

## 第2節 アセテートカイネースをコードする遺伝子 ackAのクローニング

### 1) 遺伝子ライブラリーの作製

DNA供与菌として E. coli K-12 1100<sup>(72)</sup> を使用した。TY液体培地中で37℃、20時間培養した E. coli 1100 より Saito & Miura法<sup>(114)</sup> に従い、クロモゾーマルDNAを抽出した。平均鎖長10~15Kbになるように Sau3A で部分分解したクロモゾーマルDNA断片と BamHI と SalI で切断した EMBL4ベクター<sup>(78)</sup> を結合した。組み換え体ファージDNAをホーンの方法<sup>(79)</sup> を用いて *in vitro* packaging を行ないファージ粒子として、E. coli NM539<sup>(78)</sup> のアガー・ローン上に撒いて、37℃で培養した。約3,000個のプラークが得られ、以後ライブラリーとして使用した。

### 2) purF 遺伝子のクローニング

既に報告されている Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase をコードする purF の塩基配列<sup>(112)</sup> の情報をもとにして、N末端付近の配列に対応する16-merよりなるオリゴヌクレオタイド (5'-GTCGGTA

TCGCCGGTG-3')を合成した(プローブ0)。この合成オリゴヌクレオタイドの5'末端のラジオアイソトープ標識は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ をT4DNA kinaseを用いて取込ませることにより行なった<sup>(96)</sup>。作製したライブラリーよりブランクハイブリダイゼーション法を用いてプローブ0に対してハイブリダイズするブランクを検索した。その結果、3つの組換え体EMBL4ファージ(101,102,103)が得られた。これらファージよりファージDNAを抽出して制限酵素地図を作製した結果、図4-2に示すように、互に重なり合うファージDNAであることが明らかになった。

purFを含むDNA領域とファージDNA 101,102,及び103の制限酵素地図を比較すると、8.65KbのEcoRI-EcoRI領域内において、よく一致している。また、サザンハイブリダイゼーション法によりプローブ0とハイブリダイズする制限酵素切断断片を検出した結果、8.65KbのEcoRI-EcoRI切断断片内のDNA断片とハイブリダイズした。そこで、ファージDNA 101をEcoRIで切断しアガロース・ゲル電気泳動により8.65KbのDNA断片を単離した。このDNA断片とEcoRIで切断したpUC18 DNAを結合して、pNK101を作製した(図4-3)。

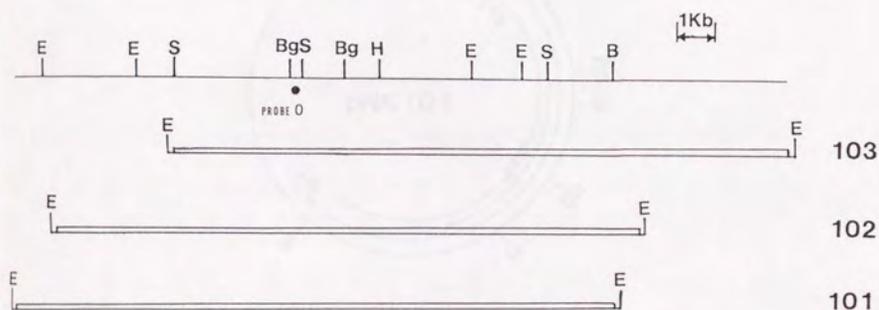


図4-2 ファージDNA 101~103に挿入された*E. coli*クロモゾームDNA断片の制限酵素地図

・(PROBE 0): プローブとして用いたpurF 5'-領域配列に対応して合成したDNA

ファージDNA中のEcoRI認識部位はEMBL4 DNA由来

Bg: BglII, E: EcoRI, H: HinIII, S: SalI

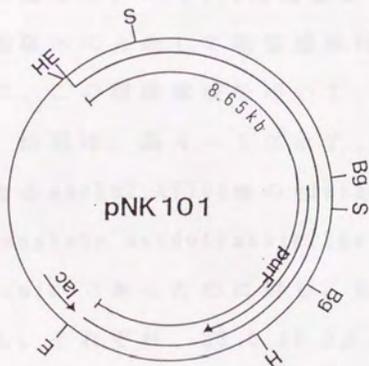


図4-3 purFを保持するpNK101 DNA

lacZは、 $P_{1..c}$ を示す。

Bg: BglIII, E: EcoRI, H: HindIII, S: SalI

pNK101 DNA により、purF<sup>-</sup>株である *E. coli* AT703, *E. coli* AB2557を形質転換した。形質転換株AT703(pNK101), AB2557(pNK101), 親株AT703, AB2557, 及びコントロールとして1100 の glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferaseの酵素活性を測定した。各菌株をTY 3mlに植えて、37°C, 16時間培養を行なった。集菌後、生理食塩水にとかして超音波破碎処理を行ない粗酵素液とした。この粗酵素液を用いて、酵素活性の測定を行なった。結果は、表4-1に示す。

purF<sup>-</sup>株であるAB2557, AT703株の glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase 活性は0.0 μg L-glutamate/ml/min.であったのに対し、形質転換株における酵素活性は、それぞれ、23.0, 12.0 μg L-glutamate/ml/min.であった。従って、pNK101 DNAは、purFを保持するプラスミドDNAである。この結果と制限酵素地図の比較、サザンハイブリダイゼーションの結果から、ファージDNA 101, 102, 103は、purFを含むDNA領域をカバーしていると考えられる。これら3つのファージDNAに挿入されているDNA断片は、クロモゾームDNA上purFを含む約19Kbの連続したDNA領域をカバーしている。

表4-1 glutamine phosphoribosylpyrophosphate  
amidotransferaseの酵素活性

菌株	酵素活性*
AB2557	0.0
AB2557(pNK101)	23.0
AT703	0.0
AT703(pNK101)	12.0
1100	18.0

\*:  $\mu\text{g L-glutamate/ml/minute}$

### 3) ジーンウォーキングによる ackA のクローニング

得られた19Kbの領域の両側のDNAをプローブとして同じジーンライブラリーを用いてブランクハイブリダイゼーションを行なった。

ファージ102DNAを EcoRI と BamHI で切断し、アガロース・ゲル電気泳動により2.55Kbと1.5KbのDNA断片を単離した。2.55KbのDNA断片はファージ102DNAの左端、1.5KbのDNA断片は右端に相当する。このDNA断片をそれぞれプローブ1、プローブ2として同じジーンライブラリーを用いてブランクハイブリダイゼーションを行なった。プローブ1、2のラジオアイソトープ・ラベルは、ニックトランスレーション法を用いて行なった。その結果、プローブ1とハイブリダイズする3つのファージクローン(402, 404, 406)が得られた。また、プローブ2とハイブリダイズする1つのファージクローン(122)が得られた。これらファージよりDNAを抽出して制限酵素地図を作製した。

図4-4に示すように、これらファージDNAはファージDNA 101, 102, 103と重複する領域をもつDNAであることが明らかになった。これら7つの重複するファージDNAはクロモゾーマルDNA上、purF領域を中ごろに含む約34Kbの連続した領域をカバーしている。

大腸菌染色体地図上、purFは、tRNA pseudo-uridine synthase I をコードする hisT と ackA の間にマップされている<sup>(115, 116)</sup>。大腸菌の hisT-purF 領域は既にクローニングされ、塩基配列も決定されている<sup>(117-119)</sup>。図4-4の制限酵素地図を解析した結果 hisT は、-3.0と-1.5Kbの間の領域に存在していることが明らかになった。ackA は、大腸菌染色体地図上 purF に対して、hisT と反対側に位置するので、ファージ122 DNAよりの方向に ackA が存在する筈である。また、ファージ122 DNAは、purF の下流約16Kbをカバーしている。この長さは、染色体地図の約0.5分に相当する。ファージ122 DNA中に ackA が存在する確立が高いと判断して、ファージ122 DNAをプラスミドベクターにサブクローニングした。

ファージ122より抽出、精製したDNAを EcoRI と BamHI で切断し、同じ制限酵素で切断した pUC19 DNA と結合した。得られた組み換え体プラスミドDNAにより大腸菌 JM101 [ $\Delta(\text{lac-pro})$  thi lacIq-Z  $\Delta$  M15] を形質転換した。X-gal寒天培地に撒き、白いコロニーを選択した。得られた Ap 耐性形質転換株の AK 活性の増加を測定することにより ackA を含む プラスミドDNAによる形質転換株を検索した。形質転換株の培養は、TY-培地 3ml 中で 37°C, 16時間行ない、粗酵素液は培養液を超音波破碎処理することによって得た。アセテートカイネースの活性は、Thomas

等の方法<sup>(104)</sup>を用いて、測定した。その結果、コントロール菌 JM101(pUC19)より高い AK 活性を示すクローンがいくつか得られた。このクローンよりプラスミド DNA を抽出して制限酵素地図を作製した結果、高い活性を示すクローンより抽出したプラスミド DNA は、全て 4.5Kb の *EcoRI*-*Bam*HI DNA 断片が挿入されていた。この 4.5Kb の DNA 断片は、図 4-4 の 16.9~21.4Kb に相当する。この断片が挿入されているプラスミド DNA を pAK122 と名づけた。制限酵素地図は図 4-5 の通りである。

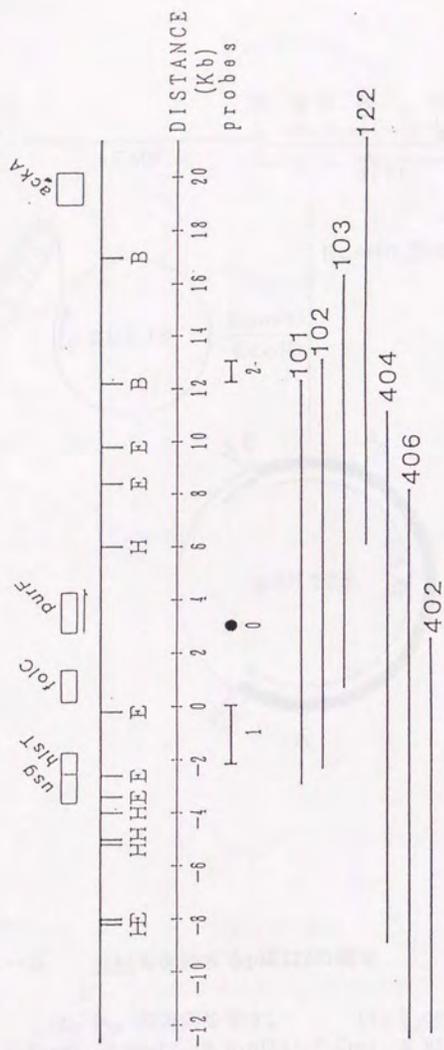


図4-4 7つの重複するファージクローンにより明らかになったpurFを含む34Kb DNAの制限酵素地図

制限酵素地図の上の usg, hisT, folCとpurFは既に決定されている(112, 117~119)。は、この領域において単離されている遺伝子を示す。B: BamHI, E: EcoRI, H: HinIII

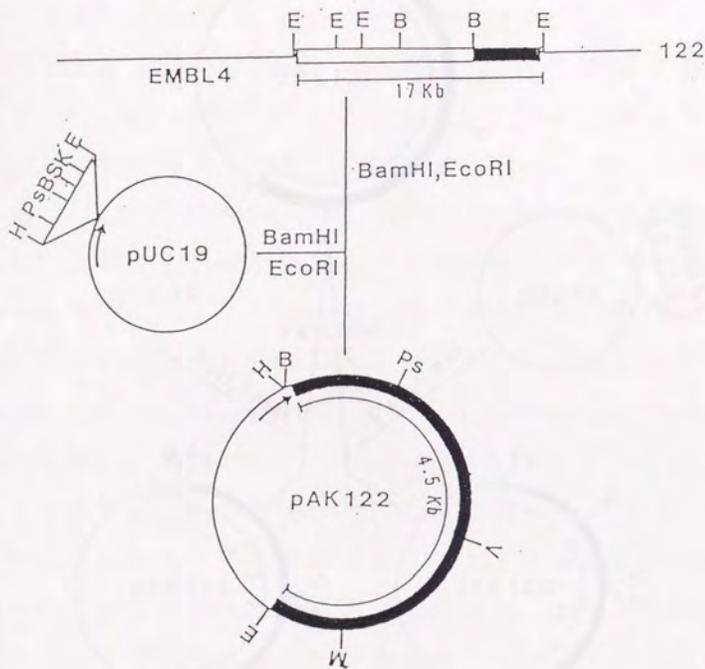


図4-5 ackAを保持するpAK122の構築

は、P<sub>lac</sub>の方向を示す。 は、E. coliクロモゾームDNAを示す。  
 B:BamHI, E:EcoRI, H:HinIII, K:KpnI, M:MluI, Ps:PstI,  
 S:SalI, V:EcoRV

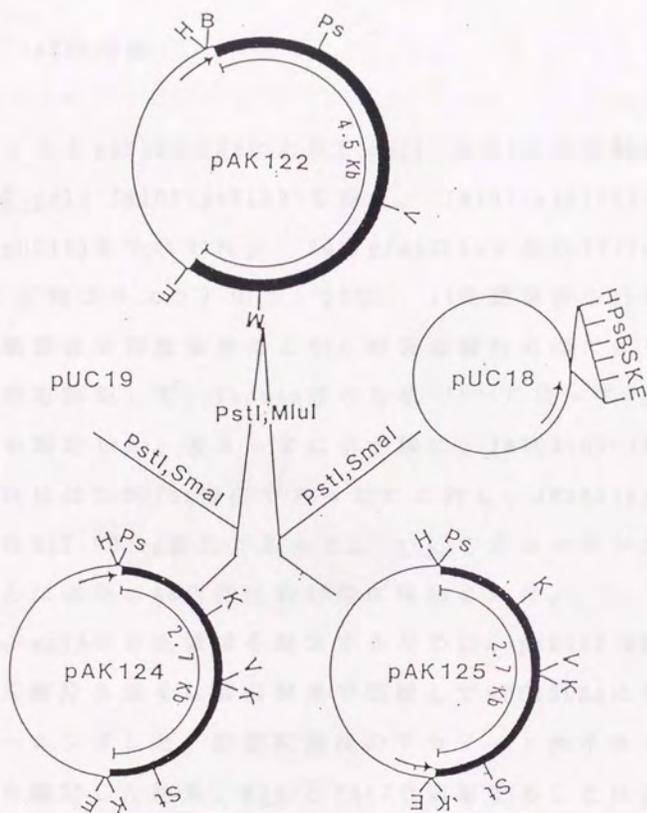


図4-6 pAK124, pAK125の構築

は、 $P_{lac}$ の方向を示す。

B: BamHI, E: EcoRI, H: HinIII, K: KpnI, M: MluI, P: PstI, S: SalI  
 St: StuI, V: EcoRV

#### (4) AKの発現

プラスミド pAK122 DNAにより E. coli JM101を形質転換して、E. coli JM101(pAK122)を得た。JM101(pAK122)とJM101(pUC19)をそれぞれ、 $20 \mu\text{g/ml}$ のApを含むTY10ml (150ml 三角フラスコ) 中で、 $37^\circ\text{C}$ 、16時間培養を行なった。集菌後生理食塩水にとかし超音波破碎処理により粗酵素液を調製して、Thomas等の方法<sup>(104)</sup>に従ってAKの活性を測定した。表4-2に示す様に、JM101(pUC19)のAK活性は $2.6\text{U/mg}$ 蛋白であったのに対し、JM101(pAK122)では $212.0\text{U/mg}$ 蛋白であった。ackAをクローニングすることにより、AK活性は約82倍に増幅された。

次に、ackAの存在領域を限定するために、pAK122 DNA中の挿入断片を様々な制限酵素で切断してpUC19DNAにサブクローニングした。形質転換株のアセテートカイネース活性を測定した結果、MluIとPstIで切断することによって得られる約 $2.7\text{Kb}$ のDNA領域を保持しているプラスミドDNAによる形質転換株においてAK活性が高いことが明らかになった。このMluIとPstIで切断して得られたDNA断片を、SmaIとPstIで切断したpUC19 DNA及びpUC18DNAに挿入することによって、pAK124 DNAとpAK125 DNAを作製した(図4-6)。

pAK124 DNA, pAK125 DNAにより *E. coli* JM101を形質転換して得られたJM101(pAK124)とJM101(pAK125)のAK活性を測定した。培養は、 $P_{lac}$ の誘導基質であるIPTG(1mM)の存在、非存在下で $20 \mu\text{g/ml}$ のApを含むTY-培地(10ml三角フラスコ)中、 $37^\circ\text{C}$ で16時間行なった。pAK124またはpAK125を保持しているJM101におけるAK活性はそれぞれ427.1, 462.2U/mg蛋白で、JM101(pUC19)に比べて165, 178倍の高活性を示した。また、IPTGを添加して培養した場合、JM101(pAK124)における活性はIPTG無添加の時と殆ど同じであったのに対し、JM101(pAK125)では、IPTG無添加に比べて約20%活性が上昇した(表4-2)。

これらの結果は、これらのプラスミドDNA中に挿入されている断片はプロモーター領域を含むackA領域を全て含んでおり、更にackAの転写方向は、pAK125の $P_{lac}$ と同じ方向であることを示唆している。

表4-2 組み換え体による形質転換株における  
アセテートカイネース活性

菌株	添加*	比活性**	活性比***
JM101(pUC19)	None	2.6	1.0
JM101(pAK122)	None	212.0	81.5
JM101(pAK124)	None	427.1	164.3
	IPTG	430.0	165.4
JM101(pAK125)	None	462.2	177.8
	IPTG	560.5	215.8

\*: IPTGを1 mM培養開始時に添加

\*\* : U/mg 蛋白

\*\*\*: JM101(pUC19)における活性に対する比

## 5) ackAの塩基配列

ackAの塩基配列を決定するために、ackAを含むDNA領域をファジミド pUC118, pUC119 DNAにサブクローニングした。pAK124 DNAを EcoRIと PstIで切断しアガロース・ゲル電気泳動により ackA領域を含む2.7KbのDNA断片を単離して、同じ制限酵素で切断したファジミド pUC118と pUC119に結合して pAK1248, pAK1249 DNAを得た。pAK122 DNAを EcoRIと EcoRVで切断し、得られた約1.2KbのDNA断片を、EcoRIと SmaIで切断した pUC118と結合して、pAK124Vを作製した。同様に、pAK122DNAを EcoRVと PstIで切断して得られた約1.5KbのDNA断片を、SmaIと PstIで切断した pUC119と結合して pAK124Pを作製した。これらファジミドDNAより一本鎖DNAを調製した。塩基配列の解析は、dideoxy-chain termination 法<sup>(82, 99)</sup>を用いて行なった。プライマーの合成は、ベックマンDNAシンセサイザー-System 1E Plusを用いて行なった。

塩基配列解析の結果は、図4-7に示す。MluI認識部位を1とした時、472番目の塩基から、1671番目の塩基にわたって、open reading frame(ORF)がみられた。AKのNH<sub>2</sub>-terminalアミノ酸は、ブロックされている<sup>(83)</sup>ので、AKのアミノ酸配列を解析するために、メチオニンの直後を特異的に切断するCNBrを用いAKを分解して、得ら

れるペプチドをHPLCより単離した<sup>(120)</sup>。これらCNBrペプチドのうち、2種類のペプチドのNH<sub>2</sub>-terminalアミノ酸配列を液相のプロテインシーケンサーにより決定した。このアミノ酸配列とORFから予想されるアミノ酸配列を比較した結果、図4-7の下線部の配列と完全に一致していることが明らかになった。この結果は、このORFがackAであることを強く示唆する。最初のメチオニンをコードする472-474番目のATGが翻訳の開始点であるとすると、このORFは400アミノ酸からなる分子量43,297の蛋白質をコードする。

pAK124 DNAによる形質転換株をもちいて、SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動により蛋白質を分析した結果、分子量約43,000の蛋白質が著量検出された。ORFから推定される分子量に近い値であるので、この結果からもこのORFはAKをコードしているackAであると考えられる。

ACCGGTCACTTCTGATAACGGCGATTTTCGACAAAGACGGGGCAAGCGGTTTTCCAGCGGCCAGCTCTTTGAGTAATGCTGCTCCCGGGCGAAACAAGCTA 100  
 AAAAATTAACAGAACGATATATCCGGCGTGCATGGTTCACCTCACTTCACATATAAAGATTCAAAATTTGTGCAAAATTCACAACCTCAGCGGGACAAAC 200  
 GTTCAAAACATTTTTGCTTCCATACCCACTATCAGGATTCCTTTAGCAGCGCTGAAGGCCATAAGTAGTACATATTGATTGAGTGGTCAAATTCATATACAT 300  
 TATGGCATGGCTGAAAATACGGCAAAATGGCATAAGACTCAAGATATTTCTTCCATCATGCAAAAAAATTTGCAGTGCATGATGTTAATCATAAATGTC 400

M S S K L V L  
 GGTGCATCATCGGCTACGGCTCTATGGCTCCGTGACGTTTTTTTAGCCAGGTATCAATTATAGGTACTTCC ATG TCG AGT AAG TTA GTA CTG 492  
 Y L N C G S S S L K F A I I D A V N G E E Y L S G  
 GTT CTG AAC TGC GGT AGT TCT TCA CTG AAA TTT GCC ATC ATC GAT GCA GTA AAT GGT GAA GAG TAC CTT TCT GGT 567  
 L A E C F H L P E A R I K W K M D G N K Q E A A L  
 TTA GCC GAA TGT TTC CAC CTG CCC GAA GCA CGT ATC AAA TGG AAA ATG GAC GGC AAT AAA CAG GAA GGG GCT TTA 642  
 G A G A A H S E A L N F I V N T I L A Q K P E L S  
 GGT GCA GGC CCC GCT CAC AGC GAA GCG CTC AAC TTT ATC GTT AAT ACT ATT CTG GCA CAA AAA CCA GAA CTG TCT 717  
 A Q L T A I G H R I V H G G E K Y T S S V V I D E  
 GGG GAG CTG ACT GGT ATC GGT GCT GGT ATG GTA CAC GGC GGC GAA AAG TAT ACC AGC TCC GTA GTG ATC GAT GAG 792  
 S V I Q G I K D A A S F A P L H N P A H L I G I E  
 TCT GTT ATT CAG GGT ATC AAA GAT GCA GCT TCT TTT GCA GCG CTG CAC AAC CCG GCT CAC CTG ATC GGT ATC GAA 867  
 E A L K S F P Q L K D K N V A V F D T A F H Q T M  
 GAA GCT CTG AAA TCT TTC CCA CAG CTG AAA GAC AAA AAC GTT GGT GTA TTT GAC ACC GCG TTC CAC CAG ACT ATG 942  
 F E E S Y T L Y A L P Y N L Y K E H G I R R Y G A H  
 GCG GAA GAG TCT TAC CTG GCG CCT TAC AAC CTG TAC AAA GAG CAC GGC ATC CCT GGT TAC GGC GCG CAC 1017  
 G T S H F Y V T Q E A A A K M L N K P V E L N I I  
 GGC ACC AGC CAC TTC TAT GTA ACC CAG GAA GCG GCA AAA ATG CTG AAC AAA CCG GTA GAA GAA CTG AAC ATC ATC 1092  
 T C H L G N G G S V S A I R N G K C V D T S M G L  
 ACC TGC CAC CTG GGC AAC GGT GGT TCC GTT TCT GCT ATC CGC AAC GGT AAA TGC GTT GAC ACC TCT ATG GGC CTG 1167  
 T F L E G L V M G T R S G D I D P A I I F H L H D  
 ACC CGT CTG GAA GGT CTG ATG GAT ACC CGT TCT GGT GAT ATC GAT CCG GCG ATC ATC TTC CAC CTG CAC GAC 1242  
 T L G M S V D A I N K L L T K E S G L L G L T E V  
 ACC CTG GGC ATG AGC GTT GAC GCA ATG AAC AAA CTG CTG ACC AAA GAG TCT GGC CTG CTG GGT CTG ACC GAA GTG 1317  
 T S D C R Y V E D N Y A T K E D A K R A M D V Y C  
 ACC AGC GAC TGC CGC TAT GTT GAA GAC AAC TAC CCG ACG AAA GAA GAC GCG AAG CCG GCA ATG GAC GTT TAC TGC 1392  
 H R L A K Y I G A Y T A L M D G R L D A V V F T G  
 CAC CGC CTG GCG AAA TAC ATC GGT GCC TAC ACT GCG CTG ATG GAT GGT GGT CTG GAC GCT GTT GTA TTC ACT GGT 1467  
 G I G E N A A M V R E L S L G K L G V L G F E V D  
GGT ATC GGT GAA AAT GCC CCA ATG GTT GGT GAA CTG TCT CTG GGC AAA CTG GGC GTG CTG GCG TTT GAA GTT GAT 1542  
 H E R N L A A R F G K S G F I N K E G T R P A V V  
 CAT GAA CGC AAC CTG GGT GCA CGT TTC GGC AAA TCT GGT TTC ATC AAC AAA GAA GGT ACC CGT CCT GCG CTG GTT 1617  
 I P T N E E L V I A Q D A S R L T A \*  
 ATC CGA ACC AAC GAA GAA CTG GTT ATC GCG CAA GAC GCG AGC CGC CTG ACT GCG TGA TTTACACGCCAGCTCAGCTCTG 1697  
 TTTTCTAACCCGCCAAATCGGGCTTAACGAAAGAGGATAAACCGGTGCCCGTATTATTA 1758

図4-7 アセテートカイネース遺伝子の塩基配列

最も長いORFの塩基配列から予測されるアミノ酸配列をsingle-letterアミノ酸コードで示した。太下線は、Shine-Dalgarno sequenceの可能性が有る部分を示す。細実線は、アセテートカイネースをCNBrで処理して得られたフラグメントのアミノ酸配列と一致している部分を示す。

### 第3節 フォスフトランスアセチレースをコードする 遺伝子 pta のクローニング

#### 1) pta欠損株の取得

大腸菌は、ピルビン酸やプロリンで生育させる時、フルオロ酢酸を共存させるとその生育が強く阻害される。フルオロ酢酸は、フルオロアセチルリン酸→フルオロアセチルCoA→フルオロクエン酸と代謝されることにより、細胞の生育は強く阻害される。pta遺伝子産物であるPTAは、アセチルリン酸 $\longleftrightarrow$ アセチルCoAを触媒する酵素である。この酵素を欠損している菌は、フルオロ酢酸を代謝できないので、フルオロ酢酸に対して耐性となる。このことを利用して、Brown等の方法<sup>(30)</sup>に従い、以下に示す方法によりフルオロ酢酸耐性株を選択し、その株から pta欠損株を単離した。

親株として E. coli 1100を使用した。1100の培養はTY液体培地3ml中、37°Cで24時間行なった。フルオロ酢酸耐性株の取得は、培養液200 $\mu$ lを表4-3の組成からなるフルオロ酢酸を含む寒天培地にまき、37°Cで3~4日間生育させ、コロニーを形成したspontaneous mutantsを選択することによっておこなった。

表4-3 フルオロ酢酸耐性株選択用培地組成

Pyruvate	25 mM
Fluoro acetate	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.1 mM
FeCl <sub>3</sub>	1 μM
Vitamin B1	250 μg
Casamino acid	0.5 %
M9 salts(x10)*	10 ml
Agar	1.5 g

H<sub>2</sub>O 100 ml

\*: M9 salts(x10)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
NaCl	0.5g

H<sub>2</sub>O 100 ml

得られたフルオロ酢酸耐性株から同じ組成の寒天培地を用いて、単一コロニーを単離した。フルオロ酢酸耐性株は、約 $10^6 \sim 10^7$ 個に1個の割合で得られた。フルオロ酢酸耐性株からの pta欠損株の取得は、それぞれの株のPTA酵素活性を測定し、活性が欠失している株を検索することによって行なった。AK活性が欠失している株もフルオロ酢酸に対して耐性となるので、同時にAK活性も測定することにより ackA欠損株も検索した。フルオロ酢酸耐性株をそれぞれTY液体培地3mlに植えて37°Cで24時間培養した培養液を遠心集菌後、生理食塩水で洗浄し超音波破碎処理をすることによって粗酵素液を得た。PTA活性はBrown等の方法<sup>(80)</sup>、AK活性はThomas等の方法<sup>(104)</sup>に従って行なった。

得られたフルオロ酢酸耐性株30株の酵素活性を測定した結果、PTA欠損株、AK欠損株、そしてPTAとAKをともに欠損している株の3種類の変異株がえられた。PTA欠損株中より1株をAM1000と名付けて以後の実験に用いた。また、AK欠損株より1株をAM1100、AK,PTA欠損株より1株をAM1200として選択した。AM1000,AM1100,AM1200株のPTAとAKの酵素活性は表4-4に示す通りである。

表 4-4 E. coli 1100とackA,pta欠損株の  
AK,PTA活性

菌株	AK*	PTA*
1100	2.6	1.8
AM1000	2.5	0.0
AM1100	0.0	1.8
AM1200	0.0	0.0

\*: U/mg 蛋白

## 2) 遺伝子ライブラリーの作製

第2節で作製した *E. coli* 1100由来のクロモゾーマルDNAを用いた。平均鎖長3~10Kbとなるように Sau3A で部分分解したクロモゾーマルDNAと、BamHI で切断後アルカリリンフォスファターズ処理した pBR322 DNAを結合した。CaCl<sub>2</sub>処理した AM1000を、この組み換え体DNAにより形質転換して、Ap耐性且つTc感受性株を選択することにより約5,000個の形質転換株を得た。これらを遺伝子ライブラリーとして以後の実験に用いた。

## 3) ptaのクローニング

ptaのクローニングは形質転換株中よりPTA活性が復帰している株を検索することによって行なった。遺伝子ライブラリーとして作製した形質転換株をそれぞれ、Apを含む2mlのTY液体培地に植え、37°Cで16時間培養した。培養液を遠心集菌した後、1mlの10mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁して超音波破碎処理して粗酵素液とした。各粗酵素液のPTA酵素活性をBrown等の方法<sup>(30)</sup>に従って測定した結果、5,000株中、1株よりPTA活性が復帰している株が見出された。この株より抽出したプラスミドを pPT100と名付けた。pPT100 DNAにより AM1000及び 1100

を形質転換して得られた形質転換株より同様にして粗酵素液を調製し、PTA活性を測定した。1100におけるPTA酵素活性は1.8U/mg蛋白であったのに対し、AM1000(pPT100)、1100(pPT100)の酵素活性はそれぞれ3.7、5.3 U/mg蛋白であり、1100(pPT100)は1100に比べて約3倍高い活性を示した(表4-5)。この結果は、pPT100DNA中にPTAをコードする領域が含まれていることを強く示唆する。pPT100 DNAの制限酵素地図を作製した結果、約3.2KbのDNA断片が挿入されていることが判明した(図4-8)。

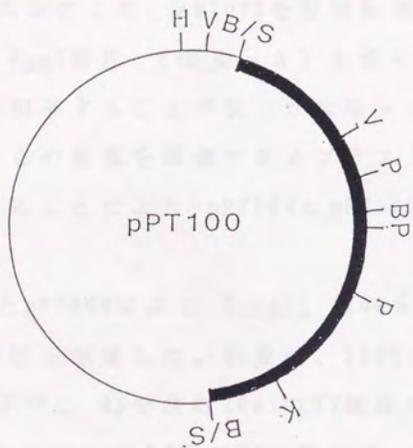


図4-8 ptaを保持するpPT100の制限酵素地図

B: BamHI, H: HinIII, K: KpnI, P: PstI, S: Sau3A, V: EcoRV

## 7) PTAの発現

ptaの存在領域を限定するために、pPT100 DNAに挿入されている3.2KbのDNA断片を制限酵素で切断してpBR322にサブクローニングした。AM1000を形質転換した結果、2.9KbのEcoRI-KpnI断片（図4-8）を含むプラスミドは、pta変異を相補することが明らかになった。このDNA断片を *P. a.*からの発現を誘導できるプラスミドpUC18とpUC19に挿入することにより pPT200とpPT300を作製した（図4-9）。

このpPT200とpPT300により *E. coli* 1100を形質転換して、PTA酵素活性を測定した。培養は、IPTG(1mM)の存在または非存在下で、Apを含む10mlのTY液体培地（150ml三角フラスコ）において37℃で16時間行なった。粗酵素液は、培養菌体を生理食塩水で洗浄後、超音波破碎処理を行なうことによって調製した。結果は、表4-5に示す。

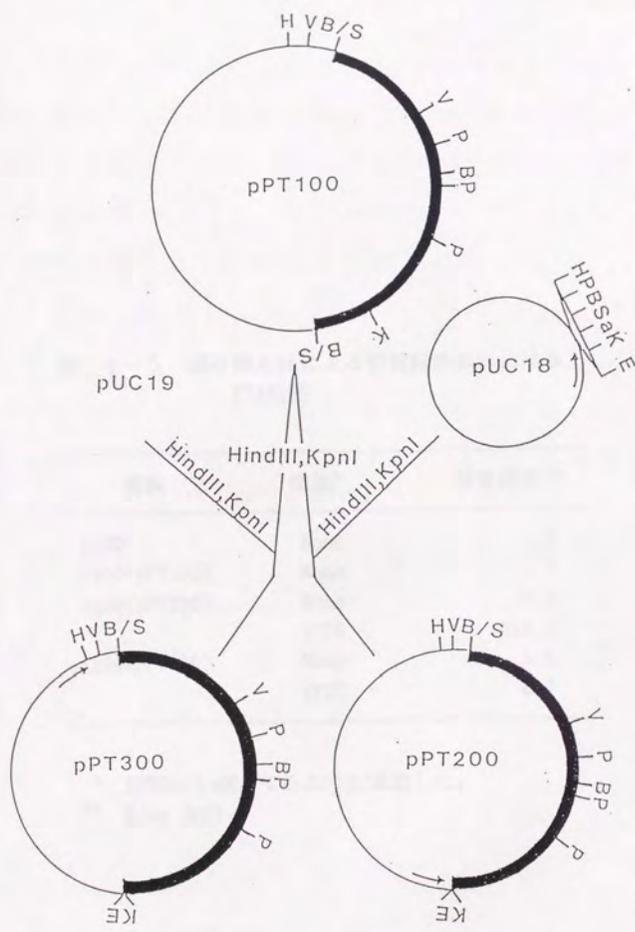


図4-9 P<sub>1</sub>よりptaの発現を誘導できるpPT200, pPT300の構築

B: BamHI, H: HinIII, K: KpnI, P: PstI, S: Sau3A, Sa: SacI, V: EcoRV

表 4-5 組み換え体による形質転換株における  
PTA活性

菌株	添加*	酵素活性**
1100	None	1.8
1100(pPT100)	None	5.3
1100(pPT200)	None	9.8
	IPTG	224.4
1100(pPT300)	None	5.2
	IPTG	4.7

\*: IPTGは1 mMとなるように添加した。

\*\* : U/mg 蛋白

pPT200を持っている E. coli 1100 の PTA 活性は、IPTG を添加した時 224.4U/mg 蛋白であった。無添加に比べて約 23 倍、コントロールとしての 1100 (pUC18) に比べて約 150 倍もの高活性を示した。pPT300 を持っている 1100 は、IPTG を添加しても PTA の発現は誘導されなかった。

IPTG を添加して培養した 1100 (pPT200) の細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって分離して、Coomassie Brilliant Blue 染色を行なった結果、他の細胞抽出液からはみられない分子量約 81,000 の蛋白質が著量生産されていた。

これらの結果は、おそらくプロモーター領域をもっていないが、pta が完全にこれらプラスミドに含まれており、更に pta の転写方向は pPT200 における  $P_{lac}$  の向きと同じであることを強く示唆する。

#### 第4節 ackA-ptaの同時発現

大腸菌染色体地図上、ptaは、ackAの近傍にマップされている<sup>(49)</sup>。第3節で得られたフルオロ酢酸耐性株AM 1200は AKとPTA活性がともに欠失している変異株である。また、AKとPTA活性を共に欠失する変異(fac-A)は既に報告されており、染色体地図上、ackAのすぐ上流にマップされている<sup>(50)</sup>。更に、S.typhimuriumではAKをコードするackはpta遺伝子の上流に存在し、ackとptaはオペロンとして存在すると報告されている<sup>(25)</sup>。これらの点から、E.coliにおいてもackAとptaは近接している可能性が高いと考えて、ackAを含むpAK122DNAとptaを含むpPT200 DNAの制限酵素地図を比較した(図4-10)。

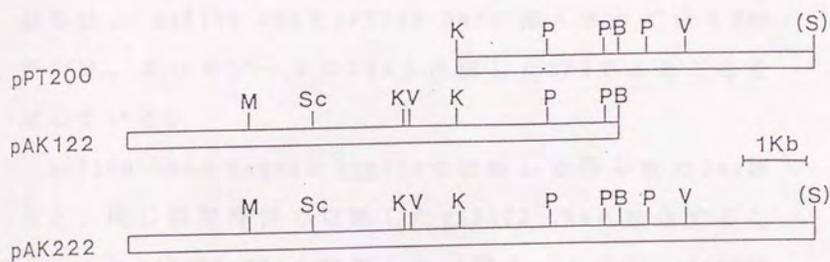


図4-10 ackAを保持するpAK122, ptaを保持するpPT200の制限酵素地図とpAK222の構築

ベクターDNA断片は含まれていない。

B: BamHI, K: KpnI, M: MluI, P: PstI, (S): Sau3A, Sc: ScaI, V: EcoRV

pPT200 DNAの KpnIと BamHI認識部位の間の制限酵素地図と、pAK122 DNAに挿入されている ackA の3'末端側の KpnIと BamHI 認識部位の間の制限酵素地図が完全に一致していた。また、pPT200 DNAの KpnI認識部位より下流約100bpの塩基配列を解析した結果、pAK122 DNAの KpnI認識部位より下流の塩基配列と完全に一致していた。この結果は、pAK122 DNAとpPT200 DNAに挿入されているDNA断片は、クロモゾーマルDNA上連続したDNAであることを示している。

pPT200 DNAを BamHIと HinIIIで切断して得られたDNA断片と、同じ制限酵素で切断したpAK122 DNAと結合することによりpAK222 DNAを作製した(図4-10)。pAK222 DNAによる E.coli 1100形質転換株のAKとPTA活性を測定した(表4-6)。同時にpAK122, pPT200とコントロールとしてpUC19による E.coli 1100 形質転換株のAKとPTA活性も測定した。

表4-6 組み換え体による形質転換株のAK,PTA活性

菌株	添加*	酵素 活性**	
		AK	PTA
1100(pAK122)	None	472.6 (183.2)***	2.0 ( 1.1)
1100(pPT200)	None	2.6 ( 1.0)	9.6 ( 5.3)
	IPTG	1.4 ( 0.6)	224.0 (124.4)
1100(pAK222)	None	102.5 ( 39.4)	78.3 ( 43.6)
1100(pUC19)	None	2.6 ( 1.0)	1.8 ( 1.0)

\*: IPTGは1mMとなるように培地中に添加した

\*\* : U/mg 蛋白

\*\*\*: 1100(pUC19)の酵素活性を1.0とした時の相対活性

E. coli 1100(pAK222)では、AKとPTAの活性はそれぞれ102.5, 78.3 U/mg蛋白であった。1100(pUC19)に比べて両酵素活性とも約40倍まで上昇した。一方、1100(pPT200)では、IPTGを添加した時は、酵素活性がコントロールに比べて124倍まで上昇したが、IPTG無添加の時は、約5倍程度の上昇に留まった。これらの結果よりpAK222 DNAはackAとptaを完全に保持するプラスミドDNAであり、ackAとptaは、DNAのレベルからもクロモゾーマルDNA上近接して存在することが明らかになった。

また、pAK222 DNAを作製する時に利用した KpnI認識部位は ackA構造遺伝子の3'末端より上流に存在する。1100(pPT200)においてPTAの発現はIPTGの添加により誘導されたのに対し、1100(pAK222)では構成的に発現した。

また、ackAとptaの転写方向は同じであった。これらの結果は、ptaの発現はackA上流のプロモーターに支配されており、S. typhimuriumと同様にE. coliにおいてもackAとptaはオペロンとして存在する可能性を示唆している。

ackA上流にプロモーター活性が存在するかどうかを調べるために、gshIの上流にackA上流域を導入したプラスミドDNAを作製した。pGS100 DNA(第3章、第2節参照)をStuI, PstIで切断後、アガロース・ゲル電気泳動により gshIを含む領域を単離して、ScaI, PstIで切断した

pAK124 に結合することにより pGS124 DNAを作製した。pAK124 DNA中に存在する ScaI 認識部位は AK をコードしていると思われる ORF の最初の ATG より下流に存在している。また、pGS100 DNA中に存在する StuI 認識部位は gshI-プロモーターの中に存在する。従って、pGS124 DNAによる形質転換株では、もし組み込んだ ackA 上流域にプロモーター活性が存在しなければ、殆ど GSH-I 活性が誘導されないことになる。E. coli JM101 を pGS124 又は pGS100 DNA により形質転換し、形質転換株における GSH-I 活性を測定した。培養は、TY 培地 10ml (150ml 三角フラスコ) 中で、37°C で行なった。粗酵素液の調製は、培養液を生理食塩水で遠心洗浄後超音波破碎処理により行なった。表 4-7 に示したように、JM101 (pGS100) においては、 $1.1 \mu\text{mol}/\text{mg}$  蛋白/h であったのに対し、JM101 (pGS124) では  $4.5 \mu\text{mol}/\text{mg}$  蛋白/h の活性を示した。この結果は、ackA 上流域にプロモーター領域が存在することを強く示唆する。

更に、本研究により ackA と pta のクロモゾーム DNA 上での正確な位置が初めて明らかになった。図 4-11 に示すように、ackA と pta は purF の 13Kb 下流に存在し、転写方向は、purF と逆方向である。

表4-7 ackAプロモーターとgshIプロモーターによるGSH-Iの活性

菌株	酵素活性*
JM101(pGS100)	1.1
JM101(pGS124)	4.5

\*:  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  蛋白/時間

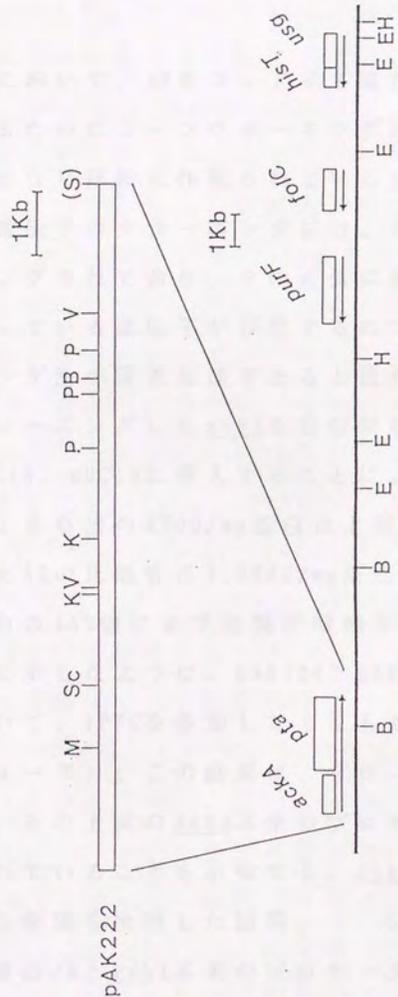


図4-1-1 *E. coli* 1100における *ackA*, *pta* を含む34-KbDNA領域の制限酵素地図

制限酵素地図の上の □ は、この領域において単離されている遺伝子を示す。→ は、転写方向を示す。

B: BamHI, E: EcoRI, H: HinIII, K: KpnI, M: MluI, P: PstI, (S) Sau3A, Sc: ScaI, V: EcoRV

## 第5節 考察

本研究において、AKをコードする遺伝子ackAをクローニングするためにジーンウォーキング法を用いた。染色体地図がかなり詳細に作製されているE. coliのような細胞由来の遺伝子のクローニングには、単離したい遺伝子がマッピングされており、その近傍に既に塩基配列が明らかになっている遺伝子が存在するのであれば、ジーンウォーキング法が確実な道であると思われる。この方法によりクローニングしたackAを含む領域をプラスミドベクター pUC18、pUC19に導入することにより、AKの活性は親株の約180倍の470U/mg蛋白に上昇した。大腸菌より精製したAKの比活性は2,900U/mg蛋白である<sup>(33)</sup>ので、全菌体蛋白の15%強にまで発現が増幅されたことになる。

第2節に示したように、pAK124とpAK125による形質転換株において、IPTGを添加しなくともAKの発現が強化された(表4-2)。この結果は、クローニングしたackAの発現は、その上流のackA本来のプロモーターより転写が開始されていることを示唆する。ackAの上流域を利用してgshIの発現を検討した結果、GSH-Iの活性は4.5  $\mu\text{mol/mg蛋白/h}$ とgshI本来のプロモーターを利用した時より4倍高い活性を示した(表4-7)。従って、ackA

上流にプロモーター領域が存在することは間違いないと思われる。本研究において決定した塩基配列よりプロモーター領域のコンセンサス配列と考えられている配列を検索すると130番目にTTGACA, 19bp離れた下流にTATAAAが見出された。この配列は、コンセンサス配列と非常に一致している配列である。しかしながら、AKをコードしているORFの最初のATGより約300bpも離れているため、今後発現調節機構を含め、検討が必要であろう。

また、第3節でクローニングしたptaは、 $P_{lac}$ の利用によりIPTGを添加した時のみ、親株の120倍に発現が増幅された。また、ackA構造遺伝子の3'末端より内側までの領域を含むpPT100, pPT300による形質転換株におけるPTA活性は親株の3~5倍に留まった。これに対し、ackAとptaを同時に含むpAK222による形質転換株においては、PTA活性は親株に比べて40倍まで増幅され、更にAK活性も同様に40倍に増幅された。このpAK222に挿入されているDNA断片は、クロモゾームDNA中の連続した領域の一部に相当する。従って、ptaはackAと同様にackA上流のプロモーター領域に支配されている可能性が高い。また、ackAとptaの転写方向は同じであった。このことは、S. typhimuriumと同様に<sup>(61)</sup>、大腸菌においてもackAとptaはオペロンを形成していることを強く示唆する。AKとPTA活性をともに欠失した変異(fac-A)が単

離され、染色体地図上 ackA のすぐ上流にマップされている<sup>(50)</sup>。この fac-A 変異は ackA プロモーター領域の変異による両酵素活性の欠失によるものではなかろうか。

PTAとAKの触媒する反応は、微生物細胞内において酢酸からのアセチルCoAの形成、酢酸の排出<sup>(30, 31, 37)</sup>、嫌氣的培養時におけるATPの形成<sup>(32)</sup>に関与していると考えられている。また、アセテートカイネースは、ATPあるいは、アセチルリン酸によりリン酸化され<sup>(121)</sup>、リン酸化された酵素のリン酸基はADP或いは酢酸に転移される<sup>(122-124)</sup>と報告されている。アセチルリン酸は細胞におけるいくつかの栄養素の吸収のためのエネルギー源であり<sup>(38-40)</sup>、リン酸基はアシルリン酸を經由して蛋白にリンクする<sup>(33, 121, 123, 124)</sup>と報告されている。また、リン酸化されたAKのリン酸基が直接 Bacterial transferase system の Enzyme I<sup>(125)</sup>に移行されるという報告もある<sup>(34)</sup>。このようにAKとPTAの細胞内における機能は、数多く議論されてきたにもかかわらず酵素の不安定性、生体代謝機構を特化して研究する困難さなどから明確な結論は得られていない。本研究において、AKとPTAをコードする遺伝子を初めてクローニングし高発現に成功したことにより、遺伝子の発現制御機構、酵素レベルでの研究から多くの成果が今後期待される。

ackAのクローニングをジーン・ウォーキング法によっ

て行なったことにより、大腸菌染色体地図上での ackA と pta の正確な位置が本研究により初めて明らかになった。

更に、AKはATP再生系、PTAはアセチルCoA $\leftrightarrow$ CoAサイクリング系として応用することにより、より多様な物質生産が可能となり、工業的な貢献も今後期待できよう。

## 第5章 ATP再生系を増強したグルタチオン高生産菌の育種

## 第1節 はじめに

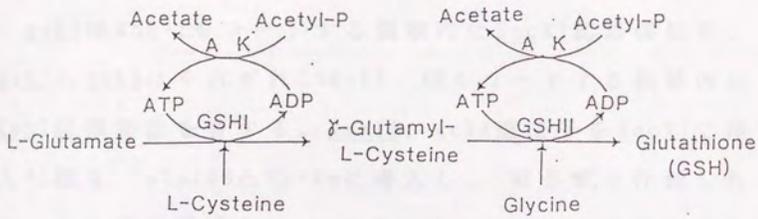
生物の有する機能は、一般的に、複数酵素反応による長いプロセスに支配されている。この複数酵素系に支配されている機能を物質生産に応用する際、遺伝子組換え技術を利用して効率的システムを構築することが多く試みられてきている。既に論じてきたように、スリーパーベクターのシステムはこの様な系への応用に最適の宿主・ベクター系であり、更にATPを要求する酵素がその反応系に含まれる場合、ATP再生系を効率的に利用することが要求される。本章において、第4章でクローニングしたackAを第3章で構築したGSH高生産システムに組み込むことにより、ATP再生系を含む複数酵素系物質生産システムとしてGSH生産を検討した。

グルタチオンを合成する酵素GSH-I, GSH-IIをコードする遺伝子gshI, gshIIを同一スリーパーベクターに導入し、熱誘導培養によりGSH-I, GSH-IIの酵素発現はそれぞれ220, 110倍に増幅された(第3章)。GSH-IとGSH-IIは共にATPを要求する酵素である。ATPは非常に高価であるため、工業的にグルタチオンを生産する場合、コスト面から大きな負担となる。ATP再生を効率良く行なうことによりATPを軽減できれば工業生産において大きなメ

リットとなることが期待される。第4章でクローニングした *ackA* 遺伝子産物である AK は、既に論じたように ATP 再生系酵素として非常に有効であると考えられている。グルタチオン生産においても大腸菌本来が持っている AK の利用が検討されている。

本章では、グルタチオン生合成酵素 GSH-I, GSH-II と ATP 再生系酵素 AK を共役させてグルタチオンを生産させる (図 5-1) ことを目的として、同一ファージ DNA 上に三種酵素の遺伝子を導入した溶原菌の育種を行ない、この溶原菌の熱誘導後の培養菌体を酵素液として、ATP 再生系の強化による GSH 生産性について検討した。

また、本研究において検討しているグルタチオンのような複数酵素系による物質生産を、安定にしかも効率良く行なうためには、固定化等によってバイオリアクターとして利用することが考えられる。スリーパーベクターは、 $S_7$  変異を導入しているため、熱誘導後の溶菌が抑制される。培養菌体を包括固定化するためには、溶原菌の溶菌をできるだけ抑える必要がある。そこで、 $S_7$  変異に更に溶菌遺伝子 (*Rz*) 欠失変異を加えることにより、熱誘導後の溶菌を強く抑制できるベクター *s1p10S $\Delta$ Rz-Km* を用いた。



GSH I:  $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteine synthetase

GSH II: Glutathione synthetase

A K: Acetate kinase

図5-1 AK, GSH-I, GSH-IIによるGSH生合成経路

## 第2節 スリーパーベクターによる三種酵素遺伝子 gshI, gshII, ackAの同時発現

gshI, gshII, 及び ackAを含むDNA領域それぞれの制限酵素地図を図5-2に示す。

gshIはGSH-Iをコードする領域内にEcoRI認識部位を、gshII, ackAはそれぞれGSH-II, AKをコードする領域内にKpnI認識部位を有する。gshII, ackA遺伝子をEcoRIで挿入可能な  $slp10S\Delta Rz-Km$ に導入し、第3章で作製した  $P_{i..}$ より発現可能な gshIを2コピータンデムに保持する  $slp_{P_{i..}}GSI_2$ とくみかえることにより同一ファージDNA上に三種酵素遺伝子を併せ持つ組み換え体DNAを作製することとした。

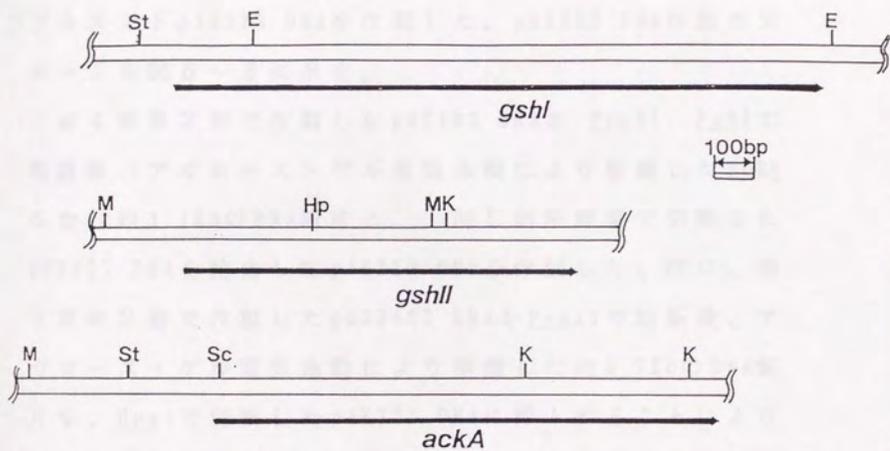


図5-2 *gshI*, *gshII*, 及び *ackA* を含むDNA領域の制限酵素地図

E: *EcoRI*, Hp: *HpaI*, K: *KpnI*, M: *MluI*, Sc: *ScaI*, St: *StuI*

- 1) ackA及びlac-プロモーターより発現可能なgshIIを1コピーずつ組み込んだ組み換え体 slp<sub>10S</sub>ΔGSII<sub>1</sub>-AK<sub>1</sub>の作製

ackAと P<sub>10S</sub>より発現可能なgshIIを順方向に併せ持つプラスミド pAK323 DNAを作製した。pAK323 DNA作製のスキームを図5-3に示す。

第4章第2節で作製した pAK122 DNAを EcoRI, PstIで切断後、アガロース・ゲル電気泳動により単離した ackAを含む約3.7KbのDNA断片と、同じ制限酵素で切断した pBR322 DNAを結合して pAK223 DNAを作製した。次に、第3章第2節で作製した pGSB403 DNAを PvuIIで切断後、アガロース・ゲル電気泳動により単離した約1.7KbのDNA断片を、HpaIで切断した pAK223 DNAに挿入することにより pAK323 DNAを作製した。pAK323 DNAは、ackAの下流に P<sub>10S</sub>より発現可能な gshII遺伝子が順方向に存在する4.6KbのDNA領域の両側に EcoRI認識部位を有するプラスミドDNAである。

pAK323 DNAを EcoRIで切断後、アガロース・ゲル電気泳動により単離した ackA, gshIIを含む4.6KbのDNA断片と、同じ制限酵素で切断した slp10SΔRz-Km DNAを結合後、*in vitro* packaging法によりファージ粒子とした。このファージ粒子を E. coli 1100に感染後、Km寒天培地

上、32℃でコロニーを形成させた。得られたKm耐性株の中から温度感受性株を選択して溶原菌を得た。これら溶原菌各々を培養し、AKとGSH-II酵素活性を測定した。培養は、TY液体培地3ml中、32℃で行ない、K.U.=50~70の時42℃、15分間の熱誘導をかけた後37℃で2時間続けることによって行なった。粗酵素液は培養液を超音波破碎処理することによって調製した。AKとGSH-IIの酵素活性がともに高かった溶原菌よりファージDNAを抽出して制限酵素地図を作製した結果、P<sub>R</sub>プロモーターと順方向にackAとP<sub>I<sub>lac</sub></sub>より発現可能なgshIIが1コピーずつ挿入されたslp<sub>P<sub>I<sub>lac</sub></sub></sub>GSH<sub>II</sub>-AK<sub>1</sub>\* DNAが得られた(図5-4)。

\*: P<sub>I<sub>lac</sub></sub>はlac-プロモーター、GSH<sub>II</sub>, AKの後の<sub>1</sub>はファージDNAにgshI, ackAが1コピーずつ組み込まれていることを表している。

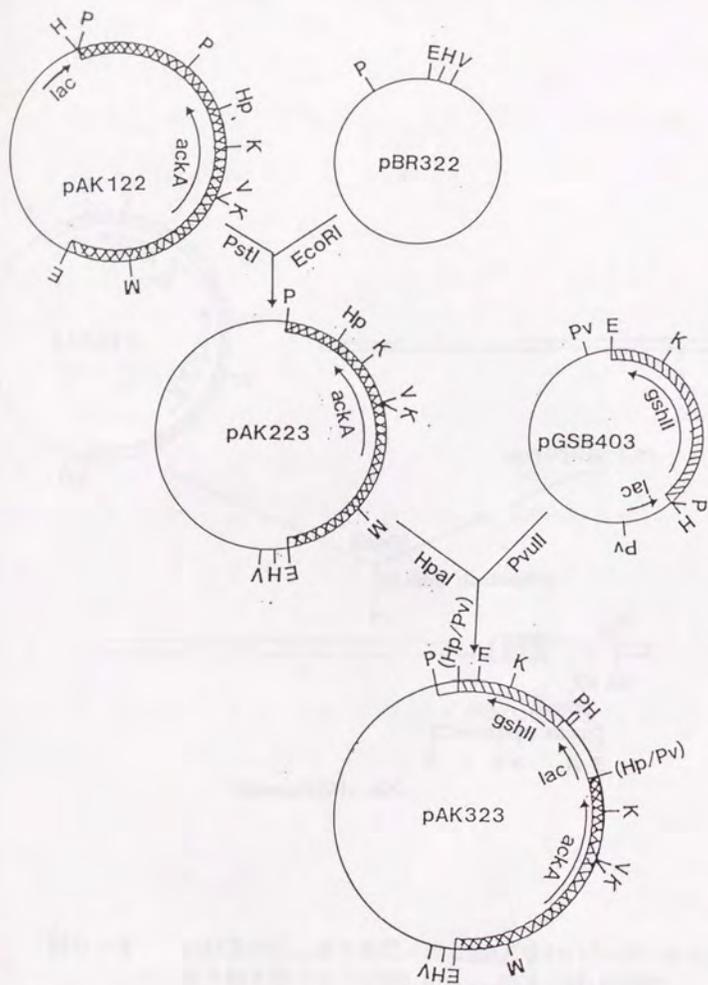


図5-3 *ackA*及びP<sub>lac</sub>より発現可能な*gshII*を1コピーずつ保持するpAK323の構築

E: EcoRI, H: HinIII, Hp: HpaI, K: KpnI, M: MluI, P: PstI, Pv: PvuII  
 V: EcoRV

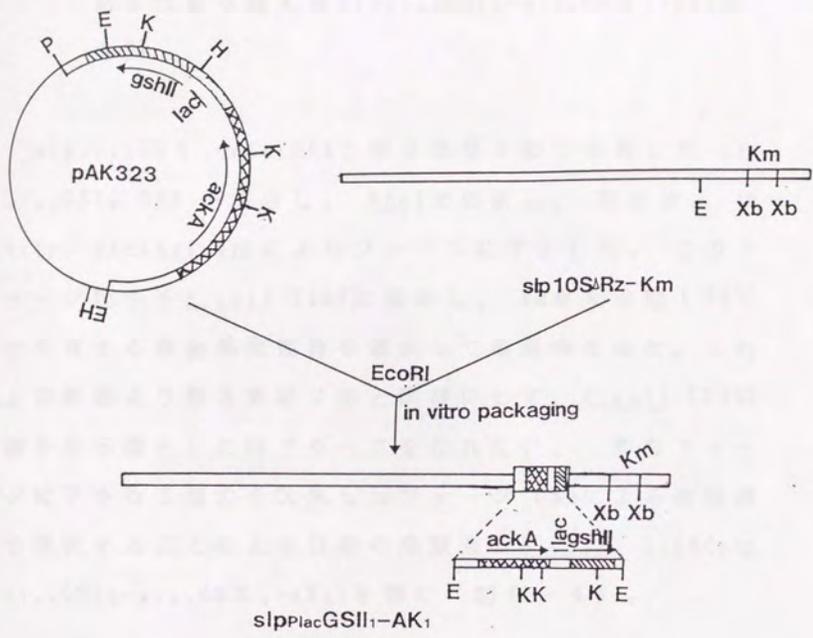


図5-4  $ackA$ 及び $P_{lac}$ より発現可能な $gshII$ を1コピーずつ組み込んだ組み換え体ファージDNA  $slp^{P_{lac}GSII_1-AK_1}$ の作製

E:  $EcoRI$ , H:  $HinIII$ , K:  $KpnI$ , P:  $PstI$ , Xb:  $XbaI$

2) ackAを1コピー、lac-プロモーターより発現可能な gshIを2コピー及び gshIIを1コピー同時に組み込んだ組み換え体  $slp_{P_{1.0}cGSII_1-AK_1}$  の作製

$slp_{P_{1.0}cGSII_1-AK_1}$  DNAと第3章第3節で作製した  $slp_{P_{1.0}cGSI_2}$  DNAを混合し、NheIで切断し、結合後、*in vitro* packaging法によりファージ粒子とした。このファージ粒子を E.coli 1100に感染し、Km寒天培地上32℃で生育する温度感受性株を選択して溶原菌を得た。これら溶原菌より第3章第2節と同様にして、E.coli LE392株を指示菌とした時ブラックを作れない、即ちファージ粒子を作る能力を欠失したファージDNAによる溶原菌を選択することにより目的の溶原菌 E.coli 1100( $slp_{P_{1.0}cGSI_2-P_{1.0}cGSII_1-AK_1}$ )を得た(図5-4)。

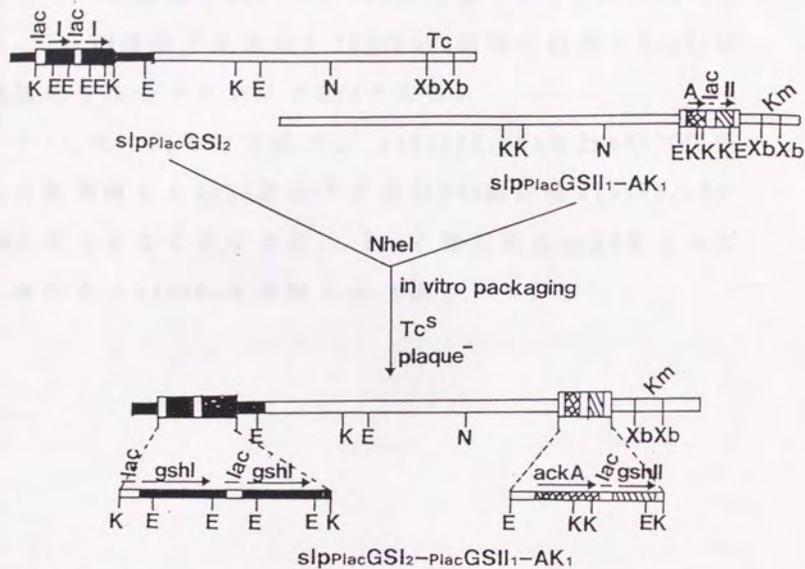


図5-5 *ackA*を1コピー、 $P_{lac}$ より発現可能な*gshI*を2コピー、及び*gshII*を1コピー同時に組み込んだファージDNA  $slp_{P_{lac}GSI_2-P_{lac}GSI_2-AK_1}$ の作製

E: *Eco*RI, K: *Kpn*I, N: *Nhe*I, Xb: *Xba*I

3) ackAを1コピー組み込んだ組み換え体  $s1pAK_1$  の作製

第4章第2節で作製した  $pAK122$  を PstI で切断後、PstI リンカーを挿入し  $pAK123E$  DNA を作製した。 $pAK123E$  DNA は、ackA 遺伝子を含む 3.7Kb の DNA 領域の両側に EcoRI 認識部位を持つプラスミド DNA である。

1) と全く同様の方法で、 $pAK123E$  DNA を EcoRI で切断した後単離した ackA 遺伝子を含む DNA 断片を  $s1p10S\Delta Rz-Km$  に導入することにより、 $P'_R$  と順方向に ackA を1コピー保持する  $s1pAK_1$  を作製した (図5-6)。

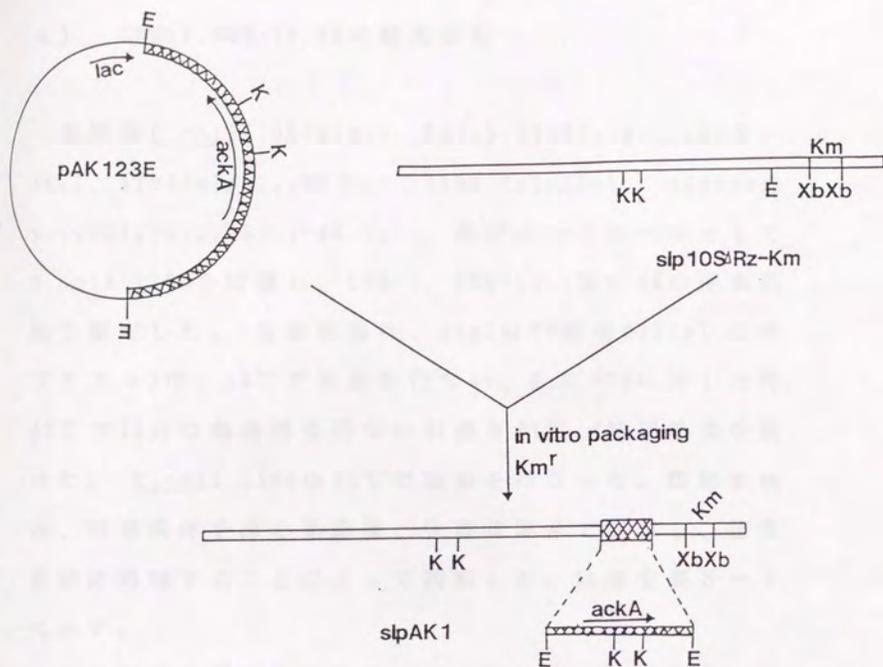


図5-6 *ackA*を1コピー組み込んだファージDNA *slpAK<sub>1</sub>*の作製

E:EcoRI, K:KpnI, Xb:XbaI

#### 4) GSH-I, GSH-II, AKの酵素活性

溶原菌 *E. coli* 1100 ( $slp_{P_{1..c}}GSI_2$ ), 1100 ( $slp_{P_{1..c}}GSII_1-AK_1$ ), 1100 ( $slp_{P_{1..c}}GSII_1$ ), 1100 ( $slp_{AK_1}$ ), 1100 ( $slp_{P_{1..c}}GSI_2-P_{1..c}GSII_1-AK_1$ )、及びコントロールとして *E. coli* 1100 を培養し、GSH-I, GSH-II, 及び AK の酵素活性を測定した。各溶原菌は、10ml の TY 培地 (150ml 三角フラスコ) 中、32°C で培養を行ない、K.U.=75 に達した時、42°C で 15 分の熱誘導を行ない引続き 37°C, 4 時間培養を続けた。*E. coli* 1100 は 32°C で培養を行なった。粗酵素液は、培養菌体を遠心集菌後、生理食塩水で洗浄し、超音波破碎処理することによって調製した。結果を表 5-1 に示す。

三種酵素の遺伝子を組込んだ 1100 ( $slp_{P_{1..c}}GSI_2-P_{1..c}GSII_1-AK_1$ ) においては、GSH-I, GSH-II, 及び AK の酵素活性は、それぞれ、 $18.0 \mu\text{mol/mg蛋白質/h}$ ,  $75.6 \mu\text{mol/mg蛋白質/h}$ , 及び  $286.8 \text{U/mg蛋白質}$  であった。*E. coli* 1100 に比べて、それぞれ、150倍, 180倍, 及び100倍に増幅された。一種酵素遺伝子のみを導入した溶原菌では、1100 ( $slp_{P_{1..c}}GSI_2$ ) において GSH-I は  $22.8 \mu\text{mol/mg蛋白質/h}$ , 1100 ( $slp_{P_{1..c}}GSII_1$ ) において GSH-II は  $36.6 \mu\text{mol/mg蛋白質/h}$ , 1100 ( $slp_{AK_1}$ ) において AK は  $281.3 \text{U/mg蛋白質}$  であった。三種酵素の遺伝子を組込んだ溶原菌における酵素生産量

は、一種酵素遺伝子のみを組み込んだ溶原菌における酵素生産量に比べて三種酵素(GSH-I, GSH-II, AK)とも劣ることはなかった。

これらの酵素蛋白質生産量は、それぞれ、全蛋白質の8~10%に相当する

菌株	酵素 I (GSH-I)	酵素 II (GSH-II)	酵素 III (AK)
11901211-2000-1000-1000-1000	10.5	11.2	10.8
11901211-2000-1000-1000-1000	10.2	11.0	10.5
11901211-2000-1000-1000-1000	10.8	11.5	11.0
11901211-2000-1000-1000-1000	10.3	11.1	10.6
11901211-2000-1000-1000-1000	10.7	11.3	10.9
11901211-2000-1000-1000-1000	10.4	11.2	10.7

表5-1 溶原菌におけるGSH-I, GSH-II, AKの酵素活性

菌株	酵素 活性		
	GSH-I*	GSH-II*	AK**
1100(s1p <sub>P<sub>lac</sub></sub> GSI <sub>2</sub> -P <sub>lac</sub> GSII <sub>1</sub> -AK <sub>1</sub> ***)	18.0	75.6	286.8
1100(s1p <sub>P<sub>lac</sub></sub> GSI <sub>2</sub> )	22.8	1.2	4.0
1100(s1p <sub>P<sub>lac</sub></sub> GSII <sub>1</sub> )	0.18	36.6	3.5
1100(s1pAK <sub>1</sub> )	0.12	0.48	281.3
1100(s1p <sub>P<sub>lac</sub></sub> GSII <sub>1</sub> -AK <sub>1</sub> )	0.18	6.0	257.1
1100	0.12	0.42	2.8

\*:  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  蛋白/時間

\*\* : U/mg 蛋白

\*\*\*: P<sub>lac</sub>はlac-プロモーター、GSI, GSII, AKはそれぞれGSH-I, GSH-II, 及びAK酵素遺伝子を組み込んでいることを表し、<sub>1</sub>或いは<sub>2</sub>は、組み込まれている遺伝子のコピー数を示す。

## 5) グルタチオン生産能の検定

表5-1に示したように、溶原菌 1100( $slp_{P_{1.0}}GSII_2-  
P_{1.0}GSII_1-AK_1$ ) を熱誘導を含む培養をすることにより  
GSH-I, GSH-II及びAKの活性は、それぞれ150倍、180倍、  
及び100倍に増幅された。そこで、gshI, gshII, ackA  
を組み込んだファージDNAによる溶原菌の熱誘導を含む  
培養菌体を酵素源として、第3章第4節と同様にして、  
3つのアミノ酸からのグルタチオン生産能について検討  
を行なった。

溶原菌 1100( $slp_{P_{1.0}}GSII_2-  
P_{1.0}GSII_1-AK_1$ ), 1100( $slp_{  
P_{1.0}}GSII_2-  
P_{1.0}GSII_1$ ), 及びコントロール菌として E. coli  
1100 のGSH生産能を検討した。溶原菌からの酵素液は4)  
で培養した菌体を生理食塩水で洗浄後、培養液と等量の  
50mM Tris·HCl(pH7.0)bufferに懸濁して超音波破碎処理  
を行なうことによって調製した粗酵素液を利用した。11  
00からの酵素液は、TY培地10ml(150ml三角フラスコ)中、  
37℃で16時間培養した菌体を生理食塩水で洗浄した後、  
0.5mlの 50mM Tris·HCl(pH7.0)buffer に懸濁し超音波破  
碎処理を行なうことによって調製した。反応は、第3章  
と同じ組成で行なった。即ち、ATPは20mM添加の条件で  
行なった(表3-3)。反応は、37℃で30分間緩やかに  
浸とうしながら行なった。生成したGSHの量はTietzeの

方法により測定した。結果は、表5-2に示す通りである。

熱誘導を含む培養を行なった溶原菌体を酵素源としてGSH生産能を測定した結果、1100(slp<sub>P1ac</sub>GSI<sub>2-P1ac</sub>GSII<sub>1-AK1</sub>)においては、25.2 μmol/mg蛋白/h, 1100(slp<sub>P1ac</sub>GSI<sub>2-P1ac</sub>GSII<sub>1</sub>)においては、22.4 μmol/mg蛋白/hのGSH生産能がみられた。1100におけるGSH生産能は0.07 μmol/mg蛋白/hであったので、スリーパーベクターを利用して三種酵素活性を強化した1100(slp<sub>P1ac</sub>GSI<sub>2-P1ac</sub>GSII<sub>1-AK1</sub>)では360倍、GSH-I, GSH-II 両酵素遺伝子の発現を誘導した1100(slp<sub>P1ac</sub>GSI<sub>2-P1ac</sub>GSII<sub>1</sub>)では、320倍ものGSH高生産能を示したことになる。

表5-2 GSH生産能

菌株	GSH生産能*
1100(s1p <sub>P<sub>lac</sub></sub> GSI <sub>2</sub> -P <sub>lac</sub> GSII <sub>1</sub> -AK <sub>1</sub> **)	25.2
1100(s1p <sub>P<sub>lac</sub></sub> GSI <sub>2</sub> -P <sub>lac</sub> GSII <sub>1</sub> )	22.4
1100	0.07

\* :  $\mu\text{mol/mg 蛋白/時間}$

\*\* : P<sub>lac</sub>はlac-プロモーター、GSI, GSII, AKはそれぞれGSH-I, GSH-II, 及びAK酵素遺伝子を組み込んでいることを表し、<sub>1</sub>或いは<sub>2</sub>は、組み込まれている遺伝子のコピー数を示す。

### 第3節 ATP再生系の強化によるGSH効率的生産の検討

三種酵素遺伝子 (*gshI, gshII, ackA*)を同時に組み込んだ溶原菌 1100(*slp<sub>P1</sub>, cGSI<sub>2-P1</sub>, cGSII<sub>1</sub>-AK<sub>1</sub>*)における熱誘導培養後のGSH-I, GSH-II及びAK酵素活性はそれぞれ、 $18.0 \mu\text{mol/mg蛋白/h}$ ,  $75.6 \mu\text{mol/mg蛋白/h}$ , 及び  $286.8 \text{ U/mg蛋白}$  (表5-1)であった。GSH生合成系酵素群 (GSH-I, GSH-II)の活性に比べて、ATP再生系酵素としてのAKは、はるかに高い酵素活性となっている。ATP再生系酵素活性を強化することにより、ATP再生系がより効率良く回転し、ATPの添加量を軽減しても効率的な物質生産が期待される。即ち、GSH生産において、AKの強化による低ATP量での効率的生産が可能となろう。

本節においては、三種酵素遺伝子群の発現を増幅することができる溶原菌 1100(*slp<sub>P1</sub>, cGSI<sub>2-P1</sub>, cGSII<sub>1</sub>-AK<sub>1</sub>*)とGSH生合成系遺伝子群のみの発現を増幅することができる溶原菌 1100(*slp<sub>P1</sub>, cGSI<sub>2-P1</sub>, cGSII<sub>1</sub>*)の熱誘導後培養菌体を酵素源として、反応液中のATP濃度を変えることによるGSH生産性への影響を検討した。培養は、TY培地10ml(150ml 三角フラスコ)中で32°Cで生育させ、K.U.が75に達した時42°Cで20分熱誘導をおこなって、その後32°Cで4時間振とうすることによって行なった。粗酵素

液は、10mlの培養菌体を生理食塩水で遠心洗浄した後、2mlの生理食塩水に懸濁して超音波破碎処理を行なって調製した。この実験に用いたGSH-I, GSH-II及びAKの酵素活性は表5-3に示す通りである。GSH生産能は、表5-4からなる反応液中で37°C, 30分間反応させ、生成したGSH量を測定することにより比較した。結果は、表5-5に示す。

ATP再生系としてのAKを強化した溶原菌 1100(s1p<sub>P1</sub>, GSI<sub>2-P1</sub>, GSII<sub>1-AK<sub>1</sub></sub>)において、添加したATPが0.5mM, 0.1mMの時のGSH生産能はそれぞれ22.8, 17.7  $\mu$ mol/mg蛋白/hであり、ATP20mMのときに比べてそれぞれ110%, 85%の生産能を示した。これに対して、GSH生合成系酵素群のみを強化した1100(s1p<sub>P1</sub>, GSI<sub>2-P1</sub>, GSII<sub>1</sub>)では、ATP 0.5mM, 0.1mMの時それぞれ18.5, 5.9  $\mu$ mol/mg蛋白/hのGSH生産能であり、ATP20mMの時に比べてそれぞれ79%, 25%にまで低下した。また、1100(s1p<sub>P1</sub>, GSI<sub>2-P1</sub>, GSII<sub>1-AK<sub>1</sub></sub>)では、ATP0.5mMの時、20mMよりも高い生産能を示した。この結果は、ATP再生系の強化により低ATP量で効率よくGSHが生産されることを実証している。

表5-3 GSH-I, GSH-II, AK酵素活性

菌株	酵素 活性		
	GSH-I*	GSH-II*	AK**
1100(s1p <sub>lac</sub> GSI <sub>2</sub> -p <sub>lac</sub> GSII <sub>1</sub> )	18.6	31.8	2.8
1100(s1p <sub>lac</sub> GSI <sub>2</sub> -p <sub>lac</sub> GSII <sub>1</sub> -AK <sub>1</sub> )	17.4	74.4	293.6

\*:  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  蛋白/時間

\*\* : U/mg 蛋白

\*\*\*: p<sub>lac</sub>はlac-プロモーター、GSI, GSII, AKはそれぞれGSH-I, GSH-II, 及びAK酵素遺伝子を組み込んでいることを表し、<sub>1</sub>或いは<sub>2</sub>は、組み込まれている遺伝子のコピー数を示す。

表5-4 反应液组成

L-Glutamate	80mM
L-Cysteine	20mM
Glycine	20mM
MgCl <sub>2</sub>	25mM
Acetyl-P	20mM
ATP	0, 0.1, 0.5, or 20mM
K-Phosphate buffer (pH7.0)	50mM
粗酵素液 (sonicated)	250 μl

1.0ml, 37°C, 30分

表5-5 GSH生産におけるATP濃度の影響

菌株	GSH生産能		
	ATP20mM	ATP0.5mM	ATP0.1mM
1100(slp <sub>P1.Δc</sub> GSI <sub>2-P1.Δc</sub> GSI <sub>1</sub> )	23.4*(100)**	18.5(79)	5.9(25)
1100(slp <sub>P1.Δc</sub> GSI <sub>2-P1.Δc</sub> GSI <sub>1-AK1</sub> )	20.8(100)	22.8(110)	17.7(85)

\*:  $\mu\text{mol/mg}$  蛋白/時間

\*\* : 各菌株において、20mM ATP存在下で得られた  
GSH 生産能を100 とした時の相対生産能

## 第4節 考察

三種酵素遺伝子群 (gshI, gshII, ackA) を同時に組み込んだ溶原菌 1100 ( $slp_{P_{1.2}}GSI_2-P_{1.2}GSII_1-AK_1$ ) において、GSH-IIの活性は  $74.4 \mu\text{mol/mg蛋白/h}$  であった (表5-3)。これに対し、GSH-I, GSH-IIのみを組み込んだ溶原菌 1100 ( $slp_{P_{1.2}}GSI_2-P_{1.2}GSII_1$ ) のGSH-II活性は  $31.8 \mu\text{mol/mg蛋白/h}$  であった (表5-3)。三種酵素遺伝子を同時に組み込むことによってGSH-IIの活性が二種酵素遺伝子を組み込んだ溶原菌に比べて約2倍に上昇したことになる。三種酵素遺伝子を同時に組み込んだファージDNA  $slp_{P_{1.2}}GSI_2-P_{1.2}GSII_1-AK_1$  では、gshIIの上流にackAとそのプロモーター領域を組み込んだ形になっているため、ackAの影響により転写効率が上昇していることが考えられる。しかし、ackAとgshIIのみを組み込んだ溶原菌では、AKの活性がackA遺伝子のみを組み込んだ溶原菌の活性とほぼ同等で約  $280 \text{ U/mg蛋白}$  であったのに対し、GSH-IIの活性はgshIIのみを組み込んだ溶原菌の活性の約  $1/6$  の  $6.0 \mu\text{mol/mg蛋白/h}$  にまで低下した (表5-1)。この結果は、ackA領域をgshIIの上流に組み込むことによりgshIIの発現が阻害されていることを示唆する。データは省略するが、ackAとgshIIを組み込んだ溶

原菌の培養時に  $P_{lac}$  の誘導基質である IPTG を 1mM 添加して培養すると、GSH-II の活性は  $18.0 \mu\text{mol/mg蛋白質/h}$ 、AK は  $150\text{U/mg蛋白質}$  であった。この結果から、ackA を gshII の上流に導入することにより熱誘導後のファージ DNA の増幅が阻害されるため、コピー数が減少し、lac-リプレッサーにより gshII の転写が抑制されていることが考えられるが、この可能性は、ackA のみを組み込んだ溶原菌 1100 ( $\text{s1pAK}_1$ ) と比べて、AK 活性には変化がないことから否定されよう。論理的にこの現象を説明することは、現時点では困難であるが、この三種酵素遺伝子を組み込んだ時は GSH-II の活性が増幅され、ackA と gshII のみを組み込んだ時は抑制され、更に第 3 章で得られた結果より  $P_{lac}$  を利用した時 gshI の発現効率は上昇したのに gshII の発現はそれほど上昇しなかったという相矛盾する結果は、非常に興味深い結果である。アセテートカイネースは細胞内において ATP の生産、高エネルギー中間体であるアセチルリン酸の生成、或いはリン酸基の転移などに関与していると考えられている。CRP-cyclic AMP による正の制御、リン酸制御等との関連を含めて、ackA 領域或いは AK が遺伝子発現制御において関わっている可能性もあるので、今後検討してゆきたい課題である。

本研究において作製した溶原菌 1100 ( $\text{s1p}_{P_{lac}}\text{GSI}_2\text{-}_{P_{lac}}\text{GSH}_{II_1}\text{-AK}_1$ ) は、熱誘導後、三種酵素 (GSH-I, GSH-II,

AK)の酵素活性は、親株に比べてそれぞれ150倍、180倍、100倍に増幅された(表5-1)。三種酵素遺伝子をそれぞれ単独に組み込んだ溶原菌の熱誘導後の酵素活性は、1100(slp<sub>P1</sub>...GSI<sub>2</sub>)のGSH-I活性が22.8 μmol/mg蛋白/h、1100(slp<sub>P1</sub>...GSH<sub>1</sub>)のGSH-II活性が37.2 μmol/mg蛋白/h、そして1100(slpAK<sub>1</sub>)のAK活性が281.3 U/mg蛋白であったので、三種酵素遺伝子群を同時に組み込んでみてもいずれの酵素もその発現が何等劣ることがなかった。これらの酵素蛋白質生産量は、それぞれ、全蛋白質の8~10%に相当する。また、これら溶原菌をスラントに植えて室温で6ヵ月以上放置しておいても、その酵素発現増幅能に全く変化は見られなかった。更に、GSH生産能も親株の360倍にまで向上することができた(表5-2)。これらの結果は、GSH生合成に関わる酵素群を遺伝子組換え技術を利用することにより、遺伝子レベルから再構成し、細胞内における機能の増幅に成功したことを実証している。また、これら三種酵素遺伝子を同時に組み込んだ溶原菌において、遺伝子群が宿主内で安定に保持され、熱誘導により全ての酵素の活性が高度に増幅されたことは、本研究に利用したスリーパーベクターシステムが複数酵素系に支配される物質生産に適している宿主・ベクター系であることを実証したと言えよう。

本研究において、GSH-Iの活性は、親株の150倍まで増

幅することに成功したが、その活性は  $18.0 \mu\text{mol}/\text{mg}$  蛋白/hであり、大腸菌本来が有しているAK活性の1/10程度に留まった。そのため、GSH生合成系酵素群の活性のみを強化した1100(slp<sub>P1</sub>...GSI<sub>2-P1</sub>...GSH<sub>I1</sub>)においても通常生合成されているAKによりATP再生系が働き、添加ATP濃度を0.5mMの時80%程度の生産性を維持していたと考えられる。一方、本研究においてクローニングしたackAを利用し、三種酵素遺伝子群を同時に組み込むことにより、GSH生産性はATP濃度を低下しても高いレベルで維持され、添加したATPが0.5mMの時高いGSH生産能を示した。GSH生合成系では、GSH1molを生成するためには、ATP2molが必要であるので、ATP0.1mMの条件の時、ATP再生系が働かなければ、反応液1ml中では、 $0.05 \mu\text{M}$ のGSH生成に留まることになる。本研究において、GSH生産能の検討に用いた反応条件(表5-4)では、粗酵素液250 $\mu\text{l}$ が1.6mg蛋白に相当する。従って、表5-5において得られた結果より37°C, 30分間に生成されたGSHを計算すると、ATP0.1mMの時、1100(slp<sub>P1</sub>...GSI<sub>2-P1</sub>...GSH<sub>I1</sub>), 1100(slp<sub>P1</sub>...GSI<sub>1-P1</sub>...GSH<sub>I1</sub>-AK<sub>1</sub>)では、それぞれ、4.72, 14.15 $\mu\text{mol}$ のGSHが生成されたことになるので、ATP再生系を利用することにより添加ATP 0.1 $\mu\text{mol}$ に対して、それぞれ、94倍, 283倍のGSHが生成されたことになる。この結果は、ATP再生系としてのAKを強化することにより

ATP $\leftrightarrow$ ADPの回転率が高まり、GSH生成の結果生じるADPが効率良くATPに変換されていることを強く示唆する。そして、GSH生成に必要なATPが常に供給され、更に生成反応阻害をもたらすADPが少なくなるため、低ATP濃度においても効率良くGSH生成が進行すると考えられる。また、GSH-I, GSH-II酵素反応におけるMgCl<sub>2</sub>の最適濃度は、ATP濃度に依存している<sup>(13, 14)</sup>ので、反応中のATP濃度を低下することによりMgCl<sub>2</sub>の濃度も低下することが期待される。MgCl<sub>2</sub>の濃度を低減することができれば、反応の結果生じるリン酸とMgイオンによるリン酸マグネシウムなどの副生成物の減少も期待されるので、今後生成条件等検討すべき課題となろう。ATP再生系を強化することによりATP濃度を低減することは、工業生産においてコスト低減並びに副生成物の少ない効率的生産システムの構築に大きく貢献することと考えられる。ATP再生系が効率良く機能するためには、生合成系酵素群との活性のバランスが必要であろうが、少なくとも再生系酵素が過剰に存在する必要があると推定される。本研究において作製したファージDNA s1pAK<sub>1</sub>は、GSH-I遺伝子と同様にATPを要求する酵素をコードする遺伝子をs1p500タイプのスリーパーベクターに組み込んだファージDNAとNheIで組替えることにより同時に宿主内に組み込むことが可能である。従って、今後、ATPを要求する酵素を含

む複数酵素系による多様な物質生産に広く応用していけよう。

この様にして、スリーパーベクターを利用してGSH合成に関与する全ての酵素群を強化したGSH高生産菌を育種し、ATP再生系の効率的利用により経済的にも生産性の高いGSH生産システムの構築に成功した。本研究は、GSH生産システムの高効率化に留まらず、ATPを要求する酵素反応を含む複数酵素系による物質生産システムのモデルとなるので、今後、多種多様な展開に貢献することが大いに期待される。更に、視点を換えてみれば、この三種酵素によるGSH生合成は、細胞内のGSH生合成に関わる酵素系を全て取り出して再構成したことに他ならない。即ち、遺伝子組換え技術により人工的な代謝経路を構築したことになる。複数酵素による反応工学の研究にとってもモデルケースとして好適な材料となると考えられる。



## 第1節 グルタチオンについて

グルタチオン(GSH)は、現在、工業的には、酵母からの抽出と有機合成法によって製造されている。更に、効率良い生産法としては、遺伝子組み換え技術の利用が考えられるが、GSHはグルタミン酸とシステインが $\gamma$ -結合した $\gamma$ -L-Glu-L-Cys-Glyからなる構造をもつ物質であるため、三種のアミノ酸に対応する塩基配列をもつDNAを合成して、宿主内で発現させても活性GSHは生合成されない。従って、遺伝子組み換え技術を利用して生産させるためには、GSHの生合成に関与している酵素を増幅させることによって生産させる必要がある。これまで、GSH-Iをコードする遺伝子 $gshI$ 、GSH-IIをコードする遺伝子 $gshII$ を大腸菌より単離し、プラスミドベクターに導入することによりGSH生産能の上昇した菌株の育種が検討されてきた。 $gshI$ を2コピーと $gshII$ を1コピーを同一プラスミドに組み込んだpGS551による大腸菌形質転換株では、GSH-I,GSH-IIの酵素活性が、それぞれ、3.9、16.3 $\mu$ mol/mg蛋白/hまで上昇し、GSH生産能は親株の約60倍に向上したと報告されている。GSH生産において律速段階になっているGSH-I活性を増強することによってGSH生産能のさらなる上昇が期待される。そのためには、

細胞あたりの gshI のコピー数を増加すること、転写・翻訳効率を高めることが考えられる。従来のプラスミドを用いた系では、挿入DNAのサイズによってコピー数が変動し、安定性にも問題がある。更に、強力なプロモーターを使用する場合、lac-プロモーターを利用する時に添加するIPTGなどの高価な誘導基質が必要となるので工業的に利用する際、培養におけるコスト負担が高くなる等の問題を有している。

本研究において、この様な問題を解決し、更にGSH生産性の高い菌株を育種することを目的として、スリーパーベクターを利用した菌株の作製を行なった。何故ならば、 $\lambda$ ファージを母体として構築したスリーパーベクターのシステムは、約23Kbまでの長いDNAを組み込むことが可能であり、更に、組み込むDNAのサイズに関係なく熱誘導のみにより細胞あたり500コピー以上にファージDNAが増幅され、誘導基質の添加なしで、プロモーターからの効率良い転写が期待されるからである。gshIを2コピー、gshIIを1コピー同時に組み込んだ溶原菌1100 ( $s1pGS I_2$ -GS II<sub>1</sub>)では、熱誘導を含む培養によりGSH-I、GSH-IIの活性は、それぞれ、5.1, 36.0  $\mu$ mol/mg蛋白/hまで上昇し、GSH生産能は親株の約80倍に向上した。更に、gshI, gshIIの発現をP<sub>1.0</sub>により支配されるように構築して、同様に、同時に組み込んだ溶原菌1100

(slp<sub>P1ac</sub>GSI<sub>2-P1ac</sub>GSII<sub>1</sub>)では、熱誘導を含む培養によりIPTGの添加なしで、熱誘導のみでGSH-I, GSH-IIの酵素活性は、それぞれ、19.6, 45.1  $\mu$ mol/mg蛋白/hまで上昇し、この活性の上昇に伴いGSH生産能は親株の約320倍まで向上した。即ち、本研究において、従来報告されているよりはるかに高いGSH生産能を有する菌株の作製に成功した。この高い生産性を有する溶原菌を工業的に応用することにより、培養の少量化、培養時のコスト低減、副反応の低減などが期待される。

GSH-I, GSH-II は共にATPを要求する酵素であるので、これらの反応を利用して、GSH生産を行なう時、高価なATPがコスト面において問題となる。更に、反応の結果、生じるADPによる酵素反応の阻害も問題となる。このような問題を解決し、さらに効率良いGSH生産を達成するためには、ATP再生系を効率良く利用することが必要となる。本研究において、ATP再生系酵素として有効であると考えられているアセテートカイネースをコードするackAをクローニングし、gshI, gshII, ackAを同時に組み込んだ溶原菌を作製して、GSH生産性の検討を行なった。ackAを1コピー、P<sub>1ac</sub>に支配されるgshIを2コピー、そしてP<sub>1ac</sub>に支配されるgshIIを1コピーを同時に組み込んだ溶原菌 1100(slp<sub>P1ac</sub>GSI<sub>2-P1ac</sub>GSII<sub>1</sub>-AK<sub>1</sub>)では、熱誘導のみによりGSH-I, GSH-II及びAKの酵素活性が、それ

ぞれ、18.0、75.6、17,200  $\mu\text{mol/mg}$ 蛋白/hまで増幅され、GSH生産能は親株の約360倍まで上昇した。この三種酵素高発現株を利用して、ATP再生系の強化によるGSH生産効率を比較検討した結果、反応系中のATP濃度を20mMから0.1mMまで低減しても、20mMの系の時の85%もの生産性を維持し、更に0.5mMの系では、20mMの系の時の110%の高生産性を示した。これに対して、gshI、gshIIのみを組み込んだ溶原菌では、ATP濃度を0.1mMまで低減すると、20mMの系に比べて、25%の生産性しか示さなかった。即ち、本研究において、ATP再生系としてのAKを同時に強化してATP再生系を効率良く利用することにより、高価なATPを低減しても、効率良くGSHを酵素法により生産するシステムを構築することに成功した。

このような高い生産性をもつ菌株を利用して、酵素法によるGSH生産を行なうためには、バイオリアクターの利用による連続生産が考えられる。このような観点から、本研究において、溶菌に関与するS遺伝子を $S_7$ として、更に溶菌遺伝子 $R_z$ を欠失することにより溶菌を強く抑制できるスリーパーベクター $slp10S\Delta R_z$ を利用した。熱誘導後の菌体を $\kappa$ -カラギーナンなどのゲル化剤を使用して、包括固定することによって、バイオリアクターによる連続生産を行ない、システイン(20mM)からの転換率が90%以上で10日間の連続生産に成功している。

グルタチオンは、医薬品として解毒剤などに使われている有用な物質であり、更に、最近では、機能性食品としての食品への展開も期待されている。本研究において、作製したGSH生成に関与するGSH-I, GSH-II、そしてATP再生系としてのAKをコードする遺伝子群を同時に組み込んだGSH高生産株を利用した酵素法によるGSH生産システムは、工業的にも培養コストを軽減し、さらに、GSH生成反応におけるATPの低減及び基質からの高転換が期待されるので、今後、有用な材料となろう。

## 第2節 ATP再生系とアセテートカイネースについて

ATPは生体内において、多くの生合成経路に重要な役割を果たしている。この生合成反応において、通常、ATPは中間体を経由した新たな化学結合の合成と共役することによりADP、AMPの形に分解される。ATPを必要とする酵素反応を工業的物質生産に応用する場合、経済的に高価なATPを効率的に利用する必要がある。このような観点から、これまで生合成反応の結果消費されるATPを連続的に再生するATP再生系の利用が多く試みられてきた。

ATP $\leftrightarrow$ ADPを転換する酵素の中でも、アセテートカイネースは平衡定数が大きくATP合成の方向に偏っており、更に、基質となるアセチルリン酸は理論的には安価に合成できる。従って、AKは、ATP再生系として、その利用価値が非常に高い酵素である。遺伝子組み換え技術を用いて、発現を増幅したATP要求酵素反応を物質生産に応用する際、宿主本来が持っているAK酵素活性では不十分になるため、ATP再生系が効率良く利用できない可能性がある。本研究では、大腸菌由来のAKをコードする ackA をクローニングし、大腸菌内での発現増幅を検討し、GSH生産に応用することによって、強化したATP再生系の物質生産への効果を検討した。ackAのクローニングは、

大腸菌染色体地図上 ackA の近傍にマップされている purF を出発点としてジーンウォーキング法によって行ない、これまで全く報告のなかった ackA のクローニングに成功した。ackA は、すぐ上流に存在するプロモーター領域より効率良く発現され、プラスミドを利用した形質転換株では、420~460U/mg 蛋白の高活性を得た。この活性は、親株の160~180倍である。この ackA を GSH 生合成に関与する酵素遺伝子 gshI, gshII と共に同時に組み込んだ溶原菌を作製し、GSH 生産性を検討した。前節で論じた通り ATP 再生系を強化した結果、反応系中の ATP 濃度を低くしても効率良く ATP が再生されるため、高い GSH 生産性を維持できることが明らかになった。

この系においては、AK の比活性は GSH-I の約 1,000 倍も高くなっており、これだけの比活性の差が効率良い ATP 再生、及び物質生産のために必要であるかどうかは不明である。今後、物質生産を効率良くおこなうために必要な適切な活性比の検討をしてゆきたい。

本研究において作製した ackA のみを導入したファージ DNA slpAK<sub>1</sub> は、コート蛋白質をコードする DNA 領域にのみ制限酵素認識部位を有する slp500 タイプのスリーパーベクターに他の ATP 要求酵素遺伝子を導入したファージ DNA と組み換えることにより大腸菌内で同時に発現を増幅することが可能である。このシステムを利用すること

により、今後多種のATP要求酵素を用いた物質生産への応用が期待されよう。

一方、AKは、細胞内においてPTAとリンクして、酢酸の排出、アセチルCoAの形成など生体代謝機構においても重要な役割を果たしている。また、大腸菌染色体地図上PTAをコードする遺伝子 $\text{pta}$ は $\text{ackA}$ のすぐ近傍にマップされている。アセチルCoA $\leftrightarrow$ CoAを触媒するPTAは、物質生産の面からはCoAサイクリング反応への応用が期待される。このような観点から、本研究において、 $\text{pta}$ をクローニングし、更に、 $\text{ackA}$ との同時発現の検討を行なった。その結果、大腸菌クロモゾームDNA上 $\text{pta}$ は $\text{ackA}$ のすぐ下流に存在し、その転写方向は同一であり、更に、 $\text{purF}$ から約13Kb離れて存在することが明らかになった。また、本研究において、 $\text{ackA}$ と $\text{pta}$ がオペロンとして存在する可能性を示唆する結果が得られたが、今後、 $\text{pta}$ を含む領域の塩基配列の解析、及びmRNAの単離などを行なうことによって、両遺伝子の発現制御機構の解明を行なってゆきたい。

本研究において、細胞内で重要な役割を果たしており、更に、物質生産においても有用な酵素であることが多く報告されていたにもかかわらず、これまで遺伝子の実態が全く報告されていなかったAKとPTAをコードする遺伝子のクローニングに成功した。今後、これら遺伝子を利



### 第3節 複数酵素系による物質生産におけるスリーパーベクターの利用について

細胞の有する機能は、一般的に、複数酵素反応による長いプロセスに支配されており、これら機能は、細胞の生命維持活動、細胞複製のために高度な複合的制御のもと、作用し、恒常性を維持している。この細胞の持つ様々な機能を巧みに利用することによって、発展してきた醸造・発酵は、我が国の最も得意とする分野の一つである。複数酵素による物質生産の系は、既に、アミノ酸、抗生物質などの生産に利用されている。近年の遺伝子組み換え技術の出現により、更に高度な利用への道が開かれようとしている。複数酵素系による物質生産を遺伝子組み換え技術を利用して行なう際、従来のプラスミドを用いた系では、挿入できるDNAの収容能力、プラスミドDNAの安定性などに問題があった。更に、プラスミドは細胞内において、自律増殖するためコピー数の人為的制御が困難であることから、制御可能なプロモーターを利用した場合でも完全な発現制御を行なうことが困難であるなどの問題もあった。従って、複数酵素系の遺伝子群を安定かつ高度に発現させるためには、用いるベクターに特別の工夫が必要となろう。

本研究において用いたスリーパーベクターは、20数Kbまでの長いDNAを組み込むことが可能であり、しかも、通常はクロモゾーマルDNAに組み込まれることにより宿主内で安定に保持される。そして、熱誘導のみにより遺伝子の発現が誘導され遺伝子産物を高度に蓄積させることを特長としている。従って、複数酵素反応系による物質生産への応用に最適のベクターであろう。本研究では、GSH生産に関与する三種酵素遺伝子 (*gshI*, *gshII*, *ackA*) を同時に同一ファージDNAに組み込んだ溶原菌を作製することにより、従来の生産性を凌駕し、しかも安定なGSH高生産菌株の育種に成功した。この溶原菌では、三種酵素遺伝子とも安定に保持され、熱誘導により酵素生産は、それぞれ、菌体蛋白の8~10%にまで達した。AKを利用したATP再生系を含むGSH生合成系に関わる遺伝子群をスリーパーベクター上に導入したことは、細胞内に人工的な代謝経路を再構築したと考えられることができる。遺伝子組み換え技術を利用して再構築したGSH生合成系を同時に組み込んだGSH高効率生産株は、複数酵素系による物質生産へのスリーパーベクターの有用性を強く示唆していよう。

本研究において利用したスリーパーベクターは、 $\lambda$ ファージのatt部位により大腸菌クロモゾーマルDNAに組み込まれる。一方、 $\phi 80$ ファージのatt部位によりクロモ

ゾーマルDNA に組み込むことが可能なスリーパーベクターも開発されている。これらのスリーパーベクターを組み合わせることにより、二重溶原菌として、最大40数Kbまでの外来遺伝子を同時に同一宿主内に組み込むことが可能である。一般的に、複数酵素反応による物質生産の系は、三ステップで完結されるGSH生成系よりはるかに長い連続的な酵素反応によって行なわれる。本研究において、スリーパーベクターの利用により確立された *gshI*, *gshII*, *ackA* の三種酵素遺伝子群同時高発現によるGSH高生産システム、及び遺伝子組み換え技術により強化したATP再生系と アセチルCoA $\leftrightarrow$ CoAサイクリング反応系の応用は、今後、10段階以上の反応系による物質生産システムの効率的構築による広範な産業分野への展開が期待される。

## 要旨

細胞の有する機能は、一般的に、複数酵素反応による長いプロセスに支配されており、これら機能は、細胞の生命維持活動、細胞複製のために高度な複合的制御のもと、作用し、恒常性を維持している。近年、急速に進歩している遺伝子組み換え技術を応用して、複数酵素反応を利用した効率的物質生産システムを確立することは、産業的利用のみならず、学術的な面からも意義深いことであろう。

グルタチオン(GSH)は、 $\gamma$ -Glu-L-Cys-Glyからなる構造をもつ物質であり、大腸菌において、共にATPを要求する二種類の酵素、 $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素(GSH-I)とグルタチオン合成酵素(GSH-II)の連続反応によって生合成されている。このようなATPを要求する酵素を含む複数酵素反応系を物質生産に応用する場合、高価なATPを効率的に利用するATP再生系の構築が必要となる。著者は、ATP再生系酵素として大腸菌由来のアセテートカイネース(AK)遺伝子を新たに単離して、一次構造を決定し、更に、大腸菌染色体上近傍に存在するフォスフォトランスアセチレーズ(PTA)遺伝子の単離と両酵素遺伝子の発現の増幅を検討した。一方、著者らは従来より $\lambda$ ファージを母体として一連のベクター(スリーパーベクター)を開発してきた。スリーパーベクターは、20数Kbまでの長いDNAを組み込むことが可能であり、し

かも、通常は、クロモゾーマルDNAに組み込まれることにより宿主内で安定に保持されることを特長としている。著者は、GSHのような複数酵素反応系による物質生産への応用に最適のベクターであると考え、スリーパーベクターを利用した三種酵素(GSH-I, GSH-II, AK) 遺伝子群同時高発現によるGSHの高効率生産を検討した。本研究は、AK, PTA両酵素遺伝子の単離と発現、スリーパーベクターを利用したGSH高生産菌の育種とATP再生系強化によるGSH高効率生産について検討した結果をまとめたものである。

第1章は緒論、第2章は実験材料と方法にあてられている。

第3章は、スリーパーベクターによるグルタチオン合成酵素遺伝子群の増幅に関するものである。GSH生合成に関与するGSH-I, GSH-IIをコードする遺伝子群(gshI, gshII)をスリーパベクターに組み込むことにより、二種酵素の高発現とGSH生産能を検討した。大腸菌において、GSH-Iの比活性はGSH-IIの1/3~4程度であるため、GSH生成においてGSH-Iによる反応が律速段階になっているので、GSH-Iの活性を増強することによりGSH生産能の上昇が期待される。そのためには、細胞あたりのgshIのコ

ピー数を増加し、更に転写・翻訳効率を高めることが必要である。まず、gshIを2コピーとgshIIを1コピー同時にスリーパーベクターに組み込んだ溶原菌 E. coli 1100 (s1pGSI<sub>2</sub>GSII<sub>1</sub>) を作製した。42°C, 15分間の熱誘導を含む培養により、GSH-I, GSH-IIの活性は、それぞれ、5.1, 36.0  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  蛋白/hまで上昇し、GSH生産能は親株の約80倍に上昇した。更に、lac-プロモーターより発現可能な gshI を2コピーと gshII を1コピー同時に組み込んだ溶原菌 1100 (s1pP<sub>1</sub>.lac.GSI<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>.lac.GSII<sub>1</sub>) を作製した。この溶原菌においては、IPTGの添加なしで、熱誘導のみによりGSH-I, GSH-IIの活性は、それぞれ、19.6, 45.1  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  蛋白/h、親株に比べて、それぞれ、220倍、110倍まで上昇し、親株より約320倍高いGSH生産能が得られた。

第4章は、アセテートカイネース遺伝子とフォスフォトランスアセチレース遺伝子のクローニングに関するものである。AKは、その反応平衡定数が大きくATP生成方向に偏っており、理論的には基質となるアセチルリン酸を安価に合成できるため、ATP再生系酵素として有効であると考えられている。AKをコードする遺伝子はいかなる生物種からも単離されていなかった。大腸菌 K-12 1100 株の染色体DNAをSau3A部分分解したものをEMBL4ベクターのBamHI部位に挿入し、約3,000個のブランクによ

る遺伝子ライブラリーを作製した。クローニングは、大腸菌において、染色体地図上 ackA の近傍にマップされており、既に塩基配列が決定されている purF を出発点としてジーン・ウォーキング法を用いて行なった。プラスミドを利用して発現を検討した結果、ackA は上流に存在するプロモーター領域より構成的に発現され、その生産量は菌体全蛋白の15%程度に相当する420~460 U/mg蛋白まで達することが明らかになった。塩基配列を解析した結果、AKはアミノ酸400個からなる分子量43,297の蛋白質であることが推定された。また、AKは、細胞内においてPTAとリンクして、酢酸の排出、アセチルCoAの形成など生体代謝機構においても重要な役割を果している。

PTAは、物質生産の面においてもアセチルCoA $\leftrightarrow$ CoAサイクリング系として、その応用が期待される酵素である。

PTAによる反応系を有効に利用し、細胞内におけるAKとPTAの機能を明確にするために、ptaのクローニングを行なった。大腸菌K-12 1100株の染色体DNAをSau3Aで部分分解したものを、pBR322BamHI部位に挿入し、ptaを欠失した変異株(大腸菌AM1000)を形質転換して、PTA活性が復帰している株を選択することにより行なった。

ptaの発現を検討した結果、外来プロモーターを利用することにより誘導的に発現され、その発現量は、親株の約150倍に相当する224U/mg蛋白に達することが明らかに

なった。

大腸菌染色体地図上、ackA と ptaは、近接してマップされている。本研究においてクローニングしたackA , ptaを含むDNA領域の制限酵素地図を比較検討した結果、ackAとptaは転写の向きは同じで ackA-ptaの順に存在することが明らかになった。そこで、両遺伝子を含むようにDNA断片を連結したプラスミドによる形質転換株における両酵素活性を測定した結果、AKとPTAの両酵素とも親株に比べて約40倍高く構成的に発現されていることが明らかになった。これらの結果は、ackAとptaがオペロンとして存在する可能性を強く示唆している。

更に、本研究において、ackAとptaは、クロモゾームDNA上purFと転写方向が逆向き、かつ13Kb下流に存在することが明らかになった。

第5章は、ATP再生系を増強したグルタチオン高生産菌の育種に関するものである。スリーパーベクターを利用して、GSH生合成系酵素遺伝子(gshI, gshII)とATP再生系酵素遺伝子(ackA)を同時に組み込んだ溶原菌1100(slp<sub>P1</sub> :: GSI<sub>2</sub> - P1 :: GSII<sub>1</sub> - AK<sub>1</sub>)を作製した。熱誘導を含む培養により、GSH-I, GSH-II, AKの酵素活性は、親株に比べてそれぞれ、150倍、180倍、100倍に増幅された。三種酵素遺伝子をそれぞれ単独に組み込んだ溶原菌に比べて、

いずれの酵素もその発現は何等劣ることがなかった。これらの酵素蛋白量は、それぞれ、菌体全蛋白の8~10%に相当する量であった。さらに、これら溶原菌を室温で6か月以上放置しても、その発現増幅能が低下することもなく、安定に遺伝子群は保持された。

また、AK, GSH-I, GSH-II の三種酵素高発現株 (1100 (slp<sub>P1</sub>, cGSI<sub>2-P1</sub>, cGSII<sub>1</sub>-AK<sub>1</sub>)) と GSH-I, GSH-II の二種酵素高発現株 (1100 (slp<sub>P1</sub>, cGSI<sub>2-P1</sub>, cGSII<sub>1</sub>)) を、熱誘導を含む培養後調整した粗酵素液 (1.6mg蛋白/250 $\mu$ l) を用いて GSH 生産能を検討した結果、37 $^{\circ}$ C, 30分, 添加 ATP 0.1 $\mu$ mol の時、それぞれ、4.7, 14.2 $\mu$ mol の GSH が生成された。更に、ATP 再生系としての AK を強化した三種酵素高発現株では、ATP $\leftrightarrow$ ADP の回転率が高まり低 ATP 濃度でも効率良い GSH 生産性が維持されることが明らかになった。即ち、GSH 生合成系に関与する酵素群と ATP 再生系酵素の三種酵素遺伝子群を同時に増幅発現することにより、GSH を高効率に高生産できることが明らかになった。

今後、本研究において実証した、スリーパーベクターの利用による複数酵素同時高発現システム、及び ATP 再生系と CoA $\leftrightarrow$ アセチル CoA サイクリング反応系を応用することにより、より広範な産業分野への展開が期待される。

## 謝 辞

終りに臨み、研究全般にわたり、御指導、御鞭撻を賜わった京都大学教授木村光先生に深く感謝致します。

本論文作製にあたり、御懇篤なる御指導を賜わった東京大学教授山崎真狩先生に深甚なる謝意を表します。

グルタチオン生合成に関する研究全般にわたり、御指導、御鞭撻を賜わった京都大学助教授村田幸作先生に深く感謝致します。

グルタチオン生合成に関して御助言を賜わった京都府立大学渡部邦彦先生、山ノ内製薬株式会社具嶋弘博士、株式会社興人美矢豊文氏に拝謝致します。

大腸菌における遺伝子組み換え技術全般にわたり、御指導、御助言を賜わった東京大学依田幸司先生に謹んで深謝致します。

グルタチオン生合成遺伝子群のスリーパーベクターにおける発現の研究は、京都大学木村光教授との共同研究であり、同研究室の方々には多大な御協力をいただいた。ここに謹んで深謝致します。

アセテートカイネース及びフォスフォトランスアセチレース遺伝子のクローニングの研究は、キッコーマン株式会社研究本部の大竹（旧姓山本）秀子氏との共同研究

であり、多大なる御協力をいただいた。ここに謹んで深謝致します。

キッコーマン株式会社常務取締役研究本部長杉山晋一博士、同取締役長澤道太郎博士、同取締役那須野精一博士、財団法人野田産業科学研究所理事長吉田文彦博士、同所長石井茂孝博士には、特別の御高配、御鞭撻をいただいた。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究は、キッコーマン株式会社研究本部中野衛一博士の直接の御指導のもとに行なわれたものであり、謹んで深謝致します。

キッコーマン株式会社研究本部の方々の御協力に心より感謝致します。

## 引用文献

- 1) de Rey-Pailhade (1888) *J.C.R.Acad.Sci.*, 107:43-44
- 2) Hopkins, F.G. (1921) *Biochem.J.*, 15:286-
- 3) Kosower, N.S., and Kosower, E.M. (1978) *Int.Rev.Cytol.*, 59:109-160
- 4) Tateishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A., and Sakamoto, Y. (1974) *J.Biochem.*, 75:93-103
- 5) Larsson, A., Orrenius, S., Holmgren, A., and Mannervik, B. (1983) in *Functions of Glutathione Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects*, Raven Press, New York.
- 6) 坂本幸哉 (1985) *グルタチオン* (木下祝郎、坂本幸哉 編), pp1-17, 講談社, 東京
- 7) 中川一夫, 池内真理, 次田陽子 (1986) *食衛誌*, 27:425-427
- 8) 磯和義員 (1982) *発酵と工業*, 40:631-637
- 9) Gushima, H., Miya, T., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *Agric. Biol.Chem.*, 47:1927-1928
- 10) Murata, K., Miya, T., Gushima, H., and Kimura, A. (1983) *Agric. Biol.Chem.*, 47:1381-1383
- 11) Gushima, H., Miya, T., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J. Appl. Biochem.*, 5:43-52
- 12) 美矢豊文, 木村光 (1988) *バイオインダストリアルマテリアル*, pp.53-67, 日経技術図書
- 13) Watanabe, K., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *Agric.Biol.Chem.*, 50:1925-1930
- 14) Gushima, H., Miya, T., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J. Appl. Biochem.*, 5:210-218
- 15) Watanabe, K., Yamano, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1984) *Nucl. Acids Res.*, 14:4393-4400
- 16) Gushima, H., Yasuda, S., Soeda, E., Yokota, M., Kondo, M., and Kimura, A. (1984) *Nucl. Acids Res.*, 12:9299-9307
- 17) Lehninger, A.L. (1971) *Bioenergetics*, 2ed., ed. Benjamin, W.A., New York
- 18) Murata, K., Tani, K., Kato, J., and Chibata, I. (1981) *Enzyme Microb. Technol.*, 3:233-243
- 19) Murata, K., Tani, K., Kato, J., and Chibata, I. (1980) *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10:11-21
- 20) Kornberg, A. (1957) in *Advances in Enzymology*, F.F.Nord, ed., 18:191- , Wiley-Interscience, New York

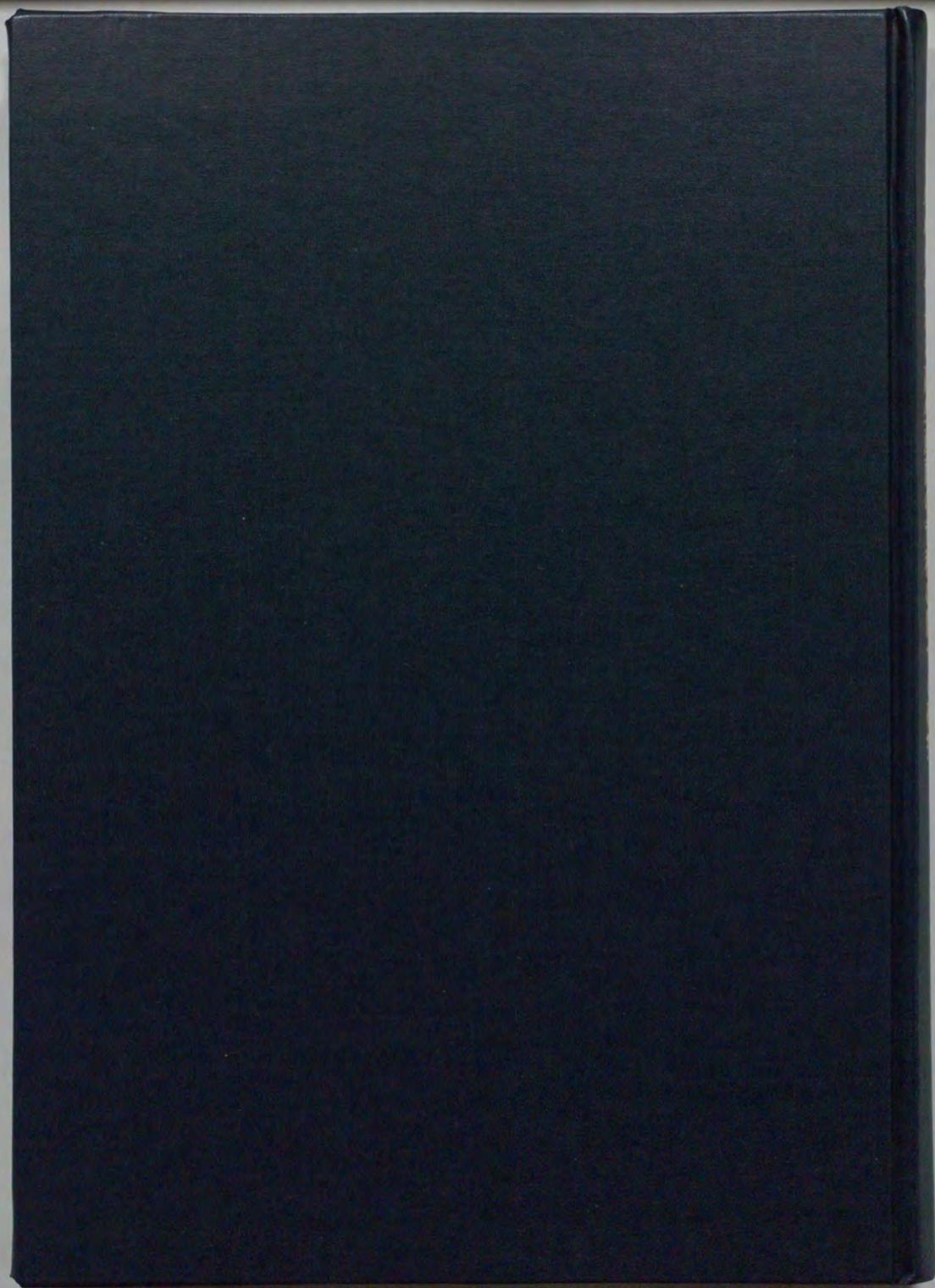
- 21) Dixon, M., and Webby, E.C. (1964) *Enzymes*, 2 ed, Academic Press, New York
- 22) Barman, T.E. (1969) *Enzyme Handbook*, 1 and 2, Springer Verlag, New York; also supplement 1 (1974)
- 23) Langer, R.S., Hamilton, B.K., Gardner, C.R., Archer, M.C., and Colton, C.K. (1976) *AIChE Journal*, 22:1079-1090
- 24) Stramond, J.G., Solomon, B.A., Colton, C.K., and Wang, D.I.C. (1977) *AIChE Symp. Ser.*, 74(No.172):1-7
- 25) Nakajima, H., Suzuki, K., and Imahori, K. (1978) *J. Biochem.*, 84:193-203
- 26) Kaplan, N.O., and Lipmann, F. (1948) *Fed. Proc.*, 7:163
- 27) Kleil-Kiss, G., and Hoffmann-Ostenhof, O. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, 67:168-170
- 28) Lipmann, F. (1944) *J. Biol. Chem.*, 155:55-70
- 29) Stadtman, E.R., and Barker, H.A. (1950) *J. Biol. Chem.*, 184:769-793
- 30) Brown, T.D.K., Jones-Mortimer, M.C., and Kornberg, H.L. (1977). *J. Gen. Microbiol.*, 102:327-336
- 31) Brown, T.D.K., Pereira, C.R.S., and Stormer, F.C. (1972) *J. Bacteriol.*, 112:1106-1111
- 32) Thauer, R.K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977) *Bacteriol. Rev.*, 41:100-180
- 33) Fox, D.K., and Roseman, S. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261:13487-13497
- 34) Fox, D.K., Meadow, N.D., and Roseman, S. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261:13498-13503
- 35) Gilvarg, C., and Davis, B.D. (1956) *J. Biol. Chem.*, 222:307-319
- 36) Rose, I.A., Grunberg-Manago, M., Korey, S.R., and Ochoa, S. (1954) *J. Biol. Chem.*, 211:737-756
- 37) Sanwal, B.D. (1970) *Bacteriol. Rev.*, 34:20-39
- 38) Hong, J.S., Hunt, A.G., Masters, P.S., and Lieberman, M.A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76:1213-1217
- 39) Masters, P.S., and Hong, J. (1981) *Biochemistry*, 20:4900-4904
- 40) Hunt, A.G., and Hong, J. (1983) *Biochemistry*, 22:844-850
- 41) Stadtman, E.R., Novelli, G.D., and Lipmann, F. (1951) *J. Biol. Chem.*, 191:365-376
- 42) Whiteley, H.R., and Pelroy, R.A. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247:1911-1917
- 43) Robinson, J.R., and Sangers, R.D. (1972) *J. Bacteriol.*, 112:465-473
- 44) Schramm, W., Klybas, V. and Racker, E. (1958) *J. Biol. Chem.*, 233:1283-1288
- 45) Bresters, T., Krul, J., Scheepers, R.C., and Veeger, C. (1972) *FEBS Lett.*, 92:305-309

- 46) Bothe, H., Falkenberg, B., and Nolteersting, V. (1974) Arch. Microbiol., 96:291-304
- 47) Kreuzberg, K., Umlauf, H., and Blaschkowski, H.P. (1985) Biochim. Biophys. Acta, 842:22-29
- 48) Suzuki, T. (1969) Biochim. Biophys. Acta, 191:559-569
- 49) Bachmann, B.J. (1983) Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 7. Microbiol. Rev., 47:180-230
- 50) Guest, J.R. (1979) J. Gen. Microbiol., 115:259-271.
- 51) Van Dyk, T.K., and LaRossa, R.A. (1987) Mol. Gen. Genet., 207:435-440
- 52) Chang, A.C.Y., and Cohen, S.N. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71:1030-1034
- 53) Murray, N.E., and Murray, K. (1974) Nature, 251:476-481
- 54) Thomas, M., Cameron, J.R., and Davis, R.W. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71:4579-4583
- 55) Rambach, A., and Tioliais, P. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71:3927-3930
- 56) Leder, P., Tiemerer, D., and Enquist, F. (1977) Science, 196:175-177
- 57) Panasenko, S.M., Cameron, J.R., Davis, R.W., and Lehman, I.R. (1977) Science, 196:188-189
- 58) Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.A., Crunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L., and Smith, O. (1977) Science, 196:161-169
- 59) Murray, N.E., Bruce, S.A., and Murray, K. (1979) J. Mol. Biol., 132:497-509
- 60) Adhya, S., Sen, A., and Mitra, S. (1971) The Bacteriophage Lambda (A.D. Hershey, ed.), pp. 743-746. Cold Spring Harbor Laboratories, New York.
- 61) Remaut, E., Stanssens, P., and Fiers, W. (1981) Gene, 15:81-93
- 62) Leplatot, P., and Danchin, A. (1983) Biochimie, 65:317-324
- 63) Young, R.A., and Davis, R.W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80:1194-1198
- 64) Howard, B.H., and Gottesman, M.E. (1983) In Experimental Manipulation of Gene Expression (ed. Inoue, M.), pp. 137-153, Academic Press, New York.
- 65) Nakano, E., and Masuda, T. (1982) Agric. Biol. Chem., 46:313-315
- 66) Roberts, J.W. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72:330-334
- 67) Sklar, J.L., Yot, P., and Weissman, S.M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72:1817-1821
- 68) Szybalski, E.H., and Szybalski, W. (1979) Gene, 7:217-270
- 69) Sussman, R., and Jacob, F. (1962) Compt. Rend. Acad. Sci., 254:1517-1520

- 70) Goldberg, A.R., and Howe, M. (1969) *Virology*, 38:200-202
- 71) Young, R., Way, J., Way, S., Yin, J., and Syvanen, M. (1979) *J.Mol. Biol.*, 132:307-322
- 72) Durwald, H., and Hoffmann-Berling, H. (1968) *J.Mol. Biol.*, 34:331-346
- 73) Borck, K., Beggs, J.D., Brammer, W.J., Hopkins, A.S., and Murray, N.E. (1976) *Mol.Gen.Genet.*, 146:199-
- 74) Murray, N.E., Brammer, W.J., and Murray, K. (1977) *Mol.Gen.Genet.*, 150:53-
- 75) Messing, J. (1979) *Recomb. DNA tech. Bull.*, 2(2):43
- 76) Hohn, B. (1979) in Wu, R. (Ed.), *Recombinant DNA, Methods in Enzymology*, vol 68. pp299-309., Academic Press, New York.
- 77) Herskowitz, I., and Signer, E.R. (1970) *J.Mol. Biol.* 47:545-556
- 78) Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A., and Murray, N.E. (1983) *J.Mol. Biol.*, 170:827-842
- 79) Vieira, J., and Messing, J. (1987) *Methods in Enzymology*, 153:3-
- 80) Bolivar, F., Rodeiguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., and Falkow, S. (1977) *Gene*, 2:95-113
- 81) Norrander, J., Kempe, T., and Messing, J. (1983) *Gene*, 26:101-106
- (82) Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H., and Roe, B.A. (1980) *J.Mol. Biol.*, 143:161-178.
- 83) 中野衛一: 蛋白質・核酸・酵素、(1987) 32:1133-1140
- 84) Murray, N.E., and Murray, K.: (1974) *Nature*, 251:476-481
- 85) Vieira, J., and Messing, J. (1982) *Gene* 19:259-
- 86) Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513-
- 87) Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981) *Anal. Biochem.*, 114:193-
- 88) Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawhorne, L. and Treiber, G. (1970) *Virology*, 40:734-
- 89) Blattner, F.R., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Slighton, J.L., Tucker, P.W., and Smithies, O. (1978) *Science*, 202:1279-1284
- 90) Hohn, B., and Murray, K. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:3529-
- 91) Lederberg, E.M., and Cohen, S.N. (1974) *J. Bacteriol.*, 119:1072-1074
- 92) Davis, R.W., Botstein, D. and Roth, L.R. (1980) In *Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.225-228
- 93) Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1980) *Meth. enzymol.* 65:499-560
- 94) 穴戸 和夫 (1981) 蛋白質・核酸・酵素 26:542-546
- 95) Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., and Chambon, P. (1981) *Anal. Biochem.*, 112:295-

- 96) Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) In Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- 97) Benton, W. D., and Davis, R. W. (1977) *Science*, 196:180-
- 98) Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98:503-
- 99) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-
- 100) Jackson, R. C. (1969) *Biochem. J.*, 111:309-315
- 101) Tietze, F. (1969) *Anal. Biochem.*, 27:502-522
- 102) Messenger, L. J., and Zalkin, H. (1979) *Nature*, 254:3382-3392
- 103) Shiio, I., and Ishii, K. (1969) *J. Biochem.*, 66:175-181
- 104) Thomas, T. D., Turner, K. W., and Crow, V. L. (1980) *J. Bacteriol.*, 144:672-682
- 105) Ochoa, S. (1955) *Methods in Enzymology* 1:685-694
- 106) 中野衛一 (1987) 蛋白質・核酸・酵素, 32:1133-1140
- 107) 木村 光 (1988) 化学と薬学の教室特集号 バイオテクノロジー pp.27-37, 広川書店
- 108) Watanabe, K., Yamano, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1986) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24:375-378
- 109) Hedgpeth, J., Goodman, H. M., and Boyer, H. W. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 3448-3452
- 110) Arber, W., and Kuhnlein, U. (1967) *Patol. Microbiol.*, 30:946-952
- 111) Murray, N. E., Manduca de Ritis, P., and Foster, L. A. (1973) *Mol. Gen. Genet.*, 120:261-281
- 112) Tso, J. V., Zalkin, H., van Cleemput, M., Yanofsky, C. and Smith, J. M. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257 :3525-3531.
- 113) Chinault, A. C. and Carbon, J. (1979) *Gene* 5:111-126
- 114) Saito, H. and Miura, K. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*. 72: 619-629
- 115) Bruni, C. B., Colantuoni, V., Sbordonc, L., Cortese, R. and Blasi, F. (1977) *J. Bacteriol.*, 130:4-10
- 116) Parker, J. (1982) *Mol. Gen. Genet.*, 187:405-409.
- 117) Arps, P. J., Marvel, C. C., Rubin, B. C., Tolan, D. A., Penhoet, E. E., and Winkler, M. E. (1985) *Nucleic Acids Res.*, 13:5297-5315.
- 118) Bognar, A. L., Osborne, C., and Shane, B. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262:12337-12343.
- 119) Nonet, M. L., Marvel, C. C., and Tolan, D. R. (1987). *J. Biol. Chem.*, 262:12209-12217.
- 120) Tso, J. Y., Zalkin, H., van Cleemput, M., Yanofsky, C., and Smith, J. M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:3532-3536.
- 121) Todhunter, J. A., and Purich, D. L. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60:273-280

- 122) Anthony, R.S. (1971) Ph.D. dissertation, The Rockefeller University  
123) Anthony, R.S., and Spector, L.B. (1970) J. Biol. Chem., 245:6739-6741  
124) Anthony, R.S., and Spector, L.B. (1972) J. Biol. Chem., 247:2120-2125  
125) Meadow, N.D., Kukuruzinska, M.A., and Roseman, S. (1985) in The  
Enzymes of Biological Membranes (Martonosi, A., ed) 2nd Ed.,  
pp. 523-559, Plenum Press, New York



inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### Kodak Color Control Patches

© Kodak 2007 TM Kodak



### Kodak Gray Scale



© Kodak 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

