

放線菌 *Streptomyces kasugaensis* の生産するアミノグリコ  
シド系抗生物質カスガマイシンの生合成とその排出に  
関する分子遺伝学的研究

池 野 聡 一

## 目 次

### Abbreviations

### 図および表

## 第 1 編 本論

第 1 章 緒論	1
第 2 章 カスガマイシンアセチル化酵素遺伝子 ( <i>kac</i> )	4
第 1 節 カスガマイシンを生産する放線菌における <i>kac</i> の保持	5
第 2 節 放線菌 <i>Streptomyces albulus</i> MF861-C4 株におけるカスガマイシン 生産性の消失と <i>kac</i> 欠失との関連	5
第 3 節 放線菌 <i>Streptomyces kasugaensis</i> M338-M1 株からの <i>kac</i> <sup>338</sup> の クローニング	9
2.3.1 サザンロット解析	
2.3.2 ショットガンクローニング	
2.3.3 塩基配列の決定, <i>kac</i> <sup>338</sup> と <i>kac</i> <sup>273</sup> との遺伝子構造および推定 タンパク質の比較	
第 4 節 大腸菌 JM109 株における <i>kac</i> の発現とカスガマイシンへの 高度耐性化	14
2.4.1 <i>kac</i> 発現プラスミドの構築	
2.4.2 形質転換株のカスガマイシン高度耐性化	
第 5 節 考察と小括	16
第 3 章 カスガマイシン生合成関連遺伝子群を含む <i>kas</i> クラスター	17
第 1 節 <i>kac</i> <sup>338</sup> 周辺領域のクローニングと塩基配列の決定	17
3.1.1 <i>kac</i> <sup>338</sup> 周辺領域のクローニング	
3.1.2 塩基配列の決定	
第 2 節 <i>kas</i> クラスター内の遺伝子群の検索	18
3.2.1 Open Reading Frame 検索	
第 3 節 考察と小括	19
第 4 章 <i>kas</i> クラスター内のカスガマイシン生合成に関わる <i>kas</i> 遺伝子群	23
第 1 節 カスガミン生合成遺伝子群 ( <i>kasPQRACD</i> )	26

4.1.1	各遺伝子の構造と推定遺伝子産物	
4.1.1.1	<i>kasP</i> の遺伝子構造と推定 KasP タンパク質	
4.1.1.2	<i>kasQ</i> の遺伝子構造と推定 KasQ タンパク質	
4.1.1.3	<i>kasR</i> の遺伝子構造と推定 KasR タンパク質	
4.1.1.4	<i>kasA</i> の遺伝子構造と推定 KasA タンパク質	
4.1.1.5	<i>kasC</i> の遺伝子構造と推定 KasC タンパク質	
4.1.1.6	<i>kasD</i> の遺伝子構造と推定 KasD タンパク質	
4.1.2	<i>kasPQRACD</i> 領域の転写単位の解析	
第2節	カルボキシホルミドイル化酵素遺伝子 ( <i>kasN</i> )	30
4.2.1	<i>kasN</i> の遺伝子構造と推定 KasN タンパク質	
4.2.2	<i>kasNO</i> 領域における転写単位	
4.2.2.1	ノーザンプロット解析	
4.2.2.2	RT-PCR	
4.2.3	転写開始点とプロモーター配列	
第3節	D-chiro-イノシトール生合成遺伝子 ( <i>kasJ</i> )	32
4.3.1	<i>kasJ</i> の遺伝子構造と推定 KasJ タンパク質	
4.3.2	<i>kasJ</i> の転写開始点とプロモーター配列の解析	
第4節	考察と小括	33
第5章	<i>kas</i> クラスター内で <i>kas</i> 遺伝子群の転写調節に関わる遺伝子	47
第1節	転写調節遺伝子 ( <i>kasT</i> ) の遺伝子構造と推定 KasT タンパク質	49
第2節	<i>kasT</i> と <i>kas</i> 遺伝子群との転写とカスガマイシン生産との関連	53
5.2.1	<i>S. kasugaensis</i> M338-M1 株の液体培養におけるカスガマイシン生産	
5.2.2	<i>kasT</i> と <i>kas</i> 遺伝子群との転写時期の比較	
5.2.3	<i>S. kasugaensis</i> MB273-C4 株由来のカスガマイシン非生産変異株 R6D4 における <i>kas</i> 遺伝子群の転写	
5.2.4	<i>kasT</i> 発現プラスミドの構築	
5.2.5	R6D4 株における <i>kasT</i> の発現とカスガマイシン生産の復帰	
第3節	Trx-KasT 融合タンパク質の発現と精製	63
5.3.1	Trx-KasT 融合タンパク質発現プラスミドの構築	
5.3.2	Trx-KasT 融合タンパク質の発現と精製	
第4節	KasT の DNA 結合領域の解析	63

第5節 考察と小括	64
第6章 <i>kas</i> クラスター内のカスガマイシン排出に関わる遺伝子群	74
第1節 <i>kas</i> クラスター内の ABC トランスポーター遺伝子群 ( <i>kasKLM</i> )	75
第2節 <i>kasKLM</i> の転写解析	80
6.2.1 転写単位	
6.2.2 転写開始点とプロモーター配列	
第3節 大腸菌 JM109 株における <i>kasK</i> , <i>kasL</i> および <i>kasM</i> の発現	84
6.3.1 <i>kasKLM</i> 発現プラスミドの構築	
6.3.2 $\beta$ -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現プラスミドの構築	
6.3.2.1 <i>KasK</i> - <i>LacZ'</i> 融合タンパク質発現プラスミド	
6.3.2.2 <i>KasL</i> - <i>LacZ'</i> 融合タンパク質発現プラスミド	
6.3.2.3 <i>KasM</i> - <i>LacZ'</i> 融合タンパク質発現プラスミド	
6.3.3 大腸菌 JM109 株における <i>kasK</i> , <i>kasL</i> および <i>kasM</i> の翻訳の確認	
6.3.4 大腸菌 JM109 株のカスガマイシン耐性化	
第4節 カスガマイシントランスポーターを構成するサブユニット	86
6.4.1 <i>kasK</i> , <i>kasL</i> および <i>kasM</i> 遺伝子を破壊したプラスミドの構築	
6.4.1.1 <i>kasK</i> 破壊プラスミド	
6.4.1.2 <i>kasL</i> 破壊プラスミド	
6.4.1.3 <i>kasM</i> 破壊プラスミド	
6.4.2 大腸菌形質転換株のカスガマイシン耐性化	
第5節 考察と小括	87
第7章 総括と展望	99



## 第2編 実験の部

第1章 実験材料	102
第1節 菌株	102
1.1.1 放線菌株	
1.1.2 大腸菌株	
1.1.3 その他の菌株	
第2節 培地	102
1.2.1 放線菌株用培地	
1.2.2 大腸菌株用培地	
1.2.3 カスガマイシンバイオアッセイ用培地	
第3節 ベクターおよび合成プライマー	102
第4節 酵素	103
第5節 キット	103
第6節 その他の試薬	103
第7節 緩衝液等の組成	114
1.7.1 DNA抽出と電気泳動	
1.7.2 サザンブロット解析	
1.7.3 ノーザンブロット解析	
1.7.4 プライマーエクステンション	
1.7.5 放線菌を用いたプロトプラストの作成と形質転換	
1.7.6 Trx-KasT 融合タンパク質の発現と精製	
1.7.7 ゲルシフト解析	
第2章 実験方法	115
第1節 培養	115
2.1.1 放線菌株の培養	
2.1.2 大腸菌株の培養	
第2節 使用した遺伝子操作技法	115
第3節 放線菌株からの核酸抽出法	116
2.3.1 ゲノム DNA の抽出	
2.3.2 Total RNA の抽出	
第4節 PCR	116

第5節	クローニング	117
2.5.1	ショットガンクローニング	
2.5.2	Inverted PCR を利用した PCR クローニング	
第6節	塩基配列決定法	117
第7節	標識プローブの作製	118
2.7.1	Nick translation	
2.7.2	DNA 5'末端標識	
第8節	サザンプロット解析	118
第9節	ノーザンプロット解析	118
第10節	RT-PCR	119
第11節	プライマーエクステンション	119
第12節	5'-RACE	119
第13節	放線菌プロトプラストの調製法	120
2.13.1	<i>Streptomyces lividans</i> TK21 プロトプラストの調製	
2.13.2	<i>S. kasugaensis</i> プロトプラストの調製	
第14節	放線菌の形質転換法	120
2.14.1	<i>S. lividans</i> TK21 の形質転換	
2.14.2	<i>S. kasugaensis</i> の形質転換	
第15節	カスガマイシンの定性と定量	121
2.15.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO15334 株の培養	
2.15.2	カスガマイシンのバイオアッセイ	
第16節	大腸菌 JM109 株における <i>kac</i> 発現とカスガマイシン耐性	121
第17節	大腸菌における Trx-KasT 融合タンパク質の発現と精製	122
第18節	ゲルシフト解析	122
参考文献		123
謝辞		128
論文の内容の要旨		129

## **Abbreviations**

**ABC** : ATP-binding cassette  
**ACT** : actinorhodin  
**AG** : aminoglycoside  
**ATP** : adenosine 5'-triphosphate  
**dCTP** : deoxycytidine 5'-triphosphate  
**DNA** : deoxyribonucleic acid  
**DNaseI** : deoxyribonuclease I  
**DOH** : deoxyhexose  
**dTDP** : deoxythymidine 5'-diphosphate  
**EDTA** : ethylenediaminetetraacetic acid  
**EPS** : extracellular polysaccharide  
**FAD** : flavin adenine dinucleotide  
**FI** : formimidoyl group  
**fMet** : *N*-formylmethionine  
**FT** : fortimicin (= astromicin)  
**GlcNAc** : *N*-acetyl-D-glucosamine  
**H4MPT** : N5, N10-methylenetetrahydromethanopterin  
**IPTG** : isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactoside  
**HTH** : helix-turn-helix motife  
**KSM** : kasugamycin  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**MOPS** : 3-morpholinopropanesulfonic acid  
**mRNA** : messenger RNA  
**NAD(P)** : nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)  
**ORF** : open reading frame  
**PAGE** : polyacrylamide gel electrophoresis  
**PCR** : polymerase chain reaction  
**PK** : polyketide  
**PMP** : pyridoxamine 5'-phosphate  
**RACE** : rapid amplification of cDNA ends

**RBS : ribosome binding site**

**RNA : ribonucleic acid**

**RNase : ribonuclease**

**rRNA : ribosomal RNA**

**RT-PCR : reverse transcriptase – polymerase chain reaction**

**RTase : reverse transcriptase**

**SARPs : *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins**

**SDS : sodium dodecyl sulfate**

**SEP : *Streptomyces E. coli*  $\sigma^{70}$ -like promoter**

**SM : streptomycin**

**tRNA : transfer RNA**

**UDP : uridine 5'-diphosphate**

**X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside**

## 図および表

### 第 1 編 本論

図 1.1.1	カスガマイシンの化学構造	2
図 2.1.1	カスガマイシン生産株における <i>kac</i> 相同 DNA 領域の検出	7
図 2.2.1	<i>S. albulus</i> MF861-C4 株における <i>kac</i> 相同 DNA 領域の欠失	10
図 2.3.1	<i>S. kasugaensis</i> M338-M1 株ゲノム DNA のサザンプロット解析	11
図 2.3.2	組換えプラスミド pSKE 1 の制限酵素地図	12
図 2.3.3	MB273-C4 株および M338-M1 株由来の <i>kac</i> 構造遺伝子と Kac タンパク質の比較	13
図 2.4.1	<i>kac</i> 発現による大腸菌 JM109 株のカスガマイシン高度耐性化	15
図 3.1.1	クローニングにより得られた DNA 領域	21
図 3.1.2	<i>kac</i> <sup>338</sup> 周辺クローニング領域の (G+C) 含量の推移	21
図 3.2.1	<i>kas</i> クラスターにおける open reading frame (ORF) 検索と <i>kas</i> 遺伝子群	22
図 4.1.1	推定されるカスガマイシン生合成経路と関与する推定遺伝子産物	24
図 4.1.2	KasQ と他生物種由来 UDP-GlcNAc 2-epimerase のアミノ酸配列 の比較	35
図 4.1.3	アスカリロース生合成	36
図 4.1.4	KasR と他生物種由来 C-3 dehydratase のアミノ酸配列の比較	37
図 4.1.5	アミノトランスフェラーゼのピリドキサルリン酸結合部位 の比較	38
図 4.1.6	KasD と類似タンパク質の N 末端領域の比較	38
図 4.1.7	<i>kasP-kasQ</i> および <i>kasR-kasA</i> 領域における転写単位 of 解析	40
図 4.1.8	<i>kasC-kasD</i> および <i>kasE-kasF</i> 領域における転写単位 of 解析	41
図 4.2.1	N-ホルムイミドイル基生合成と推定カルボキシホルミドイル基 生合成機構	42
図 4.2.2	<i>kasN</i> 構造遺伝子領域を含む転写物の検出	43
図 4.2.3	<i>kasN-kasO</i> 領域における転写単位 of 解析	44
図 4.2.4	<i>kasNO</i> mRNA の転写開始点と推定プロモーター配列	45
図 4.3.1	<i>kasU</i> および <i>kasJ</i> の mRNA の転写開始点と推定プロモーター配列	46
図 5.1.1	<i>kasT</i> およびその周辺領域の塩基配列と KasT の推定アミノ酸配列	51

図 5.1.2	ホモロジープロット解析	52
図 5.2.1	<i>S. kasugaensis</i> M338-M1 株におけるカスガマイシン生産量の 経時変化	54
図 5.2.2	RT-PCR 法による転写検討領域	55
図 5.2.3	カスガマイシン (KSM) 生産と <i>kas</i> 遺伝子群の転写解析	56
図 5.2.4	A1R6 株と R6D4 株における <i>kas</i> 遺伝子群の転写解析	60
図 5.2.5	A1R6 株、R6D4 株および <i>kasT</i> を恒常的に強制発現させた R6D4 / pSK1171- <i>kasT</i> 株における <i>kas</i> 遺伝子群の転写解析	61
図 5.2.6	R6D4 / pSK1171- <i>kasT</i> のカスガマイシン生産の復帰	62
図 5.3.1	Trx-KasT の発現と精製	67
図 5.4.1	<i>kasT</i> 上流領域および <i>kasU-kasJ</i> 遺伝子間領域に対するゲル シフト解析	69
図 5.4.2	<i>kasK</i> 上流領域に対するゲルシフト解析	70
図 5.4.3	<i>kasN</i> 上流領域に対するゲルシフト解析	71
図 5.4.4	<i>kasQ-kasR</i> 遺伝子間領域に対するゲルシフト解析	72
図 5.4.5	<i>kasB</i> 上流領域に対するゲルシフト解析	73
図 6.1.1	<i>kasKLM</i> とその周辺領域を含む 4,236 bp <i>SacI-EcoRI</i> 領域の塩基 配列と KasJ (C 末端領域) , KasK, KasL および KasM の 推定アミノ酸配列	77
図 6.1.2	KasL および KasM における疎水性領域の解析	79
図 6.2.1	RT-PCR 法による <i>kasKLM</i> mRNA の検出	81
図 6.2.2	プライマーエクステンション法による <i>kasKLM</i> mRNA の転写 開始点の同定	82
図 6.3.1	<i>kasK</i> , <i>kasL</i> および <i>kasM</i> と <i>lacZ'</i> との融合遺伝子発現プラスミド	91
図 6.3.2	大腸菌 JM109 株における <i>kasK</i> , <i>kasL</i> および <i>kasM</i> の発現の確認	92
図 6.3.3	<i>kasKLM</i> の発現による大腸菌 JM109 株の KSM 耐性化	93
図 6.4.1	<i>kasKLM</i> の破壊プラスミド	95
図 6.4.2	大腸菌 JM109 株の形質転換株におけるカスガマイシン 耐性度の比較	96
図 6.4.3	カスガマイシントランスポーターの推定構造	97
図 6.5.1	抗生物質生産菌における ABC トランスポーターの分類	98

表 2.1.1	本研究で使用したカスガマイシン生産および非生産放線菌株の特徴	6
表 2.2.1	<i>S. kasugaensis</i> M338-M1 と <i>S. albulus</i> MF861-C4 (a), (b), (c)株間 とのゲノム相同性	8
表 2.4.1	<i>kac</i> 構造遺伝子の増幅に使用した合成プライマー	14
表 3.1.1	<i>kac</i> <sup>338</sup> 周辺領域のクローニング	20
表 3.1.2	PCR クローニングに使用した合成プライマー	20
表 4.1.1	<i>kas</i> 遺伝子群がコードするタンパク質の推定機能	25
表 4.1.2	RT-PCR に使用した合成プライマー	39
表 5.1.1	放線菌より見出された主な経路特異的転写調節因子	48
表 5.2.1	<i>kasT</i> 発現実験に使用した <i>Streptomyces kasugaensis</i> MB273-C4 由来の菌株	59
表 5.2.2	<i>kasT</i> の恒常的な発現実験に用いたプラスミド	59
表 5.2.3	<i>kasT</i> 構造遺伝子領域の PCR 増幅に使用した合成プライマー	59
表 5.3.1	<i>kasT</i> 構造遺伝子領域の増幅に使用した合成プライマー	66
表 5.3.2	Trx-KasT 発現プラスミド	66
表 5.4.1	ゲルシフト解析に使用した合成プライマー	68
表 6.1.1	KasL および KasM に関する相同性検索結果	78
表 6.2.1	RT-PCR 法およびプライマーエクステンション法に用いた 合成プライマー	83
表 6.2.2	プロモーター配列の比較	83
表 6.3.1	<i>kasKLM</i> 発現プラスミドの構築と B-ガラクトシダーゼ融合タン パク質発現プラスミドの構築に使用した合成プライマー	89
表 6.3.2	<i>kasKLM</i> 発現実験に使用した組換えプラスミド	90
表 6.4.1	<i>kasKLM</i> の破壊実験に使用した組換えプラスミド	94

## 第2編 実験の部

表 1.1.1	使用した放線菌株	104
表 1.1.2	使用した大腸菌株	104
表 1.2.1	MR (カスガマイシン生産) 培地の組成	105
表 1.2.2	YGG 培地の組成	105
表 1.2.3	GPY 培地の組成	105
表 1.2.4	GLPYG 培地の組成	106
表 1.2.5	R2YE 培地の組成	106
表 1.2.6	RK5 培地の組成	106
表 1.2.7	YT 培地の組成	107
表 1.2.8	LB 培地の組成	107
表 1.2.9	L-broth の組成	107
表 1.2.10	Noken 培地の組成	108
表 1.2.11	カスガマイシンバイオアッセイ用培地の組成	108
表 1.3.1	使用したプラスミドベクター	109
表 1.3.2	塩基配列の決定に使用した合成プライマー	110
表 1.3.3	RT-PCR に使用した合成プライマー	112
表 1.3.4	5'-RACE に使用した合成プライマー	113



## 第1編 本論

### 第1章 緒論

*Streptomyces* 属放線菌（以後、放線菌と称す）はグラム陽性の原核微生物であるが、真核微生物のカビに類似した菌糸状の生育形態を示して気菌糸形成から孢子形成にいたる形態分化を行う。さらに、抗菌活性をはじめとする多種多様な生理活性をもつ抗生物質を二次代謝産物として生産している。放線菌から見出された抗生物質は、これまで発見されたカビをはじめとする微生物由来の抗生物質の60%を占めており、放線菌は創薬の研究・開発において極めて重要な微生物資源であると言える。

Hopwood らによって放線菌群での遺伝子操作技術が確立されると（Hopwood *et al.*, 1985a），放線菌は形態分化や二次代謝に関する分子生物学的研究材料として盛んに利用されるようになった。*Streptomyces coelicolor* A3 (2) の生産するアクチノロージン（ACT）やメチレノマイシン，そして *Streptomyces griseus* の生産するストレプトマイシン（SM）などの抗生物質生合成遺伝子群のクローニングが行われ（Malpartida & Hopwood, 1984 ; Chater & Bruton 1985 ; Distler & Piepersberg 1985 ; Ohnuki *et al.*, 1985），生合成遺伝子群は自身の生産する抗生物質に対して耐性となるための自己耐性遺伝子や生合成遺伝子群の転写を特異的に調節する役割の経路特異的転写活性化遺伝子などとゲノム上でクラスターを形成していることが明らかにされた。現在，抗生物質生合成に関する研究は，ポリケタイド（PK）系化合物を中心として遺伝子構造や発現制御機構の解明についての基礎研究が行われる一方で，特定の生合成遺伝子を利用して放線菌にハイブリッド抗生物質を作らせたり（Hopwood *et al.*, 1985b ; Omura *et al.*, 1986），さらに様々な PK 系化合物の生合成遺伝子を組合わせて放線菌に新規の PK 骨格化合物を作らせるコンビナトリアル生合成と呼ばれる手法について研究されている（Khosla, 1996）。近年，放線菌の2菌株（ACT生産菌 *S. coelicolor* A3 (2) およびエバーメクチン生産菌 *Streptomyces avermitilis*）のゲノムの塩基配列が続いて決定され（Bentley *et al.*, 2002 ; Ikeda *et al.*, 2003），放線菌の一次・二次代謝および形態分化とその関連の分子生物学的解明が急速に進展しつつある。

放線菌の生産する抗生物質群のなかで PK 系抗生物質とともに大きな割合をしめているアミノグリコシド（AG）系抗生物質においては，SM に関する生合成研究が最も精力的に行われている。*S. griseus* における SM 生産は， $\gamma$ -ブチロラクトン系化合物である A-factor と命名された自己調節因子により誘導されることが古くから知られていたが（Khokhlov *et al.*, 1967），近年，堀之内らによって A-factor から SM 生産に至る発現制御機構の詳細が

明らかにされた (Horinouchi, 2002)。さらに, SM 生合成と並行して, *S. griseus* の形態分化に至る発現制御機構の解明も進められており, A-factor を基点としたカスケード反応による SM 生合成遺伝子群および形態分化関連遺伝子群のグローバルな発現制御機構の全体像が明らかにされつつある (Yamazaki *et al.*, 2000 ; Yamazaki *et al.*, 2003)。SM 以外の AG 系抗生物質に関しては, *Micromonospora olivasterospora* が生産するホーチミシン, *Streptomyces flavopersicus* が生産するスペクチノマイシン, *Bacillus circulans* が生産するブチロシン, そして *Streptomyces bluensis* が生産するブルエンソマイシンの生合成遺伝子研究が行われているが (Dairi *et al.*, 1992a ; Lyutskanova *et al.*, 1997 ; Ota *et al.*, 2000 ; Tamegai *et al.*, 2002 ; Jung *et al.*, 2003), 現在までにこれら AG 系抗生物質の詳細な生合成関連遺伝子の発現制御機構の解明は報告されていない。

AG 系抗生物質に分類されるカスガマイシン (KSM) は, 稲いもち病菌 *Pyricularia oryzae* (現在では *Magnaporthe grisea* の学名が使用されている) に対して強い抗菌力を示す抗生物質として 1965 年に梅沢らによって *Streptomyces kasugaensis* M338-M1 株の培養液から発見され (Umezawa *et al.*, 1965), 現在でも農業として国内で広く使用されている。KSM は図 1.1.1 に示すようにアミノ糖のカスガミンと D-chiro-イノシトールがグリコシド結合して, カスガミン部分の C-4'位にカルボキシホルミドイル側鎖を有する化学構造である。

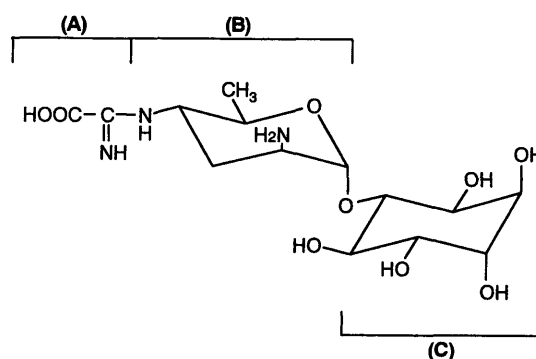


図 1.1.1 カスガマイシンの化学構造  
(A) カルボキシホルミドイル基 (B) カスガミン  
(C) D-chiro-イノシトール

KSM の生物学的研究は竹内らにより, また作用機序研究は田中らにより行われた (Takeuchi *et al.*, 1965 ; Tanaka *et al.*, 1965)。その結果, KSM は動物に対する毒性が極めて低いこと, グラム陰性菌のタンパク質生合成においてリボソームの 30S サブユニットと fMet-tRNA との複合体形成を阻害してタンパク質生合成の開始を阻害すること, 同じ AG 系抗生物質に属する SM によるタンパク質生合成阻害で見られるミスコーディング作用は示さないことなどが判明した。一方, KSM の生合成については深川らにより, カルボキシホルミドイル基がグリシン, カスガミンが UDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc), そして D-chiro-イノシトールが myo-イノシトールをそれぞれ前駆体としていることが明らかにされた (Fukagawa *et al.*, 1968a, b, c, d, e)。しかし, その後, KSM 生合成の酵素学的研究は行われず, また分子遺伝学的研究については, 約 25 年を経た 1993 年に平沢らによって, KSM 生産菌株 *S. kasugaensis* MB273-C4 株より C-2'位のアミノ基を特異的にアセチル

化して KSM を不活性化する KSM アセチル化酵素遺伝子 (*kac*<sup>273</sup>) のクローニングが行われたのみであった (JP. A-05-23187)。

著者は、農薬として今もなお重要な位置を占めているにも拘わらず、生合成の一部分の解明に留まっていた KSM 生合成に着目し、既に確立していた放線菌での遺伝子操作技術とそれまでに蓄積されていた情報を駆使すれば KSM 生合成の分子遺伝学的な総括的解明が可能であろうと考えて本研究に着手した。研究の具体的な端緒としては、KSM を生産する *S. kasugaensis* の MB273-C4 株よりクローン化された *kac*<sup>273</sup>、および M338-M1 株より著者がクローン化した *kac*<sup>338</sup> の各遺伝子産物が KSM を特異的に不活性化することから、*kac*<sup>273</sup> および *kac*<sup>338</sup> (以後、両遺伝子を含む KSM アセチル化酵素遺伝子を“*kac*”と総称する) はそれぞれの菌株における KSM に対する自己耐性遺伝子であり他の抗生物質生合成遺伝子群の場合と同様にゲノム上で KSM 生合成関連遺伝子群とクラスターを形成しているのではないかと考えたことである。すなわち、いずれかの *kac* をプローブとしたクローニング手法を用いれば KSM 生合成遺伝子群が得られる可能性が考えられた。本論文では、本章に続く第 1 編、第 2 章から第 6 章において上述の仮定をもとに行った KSM 生合成の分子遺伝学的研究について論じ、第 7 章では本研究の成果の総括と今後の展望について論じる。

## 第2章 カスガマイシンアセチル化酵素遺伝子 (*kac*)

1993 年, KSM 生産菌株である *S. kasugaensis* MB273-C4 株より, KSM 特異性を示すアセチル化酵素をコードする遺伝子 (*kac*<sup>273</sup>) がクローニングされた (JP. A-05-23187)。*kac*<sup>273</sup> 遺伝子産物の基質特異性の高さから, 著者はこの遺伝子が KSM 生産菌における自己耐性遺伝子であろうと考えた。また著者は, *kac*<sup>273</sup> が KSM に対する自己耐性遺伝子であるならば, *kac*<sup>273</sup> 相同遺伝子が KSM 生産菌株間に広く保持されているはずであり, KSM 生産放線菌において KSM アセチル化酵素遺伝子 (*kac*) 周辺領域の解析を行えば KSM 生合成関連遺伝子群をクローニングできるのであると考えた。

本章において著者は, KSM 生産が認められた由来の異なる 4 放線菌株 (*S. kasugaensis* M338-M1, *S. kasugaensis* MB273-C4, *S. celluloflavs* JCM4126, *S. albulus* MF861-C4) のすべてに *kac*<sup>273</sup> 相同 DNA 領域が保持されていたことを述べる。また著者は, 長期保存によって KSM 生産性が消失した *S. albulus* MF861-C4 株由来の 2 株の自然突然変異株では, そのゲノムから *kac*<sup>273</sup> 相同 DNA 領域が欠失していることを明らかにした (Ikeno *et al.*, 1996)。

さらに, KSM 生産菌として 4 菌株のなかで最も初期に分離された *S. kasugaensis* M338-M1 株より *kac*<sup>273</sup> をプローブとして *kac*<sup>273</sup> 相同遺伝子 (以後, *kac*<sup>338</sup> と称する) をクローニングした。*kac*<sup>273</sup> 推定産物とのアミノ酸構成の比較を行い, さらに, *kac*<sup>338</sup> を大腸菌 JM109 株に発現させると形質転換株は *kac*<sup>273</sup> の場合と同様に KSM に対して高度耐性 (> 800 µg/mL) になることから, *kac*<sup>338</sup> は M338-M1 株における KSM アセチル化酵素遺伝子であることを確認した (Ikeno *et al.*, 1998)。

このように KSM 生産放線菌の *kac*<sup>273</sup> 相同 DNA 領域には *kac* が含まれることが証明され, さらに MF861-C4 株の自然突然変異株での *kac*<sup>273</sup> 相同 DNA 領域の消失と KSM 非生産が強く相関することから, 著者は *kac* 周辺領域に KSM 生合成関連遺伝子群が存在している可能性が極めて高いと考えた。以上の結果についての詳細について論じる。

## 第1節 カスガマイシンを生産する放線菌における *kac* の保持

著者は、KSM 生産が確認されている *S. kasugaensis* M338-M1 および MB273-C4 の2菌株（以下、M338-M1 株および MB273-C4 株と省略する）と、形態学的および遺伝学的に *S. kasugaensis* とは異種と考えられる *S. celluloflavus* JCM4126 および *S. albulus* MF861-C4 の合計4菌株を KSM 生産放線菌として選択し、さらに形態学的には *S. kasugaensis* と類似しているものの KSM を生産しない *Streptomyces xantholiticus* を対照菌株として本実験に使用した（表 2.1.1）。

著者はこれら菌株に対し、KSM アセチル化酵素遺伝子 *kac* の相同 DNA 領域が保持されているか否かを明らかにする目的で、各菌株よりゲノム DNA を調製して *kac*<sup>273</sup> をプローブとしてサザンブロット解析を行った。各菌株は YGG 培地を用いて、27 °C で 72 時間振とう培養した。各菌株のゲノム DNA は、第2編、第2章、第3節の方法に従って調製した。ゲノム DNA は制限酵素 *Pst*I により完全消化し、キャピラリー法によりナイロンメンブランに転写した。プローブには、*kac*<sup>273</sup> を含む 734 bp の *Bam*HI DNA 断片を用いた。

図 2.1.1 に示す様に、上述の4菌株すべてに *kac*<sup>273</sup> と強くハイブリダイズする DNA 領域が認められ、同種、異種に拘わらずこれらの KSM 生産菌株では *kac* 相同 DNA 領域が保持されていることが判明した。一方、KSM を生産しない対照菌株 *S. xantholiticus* では *kac*<sup>273</sup> 相同 DNA 領域は確認されなかった。

## 第2節 放線菌 *Streptomyces albulus* MF861-C4 株におけるカスガマイシン生産性の消失と *kac* 欠失との関連

*S. albulus* MF861-C4 株（以後、MF861-C4 株と省略する）は、表 2.1.1 のゲノム相同性からも *S. kasugaensis* とは形態学的および遺伝学的に異なった異種菌株と考えられる（Kinoshita *et al.*, 1997）。MF861-C4 株は土壌より単離されて以来、以下の異なった保存方法により 15 年間保存されていた。

- (a) スキムミルクに懸濁した後、凍結乾燥して 10 °C で保存
- (b) 20%スクロースに懸濁し-20 °C で保存
- (c) MY 培地のスラントにて-20 °C で保存

MF861-C4 株を (a) ~ (c) の保存処理した各保存菌（以後、MF861-C4 (a) , (b) , (c) と呼ぶ）体のゲノム相同性には顕著な相違は認められないが、KSM の生産性は異なっていた（表 2.2.1）。すなわち、MF861-C4 (a) 株においては、KSM 生産性は見られなかった。そこで著者は、これら保存菌株における *kac*<sup>273</sup> 相同 DNA 領域の有無を確認した。

表 2.1.1.1 本研究で使したカスガマイシン生産および非生産放線菌株の特徴

	Phenotype		DNA		単離された年・場所 および参考文献
	General <sup>1)</sup>	KSM	Genome <sup>2)</sup>	rDNA <sup>3)</sup>	
<i>Streptomyces kasugaensis</i> M338-M1	基準	生産	基準 (100)	基準 (0)	1963年 春日大社 (奈良) Umezawa <i>et al.</i> , 1963
<i>Streptomyces kasugaensis</i> MB273-C4	同じ	生産	> 80	0	1967年 吉野 (奈良)
<i>Streptomyces cellulosus</i> JCM4126	異なる	生産	> 80	0	1953年 Nishimura <i>et al.</i> , 1953
<i>Streptomyces albus</i> MF861-C4	異なる	生産	< 20	13	1977年 山梨 保存条件により <i>kac</i> 相同領域が欠失 Kinoshita <i>et al.</i> , 1997
<i>Streptomyces xantholiticus</i> ISP5244	類似	非生産	< 20	10	表現形質に基づいた <i>S. kasugaensis</i> の対照菌株

- 1) Morphology, physiology, and chemotaxonomy.  
2) Southern hybridization (photobiotin), Similarity (%).  
3) Base substitution in 16S rRNA.

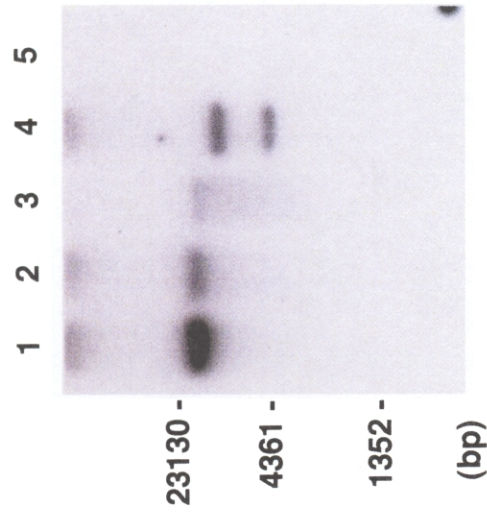


図 2.1.1 カスガマイシン生産株における*kac*相同DNA領域の検出  
各ゲノムDNAは*Pst*Iで消化した。サザンブロット解析は*kac*<sup>273</sup>を含むDNA断片をプローブとして行った。  
泳動されているゲノムDNAは：レーン1, *S. kasugaensis* MB273-C4; レーン2, *S. kasugaensis* M338-M1;  
レーン3, *S. celluloflavus* JCM4126; レーン4, *S. albulus* MF861-C4; レーン5, *S. xantholiticus* ISP5244で  
ある。*S. xantholiticus* ISP5244株はカスガマイシン非生産株。図左側の数字は分子重量マーカの長さを示  
している。

表 2.2.1 *S. kasugaensis* M338-M1と*S. albulus* MF861-C4 (a), (b), (c)株間とのゲノム相同性

Plate-bound DNA	% Hybridization with photobiotin-labeled DNA			KSM productivity
	M338-M1	MF861-C4		
		(a)	(b)	
M338-M1	100			++
MF861-C4	(a)	23	100	-
	(b)	21	100	+
	(c)	18	94	++
			92	100

(a) Suspension of aerial mycelia in skim milk, lyophilized; (b) suspension of aerial mycelia in 20% sucrose, frozen;  
(c) MY slant, frozen.



本章、第1節で述べたと同様に、各菌株は YGG 培地を用いて、27 °Cで 72 時間振とう培養した。各菌株のゲノム DNA は、第2編、第2章、第3節の方法に従って調製した。ゲノム DNA は制限酵素 *Pst*I により完全消化し、キャピラリー法によりナイロンメンブランに転写した。プローブには、*kac*<sup>273</sup> を含む 734 bp の *Bam*HI DNA 断片を用いた。その結果、図 2.2.1 に示すように KSM 生産性が消失した MF861-C4 (a) 株では、*kac*<sup>273</sup> 相同 DNA 領域の欠失が観察された。

次に、*kac*<sup>273</sup> 相同 DNA 領域中には *kac* が含まれるか否かを検討するために、M338-M1 株の *kac*<sup>273</sup> 相同 DNA 領域のクローニングを行うことにした。

### 第3節 放線菌 *Streptomyces kasugaensis* M338-M1 株からの *kac*<sup>338</sup> のクローニング

#### 2.3.1 サザンブロット解析

M338-M1 株のゲノム DNA を、制限酵素 *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sma*I, *Sph*I でそれぞれ完全消化し、*kac*<sup>273</sup> を含む DNA 断片をプローブとしてサザンブロット解析を行った。図 2.3.1 に示すように、プローブは約 4.4 kb *Eco*RI 消化断片、3.7 kb *Kpn*I 消化断片、17 kb *Pst*I 消化断片、2.0 kb *Sac*I 消化断片、1.5 kb *Sma*I 消化断片及び 9.7 kb *Sph*I 消化断片とハイブリダイズした。なお、本実験では *Bam*HI 消化断片へのプローブの結合は認められなかった。そこで著者は、M338-M1 株のゲノム DNA より 3.7 kb *Kpn*I 消化断片のクローニングを試みた。

#### 2.3.2 ショットガンクローニング

M338-M1 株のゲノム DNA を *Kpn*I で消化し、アガロースゲル電気泳動により分画後、3.7 kb 領域を含む DNA 断片を回収した。回収断片を pUC118 の *Kpn*I 部位に組込み大腸菌 DH5α を用いて遺伝子ライブラリーを構築した。コロニーハイブリダイゼーションにより、約 2,000 個のコロニーから 2 個のポジティブコロニーを得た。得られた 2 個の組換えプラスミドは、いずれも制限酵素地図が同一の 3.7 kb *Kpn*I DNA 断片を有していた。著者は、この組換えプラスミドを pSKE 1 と命名した (図 2.3.2)。

#### 2.3.3 塩基配列の決定、*kac*<sup>338</sup> と *kac*<sup>273</sup> との遺伝子構造および推定タンパク質の比較

得られた *Kpn*I DNA 断片の塩基配列を決定した結果、3,733 bp で、*kac*<sup>273</sup> 配列と高い相同性を示すコード領域が見出されたことから、本領域を *kac*<sup>338</sup> と命名した。

*kac*<sup>273</sup> と *kac*<sup>338</sup> を比較した結果 (図 2.3.3) , *kac*<sup>338</sup> の塩基配列には構造遺伝子内部に 4 ケ

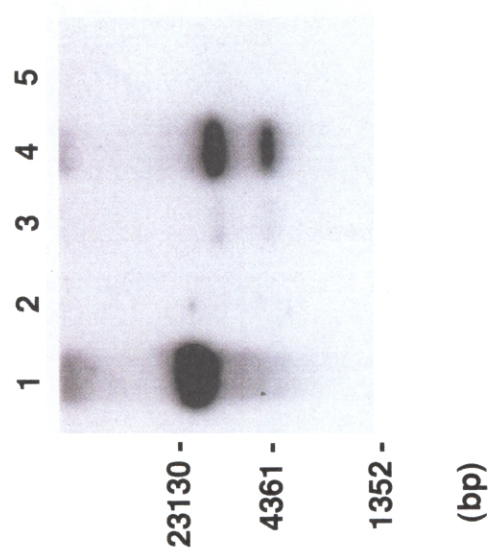


図 2.2.1 *S. albulus* MF861-C4 株における *kac* 相同 DNA 領域の欠失  
各ゲノム DNA は、*Pst*I で消化した。サザンプロット解析は、*kac*<sup>273</sup> を含む DNA 断片をプローブとして行った。  
泳動されているゲノム DNA は：レーン 1, *S. kasugaensis* MB273-C4; レーン 2, *S. albulus* MF861-C4 (a);  
レーン 3, *S. albulus* MF861-C4 (b); レーン 4, *S. albulus* MF861-C4 (c); レーン 5, *S. xantholiticus* ISP5244。  
MF861-C4 (a) (b) (c) 株は、以下の方法により 15 年間保存されていた。(a) 気菌糸をスキムミルックに懸濁  
して凍結乾燥した後、10℃で保存 (b) 気菌糸を 20% のスクロース溶液に懸濁し -20℃で保存 (c) 斜面  
培地 (MY) に培養した菌体を -20℃で保存

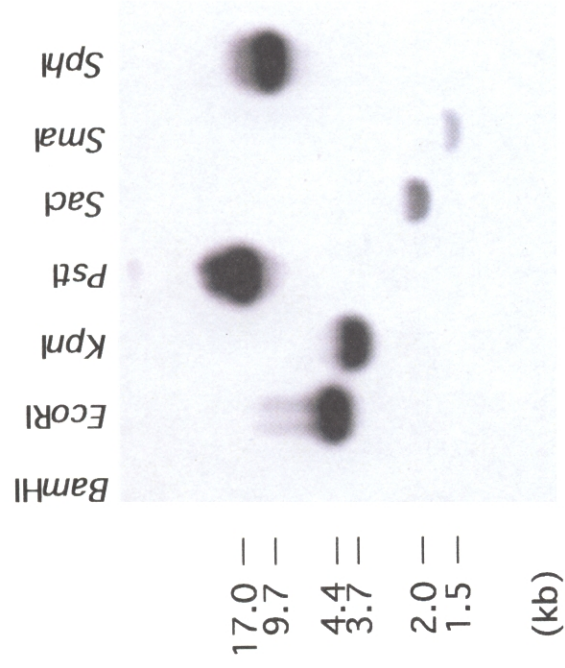


図 2.3.1 *S. kasugaensis* M338-M1株ゲノムDNAのサザンブロット解析  
ゲノムDNAは、各レーン上部に示した制限酵素により消化した。サザンブロット解析のプロープとしては $ka\zeta^{273}$ を含むDNA断片を使用した。図左側には分子量マーカーの長さを示した。

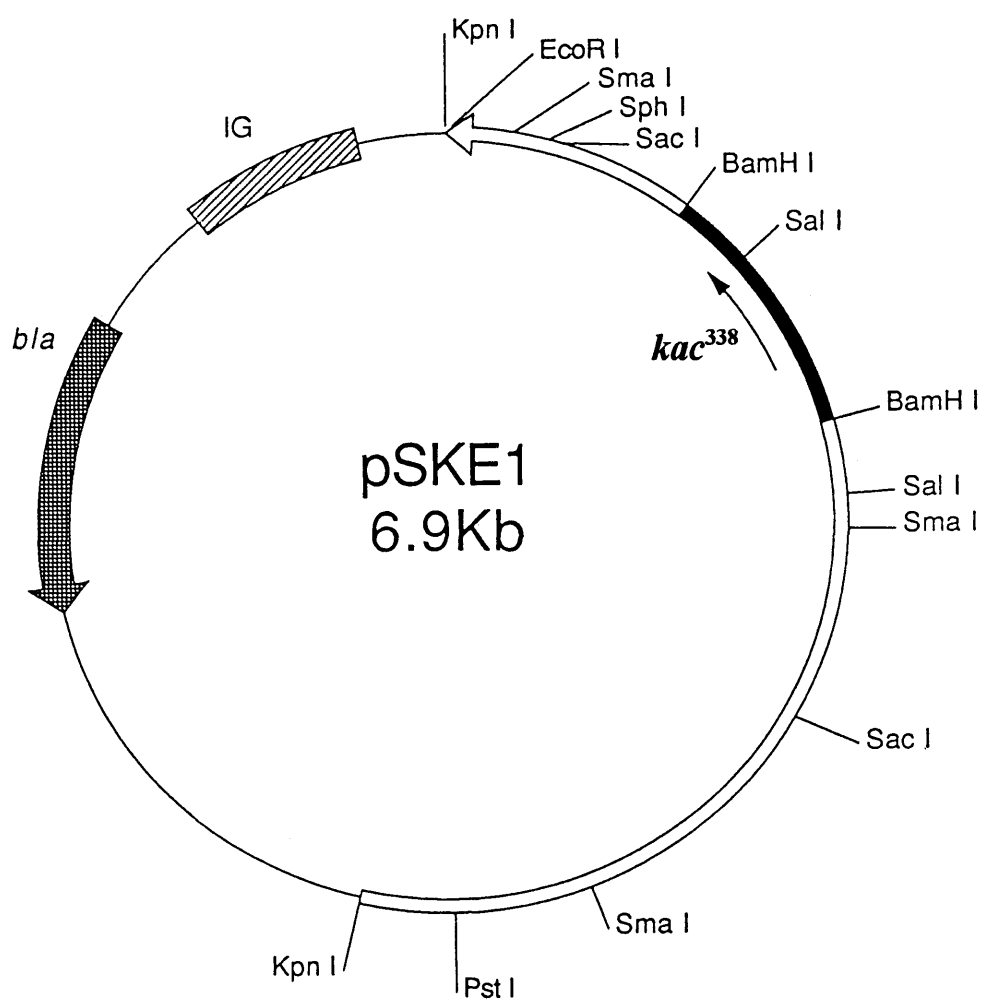


図 2.3.2 組換えプラスミド pSKE 1 の制限酵素地図

IG : M13 ファージのインタージェニックリージョン

*bla* :  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子

BamHI

1) GGATCCGGGCGAGCGACCTCTACCGCAGCGACCCCGACACCCGCTTGGCGACACACCTGGCCGGCCGCTCCGGTACGGCGGCATCGCGGCATCGAGATTCTCAGGC -70  
2) GGATCCGGGCGAGTGACCTTACCGCAGCGACCCCGACACCCGCTTGGCGACACACCTGGCCGGCCACGCCGCTACGGCGGCATCGCGGCATCGAGATTCTCAGGC -70

1  
GCCGGACGTTCCGGCCGCGCAGACGGCCAACTCCCAGCAGGCGGCGCTACTCACTCGAAATCCGGTCAGTGCCGCGCTGGGCCGGGACATACGATGGCGGCGTGAC 38  
RBS M P R W A G T Y D G G V T 13  
M P R W A G T Y D G G V T 13  
GCCGGACGTTCCGGCCGCGGACGGGTCAACTCCCCGCGAGGCGGCGCTACTCACTCGGAAACCCGGTCAGTGCCGCGCTGGGCCGGGACATACGATGGCGGCGTGAC 38

GATCACGTACGAATGGCGGGGTGGCTTCGACAAACGCCGCTCTCAACGCACTGCACGCCGAGGTTTCGGTCCCCCGTTCGCGCAGACCGGACTGGCGAAACGCGGCTTG 145  
I T Y E W R G G F D N A A L N A L H A D G F G P V A Q T D W R T R L E 49  
I T Y E W R G G F D N A A L N A L H A D G F G P P I A Q T D W R T R L E 49  
GATCACGTACGAATGGCGGGGTGGCTTCGACAAACGCCGCTCTCAACGCACTGCACGCCGAGGTTTCGGTCCCCCAATCGCGCAGACCGGACTGGCGAAACGCGGCTTG 145

AGCGCCACAGCCTCGGCTGGGTCTGTGCGTGGGAGGACGGCGGTCTGATCGGATTTGTCAACGTCGTCTGGGACGGCGGAGCCCATGCCCTTCATCTCGACACGGTC 252  
R H S L G W V C A W E D G G L I G F V N V V W D G G A H A F I L D T V 84  
R H S L G W V C A W E D G - L I G F V N V V W D G G A H A F I L D T V 83  
AGCGCCACAGCCTCGGCTGGGTCTGTGCGTGGGAGGACGG--TCTGATCGGATTTGTCAACGTCGTCTGGGACGGCGGAGCCCATGCCCTTCATCTCGACACGGTC 249

GTCGCCCGCACTGCCGGTCGAGAGGAGTCGGCGCGCGCTCGTCGCCAAGGGCGCCGACGAAGCCCGTCCCGCGAACTGCGAGTGGCTGCACGTCGACTTCGAGGA 359  
V A R H C R S R G V G A A L V A K A A D E A R A A N C E W L H V D F E E 120  
V A R H C R S R G V G A A L V A K A A D E A R A A N C E W L H V D F E E 119  
GTCGCCCGCACTGCCGGTCGAGAGGAGTCGGCGCGCGCTCGTCGCCAAGGGCGCCGACGAAGCCCGTCCCGCGAACTGCGAGTGGTTGCACGTCGACTTCGAGGA 356

GCACCTGCGCGCGTCTACTTCGATGCCTGCGGGCTTCAAGGAGACGACGGCGGGCTGATCGCCCTGTAAACGAGGATGCCCCAAGCCCTCGGCTGTGCGCTACGACCG 466  
H L R A F Y F D A C G F K E T T A G L I A L \* 142  
H L R A F Y F D A C G F K E T T A G L I A L \* 141  
GCACCTGCGCGCGTCTATTTCGATGCCTGCGGGCTTCAAGGAGACGACGGCGGGCTGATCGCCCTGTAAACGAGGGGCCCCAAGCCCTCGGCCCCCTTGCCTACGACCG 463

GGGGAAGGCACGCCGACCCAGGATTGACGGGGCGTCTGAGGCACTGCTTGATCACGGAGCGTTCCCTCAGAACTGATGGGGATCC 558  
GGGGAAGGCACGCCGACCCAGGATTGACGGGGCGATCGTGAGGCCCTGCTGAGGCCCTGCTTGATCACACGAGCGTTCCCTCAGAACTGATGGGGAICCC 555  
BamHI

### 図 2.3.3 MB273-C4株およびM338-M1株由来の*kac*構造遺伝子と*Kac*タンパク質の比較

1) はMB273-C4株由来の*kac*<sup>273</sup>, 2) はM338-M1株由来の*kac*<sup>338</sup>の塩基配列を示している。*Kac*タンパク質のアミノ酸配列は一字表記で示した。構造遺伝子内部の塩基置換箇所は傍点(・), 塩基が欠失した箇所はハイフン(-)で示した。

所の塩基置換 (G114A, G115A, C340T, C378T) と連続した 3 塩基の欠失 (C<sup>186</sup>, G<sup>187</sup>, G<sup>188</sup>) が認められ, さらに Kac<sup>338</sup> では, Kac<sup>273</sup> の 39 番目の Val が Ile に置換し, さらに Kac<sup>273</sup> の 63 番目の Gly の欠失が確認できた。

#### 第 4 節 大腸菌 JM109 株における *kac* の発現とカスガマイシンへの高度耐性化

##### 2.4.1 *kac* 発現プラスミドの構築

著者は, クローニングによって得た *kac*<sup>338</sup> が KSM アセチル化酵素遺伝子であるかを確認するために, 大腸菌 JM109 株を用いて発現を試みた。まず, *kac*<sup>338</sup> および *kac*<sup>273</sup> の構造遺伝子領域を PCR により増幅した。PCR 反応は, 第 2 編, 第 2 章, 第 4 節に記載した反応条件 1) により行った。また, *kac*<sup>273</sup> と *kac*<sup>338</sup> の 5'末端領域および 3'末端領域の塩基配列が同一であったことから, 両構造遺伝子の増幅には同一のプライマーセットを使用した (表 2.4.1)。得られた約 440 bp の増幅断片を, プライマー内に設計した制限酵素認識部位 (*Nco*I, *Bam*HI) を利用して発現用ベクター pTV118N に挿入した。pTV118N における *lacZ'* の発現は, *lac* プロモーターによって制御されているので, *lacZ'* の開始コドン領域に設けられた *Nco*I 認識部位 (5'-CCATGG-3') を利用して, *lac* プロモーターにより目的遺伝子を大腸菌中で発現させることが可能である。著者は, *kac*<sup>338</sup> および *kac*<sup>273</sup> を有する組換えプラスミドを pTV-338*kac*, pTV-273*kac* と命名した。

表 2.4.1 *kac* 構造遺伝子の増幅に使用した合成プライマー

プライマー	配 列
5'-KAC primer	5'-GGCCATGGCGCGCTGGGCGGGACA-3'
3'-KAC primer	5'-GGGGATCCTCGTTACAGGGCGATCA-3'

##### 2.4.2 形質転換株のカスガマイシン高度耐性化

大腸菌 JM109 株を pTV-338*kac* および pTV-273*kac* により形質転換した。得られた形質転換株を, アンピシリン (100 µg/mL) と KSM が添加されている YT 寒天培地上に塗布して 37 °C にて一晚培養した。その結果, 図 2.4.1 に示すように *kac*<sup>338</sup> 発現株は *kac*<sup>273</sup> 発現株と同様に, 800 µg/mL KSM の存在下でも生育し, *kac*<sup>338</sup> の発現によって KSM に高度耐性化となったことが判明した。すなわち, *kac*<sup>338</sup> は *kac*<sup>273</sup> と同様に KSM アセチル化酵素遺伝子であることが確認できた。

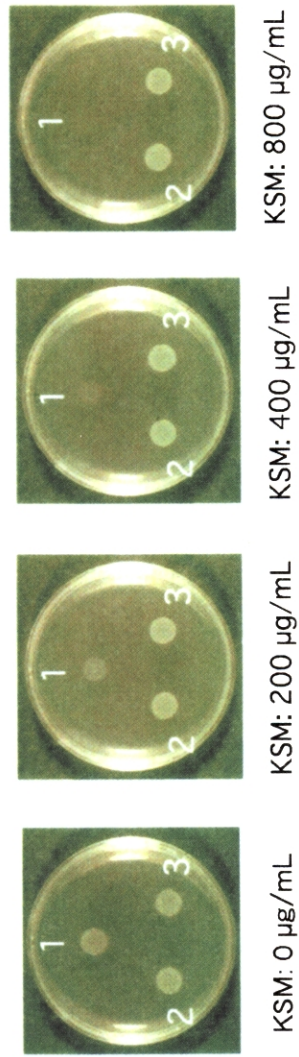


図 2.4.1 *kac*発現による大腸菌JM109株のカスガマイシン高度耐性化  
各YT寒天培地には100 µg/mLアンピシリンが添加されている。また、各プレートに添加した  
KSMの濃度は写真下部に示した。1はpTV118Nにより形質転換された株，2はpTV-273*kac*  
により形質転換された株，そして3はpTV-338*kac*により形質転換された株を示している。

## 第5節 考察と小括

著者は,*S. kasugaensis* MB273-C4株においてKSMのC-2'アミノ基をアセチル化してKSMを不活化するKSMアセチル化酵素遺伝子 *kac*<sup>273</sup>との相同DNA領域が,KSMを生産する他の3放線菌株(*S. kasugaensis* M338-M1, *S. celluloflavus* JCM4126 および *S. albulus* MF861-C4)に保持されている可能性を示した。さらにM338-M1株の *kac*<sup>273</sup> 相同DNA領域から *kac*<sup>338</sup>をクローニングして, *kac*<sup>338</sup>の推定タンパク質 Kac<sup>338</sup> (141 アミノ酸)は Kac<sup>273</sup> (142 アミノ酸)に比して2アミノ酸が異なるのみで,さらに両遺伝子とも大腸菌 JM109株をKSMに対して高度耐性化(>800 µg/mL)することを示した。この結果は,JCM4126株およびMF861-C4株においても *kac*<sup>273</sup>との相同DNA領域中に *kac*が含まれている可能性が極めて高いことを示している。MF861-C4株はM338-M1株とのゲノム相同性が18~23%で遺伝学的な分類では明らかに異種菌株に属する(表2.2.1)。このようにMF861-C4株を含むKSM生産株4株においてKSM生合成遺伝子群とKSM自己耐性遺伝子としての *kac* ホモログを共通に保持していることは,ある種の放線菌株間でKSM生合成遺伝子群が *kac*とともに伝播された結果を表しているのかもしれない。さらに,MF861-C4株由来のKSM非生産の自然突然変異株で *kac*<sup>273</sup> 相同DNA領域が欠失していた事実から,著者は,他の抗生物質生産放線菌の抗生物質生合成遺伝子クラスターと同様にKSM生合成関連遺伝子群が *kac*の周辺領域に近接しているのではないかと考えた。そこで,第1編,第3章で述べるようにM338-M1株より *kac*<sup>338</sup>とKSM生合成遺伝子群を含むDNA領域のクローニングを行った。



### 第3章 カスガマイシン生合成関連遺伝子群を含む *kas* クラスター

平沢らは、MB273-C4 株より *kac*<sup>273</sup> とその下流領域を含む 14 kb DNA 断片のクローニングに成功し、その塩基配列を一部決定したが KSM 生合成に関与する遺伝子群は見出していなかった (JP. A-05-23187)。そこで著者は、M338-M1 株より *kac*<sup>338</sup> 周辺領域の取得を目指した。

著者は、*kac*<sup>338</sup> の周辺領域を従来のショットガンクローニング法により取得するとともに、従来法では宿主の生育が阻害されるなど問題の生じた領域については、inverted PCR を利用した PCR クローニング法を用いて取得に成功した。これらにより、全長約 22.4 kb にわたる領域をクローニングしてその塩基配列を決定した (Ikeno *et al.*, 1998 ; Ikeno *et al.*, 2000 ; Ikeno *et al.*, 2002)。その結果、本領域内には *kac*<sup>338</sup> を含む 20 遺伝子を見出し、さらにそれぞれの転写単位について検討したことについて述べる。

#### 第1節 *kac*<sup>338</sup> 周辺領域のクローニングと塩基配列の決定

##### 3.1.1 *kac*<sup>338</sup> 周辺領域のクローニング

第1編、第2章、第3節に論じたように、著者は *kac*<sup>338</sup> を含む DNA 領域のクローニングを行った。この DNA 領域を足がかりとして、*kac*<sup>338</sup> 周辺領域をジーンウォーキングにより順次クローニングした (図 3.1.1, 表 3.1.1)。クローニングは、主に大腸菌 TH2 / pKF 3 システム (TaKaRa 社) を用い、ショットガンクローニング法により行った (図 3.1.1 の pSKE 2, 4, 5, 6)。また、結果として転写調節遺伝子が含まれていた領域については、inverted PCR を利用した PCR クローニング法によってクローニングした (Triglia *et al.*, 1989) (図 3.1.1 の pSKE 7, 8)。PCR クローニング法に使用した合成プライマーを表 3.1.2 に記載した。このようにして得た個々のクローニング領域は全長約 22.4 kb に達した。

##### 3.1.2 塩基配列の決定

得られた各クローンの塩基配列は、Cy5<sup>TM</sup> Autocycle<sup>TM</sup> Sequencing Kit (アマシャムバイオサイエンス社) および ALFred<sup>TM</sup> DNA Sequencer (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて決定した。PCR クローニング法により得られた領域の塩基配列は、PCR 反応時の塩基置換を考慮して、増幅断片を直接鋳型とするダイレクトシーケンス法により決定した。その結果、得られた塩基配列の総塩基数は 22,414 bp であった。また、この領域における (G+C) 含量は 69.6% であった。この領域内の (G+C) 含量の推移を検討したところ、比

較的 (G+C) 含量の低い領域が図 3.1.2 に示すように (A) (nt 870–1230 で 57.6%) , (B) (nt 4782–5052 で 57.2%) および (C) (nt 7996–8125 で 50.0%) の 3 箇所に見出された。

塩基配列は、日本 DNA データバンク (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>) に登録した (AB076838, AB033992, AB120043, AB005901) 。

## 第 2 節 *kas* クラスター内の遺伝子群の検索

### 3.2.1 Open reading frame 検索

放線菌はゲノム DNA 中の (G+C) 含量が 70%前後で、使用するコドンに極端な偏りが生じている。すなわち、構造遺伝子のコドンの 3rd レターにおける (G+C) 含量は、80 ~ 100%と極端に高く保たれる傾向にある。この性質を利用すると open reading frame (ORF) の検索が比較的容易で (Wright & Bibb, 1992) , さらに、インターネット上において本原理による ORF の検索ソフト FramePlot 2.3.2 が公開されている (Ishikawa *et al.*, 1999) 。

著者は FramePlot 2.3.2 を用いて、クローニングされた *kac*<sup>338</sup> 周辺領域に対する ORF 検索を行った。図 3.2.1 の (A) に示すように、フレームプロット解析において山型となった領域が (G+C) 含量が高く、ORF が存在している可能性が高い。これを参考にして、*kac*<sup>338</sup> の上流領域に 18 個、*kac*<sup>338</sup> の下流領域に 1 個の ORF が存在すると決定した。著者は、これら 20 の ORF 群を *kas* 遺伝子群、また、この DNA 領域全体を *kas* クラスターと命名した。

これら 20 遺伝子を含む *kas* クラスターの推定遺伝子群は図 3.2.1 の (B) に示すようであり、その特徴は次のようにまとめることができた。

- 1) *kac*<sup>338</sup> と転写が同一方向と考えられる 15 遺伝子群は、*kasT*, *kasJ*, *kasK*, *kasL*, *kasM*, *kasN*, *kasO*, *kasR*, *kasA*, *kasB*, *kasC*, *kasD*, *kasE*, *kasF*, *kasI* であった。さらに、*kasT* 上流、*kasJ*-*kasK* 間および *kasM*-*kasN* 間に、1,317 bp, 867 bp, 518 bp の非コード領域が存在して、これらの非コード領域内に図 3.1.2 に示した低 (G+C) 含有領域 (A) , (B) , (C) がそれぞれ位置していた。また、*kasA*-*kasB* 間には 388 bp の非コード領域が存在していた。一方、*kasB*, *kasC*, *kasD*, *kasE*, *kasF* では、*kasB*-*kasC* 間は 25 bp, *kasC*-*kasD* 間は 13 bp と極めて接近し、*kasD*-*kasE*-*kasF* 間では構造遺伝子が重複していた。さらに、*kasK*-*kasL*-*kasM* 間および *kasR*-*kasA* 間においても、構造遺伝子が重複していた。
- 2) *kac*<sup>338</sup> と転写が逆方向の 4 遺伝子群は、*kasU*, *kasP*, *kasQ* および *kasG* であり、これら遺伝子の上流域には転写方向が逆向きの *kasJ*, *kasR*, *kac*<sup>338</sup> がそれぞれ存在している。

### 第3節 考察と小活

著者は、クローニングした *kac*<sup>338</sup> 周辺領域の 22,414 bp の DNA 断片に 19 個の *kas* 遺伝子群を見出した。*kac*<sup>338</sup> を基準にすると、15 遺伝子が *kac*<sup>338</sup> と転写方向が同一で、4 遺伝子が逆向きとなっていた。これら *kas* 遺伝子群の転写方向と、遺伝子上流の非コード領域の存在などから、*kas* クラスターでは、*kasT*, *kasU*, *kasJ*, *kasKLM*, *kasNO*, *kasPQ*, *kasRA*, *kasBCDEF*, *kasG*, *kac*<sup>338</sup>, *kasI* の 11 の単位で転写されているのではないかと推定した。これらの各遺伝子（群）の転写解析（転写単位、転写開始点、プロモーター配列）の結果については、第1編、第4章、第5章および第6章において論ずる。

表 3.1.1.1 *kac*<sup>338</sup> 周辺領域のクローニング

組換えプラスミド	クローニング方法	プローブ	クローニング断片
pSKE 2	ショットガンクローニング	271bp <i>KpnI</i> - <i>PstI</i> (from pSKE1)	4119bp <i>PstI</i> - <i>PstI</i>
pSKE 4		850bp <i>PstI</i> - <i>KpnI</i> (from pSKE2)	8423bp <i>KpnI</i> - <i>KpnI</i>
pSKE 5		594bp <i>KpnI</i> - <i>SphI</i> (from pSKE4)	5462bp <i>SacI</i> - <i>SacI</i>
pSKE 6		345bp <i>SacI</i> - <i>EcoRI</i> (from pSKE5)	1380bp <i>EcoRI</i> - <i>EcoRI</i>
pSKE 7	PCRクローニング		1210bp <i>SacI</i> - <i>EcoRI</i>
pSKE 8			1516bp <i>PstI</i> - <i>SacI</i>

表 3.1.2 PCRクローニングに使用した合成プライマー

組換えプラスミド	プライマー	配 列
pSKE 7	5'-pKS26b	5'-CGGCTCACACAGGCCCGCACCGAAA-3'
	3'-pKS26a	5'-GCACAGTTCAGCCTCATTTCTTGT-3'
pSKE 8	5'-SKE72	5'-CCAAGATCGCACATGCGGCAGGGGT-3'
	3'-SKE73	5'-TCCGCTCCGTCGAAGAACCGCACCT-3'

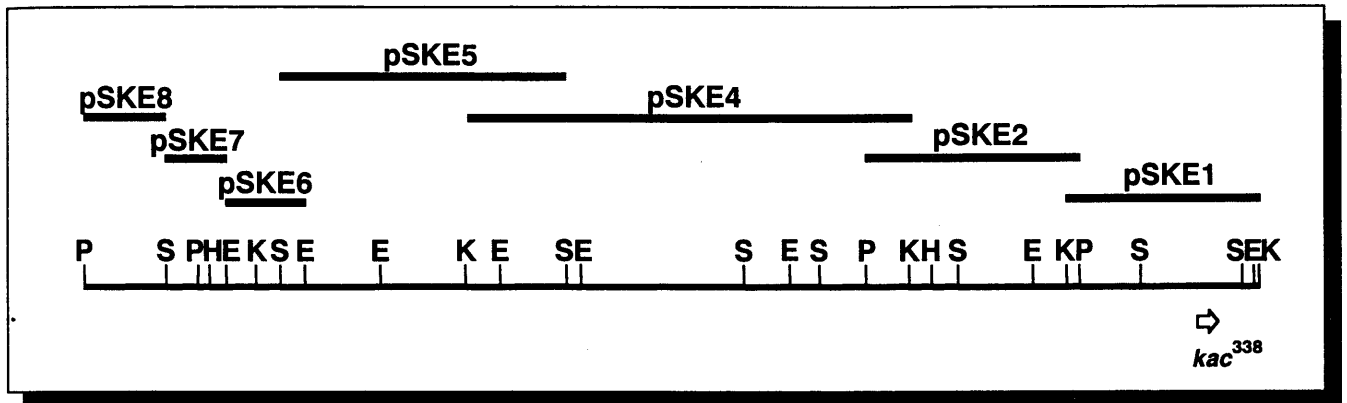


図 3.1.1 クローニングにより得られたDNA領域

Eは制限酵素EcoRI, HはHindIII, KはKpnI, PはPstI, そしてSはSacIを示している。

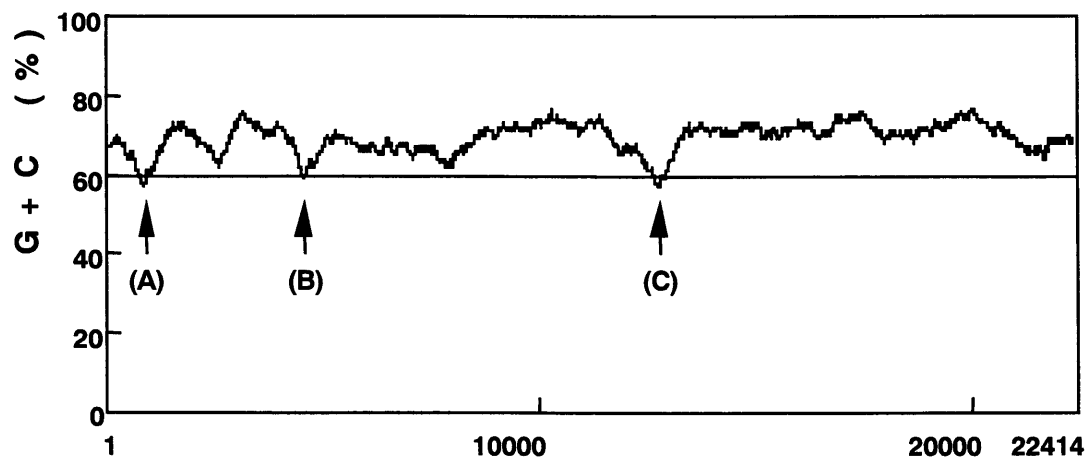


図 3.1.2 *kac*<sup>338</sup>周辺クローニング領域の(G+C)含量の推移

(A) nt 870-1230, 57.6%. (B) nt 4782-5052, 57.2%. (C) nt 7996-8125, 50.0%.



## 第4章 *kas* クラスター内のカスガマイシン生合成に関わる *kas* 遺伝子群

KSM は、カスガミン、カルボキシホルミドイル基および D-*chiro*-イノシトールから構成されている (図 1.1.1)。深川らは、KSM への標識化合物の取込み実験を行い、その生合成経路を検討した結果、カスガミン部分が UDP-*N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) (Fukagawa *et al.*, 1968a, d), カルボキシホルミドイル基がグリシン (Fukagawa *et al.*, 1968b, e), そして D-*chiro*-イノシトール部分が *myo*-イノシトールを (Fukagawa *et al.*, 1968c), それぞれ直接の前駆体としていることを明らかにしている。これらの知見に加えて、著者はカスガミンが 2,4-ジアミノ-2,3,4,6-テトラデオキシ-D-アラビノヘキソピラノースであることから、lipopolysaccharide (LPS) の構成因子であるデオキシ糖の生合成過程などを参考にして (Schnaitman & Klena, 1993; Trefzer *et al.*, 1999), 図 4.1.1 の I~X で示す KSM の生合成経路を推定した。

一方、著者は *kas* クラスター内に見出された *kas* 遺伝子群 (*kac*<sup>338</sup> 以外の 19 遺伝子) について、それらがコードしている推定タンパク質の構成アミノ酸の相同性検索 (日本 DNA データバンクの FASTA および BLAST 検索サーバを利用) を行い、このうち 12 遺伝子産物について既知タンパク質との相同性を得た (表 4.1.1)。

このようにして著者は *kas* 遺伝子群がコードする推定タンパク質のモチーフ情報や類似タンパク質の酵素学的性質などから、*kas* 遺伝子群のいずれが KSM の生合成過程に関与するかについて考えた。その結果、*kas* クラスターには、図 4.1.1 の I~IX に示した KSM 生合成過程をほぼ全て満足させる遺伝子群と、さらに KSM 排出過程 X に関与する遺伝子が含まれていたことが判明した。本章ではこれらの詳細について述べる。

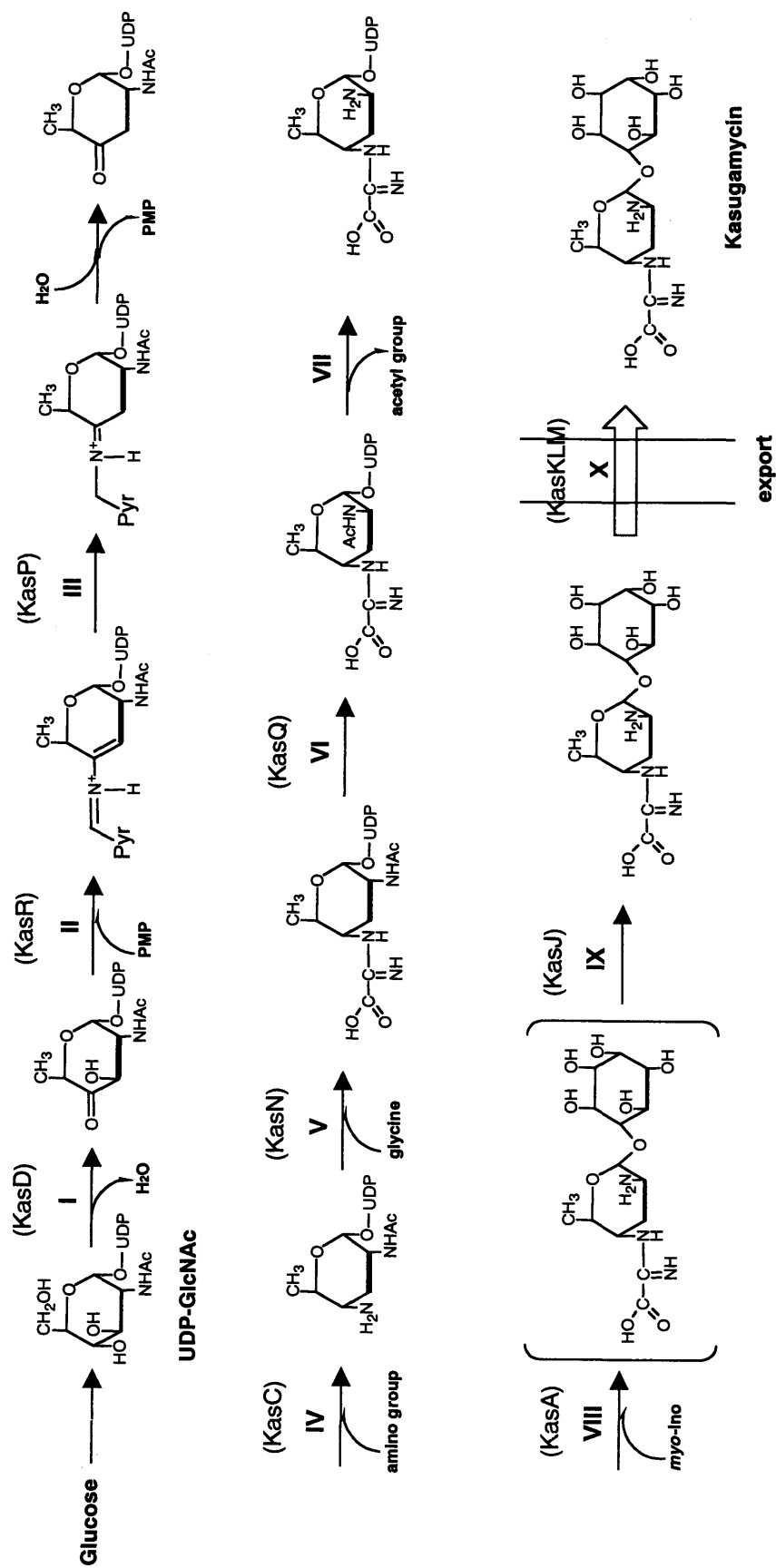


図 4.1.1 推定されるカスガマイシン合成経路と関与する推定遺伝子産物



表4.1.1 *kas*遺伝子群がコードするタンパク質の推定機能

Gene	Size (no. of amino acids)	Homology to <sup>a)</sup> :	Proposed function <sup>b)</sup>	% Identity of product	Origin	Reference (Accession no.)
<i>kasT</i>	346	StrR (Regulatory protein)	Regulator	50	<i>Streptomyces griseus</i>	Distler <i>et al.</i> , 1987
<i>kasU</i>	103		Unknown			
<i>kasJ</i>	445	StsB (NADH:N-amidino-scyllorinosamine oxidoreductase)	IX	36	<i>Streptomyces griseus</i>	Ahlert <i>et al.</i> , 1997
<i>kasK</i>	329	DrrA (ABC transporter)	X	39	<i>Streptomyces peucetius</i>	Guilfoile & Hutchinson, 1991
<i>kasL</i>	258	NodJ (ABC transporter)	X	33	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	(S08617)
<i>kasM</i>	240	NodJ (ABC transporter)	X	30	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	(S08617)
<i>kasN</i>	383	D-amino acid oxidase	V	35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Stover <i>et al.</i> , 2000
<i>kasO</i>	149		Unknown			
<i>kasP</i>	281	Mmcl (F420-dependent H4MPT reductase)	III	33	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Mao <i>et al.</i> , 1999
<i>kasQ</i>	413	UDP-GlcNAc 2-epimerase	VI	45	<i>Streptomyces verticillus</i>	(AF245690-2)
<i>kasR</i>	399	LanQ (NDP-hexose 3,4-dehydratase)	II	38	<i>Streptomyces cyanogenus</i>	Westrich <i>et al.</i> , 1999
<i>kasA</i>	391	Glycosyl transferase	VIII	36	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(AE007070-12)
<i>kasB</i>	253		Unknown			
<i>kasC</i>	436	$\beta$ -alanine:pyruvate transaminase	IV	32	<i>Pseudomonas putida</i>	Yonaha, 1992
<i>kasD</i>	329	StrE (dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase)	I	37	<i>Streptomyces griseus</i>	Pissowatzki <i>et al.</i> , 1991
<i>kasE</i>	265		Unknown			
<i>kasF</i>	238		Unknown			
<i>kasG</i>	122		Unknown			
<i>kac</i> <sup>338</sup>	141	Kac <sup>273</sup> (KSM acetyltransferase)	Resistance	98	<i>Streptomyces kasugaensis</i> MB273-C4	
<i>kasI</i>	78		Unknown			

a) ABCはATP-binding cassette, H4MPTはN5 N10-methylenetetrahydromethanopterin, そしてGlcNAcはN-acetylglucosamineを示している。

b) ローマ数字は、図4.1.1の生合成経路番号に相当する。

## 第1節 カスガミン生合成遺伝子群 (*kasPQRACD*)

### 4.1.1 各遺伝子の構造と推定遺伝子産物

#### 4.1.1.1 *kasP* の遺伝子構造と推定 KasP タンパク質

*kasP* は *kas* クラスターのちょうど中央に位置し、*kasO* の 442 bp 下流の転写方向が逆向きの遺伝子である (図 3.2.1)。*kasP* の 6 bp 上流には、推定の RBS 配列 (AGG) が確認されたが、*kasP* の上流領域には典型的なプロモーター配列は確認されなかった。*kasP* の 90~130 bp 下流域には転写終結シグナルと思われる逆向き繰返し配列が確認された。

*kasP* は、281 個のアミノ酸からなるタンパク質 (KasP: 分子量 30.2 k, pI 6.66) をコードしている。構成アミノ酸の相同性検索の結果 (表 4.1.1), KasP は *S. coelicolor* の hypothetical protein (AL939125-219) と 44% の identity を示すほか、既知遺伝子では、*Streptomyces lavendulae* のマイトマイシン C 生合成に関与する F420-dependent H4MPT reductase (MmcI) (Mao *et al.*, 1999) と 33%, *S. avermitilis* の F420-dependent dehydrogenase (Omura *et al.*, 2001) と 31% の identity を示した。従って、著者は KasP には還元酵素の機能があると考え、さらに後の 4.1.1.3 にて述べる根拠によりカスガミンの C-3'デオキシ化過程における還元過程 (図 4.1.1 の III) を触媒していると推察した。

#### 4.1.1.2 *kasQ* の遺伝子構造と推定 KasQ タンパク質

*kasQ* は *kasP* の 206 bp 上流に、*kasP* と転写方向が同一の遺伝子として見出された (図 3.2.1)。*kasQ* 開始コドンの 5 bp 上流には、推定 RBS 配列 (AAGGA) が確認された。

*kasQ* は 413 個のアミノ酸からなるタンパク質 (KasQ: 分子量 45.1 k, pI 9.45) をコードしている。構成アミノ酸の相同性検索の結果 (表 4.1.1), KasQ は *Streptomyces verticillus* 由来の UDP-GlcNAc 2-epimerase (AF245690-2) と 45% の identity を示した。さらに、大腸菌, *Yersinia pestis* および *Ralstonia solanacearum* 由来の UDP-GlcNAc 2-epimerase と約 42% の identity を示した (Kiino *et al.*, 1993; Parkhill *et al.*, 2001; Salanoubai *et al.*, 2002)。

近年、大腸菌由来の UDP-GlcNAc 2-epimerase に関する結晶構造解析が行われ (Campbell *et al.*, 2000), 基質である UDP-GlcNAc と相互作用するアミノ酸残基が特定された。すなわち、UDP との結合には Arg<sup>10</sup>, Ser<sup>290</sup>, Glu<sup>296</sup>, また GlcNAc との結合には Lys<sup>15</sup>, Asp<sup>95</sup>, Glu<sup>117</sup>, Glu<sup>131</sup>, Arg<sup>135</sup>, His<sup>213</sup> (アミノ酸番号は大腸菌由来 UDP-GlcNAc 2-epimerase の番号に相当) が関与している。そこで、KasQ と大腸菌, *Y. pestis*, *R. solanacearum* および *S. verticillus* 由来の UDP-GlcNAc 2-epimerase とのアミノ酸配列を比較した (図 4.1.2)。その結果、KasQ では基質結合に寄与するアミノ酸残基の多くが保存されていることが明らか

となり、このことから、著者は KasQ が UDP-GlcNAc 2-epimerase 活性を有し、KSM 生合成過程においてはカスガミン C-2' の N-アセチル基のエピマー化ステップ (図 4.1.1 の VI) を触媒していると推察した。

#### 4.1.1.3 *kasR* の遺伝子構造と推定 KasR タンパク質

*kasR* は *kasQ* の 493 bp 上流に、*kasQ* とは転写方向が逆の遺伝子として見出された (図 3.2.1)。*kasR* 開始コドンの 8 bp 上流に、推定 RBS 配列 (GAA) が確認された。また、*kasR* の終止コドン (TGA) とその下流に位置する *kasA* の開始コドン (ATG) は ATGA で重複していた。また、*kasA* の下流域には、推定の転写終結シグナルが見られた。

*kasR* は 399 個のアミノ酸からなるタンパク質 (KasR: 分子量 42.5 k, pI 6.06) をコードしている。構成アミノ酸の相同性検索の結果 (表 4.1.1), KasR は *Streptomyces cyanogenus* のランドマイシン生合成に関与する NDP-hexose 3,4-dehydratase (LanQ) と 38% の identity を示したほか (Westrich *et al.*, 1999), *Streptomyces purpurascens* のロドマイシン生合成に関与する hexose C-3 dehydratase (RdmI) (Niemi *et al.*, 1995), *Salmonella enterica* の LPS 生合成に関与する CDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose-3-dehydrase (RfbH) (Jiang *et al.*, 1991), *Streptomyces violaceoruber* のグラナチシン生合成に関与する CDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose-3-dehydrase (Gra-ORF23) (Tornus & Floss, 2001) とそれぞれ 37% の identity を示した。

C-3 デオキシ糖生合成の C-3 デオキシ化過程に関する酵素学的研究は、*Yersinia pseudotuberculosis* のアスカリロース生合成酵素で詳細に行われている (Lo *et al.*, 1994; Thorson *et al.*, 1994)。図 4.1.3 に示したように、C-3 デオキシ化過程は、*ascC* がコードするタンパク質 AscC (E<sub>1</sub>) により触媒される脱水過程と *ascD* がコードするタンパク質 AscD (E<sub>3</sub>) により触媒される還元過程からなる。AscC (E<sub>1</sub>) では、His<sup>220</sup> 残基がその活性に必須であり、さらに Gly<sup>169</sup>, Asp<sup>191</sup> などの残基が比較的良く保存されている (Lei *et al.*, 1995)。図 4.1.4 に示したように、KasR においても His 残基 (KasR では His<sup>196</sup>)、Gly 残基 (KasR では Gly<sup>145</sup>)、Asp 残基 (KasR では Asp<sup>167</sup>) が保存されていた。以上の結果より著者は、KasR が AscC (E<sub>1</sub>) 類似酵素として、カスガミンの C-3' デオキシ化過程における脱水過程 (図 4.1.1 の II) を触媒していると推察した。

一方、AscD (E<sub>3</sub>) との類似タンパク質をコードする遺伝子は *kas* クラスター中には見出されていない。しかしながら、著者は *kasR* の近傍に位置し、さらに還元反応に関わる酵素をコードしていると考えられる *kasP* がカスガミンの C-3' デオキシ化過程における還元過程 (図 4.1.1 の III) を触媒していると推察した。

#### 4.1.1.4 *kasA* の遺伝子構造と推定 KasA タンパク質

*kasA* は、391 個のアミノ酸からなるタンパク質 (KasA : 分子量 42.7 k, pI 5.60) をコードしており、構成アミノ酸の相同性検索の結果 (表 4.1.1) から *Mycobacterium tuberculosis* の glycosyl transferase (AE007070-12) と 36%, *Methanococcus jannaschii* の *N*-acetyl-glucosaminyltransferase (RfbU, U67601-1) と 34% の identity を示した。従って、著者は KasA がカスガミンもしくはその中間体を *myo*-イノシトールへ転移する糖転移過程 (図 4.1.1 の VIII) を触媒していると推察した。

また、*kasA* の 389 bp 下流には *kasB* が見出された。しかし、*kasB* 遺伝子産物の構成アミノ酸の相同性検索 (表 4.1.1) では、既知タンパク質との相同性は認められなかった。

#### 4.1.1.5 *kasC* の遺伝子構造と推定 KasC タンパク質

*kasC* は、*kasB* の 25 bp 下流に *kasB* と転写方向が同一の遺伝子として見出された (図 3.2.1)。*kasC* 開始コドンの 9 bp 上流には、推定 RBS 配列 (GAAAGG) が確認された。

*kasC* は、436 個のアミノ酸からなるタンパク質 (KasC : 分子量 45.4 k, pI 6.46) をコードしている。KasC の Val<sup>237</sup>-Leu<sup>277</sup> には ornithine aminotransferase のピリドキサルリン酸結合モチーフに類似したモチーフが見出された (図 4.1.5, Degols, 1987)。構成アミノ酸の相同性検索の結果 (図 4.1.1), KasC は *Pseudomonas putida* の  $\beta$ -alanine:pyruvate transaminase と 32% の identity を示した (Yonaha, 1992)。以上の結果より著者は、KasC がアミノ基転移酵素であると推定した。KSM は、2 個のアミノ基と 1 個のイミノ基を有している (図 1.1.1)。カルボキシホルミドイル基のイミノ基はグリシンのアミノ基に由来し (Fukagawa *et al.*, 1968e), カスガミンの C-2' 位のアミノ基は UDP-GlcNAc に由来する (Fukagawa *et al.*, 1968d)。さらに、大腸菌では UDP-GlcNAc のアミノ基は Glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS) により導入されることが報告されている (Walker *et al.*, 1984)。KasC は、GlmS やグリシン生合成に関与する酵素群と相同性が認められないことから、著者は KasC がカルボキシホルミドイル基のイミノ基やカスガミン C-2' 位のアミノ基ではなく、カスガミン C-4' 位へのアミノ基の導入過程 (図 4.1.1 の IV) を触媒する酵素であると推察した。

#### 4.1.1.6 *kasD* の遺伝子構造と推定 KasD タンパク質

*kasD* は *kasC* の 13 bp 下流に *kasC* と転写方向が同一の遺伝子として見出された (図 3.2.1)。*kasD* 開始コドンの 10 bp 上流には推定 RBS 配列 (GAAAGG) が見出された。

*kasD* は、329 個のアミノ酸からなるタンパク質 (KasD : 分子量 35.6 k, pI 6.16) をコードしている。KasD の N 末端領域には NAD (P) 結合モチーフ (KasD の Gly<sup>17</sup>~Gly<sup>23</sup>) が見出され、酸化還元酵素であることが示唆された (図 4.1.6)。また、構成アミノ酸の相同性検索の結果 (図 4.1.1), KasD は *S. griseus* の dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase (StrE) と 37%, *Xanthomonas campestris* の dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase (RfbB) と 36% の identity を示した (Pissowotzki *et al.*, 1991 ; Koplin *et al.*, 1993)。

dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase は、6-デオキシヘキソース (6-DOH) の生合成に必要な酵素で、その遺伝子は SM 生合成遺伝子クラスターの *strE* をはじめとして、グラナチシン生合成遺伝子クラスターの *graE*, ミスラマイシン生合成遺伝子クラスターの *mtmE* など、構造中に 6-DOH を有する抗生物質の生合成遺伝子クラスターから多数見出されている (Bechthold *et al.*, 1995 ; Lombo *et al.*, 1997)。これらの事実より、Stockmann らは、6-DOH を含む抗生物質の生合成遺伝子クラスター探索プローブとして *strE* をはじめとするこれらの類似遺伝子が有効であると提唱している (Stockmann, 1992)。カスガミンは 6-DOH 構造を有していることから、著者は KasD が KSM 生合成過程の C-6' デオキシ化過程 (図 4.1.1 の I) を触媒していると考えた。

#### 4.1.2 *kasPQRACD* 領域の転写単位の解析

カスガミン生合成への関与が推定された遺伝子群 (*kasP*, *kasQ*, *kasR*, *kasA*, *kasC*, *kasD*) は、*kac*<sup>338</sup> の上流約 10 kb 領域にクラスターを形成していた (図 3.2.1)。第 1 編, 第 3 章, 第 2 節, 3.2.1 で記載したとおり, *kasP* から *kasI* に至る DNA 領域 (図 3.2.1) では,

- 1) *kasP*, *kasQ*, および *kasG* の転写方向は *kac*<sup>338</sup> と逆である ;
- 2) *kasB*-*kasC* 間は 25 bp, *kasC*-*kasD* 間は 13 bp と近接している ;
- 3) *kasR*-*kasA* および *kasD*-*kasE*-*kasF* では構造遺伝子が重複 (ATGA もしくは TGATG) している ;

などの特徴が認められた。このような構造遺伝子の重複は、放線菌においてしばしば観察される (Hopwood, 1997)。また、このような遺伝子群はオペロンを形成してポリシストロニック mRNA に転写されるほか、トランスレーショナルカップリングを受けていると考えられている (Zalkin *et al.*, 1988 ; Guchte *et al.*, 1991)。従って、著者はこの領域の転写が *kasPQ*, *kasRA*, *kasBCDEF*, *kasG*, *kac*<sup>338</sup>, *kasI* の単位で行われているのではないかと考えた。そこで、カスガミン生合成との関連が示唆された *kasPQ*, *kasRA*, *kasCD* 領域について、実際にオペロンを形成しているか否か、RT-PCR 法を用いて検討した。RT-PCR に使用した合成プライマーは、表 4.1.2 に記載した。

M338-M1 株を KSM 生産培地 (MR 培地) にて 72 時間培養し, total RNA を抽出して試料とした。図 4.1.7 (B) に示すように, RT-PCR の結果から *kasPQ* および *kasRA* 領域 (PQ と RA) に相当するそれぞれの大きさの転写物の存在が示唆された。さらに, *kasPQ* がその前後に位置する遺伝子 (*kasO* および *kasR*) と転写方向が逆であること, またデータは示していないが, *kasA* と *kasB* 構造遺伝子領域を含む転写物が RT-PCR では検出されなかったことから, 著者は *kasPQ* 領域と *kasRA* 領域がそれぞれピシストロニック mRNA に転写されていると結論した。また, *kasCD* 領域は *kasBCDEF* として転写されると推定されたが, *kasBCDEF* 全領域 (約 4.6 kb) に対する PCR 反応が進行しなかったことから, *kasCD* および *kasEF* 領域について解析を試みた。その結果, 図 4.1.8 (B) に示すように, それぞれ (CD と EF) に相当する大きさの転写産物が確認された。

## 第 2 節 カルボキシホルミドイル化酵素遺伝子 (*kasN*)

### 4.2.1 *kasN* の遺伝子構造と推定 KasN タンパク質

*kasN* は *kasM* の 520 bp 下流に, *kasM* と転写方向が同一の遺伝子として見出された (図 3.2.1)。*kasN* 開始コドンの 11 bp 上流には推定 RBS 配列 (AAGGA) が見出された。

*kasN* は, 383 個のアミノ酸からなるタンパク質 (KasN: 分子量 41.7 k, pI 5.12) をコードしており, その N 末端領域 (Gly<sup>13</sup>~Gly<sup>18</sup>) には, FAD 結合モチーフ (GXGXXG) が保存されていた。構成アミノ酸の相同検索により, KasN は *Pseudomonas aeruginosa* の D-amino acid oxidase と 35%, *Bacillus halodurans* の glycine oxidase と 32% の identity を示した (Stover *et al.*, 2000 ; Takami *et al.*, 2000) 。KasN と相同性が認められた既知タンパク質の多くは, グリシンを基質とする酵素群であった。KSM のカルボキシホルミドイル基はグリシンに由来することが判明していることから (Fukagawa *et al.*, 1968b) , 著者は KasN がカルボキシホルミドイル化過程 (図 4.1.1 の V) に関与していると推察した。

ホーチミシン A (FT-A) に N-ホルムイミドイル (FI) 基を導入して FI-FT-A を生合成する FI-FT-A シンターゼ (FI-FTase) 遺伝子がクローニングされ, その酵素学的諸性質が検討された (Dairi *et al.*, 1992b) 。FI 基は, 酸素の存在下で, FT-A のアミノ基とグリシンの  $\alpha$  位の炭素とが結合した後, 脱炭酸されて形成される (図 4.2.1 の (A))。KasN は, FI-FTase に比べて約 100 アミノ酸残基短い, 構成アミノ酸のレベルで 31% の identity を有していた。従って著者は, カルボキシホルミドイル基と FI 基の形成とが類似の反応機構により合成されると考えた (図 4.2.1 の (B)) 。

また, *kasN* の 131 bp 下流には, *kasN* と転写方向が同一の遺伝子 *kasO* が見出され, *kasO*

の下流域には転写終結シグナルが認められた。*kasO* は、149 個のアミノ酸からなるタンパク質 (KasO : 分子量 15.8 k, pI 4.96) をコードしていると推定されるが、構成アミノ酸の相同性検索の結果、KasO と相同性を示す既知タンパク質情報は得られなかった (図 4.1.1)。

#### 4.2.2 *kasNO* 領域における転写単位

##### 4.2.2.1 ノーザンプロット解析

著者は、*kasN* の転写単位を解析する目的で *kasN* 構造遺伝子内部 (812 bp *SphI*-*SacI* DNA 断片) をプローブとして、ノーザンプロット解析を行った。MR 培地にて 72 時間および 96 時間培養した M338-M1 株から抽出した total RNA を試料として使用した。標識プローブは nick translation 法により作製した。ノーザンプロット解析の結果、プローブは約 2,000 ヌクレオチドの mRNA とハイブリダイズした (図 4.2.2)。*kasN* の上流領域には *kasM* の転写終結シグナルが、また *kasO* の下流域には *kasO* の転写終結シグナルが確認され、さらに *kasN* の開始コドンから *kasO* の終止コドンまでは 1,733 bp であることを考慮すると、*kasN* は *kasO* とともにピシストロニック mRNA に転写されていると考えられた。

##### 4.2.2.2 RT-PCR 法

4.2.2.1 において *kasN* が下流の *kasO* とともに転写されている可能性が示されたことから、著者は RT-PCR を用いて両構造遺伝子を含む転写物の有無を検討した。使用した合成プライマーは表 4.1.1 に記載した。その結果、図 4.2.3 (B) に示すように、*kasN* と *kasO* 両構造遺伝子を含む領域 (NO) に相当する mRNA の存在が確認できた。以上の結果から、*kasN* と *kasO* はオペロンを形成しており、約 2,000 ヌクレオチドのピシストロニック mRNA (*kasNO* mRNA) として転写されていることが明らかとなった。

#### 4.2.3 転写開始点とプロモーター配列

著者は、*kasNO* mRNA の転写開始点について 5'-RACE 法を用いて検討した。その結果、図 4.2.4 に示すように転写開始点は *kasN* 開始コドンの 225 bp および 226 bp 上流に位置する GG であることが示された。

放線菌由来のプロモーターには、大腸菌の主要シグマ因子  $\sigma^{70}$  により認識される配列と類似したものが知られている。これらは *Streptomyces* *E. coli*  $\sigma^{70}$ -like promoter (SEP) (Hopwood, 1986) と呼ばれ、共通配列として -35 配列 (TTGAC[Pu]) および -10 配列 (TAg[Pu][Pu]T) が提唱されている。*kasNO* の転写開始点の上流領域には、SEP プロモーター配列に類似の -35 配列および -10 配列が 18 bp の間隔をあけて確認された (図 4.2.4)。

### 第3節 D-chiro-イノシトール生合成遺伝子 (*kasJ*)

#### 4.3.1 *kasJ* の遺伝子構造と推定 KasJ タンパク質

*kasJ* は、*kasU* の 320 bp 上流に *kasU* とは転写方向が逆の遺伝子として見出された (図 3.2.1)。*kasJ* 開始コドンの 8 bp 上流には推定 RBS 配列 (GAGG) が認められた。また、*kasJ* の下流域には転写終結シグナルも確認された。

*kasJ* は、445 個のアミノ酸からなるタンパク質 (KasJ: 分子量 47.6 k, pI 5.68) をコードしている。KasJ は、その N 末端領域 (Gly<sup>8</sup>~Gly<sup>13</sup>) に FAD 結合モチーフ (GXGXXG) を保存していた。構成アミノ酸の相同性検索の結果より、KasJ は SM 生合成に関与する NADH:*N*-amidino-scyllo-inosamine oxidoreductase (StsB) と 36% の identity を示した (Ahler *et al.*, 1997)。

KSM の D-chiro-イノシトール部分は、*myo*-イノシトールを直接の前駆体とし、D-chiro-イノシトールは直接取り込まれない (Fukagawa *et al.*, 1968c)。また、M338-M1 株の代謝産物中には KSM 以外に D-chiro-イノシトール化合物が見出されないことから、D-chiro-イノシトール部分は、*myo*-イノシトールが KSM に取り込まれた後に、エピマー化され合成されと考えられた。*kas* クラスター中にはイノシトール誘導体を基質とする酸化酵素をコードする遺伝子が *kasJ* 以外に見出されていないことから、著者は KasJ が KSM の D-chiro-イノシトールの生合成 (すなわち、イノシトール部分の D-chiro 体への異性化) 過程 (図 4.1.1 の IX) に関与していると推察した。

#### 4.3.2 *kasJ* の転写開始点とプロモーター配列の解析

*kasJ* は、*kasU* と転写方向が逆であること (図 3.2.1)、*kasJ* 構造遺伝子領域の下流に転写終結シグナルが認められることからモノシストロニック mRNA に転写され、*kasU*-*kasJ* 間領域には両遺伝子に対するプロモーターが存在すると考えられた。そこで、*kasJ* および *kasU* の転写開始点を 5'-RACE 法により検討した結果、図 4.3.1 に示したように *kasU* の転写開始点は開始コドンの 51 bp 上流の G、*kasJ* の転写開始点は開始コドンの 123 bp 上流の G であることが判明した。両転写開始点は 146 bp の間隔で存在し、その領域に *kasU* プロモーターと *kasJ* プロモーターが見出された (図 4.3.1)。これらは *kasNO* のプロモーターと同様に、SEP プロモーターと類似していた。



#### 第4節 考察と小括

2,4-ジアミノ-2,3,4,6-テトラデオキシ-D-アラビノヘキソピラノースであるカスガミン（図 1.1.1 の（B）部分）は UDP-GlcNAc を前駆体とすることから，著者はカスガミン生合成には C-6 および C-3 のデオキシ化過程（図 4.1.1 の I~III）が含まれると考えた。*kas* クラスター内の遺伝子について既知のデオキシ化遺伝子群との相同検索を行った結果，*kasD* は 6-DOH の形成に必須である dNTP-D-glucose 4,6-dehydratase 遺伝子群と，*kasR* は C-3 デオキシ化の脱水過程に関与する *ascC* とそれぞれ類似性が高いことを見出した。C-3 デオキシ化の還元過程に関与する *ascD* の類似遺伝子は見出せなかったが，この過程は還元酵素による代替が可能であることから（Miller *et al.*, 1993），著者は F420-dependent H4MPT reductase と相同な *kasP* 遺伝子産物がこの還元過程を触媒しているのではないかと考えている。グラナチシン生合成遺伝子クラスターにおいても，*ascD* 類似遺伝子は見出されておらず，代りに *gra-orf24* 遺伝子産物が還元を行っていると考えられている（Tornus *et al.*, 2001）。

*kas* 遺伝子群について遺伝子産物の構成アミノ酸の相同検索を行うことにより，著者が推定した KSM 生合成過程（図 4.1.1）での各遺伝子の機能を以下のように推定することができた。

1) カスガミン部分の生合成に必要な遺伝子群，すなわち：

*kasD*：6-デオキシ糖生合成（図 4.1.1 の I）；

*kasR*：C-3'位のデオキシ化過程における脱水過程（図 4.1.1 の II）；

*kasP*：C-3'位のデオキシ化過程における還元過程（図 4.1.1 の III）；

*kasC*：C-4'位へのアミノ基転移（図 4.1.1 の IV）；

*kasN*：C-4'位アミノ基へのカルボキシホルミドイル基転移（図 4.1.1 の V）；

*kasQ*：C-2'位 *N*-アセチル基のエピマー化（図 4.1.1 の VI）；

2) イノシトールへのカルボキシホルミドイル化カスガミンの転移による KSM の生合成に必要な遺伝子群，すなわち：

*kasA*：*myo*-イノシトールへの転移過程（図 4.1.1 の VIII）；

*kasJ*：エピマー化による *D-chiro*-イノシトール生合成過程（図 4.1.1 の IX）；

である。

以上のようにこれらクラスター遺伝子群は KSM 生合成の推定経路のうち，カスガミン C-2'位の *N*-アセチル基脱アセチル化ステップ（図 4.1.1 の VII）を除くすべての過程を含んでいたことから，著者は，*kas* クラスターは KSM 生合成遺伝子クラスターであると結論した。

さらに、著者は KSM 生合成に関連する *kas* 遺伝子群の *kasNO*, *kasPQ*, *kasRA* がピシストロニック mRNA に転写されていることを明らかにした。*kasBCDEF* 領域については、少なくとも *kasCD* および *kasEF* がポリシストロニックに転写されていることを示す結果を得た。*kasCD* は前後する *kasB*, *kasEF* とオペロンを形成していると考えられるが、現在のところ *kasBCDEF* 全領域（約 4.6 kb）に対する PCR 反応が何らかの理由により進行しないため、*kasBCDEF* 領域に関する転写単位については今後の課題である。また、データは示さないが、*kasG* および *kasI* については、RT-PCR により転写産物の存在が確認されなかった。従って、この領域における転写については、これ以降検討しなかった。*kac*<sup>338</sup> の転写については第 1 編、第 5 章、第 2 節、5.2.2 で述べる。

また、*kasU*, *kasJ*, *kasNO* のプロモーター配列はいずれも SEP と高い類似性をもつことを示した。



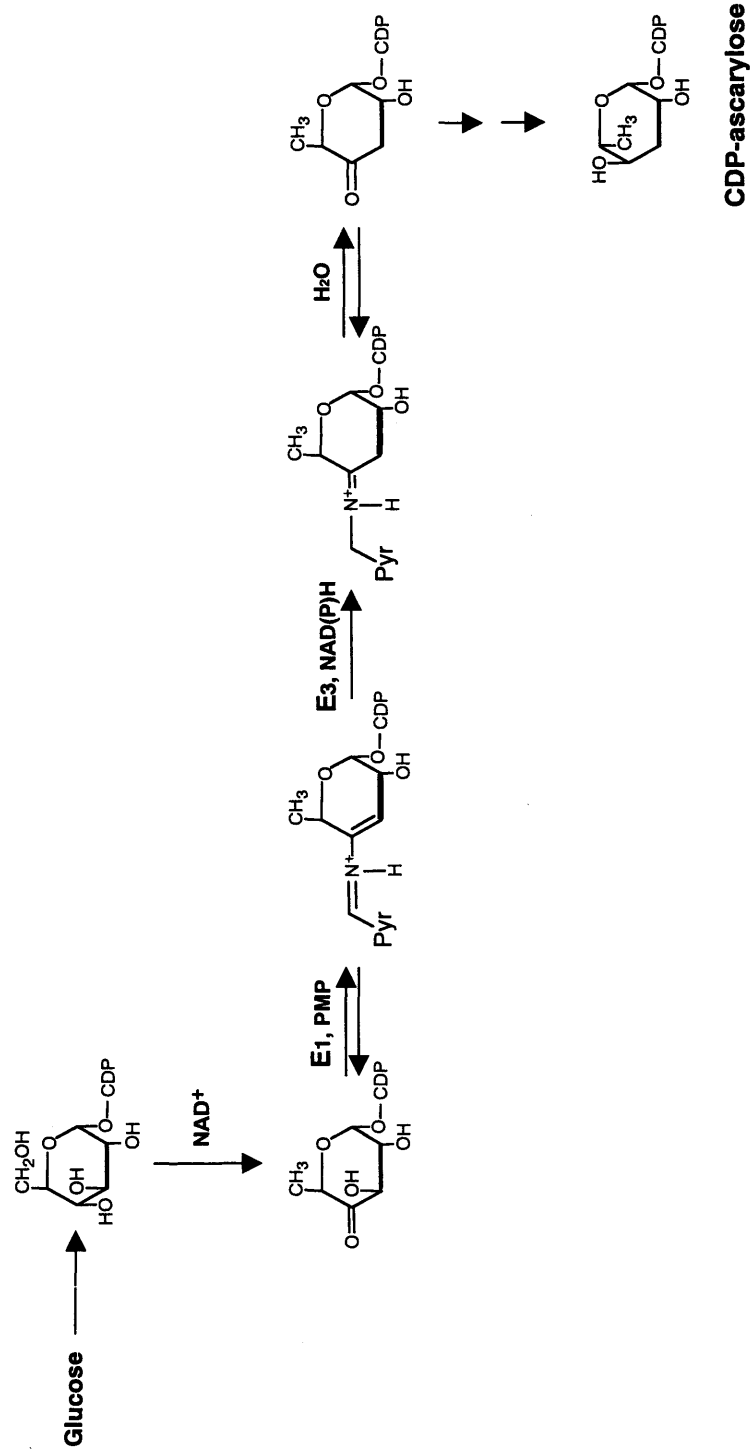


図 4.1.3 アスカリロース合成



		**	*	** *		*		*		*
1)	237	VIHDEVLTGL	GRTGLPLGAD	HCTDAAA--D	IVVLSKGLSA	G	275			
2)	256	LVFDEVITGF	GRTGSMFGAD	SFGVT---PD	LMCIAKQVTN	G	293			
3)	245	LMFDEVQVGM	GRSGKLWGYE	YLGVE--PD	IFTSKGLGG	G	282			
4)	239	LILDEAQTGV	GRTGTMFACQ	RDGVT---PD	ILTLSKTLGA	G	276			
5)	237	LIVDEIQTGI	GRTGELLCYD	HYK-AEAKPD	IVLLGKALSG	G	276			
Consensus		LLXDEVXXGL	GRXG-----X(12-16)-----D	IXXXSKXXXXA	G					
		VV I PI S A		L A T A						
		II L V A S		V G S						
		MM M M D		M G						
		FF A F		F N						
		YY Y		Y						
		WW W		W						
				A						
				G						

**図 4.1.5 アミノトランスフェラーゼのピリドキサルリン酸結合部位の比較**  
 アミノ酸は一文字表記で示した。配列上部に記した（＊）は強く保存されている残基を示す。1) KasC (*S. kasugaensis* M338-M1)。2)  $\beta$ -alanine pyruvate aminotransferase (*Pseudomonas putida*)。3) *N*-acetylornithine aminotransferase (*Anabaena* sp.)。4) 2,2-dialkylglycine decarboxylase (*Pseudomonas cepacia*)。5) Ornithine aminotransferase (*Saccharomyces cerevisiae*)。

			17	23						
KasD	1	MSPTTTHWAG	RQVLVT-GADG	FIGSHLTETL	VSRGARVTAV	VRRVSAAQVT				50
RfbB	1	M---AT-W-----	LVTRGA-G	FIGANFVLEA	VSRGIRVVN-	---LDALTYA				37
StrE	1	M---TTH-----	LLVT-GAAG	FIGSQYVRTL	LGPGGPPDVV	VTALDALTYA				42
		*	. * . .	*** ** * ***	. . . . .	. . . . .			*	
KasD	51	HRLRNLSAAT		60						
RfbB	38	GNLNTLASLE		47						
StrE	43	GNPDNLAAVR		52						
		. . * .								

**図 4.1.6 KasDと類似タンパク質のN末端領域の比較**  
 アミノ酸は一文字表記で示した。配列下段に記した（＊）は強く保存されている残基を，（・）は類似している残基の位置を示している。

表 4.1.2 RT-PCRに使用した合成プライマー

領域	プライマー	配列
<i>kasNO</i>	5'-pKS16b	5'-AGAACAGGTGGCTCAGCCCCGCGGA-3'
	3'-pKS17	5'-CAGTCGGACTCCCTGATGCCCAGGA-3'
<i>kasPQ</i>	5'-kasP	5'-CGGCAGTGCCAAGTCGCCGGTCAGC-3'
	3'-Q1	5'-ACGGAACTCGCCCCGAAGCCATCAA-3'
<i>kasRA</i>	5'-pKS20RT	5'-ATCGTGTCCGGCGCGACCTTCGTCA-3'
	3'-ABAM	5'-CCGGATCCTCACCGCTGGCCACACGCCACTTCGTA-3'
<i>kasCD</i>	5'-pKS 9	5'-GCCAGGACGGCAGGCATCACATCCT-3'
	3'-pKS10	5'-GGACGTGGAGAGTGGACATCACATT-3'
<i>kasEF</i>	5'-ORF2A	5'-TGCTGGACGACAATCCGGACGTACT-3'
	3'-ORF3B	5'-GTGTCGGCCACTTCCGGGAAGGTCT-3'

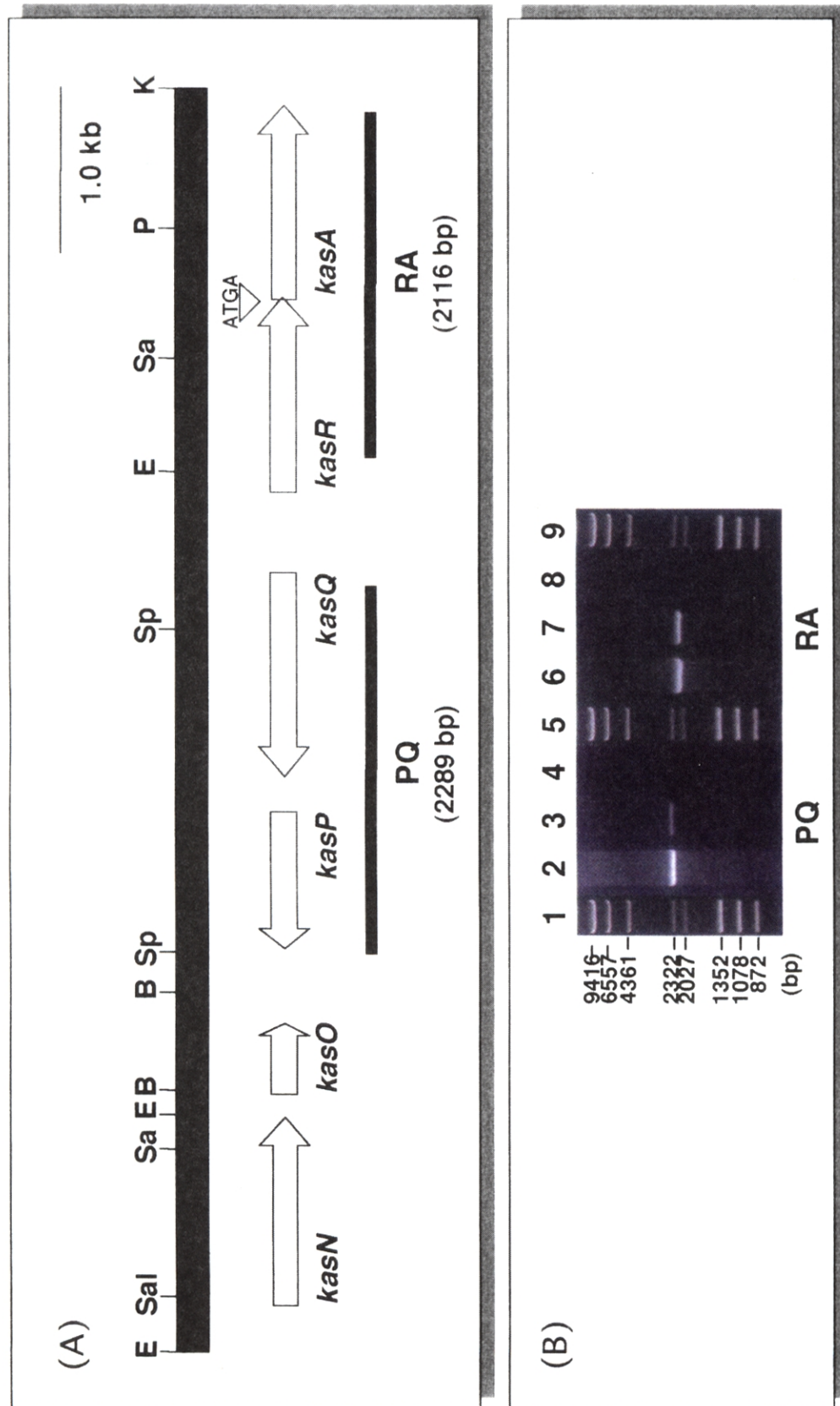


図 4.1.7 *kasP*-*kasQ*および*kasR*-*kasA*領域における転写単位の解析

(A) *kasN*~*kasA*領域の制限酵素地図。白抜き矢印は、遺伝子の位置とその転写方向を示している。*kasA*の開始コドン (ATG) と *kasR*の終止コドン (TGA) はATGAで重複している。Bは*Bam*HI, Eは*Eco*RI, Kは*Kpn*I, Pは*Pst*I, *Sa*は*Sac*I, *Sal*は*Sal*I, として*Sph*Iを示している。(B) RT-PCRの結果。レーン1, 5, 9は分子重量マーカー。レーン2, 6は、ゲノムDNAを鋳型としたPCR産物 (ポジティブコントロール)。レーン3, 7はRT-PCRサンプル。レーン4, 8はRTaseを添加せずにRT-PCR反応を行ったサンプル (ネガティブコントロール)。



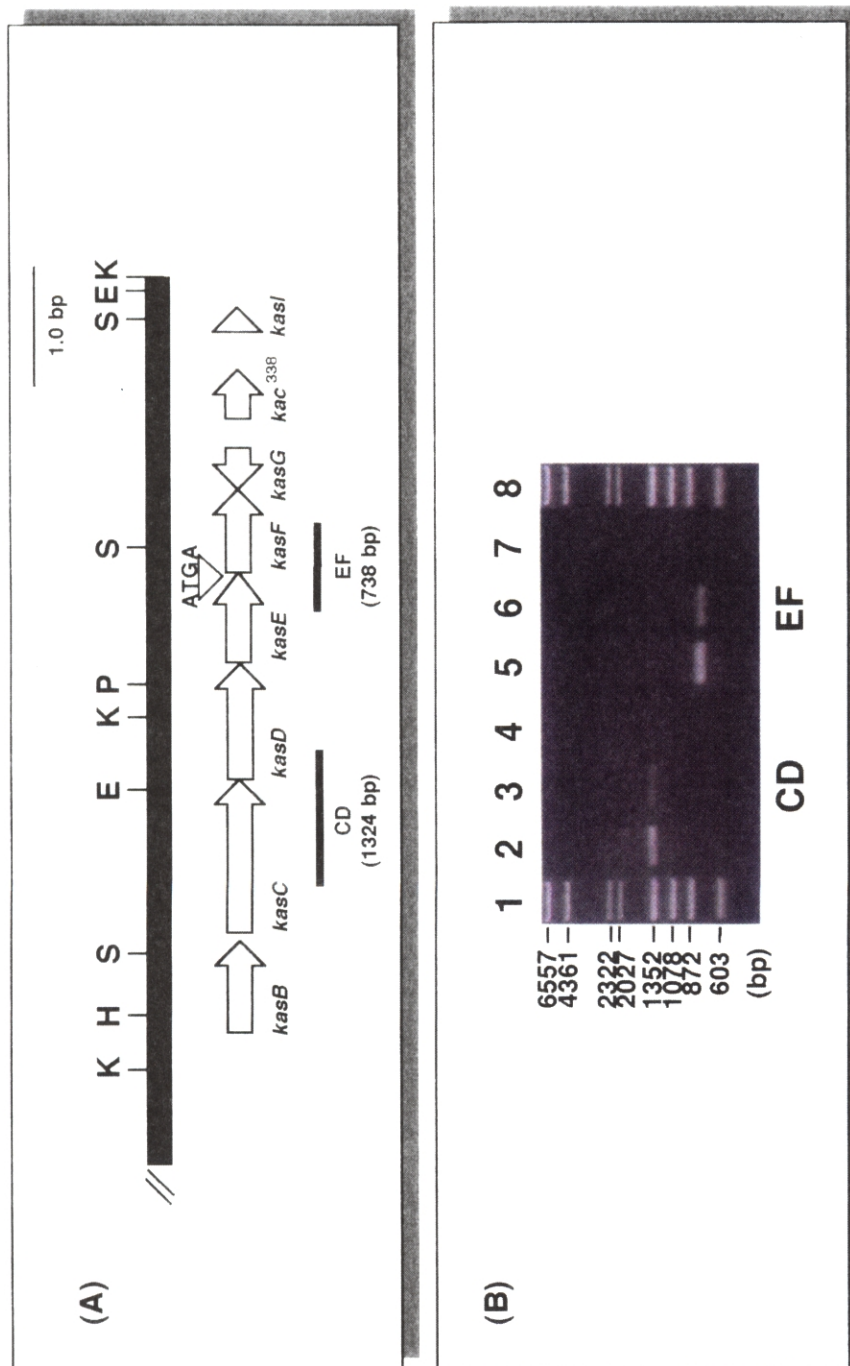


図 4.1.8 *kasC-kasD*および*kasE-kasF*領域における転写単位の解析  
 (A) *kasBCDEF*領域の制限酵素地図。Eは制限酵素EcoRI, HはHindIII, KはKpnI, PはPstI  
 としてSはSacIを示している。白抜きの矢印は、遺伝子の位置と転写方向を示している。  
 (B) RT-PCRの結果。レーン1, 8は分子重量マーカー。レーン2, 5はゲノムDNAを鋳型とした  
 PCR産物（ポジティブコントロール）。レーン3, 6はRT-PCRサンプル。レーン4, 7はRtase  
 を添加せずにRT-PCR反応を行ったサンプル（ネガティブコントロール）。

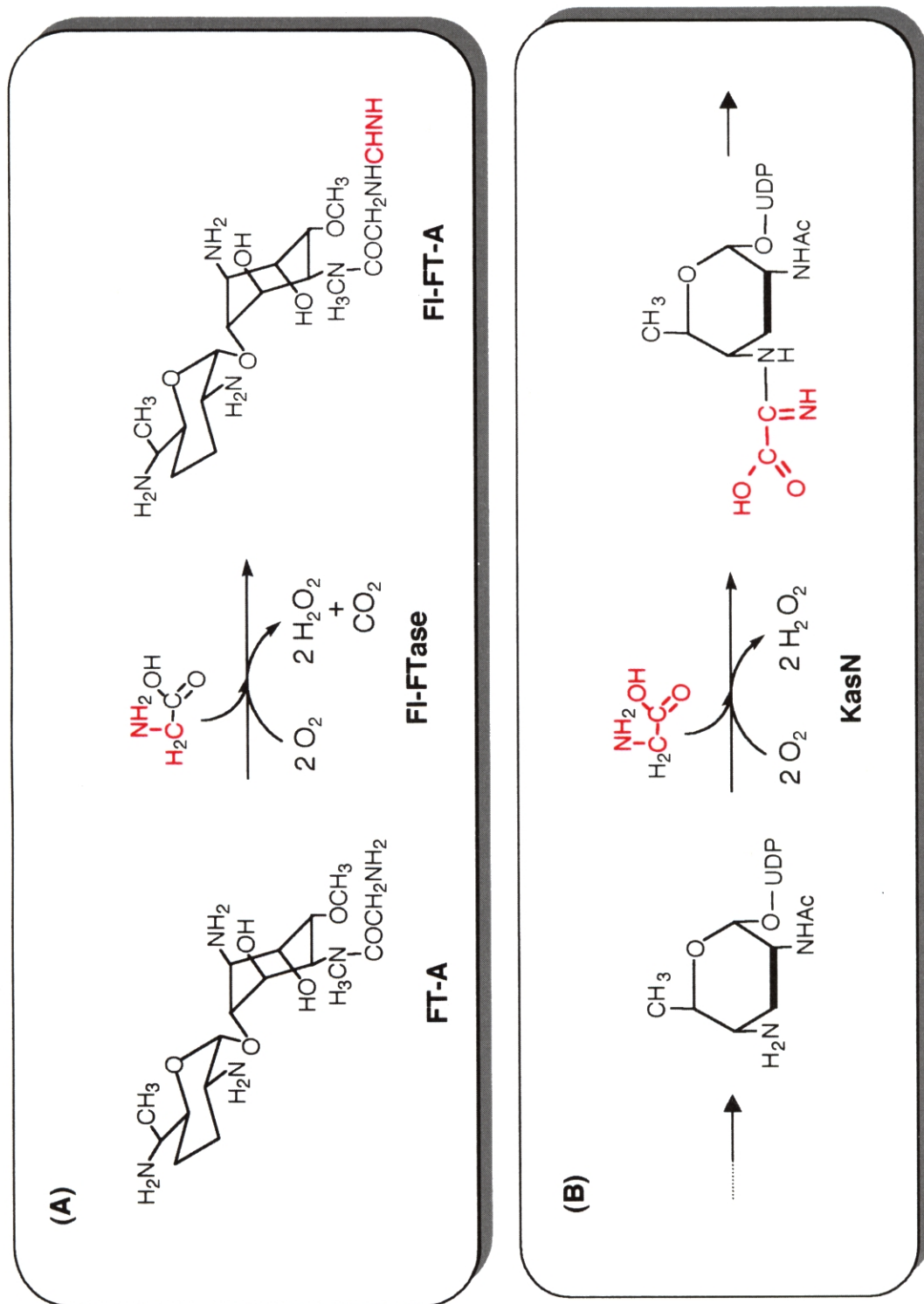


図 4.2.1 N-ホルムイミドイル基生成と推定カルボキシホルミドイル基生成機構  
 (A) N-ホルムイミドイル (FI) 基生成機構 (Dairi et al., 1992b)。 (B) 著者が推定したカルボキシホルミドイル基生成機構。

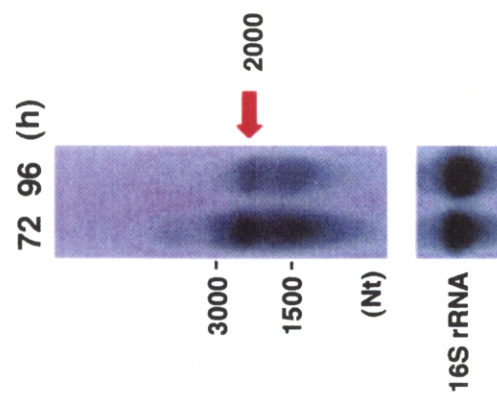


図 4.2.2 *kasN*構造遺伝子領域を含む転写物の検出  
ノーザンブロット解析の結果。プローブには*kasN*構造遺伝子内部の  
812 bp *SphI*-*SacI* DNA断片を用いた。赤い矢印が目的の転写物を  
示している。Nt:ヌクレオチド。

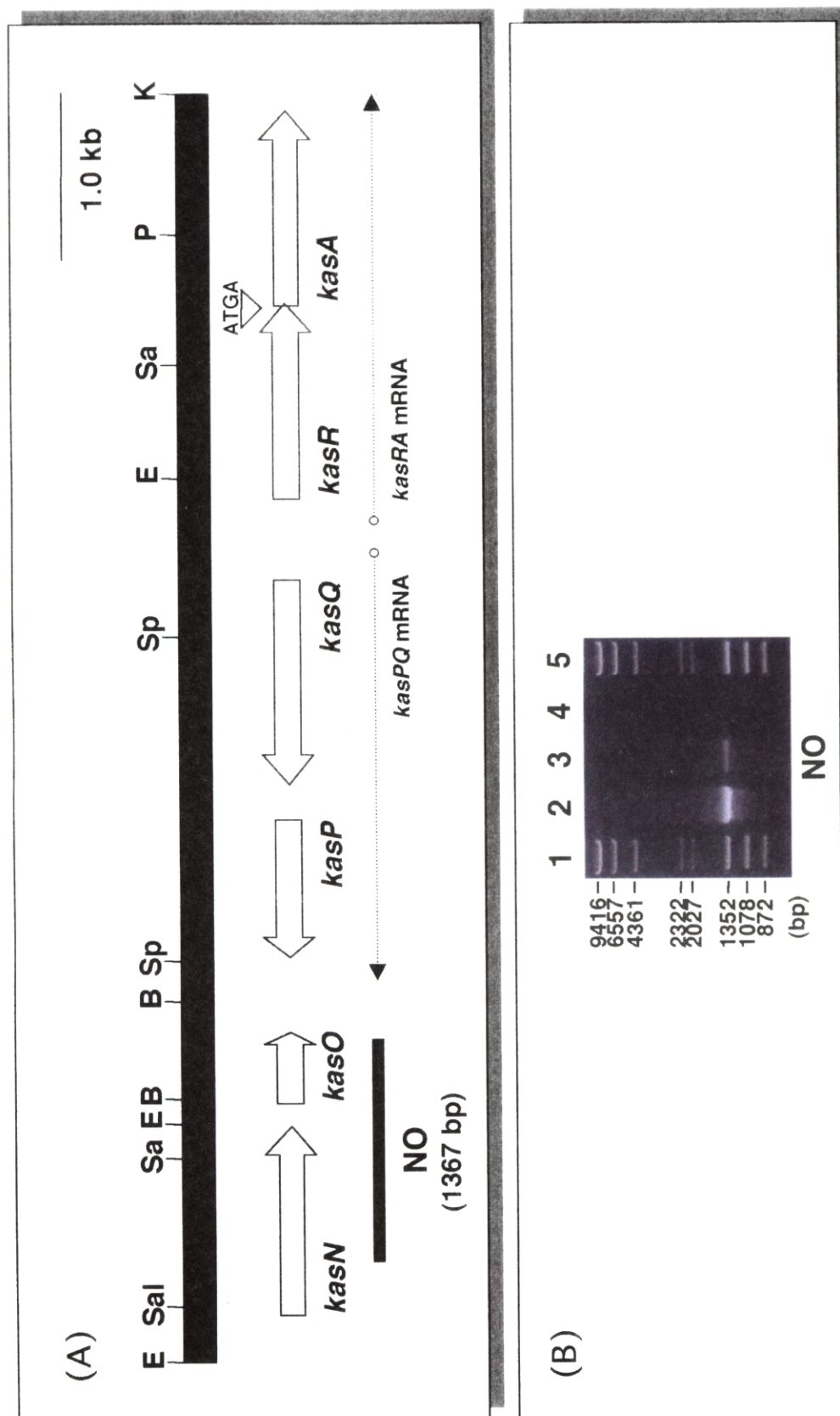


図 4.2.3 *kasN*-*kasO*領域における転写単位の解析

(A) *kasN*~*kasA*領域の制限酵素地図。白抜き矢印は、遺伝子の位置とその転写方向を示している。Bは制限酵素 *Bam*HI, Eは*Eco*RI, Kは*Kpn*I, Pは*Pst*I, Saは*Sac*I, Spは*Sph*IとしてSalIを用いている。(B) RT-PCRの結果。レーン1, 5は分子重量マーカー。レーン2はゲノムDNAを鋳型としたPCR産物 (ポジティブコントロール)。レーン3はRT-PCRサンプル。レーン4はRTaseを添加せずにRT-PCR反応を行ったサンプル (ネガティブコントロール)。

GGCGGCGGCC GGTCCGCTCT CCGATGTCCT CGGCCAACTG GGGCTGGAGG TCTGTGTCGC AGCCCTGTGG CGGCACTGAC  
A A A G P L S D V L G Q L G L E V C V A A L W R H \*

*kasM* →

GCTGCTGTTT TTCGAACGCA TCGCGAGCAA GGGCCGCCCG GACGGGTGCG TGAACCTCAC GTCATGACGC ●●●●●●●●●●  
TGTTGCCGGG CAAACAGGCC CGGCACCACC GCCCGGCAGG CATGCGACGG CAGGAGTTCTG CCGTACGGGC AGCCCCGTTT

putative terminator

ACGCGGCAAG CCGCCCTATT CCTTCGTCC GTCAACACCG TCCATAGCCG CGCGGTGCCG TCTCGTGCCT CAATCGGTGA

*EcoRI*

ATTCCTGGAG CGCGTATCCG GAATGAGGGG AATGCGATG ATTATTTACCA GGGTTACGCC CGCTCTCCTT CCTTTTCGAA

-35      --(19bp)--      -10      ||→ *kasN* mRNA

TCGCGGGCAG AGAAACATCT CGCCTCTTCG GTGATTGCCT GTTCCCAGGA AATGATCTGA ATTTCCTGGG CCCC GCCGCC

*SphI*

GAGTTGAACT CTTCGAGGCC GCACCCGTTC CTCTTCGCAT GCGGTGGCCG GCTTACCCAA GACCGTCCCG TGACACCTCC

+1

CTCCGCCCCG CACCACCCTT GAAAGGAAGA CGGCCCGATG AGCCGCAATA TCCGTGTGGA CGTGGCAGTG GTGGGCGATG

RBS      M S R N I R V D V A V V G D G

*kasN* →

#### 図 4.2.4 *kasNO* mRNA の転写開始点と推定プロモーター一配列

*EcoRI*

3'-CTTAAGGCCC CAGCCGCGGT GTGGCTACAG CCCCCACGGC TTCCCTGCG TGGACCCAGC CATTAGTGC ATTGTGGGG  
S N R P R R C M *kasU* mRNA ←-I

← *kasU*

5'---CGAGAC GGAGAAAGAC CTGACGGTGT CGTACTGAGA AGCCGGCGTC

TACGACGGAC GAATCGCCCT TTGTGTGCTGG CGCGGCTCTG CCTCTTTCTG GACTGC---5'  
-10 --(17bp)-- -35

GGTGCTCTCC TGACCCCCGA CCTTGCCCGG ACTCAGGTGT GTGCTCGACA CTTCTCGACG CTCTCCCTCG TCACACCGGG  
-35 -- (18bp) -- -10 |→ *kasJ* mRNA

*BamHI*

ATCCACCGGT GAAGACACTG GAATGAGAA GCCCTCCACA AGTGCACCCG GCCACACGCG GCACGCCGGA AGTGCCTTGG

GACAAGGAAA TGAGGCTGAA CTGTGCTGGA TACGGCGGTA ATCGGTCGG GTATGGCGG GACGGCGGTG GCCACCGAAC-3'  
RBS M L D T A V I G S G M A G T A V A T E L  
*kasJ* →

#### 図 4.3.1 *kasU*および*kasJ*のmRNAの転写開始点と推定プロモーター配列

*kasU*および*kasJ*の推定アミノ酸配列（一文字表記）は、相当する塩基配列の下段に示した。また、推定プロモーター配列（-35配列および-10配列）は、枠で囲んだ。二重下線で示したRBSは推定リボゾーム結合配列を示している。