子として同定されたものである。MerR はエフェクターである水銀が存在しない際には弱い転写抑制因子として標的遺伝子に結合しており、ひとたびエフェクターが結合すると、その結合 DNA 配列周辺の構造変化を引き起こし、強い転写促進因子として作用する (Ansari *et al.*, 1992; 1995)。CueR においては銅がエフェクター分子として機能することが明らかにされている。一方、グラム陽性細菌における制御因子については、近年、*Mycobacterium tuberculosis* を題材に新規蛋白である CsoR が同定された (Liu *et al.*, 2007)。CsoR はホモ 2 量体であり、その C 末端領域で DNA に結合して通常は転写抑制因子として機能している。1 つのホモ 2 量体に対し 2 個の銅イオンが結合することで、CsoR の標的 DNA に対する結合が解除される。この発見から程なくして、*Bacillus subtilis* においても銅シャペロン-銅輸送型 P 型 ATPase 系の制御は CsoR によってなされていることが報告された (Smaldone and Helman, 2007)。この研究グループは 2003 年に「*B. subtilis* の当該遺伝子群はグラム陰性細菌と同様 MerR 型転写因子によってなされている (Gaballa *et al.*, 2003)」と報告したが、2007 年の報告でこれを修正した。CsoR による制御は多くのグラム陽性細菌において普遍的であることが予想される。

### 1.1.3 *Streptomyces* 属に対する銅の影響

銅排出系から視点を移し、*Streptomyces* 属における銅の役割について過去の知見を記述する。*Streptomyces* 属にとって銅は特別な影響を持つ金属であることが知られている。繰り返し述べる通り *Streptomyces* 属の 2 大特徴は「形態分化」と「二次代謝」であるが、この両者は培地中への微量銅イオン添加によって劇的に活性化される (Kieser and Hopwood, 1991、Ueda *et al.*, 1997)。これは種々の金属のうち銅に特異的な現象であり、その他の金属（鉄、マンガン、亜鉛、モリブデン、カルシウム、コバルト、アルミニウム、バリウム、水銀、ニッケル、銀、リチウム、ルビジウム、カドミウム、タングステン、バナジウム、ゲルマニウム、チタン、ベリリウム、ストロンチウム、白金、金）では生じない (Ueda *et al.*, 1997)。*Streptomyces* 属の 2 大特徴が活性化されることから、基礎・応用いずれの観点からも非常に興味深い現象であるが、その機構はいまだ明らかにされていない。

#### 1.1.4. 本研究に至った経緯

著者がカタボライト抑制と二次代謝・形態分化に関する研究から銅に関連する遺伝子に着目するに至った経緯について説明する。多くの *Streptomyces* 属について、固体培地上で培養を行う場合、その培地中に高濃度グルコースを添加すると「形態分化」と「二次代謝」という *Streptomyces* 属の 2 大特徴が同時に強く抑制されることが観察されている (図 0.5)。この現象に対する一般的な説明はまだなされていないが、高濃度グルコースによる形態分化の抑制はグルコースカタボライト抑制の表現の 1 つであると考えられている。著者は修士論文研究においてこの「形態分化」の抑制に着目し、以下のように遺伝子探索を行った。*S. griseus* 野生株は、通常 4% グルコースを含む培地上で形態分化の抑制が観察される。これを踏まえ著者は、「*S. griseus* 野生株自身に高コピー導入することで 4% グルコースを含む培地上でも形態分化を行うように形態分化促進能を付与する DNA 断片」を *S. griseus* 野生株 DNA ライブラリからスクリーニングした。

スクリーニングの概要は以下の通りである (著者修士論文より)。制限酵素 Sau3AI (認識配列 GATC) で部分断片化した *S. griseus* 野生株クロモソームのうち、5-7 kb 断片に相当するものを抽出し、pIJ702 (1 細胞あたり 40-100 コピーの多コピー型放線菌プラスミド) の BglIII サイトに連結後、*S. griseus* 野生株に導入した。生じたコロニーのうち 3000 を判別培地に移植した。判別培地としては、YMP 寒天培地成分に終濃度 4% のグルコースを添加したものをを用いた。このスクリーニングの結果、通常形態分化が困難となるような高濃度グルコースを含む培地においても形態分化を引き起こさせる DNA 断片が 2 種類が得られた。

一方の断片 (これを含むプラスミドを pAS1 と命名) は、*S. griseus* において、形態分化カスケードのうち気中菌糸形成の直上流のシグナルを担うことが既に報告されている *amfTSBA* オペロン (Ueda *et al.*, 1993) のうち、プロモーター、*amfT* (SGR2397)、*amfS* (SGR2396)、*amfB* (SGR2395) を完全長として含むものであった。これらはその報告の通りグルコース抑制に関連するものではない。しかしながら形態分化と密接に関わる断片が得られたことから、本スクリーニングにより目的に準じた遺伝子が得られることが示された。

もう一方の断片は、TetR 型転写因子、銅シャペロン (*copZ*)、銅輸送型 P 型 ATPase (*copA1*)

とそれぞれ高い相同性を持つ蛋白を完全長としてコードするものであった (図 1.2、図 1.3)。 *S. griseus* 由来 CopZ (SgCopZ) ならびに CopA1 (SgCopA1) の、代表的な他種由来パラログとのアミノ酸アラインメント図を図 1.3 として掲載する。また当該断片を含むプラスミド (pAS2 と命名した) を導入した *S. griseus* 細胞の表現型を図 1.1 に掲載する。これらの遺伝子に関しては、過去に形態分化に関わるという報告および予想はなされておらず、その分子機構に興味を持った。著者は上記の背景を踏まえ「*S. griseus* において CopZ と CopA1 は銅排出系ではなく銅取り込みおよび輸送するための仕組みであり、これらが銅を内向きに輸送することで形態分化を促進するのではないか」という仮説を立て、その検証を行った。

修士論文研究により、これらについて以下の点が明らかとなった。

1. pAS2 は、形態分化能だけでなく二次代謝 (ストレプトマイシン生産) 能も促進する (図 1.1(c))。
2. pAS2 による促進能は、グルコースとは無関係である (グルコースを添加していない培地でも促進現象が見られた)。
3. pAS2 による促進能は、A-ファクター制御カスケードとは無関係である (A-ファクターが無効である  $\Delta arpA$  株に導入しても促進現象が見られた (図 1.1(a)下段))。
4. pAS2 に全長が含まれる遺伝子のうち、促進には、TetR 型転写因子ホモログをコードする遺伝子 (SGR4829) は必要ではない。すなわち、*copZ* と *copA1* のいずれか、もしくは両方が必要である。

*copZ* と *copA1* はオペロンを形成しており (図 1.5(a-b))、これらの転写は培地中への銅の添加により急激に誘導される (すなわち研究当初の仮説に反し、これらは過去に他のグラム陽性細菌において見いだされたものと同様銅の排出を行うものであることが強く示唆される)。

一方で、以下の点については未解明であった。

1. 促進に必要な遺伝子は、上記 pAS2 にコードされた遺伝子のうち *copZ* または *copA1* のみなのか。それとも両者であるのか。
2. 培地中への銅の添加により *copZ-copA1* のオペロン転写誘導が生じるが、その制御因子は何であるのか。

3. *S. griseus* ゲノム中には、*copZ* のパラログは存在しないが、*copA1* のパラログはクロモソーム上離れた位置に 1 つ存在している (*SGR3190.copA2* と命名した。図 1.3 に CopA2 のアラインメント図を掲載した)。この遺伝子はどのような機能を果たしているのか。
4. pAS2 によって形態分化ならびに二次代謝が促進されるのはどのような分子機構によるものであるか。

本研究では、修士論文研究にて未解決であったこれらの点について明らかにすることを目的とした。結果的に、研究開始当初に設定した仮説は反証され、「*copZ*、*copA1*、*copA2* は銅排出因子として機能する」ことが示された。これらの遺伝子がいかにして形態分化・二次代謝に正の影響を与えるかについても考察を行う。



## 1.2 材料と方法

### 1.2.1 pAS2 のサブクローニング

作製したサブクローニング用プラスミド群の概略を図1.2 に示した。

#### ・pUC-AS2 の構築

サブクローニングの準備として、pAS2 のショットガンクローニング配列全長を含む DNA 断片を大腸菌ベクターにライゲーションしたものを作製した。これを以下 pUC-AS2 と略記する。構築は以下の通り行った。pAS2 を、ショットガンクローニング挿入断片の 1.7 kbp 上流に存在する pIJ702 由来 EcoRV、ならびに同断片の 0.5 kbp 下流に存在する pIJ702 由来 PstI で切断し、pUC18 の HincII-PstI サイトにクローニングした。

#### ・SGR4829 (*copZ* に隣接して存在する、pAS2 のショットガンクローニング配列にその全長が含まれる遺伝子。TetR 型転写因子をコード) 過剰発現用プラスミド pAS2-4829 の構築

pAS2 を鋳型とし、プライマーセット 4829-for と 4829-rev (プライマー配列の詳細は表 1.1 にまとめた) によって SGR4829 中ほどの SphI サイトから *copZ* の N 末 1/3 程度までの 0.5 kbp を PCR 増幅した。エラーのないことを確認の上、これを pUC18 の EcoRI-PstI サイトにクローニングした。更に SphI-PstI 処理し、0.5 kbp のインサート断片を精製した。他方、pAS2 を、SGR4829 中ほどの SphI と、インサートから 0.5 kbp 下流の pIJ702 由来部分内 PstI で切断し、長断片を精製した。精製した両断片をライゲーションし、目的プラスミドとした。

#### ・*copZ* 過剰発現用プラスミド pAS2-Z の構築

pAS2 を SphI 処理し、SGR4829 中ほどの SphI から *copA1* N 末側の SphI までの 1.7 kbp 断片を得た。これを pIJ702 の SphI サイトにクローニングした。*orf* の向きが pIJ702 の持つ *mel* プロモーター (以下  $P_{mel}$ ) に影響されることを避けるため、インサーション配列の *orf* の方向が  $P_{mel}$  と逆であることを確認した。

・ *copZ-copA1* 同時過剰発現用プラスミド pAS2-ZA1 の構築

pAS2 を FbaI 処理し、*SGR4829* 内部に存在する FbaI から pAS2 ショットガンクローニング配列のほぼ末尾に存在する FbaI までの 3.9 kbp 断片を得た。これを pIJ702 の BglIII サイトにクローニングした。*copZ* 過剰発現用プラスミドの構築時と同様、インサージョン配列の *orf* の方向が  $P_{mel}$  と逆であることを確認した。

・ *copA1* 過剰発現用プラスミド pAS-A1 の構築

pUC-AS2 の 4.7 kb XbaI-StuI 断片 (*copZA* の転写開始点を+1 とした際に-3002 から+1723 を含む) を、pAS2 のショットガンクローニング配列から *copZ* 領域をインフレーム除去した 3.1 kb XbaI-StuI 断片に置き換えた。この 3.1 kb 断片は、 $\Delta copZ$  株構築時に用いたプラスミド pUZ-aph (後述) から切り出した。置き換えにより完成したプラスミドを pUC-AS2 $\Delta copZ$  と命名した。pUC-AS2 $\Delta copZ$  を大腸菌 JM110 株に導入し再調製することで脱メチル化し、3.6 kb の FbaI 断片 (インフレーム除去された *copZ* と *copA1* 全長を有する) を pIJ702 の BglIII サイトにクローニングした。*copZ* 過剰発現用プラスミドのほぼ末尾に存在する FbaI までの 3.9 kbp 断片を得た。これを pIJ702 の BglIII サイトにクローニングした。*copZ* 過剰発現用プラスミドの構築時と同様、インサージョン配列の *orf* の方向が  $P_{mel}$  と逆であることを確認した。

## 1.2.2 低解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングによる転写量解析

・ RNA 抽出

*S. griseus* 野生株を 100 ml YMPD 液体培地に植菌し、30°C, 120 rpm で 2 終夜振とう培養し、前培養菌体とした。前培養菌体をホモジナイズし、100 ml YMP 液体培地 (1% グルコースを添加したもの) に 0.1%植菌を行い 30°C, 120 rpm で 36 時間振とう培養した。培養後、終濃度 100  $\mu$  M となるように  $\text{CuSO}_4$  または  $\text{ZnSO}_4$  溶液を加え、更に 30 分または 2 時間同条件で振とう培養したのち集菌した。RNA 抽出には ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いた。

・プローブ作製に用いたプライマーセット

下記\*のものについて[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP によるラベリングを行った。ラベル時の酵素としては、T4 polynucleotide kinase (Takara 社) を用いた。

[hrdB 転写解析 (全 RNA 量のサンプル間統一のためのコントロールとして使用)]

LB-for と LB-rev\*

[copZ-copA1 転写解析]

LHeZ-for と LeZ-rev\*

[copA2 転写解析]

LHeA2-for と LA2-rev\*

[csoR 転写解析]

LR-for と LeR-rev\*

・低解像度 S1 ヌクレアーゼマッピング法

上記プライマーセットによって PCR 増幅を行い、アガロース電気泳動に供したのちゲルからの DNA 抽出を行うことで、片側 RI 標識プローブ溶液を調製した。約 500 cps のプローブと 20-50  $\mu\text{g}$  の RNA を 3 M NaTCA 溶液中で一晩かけて 65°C から 45°C へ徐々に冷却することによりアニールさせた。これに対して 37°C 1 時間 S1 ヌクレアーゼ消化を行った。イソプロパノール沈殿ののち formamide loading dye に溶解してサンプルとし、6%変性ポリアクリルアミドに 40 mA 定流で泳動した。

formamide loading dye

: 80% formamide, 10 mM EDTA, pH 8.0, 1 mg/ml BPB

6%変性ポリアクリルアミドゲル

: 21 g urea, 21.5 ml DW, 7.5 ml 40% acrylamide solution (acrylamide : N, N-methylene-bis (acrylamide) = 19 : 1), 5 ml 10×TBE buffer, 300 ml 10% APS, 50 ml TEMED

10×TBE buffer

: 162 g Tris, 27.5 g boric acid, 9.5 g EDTA · 2Na, DW up to 1 liter

running buffer

: 1×TBE buffer

### 1.2.3 高解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングによる転写開始点の決定

#### ・ RNA 抽出

低解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングの場合と同様の手法を用いた。

#### ・ プローブ作製に用いたプライマーセット

下記\*のものについて[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP によるラベリングを行った。ラベル時の酵素としては、T4 polynucleotide kinase（タカラ社）を用いた。

[*copZ-copA1* 転写開始点決定]

LHeZ-for と HZ-rev\*

[*copA2* 転写開始点決定]

LHeA2-for と HeA2-rev\*

[*csoR* 転写開始点決定]

HeR-for と HR-rev\*

#### ・ 高分解能 S1 ヌクレアーゼマッピング法

低分解能 S1 ヌクレアーゼマッピング法と同様の手法でサンプルを調製した。一方で、片側 RI 標識プローブに対してマキサムギルバート法における G+A 反応および T+C 反応を行うことで配列ラダーを調製し、サンプルと共に 6%変性ポリアクリルアミドに 1500 V 定圧で泳動した。

### 1.2.4 各種遺伝子破壊株の作製

作製した遺伝子破壊株群の概略を図 1.6(a-c)に示した。

#### ・ $\Delta copZ$ の作製

下流に存在する *copA1* への極性効果の可能性を避けるため、シングルクロスオーバー法による組み替えを 2 回行うことで *copZ* の除去による破壊を行った。破壊株作製用プラスミドの構築は以下の通り行った。プライマーセット DZ1-for と DZ1-rev を用いて *SGR4829* 中ほどの *NaeI* から *copZ* のほぼ N 末端まで 0.5 kbp を PCR 増幅し、pUC18 の *BamHI*-*PstI* サイトにクローニングした。エラーのないことを確認したのち、*NaeI*-*PstI* で切断して 0.5 kbp 断片を得た。これを断片 (1) とする。次に、pUC-AS2 を、*SGR4829* 中ほどの *NaeI* と *SGR4829* 上流 pIJ702 由来部分内 *SacI* で切断した。これを断片 (1) とライゲーションし、プラスミドを得た。得られたプラスミドを *SacI*-*PstI* で切断し、得られた断片を断片 (2) とした。他方、プライマーセット DZ2-for と DZ2-rev を用いて *copZ* の直後から *copA1* の N 末端側に存在する *NcoI* サイトまでの 1.3 kbp を PCR 増幅し、pUC18 の *PstI*-*BamHI* サイトにライゲーションした。エラーのないことを確認した。これを *PstI*-*NcoI* で切断し、得られた断片を断片 (3) とした。続いて、pUC18-AS2 の *copA1* の N 末側 *NcoI* から *copA1* 内下流の *SacI* までの断片を取得した。この断片と断片 (3) をインサクション配列とし、*PstI*-*SacI* で切断した pUC18 をベクターとして 3 断片ライゲーションを行った。得られたプラスミドを *PstI*-*EcoRI* 処理し、インサクション配列全長にあたる断片を取得した。これを断片 (4) とした。断片 (2) と断片 (4) をインサクション配列とし、*PstI*-*SacI* で切断した pUC-Kmr (3, 5) をベクターとして 3 断片ライゲーションを行い、最終的な *copZ* 破壊用プラスミドを得た。これを JM110 に導入後再調製することでメチル化フリーのプラスミドを得、定法通りシングルクロスオーバー法による組み替えを 2 回行うことで  $\Delta copZ$  株を得た。

#### ・ $\Delta copA1 :: Km^r$ の作製

プライマーセット DA1-for と DA1-rev を用いて *copA1* 内下流の *BglII* から 1.0 kbp 下流までを PCR 増幅した。これを pUC18 の *EcoRI*-*XbaI* サイトにクローニングした。エラーのないことを確認したのち、*BglII* から *PstI* までの 1.0 kbp 断片を取得し、これを断片 (5) とした。その一方で、pUC-AS2 を、内部に 4 つ存在する *BalI* サイトで切断し、最も外側の 2 つをセルフライゲーションさせた。このプラスミドを *copA1* のわずか下流に存在する *NcoI* と pUC18 マルチクローニングサイト由来 *PstI* とで切断し、得られた断片を断片 (6) とした。更に pAS2 を、*copA1* のわずか

下流に存在する NcoI と、0.7 kbp 下流の BglII とで切り出し、0.7 kbp 断片を精製した。この断片と断片 (5) をインサクション配列とし、配列 (6) と 3 断片ライゲーションを行うことでプラスミドを得た。続いてこのプラスミドを、*copA1* 下流の HindIII と、より下流の pUC18 由来 HindIII とで切断し、セルフライゲーションさせてプラスミドを得た。これを BalI で切断して精製し、断片 (7) とした。断片 (7) に、SmaI にて切り出した Tn5 由来カナマイシン耐性遺伝子 *aphII* を含む 1.3 kb 断片を挟みこんだプラスミドを得た。これを JM110 に導入して大量調製し、定法通りダブルクロスオーバー法による組み替えを 1 回行うことで  $\Delta copA1 :: Km^r$  株を得た。

#### ・ $\Delta copA2$ の作製

*S. griseus* 全ゲノム配列解読時に用いられたプラスミドライブラリを利用した (Ohnishi et.al., 2008)。本プラスミドライブラリは、大腸菌ベクター pTS1 (pUC *ori* とアンピシリン耐性遺伝子を有する。ニッポンジーン社製) のマルチクローニングサイト上 HincII サイトに、*S. griseus* クロモソームが物理的に剪断されたもの (平均長 10 kb) をランダムにクローニングしたものである。本プラスミドライブラリより、*copA2* 全長およびその上下流少なくとも 3 kb を含むものを選抜し、これを pTS1-DcopA2 と命名した。まず pTS-DcopA2 について、*copA2* の開始コドン 1 文字目を +1 とした際に +1061 および +3088 に存在する BalI サイトにて制限酵素処理を行い、生じた 2028 bp の断片を pUC19 マルチクローニングサイト由来 HincII サイトにクローニングした。正しい方向にクローニングされたものを制限酵素処理により選出し、これを pUC-DcopA2-1 とした。次に、pTS1-DcopA2 について、*copA2* の開始コドン 1 文字目を +1 とした際に -1552 および +60 に存在する SacI サイトにて制限酵素処理を行い、生じた 1612 bp の断片を pUC-DcopA2-1 上 pUC19 マルチクローニングサイト由来 SacI サイトにクローニングした。正しい方向にクローニングされたものを制限酵素処理により選出し、これを pUC-DcopA2-2 とした。pUC-DcopA2-2 の HindIII サイトに、HindIII にて切り出した Tn5 由来カナマイシン耐性遺伝子 *aphII* を含む 1.1 kb 断片を挟みこんだ。これを JM110 に導入後再調製することでメチル化フリーのプラスミドを得、定法通りシングルクロスオーバー法による組み替えを 2 回行うことで  $\Delta copA2$  株を得た。

・  $\Delta copA1 :: Km^r / \Delta copA2$  二重破壊株の作製

上記  $\Delta copA2$  に対し、更に上記  $\Delta copA1 :: Km^r$  作製手法を適用することで二重破壊株を作製した。

・  $\Delta csoR$  の構築

プライマーセット DR-1-for と DR-1-rev で増幅した断片を、pUC19 のマルチクローニングサイト上 EcoRI-BamHI サイトにクローニングした (pUC-DcsoR-1)。同様にプライマーセット DR-2-for と DR-2-rev で増幅した断片を、pUC19 のマルチクローニングサイト上 BamHI-HindIII サイトにクローニングした (pUC-DcsoR-2)。pUC-DcsoR-2 を BamHI-HindIII にて消化し、これを pUC-DcsoR-1 の BamHI-EcoRI サイトに連結することで、インフレーム除去された *csoR* とその上下流約 1.5 kb を含むプラスミドを得た (pUC-DcsoR-3)。pUC-DcsoR-3 の HindIII サイトに、HindIII にて切り出した Tn5 由来カナマイシン耐性遺伝子 *aphII* を含む 1.1 kb 断片を挟みこんだ。これを JM110 に導入後再調製することでメチル化フリーのプラスミドを得、定法通りシングルクロスオーバー法による組み替えを 2 回行うことで  $\Delta csoR$  株を得た。

### 1.2.5 遺伝子破壊株の銅感受性測定

*S. griseus* 野生株、 $\Delta copZ$  株、 $\Delta copA1 :: Km^r$  株、 $\Delta copA2$  株、 $\Delta copA1 :: Km^r / \Delta copA2$  二重破壊株をそれぞれ 100 ml YMP 液体培地 (終濃度 1% のグルコースを加えたもの) に植菌し、30°C, 120 rpm で 2 終夜振とう培養し、前培養菌体とした。前培養菌体をホモジナイズし、100 ml YMP 液体培地 (終濃度 1% のグルコースを加えたもの) に適宜  $CuSO_4$  溶液を加えたものに 0.1% 植菌を行い 30°C, 120 rpm で 55 時間振とう培養した。ポアサイズ 8.0  $\mu m$  フィルターペーパー (ミリポア社製) を用いて吸引濾過による集菌を行い、菌体を乾熱器にて十分に乾燥させたのち乾重量を測定した。別個に 3 もしくは 4 回の実験を行い、データを平均化した。

### 1.2.6 CsoR 生産

大腸菌を用いて異種発現を行った。異種発現用ベクターを以下のように構築した。プライマ

ーセット PR-for と PR-rev を用いて *csoR* コード領域全長を増幅した。得られた増幅断片を大腸菌発現ベクター pCold IV (Takara 社) のマルチクローニングサイト上 NdeI-BamHI サイトにクローニングし、PCR エラーのないことを確認した。このプラスミドを pCold-CsoR とし、これによって大腸菌を形質転換した。宿主としては *E. coli* BL21(DE3)Gold (ストラタジーン社) を用いた。前培養菌体を LB 液体培地に 0.1% 植菌し、37°C, 120 rpm で 2.5 時間培養した。その後定法に従い、15°C にて 1 時間静置したのち終濃度 0.3 mM の IPTG を添加し、15°C, 120 rpm で 24 時間培養した。遠心にて菌体を回収後、Lysis Buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM イミダゾール, 10% グリセロール, pH8.0) に懸濁し超音波破碎に供した。これを 20000 x g, 30 分, 4°C 遠心し、0.22 µm 径のフィルターにて濾過したものを蛋白可溶性画分とした。得られた蛋白可溶性画分は、小分けして分注したのち液体窒素によって急速冷凍し、-80°C に保存した。これを適宜解凍し、下記の電気泳動遅延アッセイに用いた。ネガティブコントロールとしては、*csoR* 遺伝子を含まない pCold IV 空ベクターを導入した菌体に対し同一の処理を行ったものを用いた。

### 1.2.7 電気泳動移動度遅延アッセイ

#### ・プローブ作製

以下のプライマーセットを用いてプローブ用 DNA 断片を増幅を行った。

[*copZ-copA1* 上流プローブ]

LHeZ-for, LeZ-rev

[*copA2* 上流プローブ]

LHeA2-for, HeA2-rev

[*csoR* 上流プローブ]

HeR-for, LeR-rev

これら増幅断片を T4 polynucleotide kinase を用いて[γ-<sup>32</sup>P] ATP によりラベルしたのち、フリーの[γ-<sup>32</sup>P] ATP を QIAquick Spin column (キアゲン社) を用いて除去した。

#### ・結合反応と電気泳動



結合バッファーとして以下の組成の溶液を用いた。20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 µg/ml BSA、50 mM NaCl、1 mM DTT、5 µg/ml サケ精子 DNA、10% (v/v) グリセロール。反応系の容量は 20 µl とした。結合反応は、室温にて 30 分間行った。電気泳動については、ゲルは 1x TA バッファー (TAE から EDTA を除いたもの) に基づく 6% アクリルアミドゲルを、泳動バッファーは 1x TA バッファーを用い、36 mA, 90 分の泳動条件にて行った。

### 1.3 結果

#### 1.3.1 形態分化の促進には *copA1* のみの導入で充分である

スクリーニングによって得られた、高コピー導入により形態分化と二次代謝を促進する遺伝子断片のうち、どの部分が必要であるかを調べるべく、サブクローニングを行った。図 1.2 に模式的に示したようにサブクローニングを行った。この結果、図 1.2 に示すように、形態分化促進には *copA1* のみで充分であることがわかった。

#### 1.3.2 *copA1* パラログ *copA2* も培地中への銅イオン添加によってその転写が誘導される

修士論文研究により、培地中への終濃度 100  $\mu\text{M}$  の  $\text{CuSO}_4$  添加により *copZ-copA1* の転写がわずかに 30 分で劇的に増加することが示されていた。*S. griseus* ゲノム解読により、*copZ* には *S. griseus* 内パラログ遺伝子は存在しないが、*copA1* についてはパラログ *copA2* が存在することがわかった。これに関しても培地中への銅イオン添加による転写量の変動を調べた結果、*copZ-copA1* と同様転写量の誘導が見られた。いずれの転写も、銅添加後 30 分で劇的に誘導され、添加後 120 分には減衰していた (図 1.4 レーン 2, 3)。一方、同濃度の  $\text{ZnSO}_4$  では転写量の顕著な増加は見られなかった (図 1.4 レーン 4)。これらの結果から、*S. griseus* における *copZ-copA1* ならびに *copA2* は、当初の仮定に反し、過剰な生体内の銅を排出する役割を担うものであると予想された。両者が共通の転写制御を受けることを裏付けるように、*copA2* の上流領域には *copZ-copA1* の上流領域に見られるものと同様の反復繰り返し配列が見られた。*copZ-copA1* 上流配列は TATACCCCCTAGGGGTATA であり、*copA2* 上流配列は GATACCCCCTAGGGGTATC であった (反復繰り返しに相当する部分を下線で示した)。いずれも中間に 3 nt のスペーサーが含まれる 8+3+8 の配列であり、計 19 nt の中央 17 nt は両者で同一であった (図 1.5(c-d))。

#### 1.3.3 *copZ*, *copA1*, *copA2* は *S. griseus* において過剰な銅イオンに対する耐性を付与する

*copZ*, *copA1*, *copA2* が生体内の過剰な銅イオンを排出する役割を担うという予想を裏付けるべ

く、これらの遺伝子の破壊株を構築した。*copA1* ならびに *copA2* は、そのコードする蛋白が相互に高い相同性を持つことから、相互に機能の補償を行うことが予想されたため、*copA1/copA2* 二重破壊株についても構築を行った。破壊株の模式図を図 1.6(a-b)として示した。これら破壊株について、過剰の銅イオンを添加した培地における生育の比較を行った。その結果、*copA1* を単独に破壊した株においては野生株と有意な差が見られなかったが、*copA2* 単独破壊により若干の銅イオン耐性の低下が見られ、更に *copZ* 破壊株、ならびに *copA1/copA2* 二重破壊株においては、野生株と比較して顕著な銅イオン耐性の低下が見られた (図 1.6(d))。この結果から、*copZ*、*copA1*、*copA2* は *S. griseus* において過剰な銅イオンに対する耐性を付与すること、ならびに *copA1* と *copA2* は互いに補償して機能しうることが示された。

#### 1.3.4 *csoR* オルソログ破壊株において *copZ-copA1* と *copA2* は恒常的に転写される

上記の通り、*copZ-copA1* と *copA2* が培地中への銅イオン添加により同様の転写誘導を示し、更に両者がその遺伝子上流領域に同様の反復繰り返し配列を持つことから、両者は同一の転写因子により制御されていることが予想された。近年、非 *Streptomyces* 型放線菌に属する *Mycobacterium tuberculosis* において、銅輸送型 P 型 ATPase を制御する遺伝子が、当該遺伝子の直上流に発見された。当該遺伝子のコードする蛋白は CsoR と命名された。結晶構造解析の結果、CsoR は過去に報告されているどの転写因子ファミリーにも属さず、新規ファミリーを形成するものであると提唱された (Liu *et al.*, 2007)。この報告に引き続き、低 GC 含有型グラム陽性細菌である *Bacillus subtilis* に関しても、やはり銅シャペロン-銅輸送型 P 型 ATPase オペロンを制御するのはこれらの直上流にコードされている CsoR ホモログであることが示された (Smaldone and Helmann, 2007)。これらの報告を受け、著者はゲノム情報より *S. griseus* 内 CsoR オルソログの探索を行った。その結果、*copZ-copA1* ならびに *copA2* とは離れた位置に、32%の相同性と 56%の相似性を有する蛋白をコードする遺伝子 SGR3927 が見いだされた (*copZ-copA1* は SGR4828-SGR4827、*copA2* は SGR3190 であるから、いずれも SGR3927 と遠く離れている)。 *M. tuberculosis* 由来 CsoR の構造解析により明らかとなっている、銅結合に関わるアミノ酸残基 3 つはいずれも保存されていた。 *M. tuberculosis* 由来 CsoR (MtCsoR)、 *B. subtilis* 由来 CsoR (BsCsoR)

および SGR3927 (SgCsoR) のアミノ酸アラインメント図を図 1.7(a)として掲載する。本 *csoR* オルソログ遺伝子の機能解析のため、当該遺伝子の破壊株を構築した。破壊株クロモソームの模式図を図 1.6 に掲載した。当該破壊株について低解像度 S1 マッピングによる解析を行った結果、野生株と異なり *copZ-copA1* ならびに *copA2* の転写量が培地中に銅イオンを添加することなく恒常的に生じていることがわかった (図 1.4 レーン 5, 6)。この結果から、*copZ-copA1* と *copA2* は *in vivo* レベルで CsoR によって制御されていることが示された。

### 1.3.5 銅イオンの添加により *csoR* の転写も促進される

培地中へ終濃度 100  $\mu$ M の CuSO<sub>4</sub> 添加した際の野生株における *csoR* 転写応答を、1.3.2 と同様に観察した。結果、*copZ-copA1* と *copA2* だけでなく *csoR* についても転写の促進が見られた (図 1.4)。この結果から、CsoR は自身をコードする遺伝子を直接もしくは間接的に自己制御している可能性が考えられた。1.3.2 にて述べた通り、*copZ-copA1* と *copA2* の遺伝子上流領域には同一の反復繰り返し配列が見られた。同様の配列を *csoR* 遺伝子上流から探索したところ、相同性を持つ反復繰り返し配列 TATACCCGGCAGGGGTATC (反復繰り返し配列に相当する部分を下線で示した) が見いだされた (図 1.5(e))。

### 1.3.6 *copZ-copA1*, *copA2*, *csoR* の転写開始点決定

高解像度 S1 マッピング法により、*copZ-copA1*, *copA2*, *csoR* の転写開始点決定を行った。*copZ-copA1* ならびに *copA2* については転写開始点がただ 1 つに定まらず、プラスマイナス 2 塩基程度の位置からほぼ均等に転写がなされていた。各々の転写開始位置より、予想される -10/-35 領域を過去の報告に従い同定した (Strohl, 1992)。-10/-35 領域間のスペーサー長はいずれも 17 bp であった。CsoR 結合サイトと予想される反復繰り返し配列は、*copZ-copA1* については -10 領域と一部重複するように、*copA2* については転写開始点のわずか下流に、*csoR* については転写開始点と重複するように位置していることがわかった (図 1.5(c-e))。

### 1.3.7 大腸菌異種発現系を用いた CsoR 生産と電気泳動移動度遅延アッセイによる CsoR の DNA 結合能の観察

*copZ-copA1, copA2, csoR* の遺伝子上流領域に対し CsoR が *in vitro* レベルで結合することを確認するべく、大腸菌異種発現系を用いて CsoR の生産を試みた。複数種類の手法により CsoR の完全精製を試みたが、以下の通り有意な結果は得られなかった。過去に得られた *M. tuberculosis* 由来 CsoR の結晶構造より、N 末端がその構造に大きく関わることはないと判断された (Liu *et al.*, 2007)。そこで最初に、N 末端にヒスチジンタグを融合させた CsoR (CsoR-H)を得るべく、低温ショックを利用した発現ベクター pCold I による生産を試みた。本発現系により可溶性 CsoR-H が著量得られ、Ni-NTA カラムにより SDS-PAGE 泳動後クマシーブリリアントブルー染色にて単一バンドとなるように精製を行うことに成功したものの、この精製蛋白は各種 DNA に対して結合能を持たなかった。*M. tuberculosis* 由来 CsoR については、銅イオンが CsoR に結合すると CsoR の DNA に対する結合能が失われることが報告されていた。よって蛋白精製時に金属であるニッケルに曝露したことにより、CsoR に銅が結合したときと同様の、あるいは類似した状態となり、CsoR が DNA 結合能を失った可能性が考えられた。次に、融合蛋白でないネイティブな CsoR を、低温ショックを利用した、融合タグ付加のない発現ベクター pCold IV を用いて生産させ、ここから精製を試みた。しかしながら、粗精製の段階では DNA 結合活性が見られるにもかかわらず、精製が進むにつれその活性は失われる傾向にあった。*S. griseus* の CsoR は不安定であるのかもしれない。そのため精製を行わず、pCold IV にて CsoR を生産させた大腸菌の可溶性細胞抽出液を用いて解析を行うこととした。pCold-csoR を保持する大腸菌の可溶性細胞抽出液を対照とし、電気泳動移動度遅延アッセイを行った。CsoR が可溶性画分に生産されることを、SDS-PAGE にて確認した (図 1.7(b))。結果、*copZ-copA1, copA2, csoR* いずれの遺伝子上流域を含むプローブについても、CsoR 生産大腸菌の可溶性細胞抽出液 2.8 µg を添加することで電気泳動移動度の遅延が見られた (図 1.7(c-e)レーン 3)。ネガティブコントロールとして、pCold IV (空ベクター) を有する大腸菌に対し培養、IPTG 誘導、細胞破碎等同じ作業を行ったものの可溶性細胞抽出液 2.8 µg を添加し上記 DNA 断片のバンドシフトを確認したが、バンドシフトは観察されなかった (図 1.7(c-d)レーン 2)。以上の結果より、*S. griseus* において CsoR は、*copZ-copA1, copA2, csoR* 自身

をいずれも直接制御していることが示唆された。次に、CsoR のこれら遺伝子上流域に対する結合親和性の差を調べた。同一ロットの上記可溶性細胞抽出液を段階希釈し、上記各プローブと CsoR との親和性を調べた結果、*copZ-copA1* ならびに *copA2* 上流域を含むプローブに関しては 0.71-1.0  $\mu\text{g}$  (図 1.7(c,d)レーン 6-7) の CsoR 生産大腸菌可溶性蛋白でプローブ全体のうち 50%のシフトが観察された。他方、*csoR* 上流を含むプローブを全体のうち 50%シフトさせるには 1.4  $\mu\text{g}$  の当該蛋白が必要であった (図 1.7(e)レーン 5)。このことから、*copZ-copA1* ならびに *copA2* 上流域は *csoR* 上流域に比べ、CsoR に対し 1.4-2.0 倍の親和性を持つことが示された。

#### 1.4 考察

過去の研究により得られてきた *Streptomyces* 形態分化関連遺伝子のうち大多数は、形態分化不全変異株の遺伝子的相補によって得られたものである。代表例は、序論にて記述した *S. coelicolor* A3(2)における複数の *bld* ならびに *whi* 遺伝子群である。この研究手法は、形態分化に必至な遺伝子を同定するのに適しているといえる。他のいくつかの形態分化関連遺伝子については、形態分化変異株に多コピー導入した際にその形態分化不全を抑制する、いわゆるマルチコピーサプレッサーとして同定されてきた。例えば本研究のスクリーニングでも得られた *amf* 遺伝子クラスター(1.1にて前述)は、細胞内に多コピー数存在する際に *bald* 変異株である HH1 株(A-factor 不全変異株)の気中菌糸形成を促進するものとして同定された (Ueda *et al.*, 1993)。本章で著者が用いたスクリーニング法は、この「マルチコピーサプレッサーによる形態分化関連遺伝子の取得」を更に発展させたものである。著者は野生株をショットガンクローニングのホストとし、スクリーニングのための植菌培地としては、通常親株においては形態分化が抑制される培地である 4%グルコース含有 YMP 寒天培地を用いた。その結果として、4%グルコース含有寒天培地上においてもその多コピー導入によって形態分化が可能となる 2 個の異なる DNA 断片を得た。このうち一方が *amfTSBA* オペロンの大部分を含んでいたという結果は理にかなったものである。もう一方は *copZ* と *copA1* を含んでおり、しかもこれらは、多コピー導入によって形態分化だけでなくストレプトマイシン生産も促進した。この促進現象はグルコース抑制とも A-factor 制御カスケードとも独立であった。続く解析の結果、著者は CopZ (銅シャペロン) と CopA1 (銅輸送型 P 型 ATPase)、および CopA1 のホモログ CopA2 は、*S. griseus* において銅排出システムとして機能していると判断した。これは、*Streptomyces* における銅排出システムとして初めての報告である。

本研究では更に、*copZ-copA1* ならびに *copA2* の制御因子が CsoR であることの証明も行った。過去に CsoR の解析がなされている *M. tuberculosis* においては、*csoR* (*rv0967*) は機能未知遺伝子 (*rv0968*) を挟んで *copA* ホモログ (*rv0968*) と隣接しており、これら 3 遺伝子がオペロンを形成している。CsoR は自身をコードする遺伝子上流に結合することで、自身を含むオペロン

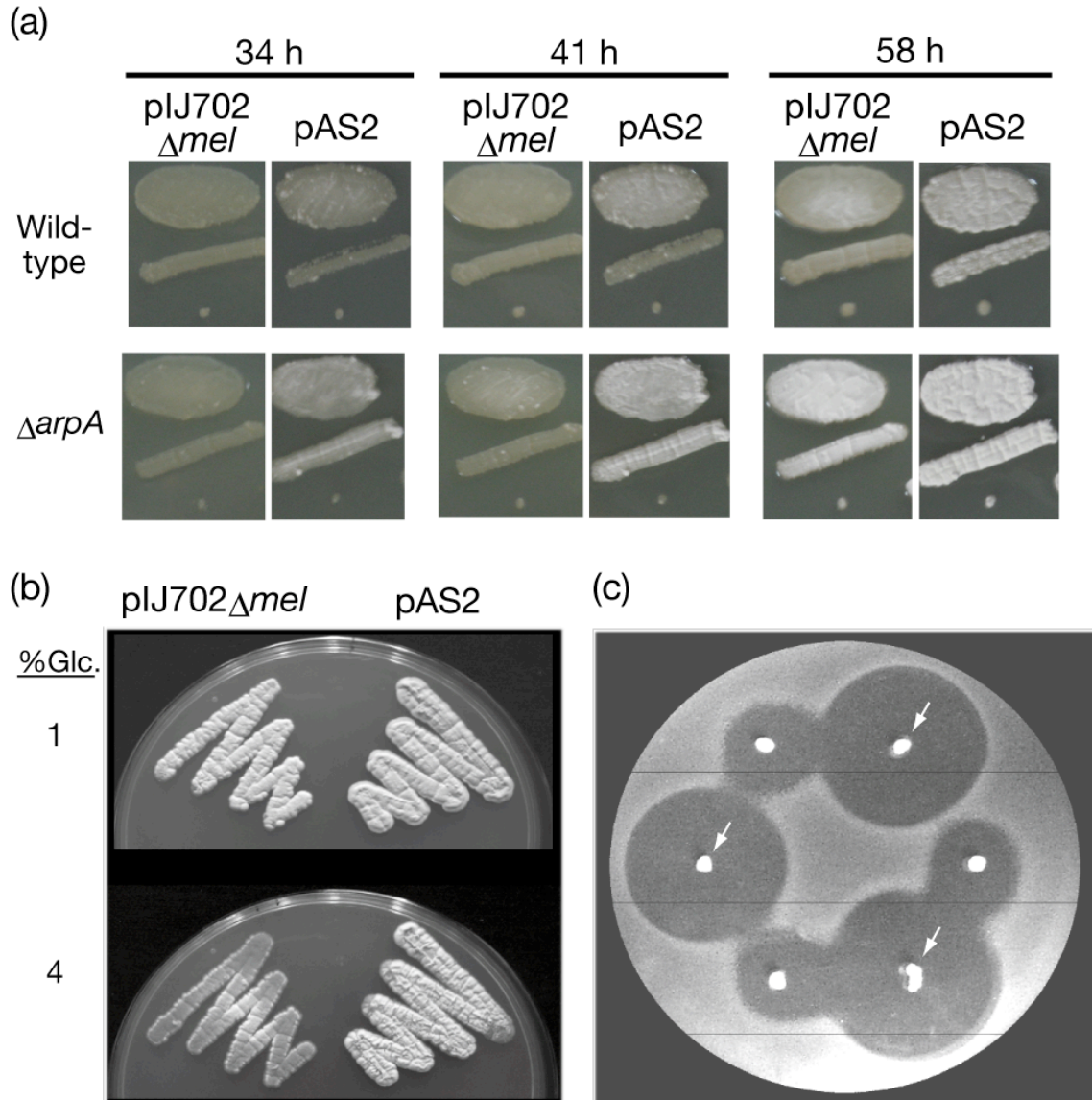
の制御を行っている (Liu *et al.*, 2007)。また *B. subtilis* では、*csoR*、*copZ*、*copA* がこの順に同一方向を向いて隣接して存在しており、CsoR は *copZ* の上流に結合することが示されている (*csoR* 上流については検討がなされていない) (Smaldone and Helmann, 2007)。すなわちどちらの種においても CsoR は自身をコードする遺伝子のごく近傍にて制御を行っている。その一方で今回研究を行った *S. griseus* においては、銅制御系機能遺伝子がクロモソーム上 2 ヶ所にばらばらに存在する上に、*csoR* 自身もこれらと離れた位置に存在しながら、*copZ-copA1*、*copA2*、そして自身という 3 者を制御していることは非常に興味を持たれる点である。これは *Streptomyces* の特徴かもしれないし、もしかすると他のグラム陽性菌種でも CsoR に制御される遺伝子が複数存在するのかもしれない。各遺伝子の上流に存在する推定 CsoR 結合領域について、*copZ-copA1* および *copA2* 上流に存在する配列は同一であったが、*csoR* 上流のものについては相同性が小さかった。実際、CsoR の結合親和性は、前者に対してのものが後者のそれに比べ 1.4 から 2.0 倍高いと算出された。この微妙な差異により、CsoR によって制御される強さが調節されているのかもしれない。

過去に、非常に低濃度の銅が *Streptomyces* の形態学的・生理学的分化に正の影響を与えることが知られている。しかしながら、これに対する分子メカニズムは不明確なままである。本論文で著者は *copZ-copA1*、*copA2* の転写量は銅の存在時に劇的に上昇すること、および *copA1* の高コピー導入が *S. griseus* における形態分化と二次代謝を正に制御することを示した。このことから、銅の添加によって誘導される CopA1 の過剰生産が銅による形態分化・二次代謝に対する正の影響を説明できるかもしれないと着想した。しかしながら、 $\Delta copZ$  や  $\Delta copA1::Km^r$  でも野生株と同様、100  $\mu M$   $CuSO_4$  の培地中への添加によって促進が生じることが観察された。この結果から、銅による形態分化・二次代謝への正の影響は、銅排出系蛋白の過剰生産とは独立であると考えられる。過去に、銅による形態分化促進の原因を探るための実験が他グループによってなされている。Endo らは *S. griseus* の細胞外フェノールオキシダーゼ (EpoA) の活性が銅の添加により強められ、これが形態分化開始に関与している可能性があることを報告している (Endo *et al.*, 2002)。このように、*Streptomyces* に対する銅による正の影響には、独立したいくつかの異なる経路が存在するのかもしれない。

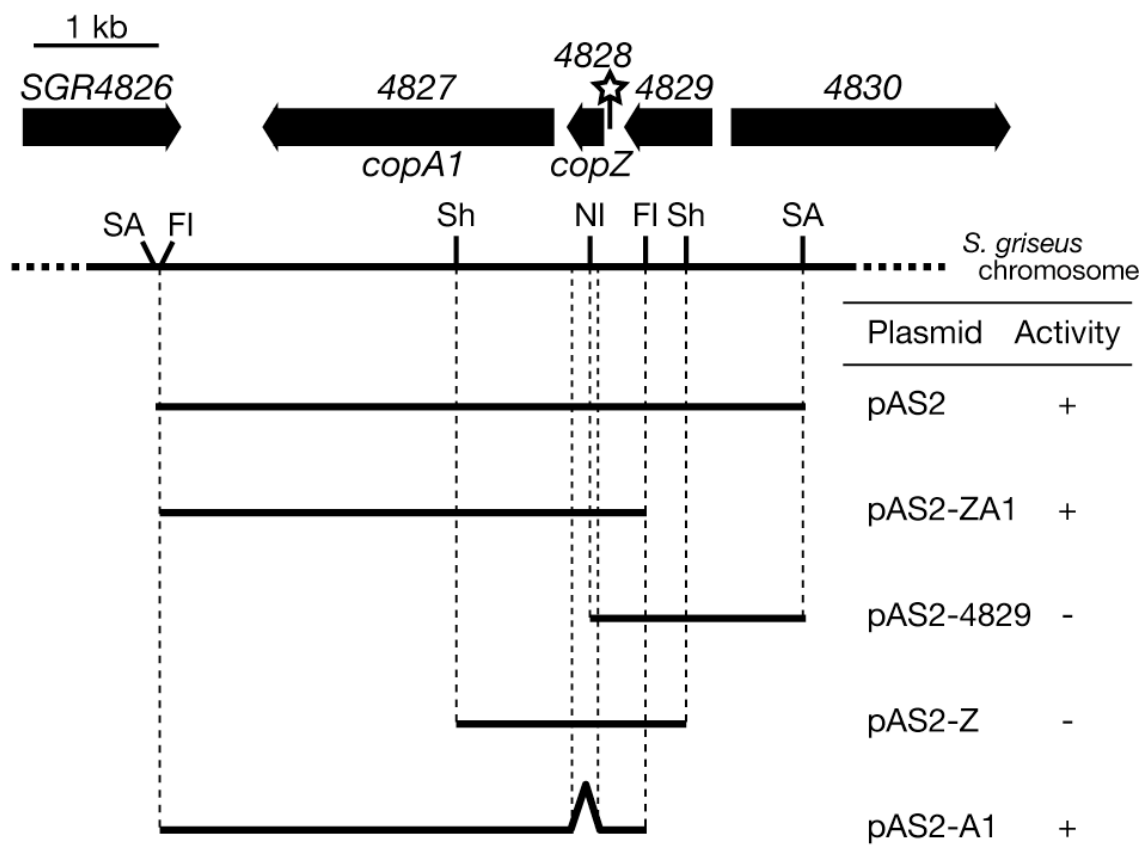


なぜ銅排出型 P 型 ATPase の過剰生産が *S. griseus* において形態分化とストレプトマイシン生産を促進するのだろうか？ グラム陰性菌の例、ならびに *S. griseus* の CopA2 がシャペロンとペプタゼを組まずに存在することから考えても、銅輸送型 P 型 ATPase はシャペロンが存在せずともある程度機能できることが考えられるので、過剰発現により銅イオンの過剰な排出が起こることが予想される。生体内に銅が豊富に存在する時に二次代謝と形態分化は促進されるが、逆に枯渇しても二次代謝や形態分化に至るようなメカニズムが存在するのかもしれない。残念ながらこれらの仮説は空想の域を出ない。しかし少なくとも、まったく予想外の遺伝子の過剰発現によって形態分化と二次代謝を促進するという発見は *Streptomyces* の基礎・応用両研究に対して重要な知見であると考えられる。

## 1.5 図表



**図 1.1** pAS2 導入による *S. griseus* の形態分化と二次代謝の促進。(a) pAS2 導入による形態分化の促進。使用培地は YMP 寒天培地に 1% グルコースを添加したもの。上段は *S. griseus* 野生株。下段は *S. griseus*  $\Delta arpA$  株 (*arpA* が存在せず、形態分化・二次代謝のグローバル転写因子 *AdpA* が恒常的に発現しているため、通常でも早期の形態分化が生じる)。いずれ株においても、空ベクター pIJ702 $\Delta mel$  導入株に比べ、pAS2 導入株における形態分化の促進が見られる。(b) pAS2 導入により 4% グルコース含有 YMP 寒天培地上においても野生株の形態分化が可能となる。上段は 1% グルコース含有 YMP 寒天培地。下段は 4% グルコース含有 YMP 寒天培地。(c) pAS2 導入による二次代謝の促進。ストレプトマイシンアッセイ法により、ストレプトマイシン生産量をハロー径で比較した。矢印を付したものは pAS2 導入野生株、付していないものは pIJ702 $\Delta mel$  導入野生株。



**図 1.2** pAS2 のサブクローニング。最上段に *S. griseus* 野生株における *copZ*, *copA1* 近傍の遺伝子構成を示した。星印は、後述の CsoR 結合サイトと予想される反復繰り返し配列の位置を示す。制限酵素サイトの略称は以下の通り。SA, Sau3AI; FI, FbaI; Sh, SphI; NI, NruI。各導入プラスミドの含む領域を水平方向の線で示した。また、それらを導入した際の形態分化促進作用の有無を Activity として +/- で示した。

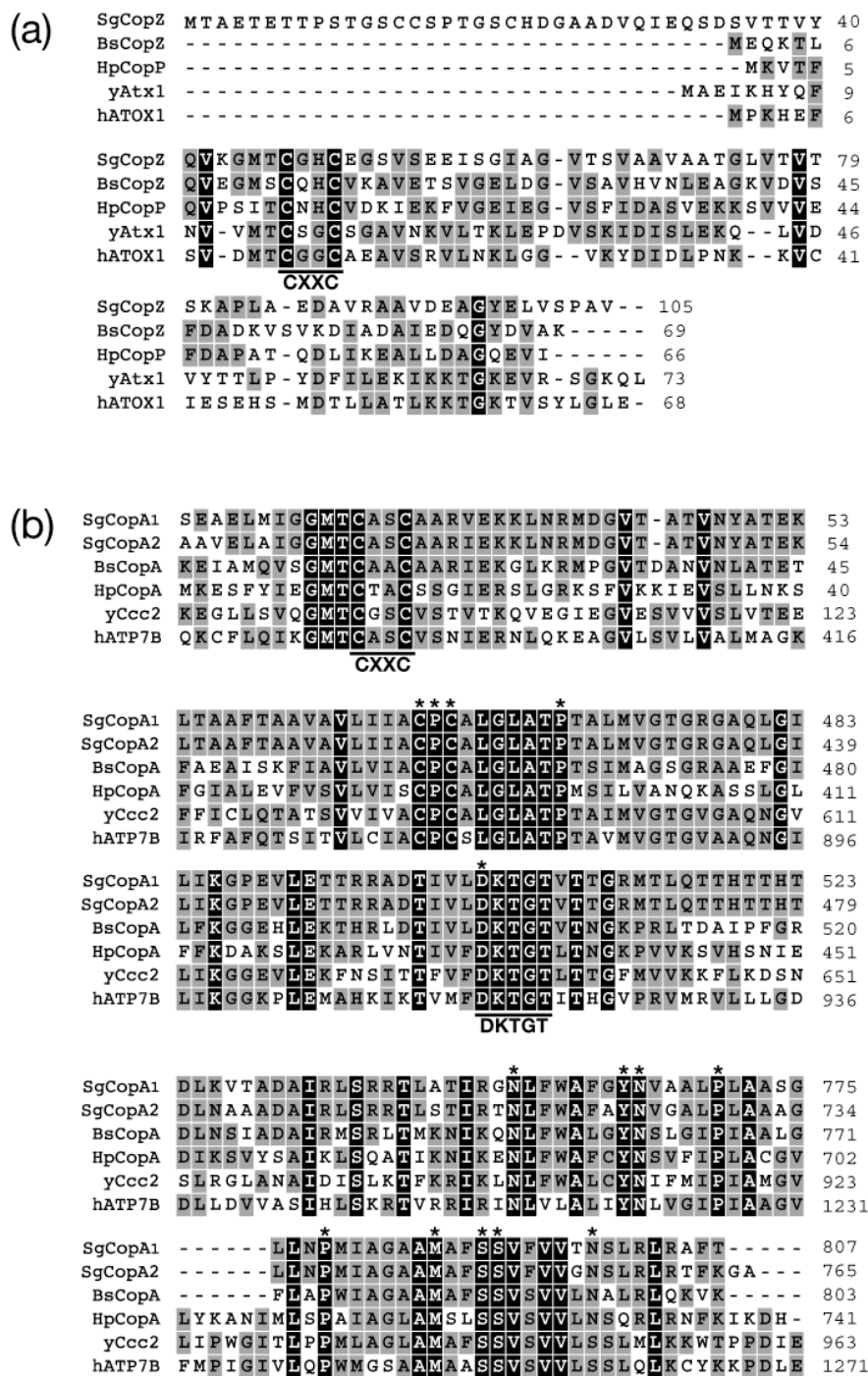
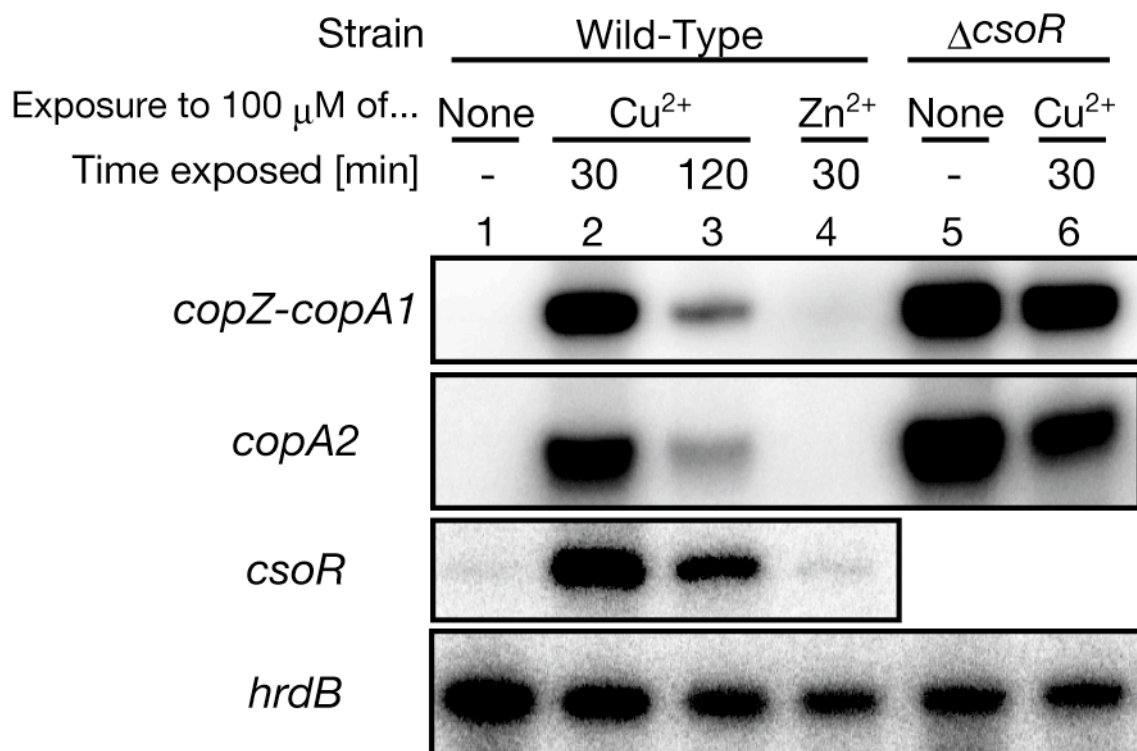
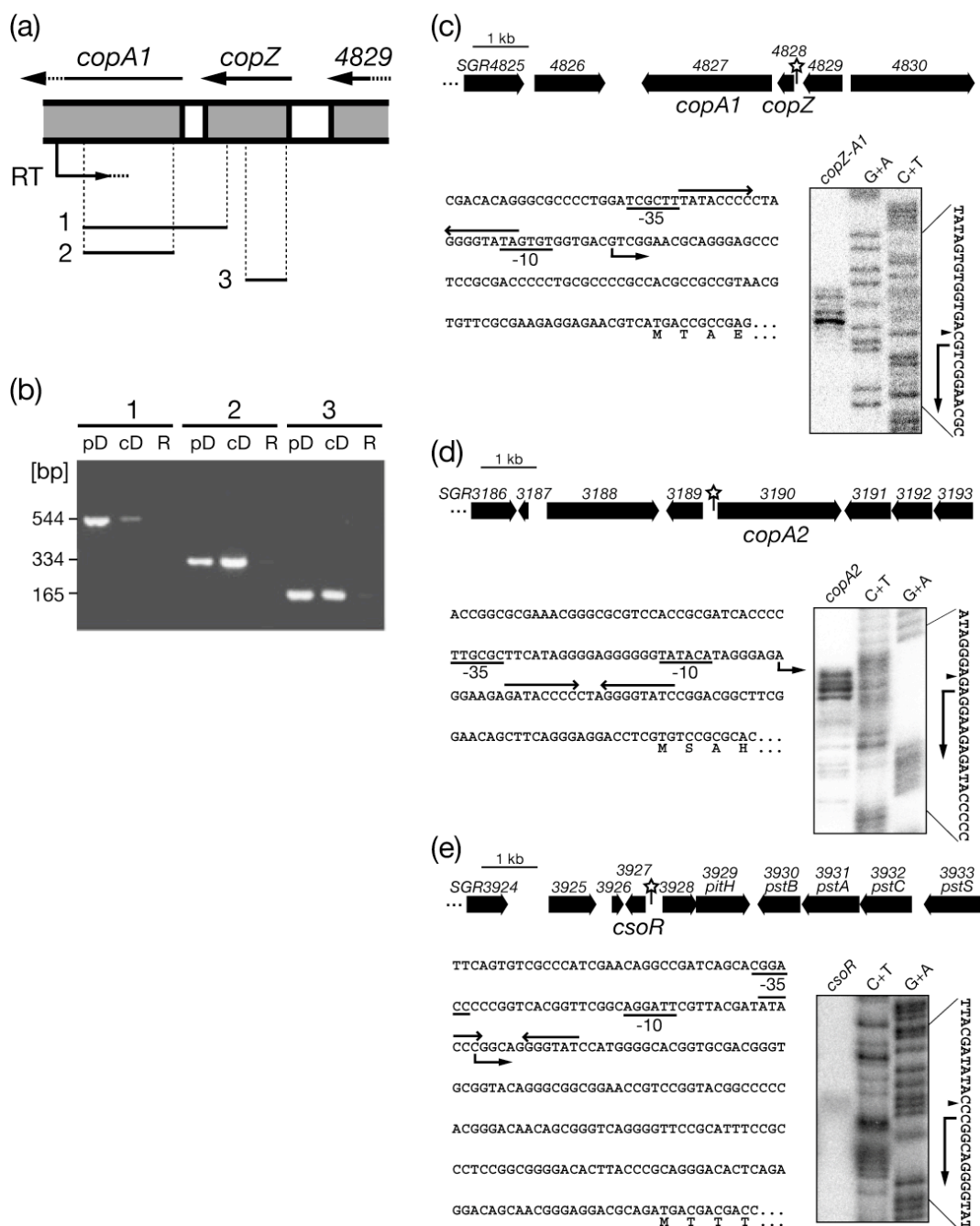


図 1.3 CopZ および CopA1 に関する代表的なホモログとのアミノ酸配列アラインメント。全蛋白で保存されているアミノ酸は黒色の四角で、少なくとも 2 つの蛋白で保存されているアミノ酸は灰色の四角で強調した。(a) CopZ の完全長アミノ酸アラインメント。SgCopZ, *S. griseus* 由来 CopZ; BsCopZ, *Bacillus subtilis* 由来 CopZ; HpCopP, *Helicobacter pylori* 由来 CopP; yAtx1, *Saccharomyces cerevisiae* 由来 Atx1; hATOX1, *Homo sapiens* 由来 ATOX1。金属結合に関与する CXXC 金属結合モチーフを下線で示した。(b) *copA1* の部分アミノ酸アラインメント。SgCopA1 *S. griseus* 由来 CopA1; SgCopA2, *S. griseus* 由来 CopA2; BsCopA, *B. subtilis* 由来 CopA; HpCopA, *H. pylori* 由来 CopA; yCcc2, *S. cerevisiae* 由来 Ccc2; hATP7B, ヒト由来 ATP7B。全タイプの ATPase に保存された DKTGT モチーフを下線で、Cu+/Ag+選択型金属輸送 PIB 型 ATPase に保存されたアミノ酸をアスタリスクで示した (Arguello, 2003)。

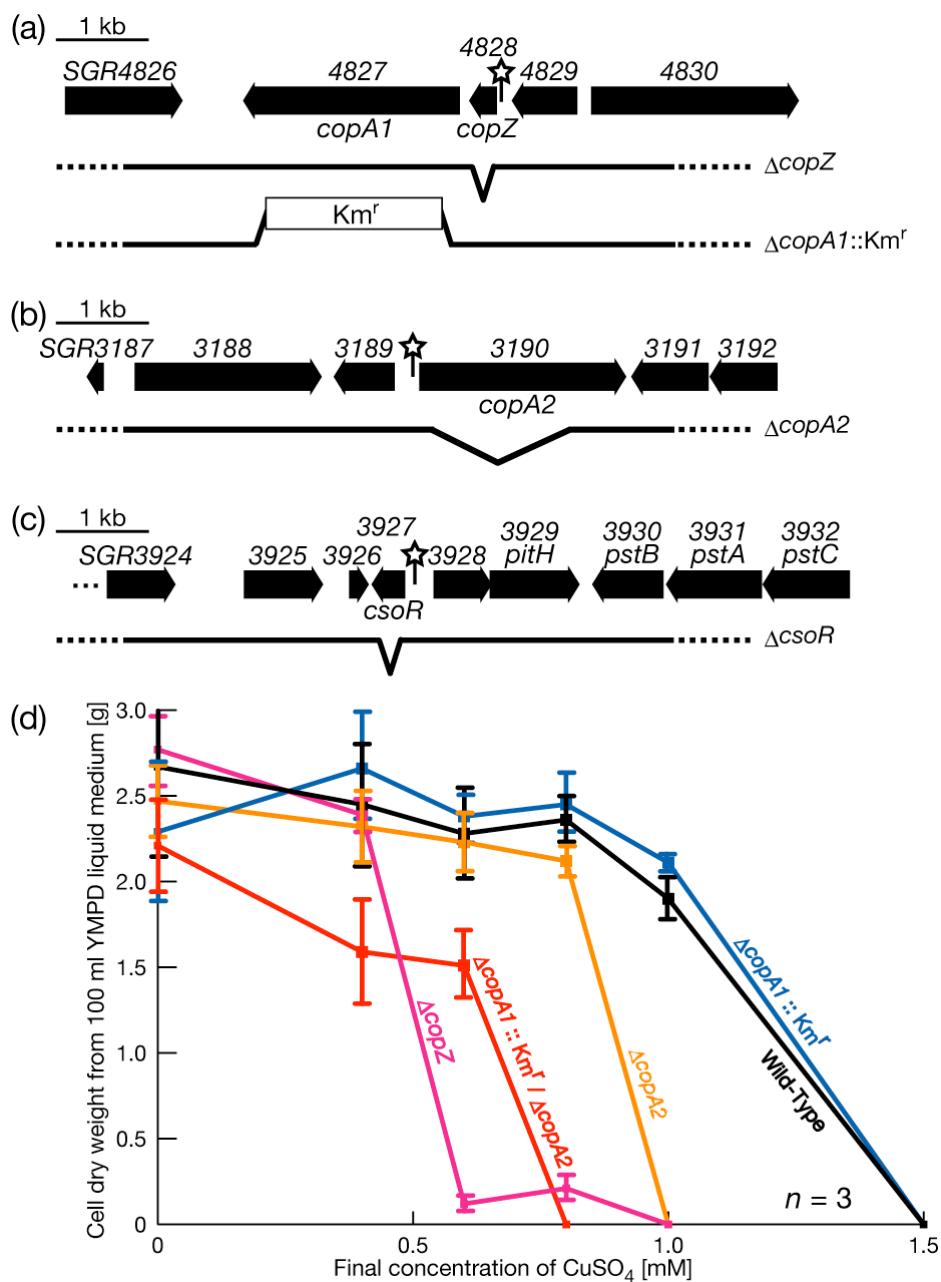


**図 1.4** 各種銅関連遺伝子の転写に対する銅応答性。低解像度 S1 マッピング法により転写量の測定を行った。菌体培養は往復型振とう機により 30°C、120 rpm にて行った。1% グルコースを含む YMP 液体培地にて定常期まで生育させた野生株または  $\Delta csor$  株を前培養菌体とし、無菌的に洗浄したのち、同じ培地に 1% 植菌して 36 時間の本培養を行った。その後、 $CuSO_4$  または  $ZnSO_4$  を終濃度 100  $\mu$ M となるように添加し、更に 30 分または 2 時間の追加培養を行い、これらを RNA 取得用菌体とした。*hrdB* は *S. griseus* の主要シグマ因子であり、各サンプルの RNA 量ならび品質を保証するコントロールとして用いた。

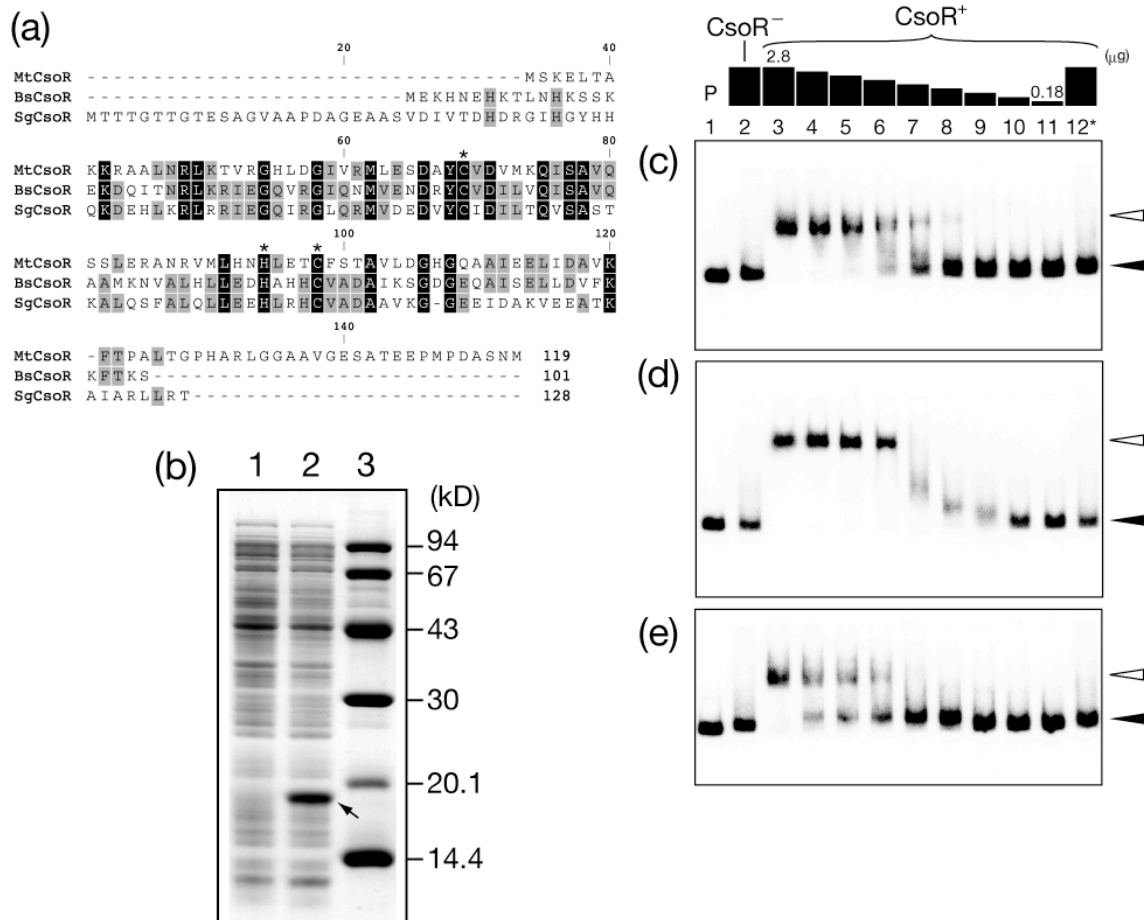


**図 1.5** 各種銅関連遺伝子の転写解析。(a)(b)RT-PCR を用いた、*copZ* と *copA1* がオペロンを形成していることの証明。(a) *copZ* と *copA1* 近傍の遺伝子構成。RT と示した矢印の付け根の部分より矢印の方向に向かい、特異的配列プライマーを用いて RNA から cDNA への逆転写反応を行った。(b) cDNA を鋳型とした PCR による増幅産物をアガロースゲルに泳動した泳動図。1-3 の数値は(a)の水平方向直線と対応しており、これは増幅領域を示す。cDNA 合成時に使用した RNA にクロソーム DNA が含まれている可能性を排除するため、3 種類の鋳型を用い増幅を行った。鋳型の略号は以下の通り。pD, プラスミド DNA; cD, 逆転写された cDNA; R, 逆転写を行っていない RNA。(c-e)各種銅関連遺伝子近傍の遺伝子構成と、高解像度 S1 マッピングによる転写開始点の決定。(c)は *copZ-copA1* 近傍。(d)は *copA2* 近傍。(e)は *csor* 近傍。泳動図における G+A/C+T は、マキシムギルバート法によって調製したシーケンスラダーを示す。塩基配列中、曲がった矢印の付け根が決定された転写開始塩基を示す。予想される -10/-35 領域には下線を引いて示す。転写開始点上流に見られる反復繰り返し配列を、向かい合った矢印で示す。各遺伝子構成図内の星印は、各向かい合った矢印の位置に対応している。





**図 1.6** 遺伝子破壊実験。(a-c) 各遺伝子破壊株のクロモソームの様式を模式的に示す。水平方向直線は各株の当該クロモソーム領域を示す。*copA1* については、ダブルクロスオーバー相同組換えを 1 回行うことによりカナマイシン耐性遺伝子を挿入し、耐性株を取得することで遺伝子破壊を行った。カナマイシン耐性遺伝子を  $Km^r$  として示した。*copZ*、*copA2*、*csoR* については、シングルクロスオーバー相同組換えを 1 回行いカナマイシン耐性株を取得したのち、更にもう一度シングルクロスオーバー相同組換えを行わせて薬剤感受性株を得、遺伝子領域を除去することによる破壊を行った。V 字型に凹んでいる領域が除去領域を示す。(d) 各種銅関連遺伝子破壊株の銅感受性グラフ。菌体培養は往復型振とう機により 30°C、120 rpm にて行った。1% グルコースを含む YMP 液体培地にて定常期まで生育させた野生株または  $\Delta csoR$  株を前培養菌体とした。これをホモジナイズし、新鮮な同培地に適宜  $CuSO_4$  溶液を加えたものに 0.1% 植菌して 55 時間の本培養を行った。培養後の各培地をポアサイズ 8.0  $\mu m$  のフィルターペーパー（ミリポア社製）を用いて吸引濾過による集菌を行い、これを乾熱器にて充分乾燥させたのち乾重量を測定した。別個に 3 回の実験を行い、データを平均化した。エラーバーは標準偏差を示す。



**図 1.7** (a) 過去に報告のなされている CsoR 蛋白と、*S. griseus* クロモソームにコードされている CsoR ホモログとのアミノ酸アラインメント。3 者で保存されたアミノ酸は黒色枠で、2 者で保存されたアミノ酸は灰色枠で強調した。*Mycobacterium tuberculosis* 由来 CsoR の研究において、銅結合に関与することが示された 2 個のシステインと 1 個のヒスチジンにアスタリスクを付した (Liu *et al.*, 2007)。(b) 15%アクリルアミドゲルによる SDS-PAGE 結果。レーン 1 は pCold IV を、レーン 2 は pCold-CsoR をそれぞれ有する BL21(DE3)Gold の可溶性蛋白画分。レーン 3 は分子量マーカー。レーン 2 の CsoR 由来と予想されるバンドに矢印を付した。(c-e) 大腸菌可溶性蛋白画分を用いた電気泳動移動度遅延アッセイ。(c)は *copZ-copA1* 上流域、(d)は *copA2* 上流域、(e)は *csoR* 上流域を含む DNA 断片をプローブとして用いた。泳動図上方の四角は、供した蛋白量を模式的に示したものである。レーン 1 は蛋白なし (プローブのみ)。レーン 2 は pCold IV を有する大腸菌の可溶性蛋白 2.8  $\mu$ g。レーン 3-11 は pCold-CsoR を有する大腸菌の可溶性蛋白 2.8、2.0、1.4、1.0、0.71、0.50、0.36、0.25、0.18  $\mu$ g。レーン 12 は、反応系の  $\text{CuSO}_4$  濃度を 0.1 mM にして pCold-CsoR を有する大腸菌の可溶性蛋白 2.8  $\mu$ g を加えたもの。泳動図右の黒い三角はフリープローブを、白い三角は蛋白結合によりシフトしたプローブをそれぞれ示す。



表1.1 本章で用いたオリゴヌクレオチド一覧 (2 頁中 1 頁目)

Name	Sequence (5' → 3')	nt underlined = in DDBJ no. AP009493	Direction	Sequence in <b>boldfaced</b>	Use
4829-for	<b>CGGAATTC</b> GCATGCTGGACGCCAT CCTCG	5680663	←	EcoRI	<i>SGR4829</i> ク ローニング
4829-rev	A <b>ACTGCAG</b> ATGACGTTCTCCTCTT CGCGAAC	5680129	→	PstI	<i>SGR4829</i> ク ローニング
LB-for	TCGGCCCATTTTCGTCACGTATGAG	2007659	←		S1 mapping
LB-rev*	TCGATGAGCGCCATCACAGACTCG	2007346	→		S1 mapping
LHeZ-for	TGGACCCCCTGGTGGGCGAC	5680349	←		S1 mapping, EMSA
LeZ-rev*	CCTCCGACACGGAGCCCTCG	5679962	→		S1 mapping, EMSA
HZ-rev*	ACGTTCTCCTCTTCGCGAACAC	5680132	→		S1 mapping
LHeA2-for	CCAGCCTACGGGTCGGTAGAC	3705325	→		S1 mapping, EMSA
LA2-rev*	<u>G</u> TGACGCCGTCCATGCGGTTG	3705696	←		S1 mapping
HeA2-rev*	GTGGCGGAGTGCGCGGACAC	3705582	←		S1 mapping, EMSA
LR-for	CCCTGGGGGTCAGACGAAAGC	4618519	←		S1 mapping
LeR-rev*	TGGTCGGTGACGATGTCCACAG	4618083	→		S1 mapping, EMSA
HeR-for	<u>G</u> TCCTCGGGATGCTCTGGATTC	4618419	←		S1 mapping, EMSA
HR-rev*	GGGGCCGTACCGGACGGTTC	4618272	→		S1 mapping

(\*) [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPにより末端をラベル化して使用した。

表1.1 本章で用いたオリゴヌクレオチド一覧 (2 頁中 2 頁目)

Name	Sequence (5' → 3')	nt underlined = in DDBJ no. AP009493	Direction	Sequence in <b>boldfaced</b>	Use
DZ-1-rev	A <b>ACTGCAGTCA</b> CTTGACCTGGTA CACGGTGGTG	5680002	→	PstI, stop codon	<i>copZ</i> 破壊
DZ-2-for	A <b>ACTGCAGT</b> GACGACCTGTCCGA GCGGCAG	5679815	←	PstI	<i>copZ</i> 破壊
DZ-2-rev	<b>CGGGATCCCC</b> ATGGCGAGCAGGA CCACGG	5679180	→	BamHI	<i>copZ</i> 破壊
DA1-for	<b>GCGAATTCTA</b> GATCTGGCGCGGGC GGCC	5676578	←	EcoRI, stop codon	<i>copA1</i> 破壊
DA1-rev	<b>TGCTCTAGAG</b> CGATCTGCCGAAGG TCGACG	5675612	→	XbaI	<i>copA1</i> 破壊
DR-1-for	<b>GCGAATT</b> CGGGCCGGGCGGTAGT CGTTG	4616345	→	EcoRI	<i>csor</i> 破壊
DR-1-rev	<b>CGCGGATCC</b> GGCGAGGAGATCGA CGCGAAG	4617856	←	BamHI	<i>csor</i> 破壊
DR-2-for	<b>CGCGGATCC</b> CTGGTGGTGGTAGCC GTGAATG	4618052	→	BamHI	<i>csor</i> 破壊
DR-2-rev	<b>CCCGAAGCTT</b> TGATGCCGACCATC ACCAGATAG	4619586	←	HindIII	<i>csor</i> 破壊
PR-for	<b>CCCGAAGCTT</b> CATATGACGACGA CCGGGACCACAGGG	4618174	←	HindIII, NdeI	CsoR生産
PR-rev	<b>GCGGATCC</b> GCCTCAGGTGCGGAG CAGAC	4617788	→	BamHI	CsoR生産
eR-for	<u>C</u> GCCTTCCCCTCCCCCATTC	2883425	→		EMSA
eR-rev	CGAGCGTACGCAGGAGTCTTCTC	2883540	←		EMSA

(\*) [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPにより末端をラベル化して使用した。

## 第 2 章 *S. griseus* におけるセロオリゴ糖利用系遺伝子の解析

### 2.1 背景

序論にて述べた通り、*Streptomyces* のグルコース抑制機構については知見の蓄積がほとんどなされていないが、ほぼ唯一といえる具体的な知見として「解糖系初発酵素であるグルコースキナーゼ Glk が重大な役割を持つ」ということが示唆されている。裏を返せば「*Streptomyces* のグルコース抑制機構を構成する因子は Glk 以外未知である」ということができる。著者は、*S. griseus* を題材に、遺伝学的手法を用いてこの「グルコース抑制機構を構成する Glk 以外の因子」の同定を試みた。これについて本章で述べる。

序論にて述べた通り *Streptomyces* の Glk は触媒機能の他に制御機能も有すると予想されているが、アミノ酸配列のホモロジー比較より、*Streptomyces* の Glk には DNA 結合部位は存在しないと考えられてきた（第 3 章にて述べるように著者らのグループとの共同研究により *S. griseus* の Glk 立体構造解析がなされたが、ここからもやはり DNA 結合配列は存在しないと判断された）。このことから、*Streptomyces* の Glk がグルコース抑制の一環として転写制御を行うには、Glk 以外に何らかの因子が必要であることが強く示唆される。最も単純な仮説の 1 つとしては、Glk が蛋白-蛋白間相互作用により他の蛋白に対し生体内グルコース濃度の情報をシグナルとして伝達している、というものが考えられる。

著者は、*S. griseus* におけるグルコース抑制機構解明への遺伝学的アプローチとして「グルコース抑制の解除された *S. griseus* 変異株のうち、*glk* 以外に変異点を持つものを取得し、その変異点を探索することでグルコース抑制に関わる新たな因子を同定できる」と考えた。このような *Streptomyces* 変異株を簡便にスクリーニングする系はこれまで確立されていなかった。そこで著者は過去に、

- ・*S. griseus* がクロモソーム上に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を 1 個以上有すること (Kato *et al.*, 2005)

- ・これらがグルコース抑制を受けることが観察されること

を利用し、グルコース抑制の解除された放線菌変異株を目視で簡便にスクリーニング可能な系

を以下のように構築した（著者修士論文）。

①グルコース ②ラクトース（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を誘導すると考えられる） および③ X-gal（ $\beta$ -ガラクトシダーゼによって分解され青色を呈色する）の 3 者を含む無機塩寒天培地（IS-GLX 培地）上に、UV 照射によってランダム変異を導入した *S. griseus* 胞子を撒いた。*S. griseus* 野生株では、これらの胞子は発芽後成長し、白色のコロニーを形成する。これは、*S. griseus* の有する  $\beta$ -ガラクトシダーゼが、グルコース抑制を受けるために活性を発揮せず、X-gal が分解されないためである。しかしながらグルコース抑制の解除された変異株では、 $\beta$ -ガラクトシダーゼがグルコース抑制を受けない結果、X-gal が分解され、コロニーが青色を呈色すると考えられる。すなわち、青色のコロニーをスクリーニングすることで目的の変異株が取得できると考えられる（図 2.1(a)）。

上記の手法では、2 タイプの誤検出が生じる可能性がある。誤検出の第 1 のタイプは「 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子上に変異が生じた結果、 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するグルコースカタボライト抑制が生じなくなった株」である。この種類の変異株はグルコース抑制経路の未知因子同定に意味をなさない。第 2 のタイプは「*glk* に変異が生じた株」である。序論で述べた通り *Glk* に変異が生じた株ではグルコース抑制が解除されることが複数の研究者によってすでに報告されていることから、この種類の変異株も同様にグルコース抑制経路の未知因子同定に意味をなさない。著者はまず第 1 のタイプの可能性を排除すべく、候補株の高濃度グルコース培地における形態分化観察を行った。序論に述べた通り、高濃度グルコース培地における形態分化・二次代謝の抑制は他の炭素源資化酵素群に対するグルコース抑制と挙動を同じくすることから、高濃度グルコース培地でなお形態分化を行う株を選別すれば、第 1 の可能性を排除できるといえる。次に第 2 のタイプの可能性を排除すべく、得られた候補株の *glk* シークエンシングを行い変異の有無を確かめた。

上記の過程を経て、グルコース抑制経路のうち未知因子に変異が導入されたと考えられる株が 3 株得られた（図 2.1(b)）。これらを GRD1 株、GRD3 株、GRD4 株とそれぞれ命名した。これらの株は、孢子形成能と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性のみならず、過去にグルコース抑制の影響を受けることが報告されていたペプチドグリカン分解酵素活性に関してもグルコース抑制が解

除されていることが確認された。このうち 1 株 (GRD1 株と命名) は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性とペプチドグリカン分解酵素活性について顕著な表現型を示すものであった。このことから著者は、ショットガンクローニング法を用いて GRD1 株の変異点同定を行った。

後述の通り、GRD1 がグルコース抑制解除に至るための原因変異点は、過去に他の放線菌においてセロビオース／セルロース資化系遺伝子を制御すると報告されている CebR をコードする遺伝子上に存在した。本章で CebR の機能解析を行い、本蛋白をコードする遺伝子の変異がグルコース抑制解除に至った原因を考察した。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 UV 照射による *S. griseus* のランダム変異株孢子の取得（著者修士論文の再掲）

*S. griseus* 野生株の孢子（ $3 \times 10^6$  個）を 10 ml の 10% glycerol に懸濁した。これをプラスチックシャーレに入れ、ニクロム線を用いてスターラー上で攪拌しながら 30 cm の距離より 40 秒の UV 処理に供した。UV 処理前に比べ、UV 処理直後の生存率は 0.54% に減少していた。

### 2.2.2 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対してグルコース抑制の解除された変異株のスクリーニング（著者修士論文の再掲）

IS-GLX プレート培地 1 枚あたりおよそ 50 コロニーが得られるよう、2.2.1 で得たランダム変異導入孢子を適度に希釈して撒いた。これを 7-10 日間 28°C で培養したのち観察し、青色を呈色したコロニーをスクリーニングした。

### 2.2.3 ペプチドグリカン分解能アッセイ

YMP 寒天培地成分に終濃度 0.25% の *Micrococcus lysodeikticus* ATCC No. 4698 孢子（シグマ社製）を添加し、更に必要に応じて炭素源を加えたものをペプチドグリカン分解能アッセイ培地とした。以後、YMP-PG 培地と略記する。本培地上で各種菌株を 28°C で 3-4 日間培養したのち、ハロー径を測定することでペプチドグリカン分解能の定量を行った。

### 2.2.4 低コピープラスミド pIJ922 を用いた *S. griseus* 野生株 DNA ライブラリの調製

*S. griseus* 野生株クロモソームを Sau3AI で部分断片化し、アガロース電気泳動に供した。泳動アガロースゲル上から 6-10 kb 断片に相当する部位を切り出して DNA 抽出を行った。これを、BglIII による切断および BAP によるアルカリフォスファターゼ処理を行ったのち泳動アガロースゲルから抽出した pIJ922 とライゲーションした。

### 2.2.5 GRD1 株変異点の探索

2.2.4 で作製した *S. griseus* 野生株 DNA ライブラリを GRD1 株プロトプラストに導入し、チオストレプトンによる選択を行った。得られた 5000 以上のコロニーを判別培地に移植した。判別培地としては IS-GLX プレート培地にチオストレプトンを添加したものをを用いた (IS-GLX-tsr プレート培地と略記)。IS-GLX-tsr プレート培地 1 枚に対して 30 コロニーを移植した。これを 7-10 日間 28°C で培養したのち観察し、青色を呈色せず白色に復帰したコロニーからプラスミド抽出を行った。

#### 2.2.6 取得 DNA 断片の解析

2.2.5 で取得したプラスミドを GRD1 株に再導入し、IS-GLX-tsr プレート培地に植菌することで、青色呈色性を再確認した。更に、ペプチドグリカン分解活性アッセイ用培地である YMPD-PG プレート培地に植菌を行い、ペプチドグリカン分解活性を観察した。

#### 2.2.7 GRD1 株にグルコース抑制解除を生じさせた変異点である *cebR* (*SGR4739*) の破壊株ならびに相補株の構築

遺伝子破壊については以下の通り行った。破壊株のクロモソームの概要を図 2.2(a)に示した。下流に存在する *SGR4740* への極性効果の可能性を避けるため、シングルクロスオーバー法による組み替えを 2 回行うことで *cebR* のクロモソームからの欠損を行った。破壊株作製用プラスミドの構築は以下の通り行った。まず、pGRL2 (GRD1 株相補に用いたプラスミド 2 種のうち 1 種。2.3.2 にて後述) を、pIJ922 に由来する EcoRI/BglIII サイトで切断し、生じた断片を pUC18 マルチクローニングサイト上 EcoRI/BamHI サイトにクローニングすることで pUC-GRL2 とした。

pUC-GRL2 を平滑末端型制限酵素 NruI で切断することにより、-2285 から +9 までの 2.3 kb 断片を得た (数値は *SGR4739* の翻訳開始コドン 1 文字目を +1 としたもの。本項では以下も同様)。この断片を、pUC19 を平滑末端型制限酵素 HincII で切断したのち脱リン酸化したものにクローニングした。クローニングの方向の妥当性を制限酵素処理パターンにて確認し、これを pDcebR-1 とした。pDcebR-1 を、-3 の NcoI ならびに pUC19 マルチクローニングサイト由来 EcoRI にて切断し、計 5.0 kb の DNA 断片を得た。これを断片 (1) とする。

次に、pGRL2 を鋳型とし、プライマーセット DR-for と DR-rev を用いて +750 から +1301 までの 551 bp の DNA 断片を増幅した（プライマーの詳細は表 2.1 に示した。以下のプライマーも同様）。得られた断片を pUC19 のマルチクローニングサイト由来 EcoRI/HindIII サイトにクローニングした。PCR エラーのないことを確認したのち、上記 DR-for 由来 NcoI と +1273 に位置する XbaI とで切断し、+750 から +1273 までの DNA 断片を得た。これを断片（2）とする。

最後に、pUC-GRL2 を、+1273 に位置する XbaI と pUC19 に由来する EcoRI とで切断し、1.7 kb の断片を得た。これを断片（3）とする。

上記断片（1）（2）（3）を連結し、全長のうち N 末側およそ 70% を欠損した *cebR* と *cebR* の上下流 2.3 kb を含む *cebR* 破壊用プラスミド pDcebR-2 を得た。pDcebR-2 を pUC19 マルチクローニングサイト由来 HindIII にて切断したのち脱リン酸化し、ここに Tn5 由来 *aphII* 遺伝子上下流を HindIII 処理したものを連結することで、pD4739-aph を得た。これを JM110 に導入後再調製することでメチル化フリーのプラスミドを得、定法通りシングルクロスオーバー法による組み替えを 2 回行うことで  $\Delta$ *cebR* 株を得た。破壊株構築の成功を、クロモソームに対する PCR により確認した。

破壊遺伝子の相補については以下の通り行った。pGRL2 を鋳型とし、プライマーセット CR-for と CR-rev を用いて PCR 増幅を行った。増幅断片を、pUC19 マルチクローニングサイト由来 HindIII/EcoRI サイトにクローニングした。PCR エラーのないことを確認したのち、プライマーセット由来 EcoRI/XhoI を用いて当該断片を pIJ922 の EcoRI/XhoI サイトにクローニングした。これを相補用プラスミド pIJ922-*cebR* とした。

## 2.2.8 逆転写反応を用いたオペロン性の解析

### ・RNA 抽出

製品マニュアルに従い、RNAqueous mini kit（アンビオン社製）を用いた。抽出後、DNaseI による残存 DNA の消化を行い、フェノール/クロロホルムによる DNaseI の失活を行った上、エタノール沈殿を行い逆転写反応の鋳型とした。



・逆転写反応による cDNA 合成

製品マニュアルに従い、Thermoscript（インビトロジェン社製）を用いた。プライマーとしては製品付属のランダムヘキサマーを用いた。

・PCR 増幅用プライマー

以下のプライマーセットを用いて増幅を行った。アルファベット A-E は、図 2.2(a)および(b)におけるプローブと対応する。

[A: *cebE* / *cebF* 間 cDNA の検出]

rA-for, rA-rev

[B: *cebF* / *cebG* 間 cDNA の検出]

rB-for, rB-rev

[C: *cebG* / *bglC* 間 cDNA の検出]

rC-for, rC-rev

[D: *bglC* / *cebR* 間 cDNA の検出]

rD-for, rD-rev

[E: *cebR* / SGR4740 間 cDNA の検出]

rE-for, rE-rev

## 2.2.9 異種生産 CebR の精製

大腸菌による異種発現系を用いて *cebR* の過剰発現を行い、当該蛋白をヒスチジンアフィニティータグによって精製した。これによって得られた C 末端にヒスチジインタグの付加された CebR を、以後 CebR-H と記述する。

pGRL2 を鋳型とし、プライマーセット PR-for と PR-rev を用いて CebR コード領域全長を増幅した。増幅断片を pUC19 のマルチクローニングサイト由来 BamHI/EcoRI サイトにクローニングした。PCR エラーのないことを確認したのち、上記プライマーセット由来 NdeI/XhoI サイトを用いて pET-26b(+)（ノバジェン社。C 末ヒスチジインタグ融合型過剰発現プラスミド）のマルチクロ

ーニングサイト由来 NdeI/XhoI サイトにクローニングし、pET26b-cebR とした。pET26b-cebR にて *E. coli* BL21(DE3)Gold 株を形質転換させ、CebR-H 過剰生産を行った。

過剰発現は以下の通り行った。終濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  カナマイシンを含む LB 培地にて 1 終夜培養した菌体を前培養菌体とし、新鮮な同培地に 0.1% 植菌することで本培養とした。本培養については、まず 37°C, 120 rpm にて濁度が  $\text{OD}_{600} = 0.5$  に達するまで培養した。次にこれを 16°C にて 30 分間冷却し、その後終濃度 0.3 mM となるよう IPTG を加え発現誘導を行い、引き続き 24 時間培養したのち回収した。

目的蛋白の精製は以下の通り行った。上記回収菌体に、本培養培地量の 1% に相当する量の Lysis Buffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM イミダゾール, 10% グリセロール, pH8.0) を加え、超音波破碎に供した。その後細胞破碎液を 20000 x g にて 10 分遠心し、上清を得た。更に核酸の除去を目的とし、この上清に終濃度 0.1% となるようポリエチレンイミンを加え、混和し、再度 20000 x g にて 10 分遠心し、上清を得た。この上清に対し、Ni-NTA Spin column (QIAEGN 社) を用いて定法に従い精製を行った。

#### 2.2.10 ゲル濾過による CebR 分子量測定

ゲル濾過用バッファーとしては以下の組成の溶液を用いた。50 mM Tris-HCL (pH8.0), 200 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol。ゲル濾過カラムとしては、Sephadex 200 (GE healthcare 社製) を用いた。

#### 2.2.11 低解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングによる転写量解析

##### ・RNA 抽出

ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いた。

##### ・プローブ調製用プライマー

下記の目的に対し、それぞれ以下のプライマーセットを用いてプローブの増幅を行った。\*印のプライマーは 5'末端を  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP で標識した。

[*hrdB* 転写解析 (全 RNA 量のサンプル間統一のためのコントロールとして使用)]

LB-for と LB-rev\*

[*cebR* 転写解析]

LR-for と LR-rev\*

[*SGR4735* 転写解析]

HLE-for と LE-rev\*

- ・低分解能 S1 ヌクレアーゼマッピング法

1.2.2 に記述の通り行った。

#### 2.2.12 高解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングによる転写開始点の決定

- ・RNA 抽出

ISOGEN（ニッポンジーン社製）を用いた。

- ・プローブ調製用プライマー

下記の目的に対し、それぞれ以下のプライマーセットを用いてプローブの増幅を行った。\*印のプライマーは 5'末端を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP で標識した。

[*cebR* 転写開始点決定]

HR-for と HR-rev\*

[*cebE* 転写開始点決定]

HLE-for と HE-rev\*

#### 2.2.13 定量的 RT-PCR による転写量測定

- ・RNA 抽出

製品マニュアルに従い、RNAqueous mini kit（アンビオン社製）を用いた。抽出後、DNaseI による残存 DNA の消化を行い、フェノール/クロロホルムによる DNaseI の失活を行った上、エタノール沈殿を行い逆転写反応の鋳型とした。

・逆転写反応による cDNA 合成

製品マニュアルに従い、Thermoscript（インビトロジェン社製）を用いた。プライマーとしては製品付属のランダムヘキサマーを用いた。

・定量的 RT-PCR 増幅用プライマー

以下のプライマーセットを用いて増幅を行った。各 [] 内の ( ) は、*S. griseus* ゲノムプロジェクトによるアノテーションを示す。

[*hrdB* 転写量測定]

qSGR1701(*hrdB*)-for と qSGR1701(*hrdB*)-rev

[*SGR199* (Cellulose binding protein) 転写量測定]

qSGR199-for と qSGR199-rev

[*SGR217* (Pectate lyase) 転写量測定]

qSGR217-for と qSGR217-rev

[*SGR1971* (Conserved hypothetical protein) 転写量測定]

qSGR1971-for と qSGR1971-rev

[*SGR2445* (Secreted cellulase) 転写量測定]

qSGR2445-for と qSGR2445-rev

[*SGR3391* (Acetyl transferase) 転写量測定]

qSGR3391-for と qSGR3391-rev

[*SGR4735* (CebE) 転写量測定]

qSGR4735(*cebE*)-for と qSGR4735(*cebE*)-rev

[*SGR4738* (BglC, Beta glucosidase) 転写量測定]

qSGR4738(*bglC*)-for と qSGR4738(*bglC*)-rev

[*SGR6928* (Secreted cellulase) 転写量測定]

qSGR6928-for と qSGR6928-rev

- ・ qPCR

反応試薬については製品マニュアルに従い、SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (TaKaRa 社製) を用いた。機器は、SmartCyclerII (Cepheid 社製) を用い、以下の条件で行った。まず 95°C, 10 秒の変性を行ったのち、95°C, 5 秒 ; 60°C, 20 秒の 2 ステップからなるサイクルを 40 サイクル行った。*hrdB* の mRNA 由来 cDNA 量をコントロールし、対象となる各遺伝子の cDNA 量を相対値として算出した。

#### 2.2.14 電気泳動移動度遅延アッセイ

- ・ プローブ作製

以下のプライマーセットを用いて増幅を行った。各 [] 内の () は、*S. griseus* ゲノムプロジェクトによるアノテーションを示す。

[*SGR199* (Cellulose binding protein) 上流プローブ]

eSGR199-for と eSGR199-rev

[*SGR217* (Pectate lyase) 上流プローブ]

eSGR217-for と eSGR217-rev

[*SGR1971* (Conserved hypothetical protein) 上流プローブ]

eSGR1971-for と eSGR1971-rev

[*SGR2445* (Secreted cellulase) 上流プローブ]

eSGR2445-for と eSGR2445-rev

[*SGR3391* (Acetyl transferase) 上流プローブ]

eSGR3391-for と eSGR3391-rev

[*SGR4735* (CebE) 上流プローブ]

eSGR4735(cebE)-for と eSGR4735(cebE)-rev

[*SGR4738* (BglC, Beta glucosidase) 上流プローブ]

eSGR4738(bglG)-for と eSGR4738(bglG)-rev

[SGR4739 (LacI-family regulator) 上流プローブ]

eSGR4739(cebR)-for と eSGR4739(cebR)-rev

[SGR6928 (Secreted cellulase) 上流プローブ]

eSGR6928-for と eSGR6928-rev

これら断片を T4 polynucleotide kinase を用いて[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP により 5'末端標識したのち、フリーの[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP を QIAquick Spin column (キアゲン社) を用いて除去した。

#### ・ 結合反応と電気泳動

結合バッファーとして以下の組成の溶液を用いた。20 mM HEPES (pH 7.6), 1 mM EDTA, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 30 mM KCl, 0.2% (v/v) Tween 20, 10% (v/v) Glycerol。結合反応は、室温にて 20 分間行った。電気泳動については、ゲルは 1x TBE バッファーに基づく 6%アクリルアミドゲルを、泳動バッファーは 0.5x TBE バッファーを用い、200 V, 40 分の泳動条件にて行った。

## 2.3 結果

### 2.3.1 GRD 変異株群の単離

2.1 で述べた通り、著者はまず、グルコースカタボライト抑制の解除された変異株を単離しようと試みた。著者の仮定は以下の通りである。*S. griseus* 野生株においては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼはグルコースカタボライト抑制の対象となる。グルコースとラクトースを含む寒天培地上において、グルコースカタボライト抑制の鍵となる因子を欠いた変異株が得られた場合、この株ではグルコースカタボライト抑制が生じない結果、 $\beta$ -ガラクトシダーゼが抑制されずに活性を示すと考えられる (図 2.1(a))。この仮定をもとに、*S. griseus* 野生株より調製された胞子に対して UV 照射を行うことでランダム変異導入を行い、IS-GLX 固体培地上に散布した (2.2.1 と 2.2.2 に詳述)。10000 以上のコロニーを観察した結果、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性によって X-gal が分解された結果であろう青色を呈色するコロニーを 15 個得た。これらの中には、目的通りグルコースカタボライト抑制の鍵因子に変異を持つものが期待される一方で、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのプロモーター領域に変異が生じることで  $\beta$ -ガラクトシダーゼが恒常的に発現しているものが含まれる可能性がある。そこで次にこれらの株を、野生株では形態分化に対して阻害的なレベルの高濃度のグルコースを含む YMP 寒天培地上で培養し、その形態分化を観察した。結果、15 のうち 4 株については、野生株では形態分化に対して阻害的な高濃度のグルコースを含む YMP 寒天培地上でも形態分化を行った (図 2.1(b))。これらを GRD1,2,3,4 株 (Glucose Repression-Deficient mutants) とそれぞれ命名した。

過去に、グルコースキナーゼをコードする *glk* 遺伝子領域に変異が生じるとグルコースカタボライト抑制が生じなくなるという複数の報告がある。そこで著者は、これらの株がクロモソーム上に有する *glk* 遺伝子上に変異点があるかどうかを DNA シーケンス解析により確認した。その結果、GRD2 株は、*glk* 遺伝子上第 238 塩基に点変異が生じ、結果 Glk 蛋白第 80 アミノ酸のアスパラギンがヒスチジンに変化していることがわかった。一方で、その他の 3 株については *glk* 遺伝子ならびにプロモーター領域上に変異は見られなかった。

GRD2 株以外の 3 株については、ペプチドグリカン分解活性に対してもグルコースカタボライト抑制の解除が見られた (図 3.1(b))。

以降の解析の対象として、GRD2 株を除き最もその表現型が顕著である GRD1 株を選択した。

### 2.3.2 ショットガンクローニング法による GRD1 変異点の決定

著者は、制限酵素 Sau3AI (認識配列 GATC) により *S. griseus* 野生株クロモソームを部分切断し、これを低コピー (細胞当たり 1 コピー) プラスミドである pIJ922 にクローニングすることで、*S. griseus* 野生株遺伝子含有プラスミドライブラリーを作製した。このプラスミドライブラリーを用いてプロトプラスト融合法により GRD1 変異株の形質転換を行い、生じたコロニーを IS-GLX 寒天培地上にスポットした。6000 以上の形質転換体コロニーをスポットし、これらを観察した結果、青色を呈さず白色のままであるものが 2 個得られた。これら 2 形質転換体の持つプラスミドを抽出し、pGRL1, pGRL2 とそれぞれ命名した。DNA シークエンス解析により pGRL1 と pGRL2 がコードする遺伝子領域を同定した結果、両者はクロモソーム上重なり合った領域をコードしていた (図 2.2(a))。よって、GRD1 株がグルコースカタボライト抑制の不全を示すための変異点は pGRL1 と pGRL2 が重なり合う領域に存在すると予想された。

BLAST 解析により、当該領域にその塩基配列の完全長が含まれる遺伝子は、*Streptomyces reticuli* においてもクロモソーム上近傍にコードされていることがわかった。それぞれのコードする蛋白の情報は以下の通りである。

- ・ SGR4737 (306 アミノ酸) : *S. reticuli* 由来 CebG (セロビオース ABC トランスポーターのパーミターゼ, accession no. CAB46344)
- ・ SGR4738 (485 アミノ酸) : *S. reticuli* 由来 BglC (ベータグルコシダーゼ, accession no. CAB46345)
- ・ SGR4739 (345 アミノ酸) : *S. reticuli* 由来 CebR (LacI/GalR 型転写因子, accession no. CAB46364)

これらの情報に従い、GRD1 における当該クロモソーム領域の DNA 配列を DNA シークエンス解析により決定した。その結果、GRD1 株において SGR4739 をコードする遺伝子 (以下 *cebR*



と記す)において、第 847 塩基から第 858 塩基までの 12 bp に対する欠損変異が生じ、結果として第 283 アミノ酸から第 286 アミノ酸までの 4 アミノ酸残基が欠損した CebR (CebR<sup>m</sup>と略記)が生産されていることがわかった (図 2.2(c))。

### 2.3.3 *cebR* 破壊株の作製とその表現型

著者は、*S. griseus* 野生株クロモソーム上 *cebR* 遺伝子を、コード領域全体のうち 70%を除去する形式で  $\Delta$ *cebR* 株を作製した (図 2.2(a))。作製された  $\Delta$ *cebR* 株は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、形態分化、ペプチドグリカン分解活性すべてに対するグルコースカタボライト抑制に対して、GRD1 と同様の表現型を示した。また、低コピー (細胞当たり 1 コピー) プラスミドである pIJ922 に対し *cebR* コード領域全長およびそのプロモーター領域を連結したプラスミドを用い  $\Delta$ *cebR* 株の相補を行った結果、これらの表現型はいずれも回復した (図 2.3)。以上より、GRD1 株においてグルコースカタボライト抑制が解除されるための原因変異点は *cebR* であると結論づけた。

### 2.3.4 *ceb* 領域遺伝子群のオペロン性の解析

*S. reticuli* においては、*cebE*, *cebF*, *cebG*, *bglC* がこの順に同一方向に存在してオペロンを形成しており、*cebR* は *cebE* に隣接してこれらと逆向きに存在する (Schlösser *et al.*, 1999)。一方で図 2.2(a)に示した通り、*S. griseus* においては *cebE*, *cebF*, *cebG*, *bglC*, *cebR* がこの順に同一方向に存在している。*S. griseus* におけるこれら遺伝子のオペロン性を RT-PCR を用いて調べた。*S. griseus* の全 RNA に対して 6 塩基ランダムプライマーによる逆転写反応を行うことにより cDNA を合成し、この cDNA を鋳型として図 2.2(a)にて A-E と示された遺伝子間領域の PCR 増幅を試みた。結果、図 2.2(b)に示す通り、上記 5 遺伝子がオペロンを形成していることが示された。*cebR* に隣接する *SGR4740* も *cebR* と同じ向きを持つ遺伝子であるが、これについてはオペロン上に存在しないことが示された。

### 2.3.5 CebR の性質

過去の報告より、*S. reticuli* における CebR は 14 bp からなる反復繰り返し配列 (CebR-box と

命名)に結合し、*cebR* に隣接するセロビオース利用遺伝子群を負に制御していることが示されている (Schlösser *et al.*, 1999; 2000)。 *S. griseus* における CebR が同様の性質を示すか否かを知るため、大腸菌異種発現系を用いた CebR の精製を行った。T7 プロモーターの支配下に *S. griseus* 由来 *cebR* を配置し、CebR-ロイシン-グルタミン- (ヒスチジン) x6 からなる蛋白 (以下 CebR-H) が生産されるプラスミド pET-cebR を構築した。これを *E. coli* BL21(DE3)Gold 株に導入し、2.2.9 に記した通り蛋白生産を行わせ、Ni-NTA スピンカラムを用いて精製を行った。結果、SDS-PAGE ゲル上クマシーブリリアントブルーR250 染色において単一バンドとなるよう精製がなされた (図 2.4(a))。CebR-H のサブユニット構成を知るために、非変性条件下にて精製 CebR-H をゲル濾過クロマトグラフィーに供した。CebR-H は 70 kDa の位置にシングルピークとして溶出された。CebR-H の計算上の分子量は 38 kDa であることから、CebR-H はホモダイマーを形成していると結論づけた (図 2.4(b))。

### 2.3.6 CebR-H の CebR-box 配列に対する結合性試験

上記の通り精製した CebR-H を用い、CebR-box 配列を有する DNA 配列である *cebE* (SGR4735) プロモーター領域に対する CebR-H の結合性を、電気泳動移動度遅延アッセイにより試験した。図 2.5 に示される通り、CebR-H は *cebE* プロモーター領域に結合し、その見かけの  $K_d$  値は 8.6 nM であった。

*S. griseus* ゲノムデータベース (<http://streptomyces.nih.go.jp/griseus/>) を用い、*S. griseus* クロモソーム上他に CebR-box が存在するか否かを調べた結果、14 bp 中 2 bp のミスマッチを許容することで、*cebE* (SGR4735) , *bglC* (SGR4738) , *cebR* (SGR4739) を含む合計 10 遺伝子の上流域に CebR-box が存在することがわかった (表 2.2)。10 遺伝子のうち、SGR199 と SGR6928 のプロモーター領域については 2 つの CebR-box が存在していた。電気泳動度遅延アッセイの結果、図 2.6 に示す通り、*cebE* プロモーター領域と同様、これらすべてのプロモーター領域に CebR-H が結合することが示された。

### 2.3.7 CebR-box をそのプロモーター領域に持つ遺伝子に対し CebR が与える影響

前項で述べた通り、見いだされたすべての CebR-box を含む領域に対して CebR-H が *in vitro* レベルで結合することが示された。この結合が *in vivo* レベルで実際に転写に影響を与えているかどうかを調べた。*S. griseus* 野生株ならびに  $\Delta cebR$  株を、グルコースを唯一の炭素源とする SMM 最少培地にて生育させ、菌体より総 RNA を抽出し、定量的 RT-PCR に供した。結果、CebR-box をそのプロモーター領域に持つ遺伝子すべてについて  $\Delta cebR$  株における転写の亢進が見られた (表 2.2)。この結果より、CebR は *in vivo* で実際に CebR-box をそのプロモーター領域に持つ遺伝子を負に制御していることが示された。

### 2.3.8 *cebE* と *cebR* の転写解析

過去に、*S. reticuli* において CebR により制御されている遺伝子は、セロピオースを糖源として生育させた細胞において活性化されることが見いだされている (Schlösser *et al.*, 1999)。一方で *Thermobifida fusca* において CebR と高い相同性を有する CelR により制御されている遺伝子は、結晶セルロースを糖源として用いた細胞において活性化されることが見いだされている (Spiridonov *et al.*, 1999)。そこで著者は、*S. griseus* における CebR による制御がこれらの報告と同様の挙動を示すかどうかを試験するべく、*cebE* と *cebR* の転写解析を行った。全 RNA を、1% グルコース、1%セロピオース、1%グルコースと 1%セロピオース、1%グリセロールを糖源とした SMM 最少液体培地にて培養した菌体より調製し、低解像度 S1 マッピングに供した。成育時に恒常的に転写されていると考えられる主要シグマ因子である *hrdB* を、mRNA の量および品質を保証するためのコントロールとして用いた。結果、*cebE* の転写はセロピオースを糖源として用いた細胞において亢進し、これはグルコースによる抑制を受けることはなかった。 $\Delta cebR$  株より調製した RNA における *cebE* の mRNA 量は、その培養時にセロピオースが存在せずとも高レベルであった。このことから、CebR は CebE の転写抑制因子として機能し、細胞内にエフェクター分子が存在することでその機能が失われることが示され、前項の定量的 RT-PCR の結果が再現された。一方、*cebR* の転写は異なる 2 つの転写開始点を有していた。そのうち一方 (サイト I) からの転写はセロピオースにより誘導され、他方 (サイト II) からの転写は栄養源として用いた糖とは独立して常に生じていた (図 2.7(a))。

次に、*cebE* と *cebR* の転写開始点の決定を高解像度 S1 マッピングにより行った。それぞれ開始コドン 1 文字目を+1 とすると、*cebE* の転写開始点は-128 と-127 であり、*cebR* の転写開始点は-78 (サイト I) および-16 と-13 (サイト II) であった (図 2.7(b-e))。Strohl らの報告 (1994) に従い-10/-35 領域の同定を行ったが、*cebR* のサイト I における-35 領域のみ同定できなかった。*cebE* の-10/-35 領域間のスペーサーは 18 bp、*cebR* サイト II に関しては 17 bp であった。*cebE* について、CebR-box は転写開始点のわずかに下流に存在していた。一方 *cebR* については、CebR-box は転写開始サイト I の-10 領域のわずかに上流に存在していた。サイト I からの転写はセロビオースによって誘導されるのに対しサイト II からの転写は恒常的であったが、これはサイト II がサイト I に比べ CebR-box から離れているためだと説明づけることができる。

### 2.3.9 CebR と DNA の結合に対し各種糖が与える影響

一般に、LacI/GalR ファミリーに属する転写制御因子は、それが自身に結合することで自身と DNA 標的配列との結合が解離させられる低分子化合物、いわゆるエフェクター分子を有することが知られている。先行研究により、*S. reticuli* 由来 CebR はセロペンタオース (グルコースが  $\beta(1\rightarrow4)$  結合で 5 個連結されている糖) を主要なエフェクターとして認識することが明らかとなっている (Schlösser *et al.*, 2000)。これに対し、*T. fusca* 由来 CelR は、セロペンタオースでなくセロビオースをエフェクターとして認識する (Spiridonov *et al.*, 1999)。著者は、*S. griseus* 由来 CebR のエフェクター分子が何であるかを電気泳動移動度遅延アッセイにより決定した。CebR-H と *cebE* プロモーター領域との結合は、試した全てのセロオリゴ糖 (グルコースが  $\beta(1\rightarrow4)$  結合で複数個連結されている糖) の添加により解除された (図 2.8)。これらセロオリゴ糖によるみかけの  $K_d$  値は、セロビオースについて 0.22 mM、セロトリオースについて 0.99 mM、セロヘキサオースについて 4.1 mM、セロペンタオースについて 7.9 mM、セロテトラオースについて 12 mM であった (図 2.8(b)(c))。その他試行した、セロオリゴ糖に属さない糖 (グルコース、マルトース、ラクトース、ゲンチビオース) およびリン酸化糖 (グルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸) については終濃度 20 mM を反応系に添加しても CebR-H と *cebE* プロモーター領域との結合に何ら影響を与えなかった (図 2.8(a))。

#### 2.3.10 *cebR* 破壊株は生育糖源特異的に形態分化不全となる

$\Delta cebR$  株は生育糖源特異的に形態分化不全となることが明らかとなった。すなわち、YMP 寒天培地をもとにした際、終濃度 1.5% グルコースの添加では野生株と差異が見られなかったが、終濃度 1.5% のラクトースでは形態分化不全が観察された (図 2.9(a,b))。この形態分化不全は、終濃度 1.0% グルコースと 0.5% ラクトースの双方を加えた際に顕著になり、bald 表現型を呈した (図 2.9(c))。*S. coelicolor* A3(2)において過去に見いだされた bald 株群のうちいくつかのものは、その変異遺伝子が培地の酸性化を引き起こし、これが bald 表現型の原因となることが知られている (Susstrunk *et al.*, 1998、Viollier *et al.* 2001a; 2001b) (序論表 0.1 を参照)。このタイプの bald 株においては、緩衝剤の添加によって培地の pH を中性域に保つことにより、bald 表現型が回避され、野生株と同様の形態に至ることが確かめられている。これを踏まえ、YMP 寒天培地に終濃度 1.0% グルコースと 0.5% ラクトースの両方を加えた培地に、更に終濃度 100 mM の TES (pH7.5)を添加した培地における  $\Delta cebR$  株の形態を観察した。結果、その bald 型形態は一部回復したものの、完全な回復には至らなかった (図 2.9(d))。

## 2.4. 考察

本章にて著者は以下の流れで研究を行った。

- ・ *S. griseus* グルコースカタボライト抑制不全株のスクリーニング系を構築した。
- ・ 実際に目的の表現型を持つ株の取得に成功した。
- ・ ショットガンクローニング法により変異点がLacI/GalR型転写制御因子に属するCebRをコードする遺伝子上にあることを同定した。
- ・ 遺伝子破壊と相補により変異株の表現型が確かに *cebR* 変異によるものであることを示した。
- ・ CebR の機能解析を行った。

本項では、まず本章で明らかとなった *S. griseus* 由来 CebR の機能について過去の知見と比較することにより論じ、次に本遺伝子が形態分化ならびにカタボライト抑制に対しどのように寄与するかについて考察したい。

### 2.4.1 *S. griseus* における CebR の機能

本章にて明らかとなった *S. griseus* 由来 CebR の機能は以下の通りである。

- ・ CebR は 14 bp からなる反復繰り返し配列 (CebR-box) に対し結合能を持つ。
- ・ CebR-box を自身の上流に持つ遺伝子は、*cebR* 自身ならびに隣接するセロビオース利用遺伝子群だけでなく、ゲノム全体にわたり 10 個存在する。CebR は *in vitro* レベルでこれらすべてに実際に結合し、*in vivo* レベルでこれらを負に制御している。
- ・ CebR レギュロンの転写は、*in vivo* レベルにおいてセロビオースにより誘導され、グルコースによりその誘導が打ち消されることはない。
- ・ *in vitro* レベルにおいて、CebR に対する最も強いエフェクターはセロビオースであり、その他セロトリオースからセロヘキサオースまで広範なセロオリゴ糖がエフェクターとして機能する。

近縁種のオルソログに関する研究については *S. reticuli* 由来 CebR ならびに *Thermobifida fusca*

由来 CelR に関する研究がなされている。*S. griseus* CebR を含む 3 者の比較を、表 2.3 として掲載した。標的 DNA 配列は三者とも同一であり、14 bp からなるスパーサーを含まない反復繰り返し配列 TGGGAGCGCTCCCA である。この配列は古くより多くの放線菌属セルラーゼ遺伝子上流から見いだされているものであり、高 GC 含有型グラム陽性細菌のセルラーゼに対する "universal regulatory site" であることが提唱されている (Spiridonov and Wilson, 1998)。*T. fusca* においては、*celR* はどのセルロース関連遺伝子とも独立した位置に存在し、自身ならびにセルロース分解酵素群を制御していることが示唆されている (Spiridonov and Wilson, 1998; Spiridonov and Wilson, 1999; Chen and Wilson, 2007)。他方で *S. reticuli* の CebR は、自身をコードする遺伝子、隣接するセロビオース透過型 ABC トランスポーターとセロビオース代謝酵素、離れた位置に存在するセルロース分解酵素 (Cel1) を制御することが明らかになっている。*T. fusca* においては CelR に制御されているトランスポーター遺伝子は見つかっていない。

これら 2 者と *S. griseus* を比較すると、「セルロース分解産物が環境中に存在する際にこれらの利用酵素を増大させる」というその基本的な役割は同一であると考えられる。*S. griseus* 由来 CebR の特徴的な点として着目すべきは、そのエフェクター分子である。*T. fusca* 由来 CelR のエフェクターはグルコース  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) 結合 2 量体であるセロビオースである一方で、*S. reticuli* 由来 CebR のエフェクターはセロビオースではなく、グルコース  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) 結合 5 量体であるセロペンタオースであることが示されている。セロペンタオースもしくはこれよりも大きいセロオリゴ糖を特異的に取り込む機構が *S. reticuli* に存在することは考えにくく、少なくとも *S. reticuli* の *cebR* に隣接してコードされるトランスポーターはセロビオース取り込み型であってセロペンタオース取り込み型でないことから、*S. reticuli* 由来 CebR のエフェクター分子セロペンタオースは何らかの機構により細胞内にて再合成されるものであると予想されている (Schlosser et al., 2000)。一方で *S. griseus* 由来 CebR については、セロビオースからセロヘキサオース (グルコース  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) 結合 6 量体) までの幅広いセロオリゴ糖が *in vitro* においてはエフェクター分子として認識されることが本研究により示された。*S. griseus* 由来 CebR が幅広い種類のエフェクター分子を有することに対する意義については下記のように 2 通り考えられる。

1. *S. griseus* 由来 CebR は、*in vivo* においても実際に、複数種類のセロオリゴ糖に対応し、利用可能な栄養源に対して柔軟にその利用遺伝子の転写量を変化させているのかもしれない。この場合、セロテトラオース、セロペンタオース、セロヘキサオースといった比較的大きいセロオリゴ糖に関しては、実際にこれらに対する未知の取り込み系が存在するのかもしれないし、また先行研究から *S. reticuli* で予想されているように、細胞内にてセロオリゴ糖の再構成を行う機構が存在するのかもしれない。
2. *S. griseus* 由来 CebR は、そのエフェクター分子に対する結合部位の構造が、“ポケット型”でなく“トンネル型”であり、グルコース  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)結合がありさえすればそれを認識できる構造を取っているのかもしれない。すなわち *S. griseus* 生体内には比較的大きいセロオリゴ糖が有意な量存在するわけでないが、*in vitro* においてはエフェクター結合ポケットの寛容性によりこれらも結合するように判断されるのかもしれない。

上記 2 仮説のうちどちらが正しいのか推測するすべは現在の所ない。各放線菌に存在する CebR ホモログに対して正しいエフェクター分子が何であるのかを決定することや、蛋白立体構造解析によりエフェクターポケットの構造を把握することが必要であろう。

興味の持たれることとして、*S. griseus* と同じ *Streptomyces* 属であり、ゲノム解読が初期に完了したモデル放線菌である *S. coelicolor* A3(2)においては、*cebR* ならびに隣接するセロビオース利用オペロンのホモログは保存されているにもかかわらず、生育炭素源をセロビオースとしてもこれらは転写されないという報告がなされている (Bertram *et al.*, 2004)。CebR は土壤環境中に豊富に存在するセルロースを分解するための制御因子であり、*Streptomyces* 属が土壤環境中で生育するにあたりその重要性は高いと考えられる。そうであるにもかかわらず CebR の働きを *S. coelicolor* A3(2)が失っているのは不可解な現象であり、生理学ならびに進化学上のその意義は、今後議論されるべきであろう。

#### 2.4.2 *S. griseus* において CebR が形態分化に影響を与えるのはなぜか

以上の通り、*S. griseus* 由来 CebR は、過去の他の放線菌種においてなされた報告と同様、セロビオースを初めとするセルロース分解産物の転写をグローバルに制御していることが証明され



た。では本研究で示されたように、当該遺伝子がカタボライト抑制ならびに形態分化に関与するのはどのような経緯によるものであろうか？重ねて述べているように形態分化能を失った *Streptomyces* 変異株は多くの場合同時にカタボライト抑制能を失うことから、今回  $\Delta cebR$  において見られたカタボライト抑制の解除も形態分化不全の二次的影響と考えるべきである。それでは  $\Delta cebR$  が形態分化不全に陥る原因は何であろうか？ CebR は代謝産物を感知するタイプの転写制御因子であるが、このような転写制御因子が *Streptomyces* 属の形態分化に影響を与える例は過去に 2 例知られている。これについて概説する。

1. Westpheling らの研究グループは、*S. coelicolor* A3(2)の変異点未知 *whi* 変異株群 (white 変異株群。基底菌糸から気中菌糸へは至るがその後胞子形成へと移行できない変異株群。序論にて概説) を解析した結果、GntR 型転写制御因子をコードする遺伝子 (*agl3R* と命名) を変異点として同定するに至った (Sprusansky *et al.*, 2003)。GntR 型転写制御因子の転写制御様式は LacI/GalR 型転写因子のそれと同じである。すなわち N 末端側に DNA 結合ドメインを持ち、エフェクター非存在下ではリプレッサーとして機能する。C 末端側にはエフェクター結合ドメインを持ち、エフェクター存在下においてはこのドメインにエフェクターが結合し、DNA との結合が解除され、制御下にある遺伝子の転写が開始される (Haydon and Guest, 1991)。同じ研究グループによる後の解析の結果、この GntR 型転写制御因子 Agl3R は、自身ならびに隣接する基質未知 ABC トランスポーターを負に制御することがわかった (Hillerich and Westpheling, 2006)。agl3R の変異により *whi* 形態が生じる原因は、Agl3R の機能不全により、本来ならば Agl3R によって制御されている隣接する *agl3EFG* が不適切に (おそらく過剰に) 発現することが原因であることが示された。実際、agl3R と *agl3EFG* の両者を破壊した株においては、形態分化異常は観察されなかった。なお、Agl3R の制御する ABC トランスポーターである Agl3EFG の基質、ならびに Agl3R のエフェクター分子については未同定のままである。
2. 2002 年、*S. griseus* を題材に、著者の所属研究室の Seo らにより「*dasR* (GntR 型転写制御因子をコードする) またはそれと隣接する *dasA* (ABC トランスポーター構成因

子をコードする)を破壊することによりグルコース含有培地上で *bld* 型形態が見られる」ことが示された。*dasA* 破壊による *bld* 形態は糖源に依存しなかったが、*dasR* 破壊による *bld* 形態は糖源がグルコースである場合のみ生じた (Seo *et al.*, 2002)。その後別グループにより、バイオインフォマティクス的手法に基づき *S. coelicolor* A3(2)において DasR が *N*-アセチルグルコサミン利用遺伝子群と PTS 遺伝子群をグローバルに制御していることが示された (Rigali *et al.*, 2004)。DasR に対するエフェクター分子はグルコサミン-6-リン酸であると同定されている (Rigali *et al.*, 2006)。 $\Delta$ *dasR* が形態分化に異常をきたす理由をその論文の著者らは以下のように記述している。「様々なデータから総合して、*S. coelicolor* A3(2)において PTS 蛋白が形態分化シグナルカスケードの一端を担っていると考えられる。転写抑制因子である DasR が存在しない際には PTS 遺伝子群が恒常的に強く発現し、その結果として PTS 蛋白リレーに不具合が生じ、PTS 蛋白からの形態分化シグナルが生じなくなる。このため  $\Delta$ *dasR* 株では形態分化の不具合が生じる。」

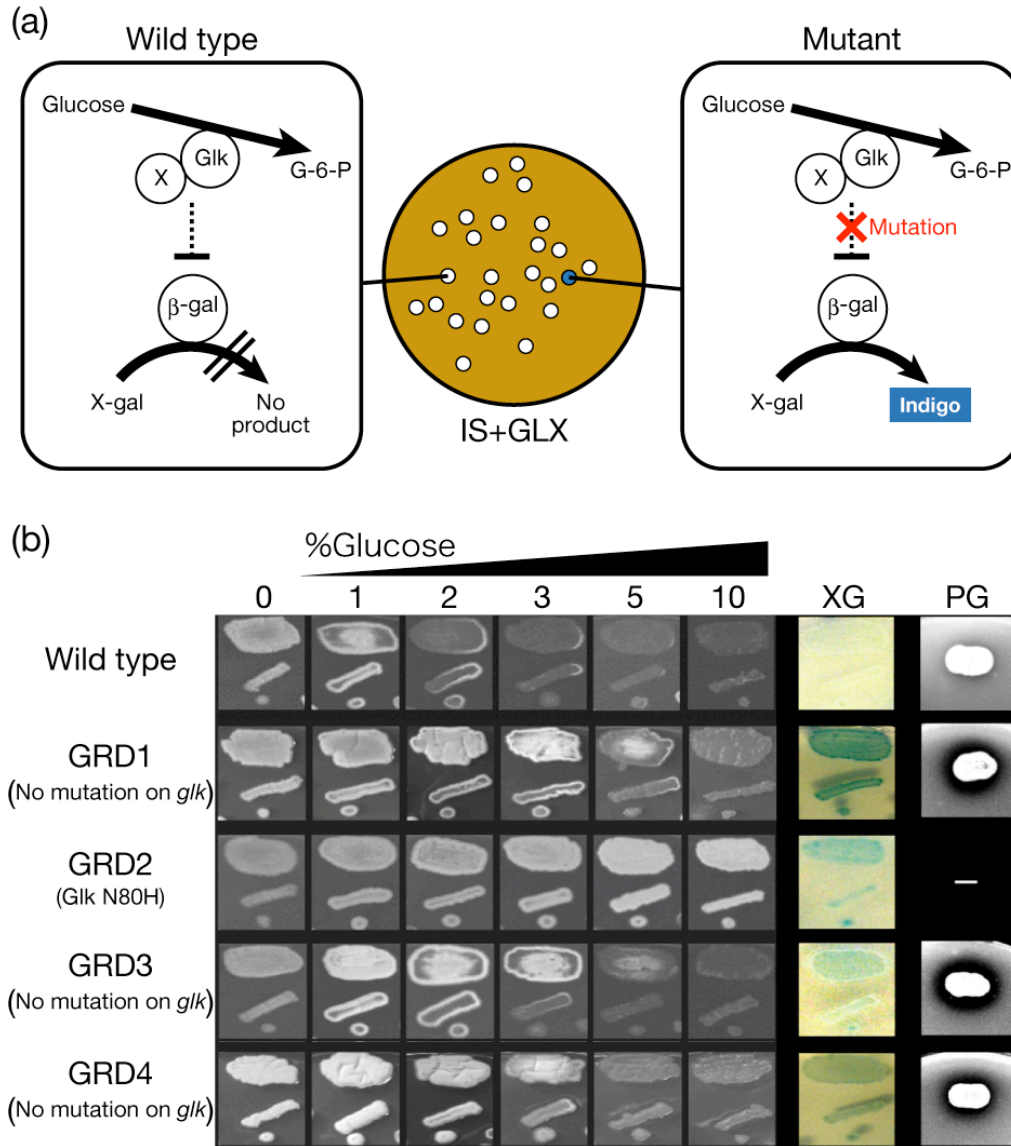
上記を要約すると、1 は「本来発現が適度に制御されているべきトランスポーター型膜蛋白の不適切な増加」、2 は「本来発現が適度に制御されているべき細胞内リン酸シグナル蛋白の不適切な増加」がそれぞれ形態分化阻害の原因になっているとすることができる。しかしながらいづれにせよこれら「不適切な増加」が具体的にどのように形態分化の抑制に結びついているのかは残念ながら分子レベルで明らかにされていない。今回得られた  $\Delta$ *cebR* 株が形態分化不全に陥る経緯が、上記の報告とある程度共通しているのか、あるいはまったく別であるのかについて現状では断言することができない。しかし共通していると仮定すれば、少なくとも 1 つのモデルとしては以下のようなものが構築できる。「通常は CebR により抑制されており、また糖源としてラクトースが存在する際に発現誘導される遺伝子が存在して、これが異常に発現すると形態分化が負の影響を受ける。」今後、ゲノムデータベースとマイクロアレイなどの技術を用いて、 $\Delta$ *cebR* がラクトース特異的に形態分化不全に至るための原因遺伝子が特定されることが期待される。*Streptomyces* 属の形態分化シグナル遺伝子やその阻害遺伝子については未知な点が数多く残されているが、既にセルロース代謝の観点から解析が進んでいる *cebR* が形態分化に関わる

遺伝子として同定されたことは、*Streptomyces* の形態分化研究を進展させる上で大きな進歩であると考えられる。過去に同定された *bld* 遺伝子群や *whi* 遺伝子群を初めとする形態分化関連遺伝子は、生育糖源がグルコースである際にのみ効果を示すものが多数を占めている。グルコースではなくラクトースに特異的に形態分化不全を引き起こす株の報告例は過去になく、この意味でも  $\Delta$ *cebR* の再発見は *Streptomyces* 属の形態分化研究に対し大きな貢献を果たすものと期待される。

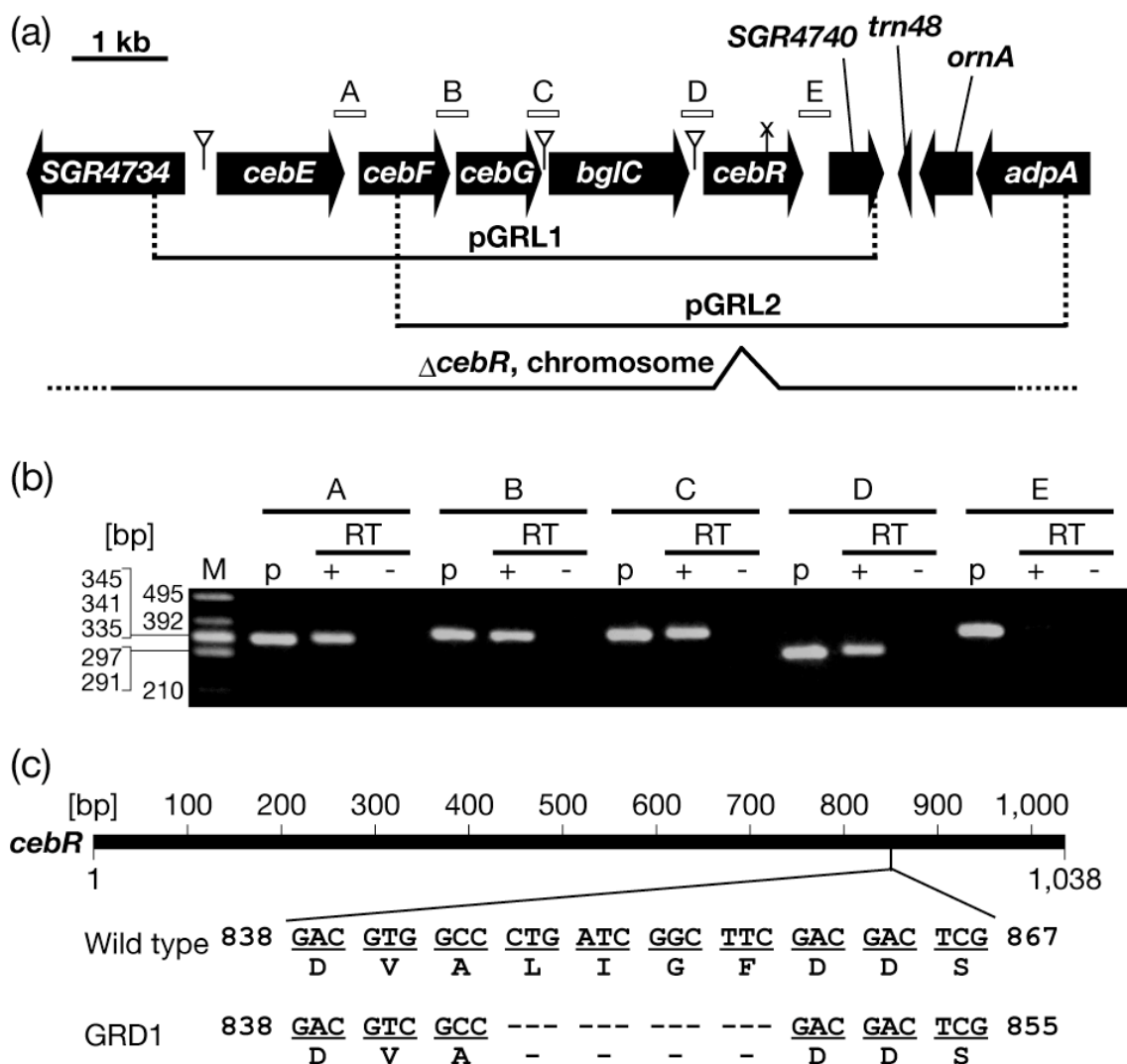
#### 2.4.3 まとめ

本章を通し著者は、放線菌においてセルロース系糖の資化を制御する因子として知られる *CebR* の *S. griseus* における諸性質を明らかとするとともに、これをコードする遺伝子が欠損した株はラクトースに応答して形態分化不全を引き起こすという予想外の発見をした。この発見は、極めて複雑な機構によって成立する *Streptomyces* 属形態分化メカニズムに対する知識の蓄積として意義深いものであるといえる。

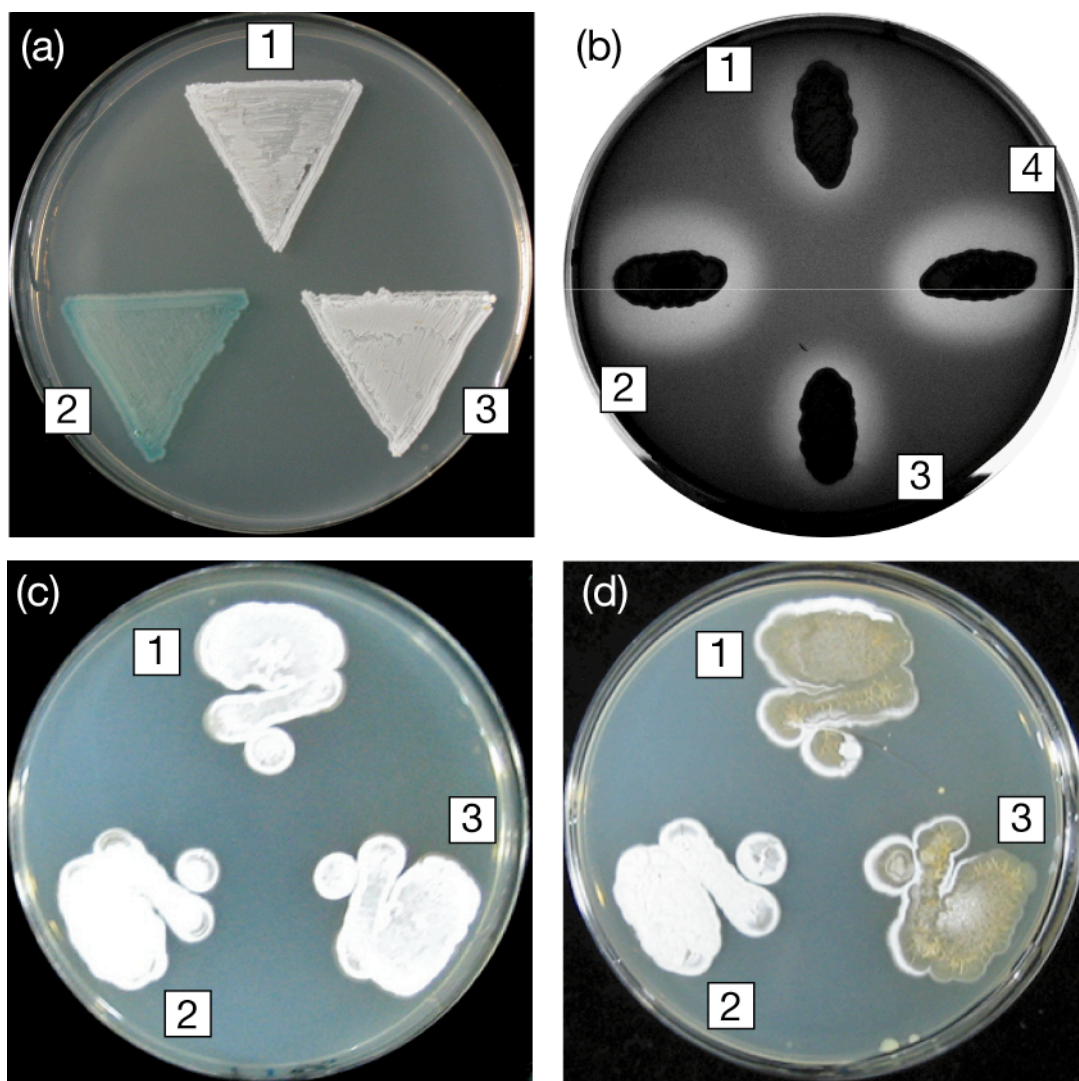
## 2.5 図表



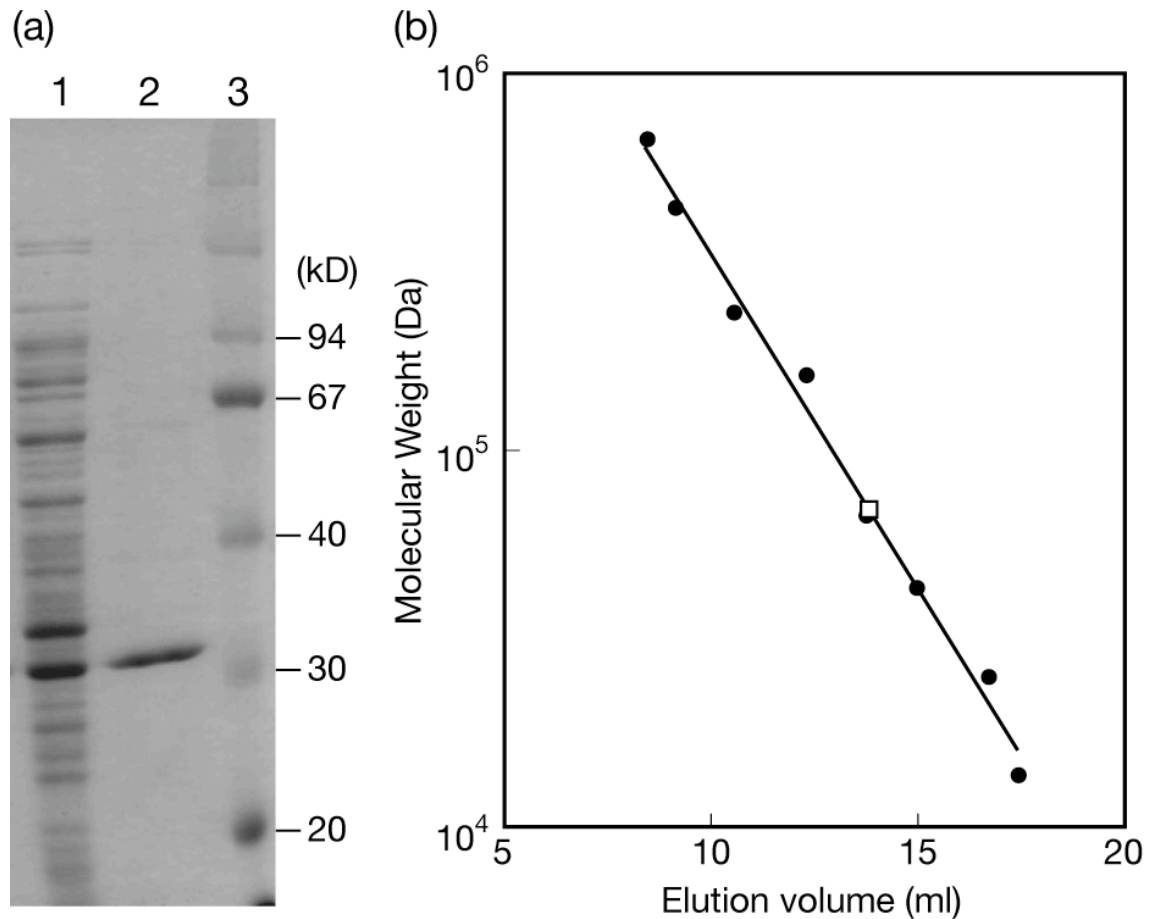
**図 2.1** (a)  $\beta$ -ガラクトシダーゼに対してグルコース抑制の生じない変異株を分離するための戦略を模式的に示した。グルコース、ラクトース、X-gal を含む寒天培地上にて、*S. griseus* は通常白色を呈する。これは *S. griseus* に内在する  $\beta$ -ガラクトシダーゼがグルコースカタボライト抑制を受けるためである (左)。青色を呈するコロニーを見出だした場合、この青色呈色は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するグルコースカタボライト抑制が解除されたために X-gal の分解が生じた結果であると考えられる (右)。(b) 得られた変異株 (GRD 株群) の表現型。野生株においては、YMP 培地中のグルコース濃度が上昇するにつれ形態分化の抑制が生じる。今回のスクリーニングにより得られた GRD1-4 は、より高いグルコース濃度においても形態分化が可能である。また、X-gal (XG) 分解能やペプチドグリカン分解能 (PG) についても GRD 変異株群は脱抑制されている。*glk* 領域の DNA シークエンシングにより、GRD2 は点変異を有しており、その他 GRD1、3、4 については有していないことを確認した。



**図 2.2** GRD1 の変異点。(a) GRD1 における  $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するグルコースカタボライト抑制解除を低コピー導入により相補するプラスミドのコードする領域、ならびにその近傍の遺伝子構成を模式的に示した。黒色の水平方向直線は、相補を行ったプラスミドのコード領域を示す。白抜きの水平方向直線は、RT-PCR によって調製した cDNA を増幅した際の増幅領域を示す。x 印は GRD1 にて見いだされた変異点を示す。逆三角形は CebR-box 配列を示す。(b) cDNA を鋳型とした PCR による増幅産物をアガロースゲルに泳動した泳動図。cebR 近辺遺伝子のモノシストロニック性が証明された。RT-PCR における逆転写反応にはランダムヘキサマーを用いた。cDNA 増幅には、A-E 5 種類のプライマーセットを用いた。それぞれによって増幅される領域の位置は、(a) の A-E にそれぞれ対応する。cDNA 合成時に使用した RNA にクロモソーム DNA が含まれている可能性を排除するため、3 種類の鋳型を用い増幅を行った。鋳型の略号は以下の通り。p はプラスミド DNA。RT+ は RNA に対して逆転写反応を行ったもの。RT- は RNA に対して逆転写反応を行っていないもの。M は分子量マーカーを示す。(c) GRD1 において見いだされた変異点の詳細。cebR (SGR4739) の第 847 番塩基から第 858 番塩基までの計 12 塩基が欠失し、結果として GRD1 では CebR が 4 アミノ酸欠失していることが示された。

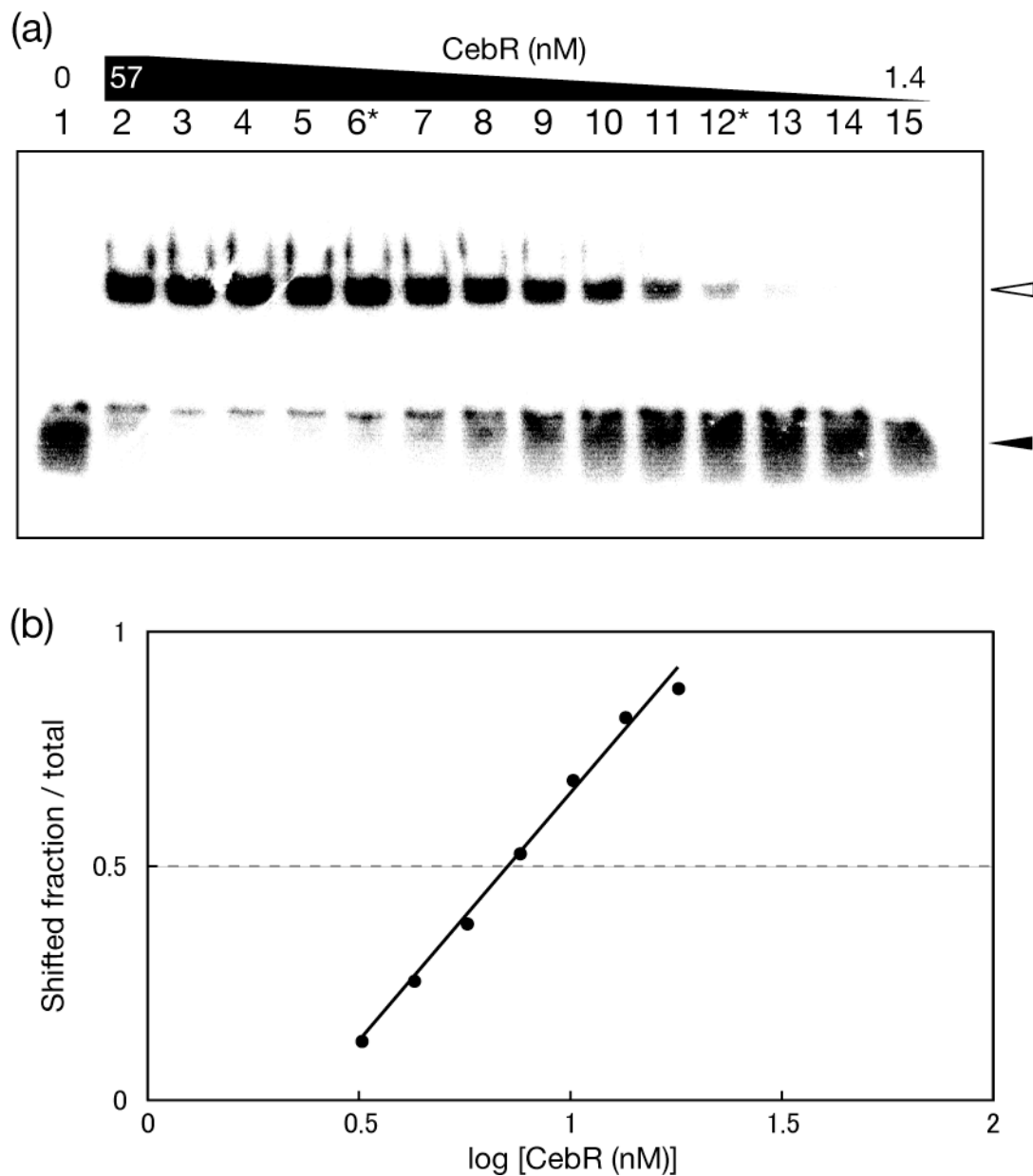


**図 2.3** *ΔcebR* 株の各種寒天培地上における表現型。各菌体横に表示された数字は、それぞれ以下の株であることを示している。1, Wild type / pIJ922。2, *ΔcebR* / pIJ922。3, *ΔcebR* / pIJ922-*cebR*。4, *ΔcebR* / pIJ922-*cebR*<sup>m</sup> (図 2.2(c)に示された通り、12 塩基の欠失変異を持つ *cebR* を 1 細胞あたり 1 コピー発現させたもの)。使用培地は以下の通り。(a) IS-GLX 寒天培地。(b) YMP 寒天培地に終濃度 1%のグルコースと 0.25%のペプチドグリカンを追加したもの。菌体のペプチドグリカン分解によるハロー形成が観察される。(c) YMP 寒天培地。(d) 終濃度 2.0%グルコースを追加した YMP 寒天培地。



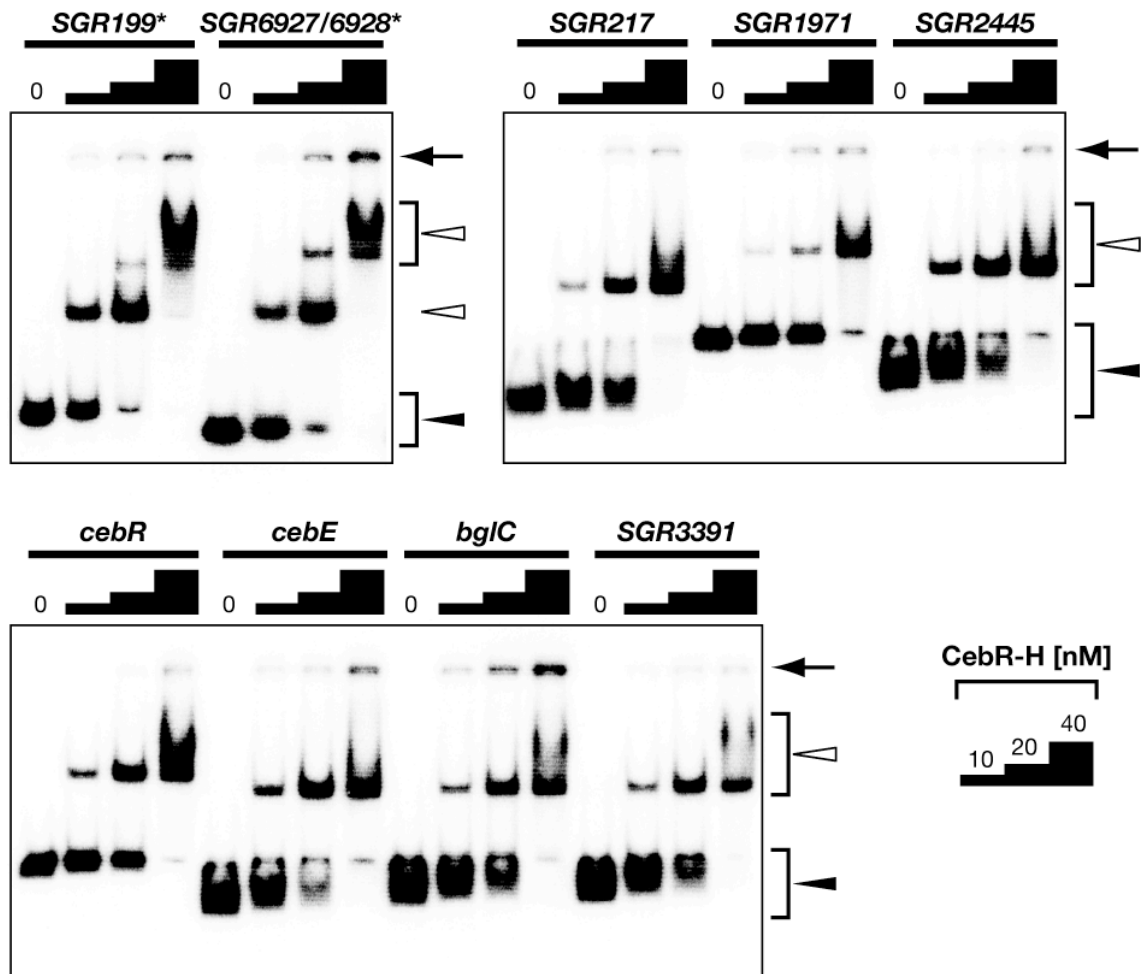
**図 2.4** CebR-H 精製。(a) 精製 CebR-H の 15%ポリアクリルアミド電気泳動図。レーン 1, *cebR* 異種発現大腸菌 (*E. coli* BL21(DE3)Gold / pET-*cebR*) の蛋白可溶性画分; レーン 2, 精製 CebR; レーン 3, 分子量マーカー。(b)ゲル濾過 CebR-H のゲル濾過図。分子量マーカーを"●"、精製 CebR-H の溶出位置を"□"で示した。分子量マーカーとしては、チログロブリン (669 kD)、フェチリン (440 kD)、カタラーゼ (232 kD)、アルドラーゼ (158 kD)、アルブミン (67 kD)、オバルブミン (43 kD)、キモトリプシノーゲン A (25 kD)、リボヌクレアーゼ A (13.7 kD) を用いた。分子量マーカーによって作製された検量線により、CebR-H 溶出分子量は 70.1 kD と算出された。アミノ酸配列によって算出された CebR-H モノマーの分子量は 36 kD であることから、CebR-H はゲル濾過溶液中でホモダイマーであることが強く示唆された。





**図 2.5** (a) *cebE* 上流域を含む DNA 断片に対する CebR-H 結合を確かめるための電気泳動移動度アッセイ。泳動図右の黒い三角は CebR-H 非結合のフリープローブ、白い三角は CebR-H 結合に移動度の変化したプローブを示す。CebR-H の容量反動的なバンドシフトが見られた。(b) (a) で得られた結果のうち、全プローブバンドに対するシフトバンドの比について線形性が見られた CebR-H 濃度のもの (レーン 6 からレーン 12) について、反応系に含まれる CebR-H 濃度を横軸に、全プローブによるバンド濃度に対するシフトバンドの比を縦軸にプロットした。この検量線より、シフトバンドの比が 0.5 となる CebR-H 濃度を算出し、これを見かけの結合定数とした。見かけの  $K_d$  値は 8.6 nM であった。





**図 2.6** CebR-box と予想される領域を含む DNA 断片に対する CebR-H の結合を調べる電気泳動移動度アッセイ。泳動図の上にその下流にコードされる遺伝子名を示した。各 DNA 断片に対するアッセイは 4 レーンからなり、各々の反応系に対する CebR-H 添加量（終濃度）は左から順に 0、10 nM、20 nM、40 nM である。図右端の黒い三角は CebR-H 非結合のフリープローブ、白い三角は CebR-H 結合に移動度の変化したプローブ、矢印はウェルの位置をそれぞれ示す。CebR-box を 2 個含むと予想される領域の下流遺伝子についてはアスタリスクを付したが、これらに関しては 2 段階のシフトバンドが見られたことから、2 個の CebR-box 両者について結合が生じたと考えられる。なお、SGR6927 と SGR6928 は隣り合った遺伝子でありプロモーター領域を共有している。

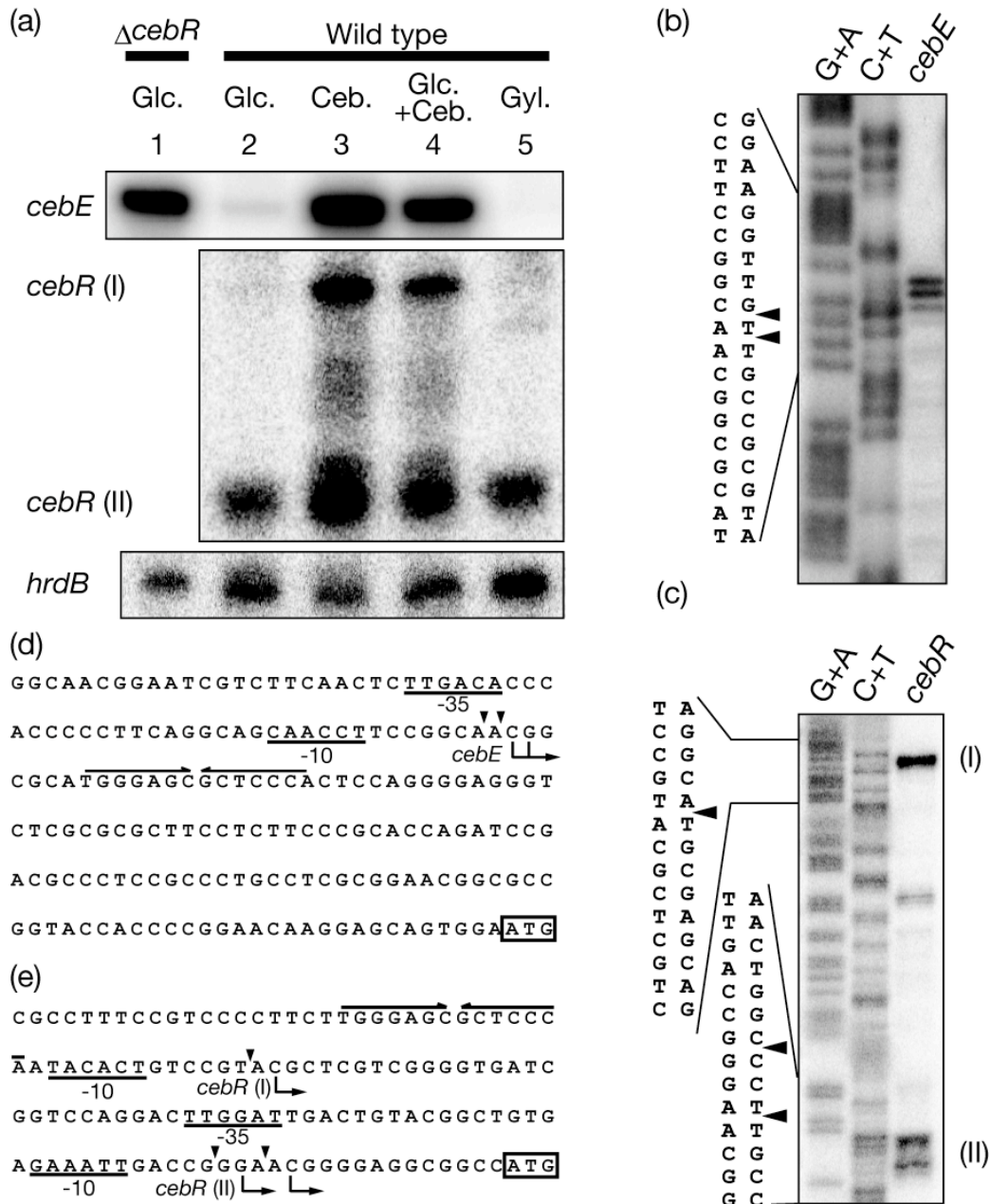
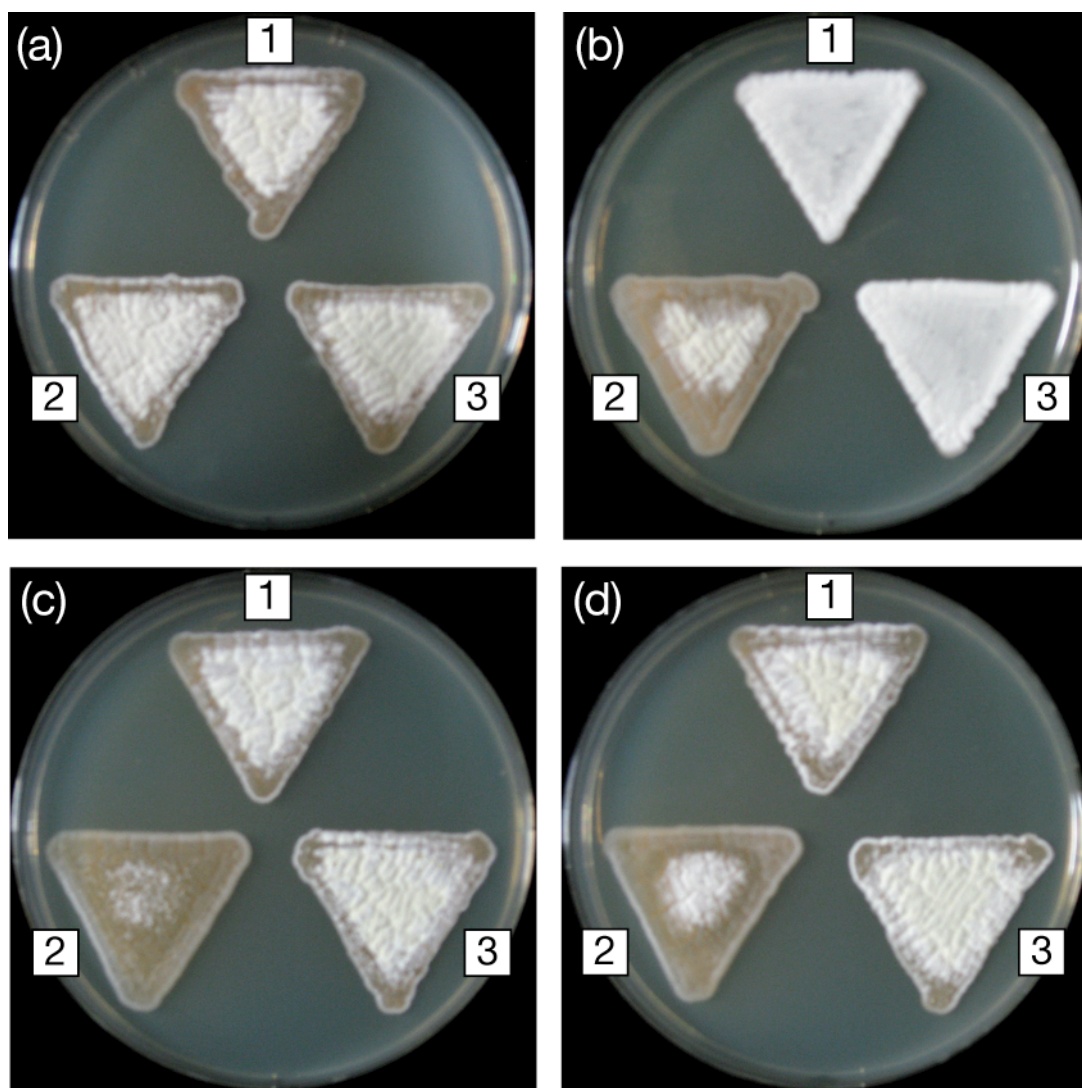


図 2.7 *cebR* および *cebE* の転写解析。(a) 低解像度 S1 マッピング法により転写量の測定を行った。菌体培養は往復型振とう機により 30°C、120 rpm にて行った。1% グルコースを含む YMP 液体培地にて定常期まで生育させた野生株または  $\Delta cebR$  株を前培養菌体とし、無菌的に洗浄したのち、SMM 液体培地に各種糖源を添加したものに対して 1% 植菌して 36 時間の本培養を行った。レーン 1 は  $\Delta cebR$  株、レーン 2-5 は Wild type より調製した全 RNA をそれぞれ用いた。本培養時の添加糖源は、レーン 1 と 2 は終濃度 1% グルコース。レーン 3 は終濃度 1% のセロビオース。レーン 4 は終濃度 1% のグルコースと終濃度 1% のセロビオース。レーン 5 は終濃度 1% のグリセロール。*hrdB* は *S. griseus* の主要シグマ因子であり、各サンプルの RNA 量ならび品質を保証するコントロールとして用いた。(b-e) 高解像度 S1 マッピング法による転写開始点の決定。(b) *cebE* 転写開始点の決定。決定された転写開始点、ならびにその近傍の配列を(d)として示した。(c) *cebR* 転写開始点の決定。決定された転写開始点、ならびにその近傍の配列を(e)として示した。(b)(d) では、S1 反応によって生じたバンドの位置を黒三角で示した。また(c)(e)では、推定転写開始点を曲がった矢印で示した。CebR-box の反復繰り返し配列は向かい合った矢印で示した。推定-35 ならびに-10 領域を下線で示した。四角で囲まれた ATG は、*cebE* ならびに *cebR* の推定開始コドンを示す。





**図 2.9**  $\Delta cebR$  株の各種寒天培地上における表現型。各菌体横に表示された数字は、それぞれ以下の株であることを示している。1, Wild type / pIJ922。2,  $\Delta cebR$  / pIJ922。3,  $\Delta cebR$  / pIJ922-*cebR*。使用培地は、YMP 寒天培地に対しそれぞれ以下を加えたもの。(a) 終濃度 1.5% グルコース。(b) 終濃度 1.5% ラクトース。(c) 終濃度 1% グルコースと終濃度 0.5% ラクトース。(d) 終濃度 1% グルコースと終濃度 0.5% ラクトースと 100 mM TES (pH7.5)。

表2.1 本章で用いたオリゴヌクレオチド一覧 (3 頁中 1 頁目)

Name	Sequence (5' → 3')	nt underlined = in DDBJ no. AP009493	Direction	Sequence in <b>boldfaced</b>	Use
DR-for	GCGAATTCATGCGGCCTCGAC GCCGTCTTCG	5570517	→	EcoRI, NcoI	<i>cebR</i> 破壊
DR-rev	GCGCAAGCTTTGCGGCGACTCAC CGCACTTG	5571618	←	HindIII	<i>cebR</i> 破壊
CR-for	CCCGAAGCTTCTCGAGCGGTCTA CGTCGACTACGAGA	5569478	→	HindIII, XhoI	<i>cebR</i> 相補
CR-rev	CGCGAATTCGCGACCCAGGCCGC ACTCAG	5570919	←	EcoRI	<i>cebR</i> 相補
PR-for	CGCGGATCCATATGCGGCATCGC GAGTACGG	5569768	→	BamHI, NdeI	CebR-H 生産
PR-rev	CGCGAATTCGCGACCCAGGCCGC ACTCAG	5570919	←	EcoRI	CebR-H 生産
HR-for	GACCGGGCCACCGCCTTTC	5569631	→		S1 mapping
HR-rev*	GCCCGTGCCGCGACCTCTTC	5569829	←		S1 mapping
HLE-for	GCCGCCCCCGTTACCTTC	5564381	→		S1 mapping
HE-rev*	GATCTGGTGCGGGAAGAGGAAG	5564576	←		S1 mapping
LR-for	ACCCAGCTCCGTACGCCGAAG	5569508	→		S1 mapping
LR-rev*	CCCGGGGCGAGCCGTTGATG	5569879	←		S1 mapping
LE-rev*	GCGAGGGTCAGGGTGATGTTG	5564797	←		S1 mapping
LB-for	TCGGCCCATTTCTGCACGTATGAG	2007659	→		S1 mapping
LB-rev*	TCGATGAGCGCCATCACAGACTCG	2007346	←		S1 mapping
rA-for	CCATCTCCACCCAGATCAACAAC	5565865	→		cDNA検出
rA-rev	TTCGCTGGGCGGTTCTTCTTC	5566205	←		cDNA検出
rB-for	CCAGTACGAGACGCTCAGCATC	5566970	→		cDNA検出
rB-rev	CGCGACCAGGGTCCAGTAGAG	5567335	←		cDNA検出
rC-for	CTGCCGCTGCTGGTGGTGTTTC	5567987	→		cDNA検出
rC-rev	GTCGCGGTAGCGGTGGAAGTG	5568361	←		cDNA検出
rD-for	CCAGCTCCGTACGCCGAAGTC	5569510	→		cDNA検出
rD-rev	GCCCGTGCCGCGACCTCTTC	5569829	←		cDNA検出
rE-for	GCCACGGAGCTGGTGGTCC	5570772	→		cDNA検出
rE-rev	GATACCGAGGCCGAGGAGTAAG	5571160	←		cDNA検出

(\*) [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPにより末端をラベル化して使用した。

表2.1 本章で用いたオリゴヌクレオチド一覧 (3 頁中 2 頁目)

Name	Sequence (5' → 3')	nt underlined = in DDBJ no. AP009493	Direction	Sequence in <b>boldfaced</b>	Use
eSGR199-for	AGCAGTCGCGACCGGGGATTG	202721	→		EMSA
eSGR199-rev	CGGGACGATCACAGGATGAAAAG	203015	←		EMSA
eSGR217-for.	CGGGCGACGGAGCACATCTTC	227579	→		EMSA
eSGR217-rev.	GTTTCGAGCCGCTTCTGCGTAAC	227659	←		EMSA
eSGR1971-for	GCGCATAGCGCCCGACAGCAC	202721	→		EMSA
eSGR1971-rev	GTGACGCCGGTGCCGATCTTC	203015	←		EMSA
eSGR2445-for	CGCCTTCCCCTCCCCCATTC	2883425	→		EMSA
eSGR2445-rev	CGAGCGTACGCAGGAGTCTTCTC	2883540	←		EMSA
eSGR3391-for	CGGCCAGACGTGGCCGGAAG	3973003	→		EMSA
eSGR3391-rev	GTGCGTATGCAGATGTCAAGAG	3973148	←		EMSA
eSGR4735( <i>cebE</i> )-for	GGAATCGTCTTCAACTCTTGACAC	5564457	→		EMSA
eSGR4735( <i>cebE</i> )-rev	GATCTGGTGCGGGAAGAGGAAG	5564576	←		EMSA
eSGR4738( <i>bglG</i> )-for	GGCGTCCTCTCCACCTCCTTC	5568078	→		EMSA
eSGR4738( <i>bglG</i> )-rev	GCCGCGCCCCAGAGGAAACC	5568216	←		EMSA
eSGR4739( <i>cebR</i> )-for	CACTGGTACGGCGAGGTCATC	5569538	→		EMSA
eSGR4739( <i>cebR</i> )-rev	CACAGCCGTACAGTCAATCCAAG	5569738	←		EMSA
eSGR6927/6928-for	GCCAATCCGCGACGCGAAGTC	8314691	→		EMSA
eSGR6927/6928-rev	TCCGTGACGCTCAGGAGGTAAG	8314897	←		EMSA

(\*) [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPにより末端をラベル化して使用した。



表2.1 本章で用いたオリゴヌクレオチド一覧 (3 頁中 3 頁目)

Name	Sequence (5' → 3')	nt underlined = in DDBJ no. AP009493	Direction	Sequence in <b>boldfaced</b>	Use
qSGR1701( <i>hrdB</i> )-for	GTGGCGGAGCTTCGACATC	2005911	→		quantitative RT-PCR
qSGR1701( <i>hrdB</i> )-rev	GAAGGTCATCGAGGTCCAGAAG	2006235	←		quantitative RT-PCR
qSGR199-for	GCATCTGACGGCCGGAAGAC	203670	→		quantitative RT-PCR
qSGR199-rev	AGCTCGGTGCTGGGCGAGTAG	203780	←		quantitative RT-PCR
qSGR217-for.	GTGGTAGGTGACGAAGCCGTTG	226823	→		quantitative RT-PCR
qSGR217-rev.	CGACGGCCTCTTCGACATGAAG	226955	←		quantitative RT-PCR
qSGR1971-for.	GCGCGCCGAGCGTGATCAGAC	2326498	→		quantitative RT-PCR
qSGR1971-rev.	GACGCCGACACCCAGCTGAAC	2326639	←		quantitative RT-PCR
qSGR2445-for	GCGGGCACTCCGAGCGCCTAC	2883888	→		quantitative RT-PCR
qSGR2445-rev	GAGCGAGTCGGGCTCGATGAC	2883983	←		quantitative RT-PCR
qSGR3391-for	GGACCTGCTGCCGAACATCTTC	3973191	→		quantitative RT-PCR
qSGR3391-rev	TCCGCCGTGCCGAGGATGTAG	3973301	←		quantitative RT-PCR
qSGR4735( <i>cebE</i> )- for	GGCCCCATGTCCCTCTGCTAC	5565117	→		quantitative RT-PCR
qSGR4735( <i>cebE</i> )-rev	CCCTCGGGGGCCTTCTTCTTG	5565262	←		quantitative RT-PCR
qSGR4736( <i>cebF</i> )- for	GGCCCACCTCCTCAACTACAAG	5566499	→		quantitative RT-PCR
qSGR4736( <i>cebF</i> )-rev	CCGGAACACCAGGGCGAAGAC	5566613	←		quantitative RT-PCR
qSGR4737( <i>cebG</i> )- for	GGCGATCCTCAACAGCGTCATC	5567443	→		quantitative RT-PCR
qSGR4737( <i>cebG</i> )-rev	GGCGATGACCGCGGTCATCAG	5567575	←		quantitative RT-PCR
qSGR4738( <i>bglC</i> )- for	GCTCGGCCTTCCTCGGTTACG	5568678	→		quantitative RT-PCR
qSGR4738( <i>bglC</i> )-rev	CGGCCGTGGGCGAGGTTGAG	5568780	←		quantitative RT-PCR
qSGR6927-for.	CCGAGCAGCGTGTGAGCTTC	8313916	→		quantitative RT-PCR
qSGR6927-rev.	CAGACACAGCCGTACGCCAATC	8314052	←		quantitative RT-PCR
qSGR6928-for	CGTGACCGGCTTCATCGTGAAC	8315714	→		quantitative RT-PCR
qSGR6928-rev	CGAGAGCTCGTCCACGTAGTAG	8315852	←		quantitative RT-PCR

(\*) [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPにより末端をラベル化して使用した。

**表 2.2** *S. griseus* ゲノム中に見出されたCebR-box 一覧と定量 RT-PCR の結果

Gene ID	Deduced function	Sequence of CebR-box	Position	from <sup>a)</sup>	Transcription level ( <i>ΔcebR</i> / Wild type) <sup>b)</sup>
<i>SGR199</i>	Cellulose-binding protein	<u>TGGGAGCGCTCCCA</u> , <u>CGGGAGCGCTCCCC</u>	-324.5, -519.5	TL	39
<i>SGR217</i>	Pectate lyase	<u>TGGGAGCGCTCCCG</u>	-103.5	TL	4.2
<i>SGR1971</i>	Hypothetical protein	<u>TGGGAGCGCTCCCC</u>	-298.5	TL	5.5
<i>SGR2445</i>	Secreted cellulase	<u>TGGGAGCGCTCCCA</u>	-23.5	TL	15
<i>SGR3391</i>	Acetyl transferase	<u>CGGGAGCGCTCCCG</u>	-25.5	TL	1.6
<i>SGR4735</i>	CebE, cellobiose ABC-transporter solute-binding protein	<u>TGGGAGCGCTCCCA</u>	+13.5	TC	10
<i>SGR4738</i>	BglC, β-galcosidase	<u>AGGGAGCGCTCCCA</u>	-8.5	TL	5.8
<i>SGR4739</i>	CebR, LacI-family transcriptional regulator	<u>TGGGAGCGCTCCCA</u>	-17.5 <sup>c)</sup>	TC	_ <sup>d)</sup>
<i>SGR6927</i> <sup>e)</sup>	Hypothetical protein	<u>TGGGAGCGCTCCCA</u> , <u>TTGGAGCGCTCCCA</u>	-296.5, -209.5	TL	2.6
<i>SGR6928</i> <sup>e)</sup>	Secreted cellulase	<u>TGGGAGCGCTCCAA</u> , <u>TGGGAGCGCTCCCA</u>	-199.5, -112.5	TL	130

a) CebR-boxの位置は、翻訳開始点 (TL) または転写開始点 (TC) を+1として算出した。

b) 定量的RT-PCRを独立して3回試行し、平均値を算出した。

c) 2個ある転写開始点のうち、セロビオースの影響を受けるもの (I)を用いて算出した。

d) 比較対象に $\Delta cebR$ 株を用いたため算出できなかった。

e) *SGR6927*と*SGR6928*は、隣り合って同じプロモーター領域を共有している。

**表 2.3** これまでに解析された放線菌 CebR ホモログの比較

Source	<i>Thermobifida fusca</i> , CelR	<i>S. reticuli</i> , CebR	<i>S. coelicolor</i> , CebR	<i>S. griseus</i> , CebR
Report	Spiridonov and Wilson, 1999	Schlosser et al., 1999; 2000	Bertram et al., 2004	This study
Target DNA	TGGGAGCGCTCCCA	TGGGAGCGCTCCCA	-	TGGGAGCGCTCCCA
Effector ( $K_d$ )	Cellobiose (0.5 mM) <sup>a)</sup>	Cellopentaose (0.7 mM) <sup>b)</sup>	-	Cellobiose (0.22 mM), Cellotriose (0.99 mM), Cellohexaose (4.1 mM), Cellopentaose (7.9 mM), Cellotetraose (12 mM) <sup>c)</sup>
<i>in vivo</i> Function	Regulation of cellulose utilization genes	Regulation of cellobiose utilization genes, and at least one cellulose utilization gene	(Not work?)	• Regulation of both cellulose and cellobiose utilization, (directly total ten genes) • Involved in morphological development

a) 「CellotrioseとSophoroseは50 mMでもほとんど効果がなく、その他の単糖・二糖は100 mMでもまったく効果がない (data not shown)」との記述があ

b) Cellobioseは10 mMにてCebR-DNA間の結合にわずかに影響を与えているが、その他のセロオリゴ糖は10 mMでまったく影響を与えない。

c) セロオリゴに属さないその他の二糖などは20 mMでCebR-DNA間の結合にまったく影響を与えない (図2.8参照)。



## 第 3 章 *S. griseus* のグルコースカタボライト抑制において Glk が果たす役割の解析

### 3.1 背景

前章までにおいて、放線菌グルコースカタボライト抑制機構解明のためのアプローチとして遺伝学的側面からアプローチを行った結果を報告した。本章では他の側面からのアプローチとして、本機構に対し中心的役割を担うと予想されてきた蛋白である Glk に対し蛋白工学的解析を行った結果を報告する。

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 食品工学研究室（田之倉優教授主宰）との共同研究の結果、同研究室に所属する宮園健一博士ならびに田部井信充氏により *S. griseus* 由来 Glk の結晶構造解析がなされた。本項においてはまず、（１）共同研究により得られた Glk 立体構造について概説し、続いて（２）過去にその立体構造が明らかになっている同ファミリー蛋白および同機能蛋白との比較を行い、最後に（３）これをもとに着想した Glk とグルコースカタボライト抑制との関連を解明するためのアプローチについて述べる。

#### 3.1.1 Glk 立体構造について

Glk の結晶構造は、大腸菌由来 putative *N*-acetylmannosamine kinase をモデルとした分子置換法によって 2.50 Å の分解能で決定された。精密化後のモデルには、1 分子の Glk、1 分子のグルコース、1 原子の亜鉛イオン、カリウムイオン、73 分子の水分子が含まれた。Glk 単量体の立体構造を図 3.1(a)に示した。Glk は 10 本の  $\alpha$  ヘリックス、5 本の  $3^{10}$  ヘリックス、13 本の  $\beta$  ストランドから形成されている。Glk は他の類似蛋白質と同様（後述）、N 末端側の small domain と C 末端側の large domain の 2 つのドメインから構築されている。N 末端の small domain は 3 本の  $\alpha$  ヘリックス ( $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 10$ ) と 2 枚の  $\beta$  シートからなる。Glk の C 末端に位置する  $\alpha 10$  は、5 本の  $\beta$  ストランド ( $\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 6$ ) からなる mixed  $\beta$  sheet によって 2 つの  $\alpha$  ヘリックスから隔てられており、 $\alpha/\beta/\alpha$  の三層構造を形成している。また、 $\beta 6$  と  $\alpha 2$  の間に 3 本の  $\beta$  ストランド ( $\beta 5, \beta 6, \beta 7$ ) からなる antiparallel  $\beta$  sheet が形成されている。C 末端側の large domain は、7 本の

$\alpha$  ヘリックス、5 本の  $3^{10}$ ヘリックス、5 本の  $\beta$  ストランドから形成される。最も small domain に近い  $\alpha 3$  は、5 本の  $\beta$  ストランド ( $\beta 9, \beta 10, \beta 11, \beta 12, \beta 13$ ) からなる mixed  $\beta$  sheet によってその他のヘリックスから隔てられている。

結晶構造中において、Gik は 4 量体を形成していた (図 3.1(b))。Gik の 4 量体は、Gik の 2 量体が更に 2 量体化することによって形成されていた。後述の *Trypanosoma cruzi* 由来グルコースキナーゼ (TcGik) は濃度依存的に単量体および 2 量体を形成し、結晶構造中では 4 量体を形成していることが知られている (Cordeiro *et al.*, 2007)。TcGik の 2 量体および 4 量体の形成様式は、Gik のそれと非常に類似しており、Gik においても濃度や溶媒条件依存的に四次構造が変化する可能性がある。また、後述のヒト由来グルコースキナーゼ (HsGik) では、グルコースの存在によって三次構造自体が大きく変化することが知られている (Kamata *et al.*, 2004)。グルコース濃度依存的な立体構造の変化が活性に大きく関与している例がこの他にも多くのグルコースキナーゼで確認されているため、Gik においてもグルコース濃度依存的な立体構造変化に依存した機能の変化があるかもしれない。

### 3.1.2 他の構造既知蛋白と Gik との比較

#### 3.1.2.1 Gik の属する蛋白ファミリーについて

微生物由来のグルコースキナーゼは、以下の 3 つのグループに分けられる。

- Group I : 古細菌や真核生物が有する ATP もしくは ADP 依存的グルコースキナーゼ (Glucose kinase in RK (ribokinase) family)
- Group II : ROK sequence motif を持たない ATP 依存的グルコースキナーゼ (Glucose kinase in HK (hexokinase) family, group A)
- Group III : ROK sequence motif を持つ ATP 依存的グルコースキナーゼ (Glucose kinase in HK (hexokinase) family, group B))

アミノ酸配列上、*Streptomyces* 属 Gik は ROK sequence motif を持ち、上記 Group III に属する。なお、このグループに属するグルコースキナーゼの立体構造はまだ報告されていない。

ここで ROK ファミリー蛋白について概説する。ROK は、Repressors, Open reading frames,

Kinases の頭文字から命名された。その名の通り、いくつかの転写制御因子、キナーゼ、機能未知遺伝子が、異なった機能を持つにもかかわらず共通した Consensus motif を有する点に着目し、これらを新規ファミリーとして分類したものである (Titgemeyer *et al.*, 1994)。ROK ファミリー蛋白は、以下に述べるような 2 つの Consensus motif (Consensus sequence 1 と 2) を有する。

Glk の構造では、上記 Consensus sequence (図 3.2(b)) は多量体形成およびグルコース結合部位に大きく関与していた。Glk において、Consensus sequence 1 は 130 から 157 残基の領域に存在しており、その多くの部分が Glk の 2 量体化に関与している。また、この領域に含まれる 2 つの残基 Glu154 と His157 は Glk のグルコース認識にも関与している。一方、Consensus sequence 2 は、177 から 180 残基の位置に存在しており、その特徴的な、CXCGXXGCXE という配列モチーフによって亜鉛イオンを結合している (亜鉛イオンを結合する残基 (すべてシステイン) を下線で示した)。また、上記モチーフの最後のグルタミン酸 (Glu176) は、Glk のグルコース認識に関与する残基でもある。これらの 2 つの Consensus sequence は立体構造上非常に近い位置に存在しており、共同的にグルコース結合部位の立体構造を形成している。Consensus sequence 1 の最後に位置し、必ず保存されているヒスチジン残基は、Consensus sequence 2 に含まれる 3 つの残基によって固定化されている亜鉛イオンと相互作用し、グルコースの認識に関与している。亜鉛結合に係るシステイン残基の重要性は、*Bacillus subtilis* 由来グルコースキナーゼで確認されており、これらの残基のアラニン置換体は、不活性化することが知られている。

Glk の立体構造を、機能既知かつ構造既知の他の蛋白質立体構造と比較したとき、類似したものとして主に以下の 5 つが挙げられる。

大腸菌由来転写制御因子 Mlc (Schiefner *et al.*, 2005、Nam *et al.*, 2008)

*Arthrobacter* sp.由来グルコマンノキナーゼ AsGMK (Mukai *et al.*, 2004)

大腸菌由来グルコースキナーゼ EcGIK (Lunin *et al.*, 2004)

*Trypanosoma cruzi* 由来グルコースキナーゼ TcGIK (Cordeiro *et al.*, 2007)

ヒト由来グルコースキナーゼ HsGIK (Kamata *et al.*, 2004)

以下に、構造上 Glk と最も類似しており、Glk と同じく ROK ファミリーに属しながらキナーゼではなく転写制御因子としての機能を持つ Mlc との比較、ならびにグルコースキナーゼのう

ちグルコース濃度によって特徴的な活性制御機構を有するヒト由来グルコースキナーゼ HsGK との比較、について記述する。

### 3.1.2.2 Glk と Mlc との比較

Mlc は糖代謝に関する様々な遺伝子の発現制御を行う転写調節因子である。Mlc は ROK ファミリーに属し、N 末端側に DNA 結合ドメインを有する点を除いて多くのグルコースキナーゼと立体構造上の相同性がある。Mlc の立体構造については Mlc 単独の構造と EII<sup>glc</sup> との複合体構造の 2 つが報告されている。Mlc は Glk と同様 dimer of dimer の 4 量体を形成し、機能を発揮する。Mlc の 2 量体化は Glk の 2 量体化とほぼ同様の機構によってもたらされており、Glk の 2 量体と Mlc の 2 量体はほぼ同様の立体構造を持つ。Mlc は PTS 構成因子の 1 つである膜蛋白 EIIB<sup>glc</sup> と相互作用し、その機能調節を行っている。EII<sup>glc</sup> は Glk における small domain に相当する Mlc 部位に結合している。Mlc の立体構造では、DNA 結合ドメインおよび Glk の small domain に相当する部分の可動性が Mlc の DNA 結合に必須であることが知られており、Glk の small domain に相当する部分から見た、DNA 結合ドメインの相対配置の変化が Mlc の機能発現に重要であると考えられている。large domain と small domain の間の相対的な配置の変化は、多くのグルコースキナーゼで確認されており、活性部位にグルコースが結合することにより、より折りたたまれた形に構造変化することが知られている。Glk も同様な機構で構造変化を起こすかもしれない。

### 3.1.2.3 Glk とヒト由来グルコースキナーゼ (HsGK) との比較

ヒト由来グルコースキナーゼ (ヘキソキナーゼ IV) (HsGK) は単量体で機能し、グルコースの存在の有無で、その立体構造を大きく変化させる (図 3.1(c))。この立体構造の変化によって、HsGK はグルコース濃度依存的な活性の調節を行っている (Kamata *et al.*, 2004)。HsGK では、グルコース非共存条件下では、グルコース結合部位が大きく開いた立体構造をとる。Large domain と small domain の間の相対配置の変化は、Mlc でもその機能に重要な役割を果たしており、Glk においてもこのような事象が起こるか否かは興味を持たれるところである。

### 3.1.3 本研究の概略

上述した立体構造解析結果より、グルコース資化能だけでなくグルコースカタボライト抑制能も担うと予想される *S. griseus* 由来 Glk (以下 SgGlk) は、過去に構造の決定された同ファミリー蛋白および同機能蛋白と構造上目立った違いを持つものではないことがわかった。よって、比較的小規模なレベルでのアミノ酸置換などにより、『グルコース資化能は有するがカタボライト抑制能は失ったもの』、もしくは逆に『カタボライト抑制能を有しながらグルコース資化能を失ったもの』が得られる可能性が考えられた。

序論にて述べた通り、過去に *S. coelicolor* A3(2) *glk* 欠損株において *Zymomonas mobilis* Cp4 株由来 *glk* (以下 ZmGlk) を発現させた結果、グルコース資化能は回復したが、グルコースカタボライト抑制機能は回復しなかったという報告がなされている (Angell *et al.*, 1994)。ZmGlk は *Streptomyces* 由来 Glk とアミノ酸配列上の相同性は高くなく、報告当時は ROK ファミリーに属していないと考えられていた (その後分類様式が変化し、現在は ZmGlk も ROK ファミリーに属するとされている)。よってこの Angell らの報告からは、①グルコース資化能とグルコースカタボライト抑制能は互いに独立であること②ZmGlk は持たないが *S. coelicolor* A3(2)由来 Glk は持つ何らかの構造的特徴 (例えば ROK ファミリーに特有な特徴) がグルコースカタボライト抑制を可能にしているであろうこと、という2点が示唆されていた。

著者は上記 Angell らによる報告を参考とし、「より SgGlk と高い相同性を有する異種由来グルコースキナーゼを *S. griseus*  $\Delta glk$  株にて発現させ、そのグルコース資化能ならびにグルコースカタボライト抑制能の復帰の有無を観察する」ことを着想した。これにより、SgGlk 中グルコースカタボライト抑制能に必要な領域の絞り込みができると考えられた。つまり、異種由来グルコースキナーゼ (仮に Xyglk とする) を発現させることで  $\Delta glk$  株の『資化能と抑制能の両方が回復する』場合、XyGlk と SgGlk とで保存された領域がグルコースカタボライト抑制の鍵になると考えられ、一方『資化能は回復するが抑制能が回復しない』場合は逆に XyGlk と SgGlk とで保存されていない領域が鍵となると考えられる。この着想に従い、*Streptomyces* に比較的近縁な種として、非 *Streptomyces* 型放線菌に分類される *Rhodococcus* sp. RHA1 株に着目し、該株由来 *glk* をクローニングし、*S. griseus*  $\Delta glk$  株内で安定的に発現させることを試みた。*Rhodococcus* sp.

RHA1 株は難分解性化合物である PCB の分解細菌として研究され (Seto *et al.*, 1995)、その全ゲノム配列が明らかにされている (McLeod *et al.*, 2006)。そのゲノムの GC 含量は 68% であり、*S. griseus* ゲノムの GC 含量 72% には及ばないながらも十分に高いことから、異種発現においてしばしば問題となりうるコドン使用頻度の影響も最小限に抑えられると予想された (なお *Z. mobilis* の GC 含量は 46% である)。*Rhodococcus* RHA1 株由来 Glk (以下 RhGlk) と SgGlk の配列を比較すると、54% の相同性、68% の相似性を有し、よく似ている。また、ROK consensus sequence もよく保存されている。両者のアラインメント図を図 3.2(b) として、また *S. griseus* 近縁種の SgGlk 類似蛋白と比較した際のそれぞれの進化的な位置について図 3.2(a) として示した。実験の結果、後述の通り RhGlk は *S. griseus* 内にて「酵素活性は有するがカタボライト抑制能は有さない」という結果が得られた。この結果は両者の高い相同性から考えて驚くべきものであった。この RhGlk を用いて、グルコース抑制に必要なアミノ酸残基の同定を試みた。

一方で、SgGlk がヒトグルコースキナーゼ HsGlk とともに構造および機能上似ていることを参考に、以下の着想を得た。図 3.1(c) に示した通り、HsGlk は周囲のグルコース濃度を感知し、低濃度グルコース存在下ではグルコースとの親和性の比較的低い Open form を取る一方で、高濃度グルコース存在下では親和性の比較的高い Closed form を取り代謝回転を高めていることが報告されている。SgGlk もこれと同様の構造変化を行っている可能性が高い。もしそうだとすれば、SgGlk のカタボライト抑制シグナルは Closed form の際に on となり Open form の際に off になると考えられる。すなわち SgGlk を Closed form に固定することができればカタボライト抑制が恒常的に生じている *S. griseus* が観察できると予想した。HsGlk の例からは Glk が Closed form を取るにはグルコースの結合が必要であることがわかる。従って、グルコースの結合後、ATP を用いた変換のステップを行えなくすることで、上記の通り Closed form に固定された SgGlk が得られると考えた。以上の発想から、立体構造より ATP 結合部位と予想された 3 つのアミノ酸残基についてそれぞれアラニン置換変異を行った変異型 SgGlk を設計し、これを導入した *S. griseus*  $\Delta$ glk の挙動を調べた。

更に実験の過程で、予想外にも「Glk だけでなく他の何らかの代謝産物の存在が  $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するグルコースカタボライト抑制に関わっている」という結果が得られた。この結

果は、1994 年になされた 2 つの論文 (Angell *et al.*, 1994、Kwakman and Postma, 1994) による「*Streptomyces* のグルコースカタボライト抑制は Glk 蛋白単独の機能によりなされる」という主張と一部矛盾するものであるが、近年他の研究グループによって構築されたモデルとつじつまが合うことがわかった。以上を含め、*Streptomyces* におけるグルコースカタボライト抑制における Glk の果たす機能について論じる。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 *glk* 破壊株の構築

シングルクロスオーバー法による組み替えを 2 回行うことで *glk* の欠損を行った。作製した  $\Delta glk$  株の概略を図 3.3 に示した。

破壊株作製用プラスミドの構築は以下の通り行った。まず、*S. griseus* 野生株クロモソームを鋳型とし、プライマーセット Dglk1-for と Dglk1-rev を用いて *glk* 上流域から *glk* 5'末端領域 30 bp まで計 1.5 kb の DNA 増幅を行った。増幅断片を HindIII/PstI 処理し、pUC19 マルチクローニングサイト由来 HindIII/PstI サイトにクローニングした。増幅エラーのないことを確認し、これを pDglk-1 とした。

次に同様に、*S. griseus* 野生株クロモソームを鋳型とし、プライマーセット Dglk2-for と Dglk2-rev を用いて *glk* 3'末端領域 105 bp ならびに *glk* 下流域計 1.6 kb の DNA 増幅を行った。増幅断片を PstI/EcoRI 処理し、pUC19 マルチクローニングサイト由来 PstI/EcoRI サイトにクローニングした。増幅エラーのないことを確認し、これを pDglk-2 とした。

pDglk-1 を HindIII/PstI 処理することで増幅領域にあたる 1.5 kb 断片を精製し、これを pDglk-2 の pUC19 マルチクローニングサイト由来 HindIII/PstI 領域にクローニングし、pDglk-3 とした。pDglk-3 を pUC19 マルチクローニングサイト由来 HindIII にて切断したのち脱リン酸化し、ここに Tn5 由来 *aphII* 遺伝子上下流を含む DNA 断片を HindIII 処理したものを連結することで、pDglk-aph を得た。これを JM110 に導入後再調製することでメチル化フリーのプラスミドを得、定法通りシングルクロスオーバー法による組み替えを 2 回行うことで  $\Delta glk$  株を得た。遺伝子破壊が正しく行われたことを PCR により確認した。

### 3.2.2 各種 *glk* を安定的に発現する *S. griseus* 株の作製

#### 3.2.2.1 各種 *glk* を *S. griseus* 内にて安定的に発現させるためのプラスミド pTYM-P<sub>*glk*</sub> の構築

*S. griseus* 由来 *glk*、変異導入型 *S. griseus* 由来 *glk*、ならびに *Rhodococcus* sp. RHA1 株由来 *glk*



を *S. griseus* 生体内で安定して発現させるべく、*S. griseus* 由来 *glk* のプロモーター（以下  $P_{glk}$  と略記）の支配下にてこれらを転写させるためのプラスミドを構築した。なお、*S. coelicolor* A3(2)において *glk* 転写および Glk 生産量は菌体生育糖源の種類によらずほぼ一定であることが示されており、 $P_{glk}$  は恒常的プロモーターとして機能することが予想される（Ikeda *et al.*, 1984、Mahr *et al.*, 2000）。構築の概略を図 3.3 として示した。もととなるベクターとしては pTYM18 を用いた。pTYM18 は大腸菌内では *p5a ori* により増幅するプラスミドとして振る舞う一方、*Streptomyces* 属の細胞内ではクロモソームのアタッチメントサイト内に 1 コピーが組換えにより導入され、その後安定的に保持されることが知られている（Onaka *et al.* 2003）。*S. griseus* 野生株クロモソームを鋳型として、プライマーセット P $glk$ -for と P $glk$ -rev により  $P_{glk}$  領域の増幅を行った。増幅した 0.4 kb の断片を、pUC19 のマルチクローニングサイト由来 HindIII/EcoRI サイトにクローニングした。PCR エラーのないことを確認したのち、増幅領域を HindIII/EcoRI により切り出し、pTYM18 のマルチクローニングサイト由来 HindIII/EcoRI にクローニングした。これを pTYM- $P_{glk}$  とした。pTYM- $P_{glk}$  の NdeI サイトもしくは NdeI/EcoRI サイトに各種 *glk* (開始コドン ATG と NdeI サイト認識配列 CATATG とがオーバーラップするように増幅したもの) をクローニングすることで、各種 *glk* を *S. griseus* 内にて安定的に発現させることが可能となった。

#### 3.2.2.2 *S. griseus* 由来 *glk* (S $gglk$ ) 安定発現株の構築

プライマーセット S $gglk$ -for と S $gglk$ -rev を用い、S $gglk$  領域の増幅を行った。鋳型としては、*S. griseus* 野生株クロモソームを用いた。増幅した 1.0 kb の断片を、pUC19 のマルチクローニングサイト由来 HindIII/EcoRI サイトにクローニングし、PCR エラーのないことを確認した。これを pUC-S $gglk$  とした。pUC-S $gglk$  のうち上記増幅領域を NdeI サイト（S $gglk$ -for 由来のもの）および EcoRI サイト（S $gglk$ -rev 由来のもの）により切り出し、同じく NdeI/EcoRI 処理した pTYM- $P_{glk}$  に連結した。これを pTYM- $P_{glk}$ -S $gglk$  とした。大腸菌 JM110 から再調製した pTYM- $P_{glk}$ -S $gglk$  をプロトプラスト法によって *S. griseus* に導入することで、S $gglk$  安定発現株を得た。

#### 3.2.2.3 *Rhodococcus* sp. RHA1 由来 *glk* (R $hglk$ ) 安定発現株の構築

プライマーセット RhgIk-for と RhgIk-rev を用い、*RhgIk* 領域の増幅を行った。鋳型としては、長岡技術科学大学教授、福田雅夫博士より分譲を受けたプラスミド (*RhgIk* 全長を PCR 増幅し大腸菌ベクターにクローニングしたもの) を用いた。増幅断片を pUC19 のマルチクローニングサイト由来 HindIII/BamHI サイトにクローニングした。PCR エラーのないことを確認したのち、増幅領域を 2 箇所の NdeI (一方は上記 RhgIk-for に由来、他方は RhgIk-rev に由来するもの) により切り出し、同じく NdeI 処理したのち脱リン酸化処理した pTYM-P<sub>gIk</sub> に連結した。連結方向が正しいことを制限酵素処理にて確認したのち、これを pTYM-P<sub>gIk</sub>-*RhgIk* とした。これを用い、上記 pTYM-P<sub>gIk</sub>-*SggIk* と同様の手法を用いて *S. griseus* に導入した。

#### 3.2.2.4 Sg-Rh キメラ Glk (Chimeric Glk) 安定生産株の構築

後述する着想に従い、Sg-Rh キメラ Glk (Chimeric Glk) の安定生産系を以下のように構築した。

Chimeric Glk を作製するための「繋ぎ目 (linker)」の部分にアミノ酸変異が導入されることを避けるべく、この部分を制限酵素サイト PstI (認識配列 CTGCAG) とした。SgGlk と RhGlk のアラインメントを比較し、周囲の保存性が高くかつアミノ酸配列が A-A-[A、D、E、G、V のいずれか]である配列を 4 箇所選抜し、これらを linker 1-4 とした。図 3.2(b)に示す通り、SgGlk において linker 1 は 64A-A-G66、linker 2 は 108A-A-A110、linker 3 は 152A-A-E154、linker 4 は 199A-A-V201 である。当該アミノ酸配列は DNA 配列レベルでは GCNGCNGNN (N は ACGT いずれでもよい) となることから、この第 3 塩基の N を T、同第 6 塩基の N を A とすることでアミノ酸配列レベルの影響を与えることなく PstI 認識配列を導入することができる。以上はサイレント変異導入支援サイト

Silent sites ([http://www.dwalab.com/DNAProject/bin/DNA\\_Analysis\\_Frame.html](http://www.dwalab.com/DNAProject/bin/DNA_Analysis_Frame.html)) を参考として立案した。

上記の計画をもとに、図 3.2(b)に示した linker 1-4 を繋ぎ目とし、N 末端側を SgGlk、C 末端側を RhGlk とした Chimeric Glk (Glk<sup>S→R</sup>1-4) ならびに N 末端側を RhGlk、C 末端側を SgGlk とした Chimeric Glk (Glk<sup>R→S</sup>1-4) の計 8 種類の Chimeric Glk を設計した。各々のアミノ酸構成の模

式図を図 3.5(a)として掲載した。これらの設計に従い、各断片を以下のプライマーセットによって増幅した。なお、() 内の番号は図 3.5(a)における各断片の下に付した番号と対応する。

Glk<sup>S→R1</sup> の N 末側用 DNA (1) : Sgglk-for と chimSg1-rev

Glk<sup>S→R2</sup> の N 末側用 DNA (2) : Sgglk-for と chimSg2-rev

Glk<sup>S→R3</sup> の N 末側用 DNA (3) : Sgglk-for と chimSg3-rev

Glk<sup>S→R4</sup> の N 末側用 DNA (4) : Sgglk-for と chimSg4-rev

Glk<sup>S→R1</sup> の C 末側用 DNA (5) : chimRh1-for と RhgIk-rev

Glk<sup>S→R2</sup> の C 末側用 DNA (6) : chimRh2-for と RhgIk-rev

Glk<sup>S→R3</sup> の C 末側用 DNA (7) : chimRh3-for と RhgIk-rev

Glk<sup>S→R4</sup> の C 末側用 DNA (8) : chimRh4-for と RhgIk-rev

Glk<sup>R→S1</sup> の N 末側用 DNA (9) : RhgIk-for と chimRh1-rev

Glk<sup>R→S2</sup> の N 末側用 DNA (10) : RhgIk-for と chimRh2-rev

Glk<sup>R→S3</sup> の N 末側用 DNA (11) : RhgIk-for と chimRh3-rev

Glk<sup>R→S4</sup> の N 末側用 DNA (12) : RhgIk-for と chimRh4-rev

Glk<sup>R→S1</sup> の C 末側用 DNA (13) : chimSg1-for と Sgglk-rev

Glk<sup>R→S2</sup> の C 末側用 DNA (14) : chimSg2-for と Sgglk-rev

Glk<sup>R→S3</sup> の C 末側用 DNA (15) : chimSg3-for と Sgglk-rev

Glk<sup>R→S4</sup> の C 末側用 DNA (16) : chimSg4-for と Sgglk-rev

上記断片 (1-4) (9-12) は HindIII/PstI により pUC19 に、断片 (5-8) (13-16) は TA クローニングを用いて pT7-blue にそれぞれクローニングし、シーケンシングによりエラーのないことならびに方向が正しいことを確かめた。次に断片 (5-8) (13-16) のクローニングされたプラスミドについて PstI により増幅された領域を切り出し、対応する断片のクローニングされたプラスミドを PstI 処理したものに対して連結した。方向性が正しいことを制限酵素処理により確認した。こうして pUC19 上にクローニングされた各種 Chimeric *gIk* を、*gIk*<sup>S→R1-4</sup> については 2 箇所の NdeI (一方は翻訳開始点と重複したもの、他方は RhgIk-rev に由来したもの) で切り出し、同じく NdeI 処理したのち脱リン酸化処理した pTYM-P<sub>*gIk*</sub> に連結した。連結方向が正しいことを

制限酵素処理にて確認したのち、これを pTYM-P<sub>gk</sub>-gk<sup>S→R</sup>1-4 とした。また、gk<sup>R→S</sup>1-4 については翻訳開始点と重複した NdeI と Sgglk-rev に由来した EcoRI とで切り出し、同じく NdeI/EcoRI 処理した pTYM-P<sub>gk</sub> に連結した。これを pTYM-P<sub>gk</sub>-gk<sup>R→S</sup>1-4 とした。大腸菌 JM110 から再調製したこれらプラスミドをプロトプラスト法によって *S. griseus* に導入することで、Chimeric Glk 安定生産株を得た。

### 3.2.2.5 ATP 非結合型変異 SgGlc 安定生産系の構築

後述する着想に従い、ATP が結合できない変異 SgGlc (Glc<sup>mut</sup>) の生産系を以下のように構築した。

食品工学研究室 宮園健一博士によるバイオインフォマティクスの手法により、SgGlc のうち ATP のトリリン酸の結合に関与するアミノ酸残基が D8, T12, T132 であると予想された。そこで、これら各々のアミノ酸をアラニンに置換した変異 SgGlc である SgGlc D8A (mut1), T12A (mut2), T132A (mut3) をコードするプラスミドをそれぞれ以下の手法にて構築した。目的変異点に変異を導入した、センス/アンチセンス鎖からなるプライマーセット (後述) により鑄型 (dam+/dcm+ 株である大腸菌 JM109 より調製した pUC-Sgglk) を PCR 増幅した。増幅後の反応液を、dam/dcm メチル化 DNA 選択的制限酵素である DpnI にて処理することで、鑄型プラスミド (dam/dcm メチル化されている) を分解し、増幅された断片を残存させた。この DNA 溶液を用いて大腸菌を形質転換させ、そこからプラスミドを抽出することで、変異の導入された Sgglk を持つプラスミドを得た。正しい変異の導入を DNA シークエンシングにより確認した。プライマーセットとしては以下のものを用いた。

- SgGlc D8A (mut1) 生産用: mut1-for と mut1-rev
- SgGlc T12A (mut2) 生産用: mut2-for と mut2-rev
- Sgglk T132A (mut3) 生産用: mut3-for と mut3-rev

得られたプラスミドの Sgglk 領域を NdeI および EcoRI により切り出し、同じく NdeI/EcoRI 処理した pTYM-P<sub>gk</sub> に連結した。これを pTYM-P<sub>gk</sub>-Sgglk<sup>mut1-3</sup> とした。大腸菌 JM110 から再調製した pTYM-P<sub>gk</sub>-Sgglk をプロトプラスト法によって *S. griseus* に導入することで、変異型 SgGlc 安定

生産株を得た。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 *glk* 破壊株はグルコースを唯一の炭素源とする無機塩培地で生育しなかった

複数の *glk* 破壊株が得られたため、ここから 2 株を選択し、1%グルコースを唯一の炭素源とした IS 寒天培地 (以下 IS-G 寒天培地) に植菌したところ、2 株いずれも生育が見られなかった。このことから、*S. coelicolor* A3(2)で報告されているのと同様、*glk* が *S. griseus* における唯一のグルコース資化酵素であることが強く示唆された。更に、この  $\Delta glk$  株に *Sgglk* 相補用ベクターである pTYM-P<sub>*glk*</sub>-*Sgglk* を組み込み導入した結果、IS-G 培地での生育の復帰が見られた。このことから相補は成功していると判断した (図 3.4(a))。なお、 $\Delta glk$  株の成長は、1%グルコースと 0.5%のラクトース、60 mg/l の X-gal を添加した青白判定用 IS 寒天培地 (IS-GLX 寒天培地) 上では極端に遅かった。このことから *S. griseus* はラクトースを単一の糖源とした場合生育が悪いことが示唆された (図 3.4(b))。

#### 3.3.2 *Rhglk* の導入により見かけ上グルコース資化能は回復しグルコース抑制能は回復しなかった

$\Delta glk$  株内にて安定的に *Rhglk* を発現させるべく、pTYM-P<sub>*glk*</sub>-*Rhglk* を  $\Delta glk$  株に対し組み込み導入した。これを IS-G 培地に植菌した結果、当該株は野生株ならびに  $\Delta glk$  株に *Sgglk* を相補した株と同等の生育を見せた。このことから、RhGlk は *S. griseus* 内でグルコース資化活性を持つことが示された (図 3.4(a))。一方で当該株を IS-GLX 培地に植菌した結果、やはり生育については遜色がないものの、コロニーは強い青色を呈した。このことから、RhGlk は *S. griseus* 内において、グルコース資化能は持つが、 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するグルコースカタボライト抑制能は持たないことが強く示唆された (図 3.4(b))。

#### 3.3.3 *Sg-Rh* キメラ *glk* 発現株は中程度のグルコースカタボライト抑制を呈した

上述の通り、SgGlk と RhGlk は高い相同性を持つ。そうであるにもかかわらず SgGlk はグルコースカタボライト抑制能を持ち RhGlk は持たないことから、両者の些細な差がグルコース抑

抑制能の有無を分けるものであると考えられた。このことから、Glc のアミノ酸配列のうち N 末端から数えてある地点までは SgGlc であり、それ以降 C 末端までは RhGlc である Glc、またはその逆の Glc (N 末端側が RhGlc、C 末端側が SgGlc) を作製し、これを  $\Delta glk$  株に導入し、そのカタボライト抑制能の有無を観察することで、SgGlc のどの部分がカタボライト抑制能に重要であるかを判断できると考えた。この着想に従い、3.2 にて述べた方法を用いて SgGlc と RhGlc のキメラ蛋白 (Chimeric Glc) を安定的に生産する  $\Delta glk$  株を得た。

各 Chimeric Glc を生産する計 8 種類の  $\Delta glk$  株を IS+G 寒天培地ならびに IS+GLX 培地に点植菌し観察した。結果、IS+G 寒天培地上における生育には各種 Chimeric Glc 間でばらつきが見られた (図 3.5(b))。これに対し、IS+GLX 培地上にて観察される  $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するカタボライト抑制についてはばらつきが見られず、ことごとく中程度であり、当初期待されたカタボライト抑制能を完全に持つ／あるいは持たないものは得られなかった。唯一、Glc<sup>S→R3</sup> を生産させた株については、IS+G 寒天培地上では中程度の生育を示すのに対し、IS+GLX 寒天培地上ではほとんど生育が見られないという表現型を示した (図 3.5(c))。

### 3.3.4 ATP 非結合型変異 *Sgglk* 発現株グルコースカタボライト抑制能を失ってしまっていた

3.1 で述べた通り、グルコースは結合できるが ATP は結合できない変異 SgGlc を生産させることができれば、恒常的にグルコースカタボライト抑制の生じたままである株が得られる可能性が考えられた。この着想に従い、3.2 にて述べた手法を用い ATP の結合に関与すると予想されるアミノ酸残基をアラニンに置換した変異 SgGlc (SgGlc<sup>mut1-3</sup>) を安定的に生産する  $\Delta glk$  株を得た。これらの株は、SgGlc への変異のためグルコース資化能が付与されない可能性が高いと考えられ、最少培地系である IS+GLX 寒天培地における  $\beta$ -ガラクトシダーゼの観察が生育の不全により観察できないことが懸念された。従って、栄養豊富な YMP 寒天培地をベースとしたペプチドグリカン分解活性に対するグルコースの影響を観察した。しかしながら期待に反し、各 SgGlc<sup>mut</sup> 生産  $\Delta glk$  株はグルコース抑制能を失ったままであった (図 3.6)。各々の具体的な性質としては、Sgglk<sup>mut1</sup> ならびに Sgglk<sup>mut3</sup> 発現株では、IS+G 寒天培地における生育の復帰は見られず (Sgglk

$\text{mut}^1$  については図 3.6(a)。  $\text{SggIk}^{\text{mut}^3}$  については未掲載)、これらについては触媒活性がほぼ完全に失われていることが予想された。これらのペプチドグリカン分解に対するグルコースカタボライト抑制については見かけ上まったく観察されなかった (図 3.6(d)(e))。一方、  $\text{SggIk}^{\text{mut}^2}$  発現株については IS-G 寒天培地上にて若干の生育が見られたことから、この変異では Glk 触媒活性が完全には失われないことがわかった (図 3.6(a))。  $\text{SgGlk}^{\text{mut}^2}$  に該当する変異である T12A 変異では、  $\text{SgGlk}$  に不完全ながら ATP が結合できるのかもしれない。当該株については、グルコース添加 YMP+PG 寒天培地において若干のペプチドグリカン分解ハローの縮小が見られた (図 3.6(d)(e))。更に予想外の結果として、IS+GLX 寒天培地上では  $\beta$ -galactosidase に対するグルコースカタボライト抑制が著しく解除されていた RhGlk 生産株について、グルコース添加 YMP+PG 寒天培地においては野生株にはおよばないものの顕著なペプチドグリカン分解ハローの縮小が観察された (図 3.6(d)(e))。

以上の結果より、少なくとも栄養豊富な YMP+PG 寒天培地上においては、ペプチドグリカン分解に対するカタボライト抑制の度合いがある程度 Glk の触媒活性と比例関係にあることがわかった。

### 3.3.5 ある種の糖源の添加は $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するグルコースカタボライト抑制に補助的に作用する

3.3.4 にて、グルコースを含む YMP+PG 寒天培地においてはペプチドグリカン分解に対するカタボライト抑制の度合いと Glk の触媒活性との間に比例関係が見られた。これを踏まえ、著者は「他の炭素源の存在がグルコースカタボライト抑制に補助的に作用するかもしれない」と考え検証を行った。IS+GLX 寒天培地に終濃度 1%の種々の糖源を添加したものに対し、見かけ上の Glk 触媒活性が異なる複数の  $\Delta\text{glk}$  形質転換体を植菌し、コロニーの呈色を調べた。添加糖源としては、マルトース (ABC トランスポーターによって取り込まれる)、フルクトース (PTS によって取り込まれる)、ガラクトース ( $\text{Na}^+$ 共輸送によって取り込まれる) を選択した。結果、マルトース添加で IS+GLX 寒天培地上での呈色と差異が見られなかったが、フルクトースならびにガラクトース添加時は、その  $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するカタボライト抑制能が導入した



Glk の触媒活性と比例関係にあるように観察された (図 3.7)。すなわち、Glk を導入しない株 (empty) ならびに Glk 触媒活性を失う変異 *Sgglk* 導入株 (*Sgglk<sup>mut1</sup>* と *Sgglk<sup>mut3</sup>*) は同じ水準であったが、若干の Glk 触媒活性を持っていると考えられる変異 *Sgglk* 導入株 (*Sgglk<sup>mut2</sup>*) についてはある程度のグルコースカタボライト抑制が見られ、これよりも強い Glk 触媒活性を持っていると考えられる *Rhglk* 導入株については野生株と遜色のないレベルでの抑制が見られた。

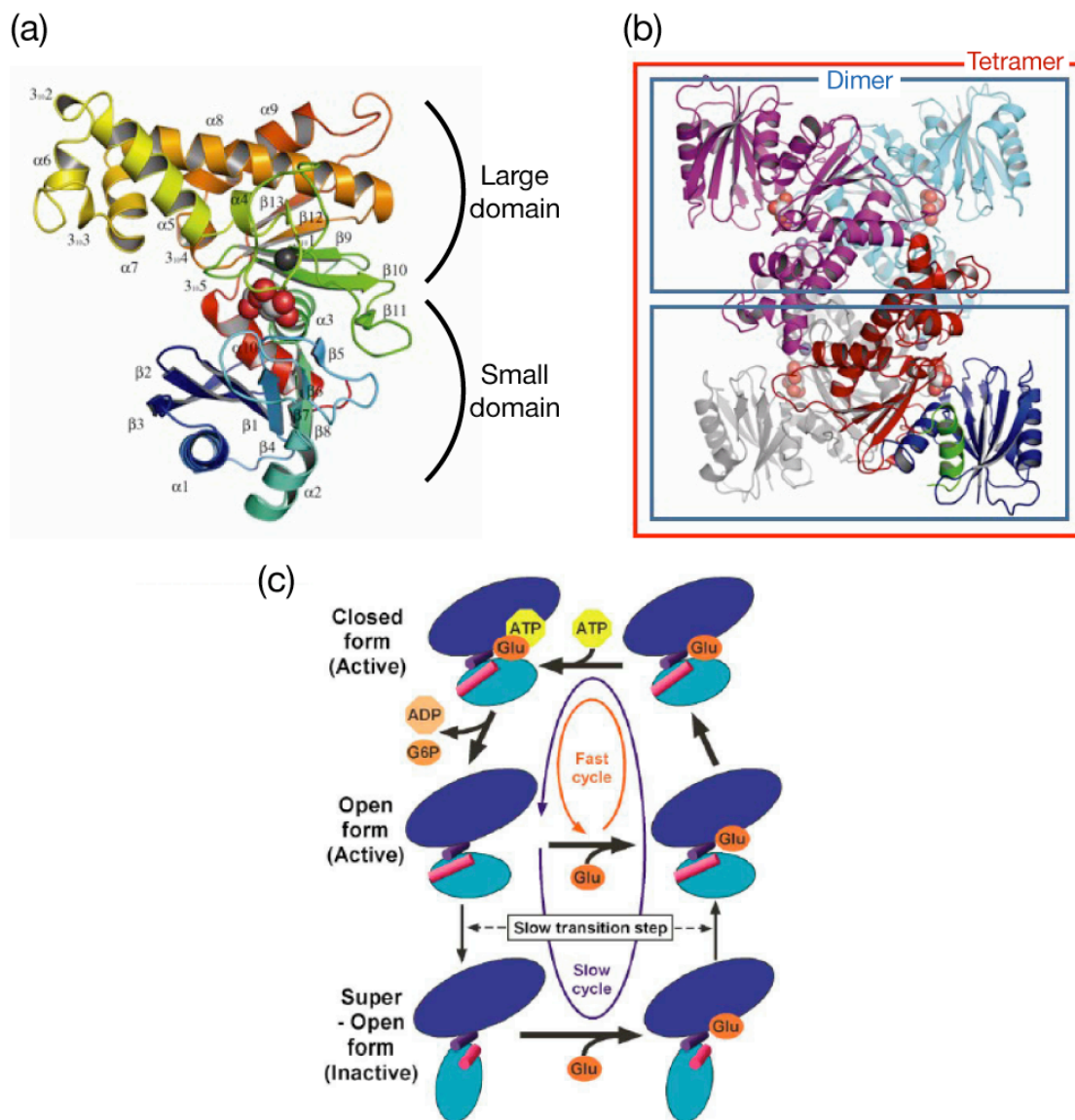
### 3.4 考察

本章では、*S. griseus* と近縁の生物種である *Rhodococcus* sp. RHA1 株由来 *glk* (*Rhglk*) に着目し、これを *S. griseus*  $\Delta glk$  にて安定的に発現させることで、グルコース資化能ならびにグルコースカタボライト抑制能が復帰するか否かを観察した。その結果、グルコース資化能は復帰するにもかかわらず、グルコースカタボライト抑制能は復帰しないという結果が得られた。*SgGlk* と *RhGlk* がアミノ酸配列レベルで 53%もの高い相同性を有することを考えると、これは驚くべき現象である。上記の結果は、*SgGlk* と *RhGlk* との間で保存されていない少ない領域が *S. griseus* グルコースカタボライト抑制能に対し重要な役割を担うということを強く示唆する。この結果を受け、*SgGlk* においてグルコースカタボライト抑制に必要な領域を同定すべく、*SgGlk* と *RhGlk* のキメラ蛋白計 8 種を *S. griseus*  $\Delta glk$  株に安定生産させた。しかしながら、これらのグルコース資化能はまちまちであり、またこれらの  $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するグルコースカタボライト抑制能は中程度であった。このことは、*SgGlk* と *RhGlk* がいずれも非常に厳密な分子内相互作用によって機能を保持していることを示唆するものである。このため今回作製された、例えば N 末端側半分は *SgGlk* であり C 末端側半分は *RhGlk* である、といった Chimeric Glk は、代謝機能にしる制御機能にしる、それぞれの野生型 Glk に比べて大幅に失われているのかもしれない。恒常的にグルコースカタボライト抑制能を発揮する変異型 *SgGlk* の構築が同様に期待通りでなかったのも、やはり *SgGlk* 分子の精密さゆえのものであるのかもしれない。今後、本論文と同様の目的のもと実験を行うのであれば、*SgGlk* と *RhGlk* との間で保存されていないアミノ酸（単一もしくは複数）に対して変異導入を行うことによるスクリーニングが必要であると考えられる。

共同研究により *SgGlk* の立体構造が明らかとなったが、その構造が大腸菌において糖代謝をグローバルに制御する転写因子 *Mlc* と高い相同性を持つことは大いに興味の持たれる点である。序論にも述べた通り、*Mlc* は、環境中のグルコース濃度が低い状態では *ptsG*, *ptsHI*, *manXYZ* といった糖代謝関連遺伝子を負に制御しているのに対し、グルコース濃度が高い状態では膜蛋白である *EII<sup>glc</sup>* と親和性を持つことで膜にトラップされ、その制御機能が失われる。すなわち、膜蛋

白との相互作用が制御機能の on/off の鍵となっている。面白いことに、グルコースを炭素源として *S. coelicolor* A3(2) を培養した場合、その Glk が細胞膜にトラップされるという報告が近年なされた (van Wezel *et al.*, 2007)。グリセロールを炭素源として培養した際には Glk の膜面分への局在は観察されない。この論文の著者らは以下のように主張している (この主張をまとめた図を、図 3.8 として引用掲載する)。「グルコース資化時には Glk がグルコース透過酵素である GlcP と相互作用して効率よくグルコースの取り込みと資化を行う。グルコースまたは他の栄養分の資化が進み、ある代謝産物が蓄積すると、これが引き金となって Glk が膜から引きはがされる。引きはがされた Glk が他の未知因子と相互作用することでカタボライト抑制を引き起こす。」この主張は、Glk と膜蛋白との相互作用がカタボライト抑制 on/off の鍵となっている点で、Mlc におけるカタボライト抑制メカニズムと共通している。Glk と Mlc との構造類似性からも、大変興味深い仮説であると考えられる。更にこの主張に従えば、代謝産物のうち何かがグルコースカタボライト抑制に対し正の影響を与えると考えられるので、Glk 触媒活性とグルコースカタボライト抑制活性が相関するという今回の実験で見られた現象も合理的に説明がつけられる。*S. griseus* 細胞内において「高い触媒活性を持つがカタボライト抑制活性は弱い」RhGlk は、SgGlk と同様 GlcP に結合することで効率よくグルコースの代謝を行うことはできるが、膜から解離するステップもしくは修飾を受けるステップで障害を有するのかもしれない。今回安定的発現に成功した SgGlk ならびに RhGlk に関して、*S. coelicolor* A3(2) でなされたように Glk 局在観察および修飾の確認を行うことにより、*Streptomyces* 属カタボライト抑制に関する新しい知見が得られることが期待される。

### 3.5 図表



**図 3.1** (a)(b) *S. griseus* 由来 Glk の立体構造のリボン図。宮園 健一 博士より許可を得て転載。(a)モノマー構造。黒色の球は亜鉛原子を示す。赤色の球は、基質であるグルコースの炭素原子を示す。(b)Glk のダイマーおよびテトラマー構造。SgGlk は結晶溶液中にて 2 組のホモダイマーからなるホモテトラマーを形成していた。(c) HsGlk で提唱された Kinetic モデル。Kamata *et al.*, *Structure*; **2004**:12(3):429-38. の図を引用。グルコース濃度が低い場合には“inactive”な super-open form であるのに対し、グルコース濃度が高い場合には“active”な open form / closed form を行き来する。

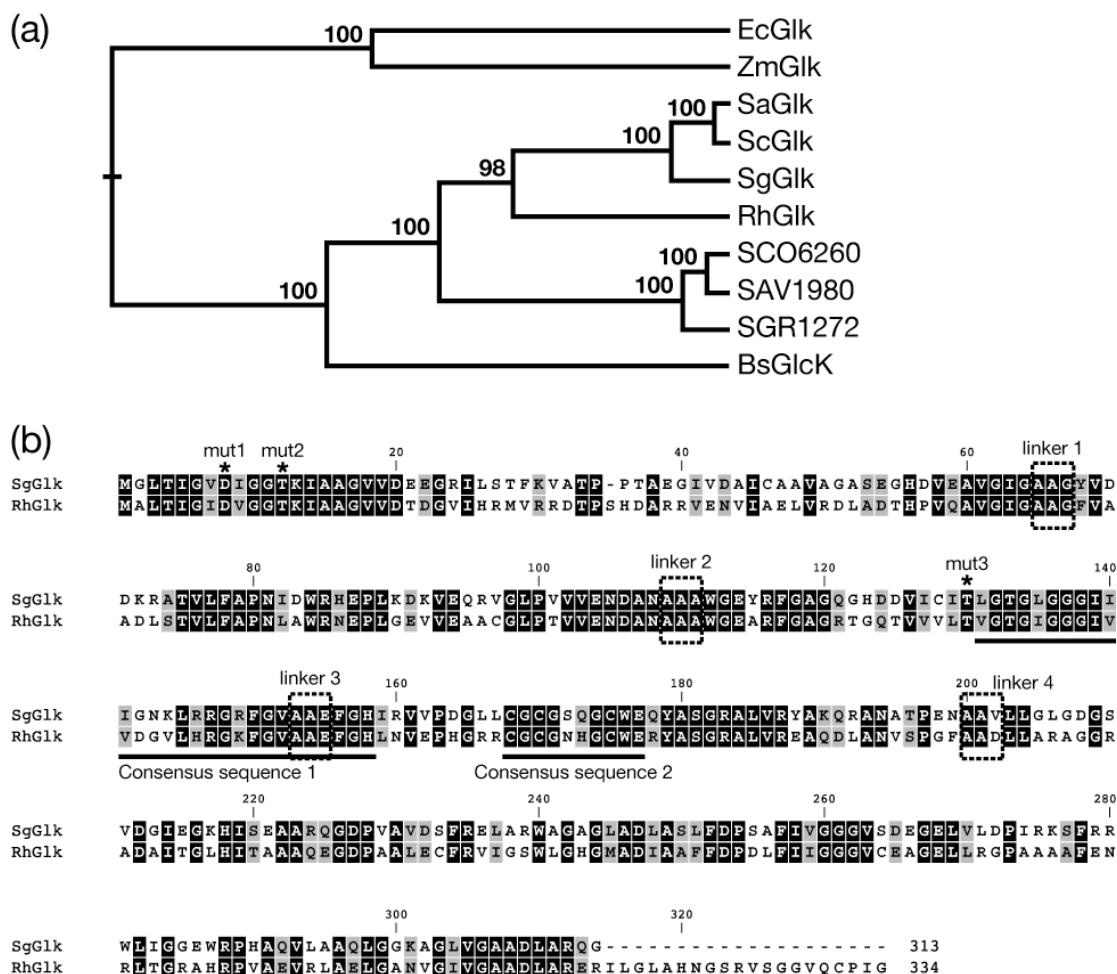


図 3.2 SgGlc と RhGlc の相同性比較。(a)SgGlc、RhGlc ならびにその近縁分子の分子系統樹。近隣結合法により、ソフトウェア CLC Sequence Viewer を用いて作製した。各枝に付した数値はブートストラップ値。Glc および GlcK は各細菌種における可溶性グルコースキナーゼを示す。種の略字は、Ec は *E. coli*、Zm は *Z. mobilis*、Sa は *S. avermitilis*、Sc は *S. coelicolor* A3(2)、Sg は *S. griseus*、Rh は *Rhodococcus* sp. RHA1 株、Bs は *B. subtilis* を示す。SCO6260、SAV1980、SGR1272 は、*S. coelicolor* A3(2)、*S. avermitilis*、*S. griseus* それぞれのクロモソームにコードされる蛋白のうち、各々の Glk ともっとも相同性の高い遺伝子であり、いずれも putative sugar kinase とアノテーションされている。(b)SgGlc と RhGlc のアミノ酸アラインメント図。相同アミノ酸残基を黒、相似アミノ酸残基を灰色で示した。ROK ファミリー蛋白に保存されている Consensus sequence 1 および 2 を下線で示した。また、ATP 結合に関与すると予想され、ATP 非結合型変異 Glk 作製のために変異導入のなされたアミノ酸 (D8、T12、T132) をアスタリスクで示した。更に、キメラ型 Glk 作製の際に用いた連結アミノ酸 (各々 3 アミノ酸) を linker 1-4 として点線で囲んだ。

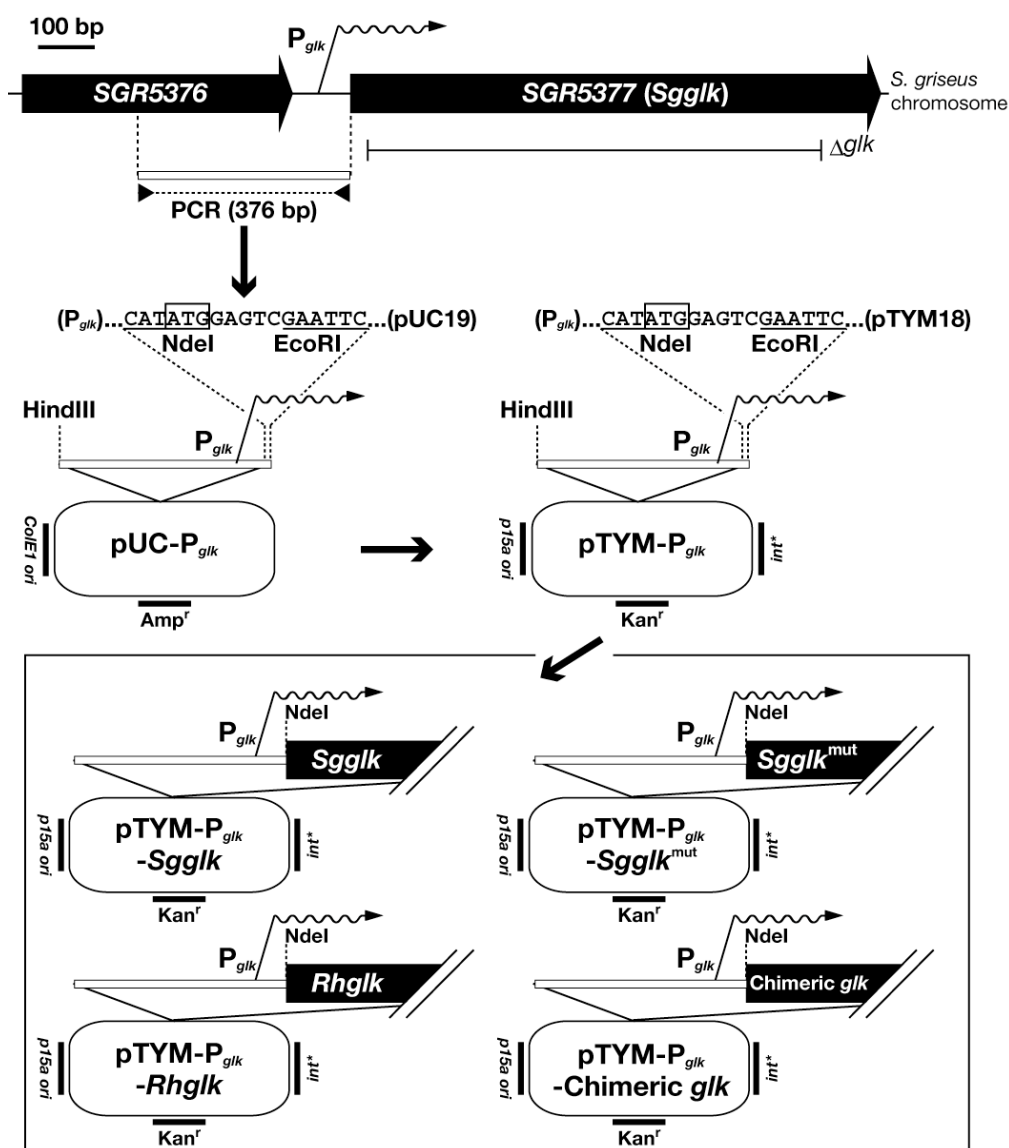


図 3.3 本研究に用いた、各種 *glk* を SgGlc 本来のプロモーター支配下にて安定的に発現させるためのプラスミド構築の模式図。 *Sgglk* プロモーターを完全に含む 376 bp を PCR 増幅した。この際 *NdeI* サイト由来 ATG が開始コドン ATG と重複するように制限酵素サイトを設計した（当該 ATG 塩基を四角で囲んだ）。増幅断片を *pUC19* マルチクローニングサイト由来 *HindIII*/*EcoRI* サイトにクローニングし、これを *pUC-P<sub>glk</sub>* とした。*pUC-P<sub>glk</sub>* から *HindIII*/*EcoRI* にて増幅領域を切り出し、*pTYM18* のマルチクローニングサイト由来 *HindIII*/*EcoRI* サイトに連結し、*pTYM-P<sub>glk</sub>* とした。*pTYM-P<sub>glk</sub>* の *NdeI* サイト由来 ATG と各種 *glk* の開始コドン由来 ATG が重複するよう、各種遺伝子を PCR 増幅し、ここにクローニングした。*pTYM-P<sub>glk</sub>* に各種 *glk* を連結したものを、*int\**を用いた組み込みにより *S. griseus* へと導入した。なお、図中 *SGR5377(Sgglk)* 下に示した水平方向の実線は、 $\Delta glk$  株作製時にクロモソームから除去した領域を示す。

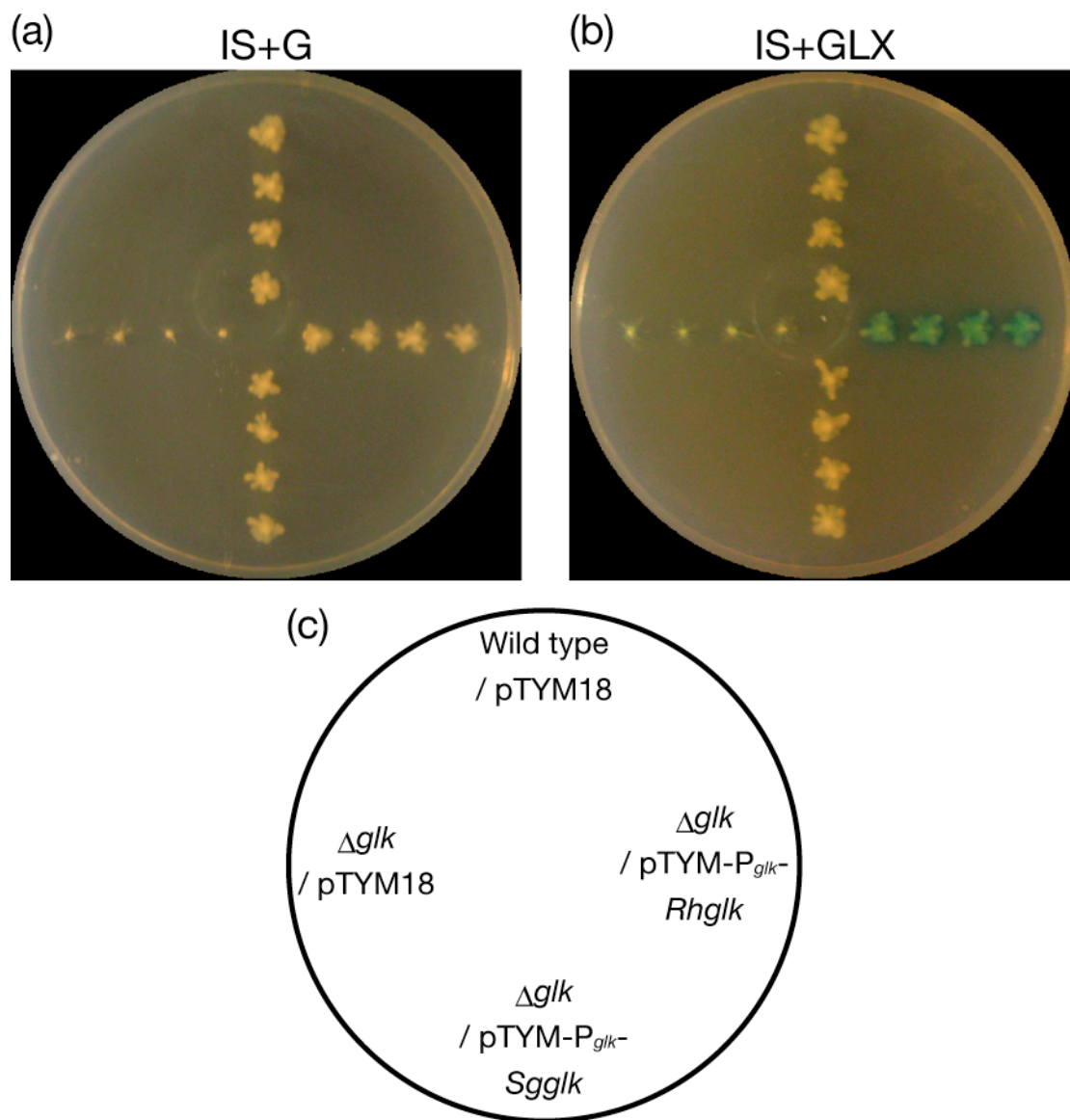


図 3.4 野生株、 $\Delta glk$  株、 $\Delta glk$  株に *Sgglk* または *Rhglk* を相補した株の (a) IS+G または (b) IS+GLX 寒天培地上における表現型。

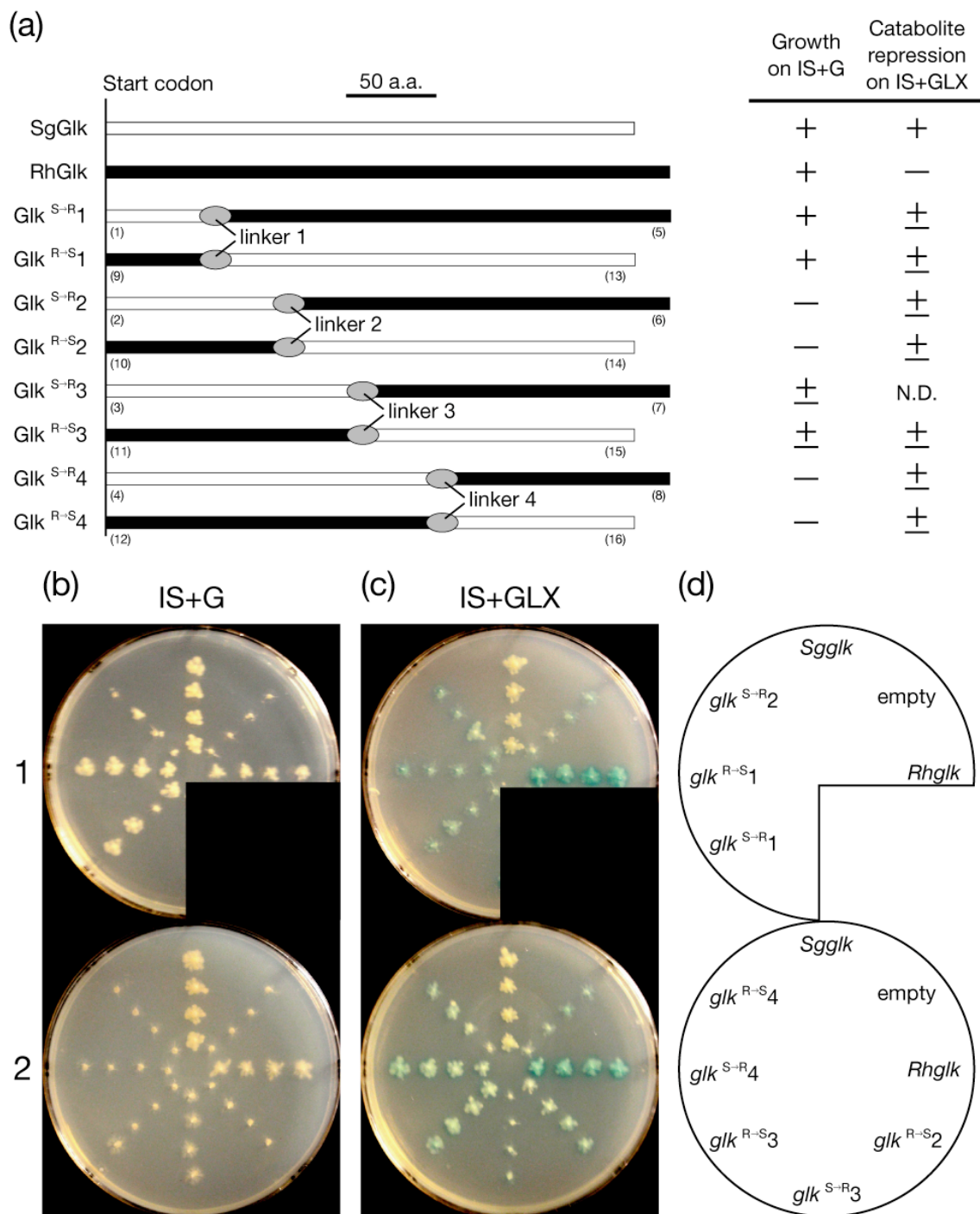


図 3.5 (a) 作製した Chimeric Glk の模式図。白塗りの棒は SgGlc 由来配列、黒塗りの棒は RhGlc 由来配列を表す。灰色の楕円は、図 3.2(b)における linker 配列を示す。(b)-(d) Chimeric Glk を  $\Delta glk$  株に安定生産させた際の、IS+G または IS+GLX 培地における表現型。結果を(a)右に表としてまとめた。



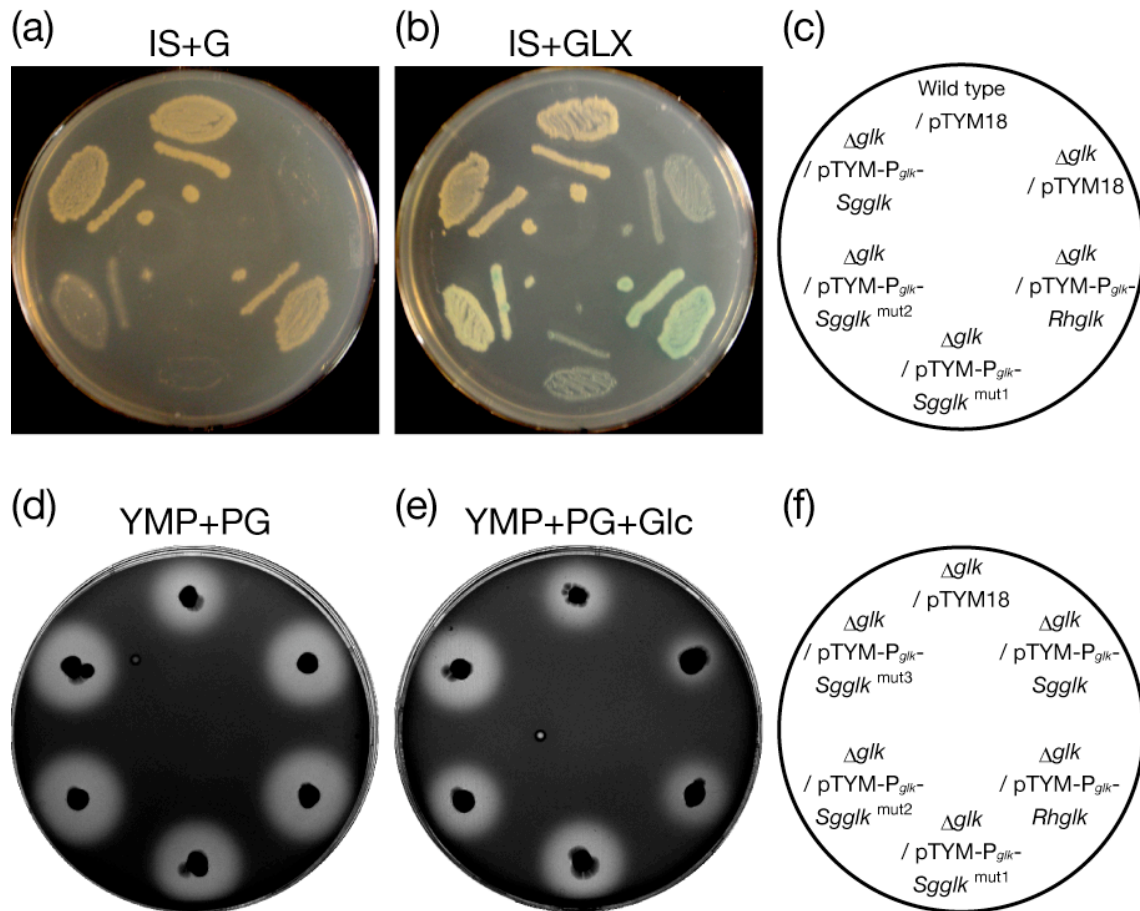


図 3.6 変異導入 SgGlc を  $\Delta gIk$  株に生産させた際の、各種寒天培地上における表現型。(c)は(a)(b)における植菌配置を、(f)は(d)(e)における植菌配置を表す。

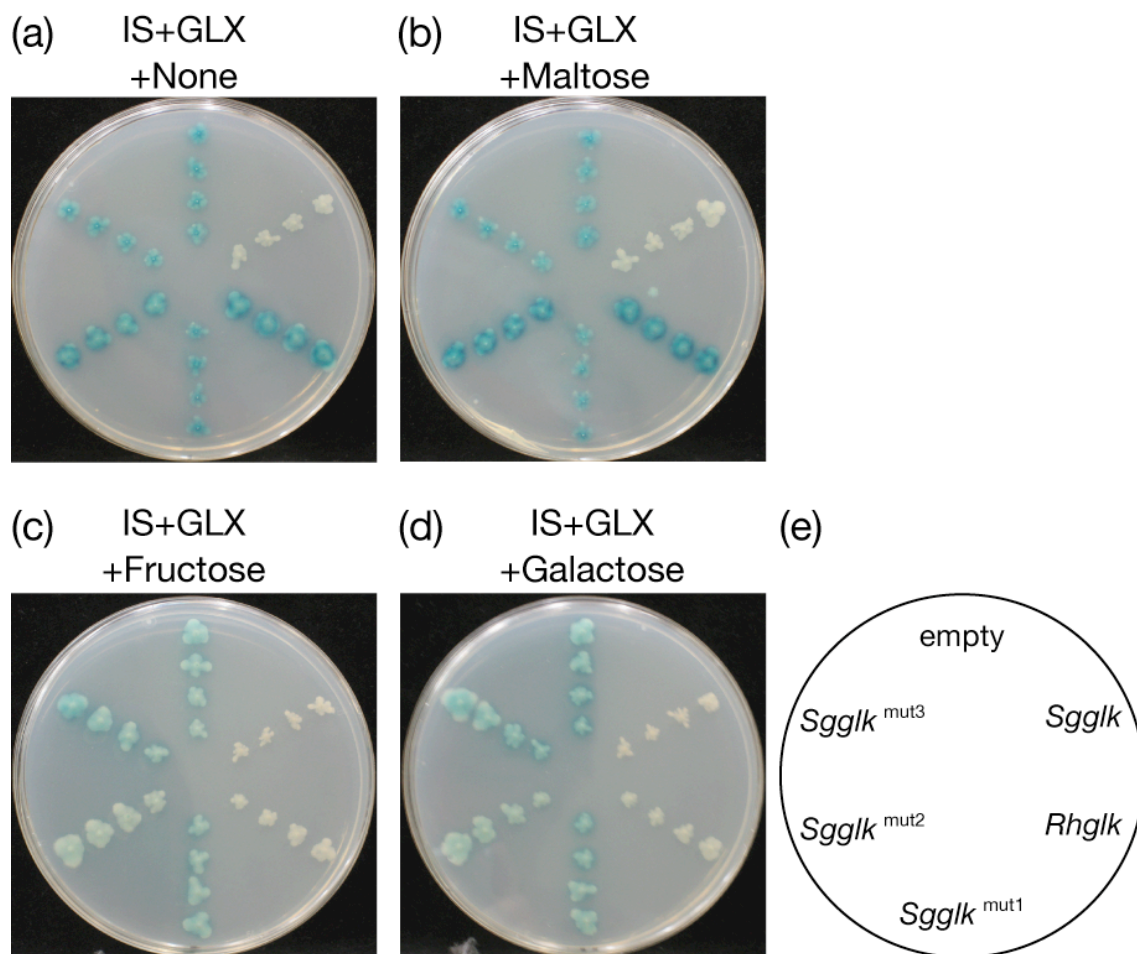
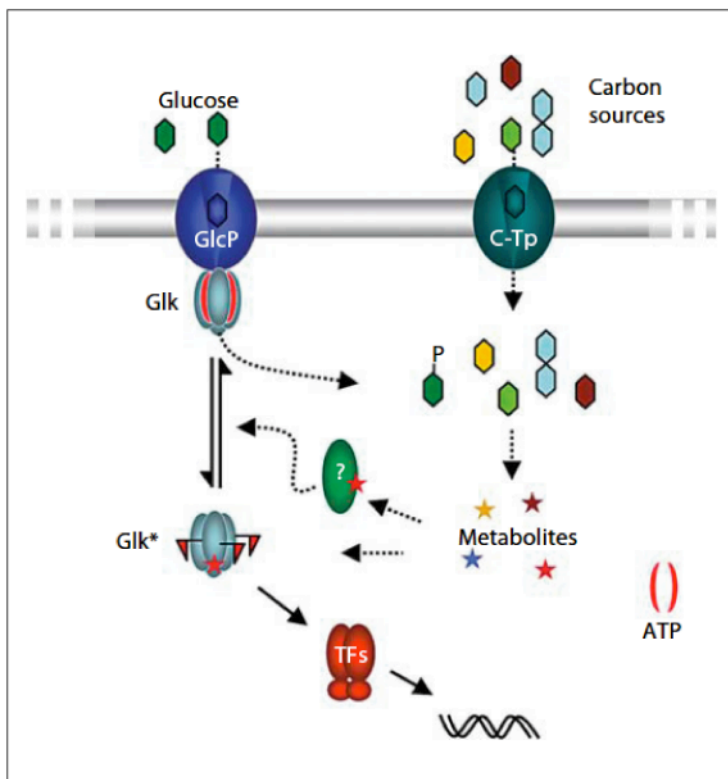


図 3.7 種々の糖源を添加した IS+GLX 寒天培地上における、様々な触媒活性を持つ Glk を生産する  $\Delta glk$  株の青色呈色の様子。添加糖源はすべて終濃度 1%とした。(a) 糖源無添加。(b) マルトース添加。(c) フルクトース添加。(d) ガラクトース添加。(e)は植菌配置図を示す。



**Fig. 5.** Model on the function of glucose kinase. Glk interacts with GlcP in the presence of glucose to immediately convert the incoming sugar to Glc-6-phosphate. Glucose and other carbon sources, which enter the cell via specific carbohydrate permeases (C-Tp), generate metabolites during catabolism. These trigger Glk (Glk\*) and/or an unknown nutrient sensor protein that is required for posttranslational modification of Glk. Glk\* interacts with transcription factors (such as MalR, GylR, BldB, etc.) to exert carbon catabolite repression.

**図 3.8** van Wezel *et al.*, 2007 による、*S. coelicolor* A3(2)におけるグルコースカタボライト抑制機構に関する主張を示した模式図（抜粋）。この論文の著者らの主張は以下の通り。グルコースを栄養源として資化できる環境下では、GlcK はグルコース透過酵素（グルコース-H<sup>+</sup>共輸送体）である GlcP と相互作用して存在し、取り込んだ糖をすぐにグルコース-6-リン酸へと変換する。グルコースや他の栄養源の資化が進み、ある代謝物（上図では赤い星印で示してある）が蓄積すると、これが GlcK を膜から引きはがすと同時に何らかの修飾をする。修飾された GlcK（上図で Glk\*と表現されている）が他の転写制御因子と相互作用することで、カタボライト抑制が実現される。

表3.1 本章で用いたオリゴヌクレオチド一覧 (2 頁中 1 頁目)

Name	Sequence (5' → 3')	nt <u>underlined</u> = from translational start site of <i>glk</i>	Direction	Sequence in <b>boldfaced</b>	Use
Dglk1-for	GCGCA <b>AAGCTT</b> GGCTACGACA CCCTCGTCGTC	-1514	→	HindIII	<i>glk</i> 破壊
Dglk1-rev	AAACT <b>GCAGC</b> GCCGATATCG ACGCCGATGG	+30	←	PstI	<i>glk</i> 破壊
Dglk2-for	AAACT <b>GCAGC</b> TGGCTGATCG GCGGCGAATG	+836	→	PstI	<i>glk</i> 破壊
Dglk2-rev	CGC <b>GAATTCT</b> GGCTGAGCAC GACGCGGAAC	+2465	←	EcoRI	<i>glk</i> 破壊
Pglk-for	CCCGA <b>AAGCTTCTCGAG</b> GGC GAAGGCCGCGTCGAAC	-369	→	HindIII, XhoI	Pglk クローニン グ
Pglk-rev	GCGA <b>ATTCTGAGTCCATAT</b> GT CCCTCAGTTCCGGTCGAGCC	+1	←	EcoRI, NdeI	Pglk クローニン グ
Sgglk-for	CCCGA <b>AAGCTTCATAT</b> GGGAC TCACCATCGGCGTC	+1	→	HindIII, NdeI	Sgglk クローニ ング
Sgglk-rev	GCGA <b>ATTCT</b> CAGCCCTGGCG GGCCAGGTC	+942	←	EcoRI	Sgglk クローニ ング
Rhglk-for	CCCGA <b>AAGCTTCATAT</b> GGCTC TGACAATTGGCATCG	+1	→	HindIII, NdeI	Rhglk クローニ ング
Rhglk-rev	CGCG <b>GATCCATATG</b> CAACC GATTGGACATTGCACTC	+1005	←	EcoRI, NdeI	Rhglk クローニ ング
mut1-for	<u>C</u> CATCGGCGTCG <b>CC</b> ATCGGC GGCACGAAG	+11	→	変異導入点	SgGik D8A 変異導入
mut1-rev	<u>C</u> TTCGTGCCGCCGAT <b>GG</b> CGA CGCCGATGG	+25	←	変異導入点	SgGik D8A 変異導入
mut2-for	<u>C</u> GATATCGGCGG <b>G</b> CGAAGA TCGCGGCTGG	+21	→	変異導入点	SgGik T12A 変異導入
mut2-rev	<u>C</u> CAGCCGCGATCTTC <b>G</b> CGCC GCCGATATCG	+50	←	変異導入点	SgGik T12A 変異導入
mut3-for	<u>C</u> TGCATCACGCTCGG <b>G</b> CCG GCCTCGGCGG	+378	→	変異導入点	SgGik T132A 変異導入
mut3-rev	<u>C</u> CGCCGAGGCCG <b>G</b> CGCCGAG CGTGATGCAG	+407	←	変異導入点	SgGik T132A 変異導入

表3.1 本章で用いたオリゴヌクレオチド一覧 (2 頁中 2 頁目)

Name	Sequence (5' → 3')	nt <u>underlined</u> = from translational start site of <i>glk</i>	Direction	Sequence in <b>boldfaced</b>	Use
chimSg1-for	AAACT <b>GCAG</b> GTACGTCGAC GACAAGCGCG	+197	→	PstI	キメラGlk作製
chimSg2-for	AAACT <b>GCAG</b> CCTGGGGCGAA TACCGCTTC	+328	→	PstI	キメラGlk作製
chimSg3-for	AAACT <b>GCAG</b> AGTTCGGCCAC ATCCGGGTC	+461	→	PstI	キメラGlk作製
chimSg4-for	AAACT <b>GCAG</b> TCCTGCTCGGT CTCGGCGAC	+602	→	PstI	キメラGlk作製
chimSg1-rev	AAACT <b>GCAG</b> CGCCGATGCCG ACGGCCTC	+190	←	PstI	キメラGlk作製
chimSg2-rev	AAACT <b>GCAG</b> CGTTGGCGTCG TTCTCGACG	+322	←	PstI	キメラGlk作製
chimSg3-rev	AAACT <b>GCAG</b> CCACGCCGAA GCGTCCGCG	+454	←	PstI	キメラGlk作製
chimSg4-rev	AAACT <b>GCAG</b> CGTTCTCGGGG GTGGCGTTG	+595	←	PstI	キメラGlk作製
chimRh1-for	AAACT <b>GCAG</b> GCTTCGTCGCC GCGGACCTC	+200	→	PstI	キメラGlk作製
chimRh2-for	AAACT <b>GCAG</b> CATGGGGCGAG GCGCGCTTC	+313	→	PstI	キメラGlk作製
chimRh3-for	AAACT <b>GCAG</b> AATTCGGGCAT CTCAATGTCAAC	+464	→	PstI	キメラGlk作製
chimRh4-for	AAACT <b>GCAG</b> ACCTCCTGGCC CGCGCCGG	+605	→	PstI	キメラGlk作製
chimRh1-rev	AAACT <b>GCAG</b> CGCCGATGCCG ACCGCCTG	+193	←	PstI	キメラGlk作製
chimRh2-rev	AAACT <b>GCAG</b> CGTTGGCATCG TTCTCCACC	+325	←	PstI	キメラGlk作製
chimRh3-rev	AAACT <b>GCAG</b> CCACACCGAAC TTGCCGCGATG	+457	←	PstI	キメラGlk作製
chimRh4-rev	AAACT <b>GCAG</b> CGAAACCGGG CGAGACGTTC	+598	←	PstI	キメラGlk作製

## ＜総括＞

本研究では「放線菌のグルコースカタボライト抑制機構」の解明を最終目標とし、遺伝学的アプローチとして2種類、蛋白工学的アプローチとして1種類、計3種類のアプローチを用いた解析を試みた。ほとんど未解明である研究対象を扱うことから、遺伝学的アプローチとしては2種類のまったく異なる方面からのスクリーニング系構築ならびに実際のスクリーニングを行った。その結果として、まったく予想されなかった遺伝子が放線菌の重要な生理作用に結びつくことを明らかにできた。過去に銅排出型トランスポーターとみなされてきた CopA1 については、高コピー導入により放線菌の二大特徴である形態分化と二次代謝を促進する作用があることを明らかにできた。また、過去にセロビオース利用遺伝子の制御因子として同定されていた CebR に関しては、当該因子が *Streptomyces griseus* においてはセルロースとセロビオースの利用系に対しグローバルに働いているという事実を明らかにしたうえで、本蛋白をコードする遺伝子の欠損がラクトースを糖源として培養した際における形態分化不全を引き起こすことを示した。いずれのアプローチも残念ながらグルコースカタボライト抑制に関する深い知見を得られる結果にたどり着くものではなかったが、放線菌の魅力である形態分化と二次代謝に関する新たな切り口を見つけることができたと考える。今後、現在莫大な蓄積の築かれつつあるゲノム情報、ならびにこれを利用したトランスクリプトーム・プロテオームを初めとするいわゆるオーム解析が行われるにあたり、本論文で見いだされたような異なる視点から発掘された形態分化・二次代謝関連遺伝子の蓄積は、解析の大きなヒントとなると思われる。

蛋白工学的アプローチとしては、その一次構造が非常に似ていながら *S. griseus* 由来 Glk と異なる性質をもつ、すなわち触媒活性を有しながらグルコースカタボライト抑制能を持たないという蛋白である *Rhodococcus* sp. RHA1 株由来 Glk の性質を明らかにするに至った。時を同じくして共同研究により *S. griseus* 由来 Glk の結晶構造情報が得られるに至ったのは、*Streptomyces* Glk に残された謎を解明するにあたり大きな進歩であるといえる。*S. coelicolor* A3(2)を題材に提唱された「Glk がグルコース透過酵素である GlcP と相互作用する」という仮説は、大腸菌における

糖資化グローバルレギュレーターである Mlc の性質と比較しても非常に興味深く、また合目的なものであると考えられる。今後、結晶構造情報を用いつつ *Rhodococcus* 由来 Glk との性質の違いを精査していくことで、長年の謎であった放線菌のグルコースカタボライト抑制機構が解明されてゆくことが期待される。

## <参考文献>

- Adaikkalam, V. & Swarup, S. (2002).** Molecular characterization of an operon, *cueAR*, encoding a putative P1-type ATPase and a MerR-type regulatory protein involved in copper homeostasis in *Pseudomonas putida*. *Microbiology* **148**, 2857-2867.
- Angell, S., Lewis, C. G., Buttner, M. J. & Bibb, M. J. (1994).** Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol Gen Genet* **244**, 135-143.
- Angell, S., Schwarz, E. & Bibb, M. J. (1992).** The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol Microbiol* **6**, 2833-2844.
- Ansari, A. Z., Bradner, J. E. & O'Halloran, T. V. (1995).** DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature* **374**, 371-375.
- Ansari, A. Z., Chael, M. L. & O'Halloran, T. V. (1992).** Allosteric underwinding of DNA is a critical step in positive control of transcription by Hg-MerR. *Nature* **355**, 87-89.
- Argüello, J. M. (2003).** Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol* **195**, 93-108.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M. & other authors (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
- Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Nothhaft, H. & Saier, T. (2004).** In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **186**, 1362-1373.
- Butler, M. J., Deutscher, J., Postma, P. W., Wilson, T. J., Galinier, A. & Bibb, M. J. (1999).** Analysis of a *ptsH* homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* **177**, 279-288.
- Carr, H. S., George, G. N. & Winge, D. R. (2002).** Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome *c* oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein. *J Biol Chem* **277**, 31237-31242.
- Chater, K. F. & Chandra, G. (2006).** The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 651-672.
- Chelly, J., Tümer, Z., Tønnesen, T., Petterson, A., Ishikawa-Brush, Y., Tommerup, N., Horn, N. & Monaco, A. P. (1993).** Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat Genet* **3**, 14-19.
- Chen, S. L. & Wilson, D. B. (2007).** Proteomic and transcriptomic analysis of extracellular proteins and mRNA levels in *Thermobifida fusca* grown on cellobiose and glucose. *Journal of Bacteriology* **189**, 6260-6265.
- Cordeiro, A. T., Cáceres, A. J., Vertommen, D., Concepción, J. L., Michels, P. A. & Versées, W. (2007).** The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glucokinase reveals features determining oligomerization and anomer specificity of hexose-phosphorylating enzymes. *J Mol Biol* **372**, 1215-1226.
- Dameron, C. T. & Harrison, M. D. (1998).** Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am J Clin Nutr* **67**, 1091S-1097S.



- Delic, I., Robbins, P. & Westpheling, J. (1992).** Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1885-1889.
- Eliot, M. A., M. J. Buttner, J. R. Nodwell (2007).** Multicellular Development in *Streptomyces*. In *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*, pp. 419-439. Edited by D. E. Whitworth. Washington, D.C.: ASM Press.
- Endo, K., Hosono, K., Beppu, T. & Ueda, K. (2002).** A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology* **148**, 1767-1776.
- Gaballa, A., Cao, M. & Helmann, J. D. (2003).** Two MerR homologues that affect copper induction of the *Bacillus subtilis* copZA operon. *Microbiology* **149**, 3413-3421.
- Garcia-Dominguez, M., Martin, J. F. & Liras, P. (1989).** Characterization of sugar uptake in wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose-utilizing mutant. *J Bacteriol* **171**, 6808-6814.
- Glerum, D. M., Shtanko, A. & Tzagoloff, A. (1996).** Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **271**, 14504-14509.
- González-Guerrero, M. & Argüello, J. M. (2008).** Mechanism of Cu<sup>+</sup>-transporting ATPases: soluble Cu<sup>+</sup> chaperones directly transfer Cu<sup>+</sup> to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5992-5997.
- Haydon, D. J. & Guest, J. R. (1991).** A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol Lett* **63**, 291-295.
- Hillerich, B. & Westpheling, J. (2006).** A new GntR family transcriptional regulator in *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and controls transcription of an ABC transporter in response to carbon source. *J Bacteriol* **188**, 7477-7487.
- Hodgson, D. A. (1982).** Glucose Repression of Carbon Source Uptake and Metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and Its Perturbation in Mutants Resistant to 2-Deoxyglucose. *Journal of General Microbiology* **128**, 2417-2430.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F. & other authors (1985).** *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual*. Norwich, United Kingdom: The John Innes Foundation.
- Ikeda, H., Seno, E. T., Bruton, C. J. & Chater, K. F. (1984).** Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Gen Genet* **196**, 501-507.
- Inada, T., Kimata, K. & Aiba, H. (1996).** Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes Cells* **1**, 293-301.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961).** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**, 318-356.
- Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J. & Nagata, Y. (2004).** Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* **12**, 429-438.
- Kato, J. Y., Chi, W. J., Ohnishi, Y., Hong, S. K. & Horinouchi, S. (2005).** Transcriptional control by A-factor of two trypsin genes in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **187**, 286-295.

- Kato, J. Y., Miyahisa, I., Mashiko, M., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2004).** A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology* **186**, 2206-2211.
- Katz, E., Thompson, C. J. & Hopwood, D. A. (1983).** Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J Gen Microbiol* **129**, 2703-2714.
- Kieser, T. & Hopwood, D. A. (1991).** Genetic manipulation of *Streptomyces*: integrating vectors and gene replacement. *Methods Enzymol* **204**, 430-458.
- Kimata, K., Inada, T., Tagami, H. & Aiba, H. (1998).** A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **29**, 1509-1519.
- Kundig, W., Ghosh, S. & Roseman, S. (1964).** Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**, 1067-1074.
- Kwakman, J. H. & Postma, P. W. (1994).** Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **176**, 2694-2698.
- Lee, S. J., Boos, W., Bouché, J. P. & Plumbridge, J. (2000).** Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J* **19**, 5353-5361.
- Liu, T., Ramesh, A., Ma, Z., Ward, S. K., Zhang, L., George, G. N., Talaat, A. M., Sacchettini, J. C. & Giedroc, D. P. (2007).** CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nat Chem Biol* **3**, 60-68.
- Lunin, V. V., Li, Y., Schrag, J. D., Iannuzzi, P., Cygler, M. & Matte, A. (2004).** Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose. *J Bacteriol* **186**, 6915-6927.
- Lydiate, D. J., Malpartida, F. & Hopwood, D. A. (1985).** The *Streptomyces* plasmid SCP2\*: its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene* **35**, 223-235.
- Magasanik, B. (1961).** Catabolite repression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **26**, 249-256.
- Mahr, K., van Wezel, G. P., Svensson, C., Krengel, U., Bibb, M. J. & Titgemeyer, F. (2000).** Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large-scale purification and biochemical analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**, 253-261.
- Mattern, S. G., Brawner, M. E. & Westpheling, J. (1993).** Identification of a complex operator for *galP1*, the glucose-sensitive, galactose-dependent promoter of the *Streptomyces* galactose operon. *J Bacteriol* **175**, 1213-1220.
- McCarthy, A. J. & Williams, S. T. (1992).** Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment--a review. *Gene* **115**, 189-192.
- McGuirl, M. A. & Dooley, D. M. (1999).** Copper-containing oxidases. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 138-144.
- McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W. & other authors (2006).** The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15582-15587.
- Mercer, J. F., Livingston, J., Hall, B. & other authors (1993).** Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet* **3**, 20-25.

- Mukai, T., Kawai, S., Mori, S., Mikami, B. & Murata, K. (2004).** Crystal structure of bacterial inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase. Insights into kinase evolution. *J Biol Chem* **279**, 50591-50600.
- Nam, T. W., Cho, S. H., Shin, D. & other authors (2001).** The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. *EMBO J* **20**, 491-498.
- Nam, T. W., Jung, H. I., An, Y. J., Park, Y. H., Lee, S. H., Seok, Y. J. & Cha, S. S. (2008).** Analyses of Mlc-IIBGlc interaction and a plausible molecular mechanism of Mlc inactivation by membrane sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3751-3756.
- Nguyen, J., Francou, F., Virolle, M. J. & Guérrineau, M. (1997).** Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by *regI*, a pleiotropic regulatory gene. *J Bacteriol* **179**, 6383-6390.
- O'Halloran, T. V. & Culotta, V. C. (2000).** Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* **275**, 25057-25060.
- Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R. & Solioz, M. (1993).** Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* **268**, 12775-12779.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. & Horinouchi, S. (2008).** Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* **190**, 4050-4060.
- Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T. & Horinouchi, S. (1995).** Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **177**, 6083-6092.
- Onaka, H., Taniguchi, S., Ikeda, H., Igarashi, Y. & Furumai, T. (2003).** pTOYAMAcos, pTYM18, and pTYM19, actinomycete-*Escherichia coli* integrating vectors for heterologous gene expression. *J Antibiot (Tokyo)* **56**, 950-956.
- Parche, S., Nothaft, H., Kamionka, A. & Titgemeyer, F. (2000).** Sugar uptake and utilisation in *Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**, 243-251.
- Pastan, I. & Perlman, R. (1970).** Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science* **169**, 339-344.
- Plumbridge, J. (2002).** Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Curr Opin Microbiol* **5**, 187-193.
- Pope, M. K., Green, B. D. & Westpheling, J. (1996).** The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Mol Microbiol* **19**, 747-756.
- Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S. J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., Culotta, V. C., Penner-Hahn, J. E. & O'Halloran, T. V. (1997).** Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**, 853-856.
- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. & O'Halloran, T. V. (1999).** Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805-808.
- Reeve, W. G., Tiwari, R. P., Kale, N. B., Dilworth, M. J. & Glenn, A. R. (2002).** ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Mol Microbiol* **43**, 981-991.

- Rigali, S., Nothhaft, H., Noens, E. E. & other authors (2006).** The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol* **61**, 1237-1251.
- Rigali, S., Schlicht, M., Hoskisson, P., Nothhaft, H., Merzbacher, M., Joris, B. & Titgemeyer, F. (2004).** Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new cis/trans relationships. *Nucleic Acids Res* **32**, 3418-3426.
- Rodríguez, S., Santamaría, R. I., Fernández-Abalos, J. M. & Díaz, M. (2005).** Identification of the sequences involved in the glucose-repressed transcription of the *Streptomyces halstedii* JM8 *xysA* promoter. *Gene* **351**, 1-9.
- Süsstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A. & Thompson, C. J. (1998).** Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **30**, 33-46.
- Schiefner, A., Gerber, K., Seitz, S., Welte, W., Diederichs, K. & Boos, W. (2005).** The crystal structure of Mlc, a global regulator of sugar metabolism in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**, 29073-29079.
- Schlösser, A., Aldekamp, T. & Schrempf, H. (2000).** Binding characteristics of CebR, the regulator of the ceb operon required for cellobiose/cellotriose uptake in *Streptomyces reticuli*. *FEMS Microbiol Lett* **190**, 127-132.
- Schlösser, A., Jantos, J., Hackmann, K. & Schrempf, H. (1999).** Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and cellotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2636-2643.
- Seo, J. W., Ohnishi, Y., Hirata, A. & Horinouchi, S. (2002).** ATP-binding cassette transport system involved in regulation of morphological differentiation in response to glucose in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **184**, 91-103.
- Servín-González, L., Jensen, M. R., White, J. & Bibb, M. (1994).** Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **140** ( Pt 10), 2555-2565.
- Seto, M., Kimbara, K., Shimura, M., Hatta, T., Fukuda, M. & Yano, K. (1995).** A Novel Transformation of Polychlorinated Biphenyls by *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3353-3358.
- Siebold, C., Flükiger, K., Beutler, R. & Erni, B. (2001).** Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett* **504**, 104-111.
- Smaldone, G. T. & Helmann, J. D. (2007).** CsoR regulates the copper efflux operon *copZA* in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **153**, 4123-4128.
- Smith, C. P. & Chater, K. F. (1988).** Structure and regulation of controlling sequences for the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon. *J Mol Biol* **204**, 569-580.
- Smith, C. P. & Chater, K. F. (1988).** Cloning and transcription analysis of the entire glycerol utilization (*gylABX*) operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and identification of a closely associated transcription unit. *Mol Gen Genet* **211**, 129-137.
- Spiridonov, N. A. & Wilson, D. B. (1998).** Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. *J Bacteriol* **180**, 3529-3532.
- Spiridonov, N. A. & Wilson, D. B. (1999).** Characterization and cloning of *celR*, a transcriptional regulator of cellulase genes from *Thermomonospora fusca*. *J Biol Chem* **274**, 13127-13132.

- Sprusansky, O., Zhou, L., Jordan, S., White, J. & Westpheling, J. (2003).** Identification of three new genes involved in morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **185**, 6147-6157.
- Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. & Brown, N. L. (2001).** CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* **39**, 502-511.
- Strohl, W. R. (1992).** Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res* **20**, 961-974.
- Süsstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A. & Thompson, C. J. (1998).** Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* **30**, 33-46.
- Tanaka, Y., Itoh, F., Kimata, K. & Aiba, H. (2004).** Membrane localization itself but not binding to IICB is directly responsible for the inactivation of the global repressor Mlc in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **53**, 941-951.
- Tanaka, Y., Kimata, K. & Aiba, H. (2000).** A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *Embo Journal* **19**, 5344-5352.
- Tanaka, Y., Kimata, K., Inada, T., Tagami, H. & Aiba, H. (1999).** Negative regulation of the *pts* operon by Mlc: mechanism underlying glucose induction in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **4**, 391-399.
- Titgemeyer, F., Reizer, J., Reizer, A. & Saier (1994).** Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology* **140** ( Pt 9), 2349-2354.
- Titgemeyer, F., Walkenhorst, J., Reizer, J., Stuiver, M. H., Cui, X. & Saier (1995).** Identification and characterization of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology* **141** ( Pt 1), 51-58.
- Ueda, K., Miyake, K., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1993).** A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two-component regulatory systems and membrane translocators. *J Bacteriol* **175**, 2006-2016.
- Ueda, K., Tomaru, Y., Endoh, K. & Beppu, T. (1997).** Stimulatory effect of copper on antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces tanashiensis*. *J Antibiot (Tokyo)* **50**, 693-695.
- van Wezel, G. P., König, M., Mahr, K., Nothaft, H., Thomae, A. W., Bibb, M. & Titgemeyer, F. (2007).** A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**, 67-74.
- van Wezel, G. P., Mahr, K., König, M., Traag, B. A., Pimentel-Schmitt, E. F., Willimek, A. & Titgemeyer, F. (2005).** GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **55**, 624-636.
- van Wezel, G. P., White, J., Bibb, M. J. & Postma, P. W. (1997).** The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. *Mol Gen Genet* **254**, 604-608.
- Viollier, P. H., Minas, W., Dale, G. E., Folcher, M. & Thompson, C. J. (2001).** Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol* **183**, 3184-3192.
- Viollier, P. H., Nguyen, K. T., Minas, W., Folcher, M., Dale, G. E. & Thompson, C. J. (2001).** Roles of aconitase in growth, metabolism, and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **183**, 3193-3203.

- Virolle, M. J. & Gagnat, J. (1994).** Sequences involved in growth-phase-dependent expression and glucose repression of a *Streptomyces* alpha-amylase gene. *Microbiology* **140** ( Pt 5), 1059-1067.
- Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S. & Gitschier, J. (1993).** Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* **3**, 7-13.
- Vulpe, C. D. & Packman, S. (1995).** Cellular copper transport. *Annu Rev Nutr* **15**, 293-322.
- Wang, F., Xiao, X., Saito, A. & Schrempf, H. (2002).** *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of N-acetylglucosamine. *Mol Genet Genomics* **268**, 344-351.
- Ward, J. M., Janssen, G. R., Kieser, T., Bibb, M. J. & Buttner, M. J. (1986).** Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Mol Gen Genet* **203**, 468-478.
- Wong, H. C., Ting, Y., Lin, H. C., Reichert, F., Myambo, K., Watt, K. W., Toy, P. L. & Drummond, R. J. (1991).** Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. *J Bacteriol* **173**, 6849-6858.
- Xu, L., Li, Q. & Jiang, C. (1996).** Diversity of Soil Actinomycetes in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* **62**, 244-248.

## ＜謝辞＞

醱酵学研究室に所属して早や 6 年の歳月が流れようとしています。卒論として配属された当初は、思い返すのも憚られるほど知識も心構えも劣っていましたが、醱酵学研究室の物質的にも精神的にも恵まれた環境に 6 年間置いていただき、優秀な先生方と先輩方、気力に満ち溢れる同期や後輩の背中を常に追いかけて、四苦八苦しながらもどうにかこうして博士論文を書き上げるに至りました。

未知現象の探求という至上の喜びを何不自由なく享受できる本学の本学科、本研究室に所属できたことは無上の幸運です。研究はもちろんのこと、酒宴を初めとする触れ合いの場においても決して手を抜かず、大いに笑い、楽しみ、時に討論し叱咤激励しあう「農芸化学的研究生生活」。私は 6 年間のその生活を通して本当に多くを学び、成長させられたと感じています。その中でも私が配属された醱酵学研究室という場所、そこに集う同胞と先輩方、そしてとりわけそれを日々弛みなく牽引してくださっている堀之内末治教授には、感謝の言葉ありません。堀之内先生には研究室というこの上ない成長と楽しみの場を与えていただくのみならず、研究に対する鋭いご指摘から倫理・道徳・社会人としてのマナー等内面的なご指導まで、研究者としてスタートラインに立つまでのあらゆる基盤を与えていただきました。大西康夫准教授は、遅々として進まずしばしば暗がりに落ち込む私の研究計画に対して常に明るい灯火を掲げてくださる存在でした。多忙な折、嫌な顔ひとつせず、自身の仕事を中断してまで密度の濃いディスカッションと実験計画の指導をしてくださる大西先生が存在なくしては、今日の私は有り得なかったと確信しております。助教である鮎信学博士からは、スタッフとしてもっとも年齢が近いこともあり、細かい実験手法から研究者としての心構えまで数限りない事柄について気さくに、そして時にはとつとつするほど真剣かつ的確なアドバイスをいただきました。いずれのアドバイスも研究者を目指す身分としての宝となっています。理化学研究所主任研究員であり醱酵学研究室前助教授である吉田稔先生からは、研究発表の折、化学的観点と第一線で活躍される研究者としての切り口から鋭いご指摘を頂きました。また東京電機大学教授の川崎寿先生からは、研

究計画へのアドバイスの他、未知現象に立ち向かうことの魅力について論していただき、激励していただきました。

ポスドクや企業研究員といった「大人」の方々からは、全員から漏れなく個性やポリシーを感じ取り、大いに学ばせていただきました。特に、鈴木宏和・原啓文両博士からは、技術面だけでなく、研究を生業とする者の覚悟を教えてくださいました。同様に、企業受託研究員の皆様からは、企業で研究するということの意義と楽しさ、生き甲斐を感じ取り、これらのことは私の進路選択に大きな影響を与えました。比較的年齢の離れた先輩であった友野理生・加藤淳也両博士には弟のように可愛がっていただき、生活面・研究面の双方で多くのご指導をいただきました。私の優秀な同期 4 名、岩崎裕子氏、ツァイ・イーサン氏、原口（旧姓：池谷）美和氏、舟橋賢記氏はみな修士課程修了後すぐに研究室を離れましたが、離れてもなお、苦楽を分かち合った仲間として常に相談にのり励ましてくれました。6 年間を通し彼等にどれだけ助けられたかわかりません。歳の近い先輩である高野雄二氏、古庄康秀氏、宮久郁夫氏には、特に生活面、人間の精神的な面について貴重なご指導をいただきました。来年より修士課程にて G1k の研究を行う森田翔氏には、私が博士論文執筆に忙しい時期に指導を行うこととなり、フォローが行き届かない点もありましたが、ことあるごとにひとりで考え、実験を推進してくれました。彼の頑張りにより、20 年来の謎である G1k 研究は近いうちに必ずや解決されると信じております。

最後になりましたが、生活が不規則な上に一度家を出たらいつ帰ってくるともわからない鉄砲玉のような息子を持ちながら、その息子のために学費を捻出し、休息の時間を割いて食住の準備をし、労いの言葉と安息の場を与えてくれる家族、父丸島健二、母丸島智恵子、弟丸島直己に、最大限の感謝と将来の恩返しの約束をいたします。本当にありがとうございました。

この他にも多くの方々にお世話になりましたが、到底ここに書ききることができません。しかしたひと言言えることは、その多くの方々のうち、どのひとりが欠けようとも現在の私は、ということです。研究という単語からはどこか無機的で、自分と対象とが一对一で存在するような印象を受けるものですが、少なくとも応用生命化学・応用生命工学専攻の研究は、多くの人とのつながりをもってして対象に挑む、大規模なチームプレーでありました。私を今



の私たらしめてくれたすべての方々に、今一度、心から感謝申し上げます。

無事博士課程を取得した暁には、私は自身の地元である千葉県のバイオ企業、キッコーマン株式会社にて研究職として採用していただくことが内定しております。農芸化学の真価たる、実学というフィールドにおいて研究を行える機会を得たことは無上の喜びであり、またこれまでの研究生活で繋がりを持った個性的な皆様と再び切磋琢磨できる可能性のある分野を職とできることを非常に幸運に思います。博士課程在学中は日々長い時間をかけて実験を行っていながらもなかなか良い結果が出ず先生方に多大なご迷惑とご心配をおかけしましたが、スクリーニングや蛋白工学といった根気がものを言う実験を体験しながら、私自身はその生活の中でかけがえのない「農化魂」をいただくことができたと自負しております。就職先である企業ではこの自負を責任とプライドに変え、日々産業科学に邁進することを誓い、結びの言葉とさせていただきます。

平成 21 年 1 月 6 日