

第6章 *kas* クラスター内のカスガマイシン排出に関わる遺伝子群

抗菌物質をはじめとする多種多様な生理活性をもつ抗生物質を生産している放線菌は、自身の生産した抗生物質による自殺を避けるため、高度に発達した自己耐性機構を持っている。これらの機構は以下の3つに大別される (Cundliffe, 1989)。すなわち、

- 1) 生産した抗生物質に対して、生産菌が自身の一次作用点 (リボソームなど) を変化させて感受性を低下させる；
- 2) 生産した抗生物質を菌体内で化学的に修飾して不活性化させる；
- 3) 生産した抗生物質を効率良く菌体外へ排出する；

である。

これらのうち、3) では、膜内外におけるプロトンの濃度勾配を利用した膜輸送システムと ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターを介したシステムが知られており (Higgins, 1992)、ブレオマイシン、ミスラマイシン、SM などの生合成遺伝子クラスターから、次々と ABC トランスポーター遺伝子が見出された (Calcutt & Schmidt, 1994; Fernandez *et al.*, 1996; Beyer *et al.*, 1996)。このうち、ミスラマイシン生合成遺伝子クラスター内に見出された *mtrAB* 遺伝子群のコードする ABC トランスポーターは、ミスラマイシンへの自己耐性に必須であることが示唆されている (Fernandez *et al.*, 1996)。さらに、このような ABC トランスポーター遺伝子群を抗生物質の標的となる生物種に導入して発現させると、多くの場合その抗生物質に対して耐性を獲得することなどから (Kaur, 1997)、抗生物質生合成遺伝子クラスター内に見出される ABC トランスポーターの役割のひとつは、自身が生産する抗生物質の効率良い排出による自己耐性化であると考えられている。

本章では、KSM 生合成遺伝子クラスター内に見出された ABC トランスポーター遺伝子群 (*kasKLM*) の一次構造および推定タンパク質の特徴を述べ、*kasKLM* 領域がオペロンを形成していることについて述べる (Ikeno *et al.*, 2000)。さらに、著者は、大腸菌 JM109 株において *kasKLM* を発現させ、その形質転換株が KSM に対して高度の耐性を獲得することを示し、*kasKLM* が KSM トランスポーターをコードしていることを論じる (Ikeno *et al.*, 2000)。また、その構成には KasK, KasL および KasM の3種類のタンパク質が必須であることについても述べる。

第1節 *kas* クラスター内の ABC トランスポーター遺伝子群 (*kasKLM*)

kasK, *kasL* および *kasM* は, *kasJ* と *kasN* の遺伝子間領域に見出された (図 3.2.1)。*kasJ* と *kasK* の遺伝子間領域には, 推定 *kasJ* 転写終結シグナルが図 6.1.1 の nt 722-752 に見出された。また, 第1編, 第3章の図 3.1.2 の (B) で見出された低 (G+C) 領域 (G+C 含量: 57.2%) は, *kasK* 開始コドンの 210~480 bp 上流 (図 6.1.1 の nt 1033-1303) に位置していることが確認された。図 6.1.1 に示すように *kasK* 開始コドンの 9 bp 上流には推定 RBS 配列 (AAGGAG) が見出された。また, *kasM* と *kasN* の遺伝子間領域 (図 6.1.1 の nt 4062-4111) には *kasM* の転写終結シグナルが見出された。さらに, *kasK* の終止コドン (TGA) と *kasL* の開始コドン (ATG), *kasL* の終止コドン (TGA) と *kasM* の開始コドン (ATG) はそれぞれ ATGA で重複していた (図 6.1.1 における nt 2499-2502 および nt 3269-3272)。このように ATGA によって終止コドンと開始コドンが重複している遺伝子群は, ポリシストロニック mRNA に転写され, トランスレーショナルカップリングを受けている可能性が高い (Zalkin *et al.*, 1988; Guchte *et al.*, 1991)。実際に *kas* クラスターにおいても第1編, 第4章, 第1節における図 4.1.7 および図 4.1.8 において示されたように, *kasR* と *kasA* および *kasE* と *kasF* においても同様な重複が観察され, これらはポリシストロニック mRNA に転写されていた。

kasK, *kasL* および *kasM* は, それぞれ 329 アミノ酸からなる KasK (分子量 35.8 k, pI 6.58), 257 アミノ酸からなる KasL (分子量 27.5 k, pI 8.2), 240 アミノ酸からなる KasM (分子量 26.4 k, pI 9.56) をコードしている。モチーフ検索の結果, KasK は ATP 結合モチーフである Walker A および Walker B を1組有し, さらに Walker A と Walker B の間に loop 3 と呼ばれるモチーフを有していた (図 6.1.1) (Walker *et al.*, 1982; Hyde *et al.*, 1990)。各推定タンパク質のアミノ酸配列を基に相同性検索を行った結果, KasK は *Streptomyces peucetius* 由来のダウノルピシントランスポーターを構成する ATP 結合タンパク質 DrrA と 39%の identity を示したほか, *Streptomyces antibioticus* 由来のオレアンドマイシントランスポーターを構成する ATP 結合タンパク質 OleC と 39%, *Streptomyces argillaceus* 由来のミスラマイシントランスポーターを構成する ATP 結合タンパク質 MtrA と 37%の identity を示した (Guilfoile & Hutchinson, 1991; Rodriguez *et al.*, 1993; Fernandez *et al.*, 1996)。一方, KasL および KasM はともに ABC トランスポーターを構成する膜貫通タンパク質との相同性が得られた (表 6.1.1)。さらに, KasL および KasM の疎水性領域の検索を行った結果, 図 6.1.2 に示すように KasL および KasM はともに複数の疎水性領域 (値が 0.00 より高くなっている部分) が観察され, これらが膜貫通領域であろうことが示唆された。

SphI

GAGCGTGCGCGTCATGGCGGCCGCGCAAGGTGCAGTGGAAACGAGCATGCGGGCGCCGAGCACATGCTGATCGTCGTCACGGCACCGGTTCATGTCC 2600
S V R V M A A A A K V Q W N T S M R A P E H M L I V V T A P V M S

GTGATCTTCTGTCCATCGTGCGCTACAACGACCGCGACGACCTCGTGGCCAACGCGGTATCGGCACCGGATTGTTGCGTATCTGGTTCGTGGCGGTGG 2700
V I F L S I V R Y N D R D D L V A N A V I G T G L F G I W F V A V D

ACGTGCGCGCGCGTCATCCAGAACGAGCGGTGGATGTCCACCTTGGATCTCGTCTCGCGGCCACGGGCTTCGCCCTGGTCTGCGGACGCAT 2800
V A G G V I Q N E R W M S T L D L V L A A P R A F A L V V C G R I

CCTGCGCGTGATGCTGATCGGCGCCTTCACCTGGCGGAGTCTGGTGGTGGCCACGGTGGGCTTCGGGGTCCAACCTGCCGTGGCGCACCCCGGTATC 2900
L P V M L I G A F T L A E S W L V A T V G F G V Q L P V A H P G I

GCGCTGATCGCGTGATCGTGACGTTGCTGCCACCGCTGCACGGCGACGATGCTGGCGACGTTCTTCGTGATCAGCCGCGATACGACGATCTACCAGA 3000
A L I A L I V T L L A T A C T A T M L A T F F V I S R D T T I Y Q N

BamHI

ACGCGCTGAGCTATCCCTTCTACATCCTTGGCGCGGTGGTGTCCCGCTCTCCGTTCTGCCGACTGGATCCAGCCCTGGGACGCGTGATCTTCTGTGTC 3100
A L S Y P F Y I L G G V V F P L S V L P D W I Q P L G R V I F L S

CTGGTGGCGGATCTGCTGCGCGACAGCCTGTCCGGTGACGAAGTCCATGACGTGGTGCCGCGCTGGGGGCGATCGCGGGTCTGGGCGCCATCGCGCTC 3200
W S A D L L R D S L S G D E V H D V V P R L G A I A G L G A I A L

CTCCTCGGCATCGTCTCATCCGAAGGCCGCGGACCGCGCCCGGCGCACCGGGATGGTGAGCCTCGCATGATGGTGAAGCAGGTTCATCGGCCAGGCCGC 3300
L L G I V L I R K A A D R A R R T G M V S L A *
(RBS) M M V K Q V I G Q A A
kasM

ATTCGTGGGCTTCGCCGAGTTCAAGCACGTCTACACCCCAAGACTTGGCTCACGGGATGGATGCTGCGCCTGGTCAGCCAGGTGGTCTTCTTGGCCTG 3400
F V G F A E F K H V Y T P K T W L T G W M L R L V S Q V V F F G L

GTGGGCAAGATGGCGGGCGACCGGATCACGGCCGAGTACGTCCTGCTGGGCAACGCGGTGACGGTGATCGCGATCGAGGCCACGCTCGTGATCACACGG 3500
V G K M A G D R I T A E Y V L L G N A V T V I A I E A T L V I T T A

KpnI

CGTCGCTGGAGCGGTACCAGGGGACCTACCCCATGCTCGTCTCGTCTCGCCACGAACATGGGGCTGGTCTACCTCGGCCGCGGTCTGCACTGGGTGCTGGC 3600
S L E R Y Q G T Y P M L V V S P T N M G L V Y L G R G L H W V L A

CGGACTGGGCGAGTTCGCCCTTGTCTTCGCGCTGGTGTGGGCGCTCTTCGGGCCGACTGGAACCTGGCGGGTCGCTGTCTTCGCCCTGCCGTGCCTGATA 3700
G L G S S A L V F A L V W A L F R P D W N W R V A V F A L P C L I

GTGATCGGGCTCGGTGCCTATGTGTACGGAGCAATCCTGGCCGCGTGTTCGCTGCGCCACTACAAGTTCGCTGGGTGTACCTGAATTTTCGGCTTCATGG 3800
V I G L G A Y V Y G A I L A A C S L R H Y K F R W V Y L N F G F M V

TCCTGATGACCTTCTGCGGTACGAACGTTCCGCGGTCTTCTGGCCGGCGCCGATCGAGTGGGCCACCCAGGTCTGCCCTCTCGCACGGACTCACCGC 3900
L M T F C G T N V P R S F W P A P I E W A T Q V L P L S H G L T A

CATGCGCACCTGGCGGCCGCGGTCCGCTCTCGATGTCTCGGCCAACTGGGGCTGGAGGTCTGTGTGCGAGCCCTGTGGCGGCACTGACGCTGCTGT 4000
M R T L 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 *

-63.80kcal/mol

TCTTGAACGCATCGCGAGCAAGGGCCCGGGGACGGGTGCTGAACCTCACGTATGACGCTGTGCGGGCGGTGGTGGCGGCAACAGGCCCGGCACCA 4100
.....

SphI

CCGCCCGGCAGGCATGCGACGGCAGGAGTTGCCGTACGGGCAGCCCCGTTACCGCGCAAGCGCCCTATTCTTTCTGTCGTCACACCGTCCATAGC 4200
.....

EcoRI

CGCGCGGTGCCGTCTCGTGCGTCAATCGGTGAATTC 4236

図 6.1.1 *kasKLM*とその周辺領域を含む 4,236 bp *SacI*-*EcoRI*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

制限酵素認識部位は塩基配列の上段に示した。逆向き繰返し配列は傍点で示し、繰返し配列には下線と番号を付した。推定プロモーター配列は、-35配列および-10配列を枠で囲んだ。推定リボソーム結合配列は二重下線で示し (RBS) と記載した。*kasKLM*の重複箇所 (ATGA) は下線で示した。*KasK*タンパク質の Walker A, Walker B, loop 3 の各モチーフは、相当するアミノ酸配列を枠で囲んで示した。

表 6.1.1 KasLおよびKasMに関する相同性検索結果

推定タンパク質	相同タンパク質	生物名称	Identity (%)	Accession No.
KasL	Nodulation (membrane protein, NodJ)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	33	S08617
	Nodulation (membrane protein, NodJ)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	33	AF043118
	Nodulation (membrane protein, NodJ)	<i>Rhizobium</i> sp.	32	U53327-9
	ABC transporter (membrane protein, MtrB)	<i>Streptomyces argillaceus</i>	31	U43537-4

KasM	Nodulation (membrane protein, NodJ)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	30	S08617
	Nodulation (membrane protein, NodJ)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	32	B24400
	Nodulation (membrane protein, NodJ)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	31	AF043118
	Nodulation (membrane protein, NodJ)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	31	S10231

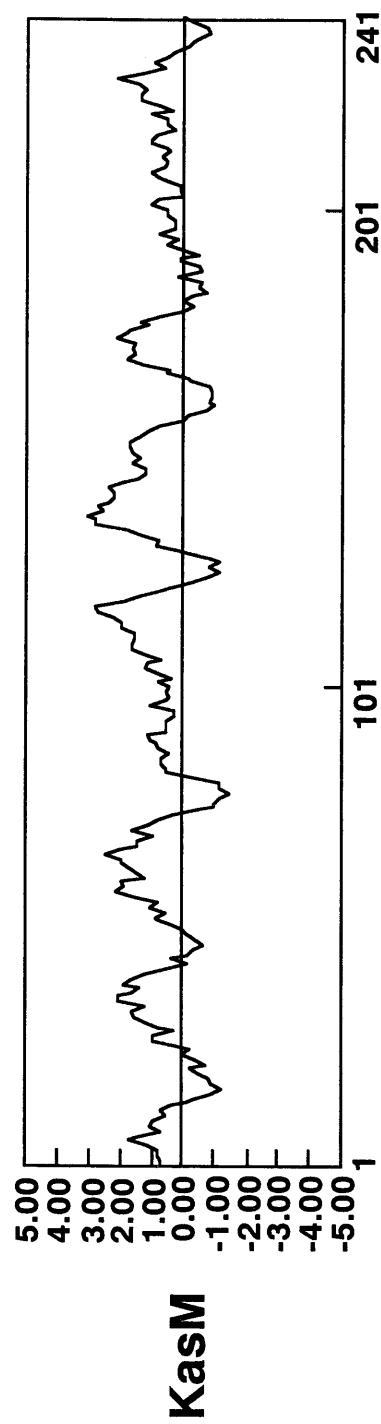
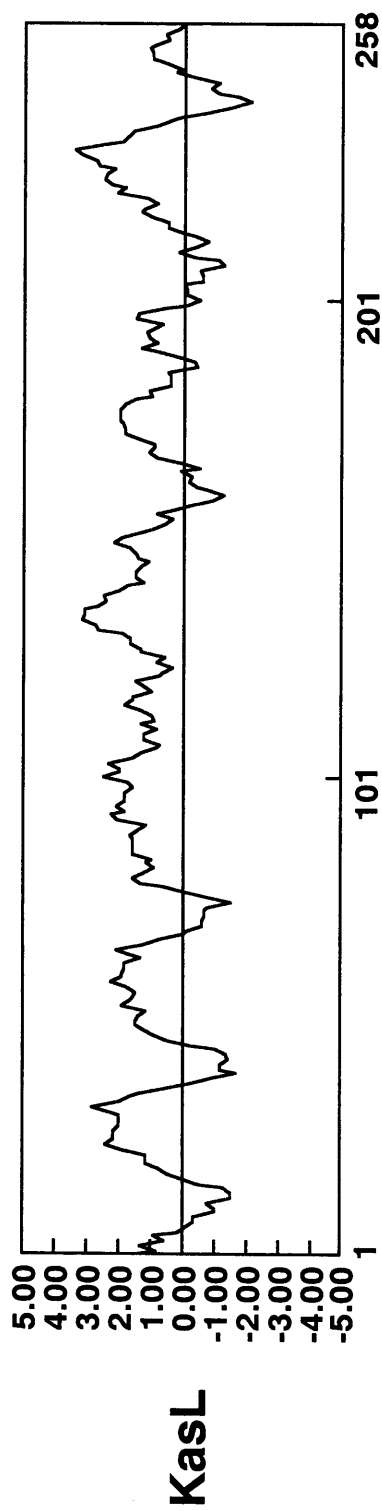


図 6.1.2 KasLおよび KasMにおける疎水性領域の解析
 グラフの下に示した数字は、各タンパク質のアミノ酸番号を示している。

第2節 *kasKLM* の転写解析

6.2.1 転写単位

著者は、*kasKLM* 領域の塩基配列情報、各構造遺伝子の ATGA による重複などの特徴から *kasKLM* がポリシストロニック mRNA に転写されていると考えた。そこで、図 6.2.1 の (A) に示される *kasK* 開始コドンの上流から *kasM* の 3' 末端領域に至る領域に対して RT-PCR を行った。使用した合成プライマーは表 6.2.1 に示した。RT-PCR の結果、図 6.2.1 の (B) のように予測された 2,643 bp に相当する DNA 断片の増幅が確認され、*kasKLM* がオペロンを形成しポリシストロニック mRNA に転写されていることを明らかにすることができた。著者は、ノーザンブロット解析も試みているが、現在までのところ *kasKLM* の mRNA 鎖長は不明である。

6.2.2 転写開始点とプロモーター配列

次に著者は、表 6.2.1 に示した合成プライマーを用いて、プライマーエクステンション法により *kasKLM* mRNA の転写開始点を決定した (図 6.2.2)。その結果、転写開始点は *kasK* の推定開始コドンより 436 bp 上流の C (図 6.1.1 の nt 1077) であることが明らかとなった。従って、*kasKLM* mRNA の 436 bp 非翻訳領域には、図 6.1.1 中の・・・で示した 2 つの逆向き繰返し配列と同じく図 6.1.1 中で 1, 2, 3 で示した 3 つの繰返し配列が認められた。転写開始点が決定されたことにより、その上流領域に推定のプロモーター配列、-10 配列 (図 6.1.1 中の nt 1065-1070) および -35 配列 (図 6.1.1 中の nt 1041-1046) が見出された。-10 および -35 配列の間隔は 18 bp であった。*kasK* 上流に見出されたプロモーター (*kasKLM*-p) も、*kas* クラスター内で見出された *kasU*, *kasJ* および *kasNO* のプロモーター (*kasU*-p, *kasJ*-p, *kasNO*-p) と同様、SEP プロモーターとの類似性が認められた。*kasKLM*-p と類似のプロモーター配列は、主要シグマ因子の 1 つである HrdB により認識されることが知られている *S. coelicolor* A3 (2) 由来の agarase 遺伝子 (*dagA*) のプロモーター *dagA*-p4 のほか (Brown *et al.*, 1992), SM のトランスポーター遺伝子 *strVW* のプロモーター *strVW*-p やダウノルビシントランスポーター遺伝子 *drrAB* のプロモーター *drrAB*-p にも見出されている (表 6.2.2) (Beyer *et al.*, 1996 ; Guilfoile & Hutchinson, 1991)。

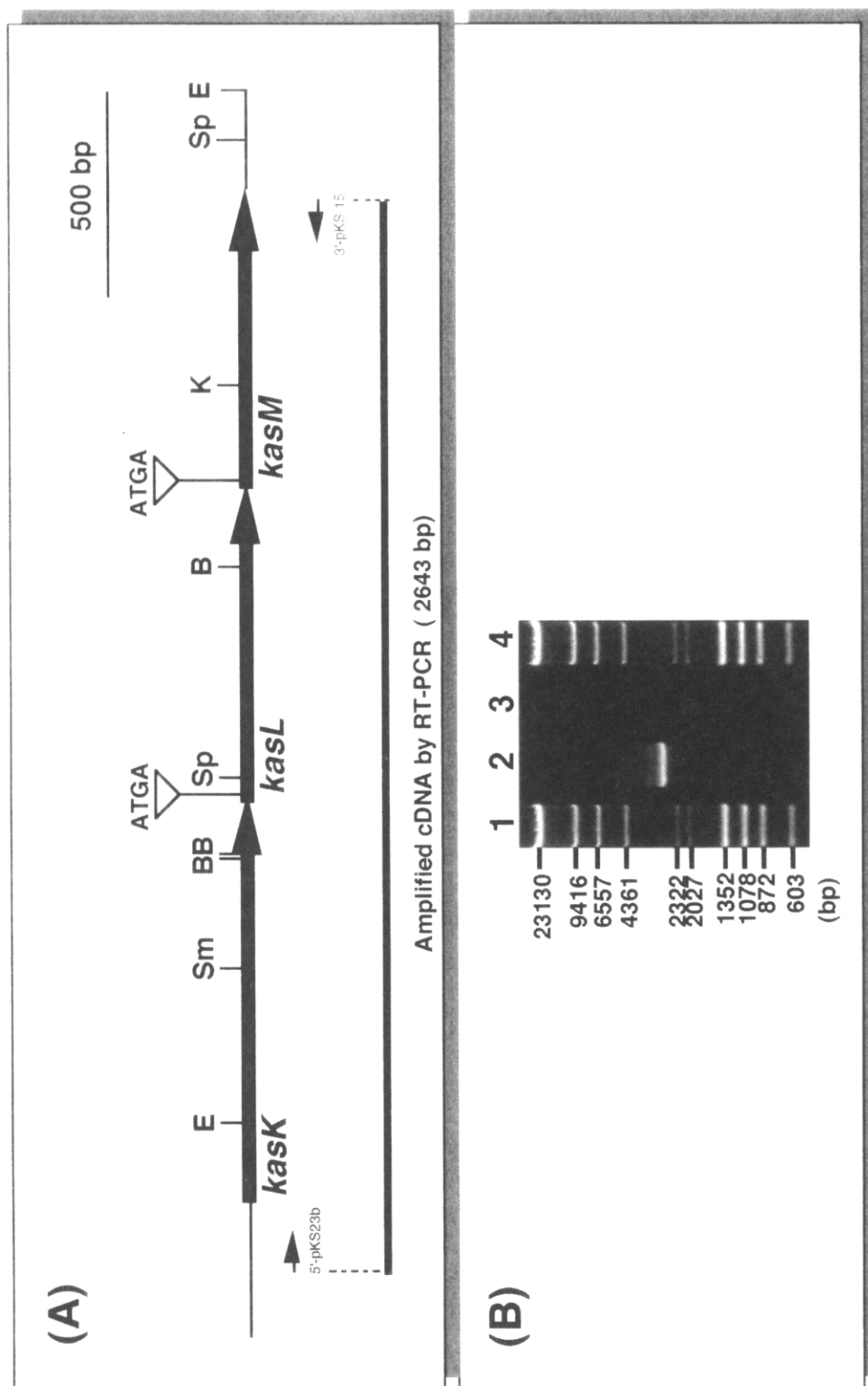


図 6.2.1 RT-PCR法によるkasLM mRNAの検出

(A) RT-PCRに使用された合成プライマーの位置と、増幅される領域を示した。(B) RT-PCRの結果。レーン1, 4は分子量マーカー。レーン2はRT-PCRにより増幅された2,643 bp断片。レーン3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）。なお、写真左側の数字は相当する分子量マーカーの長さ (bp) を示している。

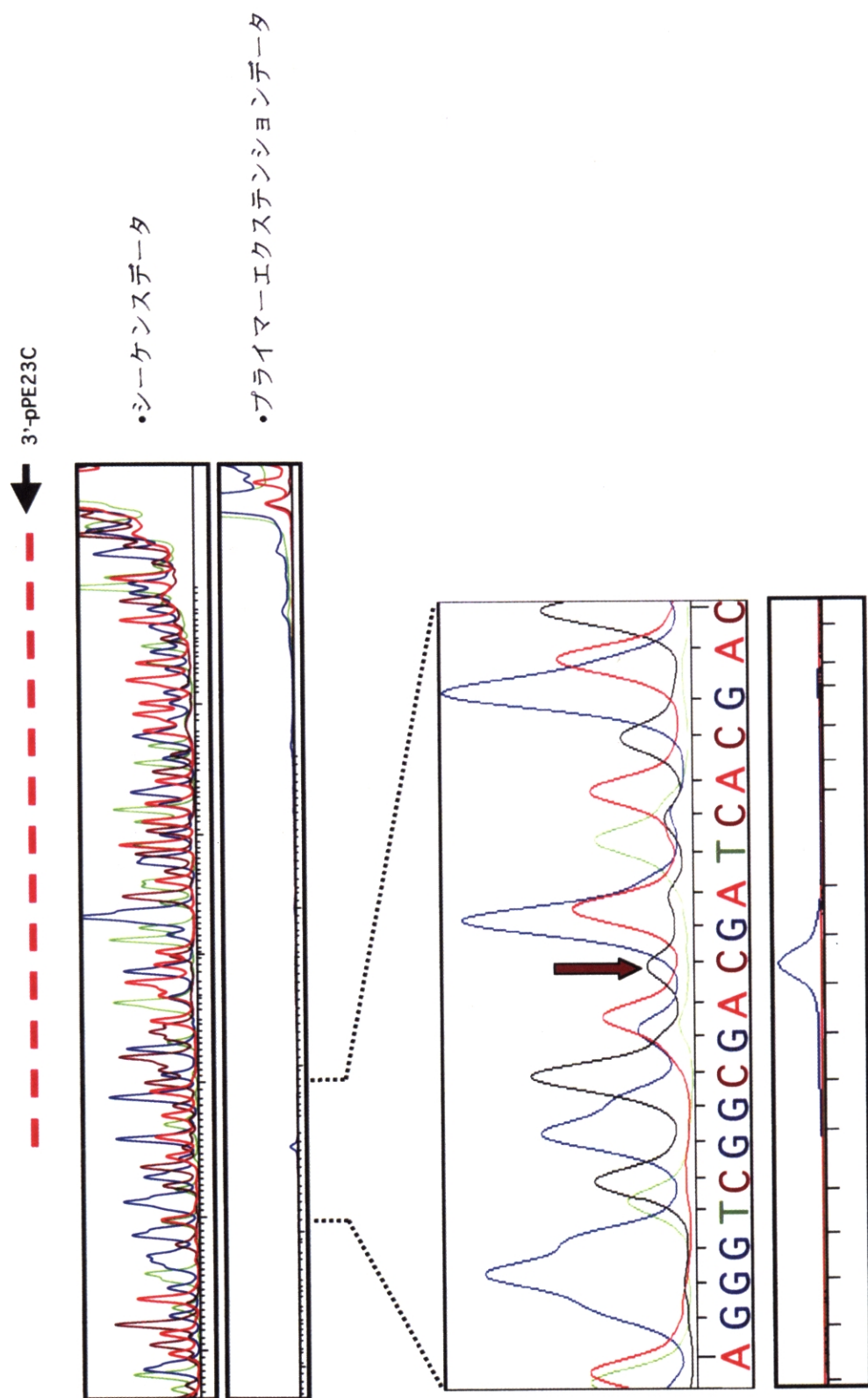


図 6.2.2 プライマーエクステンション法によるkasKLM mRNAの転写開始点の同定

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

実験方法	プライマー	塩基配列	位置 ¹⁾
RT-PCR	5'-pKS23b	5'-TCCGGGATTTCCGAAGGAACGGCGT-3'	1329 - 1353
	3'-pKS15	5'-GCGACACAGACCTCCAGCCCCAGTT-3'	3948 - 3972
	3'-pPE23C	5'-GTGCCACTCTGCATAATCCCCCACACCTAT-3'	1192 - 1221

1) 塩基番号は図 6.1.1 の塩基番号に相当する。また、3'プライマーは図 6.1.1 に示した配列の相補配列に相当する。

表 6.2.2.2 プロモーター-配列の比較

プロモーター	配列
<i>Streptomyces</i> コンセンサス配列	<div>-35</div> <div>TTGaca</div> <div>- 18 bp -</div> <div>-10</div> <div>tAGgat</div> <div>-6bp-</div> <div>+1</div>
<i>kasKLM-p</i>	<div>ATTCGATCTGGCACGACGTCAGTTGGGGCGGTAGGGTCTGGCGAC</div> <div>-35</div> <div>- 18 bp -</div> <div>-10</div> <div>-6bp-</div>
<i>dagA-p4</i>	<div>GTACCGATTGTACCCCTGCGACACTCCGCTGTAGCAATTCGGGAAA</div> <div>-35</div> <div>- 18 bp -</div> <div>-10</div> <div>-7bp-</div>
<i>strVW-p</i>	<div>CTCCTGGTTGACGCACCGTCCGCCGGGCTCGGTATCAATTGCGCAA</div> <div>-35</div> <div>- 19 bp -</div> <div>-10</div> <div>-6bp-</div>
<i>ddlAB-p</i>	<div>ATCGCGGCCATGAAGTGTCTCTCATTTGGGGGCTACGGTACTCAAC</div> <div>-10</div> <div>-6bp-</div>

転写開始点は傍点(・)で示した。

第3節 大腸菌 JM109 株における *kasK*, *kasL* および *kasM* の発現

kasK, *kasL* および *kasM* の3遺伝子は、本章、第1節で述べたように構造遺伝子の一部を ATGA で重複させていた。著者は、これらの遺伝子を大腸菌に導入した際に、正しく発現するのかどうか確かめる必要があると考えた。そこで、*kasKLM* の発現プラスミドと、*kasKLM* の各遺伝子と *lacZ'* との融合遺伝子を有するプラスミドを構築して各遺伝子の大腸菌 JM109 株中での翻訳について β -ガラクトシダーゼ活性を指標にして確認することとした。本節で使用した合成プライマーは表 6.3.1 にまとめて示した。また、本節で使用もしくは作製した組換えプラスミドについては表 6.3.2 にまとめて記載した。

6.3.1 *kasKLM* 発現プラスミドの構築

著者は、大腸菌 JM109 株中で *kasK*, *kasL*, *kasM* を発現させるために、pTV118N を使用した。まず、*kasK* 開始コドンを *lacZ'* 開始コドンにあわせるため、*NcoI* 認識部位 (CCATGG) を開始コドン領域に設計した合成プライマー (表 6.3.1) を作製し、*kasK* の5'端領域 (195 bp) を PCR 法により増幅した。得られた DNA 断片を制限酵素 *NcoI* および *EcoRI* により消化した後、同様の制限酵素により消化した pTV118N に挿入した。得られた組換えプラスミドを pTV-NE195 と命名した。次に、pSKE 5 (表 3.1.1, 表 6.3.2) を *EcoRI* により完全消化して *kasK* の3'領域 (開始コドンの下流 195 bp 以降) から *kasL* および *kasM* の全領域を含む 2,533 bp の *EcoRI* 断片を回収し、pTV-NE195 の *EcoRI* サイトに挿入した。得られた組換えプラスミドより、挿入方向が目的の向きであるものを選択し pTV-KLM と命名した。

6.3.2 β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用プラスミドの構築

6.3.2.1 *KasK-LacZ'* 融合タンパク質発現プラスミド

kasK の5'末端領域 (開始コドンより 77 bp) を PCR 法により増幅した。鋳型 DNA としては pSKE 5 (表 3.1.1, 表 6.3.2) を 1 ng 使用した。得られた DNA 断片を制限酵素 *NcoI* および *EcoRI* にて消化した後、大腸菌用発現ベクター pTV118N の *NcoI* および *EcoRI* 認識部位に挿入した。得られた組換えプラスミドを pTV-Kgal と命名した。また、ネガティブコントロールとしては、本節 6.3.1 で作製した pTV-NE195 を使用した。

6.3.2.2 *KasL-LacZ'* 融合タンパク質発現プラスミドの構築

kasK の3'末端領域から *kasL* の5'端領域を含む DNA 領域 (図 6.1.1 の nt 2350-2553)

を PCR 法により増幅した。5'-ORF S1 プライマーがアニーリングする領域には、2 個の *Bam*HI サイトが近接している。そこで、プラスミド構築に際して下流側の *Bam*HI サイトが無くなるようにプライマーの配列を 1 塩基置換 (G→C) させて設計した (表 6.3.1)。また、3'-ORF S1 プライマーでは、*kasL* と *lacZ'* とのフレームを一致させるために *Sph*I サイトの直前に 1 塩基 (G) を挿入した (表 6.3.1)。得られた DNA 断片を制限酵素 *Bam*HI および *Sph*I で消化し、本節 6.3.1 で構築した pTV-KLM を *Bam*HI および *Sph*I で消化したものに挿入した。得られた組換えプラスミドを pTV-KLgal と命名した。また、pTV-KLM を *Sph*I にて完全消化した後にセルフライゲーションさせて構築した pTV-KLgal (-) をネガティブコントロールプラスミドとした。

6.3.2.3 *KasM-LacZ'* 融合タンパク質発現プラスミドの構築

kasL の 3' 端領域に位置する *Bam*HI サイトから *kasM* の 5' 端領域を含む DNA 領域 (図 6.1.1 の nt 3067-3317) を PCR 法により増幅した。3'-ORF J1 プライマーにはその 5' 末端に *Xba*I サイトを付加した。得られた PCR 増幅断片を制限酵素 *Bam*HI および *Xba*I にて消化した。一方、pTV-KLM を *Xba*I で完全消化した後、*Bam*HI にて部分消化して目的とする消化断片をアガロースゲルより回収し、これに *Bam*HI および *Xba*I にて消化した PCR 断片を挿入した。得られた組換えプラスミドを pTV-KLMgal と命名した。また、pTV-KLM を *Kpn*I にて完全消化した後にセルフライゲーションして構築した pTV-KLMgal (-) をネガティブコントロールプラスミドとした。

6.3.3 大腸菌 JM109 株における *kasK*, *kasL* および *kasM* の翻訳の確認

図 6.3.1 に示すように各遺伝子と *lacZ'* との融合遺伝子をもつプラスミドを用いて、融合タンパク質の有無を β-ガラクトシダーゼ活性を指標にして確認した。その結果、図 6.3.2 の (A) に示すように、pTV118N, pTV-Kgal, pTV-KLgal, pTV-KLMgal の形質転換株はネガティブコントロールの各プラスミド pTV-NE195, pTV-KLgal (-), pTV-KLMgal (-) の形質転換株と比べて有意の β-ガラクトシダーゼ活性を示し、また図 6.3.2 (B) に示すようにこれらの形質転換大腸菌は X-gal を含むプレートで培養すると青色コロニーとなった。このことより、著者が構築した *kasKLM* 用発現プラスミド pTV-KLM を用いて *kasK*, *kasKL*, *kasKLM* のそれぞれを大腸菌 JM109 株にて発現させた場合、*kasKLM* のいずれも正しいフレームで翻訳が行われることが確認できた。そこで次に、pTV-KLM により形質転換した JM109 株の KSM に対する耐性度について検討した。

6.3.4 大腸菌 JM109 株のカスガマイシン耐性化

著者は、本節 6.3.1 で構築した pTV-KLM を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、その KSM に対する耐性度を観察した。その結果、pTV-KLM で形質転換された大腸菌 (JM109/pTV-KLM 株) では、培養 18 時間前後から急激な増殖が認められた (図 6.3.3)。このことは pTV-KLM より発現された ABC トランスポーターが菌体内の KSM を排出することにより、JM109 株を耐性化したことを示唆している。また、今回データを示していないが KSM と同様にアミノグリコシド系抗生物質である SM やカナマイシン等をそれぞれ培地に添加して JM109/pTV-KLM 株について同様の実験をおこなったが、いずれの薬剤にも耐性は示さなかった。以上のことから、著者は *kasKLM* が KSM に特異的な ABC トランスポーターをコードしていると結論した。

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

kasKLM の 3 遺伝子のうち、*kasL* および *kasM* はともに膜貫通サブユニットをコードしていると考えられる (本章、第 1 節)。著者は、*kasK* および、2 種類の膜貫通タンパク質 (*KasL* および *KasM*) が KSM トランスポーターの構成に必須であるか否かを検討するため、*kasKLM* のうちいずれか 1 つを破壊したプラスミドを作製し、各プラスミドによって形質転換された大腸菌 JM109 株の KSM に対する耐性度を観察した。

6.4.1 *kasK*, *kasL* および *kasM* 遺伝子を破壊したプラスミドの構築

本節で作製した組換えプラスミドを (表 6.4.1) にまとめた。

6.4.1.1 *kasK* 破壊プラスミド

本章、6.3.1 で作製した pTV-KLM を、制限酵素 *NcoI* により完全消化した後、セルフライゲーションさせた。得られた組換えプラスミドを pTV-ΔKLM と命名した。

6.4.1.2 *kasL* 破壊プラスミド

pTV-KLM を制限酵素 *SphI* および *BamHI* により各々部分消化したものに、ベクター pKF 3 由来の *SphI*-*BamHI* 断片 (約 200 bp) を挿入した。得られた組換えプラスミドを pTV-KΔLM と命名した。

6.4.1.3 *kasM* 破壊プラスミド

kasM を破壊したプラスミドとしては、本章、6.3.2.3 で構築した pTV-KLMgal を利用した。

6.4.2 大腸菌形質転換株のカスガマイシン耐性化

著者は、図 6.4.1 に示す *kasKLM* の遺伝子のいずれか 1 つを破壊した 3 種類のプラスミド (pTV- Δ KLM, pTV-K Δ LM, pTV-KLMgal) を用いて、大腸菌 JM109 株を形質転換して KSM に対する耐性度の変化を観察した。その結果、図 6.4.2 に示すように *kasK* を破壊したプラスミドにより形質転換された菌株はもとより、*kasL*, *kasM* のいずれかを破壊したプラスミドによって形質転換された株についても、KSM に対する耐性化は確認されなかった。

ABC トランスポーターは微生物からヒトに至る生物界に広く存在し、その基本構造は ATP 結合サブユニット 2 分子と膜貫通サブユニット 2 分子から構成されることが知られている (Higgins, 1992)。大腸菌中で *kasKLM* を発現させると KSM 耐性を獲得すること、ATP 結合タンパク質をコードする遺伝子は *kasK* 以外になく、また膜貫通サブユニットをコードする 2 種類の遺伝子のどちらを破壊しても活性を失うことから、KSM トランスポーターは *KasK* のホモ 2 量体と *KasL* および *KasM* の 2 種類の膜貫通サブユニットから構成されているトランスポーターであることが強く示唆された (図 6.4.3)。

第 5 節 考察と小括

膜を介した物質の能動輸送に関与する ABC トランスポーターのなかで抗生物質生産株から見出された抗生物質排出トランスポーターは、図 6.5.1 にまとめたようにその遺伝子構成から 3 つのタイプに分類されている (Mendez & Salas, 2001)。すなわち、

- 1) ATP 結合領域 (図 6.5.1 の WA と WB) と膜貫通領域 (図 6.5.1 の HC) が別々の遺伝子にコードされている Type 1 ;
 - 2) 2 つの ATP 結合領域を持つ親水性タンパク質をコードする遺伝子のみで構成され、膜貫通領域をコードする遺伝子が認められない Type 2 ;
 - 3) 膜貫通領域と ATP 結合領域を持つ融合タンパク質をコードする遺伝子から構成されている Type 3 ;
- である。

著者が見出した KSM トランスポーターは、*kasKLM* の 3 遺伝子から構成され、KSM トランスポーターの ATP 結合領域と 2 つの膜貫通領域がそれぞれ別々の遺伝子にコードされていることから Type 1 に分類することができる。KSM トランスポーターと同様に 3 遺伝子から構成されるトランスポーターの例としては、*Staphylococcus epidermidis* が生産するエピダミンのトランスポーターや *Lactococcus lactis* が生産するラクチシン 481 のトランスポーターそして *Bacillus subtilis* が生産するバシトラシンのトランスポーターなどが報告されている (Peschel & Gotz, 1996 ; Rince *et al.*, 1997 ; Podlesek *et al.*, 2000) 。

ABC トランスポーター遺伝子群から溶質の通路を形成する膜貫通領域のみを発現させると生物にとっては致死的になる場合がある。例えば、ダウノルピシントランスポーターの膜貫通領域遺伝子 *drrB* を大腸菌で発現させると、大腸菌は死に至る (Kaur, 1997) 。従って、ABC トランスポーター遺伝子群は必要時に効率良く構成サブユニットを過不足なく発現させる必要がある。KSM トランスポーター遺伝子群の遺伝子構造は、3 遺伝子 *kasKLM* がオペロンを形成し同一プロモーターによる一元的な転写調節を受け、さらにトランスレーショナルカップリングにより各構成タンパク質が効率良く生成できることを容易にしていると考えられる。ダウノルピシントランスポーター遺伝子群 (*drrAB*) や SM トランスポーター遺伝子群 (*strVW*) もオペロンを形成しトランスレーショナルカップリングしていることから (Guilfoile & Hutchinson, 1991 ; Beyer *et al.*, 1996) , このシステムは放線菌における ABC トランスポーター遺伝子群の発現機構として広く存在しているのであろう。

kasKLM mRNA の 5'末端領域には 436 bp におよぶ長い非翻訳領域があり、antiterminator などの調節部位を含んでいると考えられる (Piepersberg *et al.*, 1988 ; Li *et al.*, 1990) 。実際に、本章、第 2 節で述べたように本領域には 3 つの繰返し配列と 2 つの逆向き繰返し配列が見出されており、複数の調節因子が結合し複雑な発現調節を受けていることが考えられる。*kasKLM* がどのような因子により発現調節されているのかについては、今後の興味深い研究課題である。

表 6.3.1 *kasKLM* 発現プラスミドの構築とβ-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

プライマー	塩基配列	位置 ¹⁾
5'-ORFR	5'-GGCCATGGTCGAGGTCAC-3' <i>NcoI</i>	1509 - 1526
3'-ORFR	5'-GGGAATTCTGACCAGGGT-3' <i>EcoRI</i>	1693 - 1710
3'-ORFR2	5'-GGGAATTCCGGTCCGCTCT-3' <i>EcoRI</i>	1580 - 1597
5'-ORF S1 ²⁾	5'-CCGGATCCGTACGCATCCACACCGTAT-3' <i>BamHI</i>	2348 - 2374
3'-ORF S1 ³⁾	5'-CCGCATGCGACGTGTTCCACTGCACCTT-3' <i>SphI</i>	2529 - 2556
5'-ORF J1	5'-GGGGATCCAGCCCCCTGGGACGCGTGATCTT-3' <i>BamHI</i>	3065 - 3094
3'-ORF J1	5'-CCTCTAGACCCACGAATGCGGCCTGGCCGA-3' <i>XbaI</i>	3288 - 3317

1) 塩基番号は図 6.1.1の塩基番号に相当する。また、3'プライマーは図 6.1.1に示した配列の相補配列に相当する。

2) 5'-ORF S1での傍点は*BamHI*サイトを壊すために置換した塩基 (G2361C) を示す。これによりアミノ酸置換は生じない。

3) 3'-ORF S1二重下線はβ-ガラクトシダーゼ遺伝子との読み枠をあわせるために挿入した塩基を示す。

表 6.3.2 *kasKLM* 発現実験に使用した組換えプラスミド

プラスミド	長さ(kb)	耐性マーカー	性質と用途
pSKE 5	7.7	C ^r	クローニングベクター-pKF 3 に <i>kas</i> クラスター内に位置する 5.5 kb <i>SacI</i> DNA断片が挿入されたプラスミド。
pTV-NE195	3.3	Amp ^r	発現ベクター-pTV118Nに195 bp <i>NcoI</i> - <i>EcoRI</i> PCR断片 (<i>kasK</i> の5'端領域) が挿入されたプラスミド。 <i>kasK</i> と <i>lacZ'</i> の読み枠がずれており, pTV-Kgalに対するネガティブコントロールとしても使用した。
pTV-KLM	5.8	Amp ^r	pSKE 5に由来する2.5 kb <i>EcoRI</i> DNA断片をpTV-NE195に挿入して構築した。 <i>kasKLM</i> 発現用プラスミド。
pTV-Kgal	3.2	Amp ^r	<i>kasL-lacZ'</i> 融合遺伝子を含むプラスミド。 KasK-LacZ'融合タンパク質発現用プラスミド。
pTV-KLgal	4.2	Amp ^r	完全長の <i>kasK</i> と <i>kasL-lacZ'</i> 融合遺伝子を含むプラスミド。 KasL-LacZ'融合タンパク質発現用プラスミド。
pTV-KLgal(-)	4.2	Amp ^r	pTV-KLMを <i>SphI</i> で消化し, セルフライゲーションさせて構築したプラスミド。 pTV-KLgalのネガティブコントロールとして使用した。
pTV-KLMgal	4.9	Amp ^r	完全長の <i>kasK</i> 及び <i>kasL</i> と <i>kasM-lacZ'</i> 融合遺伝子を含むプラスミド。 KasM-LacZ'融合タンパク質発現用プラスミド。
pTV-KLMgal(-)	5.1	Amp ^r	pTV-KLMを <i>KpnI</i> で消化し, セルフライゲーションさせて構築したプラスミド。 pTV-KLMgalのネガティブコントロールとして使用した。

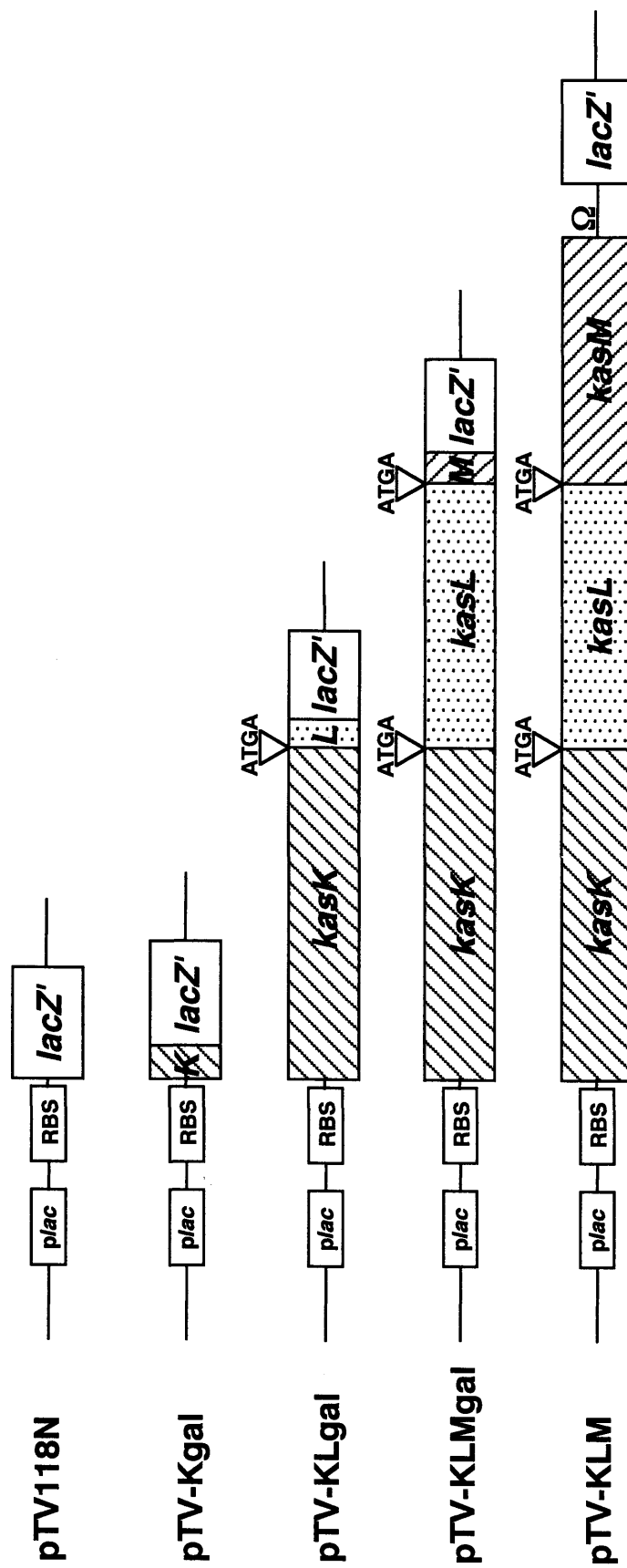


図 6.3.1 *kasK*, *kasL*および*kasM*と*lacZ'*との融合遺伝子発現プラスミド
*placI*はベクターpTV118Nの*lac*プロモーターを，またRBSはリボソーム結合領域を示している。
 ATGAは各遺伝子の重複を示している。pTV-KLMの Ω は，*kasM*の下流に見出された推定の
 転写終結領域（図 6.1.1の nt 4062-4111）を示している。pTV118は発現ベクターである。

(A)

Plasmid	Specific activity (nmols/min/mg)
pTV118N	4363.5
pTV-Kgal	94.7
pTV-NE195	2.8
pTV-KLgal	25.1
pTV-KLgal(-)	2.0
pTV-KLMgal	65.6
pTV-KLMgal(-)	2.4
Non	3.9

(B)

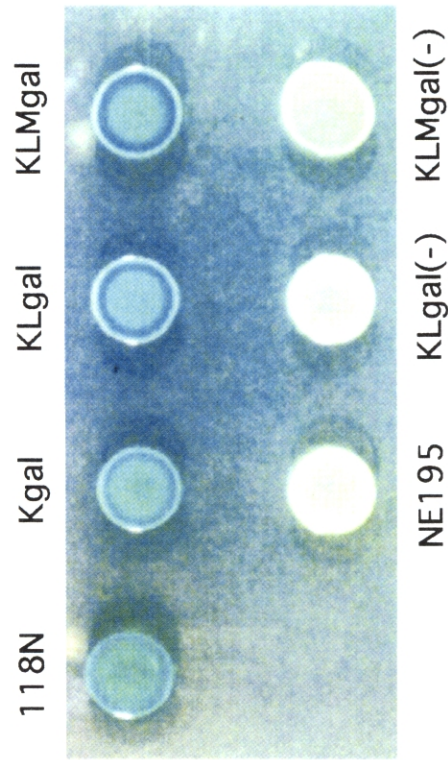


図 6.3.2 大腸菌JM109株における*kasK*, *kasL*および*kasM*の発現の確認

(A) Specific activities of β -galactosidase from transformants carrying the constructed plasmids.
(B) Phenotype of transformants on an X-gal-containing plate.

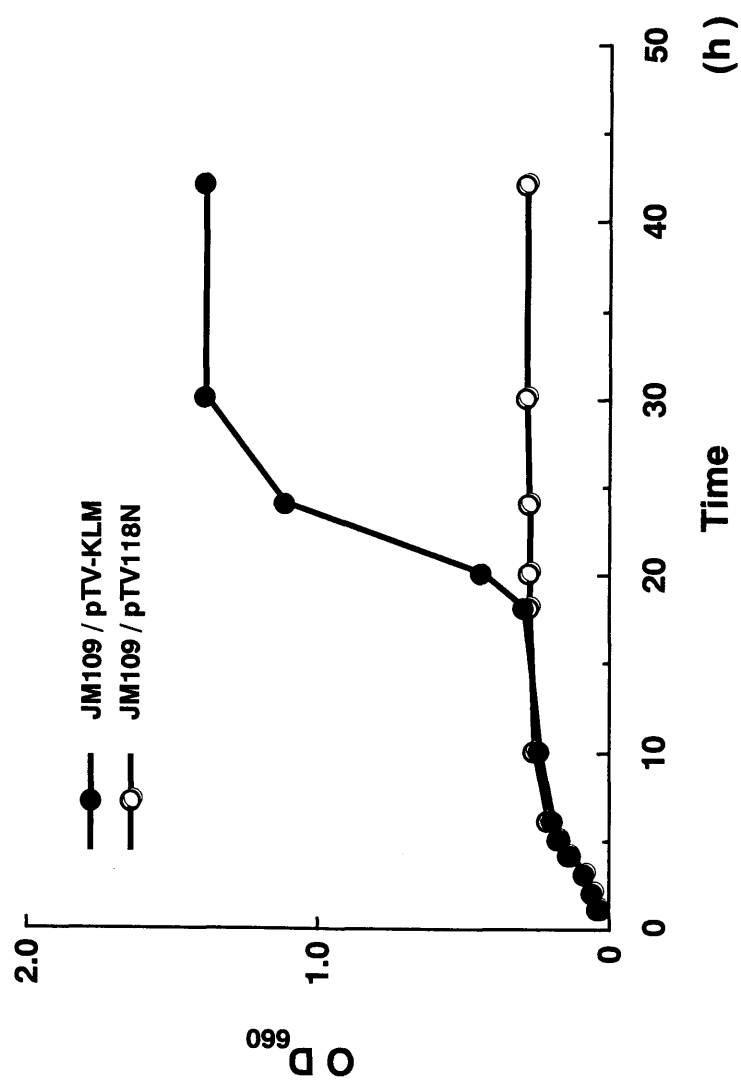


図 6.3.3 *kasKLM*の発現による大腸菌JM109株のKSM耐性化
各形質転換株は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリンと 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KSMを添加した YT培地にて培養した。

表 6.4.1 *kasKLM*の破壊実験に使用した組換えプラスミド

プラスミド	長さ(kb)	耐性マーカー	性質と用途
pTV-ΔKLM	5.3	Amp ^r	pTV-KLMから540 bp <i>Nco</i> I断片 (<i>kasK</i> の5'領域) を除去した。完全長の <i>kasL</i> および <i>kasM</i> を含む。 <i>kasK</i> を破壊したプラスミド。
pTV-KΔLM	5.5	Amp ^r	<i>kasL</i> 構造遺伝子内部に位置する520 bp <i>Sph</i> I- <i>Bam</i> HI DNA断片をpKF3由来の200 bp <i>Sph</i> I- <i>Bam</i> HI断片と入れ替えた。完全長の <i>kasK</i> および <i>kasM</i> を含む。 <i>kasL</i> を破壊したプラスミド。

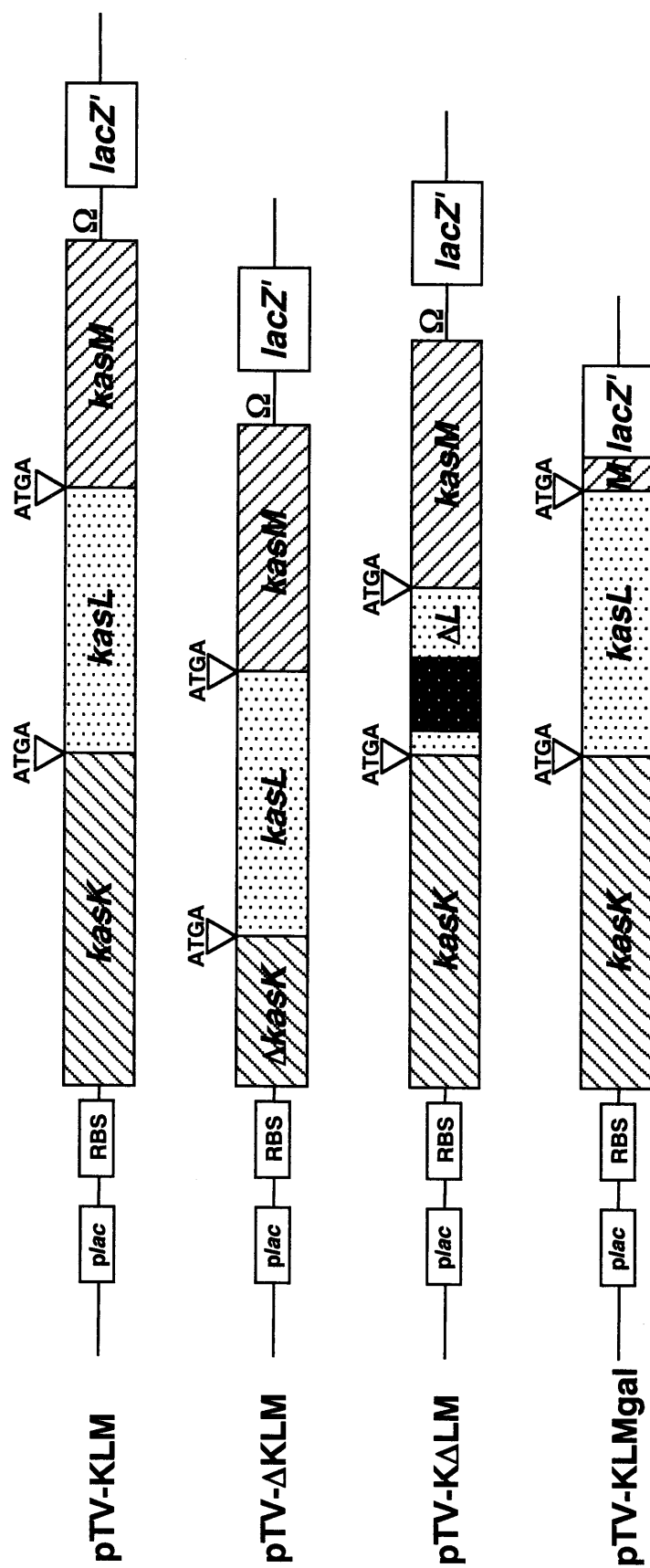


図 6.4.1 *kasKLM*の破壊プラスミド
 pTV-KΔLMの黒で示された領域は、pKF3由来の 200 bp *SphI*-*Bam*HI断片を示す。
 Ωは*kasM*下流に見出された推定の転写終結シグナルを示している。

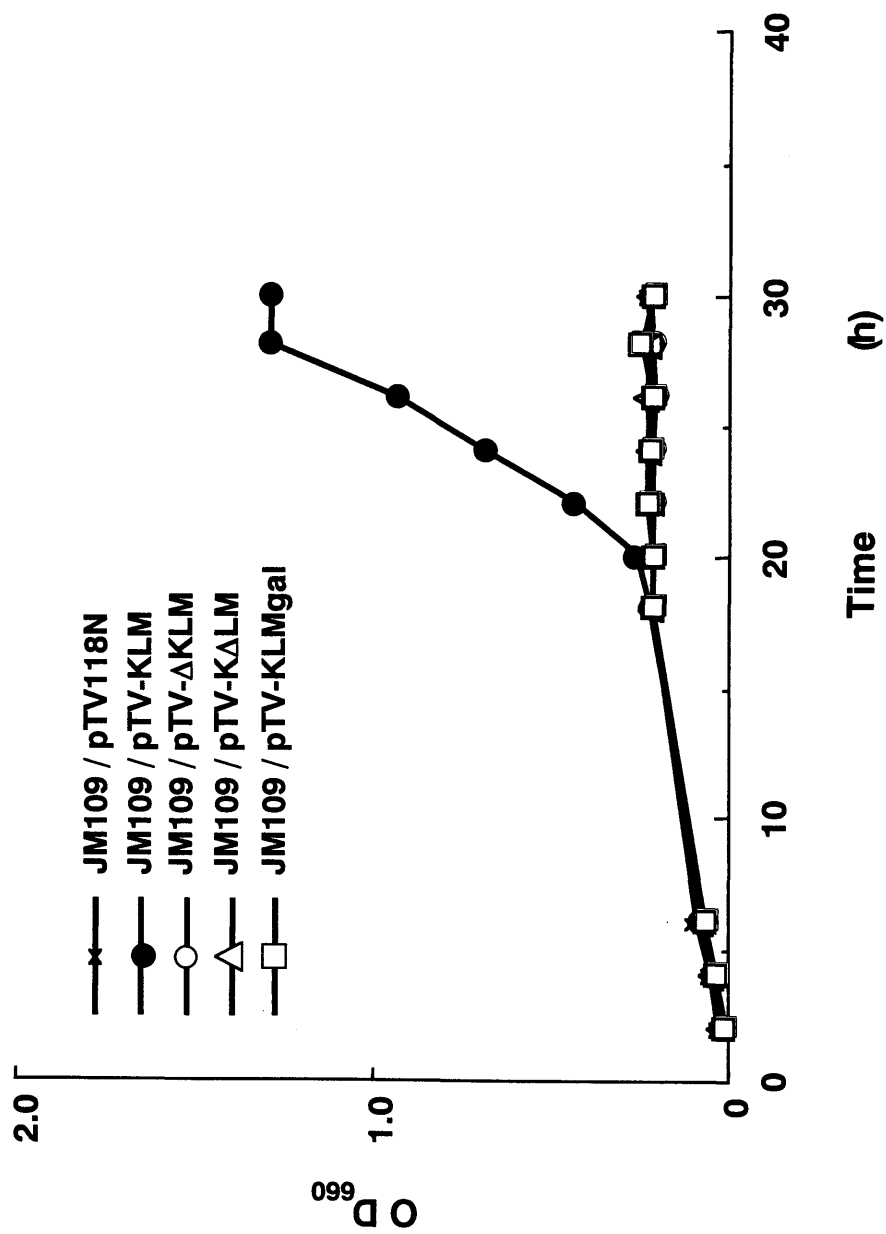


図 6.4.2 大腸菌JM109株の形質転換株におけるカスガマイシン耐性の比較
 各形質転換株は、100 μ g/mLアンピシリンと200 μ g/mL KSMを添加したYT培地にて培養した。

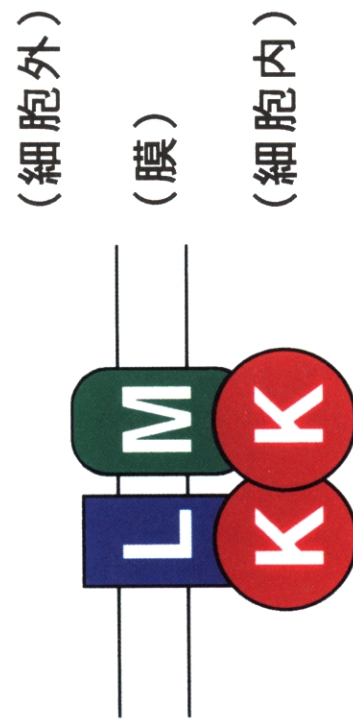


図 6.4.3 カスガマイシントランスポーターの推定構造
 KはATP結合サブユニットであるKasKタンパク質を，Lは膜貫通サブユニットであるKasLタンパク質を，また，Mはもう1つの膜貫通サブユニットであるKasMタンパク質を示している。

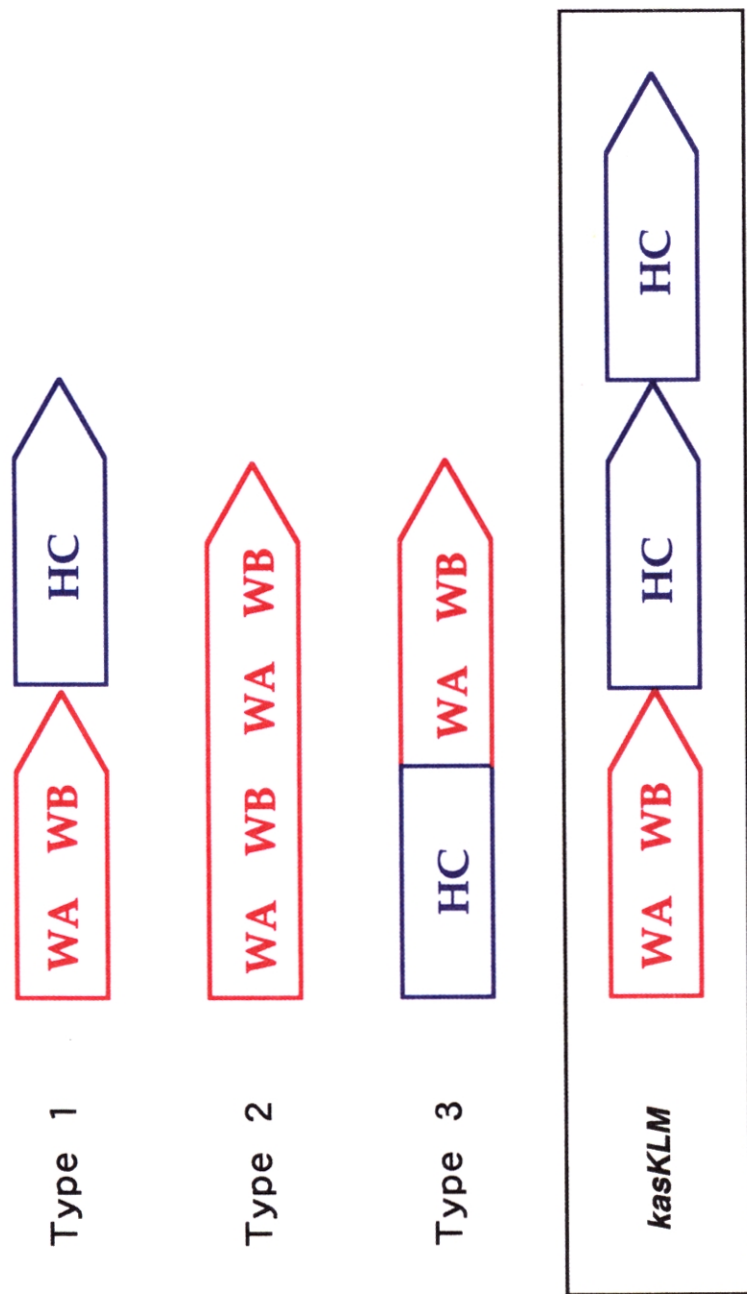


図 6.5.1 抗生物質生産菌におけるABCトランスポーターの分類
WAとWBは、ATP結合モチーフであるWalker A及びWalker Bを示している。
HCは、そのトランスポーターの疎水性コンポーネントを示している。

第7章 総括と展望

本研究は、KSMを生産する放線菌株がKSMに対して自己耐性化するために必要なKSMアセチル化酵素に関する研究から始まったものである。以下に本研究により明らかになった事項をまとめる。

1) KSMアセチル化酵素遺伝子 (*kac*) は2種のKSM生産放線菌 *S. kasugaensis* M338-M1 および MB273-C4 に存在し、*kac* 相同 DNA 領域が KSM 生産放線菌である *S. celluloflavs* JCM4126 および *S. albulus* MF861-C4 に保持されていることが示唆された。また、*S. albulus* MF861-C4 株より得られた KSM 非生産の自然突然変異株では、*kac* を含むと考えられる領域が欠失していた。これらの事実から、KSM 生産放線菌においては KSM 生合成関連遺伝子群が *kac* の近傍領域に存在していることが示唆された。

2) *S. kasugaensis* M338-M1 株より KSM アセチル化酵素遺伝子 (*kac*³³⁸) をクローニングし、*S. kasugaensis* MB273-C4 株由来の KSM アセチル化酵素遺伝子 (*kac*²⁷³) と比較した。その結果、*kac*³³⁸ および *kac*²⁷³ のそれぞれの推定タンパク質は 141 アミノ酸および 142 アミノ酸よりなり、両タンパク質のアミノ酸配列は 1 アミノ酸の欠失と 1 アミノ酸が異なる点を除き完全に一致した。さらに両遺伝子は大腸菌 JM109 株に導入して発現させると、形質転換株はいずれも KSM に対して高度耐性化 (> 800 µg/mL) することが判明した。

3) *S. kasugaensis* M338-M1 株ゲノムより *kac*³³⁸ 周辺領域のクローニングを行い、得られた 22,414 bp におよぶ領域に 19 個の遺伝子を見出し、これらを *kas* 遺伝子群とした。これらの推定タンパク質のアミノ酸配列やモチーフ情報および相同性検索などの結果から、*kasP*, *kasQ*, *kasR*, *kasA*, *kasC*, *kasD* の 6 遺伝子はカスガミン生合成、*kasN* はカルボキシホルミドイル基の生合成、そして *kasJ* はイノシトールの D-*chiro* 体へのエピマー化に関する D-*chiro*-イノシトールの生合成にそれぞれ関与していると推定した。すなわち、本領域は UDP-GlcNAc から始まり KSM に至る生合成のほぼ全過程を説明し得る *kas* 遺伝子群を含む KSM 生合成に関与する *kas* クラスターである。

4) *kas* クラスター内に存在する *kas* 遺伝子群は、*kasT*, *kasU*, *kasJ*, *kasKLM*, *kasNO*, *kasPQ*, *kasRA*, *kac*³³⁸ の少なくとも 8 つの単位で転写が行われていることが示唆された。また、その塩基配列情報からオペロンを形成していると推定された *kasBCDEF* 領域に関しては、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が示唆された。*kas* 遺伝子群の転写はいずれも KSM の生産開始以前に開始され、特に *kasT* の転写は他の *kas* 遺伝子群に先がけて開始されることを明らかにした。さらに、5'-RACE 法やプライマーエクステンション法を用いて *kasU*, *kasJ*, *kasNO* および *kasKLM* の転写開始点を決定し

た。いずれのプロモーター配列も *Streptomyces E. coli* σ^{70} -like promoters (SEP) と高い類似性を有していた。

5) *kasT* がコードするタンパク質 (KasT) は, SM の生合成を経路特異的に制御する StrR とアミノ酸レベルで 50% の identity を示し, さらに StrR と同様に DNA 結合性タンパク質に特徴的な helix-turn-helix (HTH) モチーフを有していた。KasT の *kas* クラスター DNA 領域への結合について, チオレドキシンとの融合タンパク質 (Trx-KasT) を用いて検討したところ, KasT は少なくとも *kasU-kasJ* 遺伝子間領域, *kasNO* 上流領域および *kasP-kasQ* 遺伝子間領域にそれぞれ結合することが明らかとなった。さらに, *rpoZ* 変異によって KSM 非生産となった変異株 R6D4 では, *kasT* を含め KSM 生合成に関与する *kas* 遺伝子群の転写が抑制されていたが, R6D4 株中でプラスミドを介して *kasT* を恒常的に強制発現させると *kas* 遺伝子群の転写が再び開始され, KSM 生産が復帰したことを明らかにした。これらの結果から, KasT は *kas* クラスターにおける KSM 生合成の経路特異的転写活性化因子であることが判明した。

6) *kasK*, *kasL*, *kasM* の推定タンパク質は, ABC トランスポーターを構成するサブユニットと相同であった。また, *kasK* と *kasL*, *kasL* と *kasM* 間では上流の終止コドン (TGA) が下流の開始コドン (ATG) と重複した ATGA となっており, 翻訳時にはトランスレーショナルカップリングを受けている可能性が示唆された。また, *kasK*, *kasL*, *kasM* はポリシストロニック mRNA に転写されていることが判った。3 遺伝子を大腸菌 JM109 株に導入して発現させると, 形質転換株は 200 $\mu\text{g/mL}$ の KSM 存在下でも十分な生育を示すようになったことより, *kasKLM* は KSM の菌体外への排出に関わるトランスポーター遺伝子群であることが判明した。さらに, KSM トランスポーターとしての活性発現には, KasK, KasL および KasM の 3 種類のタンパク質が必須であることを明らかにした。

著者は, KSM 生産菌 *S. kasugaensis* M338-M1 株より KSM 自己耐性遺伝子とクラスターを形成している KSM 生合成遺伝子群とそれらの転写調節遺伝子, さらに KSM の排出と自己耐性にも関わると考えられる KSM トランスポーター遺伝子群を得ることができた。これらにより, 従来, 前駆物質の取り込み実験でその一部が明らかにされていた KSM 生合成を, 生合成遺伝子群への制御と KSM 耐性機構とともに分子遺伝学的に解明することが可能となった。これまでに, *kas* クラスターに含まれる 20 遺伝子のうち 5 遺伝子 (*kac*³³⁸, *kasT*, *kasK*, *kasL*, *kasM*) については機能を同定し, 8 遺伝子 (*kasA*, *kasC*, *kasD*, *kasJ*, *kasN*, *kasP*, *kasQ*, *kasR*) については機能を推定できた。これら推定遺伝子を含め未だに機能未知の遺伝子については破壊株等の構築を行うことにより機能解明を進めて行く予定

である。

本研究の応用面として次のような研究が可能であろう。すなわち、

- 1) KSM に特徴的な側鎖であるカルボキシホルミドイル基生合成の関連遺伝子 (*kasN*) やカスガミン生合成に関与する遺伝子群 (*kasP*, *Q*, *R*, *A*, *C*, *D*) などを適宜選択して他の抗生物質生産放線菌に導入することにより、カルボキシホルミドイル基やカスガミンあるいはカルボキシホルミドイル側鎖をもつカスガミンが付加された新規ハイブリッド物質の生産研究
 - 2) *S. kasugaensis* にて KSM 生合成遺伝子群を操作することにより、未知の KSM 中間体もしくはシャント物質を蓄積する変異株の育種研究
 - 3) KSM に特徴的なイノシトールの希少異性体である D-*chiro*-イノシトールへの変換過程を解明することによって D-*chiro*-イノシトールを蓄積する変異株の育種研究
 - 4) KSM 生産株に転写調節遺伝子 (例えば, *kasT*) を導入し高発現させることによる KSM 高生産株の育種研究, さらに転写調節遺伝子とともに KSM 高度耐性化のために KSM アセチル化酵素遺伝子 (*kac*³³⁸) や KSM トランスポーター遺伝子 (*kasKLM*) を適宜導入し発現させることによる KSM 高生産菌株の育種研究
- などである。

カナマイシン, ゲンタミシン, アルベカシンなどの AG 系抗生物質の医薬品としての重要性は依然として極めて高い一方で, AG 耐性菌の出現が大きな社会問題となっている。AG 耐性の原因の多くは, 薬剤の酵素的な化学修飾による不活性化で, リン酸化, アデニリル化, アセチル化の 3 タイプが代表的である (Wright, 1999 ; 田中ら, 1992)。これらに加えて, 今後テトラサイクリン系抗生物質やアンスラサイクリン系制癌剤に対する耐性化機構に見られるような薬剤の能動的排出も AG 耐性化の一因となり得る可能性がある

(Westbrock-Wadman *et al.*, 1999 ; Saitoh *et al.*, 2003)。AG 系抗生物質生産菌における AG 排出トランスポーター遺伝子の存在は, SM 生産菌 *S. griseus* においても報告されているが (Beyer *et al.*, 1996), その詳細な機能解析は行われていない。本研究で明らかとなった KSM トランスポーターについて KSM の認識機構や排出機構の理解を深めることによって, AG 系抗生物質の耐性菌研究に対して基礎的データを提供できるものと考えている。

第2編 実験の部

第1章 実験材料

第1節 菌株

1.1.1 放線菌株

本研究で使用した放線菌株を表 1.1.1 および表 5.2.1 に示した。表 1.1.1 に記載した放線菌株は、いずれも微生物化学研究所（現微生物化学研究センター）浜田 雅博士より分与された。表 5.2.1 に記載した *Streptomyces kasugaensis* MB273-C4 株由来の A1R6 株および R6D4 株は、秋田県立大学 小嶋 郁夫博士より分与された。*Streptomyces lividans* TK21 株は、国立感染症研究所 石川 淳博士より分与された。

1.1.2 大腸菌株

本研究で使用した大腸菌株を表 1.1.2 に示した。大腸菌 DH5 α 株および TH2 株は TaKaRa 社、JM109 株は TOYOBO 社、BL21 (DE3) 株は Novagen 社よりそれぞれ購入した。

1.1.3 その他の菌株

カスガマイシンバイオアッセイに使用した *Pseudomonas fluorescens* IFO15334 株は、秋田県立大学 小嶋 郁夫博士より分与された。

第2節 培地

1.2.1 放線菌株用培地

放線菌株の培養に使用した培地を表 1.2.1, 表 1.2.2, 表 1.2.3, 表 1.2.4, 表 1.2.5, 表 1.2.6 に記載した。

1.2.2 大腸菌株用培地

大腸菌株の培養に使用した培地の組成を表 1.2.7, 表 1.2.8, 表 1.2.9 に記載した。寒天培地は、特に記載しない限り 1.5%となる様に Bacto agar (DIFCO) を添加して調製した。

1.2.3 カスガマイシンバイオアッセイ用培地

P. fluorescens の培養に使用した Noken 培地の組成は表 1.2.10, カスガマイシンバイオアッセイ用培地の組成は表 1.2.11 に記載した。

第3節 ベクターおよび合成プライマー

本研究で使用したクローニングベクターおよび発現用ベクターを表 1.3.1 にまとめて記載した。また、*S. kasugaensis* 用発現プラスミドについては、表 5.2.2 に記載した。本研究で使用した合成プライマーは、著者が決定した塩基配列情報を基に設計し、アマシャムバ

イオサイエンス社に合成を依頼した。塩基配列の決定に用いたプライマーを表 1.3.2, RT-PCR 法に使用したプライマーを表 1.3.3, さらに, 5'-RACE 法で使用したプライマーを表 1.3.4 にまとめて示した。その他, 本研究において使用した PCR プライマーについては, 第 1 編本論の各項目に別途記載した。

第 4 節 酵素

制限酵素 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Nco*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*I, *Xba*I は TaKaRa 社および TOYOBO 社より購入した。DNase I, RNase, LA Taq DNA ポリメラーゼ, AMV 由来 Reverse transcriptase (RTase), M-MLV 由来 RTase および RNase インヒビターは TaKaRa 社より購入した。リゾチーム, Proteinase K は SIGMA 社より購入した。

第 5 節 キット

組換えプラスミドの構築には DNA Ligation Kit (TaKaRa 社), 組換えプラスミド抽出には GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (SIGMA 社) を使用した。塩基配列の決定には Cy5™ AutoCycle™ Sequencing Kit (アマシャムバイオサイエンス社) を使用した。放線菌株からの total RNA の抽出には RNA Extraction Kit (アマシャムバイオサイエンス社) を使用した。RT-PCR 法には RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver.1.1 (TaKaRa 社) を使用した。5'-RACE 法には 5'-Full RACE Core Set (TaKaRa 社) を使用した。ラジオアイソトープによる DNA 断片の標識には, Nick translation Kit (アマシャムバイオサイエンス社) および MEGALABEL™ Kit (TaKaRa 社) を使用した。

第 6 節 その他の試薬

カスガマイシン塩酸塩一水和物は和光純薬工業, アンピシリン, クロラムフェニコール, ストレプトマイシン, アクチノマイシン D, チオストレプトン, X-gal および IPTG は, SIGMA 社から購入した。ラジオアイソトープ [α -³²P]-dCTP (0.37 MBq/ μ L) および [γ -³²P]-ATP (0.37 MBq/ μ L) は, 日本アイソトープ協会を通してアマシャムバイオサイエンス社より購入した。

表 1.1.1 使用した放線菌株

菌 株	性 質	参考文献
<i>Streptomyces kasugaensis</i> M338-M1	カスガマイシン生産菌株。1963年奈良県春日大社にて分離された。	Umezawa <i>et al.</i> , 1965
<i>Streptomyces kasugaensis</i> MB273-C4	カスガマイシン生産菌株。1967年奈良県吉野山にて分離された。	
<i>Streptomyces celluloflavus</i> JCM4126	1953年、オーレオシリシン生産菌株として分離された。 後に、カスガマイシン生産性が確認された。	Nishimura <i>et al.</i> , 1953
<i>Streptomyces albulus</i> MF861-C4	カスガマイシン生産菌株。1977年山梨県の土壌より分離された。	Kinoshita <i>et al.</i> , 1997
<i>Streptomyces xantholiticus</i> ISP5244	カスガマイシン非生産菌株。 <i>S. kasugaensis</i> と形態が類似しているため、対照菌株として使用した。	

表 1.1.2 使用した大腸菌株

菌 株	性 質	参考文献
<i>E. coli</i> DH5 α	$\phi 80lacZ\Delta M15\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>deoR recA1 endA1 hidR17(r_K⁻, m_K⁺)</i> <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 $\Delta(lac-proAB)$ / F'[traD36 <i>proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i></i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> TH2	<i>supE44 hsdS20(r_B⁻, m_B⁺) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 thi-1 trpR624</i>	Hashimoto <i>et al.</i> , 1993
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F' <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)</i>	Weiner <i>et al.</i> , 1994

表 1.2.1 MR（カスガマイシン生産）培地の組成

Bacto soyton (DIFCO)	10 g
Bacto yeast extract (DIFCO)	3 g
Glycerol (和光純薬工業)	20 g
Dextrin (和光純薬工業)	20 g
硫酸アンモニウム (和光純薬工業)	2 g

pHを7.0に調節した後、精製水にて1リットルにメスアップした。500 mLの培養コルベンにあらかじめ炭酸カルシウムを0.22 gずつ分取しておき、上記の通り調製した培地を110 mLずつ分注して、121℃にて15分間高圧蒸気滅菌した。

表 1.2.2 YGG培地の組成

Bacto yeast extract (DIFCO)	10 g
Glucose (和光純薬工業)	10 g
Glycine (和光純薬工業)	2 g

pHを7.2に調節した後、精製水にて1リットルにメスアップし、121℃にて15分間高圧蒸気滅菌した。

表 1.2.3 GPY培地の組成

Glucose (和光純薬工業)	10 g
Polypepton (和光純薬工業)	4 g
Bacto yeast extract (DIFCO)	4 g
MgSO₄·7H₂O	0.5 g
K₂HPO₄	1 g

精製水にて1リットルにメスアップし、121℃にて15分間高圧蒸気滅菌した。
プラスミドの調製を目的とした培養の場合、1リットルに対して1gのGlycineを添加する。

表 1.2.4 GLPYG培地の組成

Glycerol	4 g
Polypepton (和光純薬工業)	3 g
Bacto yeast extract (DIFCO)	4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Glycine (和光純薬工業)	1 g

精製水にて 900 mL にメスアップし、121℃にて15分間高圧蒸気滅菌した。使用時に、別途に滅菌しておいたPB緩衝液（第2編，第1章，第7節，1.7.5）100 mLを加える。

表 1.2.5 R2YE培地の組成

Sucrose	103 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
Glucose	10 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.12 g
Casaminoacids (DIFCO)	0.1 g

精製水にて 800 mL にメスアップし、80 mL ずつ分注してBacto-agarを2.2 gを添加した後、121℃にて15分間高圧蒸気滅菌した。使用時には、別途に滅菌しておいた下記溶液を添加し、適量ずつプレートに分注して固化させた。

KH₂PO₄ (0.5%) 1 mL, CaCl₂·2H₂O (3.68%) 8 mL, L-proline (20%) 1.5 mL, TES緩衝液 (5.73%, pH7.2) 10 mL, Trace element solution 0.2 mL, NaOH (1N) 0.5 mL。

表 1.2.6 RK5培地の組成

Succinic acid disodium salt	80 g
Sucrose	80 g
Glycerol	10 g
Polypepton (和光純薬工業)	3 g
Bacto yeast extract (DIFCO)	4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Glycine (和光純薬工業)	1 g
Trace element solution	2 mL

精製水にて900 mLに溶解してpH7.0~7.2に調整した後、Bacto-agarを20 g添加して1リットルにメスアップし高圧蒸気滅菌した。使用時は、溶解した培地が60℃ほどに冷却した時点で、100mg/mLのBSA溶液4 mLを添加し適量ずつプレートに添加する。

表 1.2.7 YT培地の組成

Bacto tryptone (DIFCO)	8 g
Bacto yeast extract (DIFCO)	5 g
NaCl	5 g
pHを7.5に調節した後，精製水にて1リットルにメスアップし，121℃にて20分間 高圧蒸気滅菌した。	

表 1.2.8 LB培地の組成

Bacto tryptone (DIFCO)	10 g
Bacto yeast extract (DIFCO)	5 g
NaCl	10 g
pHを7.0に調節した後，精製水にて1リットルにメスアップし，121℃にて20分間 高圧蒸気滅菌した。	

表 1.2.9 L-brothの組成

Bacto tryptone (DIFCO)	10 g
Bacto yeast extract (DIFCO)	5 g
NaCl	5 g
pHを7.5に調節した後，精製水にて1リットルにメスアップし，121℃にて20分間 高圧蒸気滅菌した。	

表 1.2.10 Noken培地の組成

L-Glutamic acid monosodium salt	2 g
Sucrose	20 g
Bacto yeast extract (DIFCO)	3 g
Polypepton (和光純薬)	5 g
KH₂PO₄	2 g
MgCl₂·6H₂O	1 g
FeSO₄·7H₂O	1 mg
pHを7.0に調節した後，精製水にて1リットルにメスアップした。121℃にて20分間 高圧蒸気滅菌した。	

表 1.2.11 カスガマイシンバイオアッセイ用培地の組成

Glucose	1 g
Bacto yeast extract (DIFCO)	2 g
Polypepton (和光純薬)	5 g
pHを7.0に調節した後，精製水にて1リットルにメスアップした。各培地瓶に0.4 gず つBacto agarを取分けた後，上記培地を50 mLずつ分注して121℃にて20分間高圧蒸気 滅菌した。	

表 1.3.1 使用したプラスミドベクター

プラスミド	長さ(kb)	耐性マーカー	用 途	参考文献
pUC118	3.1	Amp ^r	大腸菌用クローニングベクター。	Vieira & Messing, 1987
pTV118N	3.1	Amp ^r	大腸菌用発現ベクター。pUC118より構築された。ユニークなNcoIサイトを利用して、目的遺伝子をベクターに内在する <i>lac</i> プロモーターにより発現させる。	Maki <i>et al.</i> , 1987
pKF 3	2.2	CP ^r	大腸菌用クローニングベクター。ストレプトマイシンの標的分子 (S12) をコードする遺伝子 (<i>rpsL</i>) 中にクローニング部位が設けられており, TH 2 株 (<i>rpsL</i> ⁻) と組み合わせることで, ベクターのセルフライゲーションによるバックグラウンドが低く抑えられる。	Toba-Minowa & Hashimoto-Gotoh, 1992 Hashimoto <i>et al.</i> , 1993
pET-32a(+)	5.9	Amp ^r	pBR322に由来する発現プラスミド。チオレドキン (<i>trxA</i> [1-109]) とHis-Tagをもち, T7プロモーターによりその発現が調節されている。	LaVallie <i>et al.</i> , 1993

表 1.3.2 塩基配列決定に使用した合成プライマー

	名 称	配 列
pUC	M13-40 primer	5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'
	M13-reverse	5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'
pSKE1	5'-pKS1	5'-CAAGCTGCAGGCCGATCCGGCGAAA-3'
	3'-pKS1	5'-GTCGGCCATACCGTCTCCACGTGTT-3'
	5'-pKS2	5'-GCCCCGATACGAAGGCCGGACATGAA-3'
	3'-pKS2	5'-TCTTCGGGCGAGGTCGCGTTCATGT-3'
	5'-pKS3	5'-CGCTCTACAGCACCGAATGGGACAA-3'
	3'-pKS3	5'-GACAGGGACGAGTGGTTGTCCCATT-3'
	5'-pKS4	5'-TGGCGAACGCGGCTTGAGCGCCACA-3'
	3'-pKS4	5'-ACGACCGTGTCCAGGATGAAGGCAT-3'
	5'-pKS5	5'-ACGATGCCGGTGACGCCATCCAGAA-3'
	3'-pKS5	5'-TGACGGGTTCAGCCAGTTACCGCTT-3'
pSKE2	5'-pKS6	5'-TGATCTGGGAGCAGGGACTCTCCTG-3'
	3'-pKS6	5'-CAGGAGAGTCCCTGCTCCCAGATCA-3'
	5'-pKS7	5'-TCTTCCTCTTCGACATCGGCATGAT-3'
	3'-pKS7	5'-ATCATGCCGATGTCTGAAGAGGAAGA-3'
	5'-pKS8	5'-TCAGGCGATACGCCTGGCCAAGTTG-3'
	3'-pKS8	5'-CAACTTGGCCAGGCGTATCGCCTGA-3'
	5'-pKS9	5'-GCCAGGACGGCAGGCATCACATCCT-3'
	3'-pKS9	5'-CAGCGGAAGGTATCCGGCGGACAGT-3'
	5'-pKS92	5'-CGGTGCTCGATGTGCTCGGCGAGAT-3'
pSKE4	5'-pKS15	5'-CGCTCTCCGATGTCCTCGGCCAACT-3'
	3'-pKS15	5'-GCGACACAGACCTCCAGCCCCAGTT-3'
	5'-pKS16	5'-GCCTTCGGCCTGGACATTCCCGTCT-3'
	3'-pKS16	5'-GCCAGCCGTACGATCTGCCCCTTCA-3'
	5'-pKS17	5'-CGGCCACGGTCTCGTGGCTGTTCTT-3'
	3'-pKS17	5'-CAGTCGGACTCCCTGATGCCCAGGA-3'
	5'-pKS18A	5'-TCGGGGGTGGTGAACGGAGCGTTGA-3'
	3'-pKS18A	5'-GCGAGCCGTTGCGTTATTCCGAGTT-3'
	5'-pKS18B	5'-TCGTAGGTGGTGCCCTGCTGAGGCT-3'
	3'-pKS18B	5'-ACGCCATGACCCTCCGTCTGCTCGT-3'
	5'-pKS18C	5'-TTGCCCAGCGTCGGTGCCCTCTTCCT-3'
	3'-pKS18C	5'-GAAGTCACCTACCAGGGGCGGCACA-3'
	5'-pKS18D	5'-GATCGCGTCCGGTCTCCTCACAA-3'

表 1.3.2 塩基配列決定に使用した合成プライマー（続き）

	名 称	配 列
pSKE4	3'-pKS18D	5'-GGCATCCCCCTTCCCTCCGTCA-3'
	5'-pKS19	5'-CACTCCGGCTGCGGTACATGAGTAA-3'
	3'-pKS19	5'-GCGCAATCAACCCTGCGACGGGGAA-3'
	5'-pKS20	5'-GCCGACGTGGCGACCTTCAGCTTCT-3'
	3'-pKS20	5'-CGCTTGATCTCGGCGAGACGGTCCA-3'
	5'-pKS21	5'-TCCACGAAGTCACCGGGCTGATGGA-3'
	3'-pKS21	5'-CGCCACGAGCAGGATCTTCATGACA-3'
pSKE5	5'-pKS22a	5'-GGAACAGCGCAATCTGCTCAGGGAA-3'
	3'-pKS22a	5'-CCTTGAGTCCTGTGCGCCTGGCGAA-3'
	5'-pKS23a	5'-CTCTTCGGGTTGGCGGGGTATTTCT-3'
	3'-pKS23a	5'-CCCACCGACGCCGTTCTTCGGAAA-3'
	5'-pKS23b	5'-TCCGGGATTTCCGAAGGAACGGCGT-3'
	3'-pKS23b	5'-CGCGCCTACGGTACGACATTCTCCT-3'
	5'-pKS24a	5'-TTCCGCGACCTGGTCCACGAGTTGA-3'
	3'-pKS24a	5'-TGCCCATGGTGGGCTCGTCGAGGAA-3'
	5'-pKS25a	5'-ACCAGAACGCGCTGAGCTATCCCTT-3'
	3'-pKS25a	5'-TTGCGGATGAGGACGATGCCGAGGA-3'
	3'-pKS25b	5'-CCAGGGTGAAGGCGCCGATCAGCAT-3'
pSKE6	5'-pKS26a	5'-CTCGACACTTCTCGACGCTCTCCCT-3'
	3'-pKS26a	5'-GCACAGTTCAGCCTCATTTCTTGT-3'
	5'-pKS26b	5'-CGGCTCACACAGGCCCGCACCGAAA-3'
	3'-pKS26b	5'-TCCTTCGCCATCGCCTCCTCTGTTT-3'
pSKE7	5'-SKE71	5'-TCGACGGAGCGGAGGAGGACTCCTT-3'
	3'-SKE71	5'-CTACTGTGCGACGCGGTCCGGAAGT-3'
	5'-SKE72	5'-CCAAGATCGCACATGCGGCAGGGGT-3'
	3'-SKE72	5'-GTAGGGGGGCCCTTGCGCAGTTTCT-3'
	5'-SKE73	5'-GCAGGATTTGCGCCGCGCAACTGGAA-3'
	3'-SKE73	5'-TCCGCTCCGTCTGAAGAACCGCACCT-3'
pSKE8	5'-SKE81	5'-GTCCTTCGCGCTGCGGATGCCGTAT-3'
	3'-SKE81	5'-CGGCTCAAGCGGCTATCGGATTCAC-3'
	5'-SKE82	5'-CCAGCCCGAACAACGCGTGACCAGT-3'
	3'-SKE82	5'-AAGCCGCCCCCGTGGCAGACGAAAT-3'
	5'-SKE83	5'-GGCTCGGGTCAGGTGAGAGTGCTT-3'
	3'-SKE83	5'-GACCGTGTGGACTCACCAGAAGACC-3'

表 1.3.3 RT-PCRに使用した合成プライマー

領 域	プライマー	配 列
16S rRNA	5'-16SLa	5'-TCACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'
	3'-16SLa	5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG-3'
<i>kasT</i>	5'-SKE 71	5'-TCGACGGAGCGGAGGAGGACTCCTT-3'
	3'-SKE 72	5'-GTAGGGGGGGCCCTTGCGCAGTTTCT-3'
<i>kasU</i>	5'-ORF U	5'-CGACTTCCGGACCGCGTCGCACAGT-3'
	3'-ORF U	5'-ATTACCGCACCAGGTGCGTCCCTTT-3'
<i>kasJ</i>	5'-pKS 26b	5'-CGGCTCACACAGGCCCGCACCGAAA-3'
	3'-pKS 22a	5'-CCTTGAGTCCTGTGCGCCTGGCGAA-3'
<i>kasKLM</i>	5'-pKS 24a	5'-TTCCGCGACCTGGTCCACGAGTTGA-3'
	3'-ORF J1	5'-CCTCTAGACCCACGAATGCGGCCTGGCCGA-3'
<i>kasNO</i>	5'-pKS 16b	5'-AGAACAGGTGGCTCAGCCCCGCGGA-3'
	3'-pKS 16	5'-GCCAGCCGTACGATCTGCCCCTTCA-3'
<i>kasPQ</i>	5'-pKS 18c	5'-TTGCCCAGCGTCGGTGCCTCTTCCT-3'
	3'-pKS 18RT	5'-CCCGGCCACGCTGCGTTTCGTCAT-3'
<i>kasRA</i>	5'-pKS 20	5'-GCCGACGTGGCGACCTTCAGCTTCT-3'
	3'-pKS 21	5'-CGCCACGAGCAGGATCTTCATGACA-3'
<i>kasCD</i>	5'-pKS 1	5'-CAAGCTGCAGGCCGATCCGGCGAAA-3'
	3'-pKS 1	5'-GTCGGCCATACCGTCTCCACGTGTT-3'
<i>kasEF</i>	5'-ORF 3B	5'-ACGCCCCGGTGACGGAGAGCTTCGT-3'
	3'-ORF 3B	5'-GTGTCGGCCACTTCCGGGAAGGTCT-3'
<i>kac</i>³³⁸	5'-pKS 4	5'-TGGCGAACGCGGCTTGAGCGCCACA-3'
	3'-pKS 4	5'-ACGACCGTGTCCAGGATGAAGGCAT-3'

表 1.3.4 5'-RACEに使用した合成プライマー

	プライマー	配 列
<i>kasJ</i>	3'-PKasJ	5'-CCAGCACGATGTACTCGCGGCCAGTCGTT-3'
	5'-RACE26	5'-GGCTCGAGTGGATACGGCGGTAATCGGGTC-3' <i>XhoI</i>
	3'-RACE26	5'-GGGCATGCGCACAGTTCAGCCTCATTTCCT-3' <i>SphI</i>
	5'-RACE26b	5'-GGGCATGCCCCGAAGTGAACGACT-3' <i>SphI</i>
	3'-RACE26b	5'-CGCTCGAGTCCGGCGTGCCGCTGT-3' <i>XhoI</i>
<i>kasNO</i>	3'-PKasN	5'-ATCGCCCACTGACCACGTCCACA-3'
	5'-RACE15a	5'-CTCCGCCCCGCACCAACCCT-3'
	3'-RACE15a	5'-GGAGGTGTCACGGGACGGTCTT-3'
	5'-RACE15b	5'-CCCTGCAGAAAGGAAGACGGCCCGATGA-3' <i>PstI</i>
	3'-RACE15b	5'-CCGTCGACCCGGCCACCGCATGCGAAGA-3' <i>SalI</i>
<i>kasU</i>	5'-PKasU	5'-CGACTTCCGGACCGGTCGCACAGT-3'
	5'-RACE7a	5'-TTGGTTGAACACAGGTGGAG-3'
	3'-RACE7a	5'-GGAATTTCTGGGTGAACA-3'
	5'-RACE7b	5'-GGGCATGCGGTGCGCACGTACGGGGAC-3' <i>SphI</i>
	3'-RACE7b	5'-GCGTCGACCCGCCGTTGCAGCCA-3' <i>SalI</i>

第7節 緩衝液等の組成

1.7.1 DNA抽出と電気泳動

2x TES : 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 50 mM EDTA, 50 mM NaCl

TE 緩衝液 : 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA

TAE 緩衝液 : 40 mM TRIZMA BASE, 40 mM 酢酸, 1 mM EDTA [pH 8.0]

1.7.2 サザンブロット解析

6x STE : 900 mM NaCl, 90 mM Tris-HCl [pH 7.5], 6 mM EDTA

2x SSC : 300 mM NaCl, 30 mM Na₃-citrate-2H₂O

ハイブリダイゼーション溶液 : 50% ホルムアミド, 6x STE, 0.1% SDS, 5x Denhardt's 溶液, 100 µg/mL サケ精子 DNA

1.7.3 ノーザンブロット解析

MOPS 緩衝液 : 20 mM MOPS, 5 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA [pH 8.0]

ハイブリダイゼーション溶液 : 50% ホルムアミド, 5x SSC, 50 mM リン酸緩衝液 [pH 6.5], 10x Denhardt's 溶液, 100 µg/mL サケ精子 DNA

1.7.4 プライマーエクステンション

TEK 緩衝液 : 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 1 mM EDTA [pH 8.0], 250 mM KCl

RT 緩衝液 : 24.2 mM Tris-HCl [pH 8.3], 17.3 mM KCl, 13.7 mM MgCl₂, 13.8 mM DTT, 0.346 mM dNTP

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

Trace element solution : 0.004% ZnCl₂, 0.02% FeCl₃-6H₂O, 0.001% CuCl₂-2H₂O, 0.001% MnCl₂-4H₂O, 0.001% (NH₄)₆Mo₇O₂₄-4H₂O, 0.001% Na₂B₄O₇-4H₂O, 0.001% Na₂B₄O₇-10H₂O

TES 緩衝液 : 5.73% *N*-tris [Hydroxymethyl] methyl-2-aminoethanesulfonic acid [pH 7.2]

プロトプラスト緩衝液 : 10.3% Sucrose, 0.025% K₂SO₄, 0.202% MgCl₂-6H₂O に調整後, 1000 mL に対して Trace element solution を 2 mL 添加し高圧蒸気滅菌した。使用時は, プロトプラスト緩衝液 80 mL に対して 0.5% KH₂PO₄ を 1 mL, 3.68% CaCl₂-2H₂O を 10 mL, TES 緩衝液を 10 mL 加えて使用した。

Transformation 緩衝液 : 2.575% Sucrose, 0.025% K₂SO₄ に調整後, 100 mL に対して Trace element solution を 0.2 mL 添加した。使用時に, 9.3 mL に対して 5M CaCl₂ を 0.2 mL, 1M Tris-maleic acid を 0.5 mL 加えて使用した。

P3 medium : 70 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 0.5 M Sucrose, 0.025 M TES 緩衝液

PWP : 70 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, 0.5 M Sucrose, 0.025 M TES 緩衝液

PB 緩衝液：2% KH_2PO_4 ，8% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

1.7.6 Trx-KasT 融合タンパク質の発現と精製

SDS-PAGE 泳動緩衝液：25 mM TRIZMA BASE，192 mM glycine，0.1% SDS

固定液：40% 酢酸

Tris-HCl [pH 8.0] / NaCl 溶液：50 mM Tris-HCl [pH 8.0]，300 mM NaCl

Lysis 緩衝液：Tris-HCl [pH 8.0] / NaCl 溶液に 10 mM になるように imidazole を添加

Wash 緩衝液：Tris-HCl [pH 8.0] / NaCl 溶液に 50 mM になるように imidazole を添加

Binding 緩衝液：10 mM Tris-HCl [pH 8.0]，50 mM KCl，5 mM MgCl_2 ，10% glycerol

Elution 緩衝液：Binding 緩衝液に 250 mM になるように imidazole を添加

1.7.7 ゲルシフト解析

40% アクリルアミド溶液：39% acrylamide，1% N,N'-Methylene-bis-acrylamid

10x ゲルシフト緩衝液：67 mM Tris-HCl [pH 8.0]，10 mM EDTA [pH 8.0]，33 mM 酢酸ナトリウム

その他，ここに記載しなかった基本的な試液の組成およびその調整は，Sambrook らの成書に従った (Sambrook *et al.*, 2001)。

第2章 実験方法

第1節 培養

2.1.1 放線菌株の培養

放線菌株の培養は，500 mL の培養フラスコに培地 110 mL およびガラスビーズ約 50 粒を加えたものを用いて行った。特記しない限り，培養の条件は 27 °C，180 rpm とした。

2.1.2 大腸菌株の培養

大腸菌株の培養は，特に記載しない限り 37 °C，180 rpm で数時間から一晩行った。pUC118 および pTV118N による形質転換株の培養では，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる様にアンピシリンを添加した。また，pET-32a (+) による形質転換株の培養では，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる様にアンピシリンを添加した。pKF 3 による形質転換株の培養では，クロラムフェニコール（終濃度 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），ストレプトマイシン（終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を添加した。

第2節 使用した遺伝子操作技術

フェノール・クロロホルム抽出，アルコール（イソプロパノール，エタノール）沈澱などの基本的な遺伝子操作は，Sambrook らの成書に従って行った (Sambrook *et al.*, 2001)。

制限酵素および他の酵素類の取扱いは、添付の取扱説明書に従った。アガロースゲル電気泳動による核酸の分離は、特に記載しない限り TAE 緩衝液を使用して 100 V, 60 分間行った。アガロースゲルからの核酸の回収は SUPREC-01 (TaKaRa 社) を用いて行った。PCR 反応後のプライマーの除去および標識プローブ作製後の未反応ラジオアイソトープの除去は、ゲルろ過スピンカラム S-200HR, S-300HR および S-400HR (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて添付の取扱説明書に従って操作した。

第3節 放線菌株からの核酸抽出法

2.3.1 ゲノム DNA の抽出

YGG 培地にて 48 時間振とう培養した菌体を回収し、2xTES にて菌体を洗浄した後、再度 2x TES で懸濁した。この菌体懸濁液にリゾチーム (終濃度 4 mg/mL) を添加して 37 °C, 1 時間処理した後、SDS (終濃度 0.1%) および Proteinase K (終濃度 20 µg/mL) を添加して溶菌し、フェノール・クロロホルム抽出により除タンパク、イソプロパノール沈澱により核酸を回収した。得られた沈澱を TE 緩衝液 (pH8.0) に溶解し、RNase (終濃度 20 µg/mL) を添加して 37 °C, 1 時間処理した後、フェノール・クロロホルム抽出を再度行い、エタノール沈澱によりゲノム DNA を沈澱させた。得られたゲノム DNA は適量の TE 緩衝液に溶解して 4 °C で保存した。

2.3.2 Total RNA の抽出

MR 培地に *S. kasugaensis* M338-M1 株の孢子懸濁溶液を添加して、24 時間毎に (120 時間まで) 菌体を回収した。得られた菌体 1 g から、RNA Extraction Kit (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて total RNA を抽出した。操作は添付の取扱説明書に従って行った。特に記載しない限り、RNA を取扱う実験においては、使用するガラス器具類はすべて DEPC 処理を行った。また、プラスチック器具・容器類は AbSolve (PerkinElmer 社) により洗浄した。精製水も DEPC 処理 (DEPC-DW) を行った後、オートクレーブを 3 回繰返してから使用した。RNA を用いる実験の試液は、すべて DEPC-DW により調製した。

第4節 PCR

PCR は、MJ RESEARCH 社の MiniCycler™ PTC-150-16 を用いて行った。PCR 反応には、LA Taq DNA polymerase (TaKaRa 社) と、酵素購入時に添付されてくる PCR 緩衝液、25mM MgCl₂ 溶液、2.5mM dNTP 混合溶液を使用した。また、本研究で行った PCR 反応条件を以下に記載した。本論では以下の反応条件名を記載した。

反応条件 1) :

97 °C, 1 分 → 65 °C, 2 分 → 72 °C, 2 分 (1 サイクル)

97 °C, 30 秒 → 65 °C, 1 分 → 72 °C, 1 分 (23 サイクル)

97 °C, 30 秒 → 65 °C, 1 分 → 72 °C, 5 分 (1 サイクル)

合 計 25 サイクル

反応条件 2) :

98 °C, 2 分 → 72 °C, 2 分 (1 サイクル)

98 °C, 30 秒 → 72 °C, 2 分 (23 サイクル)

98 °C, 30 秒 → 72 °C, 5 分 (1 サイクル)

合 計 25 サイクル

第 5 節 クローニング

2.5.1 ショットガンクローニング

本研究では、宿主ベクター系として大腸菌 DH5α / pUC118, および大腸菌 TH2 / pKF 3 を使用した。各標識プローブは、Nick Translation Kit (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて取扱説明書に従って作製した。遺伝子ライブラリーの構築およびコロニーハイブリダイゼーションは Sambrook らの成書に従って行った (Sambrook *et al.*, 2001)。

2.5.2 Inverted PCR を利用した PCR クローニング

既知 DNA 領域に認識部位が認められる制限酵素を用いて M338-M1 株のゲノム DNA 約 1 µg を完全消化した。これを DNA Ligation Kit (TaKaRa 社) を用いてセルフライゲーションさせて、その 300 ng 相当分を inverted PCR の鋳型とした。PCR の反応条件は、第 2 編、第 2 章、第 4 節の反応条件 2) で行った。

第 6 節 塩基配列決定法

塩基配列の決定は、Cy5TM AutoCycleTM Sequencing Kit (アマシャムバイオサイエンス社) を用いたサイクルシーケンス法により行った。反応条件を下記に示した。

サイクルシーケンス反応条件:

95 °C, 2 分 → 50 °C, 36 秒 → 72 °C, 84 秒 (1 サイクル)

95 °C, 36 秒 → 50 °C, 36 秒 → 72 °C, 84 秒 (16 サイクル)

95 °C, 36 秒 → 72 °C, 84 秒 (13 サイクル)

反応に使用した鋳型 DNA 量は、pUC118 もしくは pTV118N で作製した組換えプラスミドの場合 500 ng~1 µg, PCR 増幅断片 (500~2,000 bp) の場合 200 ng~500 ng 程度を使用

した。各プライマー（表 1.3.2）は 4 pmol 使用した。作製したサンプルは 6% ポリアクリルアミドゲル（6 M ウレア含）により 1,200 V, 10 時間電気泳動した。泳動は ALFred™ DNA Sequencer（アマシャムバイオサイエンス社）により行った。

第 7 節 標識プローブの作製

2.7.1 Nick translation

サザンブロット解析およびノーザンブロット解析に使用した標識プローブは、nick translation 法により作製した。実験には Nick translation Kit（アマシャムバイオサイエンス社）を用いて操作は取扱説明書に従って行った。アイソトープは $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ （0.37 MBq/ μL ）を使用した。

2.7.2 DNA 5'末端標識

ゲルシフト解析に使用した標識プローブは、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ （0.37 MBq/ μL ）を用いて DNA 5'末端のリン酸基を標識したのを用いた。5'末端標識反応は MEGALABEL™ Kit（TaKaRa 社）を用いて行い、その操作は取扱説明書に従った。

第 8 節 サザンブロット解析

放線菌ゲノム DNA 約 5 μg を、適当な制限酵素（約 50 単位）にて完全消化して 0.6% アガロースゲルにて分画後、キャピラリー法により Hybond-N（アマシャムバイオサイエンス社）に転写した。80 °Cにて 2 時間フィルターを加熱してフィルター上に DNA を固定した後、5 mL のハイブリダイゼーション溶液に浸し、42 °C数時間プレハイブリダイゼーションした。その後、熱変性させた標識プローブを添加し 42 °C, 12~17 時間ハイブリダイゼーションを行った。次にシートを 2x SSC に移し、65 °C, 30 分間洗浄した。さらに 0.2x SSC にシートを移して 65 °C, 30 分間洗浄した後、イメージングアナライザー BAS2000 にて解析した。

第 9 節 ノーザンブロット解析

本章、第 3 節、2.3.2 に従って抽出した total RNA 約 20 μg を、ホルムアルデヒドを含んだ 1.2% アガロースゲルで電気泳動した。次にキャピラリー法により Hybond-N（アマシャムバイオサイエンス社）に転写した。80 °Cにて 2 時間フィルターを加熱してフィルター上に RNA を固定した後、5 mL のノーザンブロット解析用ハイブリダイゼーション緩衝液に浸し、42 °Cにて 3~4 時間プレハイブリダイゼーションした。その後、熱変性した標識プローブを添加し 42 °C, 12~17 時間ハイブリダイゼーションを行った。シートの洗浄

は、2x SSC にて 65 °C、30 分間を 1 回、さらに 0.2x SSC にて 65 °C、30 分間を 1 回行い、イメージングアナライザー BAS2000 にて解析した。

第 10 節 RT-PCR

RT-PCR は、RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver.1.1 (TaKaRa 社) を使用し、添付されていた取扱説明書に従って操作した。特に記載しない限り、各 total RNA は 100 ng 使用し、逆転写反応は 42 °C、30 分間行った。また、PCR 反応条件は本章、第 4 節の反応条件 1) で行った。内部標準として 16S rRNA の RT-PCR 反応を行った。また、ゲノム DNA を用いて行った PCR 溶液をポジティブコントロール、逆転写過程において RTase を添加せずに反応を行ったものをネガティブコントロールとした。

第 11 節 プライマーエクステンション

本実験では、Cy5ラベルされたプライマーを用い、その解析にはALFred™ DNA Sequencerを使用した。本章、第3節、2.3.2で調製した各 total RNA 20 µgを、TEK緩衝液40 µLに溶解した。この溶液20 µLに、Cy5ラベルされたプライマー溶液 (1 pmol/µL) を1 µL加え、90 °C、5 分 → 60 °C、30 分 → 30 °Cで一晩保持しプライマーをアニーリングさせた。この溶液に、RT緩衝液 58.4 µLとアクチノマイシンD (5 µg/µL) 1.6 µLおよびM-MLV由来 RTase (200 u/µL) 1 µLを加え37 °Cにて1 時間反応し、エタノール沈殿を行った。得られた沈澱を、精製水3 µLとCy5™ AutoCycle™ Sequencing Kit (アマシャムバイオサイエンス社) 付属の反応停止液 2 µLに溶解した。また、残りの溶液 20 µLには、M-MLV由来RTaseを添加せずに、同様の操作を行い、ネガティブコントロールとした。これら反応溶液と、プライマーエクステンションで使用したのと同じプライマーで作製したシーケンス反応溶液をシーケンス用ゲルに流し解析を行った。

第 12 節 5'-RACE

本実験は、5'-Full RACE Core Set Kit (TaKaRa 社) を用いて行い、その操作は取扱説明書に従った。各 total RNA は、3.5~7 µg 使用した。5'末端がリン酸化された合成プライマーを逆転写反応時のプライマーとして使用した (表 1.3.4)。Total RNA と合成プライマーを合わせ、80 °C、2 分 → 60 °C、10 分間加熱した後、室温に戻るまで数分間放置した。その後、RNase インヒビターおよび AMV 由来 RTase を添加し、50 °C、30 分間反応した。この反応溶液に RNaseH を添加し、30 °C、1 時間反応し RNA 鎖を分解した。次に、得られた 1 本鎖 cDNA を T4 RNA Ligase により 15 °C、15~18 時間反応して環状化 (もしくは

コンカテマー化)させた。この反応溶液の10倍希釈液(もしくは原液)をPCR用の鋳型とし、1st PCRプライマーセットによりPCRを行った。さらに、内部に設計した2nd PCRプライマーセットを用いてPCRを行った。プライマーの5'末端領域に設計した制限酵素認識部位を利用して得られた増幅断片をpUC118にクローニングした後、その塩基配列を決定してmRNAの5'末端を解析した。

第13節 放線菌プロトプラストの調製法

2.13.1 *Streptomyces lividans* TK21 プロトプラストの調製

GPY 培地 110 mL に対して *S. lividans* TK21 胞子懸濁液 100 μ L を加え、27 $^{\circ}$ C 180 rpm で 30 ~ 40 時間培養した。次に 0 $^{\circ}$ C にて 8000 $\times g$ 10 分間遠心して集菌し、10.3% Sucrose で 2 回洗浄した。得られた菌体を 4 mL のプロトプラスト緩衝液で懸濁し 10 mg/mL リゾチーム溶液を 1 mL 加えて 30 $^{\circ}$ C で 60 分反応させた。反応後、5 mL のプロトプラスト緩衝液を加え、綿栓したシリンジにより菌糸を除去した。その溶液を 0 $^{\circ}$ C にて 1000 $\times g$ 7 分間遠心して集菌し、5 mL のプロトプラスト緩衝液で 1 回洗浄後、再度 0 $^{\circ}$ C にて 1000 $\times g$ 7 分間遠心して集菌した後、1 mL のプロトプラスト緩衝液に懸濁した。得られたプロトプラスト溶液を 200 μ L ずつ分注し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

2.13.2 *S. kasugaensis* プロトプラストの調製

GLPYG 培地 110mL に *S. kasugaensis* MB273-C4 株 (A1R6 株) を植菌し、27 $^{\circ}$ C 180 rpm 48~50 時間培養した。培養菌液 8 mL を 0 $^{\circ}$ C にて 8000 $\times g$ 10 分間遠心して集菌し、0.35 M Sucrose にて洗浄した後、8 mL の P3 培地にて懸濁した。8 mg リゾチームを加えて 27 $^{\circ}$ C ~30 $^{\circ}$ C で 90 分間反応させた。反応後、0 $^{\circ}$ C にて 200 $\times g$ 10 分間遠心して上清を回収し、再度 0 $^{\circ}$ C にて 1000 $\times g$ 10 分間遠心してその上清を除去した。次に、沈殿を 8 mL の PWP 培地で懸濁させ、0 $^{\circ}$ C にて 1000 $\times g$ 10 分間遠心して上清を除去した。この操作を 2 回繰り返し、400 μ L の PWP 培地に懸濁後、100 μ L ずつ分注して-80 $^{\circ}$ C で保存した。

第14節 放線菌の形質転換法

2.14.1 *S. lividans* TK21 の形質転換

DNA 溶液に同量の 0.6 M Sucrose を加えた後、*S. lividans* TK21 プロトプラスト 100 μ L に全量を加え 1 分間室温で放置した。次に、1 mL の Transformation 緩衝液 (25% PEG4000 を含む) を加えて軽くピペティングした後、あらかじめチューブに分注しておいた 5 mL のプロトプラスト緩衝液にこの溶液を添加した。0 $^{\circ}$ C にて 1000 $\times g$ 7 分間遠心して上清を除去後、1 mL のプロトプラスト緩衝液に懸濁して R2YE プレートに 100 μ L ずつプレーティングし 28~30 $^{\circ}$ C で 14 ~ 18 時間培養した。培養後、チオストレプトン (12 μ g/mL)

を含んだ R2YE ソフトアガーを 9 mL 重層し、さらに 2~3 日培養した。得られたコロニーを GPY 培地にて 2~3 日培養し、プラスミドを抽出して確認した。

2.14.2 *S. kasugaensis* の形質転換

DNA 溶液 (3~5 µg) 20 µL に 5 µL の 50% Sucrose を加えた後、*S. kasugaensis* MB273-C4 のプロトプラスト溶液 105 µL を加え、0 °C にて 1 分間放置した。次に、100 µL の PWP 緩衝液 (40% PEG4000 入り) を加えて混和後、0 °C にて 2 分間放置した。これに 1.7 mL の PWP 緩衝液を加えて 0 °C にて 5 分間放置した。この溶液を、2 時間以上乾燥させた RK5 プレートに 300 µL ずつブレイティングし、30 分間乾燥後、27~30 °C で 17~18 時間培養させた。培養後、チオストレプトン (12 µg/mL) を含んだ RK5 ソフトアガーを 3 mL ずつプレートに重層し、さらに 5~7 日培養した。得られたコロニーを GLPYG 培地にて 2~3 日培養後、プラスミドを抽出して確認した。

第 15 節 カスガマイシンの定性と定量

2.15.1 *Pseudomonas fluorescens* IFO15334 株の培養

凍結保存しておいた *P. fluorescens* IFO15334 菌液を火炎滅菌したミクロスパーテルでかきとり、1 mL の Noken 培地に植菌し 30 °C で 20 時間静置培養した。得られた菌液 1 mL を 45 mL の Noken 培地に植菌し、30 °C で 36 時間再度静置培養した。3,000 rpm で 5 分間遠心して菌体を回収した。上清を除去した後、新しい Noken 培地を 7 mL と 50% グリセロール溶液 3 mL を加えて懸濁した。得られた懸濁液は 300 µL ずつ分注した後、-80 °C にて凍結保存した。

2.15.2 カスガマイシンのバイオアッセイ

カスガマイシンバイオアッセイ培地 50 mL を溶解し、45 °C の湯浴に 30 分間放置した。別途融解した *P. fluorescens* IFO15334 菌液 300 µL を培地に添加して軽く混合した後、滅菌角型シャーレ 1 号 (栄研器材) に流し込んだ。培地が固まった後、試料溶液を 25 µL しみ込ませたペーパーディスクをのせて 30 °C にて 24 時間培養して阻止円の有無を観察した。

第 16 節 大腸菌 JM109 株における *kac* の発現とカスガマイシン耐性

カスガマイシンに対して比較的感受性を示す大腸菌 JM109 株を、発現用ベクター pTV118N に *kac*²⁷³, *kac*³³⁸ を導入して構築した pTV-273*kac* および pTV-338*kac* により形質転換した。得られた形質転換株を YT 培地 (100 µg/mL アンピシリン含) にて 37 °C 一晚培養した。得られた菌液 20 µL を 2 mL の YT 培地 (100 µg/mL アンピシリン含) に植菌し、660 nm における吸光度が約 0.5 OD となった時点で、IPTG (終濃度 0.2 mM) を添加して

さらに3時間培養を継続した。この菌液 10 μ L を、100 μ g/mL アンピシリンと KSM（濃度は各プレートで異なる）を添加した YT 寒天培地上に滴下して、37 $^{\circ}$ C にて一晩倒置培養した。

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

pET-KasT により形質転換された大腸菌 BL21 (DE3) を 5 mL の LB 培地に植菌し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。得られた菌液 1 mL を 110 mL の LB 培地に植菌し、37 $^{\circ}$ C で約 5 時間 (660 nm における吸光度が約 0.5 OD) 培養した。この培養液に IPTG（終濃度 1 mM）を添加し、さらに 30 $^{\circ}$ C にて 20 時間培養を継続した。培養終了後、遠心により菌体を回収し、3 mL の Lysis 緩衝液で再懸濁した。これに 5 mg のリゾチームを添加して 0 $^{\circ}$ C にて 30 分間処理した後、超音波処理により菌体を破碎した。菌体破碎液を 5,000x g、30 分間遠心し、その上清を Ni-NTA とともに 90 分間振とうした後、カラムに充填した。Wash 緩衝液 4 mL で 2 回、Binding 緩衝液 2 mL で 3 回カラムを洗浄し、続いて Elution 緩衝液 1 mL で 5 回溶出した。各フラクション溶液を SDS-PAGE により泳動し、Trx-KasT の有無を確認した。精製されたタンパク質溶液を適当な容量に分注し、直ちに -80 $^{\circ}$ C にて凍結保存した。各フラクション溶液のタンパク質量はプロテインアッセイ染色液（BIO-RAD 社）を用いて定量した。

第18節 ゲルシフト解析

プローブ DNA は PCR 法により作製した。PCR 反応はいずれも第2編、第2章、第4節の反応条件 1) で行った。比活性を液体シンチレーションカウンターにて測定し、15,000 cpm / μ L に希釈した後、以下の操作に使用した。

（Trx-KasT と各プローブとの結合反応）

Trx-KasT	10 μ L
0.1 M DTT	1 μ L
125 mM Spermidine	2 μ L
Poly (dI-dC) (1 μ g/ μ L)	1 μ L
Binding 緩衝液	5 μ L
Total	19 μ L

上記反応溶液に各プローブ (15,000 cpm/ μ L) 1 μ L を加え、30 $^{\circ}$ C にて 1 時間加温した後、4% アクリルアミドゲルを用いて 150 V、1 時間電気泳動した。泳動終了後、ゲルを Whatman 3MM ろ紙に移して 30 分間乾燥した後、イメージングアナライザー BAS2000 により解析した。また、コンペティターを添加する場合は、上記反応溶液に非標識プローブを約 500 ~1,500 ng 添加した。

参考文献

- Ahlert, J., Distler, J., Mansouri, K., Piepersberg, W. (1997) *Arch Microbiol* 168: 102-113.
- Bechthold, A., Sohng, J. K., Smith, T. M., Chu, X., Floss, H. G. (1995) *Mol Gen Genet* 248: 610-620.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G.L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbino-witsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., Hopwood, D. A. (2002) *Nature* 417: 141-147.
- Beyer, S., Distler, J., Piepersberg, W. (1996) *Mol Gen Genet* 250: 775-784.
- Brown, K. L., Wood, S., Buttner, M. J. (1992) *Mol Microbiol* 6: 1133-1139.
- Campbell, R. E., Mosimann, S. C., Tanner, M. E., Strynadka, N. C. (2000) *Biochemistry* 39: 14993-15001.
- Chater, K. F. & Bruton, C. J. (1985) *EMBO J* 4: 1893-1897.
- Chiu, H. T., Hubbard, B. K., Shah, A. N., Eide, J., Fredenburg, R. A., Walsh, C. T., Khosla, C. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8548-8553.
- Calcutt, M. J. & Schmidt, F. J. (1994) *Gene* 151: 17-21.
- Cundliffe, E. (1989) *Annu Rec Microbiol* 43: 207-233.
- Dairi, T., Ohta, T., Hashimoto, E., Hasegawa, M. (1992a) *Mol Gen Genet* 232: 262-270.
- Dairi, T., Yamaguchi, K., Hasegawa, M. (1992b) *Mol Gen Genet* 236: 49-59.
- Degols, G. (1987) *Eur J Biochem* 169: 193-200.
- Distler, J. & Piepersberg, W. (1985) *FEMS Microbiol Lett* 28: 113-117.
- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M., Piepersberg, W. (1987) *Nucleic Acids Res* 15: 8041-8056.
- Distler, J., Mansouri, K., Mayer, G., Stockmann, M., Piepersberg, W. (1992) *Gene* 115:105-111.
- Evans, I. J. & Downie, J. A. (1986) *Gene* 43: 95-101.
- Fernandez, E., Lombo, F., Mendez, C., Salas, J. A. (1996) *Mol Gen Genet* 251: 692-698.
- Fukagawa, Y., Sawa, T., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1968a) *J Antibiot* 21: 50-54.
- Fukagawa, Y., Sawa, T., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1968b) *J Antibiot* 21: 182-184.
- Fukagawa, Y., Sawa, T., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1968c) *J Antibiot* 21: 185-188.
- Fukagawa, Y., Sawa, T., Homma, I., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1968d) *J Antibiot* 21: 358-360.
- Fukagawa, Y., Sawa, T., Homma, I., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1968e) *J Antibiot* 21: 410-412.
- Furuya, K. & Hutchinson, C. R. (1996) *J Bacteriol* 178: 6310-6318.
- Geistlich, M., Losick, R., Turner, J. R., Rao, R. N. (1992) *Mol Microbiol* 6: 2019-2029.
- Guchte, M., Kok, J., Venema, G. (1991) *Mol Gen Genet* 227: 65-71.

- Guilfoile, G. P. & Hutchinson, R. C. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8553-8557.
- Guthrie, E. P., Flaxman, C. S., White, J., Hodgson, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F. (1998) *Microbiology* 144: 727-738.
- Hallam, S. E., Malpartida, F., Hopwood, D. A. (1988) *Gene* 74: 305-320.
- Hanahan, D. (1983) *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Hashimoto-Gotoh, T., Tsujimura, A., Kuriyama, K., Matsuda, S. (1993) *Gene* 137: 211-216.
- Higgins, C. F. (1992) *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113.
- Hopwood, D. A. (1997) *Chem Rev* 97: 2465-2498.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., Schrempf, H. (1985a) Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Hopwood, D. A., Malpartida, F., Kieser, H. M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B. A., Floss, H. G., Omura, S. (1985b) *Nature* 314: 642-644.
- Hopwood, D. A. (1986) In Booth, I. R. & Higgins, C. F. (eds.), 25 Years On. Symp. Soc. Gen. Microbiol., University of Cambridge Press, Cambridge, pp. 251-276.
- Horinouchi, S. (2002) *Frontiers in Bioscience* 7: 2045-2057.
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., Higgins, C. F. (1990) *Nature* 346: 362-365.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., Omura, S. (2003) *Nature Biotechnology* 21:526-531.
- Ikeno, S., Higashide, K., Kinoshita, N., Hamada, M., Hori, M. (1996) *Actinomycetol* 10: 73-79.
- Ikeno, S., Tsuji, T., Higashide, K., Kinoshita, N., Hamada, M., Hori, M. (1998) *J Antibiot* 51: 341-352.
- Ikeno, S., Yamane, Y., Ohishi, Y., Kinoshita, N., Hamada, M., Tsuchiya, S. K., Hori, M. (2000) *J Antibiot* 53:373-384.
- Ikeno, S., Aoki, D., Sato, K., Hamada, M., Hori, M., Tsuchiya, S. K. (2000) *J Antibiot* 55: 1053-1062.
- Ishikawa, J. & Hotta, K. (1999) *FEMS Microbiol Lett* 174: 251-253.
- Jiang, X. M., Neal, B., Santiago, F., Lee, S. J., Romana, L. K., Reeves, P. R. (1991) *Mol Microbiol* 5: 695-713.
- Jung, Y. G., Kang, S. H., Hyun, C. G., Yang, Y. Y., Kang, C. M., Suh, J. W. (2003) *FEMS Microbiol Lett* 219: 285-289.
- Kaur, P. (1997) *J Bacteriol* 179: 569-575.
- Khokhlov, A. S., Tovarova, I. I., Borisova, L. N., Pliner, S. A., Shevchenko, L. N., Kornitskaia, E.Ia., Ivkina, N. S., Rapoport, I. A. (1967) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 177:232-235.
- Khosla, C. (1996) *Curr Opin Biotechnol* 7: 219-222.
- Kiino, D. R., Licudine, R., Wilt, K., Yang, D. H., Rothman-Denes, L. B. (1993) *J Bacteriol* 175: 7074-7080.

- Kinoshita, N., Hattori, S., Ikeno, S., Hori, M., Hamada, M. (1997) *Actinomycetol* 11: 6-10.
- Kojima, I., Kasuga, K., Kobayashi, M., Fukasawa, A., Mizuno, S., Arisawa, A., Akagawa, H. (2002) *J Bacteriol* 184: 6417-6423.
- Koplin, R., Wang, G., Hotte, B., Priefer, U. B., Puhler, A. (1993) *J Bacteriol* 175: 7786-7792.
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., McCoy, J. M. (1993) *Bio/Technology* 11: 187-193.
- Lei, Y., Ploux, O., Liu, H. W. (1995) *Biochemistry* 34: 4643-4654.
- Li, Y., Dosch, D. C., Strohl, W. R., Floss, H. G. (1990) *Gene* 91: 9-17.
- Lo, S. F., Miller, V. P., Lei, Y., Thorson, J. S., Liu, H. W., Schottel, J. L. (1994) *J Bacteriol* 176: 460-468.
- Lombo, F., Siems, K., Brana, A. F., Mendez, C., Bindseil, K., Salas, J. A. (1997) *J Bacteriol* 179: 3354-3357.
- Lyutskanova, D., Distler, J., Altenbuchner, J. (1997) *Microbiology* 143: 2135-2143.
- Madduri, K. & Hutchinson, C. R. (1995) *J Bacteriol* 177: 1208-1215.
- Maki, M., Takano, E., Mori, H., Sato, A., Murachi, T., Hatanaka, M. (1987) *FEBS* 223:174-180.
- Malpartida, F. & Hopwood, D. A. (1984) *Nature* 309: 462-464.
- Mao, Y., Varoglu, M., Sherman, D. H. (1999) *Chem Biol* 6: 251-263.
- Mendez, C. & Salas, J. A. (2001) *Res Microbiol* 152: 341-350.
- Miller, V. P., Thorson, J. S., Ploux, O., Lo, S. F., Liu, H. W. (1993) *Biochemistry* 32: 11934-11942.
- Mizuno, T. & Tanaka, I. (1997) *Mol Microbiol* 24: 665-667.
- Niemi, J., Ylihonko, K., Hakala, J., Parssinen, R., Kopio, A., Mantsala, P. (1994) *Microbiology* 140: 1351-1358.
- Nishimura, H. & Kimura, T. (1953) *J Antibiot* 6: 57-65.
- Ohnuki, T., Imanaka, T., Aiba, S. (1985) *J Bacteriol* 164: 85-94.
- Omura, S., Ikeda, H., Malpartida, F., Kieser, H. M., Hopwood, D. A. (1986) *Antimicrob Agents Chemother* 29: 13-19.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12215-12220.
- Ota, Y., Tamegai, H., Kudo, F., Kuriki, H., Koike-Takeshita, A., Eguchi, T., Kakinuma, K. (2000) *J Antibiot* 53: 1158-1167.
- Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T., Prentice, M. B., Sebahia, M., James, K. D., Churcher, C., Mungall, K. L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S. D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A. M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R. M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P. C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B. G. (2001) *Nature* 413: 523-527.

- Perez-Llarena, F. J., Liras, P., Rodriguez-Garcia, A., Martin, J. F. (1997) *J Bacteriol* 179: 2053-2059.
- Peschel, A. & Gotz, F. (1996) *J Bacteriol* 178: 531-536.
- Piepersberg, W., Distler, J., Ebert, A., Heinzel, P., Mansouri, K., Mayer, G., Pissowotzki, K. (1988) In Okami, Y., Beppu, T. and Ogawara, H. (eds.), *Biology of Actinomycetes '88*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 86-91.
- Pissowotzki, K., Mansouri, K., Piepersberg, W. (1991) *Mol Gen Genet* 231: 113-123.
- Podlessek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Grabnar, M. (2000) *FEMS Microbiol Lett* 188: 103-106.
- Retzlaff, L. & Distler, J. (1995) *Mol Microbiol* 18: 151-162.
- Richardson, M. A., Kuhstoss, S., Huber, M. L., Ford, L., Godfrey, O., Turner, J. R., Rao, R. N. (1990) *J Bacteriol* 172: 3790-3798.
- Rince, A., Dufour, A., Uguen, P., Le Pennec, J. P., Haras, D. (1997) *Appl Environ Microbiol* 63: 4252-4260.
- Rodriguez, A. M., Olano, C., Vilches, C., Mendez, C., Salas, J. A. (1993) *Mol Microbiol* 8: 571-582.
- Rudd, B. A. & Hopwood, D. A. (1979) *J Gen Microbiol* 114: 35-43.
- Rudd, B. A. & Hopwood, D. A. (1980) *J Gen Microbiol* 119: 333-340.
- Saitoh, H., Arashiki, Y., Oka, A., Oda, M., Hatakeyama, Y., Kobayashi, M., Hosoi, K. (2003) *Eur J Pharm Sci* 19: 133-140.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., Boucher, C. A. (2002) *Nature* 415: 497-502.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sawa, T., Fukagawa, Y., Homma, I., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1968) *J Antibiot* 21: 413-420.
- Schnaitman, C. A. & Klena, J. D. (1993) *Microbiol Rev* 57: 655-682.
- Steffensky, M., Muhlenweg, A., Wang, Z. X., Li, S. M., Heide, L. (2000) *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1214-1222.
- Stockmann, M. & Piepersberg, W. (1992) *FEMS Microbiology Lett* 69: 185-189.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., Olson, M. V. (2000) *Nature* 406: 959-964.
- Stutzman-Engwall, K. J., Otten, S. L., Hutchinson, C. R. (1992) *J Bacteriol* 174: 144-154.

- Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hirama, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S., Horikoshi, K. (2000) *Nucleic Acids Res* 28: 4317-4331.
- Takeuchi, T., Ishizuka, M., Takayama, H., Kureha, K., Hamada, M., Umezawa, H. (1965) *J Antibiot* 18A: 107-110.
- Tamegai, H., Nango, E., Kuwahara, M., Yamamoto, H., Ota, Y., Kuriki, H., Eguchi, T., Kakinuma, K. (2002) *J Antibiot* 55: 707-714.
- Tanaka, N., Nishimura, T., Yamaguchi, H., Yamamoto, C., Yoshida, Y., Sashikata, K., Umezawa, H. (1965) *J Antibiot* 18A: 139-144.
- Tang, L., Grimm, A., Zhang, Y. X., Hutchinson, C. R. (1996) *Mol Microbiol* 22: 801-813.
- Thorson, J. S., Lo, S. F., Ploux, O., He, X., Liu, H. W. (1994) *J Bacteriol* 176: 5483-5493.
- Toba-Minowa, M. & Hashimoto-Gotoh, T. (1992) *Gene* 121: 25-33.
- Tornus, D. & Floss, H. G. (2001) *J Antibiot* 54: 91-101.
- Triglia, T., Peterson, M. G., Kemp, D. J. (1988) *Nucleic Acids Res* 16: 8186.
- Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M., Takeuchi, T. (1965) *J Antibiot Ser. A* 18: 101-103.
- Vieira, J. & Messing, J. (1987) *Methods in Enzymology* 153: 3-11.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J. (1982) *EMBO J* 1: 945-951.
- Walker, J. E., Gay, N. J., Saraste, M., Eberle, A. N. (1984) *Biochem J* 224: 799-815.
- Weiner, M. P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B., Vaillancourt, P. (1994) *Strategies* 7: 41-43.
- Westbrock-Wadman, S., Sherman, D. R., Hickey, M. J., Coulter, S. N., Zhu, Y. Q., Warrenner, P., Nguyen, L. Y., Shawar, R. M., Folger, K. R., Stover, C. K. (1999) *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2975-2983.
- Westrich, L., Domann, S., Faust, B., Bedford, D., Hopwood, D. A., Bechthold, A. (1999) *FEMS Microbiol Lett* 170: 381-387.
- White, J., Bibb, M. (1997) *J Bacteriol* 179: 627-633.
- Wietzorrek, A. & Bibb, M. (1997) *Mol Microbiol* 25: 1181-1184.
- Wright, F. & Bibb, M. J. (1992) *Gene* 113: 55-65.
- Wright, G. D. (1999) *Curr Opin Microbiol* 2: 499-503.
- Yamazaki, H., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2000) *J Bacteriol* 182: 4596-4605.
- Yamazaki, H., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2003) *J Bacteriol* 185: 1273-1283.
- Ylihonko, K., Tuikkanen, J., Jussila, S., Cong, L., Mantsala, P. (1996) *Mol Gen Genet* 251: 113-120.
- Yonaha, K., Nishie, M., Aibara, S. (1992) *J Biol Chem* 267: 12506-12510.
- Zalkin, H. & Ebbole, D. J. (1988) *J Biol Chem* 263: 1595-1598.
- 田中信男, 中村昭四郎 (1992) 抗生物質大要 化学と生物活性 一第4版一
東京大学出版会 363-384

謝 辞

本論文の作成にあたり、御指導、御高配を賜りました東京大学農学部 山根 久和教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文の御校閲と適切な御教示を賜りました東京大学農学部 堀之内 末治教授、西山 真教授、作田 庄平助教授、そして野尻 秀昭助教授に深厚なる感謝の意を表します。

また、本論文の作成にあたり直接御指導、御助言を賜りました秋田県立大学生物資源科学部 小嶋 郁夫教授に心から感謝致します。

本研究を行うにあたり、終始、御指導、御鞭撻を賜りました昭和薬科大学 堀 誠名誉教授、昭和薬科大学 林 秀美名誉教授、微生物化学研究所 菌学部 前部長 浜田 雅博士、微生物化学研究センター 木下 直子氏、昭和薬科大学 土屋 香誉子教授に深く感謝の意を表します。

最後に、昭和薬科大学大学院生として私と苦楽を共にした東出 健次氏、辻 智大氏、山根 靖弘氏、青木 大祐氏、大石 陽子氏、佐藤 紘治氏、そして昭和薬科大学学生化学研究室の卒業生の皆様々に深く感謝致します。

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 池野 聡一

*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。

アミノグリコシド（AG）系抗生物質に分類されるカスガマイシン（KSM）は、稲イモチ病菌*Piricularia oryzae*（現在では*Magnaporthe grisea*の学名が使用されている）に対して強い抗菌活性を示す物質として、1965年に梅沢らによって*Streptomyces kasugaensis* M338-M1株の培養ろ液から発見され、現在でも農薬として国内で広く使用されている。KSMは、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'位にはカルボキシホルミドイル側鎖を有する（図1）。

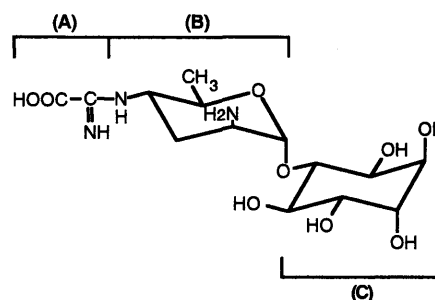


図1 カスガマイシンの化学構造
(A) カルボキシホルミドイル基。(B) カスガミン。
(C) D-*chiro*-イノシトール。

KSMの生合成については、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ている。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も、約25年を経た1993年にKSM生産菌株*Streptomyces kasugaensis* MB273-C4株から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*²⁷³) のクローニングが行われたのみであった。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生合成関連遺伝子群の取得が可能であろうと考えた。本研究は、KSM高生産株の育種およびハイブリッド抗生物質などの新規化合物の創製を究極の目的として、KSM生合成関連遺伝子群の取得を行うとともに、KSM生合成の総括的解明をめざすものである。

1) 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*S. kasugaensis* MB273-C4株よりKSMを特異的にアセチル化して不活性化するKSMアセチル化酵素遺伝子 (*kac*²⁷³) がクローニングされた。著者は、KSM生産が認められた由来の異なる4放線菌株について、*kac*²⁷³をプローブとしてサザンブロット解析を行い、4菌株すべてにおいて*kac*²⁷³との相同DNA部分を見出した（各菌株に見出されたKSMアセチル化酵素遺伝子を“*kac*”と総称する）。また、*Streptomyces albulus* MF861-C4株より得られたKSM非生産株において、*kac*相同遺伝子が欠失していたことから、*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高いことが判明した。さらに、著者が*S. kasugaensis* M338-M1株よりクローニングした*kac*³³⁸は、*kac*²⁷³の場合と同様に大腸菌JM109株をKSMに対して高度耐性化することを明らかにした。

2) *S. kasugaensis* M338-M1株の*kac*³³⁸周辺領域のクローニング

著者は、*S. kasugaensis* M338-M1株より*kac*³³⁸の周辺領域（22,414bp）をクローニングし、その全塩基配列を決定した。Open reading frame検索の結果、“*kas*

クラスター”と命名したクローン化領域には、*kac*³³⁸の他に19個の遺伝子（以後*kas*遺伝子群と称する）が見出された（図2）。

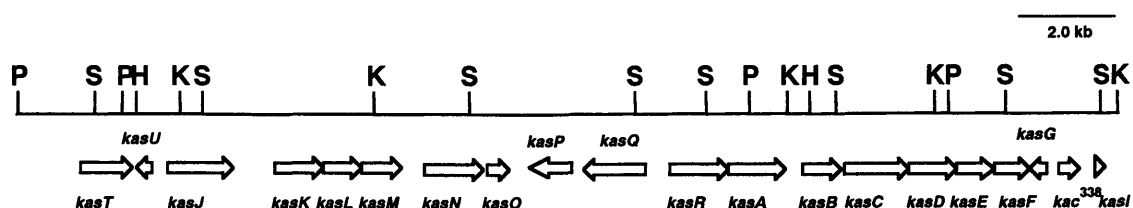


図2 *kas*クラスターに見出された*kas*遺伝子群

白抜きの矢印は、*kas*遺伝子群の位置および転写方向を示している。HはHindIII、KはKpnI、PはPstIそしてSはSacI認識部位を示している。

3) *kas*遺伝子群の転写解析

著者は、ノーザンブロット解析とRT-PCR法を用いて、*kas*遺伝子群の転写単位について検討した。その結果、*kas*遺伝子群は*kasT*、*kasU*、*kasJ*、*kasKLM*、*kasNO*、*kasPQ*、*kasRA*、*kac*³³⁸の単位で転写されていた。また、*kasBCDEF*領域は塩基配列の特徴から、ポリシストロニックに転写されていると思われるが、現在のところ少なくとも*kasCD*と*kasEF*はポリシストロニックに転写されていることが示唆された。さらに、プライマーエクステンション法と5'-RACE法を用いて転写開始点の検討を行い、*kasU*、*kasJ*、*kasKLM*、*kasNO*の転写開始点を決定した。これらのプロモーター配列は、いずれも*Streptomyces E. coli* σ^{70} -like promoters (SEP) と称するプロモーター配列と高い相同性が得られた。

4) カスガマイシン生合成に関わる遺伝子群

*kas*遺伝子群がコードする推定タンパク質のアミノ酸配列情報を基に、相同性検索を行った結果、19遺伝子産物のうち12遺伝子産物について既知タンパク質との相同性が得られた。これらのうち、*kasP*、*Q*、*R*、*A*、*C*、*D*の遺伝子産物は、C-3、C-6デオキシヘキソース生合成関連酵素や糖転移酵素などとの相同性が得られたことから、カスガミン生合成関連遺伝子群と推定された。また、*kasN*遺伝子産物はグリシン酸化酵素との相同性が得られたことからカルボキシホルミドイル基生合成遺伝子と推定された。さらに、*kasJ*遺伝子産物はストレプトマイシン (SM) 生合成に関与するStsBなど、イノシトール性水酸基の酸化酵素との相同性が得られたことから、D-*chiro*-イノシトール生合成に関与していると推定された。

5) *kas*遺伝子群の転写調節に関わる遺伝子

*kasT*遺伝子産物 (KasT) は, *Streptomyces griseus*の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。KasTの*kas*クラスターDNA領域への結合について, チオレドキシンとの融合タンパク質 (Trx-KasT) を用いて検討したところ, KasTは少なくとも*kasU-kasJ*遺伝子間領域, *kasN*上流領域, そして*kasQ-kasR*遺伝子間領域に結合することが明らかとなった。さらに, KSM非生産となった変異株R6D4では, *kasT*を含めKSM生合成に関与する*kas*遺伝子群の転写が抑制されていたが, R6D4株中でプラスミドを介して*kasT*を恒常的に強制発現させると*kas*遺伝子群の転写が再び開始され, KSM生産が復帰したことを明らかにした。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調節遺伝子であると考察した。

6) カスガマイシンの排出に関わる遺伝子群

*kasKLM*遺伝子群は前後する遺伝子の開始コドンと終止コドンがATGAで重複していることから, オペロンを形成していると予想された。著者は, RT-PCR法を用いて, *kasKLM*がポリシストロニックmRNAに転写されていることを明らかにした。*kasKLM*は, 抗生物質排出に関わるABCトランスポーターを構成する各サブユニットと相同性を有するタンパク質をコードしていると推定された。大腸菌JM109株中で*kasKLM*を発現させた結果, 得られた形質転換株がKSMに対して高度耐性化したことから, 著者は*kasKLM*がKSMトランスポーターをコードしていると結論した。また, KSMトランスポーターの構築とその活性の発現には, 各遺伝子産物であるKasK, KasLおよびKasMが必須であることを明らかにした。