

## 第5章 *kas* クラスター内で *kas* 遺伝子群の転写調節に関わる遺伝子

一般に、抗生物質生合成遺伝子群はゲノム上でクラスターを形成して存在している。典型的な例としては、約 25 kb に渡ってクラスターを形成している ACT 生合成遺伝子 (*act*) クラスターが挙げられる。*act* 遺伝子群は、幾つかのポリシストロニック mRNA に転写され、これらの転写は同じクラスター内に見出された *actII-ORF4* 遺伝子産物 (ActII-ORF4) により調節を受けている (Rudd *et al.*, 1979)。ActII-ORF4 のように、生合成遺伝子クラスターの発現に対して、いわばマスタースイッチの役割を果たすタンパク質は“経路特異的転写調節因子”と呼ばれている。経路特異的転写調節因子による生合成遺伝子群の発現調節は、おそらく抗生物質生産を可能にするまで生産菌株を十分に生育させるために必要なのであろう。現在、多くの抗生物質生合成クラスターにおいて経路特異的転写調節因子の存在が報告されている (表 5.1.1)。

本章において、*kas* クラスターに見出された *kasT* の遺伝子産物 (KasT) が (Ikeno *et al.*, 2002), *kas* クラスター内の KSM 生合成関連遺伝子群に対する経路特異的転写活性化因子であると結論した経緯について述べる。KasT は構成アミノ酸のホモロジー検索によって SM 生合成遺伝子クラスターにおける経路特異的転写活性化因子 StrR と 50% の identity を示した (Distler *et al.*, 1987)。さらに、RNA ポリメラーゼの  $\omega$  サブユニット遺伝子 (*rpoZ*) が欠損して KSM 非生産となった *S. kasugaensis* MB273-C4 株由来の R6D4 株を用いて (Kojima *et al.*, 2002), *kasT* が KSM 生産に関与すると考えられる *kas* 遺伝子群の転写を支配していることを述べる。すなわち、R6D4 株では *kasT* を含めた *kas* 遺伝子群の転写が抑制されていたが、プラスミドを介して *kasT* を恒常的に強制発現させるとこれらの *kas* 遺伝子群が転写されて KSM 生産が復帰した。さらに、*in vitro* で *kas* クラスター内に点在する *kas* 遺伝子群の推定プロモーター領域周辺への KasT の結合能について検討して、KasT が少なくとも *kasU-kasJ* 間領域、*kasN* 上流領域および *kasQ-kasR* 間領域に結合することを明らかにした。

表 5.1.1.1 放線菌より見出された主な経路特異的調節因子

抗生物質	遺伝子	機能	備考	文献
Actinorhodin	<i>actII-ORF4</i>	<i>act</i> 遺伝子群の転写を活性化。	SARPs ( <i>Streptomyces</i> antibiotic regulatory proteins) familyに属するDNA結合タンパク質。	Hallam <i>et al.</i> , 1988 Wietzorrek <i>et al.</i> , 1997
Undecylprodigiosin	<i>redD</i>	<i>red</i> 遺伝子群の転写を活性化。	SARPs familyに属するDNA結合タンパク質。	Rudd <i>et al.</i> , 1980
	<i>redZ</i>	<i>redD</i> の転写を活性化。	response regulatorに類似。	White <i>et al.</i> , 1997 Guthrie <i>et al.</i> , 1998
	<i>dnrI</i>	<i>dnr</i> 遺伝子群の転写を活性化。	SARPs familyに属するDNA結合タンパク質。	Stutzman-Engwall <i>et al.</i> , 1992 Tang <i>et al.</i> , 1996
Daunorubicin	<i>dnrN</i>	<i>dnrI</i> の転写を活性化。	response regulatorに類似。	Madduri <i>et al.</i> , 1995 Furuya <i>et al.</i> , 1996
	<i>snoA</i>	nogalamycin生産を調節。	SARPs familyに属するDNA結合タンパク質。	Ylihonko <i>et al.</i> , 1996
Cephameycin, clavulanic acid	<i>ccaR</i>	cephameycin及び clavulanic acid生産を調節。	SARPs familyに属するDNA結合タンパク質。 塩基配列の相同性から推定。	Perez-Llarena <i>et al.</i> , 1997
Spiramycin	<i>srmR</i>	<i>srm</i> 遺伝子群の転写を活性化。		Richardson <i>et al.</i> , 1990 Geistlich <i>et al.</i> , 1992
Streptomycin	<i>strR</i>	<i>str</i> 遺伝子群の転写を活性化。	DNA結合タンパク質。	Distler <i>et al.</i> , 1992
Spectinomycin	<i>spcR</i>	spectinomycin生産を調節。	<i>strR</i> 類似遺伝子。	Lyutskanova <i>et al.</i> , 1997

## 第1節 転写調節遺伝子 (*kasT*) の遺伝子構造と推定 KasT タンパク質

著者は、*kasU* の 68 bp 下流に *kasU* とは転写方向の異なる遺伝子 *kasT* を見出した (図 3.2.1)。pSKE 8 および pSKE 7 領域 (図 3.1.1 における 2.7 kb *PstI*-*EcoRI* 領域) の塩基配列と KasT の推定アミノ酸配列を図 5.1.1 に示した。*kasT* の推定開始コドン (GTG) の上流約 1.3 kb 領域には、ORF は見出せなかった。また、第1編、第3章、第1節で見出された低 (G+C) 領域 (図 3.1.2 の (A)) は、*kasT* 開始コドンよりも約 100 bp 上流域の nt 870-1230 に位置していた。*kasT* 終了コドンの下流には、*kasT* の転写終結シグナルと思われる不完全な逆向き繰返し配列が認められた。*kasT* 周辺領域の塩基配列の特徴と、隣接する *kasU* の転写方向などから、著者は *kasT* はモノシストロニック mRNA に転写されていると推察した。

*kasT* は 346 アミノ酸からなるタンパク質 (KasT: 分子量 37.5 k, pI 10.3) をコードしている。KasT は、その中央領域に helix-turn-helix (HTH) モチーフ (図 5.1.1 中の二重線部分) を保持していることから DNA 結合タンパク質であると考えられた。構成アミノ酸の相同性検索の結果、KasT は *S. griseus* の SM 生合成遺伝子クラスターにおける経路特異的活性化因子 StrR (Distler *et al.*, 1987) と、その N 末端から C 末端領域に至る全領域において高い相同性が認められ (図 5.1.2)、両タンパク質間の identity は 50% であった。また、*Streptomyces spheroides* のノボビオシン生合成遺伝子クラスターに見出された *novG* 遺伝子産物と 45%、*Streptomyces flavopersicus* のスペクチノマイシン生合成遺伝子クラスターにおける経路特異的転写調節因子 *spcR* (表 5.1.1) と 44%、そして *S. lavendulae* のコンプレスタチン生合成遺伝子クラスターに見出された *comG* 遺伝子産物と 44% の identity を示した (Steffensky *et al.*, 2000; Lyutskanova *et al.*, 1997; Chiu *et al.*, 2001)。

著者は、*kasT* が KSM 生合成遺伝子群の近傍に見出されたこと、KasT が StrR をはじめとする経路特異的転写調節遺伝子産物と高い identity を示したことなどから、*kasT* が KSM 生合成遺伝子クラスターにおける経路特異的転写調節遺伝子として機能しているのではないかと考えた。

<i>Pst</i> I									
CTGCAGGGCT	CCAGCCACAT	GCCTGGATGT	CAAGGAGTGT	GCACCGGAGT	GGTGTCTAG	GAGTGCAGAC		70	
GAGTTCCGTC	CGAGCCGTAC	AGGTTGAGCA	GGTAGCCCTG	ATGGAGGCGG	CCTCCTTCCC	GCGTCAGGAA		140	
GGAGGCCATA	CCCGTGGCGA	CGTCGTCGAA	ATTCTTGTAG	TAGGTCTTCT	GGTGAGTCCA	CACGGTCAGC		210	
ACGAGTACGC	CCTCGCGGTC	CTTCGCGCTG	CGGATGCCGT	ATACGTCGGC	GGCTCCTCCG	GCCTCGCGGT		280	
<i>Sal</i> I									
AGCGGTCGGC	CAGTTCCTTG	GCGGCCGGCA	GGGGAGTCGC	GGTGATGACC	GGAGGGCCCC	TGGGAGTCGA		350	
CTCGGGGTCG	CCGCCCCGCG	CACATCCCGT	CAGCACAACG	GCGGCCGCGA	GAAAGAGAAC	CGGCAGGATT		420	
ATTCGTCTCA	TCGCGCCGGG	GTTCCCGGCC	CTACGGCGCC	AGGACGGCAG	CGAAGGGCCG	GCAACCGCCC		490	
CAGCACCTTG	TCCGGAGGTC	TCGTGCCAGG	TGCGGATACT	GCGCACCATT	TCGTCTGCCA	CGGGGGCGGC		560	
TTCTCCTTCG	ATAGACGATC	TTCCCCGCAC	CATCCGAGCT	GACGACACCG	AACAACCTCT	CGGCCGGGGT		630	
GCTCACGCGT	ACACGTGACC	GGACATGTCC	GATCGTCCGC	CACCGCCTTG	ACGGTCGATG	AACGTCCCGT		700	
TCCCGGCGAT	GCGGTCGTCG	GAACCGCGCG	CGAAGCTCCC	GGCCCGCCCT	CGCCATCGCG	CCCAGGAAAG		770	
ATCATCGGGC	GCCACCGAC	GCCCTTGCCG	CCGAAGGCGG	ATGGGGCAGT	TTTCCGCCAC	CGCGCCACAC		840	
CCATCCCGCC	CCGGCATTCC	CACGCCAGAA	ACCAGCCCGA	ACAACGCGTG	ACCAGTCGAA	ACGCCTACCG		910	
AACCGTGGGA	GATGGGTGAA	ACCTGTGATC	GGCAGGACTA	TTCTCAAATT	ATCCCCACAA	TGCCTCGGAC		980	
CACCCGATAC	GGCAGCGTTG	TCAAGCTCGT	GCACGCCCTT	GTCGAAAAAT	CACCGTCGCC	CCAGCTCACA		1050	
CCCGACGCGC	ACCCCAACCG	GCAGCCGTGG	CGGGACATCA	TCGGGCCGTT	CCGGGTTCCT	CTCGGGGAAA		1120	
ATGGCCGATC	TCGTGCTATG	GCCGAACTTT	TGCCTTGTTA	TTCGGTGTTG	TTGACGAAAC	GATTGTTGCT		1190	
CAAAGTAAGC	TCTGTGAATC	CGATAGCCGC	TTGAGCCGAG	AGTGGCTCGG	GTCAGGTCGA	GAGTGCTTCT		1260	
GTTCCGCTTC	GTGACGGGTC	CGGCAAGTGA	CAACATCATC	GACCGAGAGG	CTCCCCGTC	GCTGAAACAG		1330	
				RBS		M A E T V			
						<i>kas</i> T →			
TTCGGGCCGA	TTCACCTCTG	AAGAGCAGTT	ACAGAAACGT	TCCTGCTGCT	GAGGTCCAGG	GGAGCGGCCT		1400	
R A D	S P L	K S S Y	R N V	P A A	E V Q G	S G L			
ATCGGTCGGG	CAACGGACCA	CTCGTATAGC	GATCAGCTCG	CTGCTGGCGG	CCGACTCGCC	TCGCAGCGCC		1470	
S V G	Q R T T	R I A	I S S	L L A A	D S P	R S A			
<i>Sac</i> I									
GGAGAGAACG	CCGAGCACAT	CCGCTTGCTG	GCCGATTCCG	GAGCTCGGCT	GCCACCCATC	GTCGTACAGC		1540	
G E N A	E H I	R L L	A D S G	A R L	P P I	V V Q R			
GCTCGACCAT	GCGCGTCATC	GACGGGATGC	ACCGGCTGCG	GGCCGCCGCG	CTCCGCGGCG	AGACCGAGAT		1610	
S T M	R V I	D G M H	R L R	A A A	L R G E	T E I			
CGAGGTGCGG	TTCTTCGACG	GAGCGGAGGA	GGACTCCTTC	CTCCTCGCGG	TCAGGTCCAA	TATCGCCCAC		1680	
E V R	F F D G	A E E	D S F	L L A V	R S N	I A H			
GGACTGCCGC	TGTCCCAGGA	GGAGCGCGCC	GCGGCCGCCC	AACGCATCAT	CCGTTCCCAT	GCCCAGTGGT		1750	
G L P L	S Q E	E R A	A A A Q	R I I	R S H	A Q W S			
CCAACCAGGC	GATCGGCGAG	GTCACCGGGC	TGGACGCGAA	GACGATTGCG	GCACTGCGAC	GAGACGCCAA		1820	
N Q A	I G E	V T G L	D A K	T I A	A L R R	D A K			

## ☒ 5.1.1 To be continued

		<i>SalI</i>		
GGACGTACCG	CAGCTGGACG	CCCGGATCGG	CAGGGACGGA	CGGGTACGGC
D V P	Q L D A	R I G	R D G	R V R P
				V D G A Q G
CGCAGGCTGG	CCGGCGAATT	GATGGCCGAG	CAGCCGGACG	CGCCGCTGCG
R R L A	G E L M A E	Q P D A	P L R	K I A H A A G
		<i>BamHI</i>		
GGGTGTCGCT	GGGCACCGCC	TCCGACGTGC	GCCGGCGGAT	CCGCAACGGC
V S L	G T A S D V R	R R I	R N G	Q D P V P A G
		HTH motif		
ACGGCAGAAG	GCCGACCCGC	AGCCACCGGC	CCGGTACGCC	GCGTCGGAGG
R Q K	A D P Q	P P A	R Y A	A S E D R S G T T A
		<i>PstI</i>		
CCGCGGACCG	CGGAGCAGAA	CCGGCGCATC	CTGCTGCAGA	AACTGCGCAA
P R T A	E Q N	R R I	L L Q K	L R K D P S L R C N
ATGAGGCCGG	GCGCGCCCTG	CTGCGCTGGC	TGGAGTTCA	GGCGGTGGAG
E A G	R A L L R W L	E V Q	A V E	G E D W E R L
GCTGGACAGC	GTGCCGATGC	ACTGTGCGGC	AACCATCGTG	GAAGTGGCGC
L D S	V P M H	C A A	T I V	E L A R G C S G V W
CAGGATTTTCG	CCGCGCAACT	GGAACGGCGT	GGACGGGCAA	GTGCGTGA
Q D F A	A Q L E R R	G R A S	A	
		<i>HindIII</i>		
GC	GGTGACGT	AGTACGAGAT	CCCAGGCCAA	GCTTCCGGGG
				CGCGCTACG
				GAAAGCCGGC
				CCCCTACGTC
				P F G A G Y T
CCCATGAGGC	CGGCGGAGAG	GCGCCGGCGG	CCGAGACGGA	CTCCTTGCCC
G M L	G A S L	R R R	G L R	V G Q G L R G P C I
GCCGGCTCCG	GAACAGCGAC	TTCCGGACCG	CGTCGCACAG	TAGGTGGCTG
P R S R	F L S	K R V	A D C L	L H S C R A A T N L
CCCAGGAAAT	TCCTTGTTG	AACACAGGTG	GAGCGGGCGG	GTGCGGTGCG
G P F	E K T	S C L H	L P R	T R H A R V P V Q V
		<i>EcoRI</i>		
TGCGGGGGAA	CGAACGGGGA	TTGGCTGCCG	GGTGACAAGG	GGAGTTTCC
H P P	V F P S	Q S G	P S L	P L N G R S
				← <i>kasU</i>

**図 5.1.1 *kasT* 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**  
 制限酵素認識部位には下線を引き塩基配列上段に制限酵素名を記載した。*kasT* の開始コドン (GTG), 終止コドン (TGA) および *kasU* の終止コドン (TAG) に相当する塩基を枠で囲んだ。*kasT* の転写終結シグナル (nt 2363-2383) と *kasU* の転写終結シグナル (nt 2416-2444) は傍点 (・) で示した。*kasT* 及び *kasU* (C末端側の一部) のアミノ酸配列 (一文字表記) を塩基配列下段に記載した。また、*KasT* のHTHモチーフは二重下線で示した。*kasT* の推定リボソーム結合配列は下線で示した。

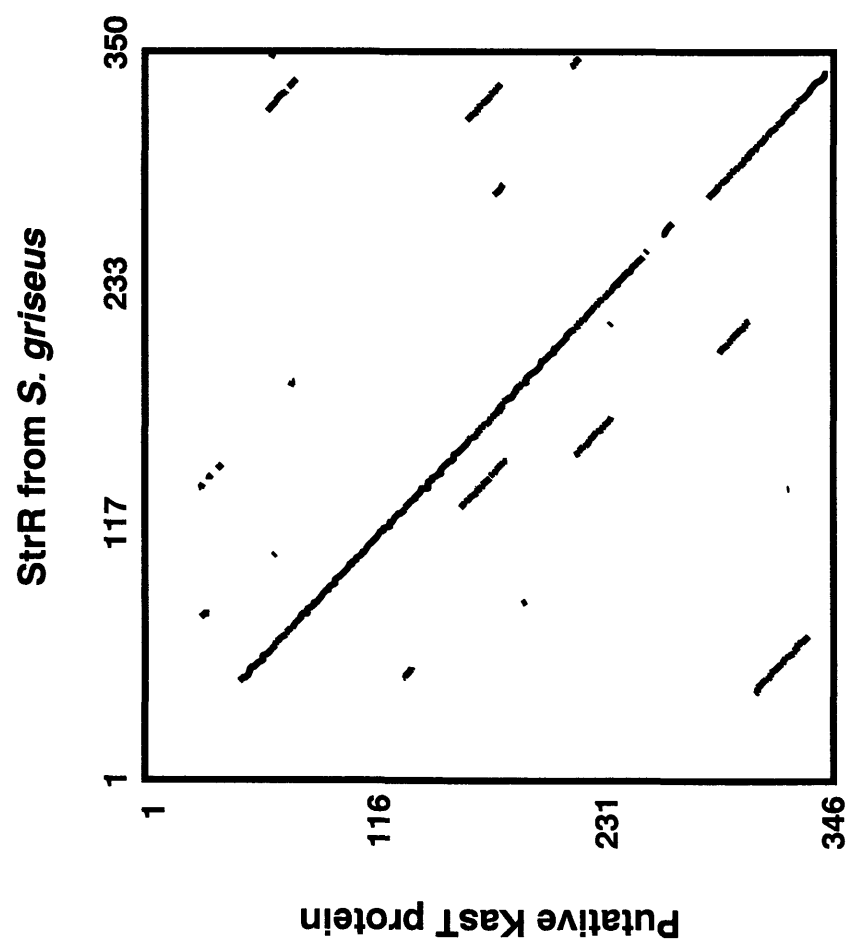


図 5.1.1.2 ホモロジープロット解析  
Window size: 30, Stringency: 8

## 第2節 *kasT* と *kas* 遺伝子群との転写とカスガマイシン生産との関連

### 5.2.1 *S. kasugaensis* M338-M1 株の液体培養におけるカスガマイシン生産

M338-M1 株の孢子懸濁液を MR 培地に加えて、27 °C にて培養を開始した。培養開始後 24 時間目に菌体および培養液を回収し、その後 24 時間毎に 120 時間まで菌体と培養液を経時的に回収した。培養液は pH が中性であることを確認後、フィルター滅菌した。この培養ろ液を用いて、KSM 生産をバイオアッセイ法にて検討した。その結果、培養開始 48 時間までは KSM の生産は認められなかったが、72 時間で 579 µg/mL、96 時間で 1,158 µg/mL そして 120 時間で 1,838 µg/mL の KSM 生産が確認された（図 5.2.1）。

### 5.2.2 *kasT* と *kas* 遺伝子群との転写時期の比較

*kas* クラスター内に位置する *kas* 遺伝子群の転写単位は、その塩基配列情報、各遺伝子の転写方向および第 1 編、第 4 章で行った RT-PCR の結果などから判断して、*kasT*, *kasU*, *kasJ*, *kasKLM* (*kasKLM* については第 1 編、第 6 章で論ずる), *kasNO*, *kasPQ*, *kasRA*, *kasBCDEF* (但し、*kasBCDEF* については全領域に対する PCR 反応がうまく進行しないことから、*kasCD* および *kasEF* の 2 領域について解析した), *kasG*, *kac*<sup>338</sup>, *kasI* と推定された。そこで、これらの領域に対して RT-PCR 法により転写時期を検討した。

前節 5.2.1 で経時的に回収した各菌体より total RNA を抽出して RT-PCR の試料とした。RT-PCR には、第 2 編、第 1 章、第 3 節の表 1.3.3 に示した合成プライマーを用い、またこれらにより増幅される領域を図 5.2.2 に示した (但し、予備実験において、何らかの理由によって *kasG* と *kasI* については転写が確認できなかったため本実験では除外した)。その結果、図 5.2.3 に示すように *kas* 遺伝子群の一部は、KSM 生産が確認されない 48 時間目においてすでに転写されていた。また、*kasT* の転写は培養開始から 24 時間以内に開始され、培養後期に至るまで継続していることが判った。*kasT* の転写が他の *kas* 遺伝子群に先がけて開始されていたことは、*kasT* 遺伝子産物が *kas* 遺伝子群の転写調節因子として機能している可能性を示唆していた。また、いずれの *kas* 遺伝子群も培養開始 72 時間で転写量が最大となり、その後徐々に転写量が減少する傾向が見られた。

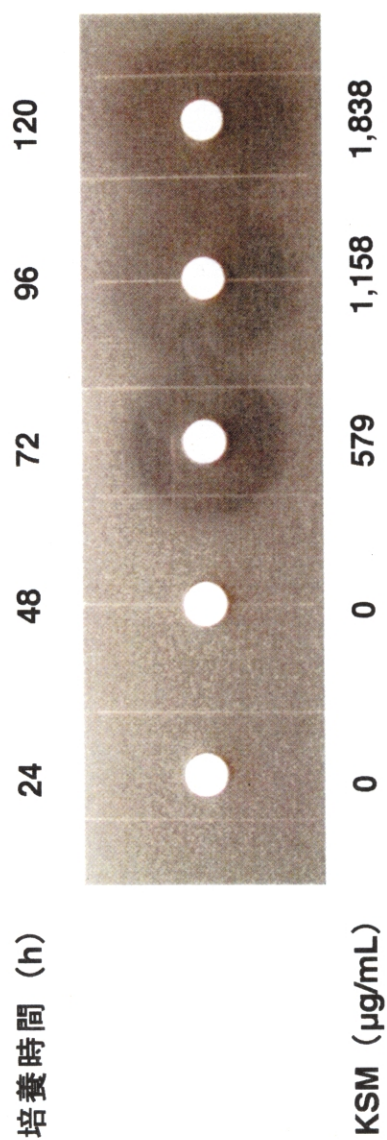


図 5.2.1 *S. kasugaensis* M338-M1株におけるカスガマイシン生産量の経時変化  
図の上段には、サンプル回収時の培養時間 (h) を記載した。また、図の下段には培養液中のKSM濃度 (μg/mL) を示した。





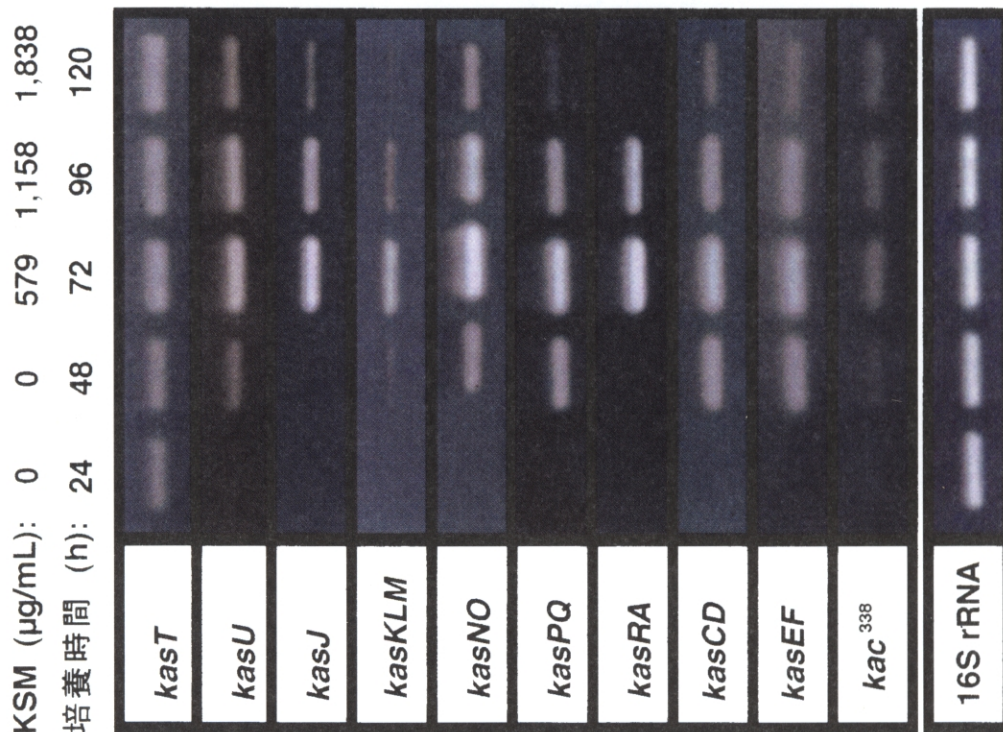


図 5.2.3 カスガマイシン (KSM) 生産と*kas*遺伝子群の転写解析

### 5.2.3 *S. kasugaensis* MB273-C4 株由来のカスガマイシン非生産変異株 R6D4 における *kas* 遺伝子群の転写

*S. kasugaensis* MB273-C4 株は *S. kasugaensis* M338-M1 株とは異なる土壌から分離された KSM の生産株で、プラスミド pSK 1 および pSK 2 を保有している。本菌株をプロトプラスト化したのち再生を行うことによりこれら 2 プラスミドを消失した KSM 生産株 A1R6 が得られた (Akagawa *et al.*, 1984)。さらに、A1R6 株の RNA ポリメラーゼの  $\omega$  サブユニット遺伝子 (*rpoZ*) を aminoglycoside 3'-phosphotransferase 遺伝子 (*aphII*) を含む DNA 断片によって破壊して得られた変異株 R6D4 では KSM が非生産となることが判った (Kojima *et al.*, 2002)。著者は、この R6D4 株が KSM 非生産であることに着目して、本菌株において *kasT* を含む *kas* 遺伝子群の転写を RT-PCR により検討した。本節、5.2.3 および 5.2.5 で使用もしくは作成した菌株については、表 5.2.1 にまとめて記載した。

A1R6 株および R6D4 株を MR 培地に植菌して 27 °C にて培養を開始して 120 時間まで培養を行い、その間に 24 時間毎に菌体および培養ろ液を回収した。回収した各菌体より total RNA を抽出して RT-PCR の試料とした。RT-PCR で使用した合成プライマーは、第 2 編、第 1 章、第 3 節の表 1.3.3 に示した。

KSM 生産に関してはデータは示していないが回収した培養ろ液を用いてバイオアッセイにより A1R6 株は KSM を生産し、R6D4 は KSM を生産しないことを確認した。図 5.2.4 に示した RT-PCR の結果より、A1R6 株では KSM 自己耐性遺伝子 *kac*<sup>273</sup> と *kas* 遺伝子群 (*kasT*, *kasU*, *kasJ*, *kasKLM*, *kasNO*, *kasPQ*, *kasRA*, *kasCD*, *kasEF*) の転写は確認されたが、R6D4 株では *kac*<sup>273</sup> と第 6 章で述べる KSM のトランスポーター遺伝子 *kasKLM* を除く全ての *kas* 遺伝子群 (*kasT*, *kasU*, *kasJ*, *kasNO*, *kasPQ*, *kasRA*, *kasCD*, *kasEF*) の転写が抑制されていることが明らかとなった。すなわち、R6D4 株では *kasT* をはじめとする KSM 生合成に関与する *kas* 遺伝子群の転写が行われないために KSM 非生産となっていることが明らかとなった。またこの結果は、*rpoZ* は KSM 生合成に関与する *kas* 遺伝子群の転写には関係しているが、KSM 自己耐性に関与すると考えられる遺伝子群 (*kac*<sup>273</sup> および *kasKLM*) の転写には関係しないことを示唆している。

### 5.2.4 *kasT* 発現プラスミドの構築

著者は、R6D4 株では *kasT* のプロモーターが、おそらく *rpoZ* が関与している何らかのメカニズムによって転写されないため、KasT が生成されずに KSM 生合成に関与する *kas* 遺伝子群の転写が抑制され、その結果、KSM 非生産となっているのではないかと考えた。すなわち、R6D4 株において *kasT* を強制的に発現させれば KSM 生産が復帰するのではな

いかと考えた。

そこでまず、*kasT* の恒常的発現が可能なプラスミドを構築した。*S. kasugaensis* MB273-C4 株由来のプラスミド pSK1 より作製された pSK1171 (表 5.2.2) は、マルチクローニングサイト (MCS) 上流にエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーター (*ermE*-p) を有しており (Bibb *et al.*, 1985), MCS に *kasT* の構造遺伝子部分を *ermE*-p と順向きに導入すれば、*Streptomyces lividans* や *S. kasugaensis* において *kasT* を高レベルに恒常的に発現させることが可能である。*kasT* 構造遺伝子領域は、表 5.2.3 に示した合成プライマーを使用して PCR 法により増幅した。反応条件は、第 2 編、第 2 章、第 4 節に記載した反応条件 2) を用いた。得られた 1,120 bp 増幅断片を制限酵素 *Hind*III で完全消化した後、pSK1171 の *Hind*III サイトに挿入し、*ermE*-p に対して *kasT* が順向きに挿入されたプラスミドを選択して pSK1171-*kasT* と命名した (表 5.2.2)。

#### 5.2.5 R6D4 株における *kasT* の発現とカスガマイシン生産の復帰

pSK1171-*kasT* を用いて R6D4 株を形質転換して形質転換株 R6D4 / pSK1171-*kasT* 株を得た。R6D4 / pSK1171-*kasT* 株における *kas* 遺伝子群の転写を RT-PCR により検討した。R6D4 / pSK1171-*kasT* 株を MR 培地に植菌し、27 °C にて培養を開始した。培養開始から 24 時間毎に 120 時間まで経時的に菌体および培養ろ液を回収した。回収した各菌体より total RNA を抽出して RT-PCR の試料とした。RT-PCR で使用した合成プライマーは、第 2 編、第 1 章、第 3 節の表 1.3.3 に示したものをを用いた。また、A1R6 株と pSK1171 により形質転換された R6D4 株 (R6D4 / pSK1171 株) を同様に培養し、菌体と培養ろ液を回収してそれぞれを RT-PCR およびバイオアッセイにおけるポジティブコントロールとネガティブコントロールとして使用した。

図 5.2.5 に示すように、R6D4 / pSK1171-*kasT* 株においては *kasT* が強く転写されていることが確認された。また、R6D4 / pSK1171-*kasT* 株では、R6D4 株で転写が抑制されていた *kas* 遺伝子群の転写が全て回復していることが明らかとなった。さらに、R6D4 / pSK1171-*kasT* 株における KSM 生産の有無を、バイオアッセイ法にて検討した。その結果、図 5.2.6 に示したように、ポジティブコントロールの A1R6 株と比較すると生産量は少ないものの、R6D4 / pSK1171-*kasT* 株の培養ろ液においても KSM による阻止円が見られ、本形質転換株において KSM の生産が復帰していることが判った。

表 5.2.1 *kasT* 発現実験に使用した *Streptomyces kasugaensis* MB273-C4 由来の菌株

菌 株	性 質	参考文献
A1R6	<i>S. kasugaensis</i> MB273-C4株からプラスミド(pSK1, pSK2)を消失して得られた菌株。	Akagawa et al., 1984
R6D4	A1R6株の <i>rpoZ</i> 遺伝子破壊株。気中菌糸形成およびKSM生産性を消失した変異株。	Kojima et al., 2002
R6D4 / pSK1171- <i>kasT</i>	R6D4株をpSK1171- <i>kasT</i> により形質転換した株。 <i>ermEp</i> により <i>kasT</i> が恒常的に高発現している。	This work

表 5.2.2 *kasT* の恒常的な発現実験に用いたプラスミド

プラスミド	長さ (kb)	耐性マーカー	
pSK1171	7.52	<i>tsr</i>	チオストレプトン耐性遺伝子 ( <i>tsr</i> ) およびメラニン産生遺伝子 ( <i>melE</i> ) [エリスロマイシン耐性遺伝子プロモーター ( <i>ermEp</i> ) + マルチクローニングサイト + メラニン産生遺伝子の構造遺伝子部分] を有する pSK1* の誘導体ベクター。
pSK1171- <i>kasT</i>	8.64	<i>tsr</i>	pSK1171 のマルチクローニングサイト中の <i>HindIII</i> に、PCR により増幅した <i>kasT</i> 構造遺伝子断片 (1,120 bp, <i>HindIII</i> DNA断片) を挿入して <i>kasT</i> を恒常的に強制発現させるためのプラスミド。

\*pSK1: *S. kasugaensis* MB273-C4株より単離された7.20kbの*pock*形成プラスミド

表 5.2.3 *kasT* 構造遺伝子領域のPCR増幅に使用した合成プライマー

プライマー	配 列
5'-THind 3	5'-GGAAGCTTGAGAGGCTCCCCGGTGG-3' <i>HindIII</i>
3'-THind 3	5'-GGAAGCTTGGCCCTGGGATCTCGTACT-3' <i>HindIII</i>



図 5.2.4 A1R6株とR6D4株における*kas*遺伝子群の転写解析  
A1R6株はMB273-C4株由来のプラスミド消失株でKSMを生産する。R6D4株はA1R6株の*rpoZ*を破壊して得られた変異株でKSMを生産しない。16S rRNAは両株の遺伝子発現のコントロールとして調べた。



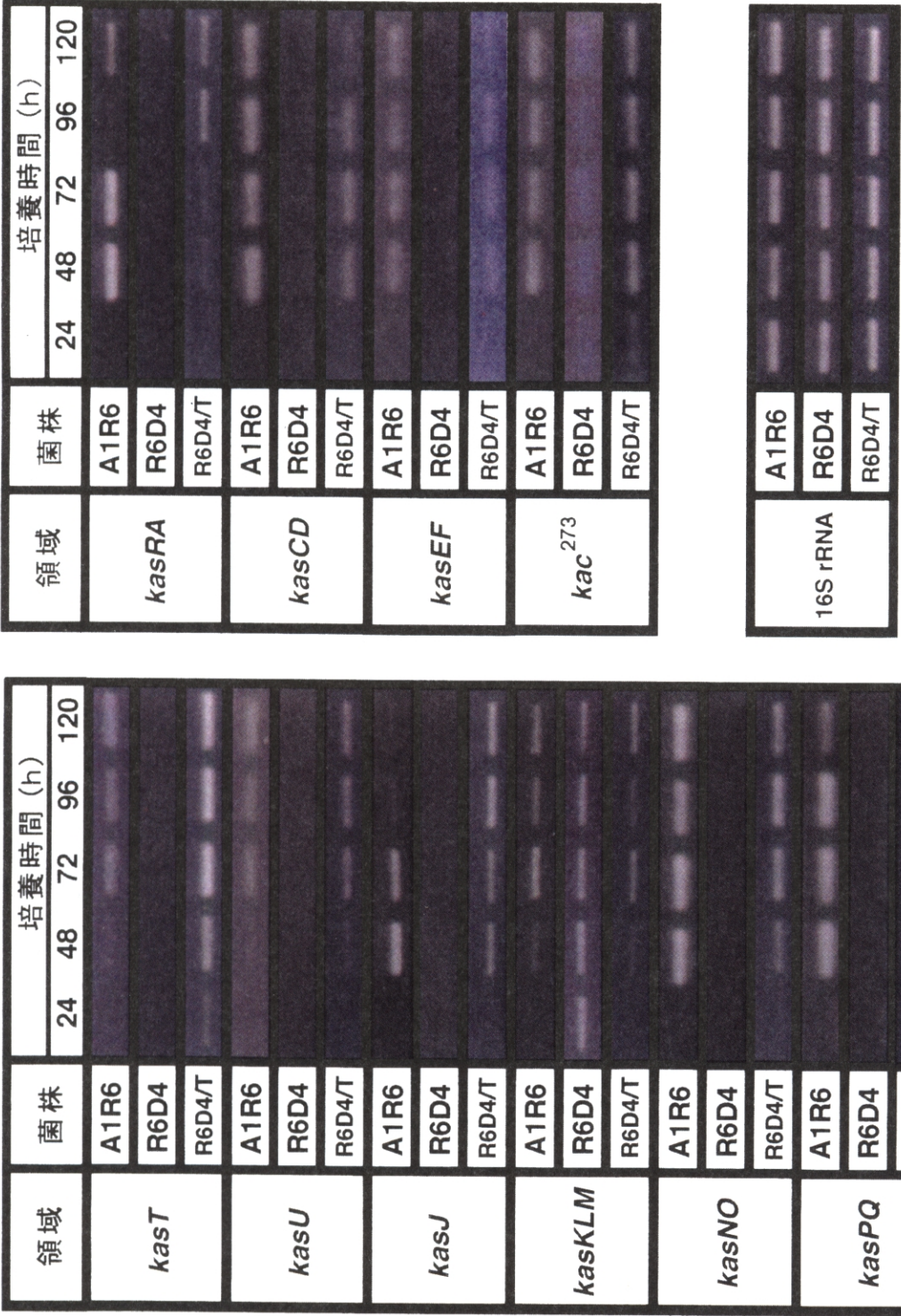


図 5.2.5 A1R6株, R6D4株および*kasT*を恒常的に強制発現させたR6D4/pSK1171-*kasT*株における*kas*遺伝子群の転写解析  
A1R6株はKSMを生産し, R6D4株は*rpoZ*の破壊によりKSMを生産しない。R6D4/pSK1171-*kasT*株 (R6D4/T) は R6D4株をpSK1171-*kasT*にて形質転換して*kasT*を恒常的に強制発現させた株である。16S rRNAは, 各株での遺伝子発現のコントロールとして調べた。

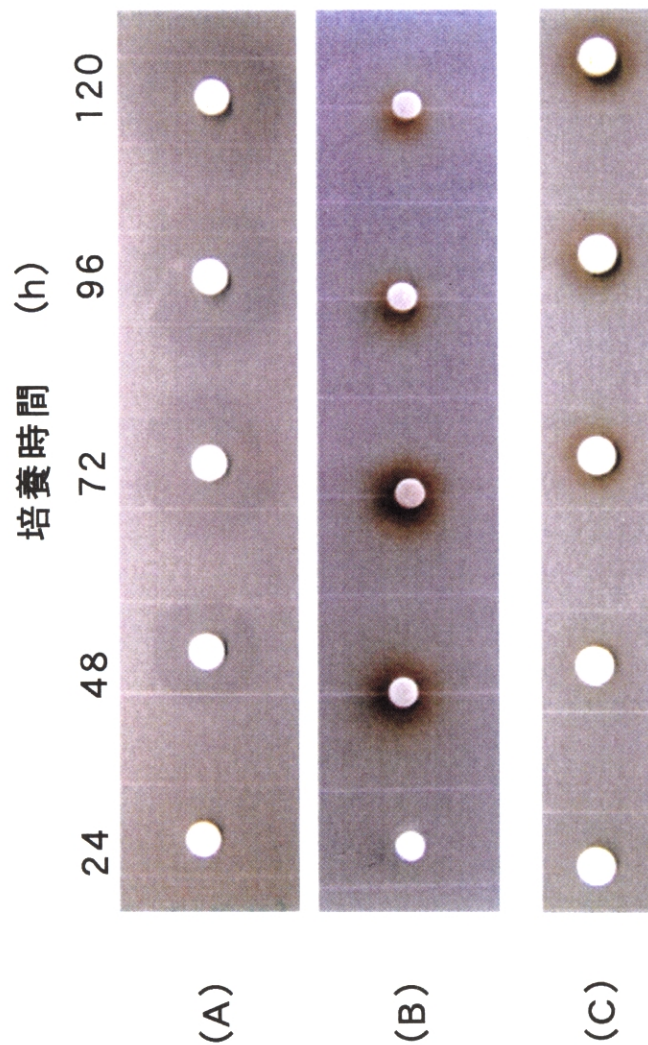


図5.2.6 R6D4/pSK1171-*kasT*株のカスガマイシン生産の復帰  
バイオアッセイは、各菌株をMR培地にて培養して得られた培養ろ液を25  $\mu$ Lずつペーパー  
ディスクに添加して行った。(A) A1R6株のKSM生産。A1R6株はKSMを生産するポジティ  
ブコントロール株である。(B) R6D4/pSK1171株のKSM生産。R6D4/pSK1171株は*rpoZ*  
破壊によるKSM非生産菌株 R6D4を、pSK1171にて形質転換したネガティブコントロール  
株である。(C) R6D4/pSK1171-*kasT*株のKSM生産。R6D4/pSK1171-*kasT*株はR6D4  
株をpSK1171-*kasT*にて形質転換して*kasT*を恒常的に強制発現させた菌株である。



### 第3節 Trx-KasT 融合タンパク質の発現と精製

#### 5.3.1 Trx-KasT 融合タンパク質発現プラスミドの構築

著者は、*kasT* 構造遺伝子領域を表 5.3.1 に示した合成プライマーを用いて、PCR 法により増幅した。反応条件は、第2編、第2章、第4節に記載した反応条件2)で行った。得られた 1,073 bp 増幅断片を制限酵素 *NcoI* で完全消化した後、*BamHI* にて部分消化した。この断片を pET32a(+)(第2編、表 1.3.1)に挿入し、得られた組換えプラスミドを pET-KasT と命名した(表 5.3.2)。

#### 5.3.2 Trx-KasT 融合タンパク質の発現と精製

著者は、前節 5.3.1 で作製した pET-KasT を用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、チオレドキシントタンパク質 (Trx) との融合タンパク質 (Trx-KasT) として KasT を発現させた。Trx-KasT の精製は、His-Tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより行った。Trx-KasT は、109 アミノ酸からなるチオレドキシンドメイン領域、2つの His-Tag 領域を含み 50 アミノ酸からなるジャンクション領域、そして 346 アミノ酸からなる KasT で構成され、分子量は約 56 k と推定された(図 5.3.1 の (A))。アフィニティークロマトグラフィーにより精製された組換えタンパク質の分子量は、SDS-PAGE により推定どおり 56 k であることが判った(図 5.3.1 の (B))。

### 第4節 KasT の DNA 結合領域の解析

SM 生合成遺伝子クラスターにおける経路特異的転写活性化因子 StrR の DNA 結合認識配列は、GTTCGActG (N)<sub>11</sub>CagTcGAAC と提唱されている (Retzlaff & Distler, 1995)。著者は KasT の DNA 結合認識配列が StrR と類似しているのではないかと考え、StrR 結合認識配列と相同性を示す領域の検索を試みたが、*kas* クラスター内には見出せなかった。そこで、*kas* クラスターにおいてプロモーターが存在すると考えられる *kasT* 上流領域、*kasU-kasJ* 間領域、*kasKLM* 上流領域、*kasN* 上流領域、*kasQ-kasR* 間領域そして *kasB* 上流領域(図 3.2.1)について前節で精製した Trx-KasT を用いてゲルシフト解析を行った。各領域の PCR 増幅に使用した合成プライマーは表 5.4.1 に示した。その結果、Trx-KasT は *kasU-kasJ* 間領域(図 5.4.1 の (B) と (C))、*kasN* 上流領域(図 5.4.3)、および *kasQ-kasR* 間領域(図 5.4.4)にそれぞれ結合することが明らかとなった。しかし、*kasT* 上流領

域 (図 5.4.1 の (A) ) , *kasK* 転写開始点周辺領域 (図 5.4.2) および *kasB* 上流域 (図 5.4.5) には Trx-KasT の特異的な結合は確認されなかった。また、データは示していないが、チオレドキシントンパク質部分のみでは上述の DNA 結合活性は認められなかった。

以上の結果と、本章 第 2 節 5.2.5 で得られた結果より、著者は、KasT が *kasU-kasJ* 遺伝子間領域、*kasN* 上流領域および *kasQ-kasR* 遺伝子間領域に直接結合して、*kasU*、*kasJ*、*kasNO*、*kasPQ*、そして *kasRA* の転写を活性化する転写活性化因子として機能していると考察した。

## 第 5 節 考察と小括

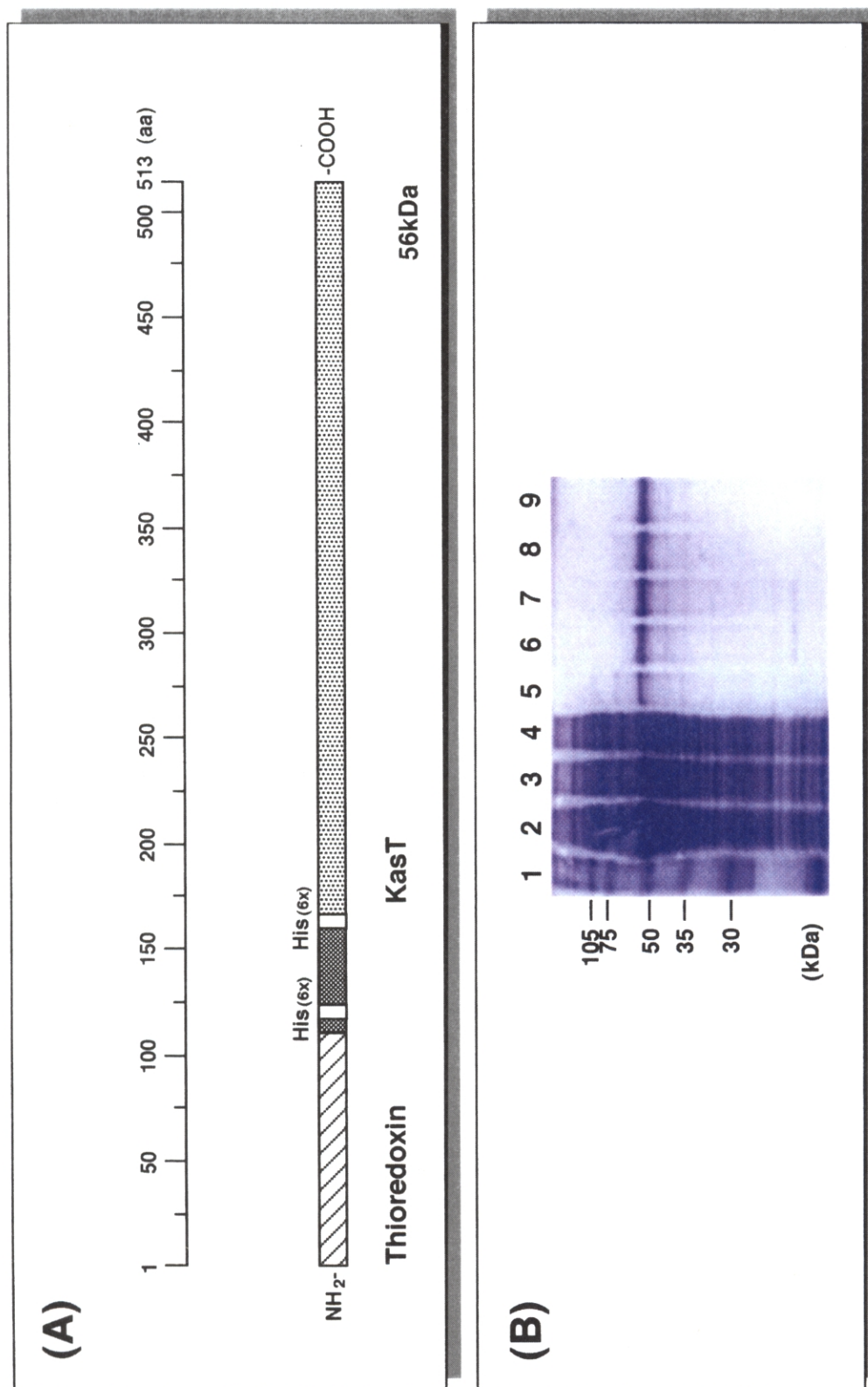
著者は、M338-M1 株の *kas* 遺伝子群のなかで *kasT* が最も早期に転写され、続いて他の *kas* 遺伝子群が転写され、そのあとで KSM 生産が開始されることを明らかにした。M338-M1 株における *kas* 遺伝子群の転写パターンを解析すると、いずれも KSM 生産が確認される以前から開始されており、培養開始から 24 時間毎の検討結果からは 72 時間で転写量が最大となり、その後徐々に減少した。M338-M1 株では、長時間の培養により菌体が“老化”して KSM の生産性が減弱することが報告されている (Sawa *et al.*, 1968)。菌体の老化に伴う KSM 生産性の減弱は、*kas* 遺伝子群の転写量が培養後期に減少することと関連していると考えられる。培養後期に見られる *kas* 遺伝子群の転写抑制機構を明らかにして転写量を一定に保つことが出来れば、KSM の発酵生産性の向上が期待できる。

*kas* クラスター内の *kasT* は HTH モチーフを有する DNA 結合タンパク質遺伝子で、その遺伝子産物 KasT は SM 生合成遺伝子クラスターの経路特異的転写活性化因子 StrR とアミノ酸レベルで 50% の identity を有していた。著者は、MB273-C4 株由来で *rpoZ* 欠損により KSM が非生産となった変異株 R6D4 において、*kasT* を含め KSM 生合成への関与が推定された *kas* 遺伝子群の転写が全て抑制されていることを明らかにし、さらに R6D4 株で *kasT* を強制発現させることによりこれら *kas* 遺伝子群の転写が再び開始されて、KSM の生産が復帰することを明らかにした。また、*in vitro* において KasT は、*kas* クラスター内の *kasU-kasJ* 間、*kasN* 上流および *kasQ-kasR* 間の DNA 領域に結合することが判明した。以上の結果より、著者は KasT が *kas* クラスターにおける経路特異的転写活性化因子であると結論した。*kasT* を強制発現させた R6D4 株では、*kasCD* および *kasEF* 領域の転写も活性化されるが、*kasB* 上流領域に対する KasT の結合は観察されておらず、本領域の転写活性化機構に関しては今後の課題である。また、*kasT* の発現について *rpoZ* の関与が示唆さ

れたが、その詳細なメカニズムの解明も今後の研究課題である。

現在までに多くの抗生物質生合成遺伝子クラスターから、経路特異的転写調節遺伝子が見出されている（表 5.1.1）。特に OmpR 様の DNA 結合領域を持つ *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins (SARPs) ファミリーに属する多数のタンパク質が報告され（Mizuno & Tanaka, 1997 ; Wietzorrek *et al.*, 1997）, 経路特異的転写調節因子の主要ファミリーを形成している。本研究で著者が見出した KasT は、スペクチノマイシン生合成の SpcR, ノボビオシン生合成の NovG およびコンプレスタチン生合成の ComG などとともに StrR の相同タンパク質である（Lyutskanova *et al.*, 1997 ; Steffensky *et al.*, 2000 ; Chiu *et al.*, 2001）。StrR を代表とするこれら経路特異的転写調節因子群は、抗生物質生産放線菌において SARPs と並ぶ主要ファミリーの 1 つと考えることができる。





**図 5.3.1 Trx-KasTの発現と精製**  
 (A) Trx-KasTの推定一次構造。 (B) Ni-NTAアガロースを用いたTrx-KasTの精製。レーン 1: 分子量マーカー。レーン 2: Cell lysate。レーン 3: Flow-through。レーン 4, 5: Wash (20 mM imidazole)。レーン 6~9: Elution (250 mM imidazole)。

表 5.4.1 ゲルシフト解析に使用した合成プライマー

領域	増幅断片	プライマー	配列
<i>kasT</i> 上流	8A	5'-GS8a	5'-GGCGATGCGGTGCTCGGAAC-3'
		3'-GS8a	5'-GTTTCGACTGGTCACGCGTT-3'
	8B	5'-GS8b	5'-GCCTACCGAACCGTGGGAGATG-3'
		3'-GS8b	5'-AGATCGGCCATTTCCTCCGAGG-3'
	8C	5'-GS8c	5'-CGTGCTATGGCCGAACCTTTTGC-3'
		3'-GS8c	5'-GAGCCTCTCGGTCGATGATGTT-3'
<i>kasU-kasJ</i> 遺伝子間領域	26A	5'-GS26a	5'-GGGAATTCCGGGGTCCGGGCACAC-3'
		3'-GS26a	5'-CACACACCTGAGTCCGGGCAAGG-3'
	26B	5'-pKS26a	5'-CTCGACACTTCTCGACGCTCTCCCT-3'
		3'-pKS26a	5'-GCACAGTTCAGCCTCATTTCTTGT-3'
	23	5'-GS23a	5'-CACGGCCGACGGCTCATGGATGGTG-3'
		3'-GS23a	5'-ACTCTGCATAATCCCCCACACCTAT-3'
<i>kasN</i> 上流	15	5'-NXba1	5'-GGTCTAGAGCAGGAGTTCGCCGTACGGGCA-3'
		3'-NBam1	5'-GGGGATCCTTCAGGGGTGGTGCGGGCGGA-3'
	19A	5'-pKS19B	5'-GAGCTTGATGGCTTCGGGCGAGTT-3'
		3'-pKS19	5'-GCGCAATCAACCCTGCGACGGGAA-3'
<i>kasPQ-kasRA</i> 遺伝子間領域	19B	5'-pKS19C	5'-TTGACATGCAAGGGAAGTCGAAA-3'
		3'-pKS19C	5'-CGCCGCACGCTAACACACGCGACC-3'
	19C	5'-pKS19	5'-CACTCCGGCTGCGGTACATGAGTAA-3'
		3'-pKS19B	5'-GTACCGTCCCCACCAAGCGTGAATGA-3'
	7	5'-pKS71	5'-GCAAGCTTACTGGGCGCCTGGCT-3'
		3'-pKS7	5'-GGTGATCATGCCGATGTCGAAGA-3'

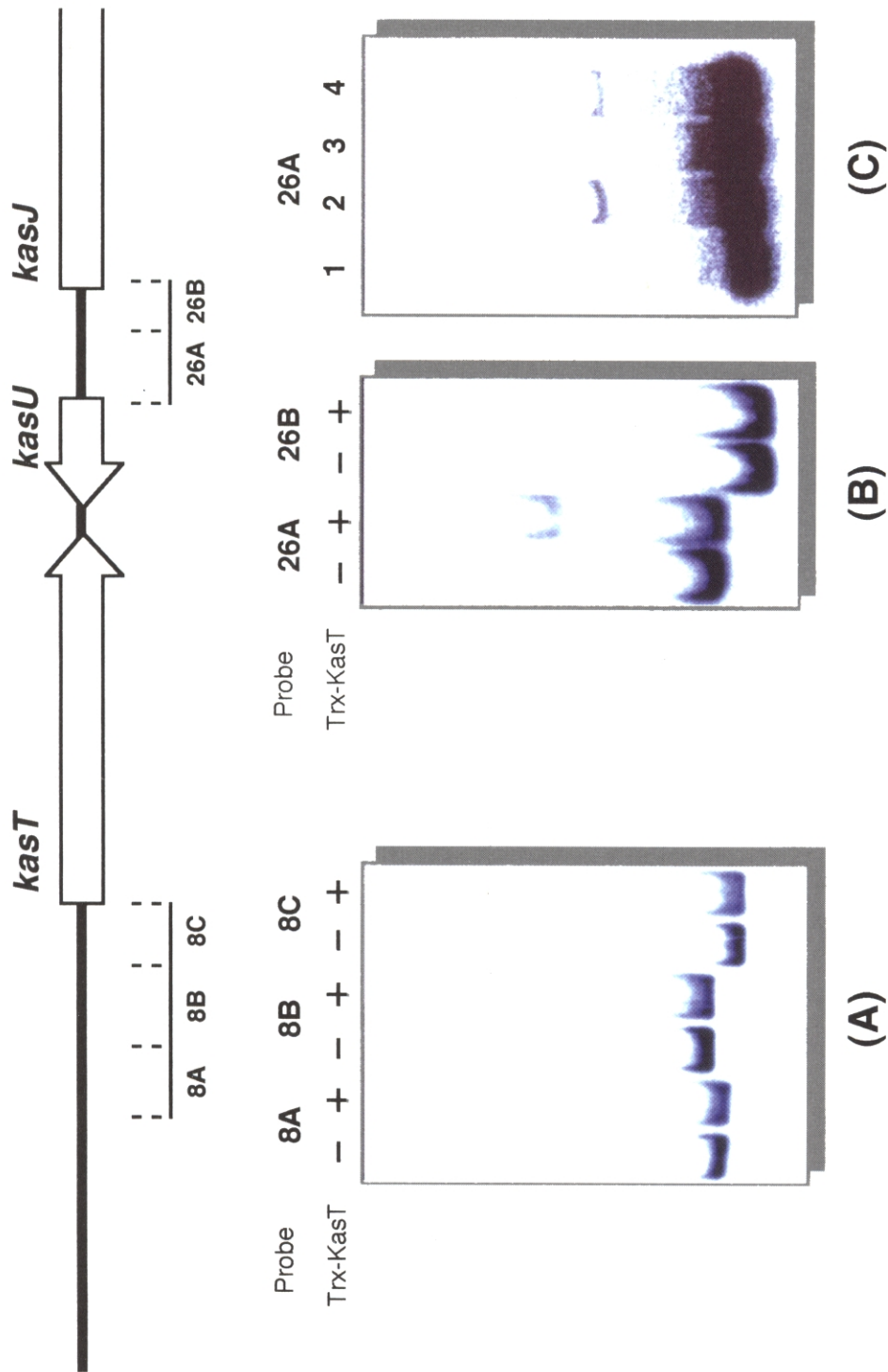


図 5.4.1 *kasT* 上流領域および *kasU-kasJ* 遺伝子間領域に対するゲルシフト解析  
 (A) *kasT* 上流領域に対するゲルシフト解析結果。  
 (B) *kasU-kasJ* 遺伝子間領域 26A に対するゲルシフト解析結果。  
 (C) *kasU-kasJ* 遺伝子間領域 26B に対する Trx-KasT の特異的結合。レーン 1 : プローブのみ。レーン 2 : プローブ + Trx-KasT。レーン 3 : プローブ + Trx-KasT + competitor (200 ng)。レーン 4 : プローブ + Trx-KasT + noncompetitor (400 ng)。

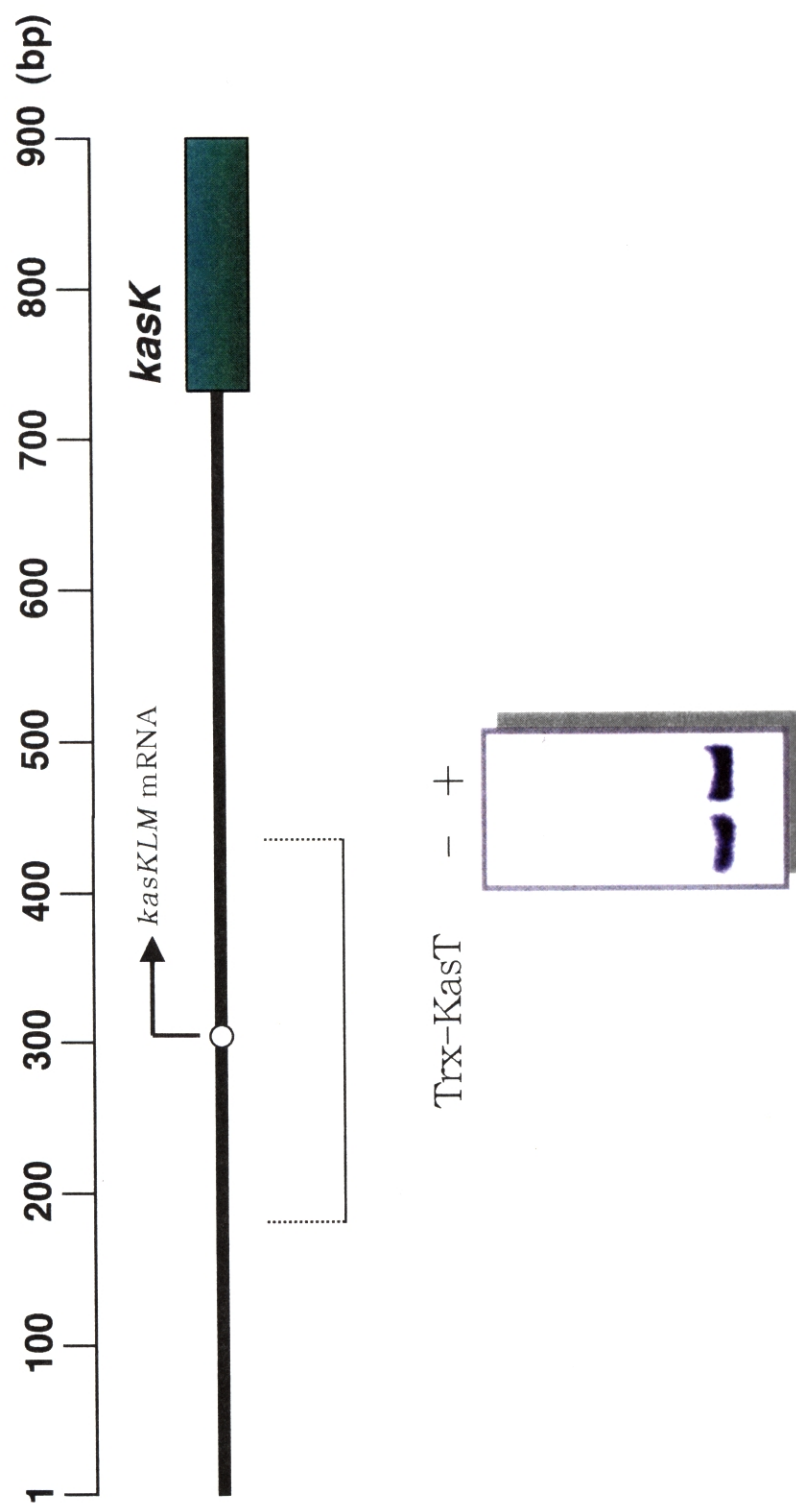


図 5.4.2 *kasK* 上流領域に対するゲルシフト解析



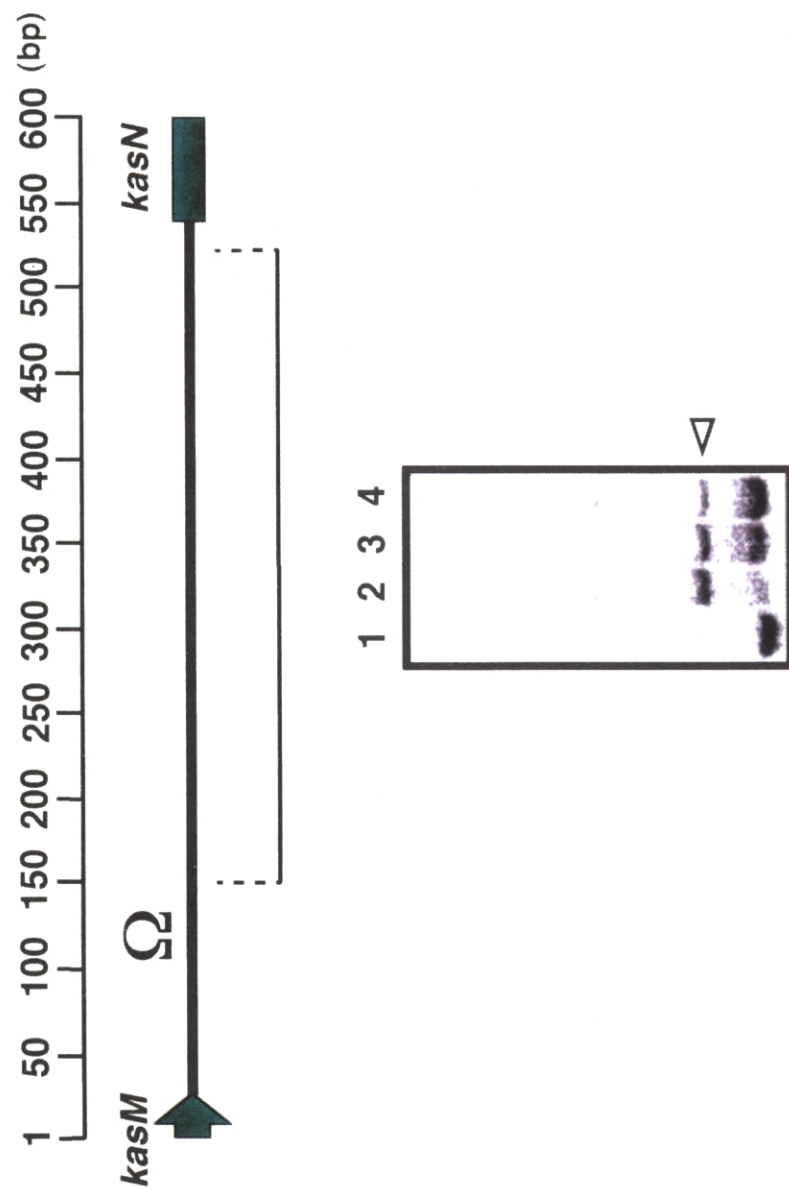


図 5.4.3 *kasN*上流領域に対するゲルシフト解析  
 白抜き $\nabla$ はシフトしたバンドを示している。また、 $\Omega$ は*kasM*の転写終結シグナルを  
 示している。レーン1：プローブのみ。レーン2：プローブ+Trx-KasT。レーン3：  
 プローブ+Trx-KasT+competitor (700 ng)。レーン4：プローブ+Trx-KasT+  
 competitor (1.5  $\mu$ g)。

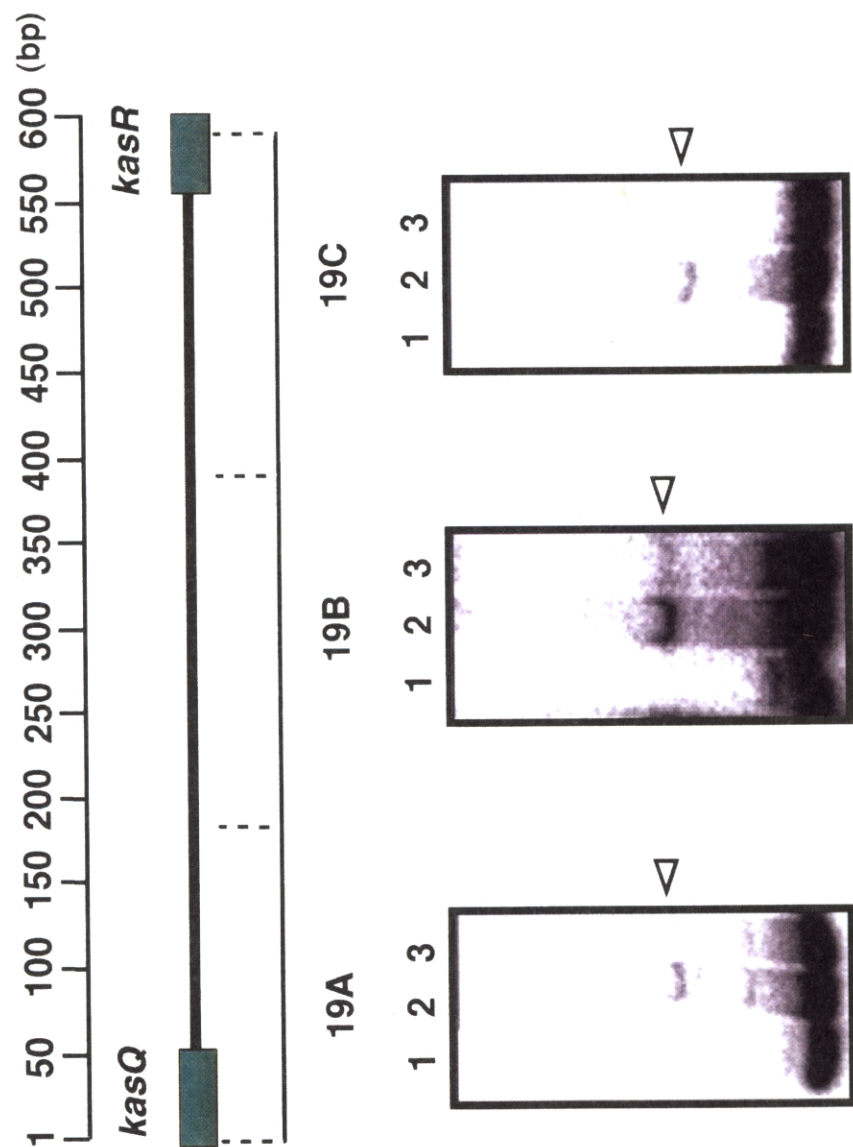


図 5.4.4 *kasQ-kasR* 遺伝子間領域に対するゲルシフト解析  
白抜きの▽はシフトしたバンドを示している。レーン1：プローブのみ。  
レーン2：プローブ+Trx-KasT。レーン3：プローブ+Trx-KasT+competitor。

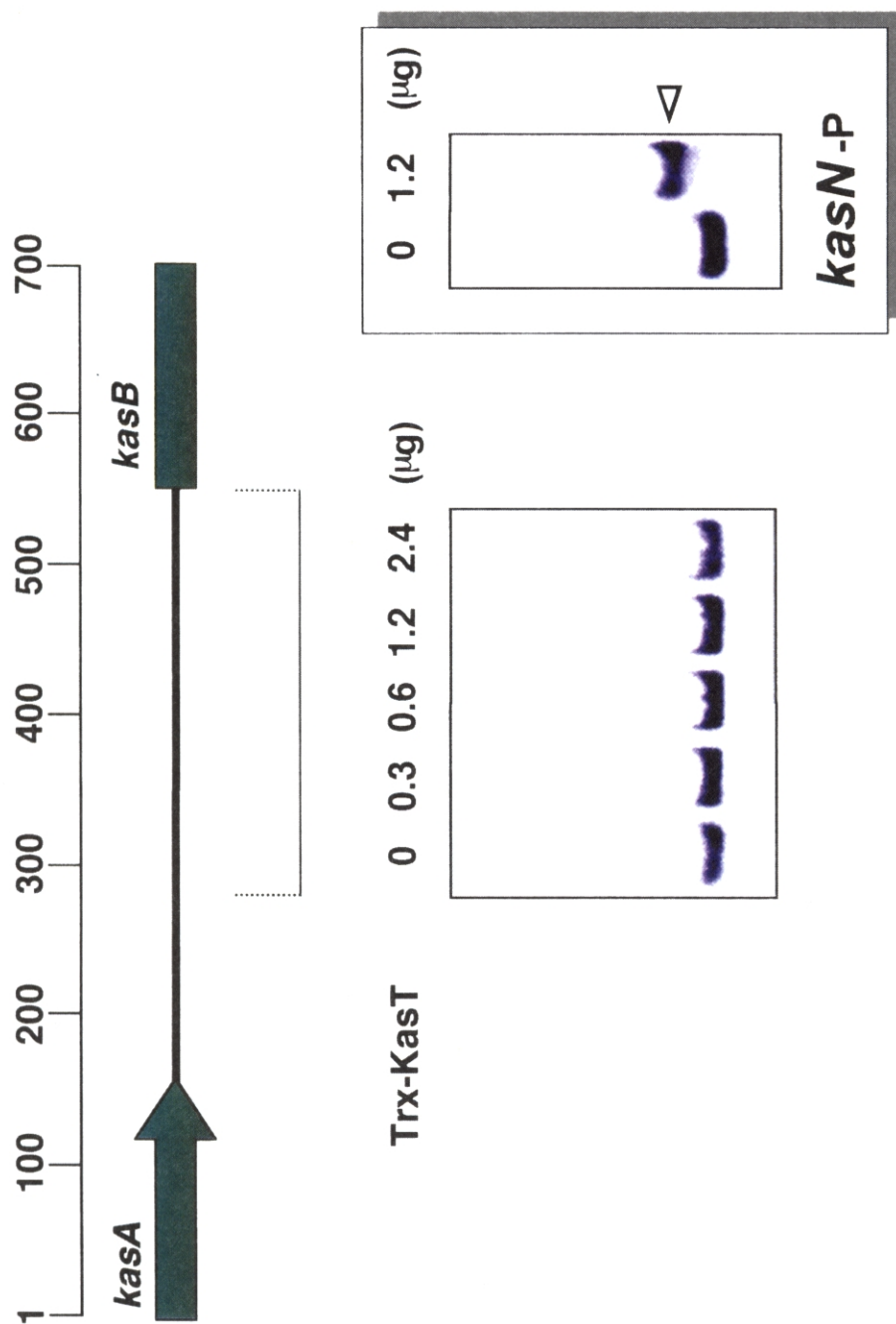


図 5.4.5 *kasB*上流領域に対するゲルシフト解析  
右側に示した枠内に、*kasN*上流領域をプローブとして行ったゲルシフト解析の結果を  
ポジティブコントロールとして示した。各写真の上部に示した数字は、添加したTrx-KasT  
のタンパク質量を示している。