

放線菌の A-ファクター制御カスケードを構成する主要因子群の解析

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻

平成15年度博士課程 進学

氏名 加藤 淳也

指導教員名 堀之内 末治

目次

第一部 序論

第一章 放線菌の特徴	1
第二章 研究の背景および目的	
第一節 微生物ホルモンによる形態分化および二次代謝の制御	3
第二節 A-ファクターによる制御機構	4
第三節 A-ファクターカスケードにおける AdpA レギュロン	6
第四節 本研究の目的および本論文の構成	8

第二部 本論

第一章 A-ファクターにより制御される分泌型プロテアーゼの解析

第一節 分泌型金属プロテアーゼをコードする *sgmA* の取得と解析

2.1.1-I 背景と目的	9
2.1.1-II 結果	13
2.1.1-III 討論	26
2.1.1-IV 材料および方法	28

第二節 分泌型トリプシン型プロテアーゼをコードする *sprT* と *sprU* の取得と解析

2.1.2-I 背景と目的	38
2.1.2-II 結果	39
2.1.2-III 討論	53
2.1.2-IV 材料および方法	55

第三節 プロテアーゼ阻害蛋白質 (SSI) をコードする *sgiA* の取得と解析

2.1.3-I 背景と目的	62
2.1.3a <i>S. coelicolor</i> A3(2)における SSI 遺伝子の解析	
2.1.3a-II 結果	63
2.1.3a-III 討論	70
2.1.3a-IV 材料と方法	71
2.1.3b <i>S. griseus</i> における SSI 遺伝子 <i>sgiA</i> の取得と解析	
2.1.3b-II 結果	74
2.1.3b-III 討論	82
2.1.3b-IV 材料と方法	84

第二章	ArpA の A-ファクター結合変異体の解析	
	ーカスケードの主要な役割を担う ArpA の標的遺伝子は <i>adpA</i> のみである	
2.2-I	背景および目的.....	86
2.2-II	結果.....	89
2.2-III	討論.....	97
2.2-IV	材料および方法.....	99
第三章	AdpA の自己転写抑制機構の解析	
2.3-I	背景および目的.....	102
2.3-II	結果.....	103
2.3-III	討論.....	120
2.3-IV	材料および方法.....	125
第三部	総括.....	130
参考文献	132
謝辞	143

第一部 序論

第一章 放線菌の特徴

放線菌はグラム陽性細菌であり、多くは土壌中に生息している。本研究で用いている *Streptomyces* 属は複雑な形態分化を行うこと、および多種多様な二次代謝産物を生産することが二大特徴である。単純な構造の多い原核生物でありながら、菌糸状に生育しその後胞子を着生する複雑な形態分化を示すのは発生生物学的にも非常に興味深く、基礎的見地から興味もたれる。また一方で、抗生物質をはじめとする様々な二次代謝産物を生産することは、醗酵工業や医薬産業などの応用的側面から興味を持たれる。現在利用されている抗生物質のうち 3 分の 2 以上が放線菌由来であることはその特徴の十分すぎる裏付けと言えるであろう。これらの特徴が放線菌を今日の基礎研究、応用研究の両面においてきわめて重要な菌群に位置づけている。

2002 年、*Streptomyces* 属の遺伝学的基準菌である *S. coelicolor* A3(2) の全ゲノム配列決定が報告された (Bentley *et al.*, 2002)。放線菌のゲノムサイズは約 8.7 Mb と巨大であり、コードされる遺伝子の数は約 8000 である。特徴として、20 を越える二次代謝産物生合成クラスターが含まれ、ECF サブファミリーに属するシグマ因子や二成分制御系などの外部環境に応答するための制御遺伝子が予想以上に多く含まれていたことが挙げられる。これらは変化の激しい土壌環境中で様々な二次代謝を行いながら真核生物のような複雑な形態分化を行うことを反映しているものと考えられる。また GC 含量が高く 70% を越えるのも特徴的である。染色体は直線状であり、両末端の欠失や環状化を生じる動的な構造を持つ (Lin *et al.*, 1993)。その後も、エバメクチン生産菌である *S. avermitilis* のゲノム解読終了も報告され (Ikeda *et al.*, 2003)、*Streptomyces* のゲノムデータベースは近年さらに充実しつつある。

本研究で扱う菌であり、ストレプトマイシン生産菌として知られる *Streptomyces griseus* の生活環を代表例として図 1.1-1 に示す。

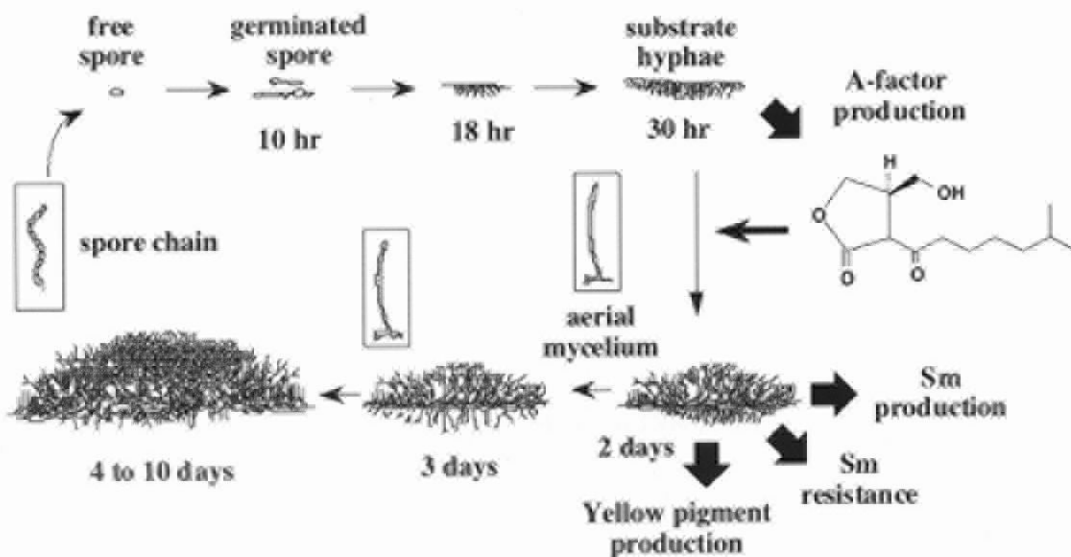


図 1.1-1 放線菌 *Streptomyces griseus* の生活環

胞子が発芽すると、まず枝分かれした基底菌糸を培地中に張り巡らし、栄養増殖を行う。基底菌糸では隔壁形成がほとんど起こらず、1本の菌糸には複数の染色体が存在する。次いで栄養状態の変化に応答して基底菌糸から気中菌糸が分化し、空中に向かって伸長する。このとき基底菌糸中の多くの細胞は死滅し、その構成成分は分解されて気中菌糸の成長に再利用されると考えられている (Wildermuth *et al.*, 1972; Mendez *et al.*, 1985; Miguelez *et al.*, 1999)。これは基底菌糸形成で使い果たされた栄養分を補うための、原核生物におけるアポトーシスとも表現される。基底菌糸にはグリコーゲンの蓄積が見られ、その後の分化に備えられており、その蓄積と代謝は形態分化の時期特異的に変動していることも報告されている (Schneider *et al.*, 2000)。気中菌糸形成後、気中菌糸には隔壁が形成され、染色体1つ1つが分配されたコンパートメントが胞子となり成熟し、数珠状に連なる。

また、気中菌糸への形態分化が誘導されるのとほぼ同じ時期に、ストレプトマイシン生産、黄色色素生産などの二次代謝が誘導される。この代謝の変化は劇的であり、形態分化 (morphological differentiation) に対して、生理的分化 (physiological differentiation) とも呼ばれるほどである。

これらの制御の特徴として挙げられるのは、形態分化および二次代謝は自身が生産する低分

子化合物 A-ファクター (2-isocapryloyl-(3R)-hydroxymethyl- γ -butyrolactone) により誘導されることである。*Streptomyces* 属において A-ファクター類似物質は広く存在し、二次代謝産物生産の調節に関与していることが明らかになっている (Nihira, 2002)。本研究において主に扱う、A-ファクターおよびその制御機構に関しては第二章で解説する。また、真核生物型セリン・スレオニンキナーゼによるリン酸化を介した制御も原核生物における新規の遺伝子発現制御様式として注目されている (Horinouchi, 2003)。

第二章 研究の背景および目的

第一節 微生物ホルモンによる形態分化および二次代謝の制御

Streptomyces 属における形態分化および二次代謝の制御での大きな特徴の1つは、微生物ホルモンによる制御機構の存在である。このホルモンは全て γ -ブチロラクトン骨格を有しており、またそれに対する受容体も高い相同性を持っている。このような制御機構は様々な *Streptomyces* 属で次々と報告されており (図 1.2-1)、グローバルに存在する機構であることが予想される。その例を簡単に列挙すると、本研究で用いている *S. griseus* のストレプトマイシン生産・黄色色素生産および形態分化 (Horinouchi and Beppu, 1994)、*S. virginiae* のバージニアマイシン生産 (Yamada *et al.*, 1987)、*S. coelicolor* A3(2)の色素系抗生物質生産 (Takano *et al.*, 2000)、*S. lavendulae* FRI-5 の核酸系抗生物質生産・青色色素生産・D-シクロセリン生産 (Hashimoto *et al.*, 1992) などが挙げられ、これらは全て γ -ブチロラクトン化合物による制御を受けている。

以上で述べたように、このような機構は主に二次代謝を制御しており、本研究で材料としている *S. griseus* の微生物ホルモン、A-ファクターは形態分化をも制御している点で興味深い。A-ファクターについてこれまでわかっている知見については次節で詳しく述べる。

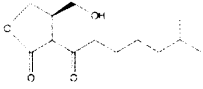

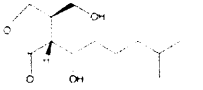
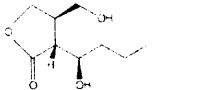
gamma-butyrolactones	producer	receptor	biological activity
A-factor 	<i>S. griseus</i>	ArpA	Streptomycin Melanin Grixazone Sporulation
SCB1 	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	ScbR	Actinorhodin Undecylprodigiosin
VB-A 	<i>S. virginiae</i>	BarA	Virginiamycin
IM-2 	<i>S. lavendulae</i>	FarA	Showdomycin Minimycin

図 1.2-1 放線菌における γ -ブチロラクトン化合物による制御の例

第二節 A-ファクターによる制御機構

前節で述べたとおり、*Streptomyces* 属では γ -ブチロラクトン化合物を生産することが知られている。*S. griseus* において形態分化および二次代謝を誘導する A-ファクター (2-isocapryloyl-(3R)-hydroxymethyl- γ -butyrolactone, 図 1.2-1) はその代表例であり、*S. griseus* のストレプトマイシン生産および気中菌糸形成を誘導する化合物として、1967 年に旧ソビエトの Khokhlov らにより発見された (Khokhlov *et al.*, 1967)。しかしロシア語の学術誌に発表されたこともあり、長い間注目されていなかった。一方、醗酵学研究室の原らは *S. griseus* のストレプトマイシン非生産株を利用して、抗生物質生産能・抗生物質耐性能・気中菌糸形成能・色素生産能等の多形質が同時に脱落する現象について解析するうち、ストレプトマイシン非生産株のあるものは A-ファクター欠損株であることを見出し、A-ファクターを再発見するに至った (Hara and Beppu, 1982)。さらに原らは、A-ファクターがストレプトマイシン生産及び胞子形成のみでなく、ストレプトマイシン耐性、黄色色素生産等も誘導することを見出した。彼らはバイオアッセイによる A-ファクター定量法を構築し、A-ファクターが 1 nM という極微量でこれらの性質を誘導すること、及び *Streptomyces* 属において幅広く生産されていることを明らかにした。

A-ファクター生合成に関しては、醗酵学研究室の堀之内らがストレプトマイシン生産能の回復を指標に A-ファクター非生産株 HH1 を宿主にしたショットガンクローニングを行い、A-ファクター生産能を回復させる遺伝子 *afsA* を取得した (Horinouchi *et al.*, 1984)。HH1 株では *afsA*

が欠損していること、野生株に *afsA* を高コピーで導入すると A-ファクター生産が増加すること (Ando *et al.*, 1997a)、及び、*afsA* を導入した大腸菌が A-ファクター活性を示す物質を生産すること (Ando *et al.*, 1997b) から、*afsA* は A-ファクター生合成遺伝子であると予想されている。また、*afsA* は *S. griseus* の直線上染色体の末端から約 150 kb に位置していることが明らかになり、HHI の形質は高温培養によって *afsA* を含む染色体末端の脱落によって生じることが示された (Lezhava *et al.*, 1997)。

A-ファクターは 10^9 M という極微量で様々な形質変化を引き起こすことから、特異的な受容体蛋白質の存在が予想された。三宅らは^[3H]でラベルした A-ファクターを用いて A-ファクターに特異的に結合する蛋白質を同定し (Miyake *et al.*, 1989)、ArpA (A-factor receptor protein) と名付けた。1 ゲノムあたりの分子数は約 40 個と計算され、A-ファクターと ArpA の解離定数は 0.7 nM と算出、A-ファクターの有効濃度 10^9 M とよく符合した。また、蛋白質と基質との結合解析法を用いて、A-ファクターが ArpA と 1 : 1 で結合することが示された。ArpA の基質特異性は非常に厳密であり、A-ファクターと構造がよく似たバージニアブタノライド VB-C とは結合しない (Sugiyama *et al.*, 1998)。

HHI 株の変異処理によって取得された *S. griseus* の変異株 (KM 株) は A-ファクター非生産株であるにも関わらず、ストレプトマイシン生産能及び形態分化能を回復しており、その細胞質画分には^[3H]ラベル A-ファクターへの結合活性が検出されないこと、また KM 株から偶然に得たストレプトマイシン生産、孢子形成の自然復帰株では ArpA の機能が回復していることから、ArpA は二次代謝及び形態分化開始のリプレッサーとして働き、A-ファクターは ArpA に結合することでその抑制を解除することが示唆された (Miyake *et al.*, 1990)。KM 株はリプレッサーの機能を失った ArpA の変異株であった。

尾仲らは^[3H]ラベル A-ファクターへの結合活性を指標に ArpA を精製した (Onaka *et al.*, 1995)。N 末端及び内部アミノ酸配列を決定し、定法により *arpA* 遺伝子をクローニングした。塩基配列を決定した結果、ArpA は N 末端側にヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) モチーフを有し、TetR ファミリーに属する DNA 結合タンパクであることが示唆された。大腸菌で発現・精製した ArpA は A-ファクター結合能を有しており、ゲル濾過分析により A-ファクターが結合した ArpA は二量体を形成していることが確認された。

また、尾仲らは ArpA が結合する DNA 配列の *in vitro* での解析により ArpA 結合コンセンサス配列を明らかにした (Onaka and Horinouchi, 1997)。この配列は片側半分が 5'-GG(T/C)CGGT(A/T)(T/C)G(T/G)-3' からなる 22 bp のパリンδροーム構造である。さらにこの解析によって取得した ArpA 結合 DNA を用い、A-ファクター添加によって ArpA が DNA から速やかに解離することを示した。

一方、ドイツの W. Pipersburg らはストレプトマイシン生合成遺伝子クラスターのクローニン

グを行い、クラスター内にストレプトマイシン生合成開始の制御遺伝子 *strR* と、自己耐性遺伝子 *aphD* が存在し、StrR 蛋白はこの遺伝子クラスターの複数の部位に結合して周辺の遺伝子の転写を活性化することを明らかにした (Retzlaff *et al.*, 1995)。

醗酵学研究室の Vujaklija らは、ストレプトマイシン耐性を指標にしてストレプトマイシン生合成遺伝子クラスターの一部をクローニングし、そこに含まれる遺伝子のうち *strR* のプロモーターのみが A-ファクター依存性を示すことを明らかにした (Vujaklija *et al.*, 1991)。また、その下流に位置する *aphD* は *strR* のプロモーターから共に転写されていることが推測された。彼女らは *strR* プロモーター領域内の A-ファクター依存性に必要な領域を特定し、この領域に A-ファクター依存的に結合する蛋白が存在することを見出し、AdpA (A-factor dependent protein A) と名付けた (Vujaklija *et al.*, 1993)。*strR* プロモーター上流には AdpA 以外に複数の蛋白質が A-ファクター非依存的に結合することが示されているが、これらの蛋白質の正体と機能は今のところ不明である。

以上のように、A-ファクターはその受容体 ArpA を経て AdpA などの発現を制御し、ストレプトマイシン生産やその他の二次代謝、そして形態分化を制御していることが明らかになった。

第三節 A-ファクターカスケードにおける AdpA レギュロン

「A-ファクターシグナルがどのようにして二次代謝を引き起こすのか？」この問いを解決すべく、AdpA の解析が行われた。醗酵学研究室の大西らは *strR* 上流の AdpA 結合領域への DNA 結合活性を指標として AdpA を精製し、N 末のアミノ酸配列を決定の後、定法により *adpA* 遺伝子をクローニングした (Ohnishi *et al.*, 1999)。AdpA は中央のやや C 末端寄りに HTH の DNA 結合モチーフをもつ 405 アミノ酸からなる蛋白質であり、AraC/XylS ファミリーと相同性をもつ転写因子であった。

次に *adpA* の機能を調べるため、*adpA* 遺伝子破壊株が作製された。この株は予想通りストレプトマイシン生産能を失っており、*strR* の転写も確認されないことから、AdpA が *strR* の転写を活性化していることが強く示唆された。驚いたことに *adpA* 遺伝子破壊株は黄色色素生産能や気中菌糸形成能をも失っており、AdpA がストレプトマイシン生産以外の二次代謝や形態分化の制御も行っていることが示唆された。また、*adpA* が A-ファクター依存的に転写されることを確認し、転写開始点が翻訳開始点の 263 bp 上流の C であることを明らかにした。これに基づいてプロモーター解析を行うと、ArpA 結合コンセンサス配列が存在していた。実際、この領域を含む DNA 断片と大腸菌より精製した ArpA を用いてゲルシフトアッセイを行うと、ArpA との結合が確認された。この結合は A-ファクター添加によって解除されることを示し、ArpA

が *adpA* を直接制御していることが明らかになった。

以上の結果から、*S. griseus* における A-ファクターによるストレプトマイシン生産誘導機構が明らかになった。培養初期には ArpA は *adpA* のプロモーターに結合して *adpA* の転写を抑制しているが、菌の生育が進んで A-ファクターがある一定の濃度に達すると A-ファクターはその特異的レセプターである ArpA に結合し、ArpA を DNA から解離させ *adpA* 遺伝子の転写を促進する。これにより発現誘導された AdpA は、ストレプトマイシン生合成遺伝子群の制御遺伝子 *strR* のプロモーター上流に結合し、*strR* 及びストレプトマイシン耐性を賦与する遺伝子 *aphD* の転写を活性化しストレプトマイシン生産に至るといものである (図 1.2-2)。

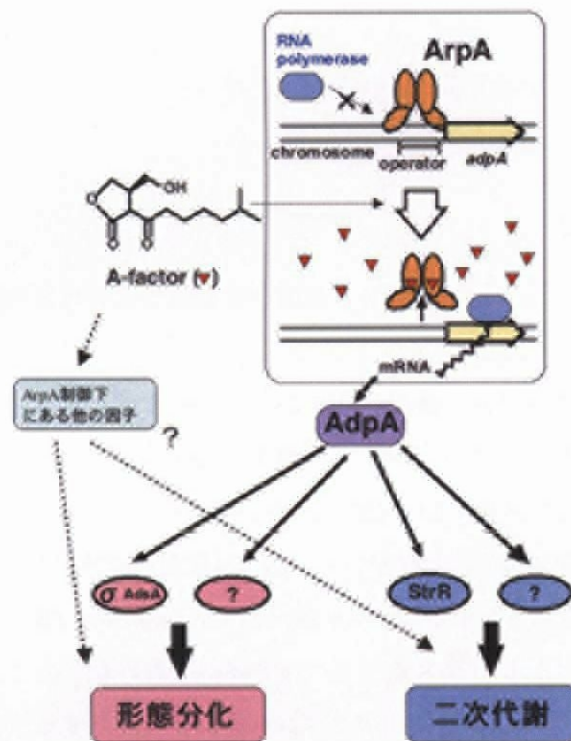


図 1.2-2 A-ファクターカスケード

*本研究開始当時のもの

しかし一方で *adpA* 遺伝子破壊株の解析から示されたように、AdpA の標的遺伝子はその他の二次代謝や形態分化に関与する遺伝子群も含まれることが示唆され、AdpA は A-ファクターシグナルカスケードの分岐点となる転写因子であると考えられた。そこで、山崎らはゲルシフト PCR 法 (Horinouchi *et al.*, 2000) を用いてゲノムライブラリーより AdpA に結合する DNA 断片を取得した。この断片の解析を進めることにより AdpA 依存的に転写が活性化される遺伝子、*adsA* を同定した (Yamazaki *et al.*, 2000)。*adsA* はシグマ因子をコードする遺伝子であり、この遺伝子破壊株は形態分化能を失う。このことから、当初の予想通り AdpA は二次代謝および形

態分化に関与する遺伝子の転写活性化を行うことが明らかとなり、さらに本研究を含むその後の解析で AdpA の標的遺伝子が次々と同定されている (Ohnishi *et al.*, 2005)。現在では、上記の *strR*、*adsA*、本研究での *sgmA*、*srpT*、*sprU* の他に、分泌型キモトリプシン型プロテアーゼをコードする *sprA*、*sprB*、*sprD* (Tomono *et al.*, 2005)、気中菌糸形成に必須の二成分制御系レスポンスレギュレーターをコードする *amfR* (Yamazaki *et al.*, 2003b)、胞子隔壁形成に必須の酸性蛋白質をコードする *ssgA* (Yamazaki *et al.*, 2003a) が AdpA の標的遺伝子として同定されている。このようにして、A-ファクターカスケードにおける「AdpA レギュロン」の全貌が徐々に解明されつつある。また現在では、AdpA の結合コンセンサス配列が決定され (Yamazaki *et al.*, 2004)、結合様式についても推定されている (第二部の中でふれる)。転写活性化の機構は、ダイマーを形成した AdpA が RNA ポリメラーゼをリクルートし、DNA との開鎖複合体形成を助けることで転写活性化を行うということが示されているものの、結合部位の位置・数との関連等、詳細は明らかになっていない。

第四節 本研究の目的および本論文の構成

第三節で述べたように AdpA は様々な二次代謝や形態分化の形質を制御している。本研究の開始時にはストレプトマイシン生合成制御遺伝子である *strR* と形態分化に関与するシグマ因子をコードする遺伝子 *adsA* の 2 つが AdpA の標的遺伝子として同定され、解析されていた。しかし、AdpA 依存的な黄色色素生産に関わる遺伝子は取得されておらず、また *adpA* 遺伝子破壊株の形態分化を失った形質は *adsA* のみでは相補できなかったことから、AdpA の標的遺伝子はまだ他にも複数あることが予想された。A-ファクターカスケードによる制御の解明にはこれらの取得とその機能解析が必須であり、AdpA による転写活性化機構についても大部分が謎であったので、その解明にも標的遺伝子群の解析は重要な情報をもたらすと考えられた。

本研究は AdpA の新規標的遺伝子の同定とその機能解析を目的としてスタートしており、それをきっかけとして AdpA により制御される分泌プロテアーゼおよびプロテアーゼ阻害蛋白質に注目して、その制御と機能に関して研究を行った。これについては第二部の本論第一章で述べている。さらに、これまで曖昧な点が残されていた A-ファクター受容体 ArpA の解析を詳細に行い、それを利用してカスケード内における AdpA の重要性をより強く示す研究を行った。これについては第二章で述べている。第三章ではカスケードの中心にある転写因子 AdpA の発現制御について新しい機構を見いだした研究について述べる。以上を通じ、本研究は A-ファクター制御カスケードの主要な構成因子がどのように制御しあい、機能しているかを明らかにしようとしたものである。

第二部 本論

第一章 A-ファクターにより制御される分泌型プロテアーゼの解析

第一節 分泌型金属プロテアーゼをコードする *sgmA* の取得と解析

2.1.1-I 背景と目的

新たな AdpA 標的遺伝子の探索

本研究開始時、AdpA の標的遺伝子としては、ストレプトマイシン生合成遺伝子群の制御因子である *strR*、および形態分化に必須のシグマ因子をコードする *adsA* が同定されていたのみであった。一方、*adsA* を標的遺伝子として取得する際に行ったゲルシフト PCR 法では、*adsA* 上流領域以外にも多数の AdpA 結合断片が取得されていた。醗酵学研究室の山崎、鈴木らはゲルシフト PCR 法によって取得したこれらの断片 (pUC ベクターにクローン化し、大腸菌のコロニーとして取得していた) についてコロニーハイブリダイゼーションを行い、同じ配列のクローンを除いた。さらに AdpA は転写活性化因子であるため ORF の上流に結合すると予想し、結合断片の塩基配列解読および ORF 解析により ORF 上流付近以外のものを除いた。当時、*S. griseus* のゲノム解析は進んでいなかったため、断片の DNA 配列以外の情報は得ることができなかった。私はここまで得られた断片の約半数 (12 断片) について引き続き解析を行い、AdpA の新たな標的遺伝子の探索を行った。この断片群の解析から AdpA の新たな標的遺伝子として *sgmA* を同定し、解析を行ったことについてこの節では述べる。

以下に、ゲルシフト PCR 法の原理について説明を記しておく。

今回用いたのは、以前 ArpA 結合配列を取得する際に用いた手法を山崎が一部改良し、AdpA が結合する DNA 断片を *in vitro* にてゲノムライブラリーから取得することに成功したものである (図 2.1.1-1)。まず、*S. griseus* のクロモソームを *HaeIII* により部分分解した 300~500 bp の断片に PCR 用のリンカーを付加したものと、C 末にヒスチジンタグを付加して大腸菌から精製した AdpA (AdpA-H) とを反応させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことで AdpA が結合した DNA をフリーの DNA と分離して抽出する。さらにこれを PCR で増幅するという一連の操作を 3~4 回繰り返すことにより、AdpA に特異的に結合する DNA 断片を濃縮する。以上の操作により得られた断片をリンカー部分に設計した *EcoRI* サイトを用いて pUC19 ベクターにクローニングする。これがゲルシフト PCR 法の原理である。表 2.1.1-1 にゲルシフト PCR 法により得られた AdpA 結合断片のまとめを示す。

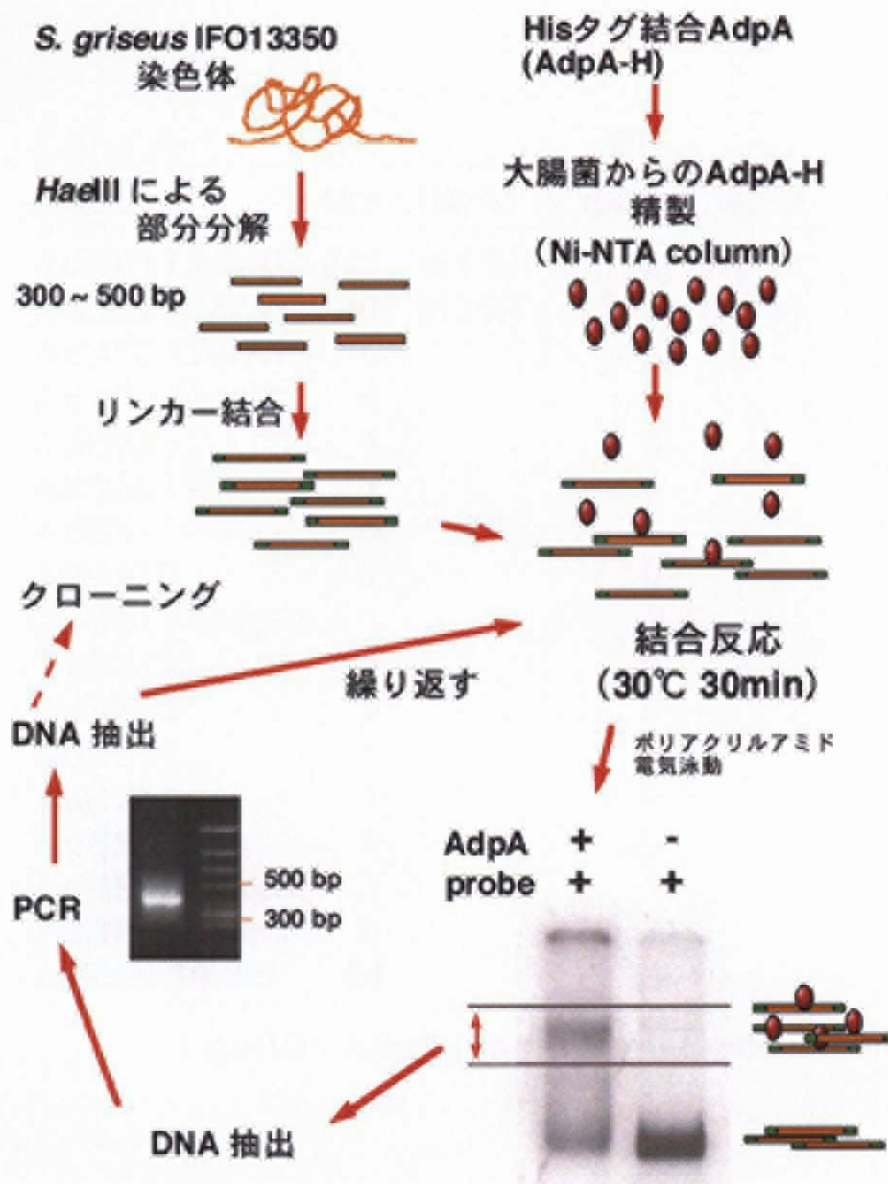


図 2.1.1-1 グルシフト PCR 法の原理

サイクル	3rd	4th
計	402 (100%)	1585 (100%)
AdBS1 (<i>adsA</i>)	243 (61%)	1172 (74%)
AdBS2 (<i>2orf1</i>)	68 (17%)	319 (20%)
AdBS3 (<i>3orf1</i>)	0	4
AdBS4 (<i>4orf1</i>)	4	9
AdBS5	1	3
AdBS6	7	5
AdBS7	0	1
AdBS10	2	0
AdBS11 (<i>ssgA</i>)	1	2
AdBS12	4	0
AdBS13	2	8
AdBS14	1	1
AdBS15	1	0
AdBS16	2	0
AdBS17 (<i>mreB</i>)	1	1
AdBS18 (<i>sgmA</i>)	0	1
AdBSs 19~60	64	61

(AdBS : AdpA-binding sequence)

表 2.1.1-1 ゲルシフト PCR 法により得られた AdpA 結合断片のまとめ

ゲルシフト PCR 法により得られた断片を AdBS (AdpA-Binding Sequences) と名付けている。括弧内に遺伝子名が記載してあるものについては AdpA 標的遺伝子の候補として解析が進んだものである。ゲルシフト PCR 法の繰り返しのサイクル数、および取得された各々の断片の数を示した。

AdpA により転写制御される分泌プロテアーゼ

分泌プロテアーゼは一般に環境中の栄養を分解し取り込むために生産されると考えられるが、この章では AdpA により転写制御される分泌プロテアーゼについて中心に述べるので、AdpA が制御する二次代謝と形態分化の面からその意義を考察しておく。*S. griseus* ではその培養上清がプロナーゼという、混合プロテアーゼ剤として商品化されていることから、非常に多くの分泌プロテアーゼを持っている。したがって、AdpA により制御されているものとして、単に二次代謝産物の一種のようなものであるとも考えられる。また、プロテアーゼを含む様々な加水分解酵素のうちの、何らかの酵素のプロセッシングを行うプロテアーゼとも考えられる。一方、*Streptomyces* におけるプロテアーゼの役割を考えるとき非常に興味深いのは、形態分化の際の菌糸の分解である。放線菌は生育環境に適応するため、多くの細胞外加水分解酵素を生産し、ポリサッカライド、蛋白質、核酸、脂肪等の高分子を分解し、栄養源として利用する。基底菌糸での生育時には細胞外の基質を栄養源として利用するが、(1) 栄養飢餓により気中菌糸形成が始まると、基底菌糸の分解が起こること、(2) 気中菌糸へ分化するあいだ乾燥重量の増加が見られないこと、(3) 基底菌糸中の蛋白をラベルするとラベルが基底菌糸から気中菌糸へ移動することから、気中菌糸形成時には基底菌糸を分解して栄養源としていると考えられる (Mendez *et al.*, 1985)。このことにより、基底菌糸形成で近隣の栄養を使い果たしてしまっても気中菌糸形成、孢子形成で栄養が不足することなくスムーズに形態分化をすすめることができる。また、序論で述べたグリコーゲンの蓄積の例 (Schneider *et al.*, 2000) にも見られるように、分化に向けて栄養を基底菌糸としてストックしている、と見ることもできる。さらにこれを裏付けるものとして、自身を分解するようなプロテアーゼやヌクレアーゼの活性が形態分化の時期特異的に上昇すること (Fernandez and Sanchez, 2002; Kim and Lee, 1996)、プロテアーゼ阻害剤やヌクレアーゼ阻害剤により形態分化が阻害されること (Kim and Hong, 2000) も報告されている。したがって、AdpA による制御との関連を考える上で、プロテアーゼは二次代謝産物そのものであるとかプロセス酵素であるなど以外にも、形態分化との関わりが注目される場所である。

2.1.1-II 結果

ゲルシフト PCR 法により取得した断片と AdpA の特異的結合の確認および

S1 マッピング法による AdpA 依存的転写の解析

ここではゲルシフト PCR 法によって得た断片群 (12 断片) をさらに解析・スクリーニングすることによって *sgmA* を取得した経緯を簡単に述べる。ゲルシフト PCR 法で得た断片は *in vitro* での AdpA 結合を指標に取得したものであるが、ゲルシフトアッセイにてシフトバンドを切り出すという方法であったため、実際は結合しない断片も混入してくる。そこでゲルシフトアッセイ法を 12 断片それぞれについて再度行うことにより、AdpA との特異的結合を確認した。その結果、1 つを除いては AdpA との特異的な結合を確認することができた。

以上の候補 (11 断片) について、近隣に位置する ORF の転写量を S1 マッピング法により比較し、AdpA 依存的な転写がみられるかどうかを調べた。具体的には、野生株と *adpA* 遺伝子破壊株との比較により、*adpA* 遺伝子破壊株において顕著に転写量が減少しているものを選別した。また、S1 マッピング法のプライマー設計に必要な周辺の塩基配列が不十分であった断片については定法 (サザンハイブリダイゼーションおよびコロニーハイブリダイゼーション) により周辺をクローニングし、塩基配列を決定して解析に用いた。

以上のスクリーニングにより表 2.1.1-1 の AdBS17 および AdBS18 の配列近傍に位置する *mreB* および *sgmA* を標的遺伝子候補として取得した。これらの遺伝子は AdpA 依存的な転写を示し、かつ遺伝子上流に AdpA が結合した。*sgmA* の解析については以下に述べていく。*mreB* については解析を進めたものの、解析の結果 AdpA の直接の標的遺伝子ではないことが分かったので本論文では詳しく述べず、討論で述べるにとどめる。

AdBS18 周辺の塩基配列解析

AdBS18 周辺の遺伝子を調べるため、AdBS18 をプローブとして定法により周辺約 6.0 kb の DNA 断片を取得し、塩基配列を決定した。その結果、図 2.1.1-2 のような塩基配列・遺伝子構成であることがわかり、AdBS18 は分泌型金属プロテアーゼをコードする遺伝子上流の DNA 配列であることがわかった。このプロテアーゼの 234 番目のグリシンから 567 番目のグリシンまでのアミノ酸配列は、*S. griseus* K-1 株より取得され、全アミノ酸配列の決定および酵素の性質が調べられている SGMPII (*Streptomyces griseus metalloendopeptidase II*) (Kojima et al., 1998) と 100% 一致していた。つまり、この遺伝子が転写・翻訳された蛋白質がプロセッシングを受け成熟型になったプロテアーゼが SGMPII そのものであると考えられる。そこで取得したこの遺伝子を *sgmA* (*Streptomyces griseus metalloendopeptidase A*) と命名した。*sgmA* の周囲には *orf1* (putative mono-oxygenase)、*orf2* (hypothetical protein)、*orf4* (putative secreted protein) が存在し

ていた (いずれも *S. coelicolor* A3 (2) の蛋白質との相同性)。

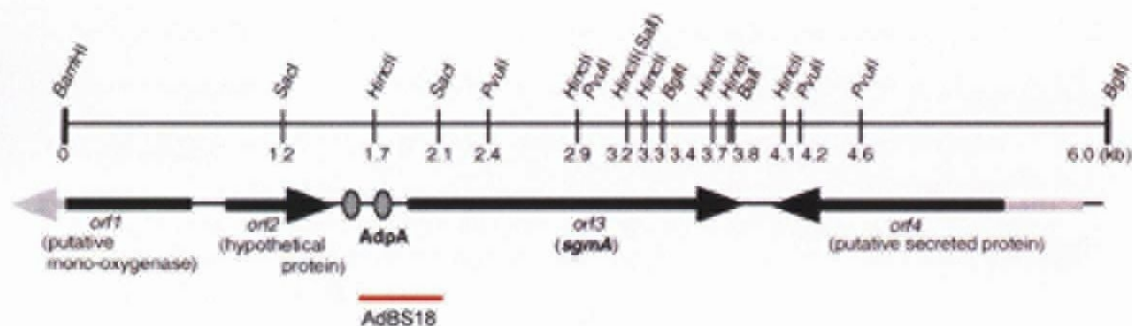


図 2.1.1-2 AdBS18 周辺の塩基配列と遺伝子構成

塩基配列を決定した AdBS18 周辺の制限酵素部位と ORF 構成 (Ishikawa and Hotta, 1999 の Frame Plot プログラムによる) を示した。AdpA の結合位置 (後述) も示した。

SgmA は 681 アミノ酸であり、成熟型となる配列の他に、分泌の際や、活性体への構造変化の際に必要であると考えられる pre、pro 領域が存在した (図 2.1.1-3)。N 末に pre-pro、C 末に pro 領域がそれぞれ存在しており、N 末 pre と pro の境界 (30 番目のアラニンと 31 番目のアラニンの間) については Web 上の PSORT プログラムを用いた予測である。N 末 pre 領域については、アルギニンが数個続いた後に疎水性領域、特にアラニン、プロリンの繰り返しが続くという、*S. pilicatus* のエンドグルカナーゼ (Robbins *et al.*, 1984) や *Streptomyces sp.* のセルラーゼ (Nakai *et al.*, 1988) のシグナル配列と似ていた。SgmA はこのタイプと同様なシグナルペプチドを有しているものと考えられる。したがって、N 末 pre 領域は分泌に必要なシグナルペプチドであり、N 末 pro 領域や C 末 pro 領域は分泌後にプロセッシングを受けるものと考えている。

sgmA の S1 マッピング法による転写解析

AdpA の結合が *sgmA* の転写制御に関与するかどうか調べるために S1 マッピング法により転写量を比較した (図 2.1.1-4)。野生株、*adpA* 破壊株、HH1 株の 3 株より RNA を抽出し、*sgmA* の転写量の比較を行った。その結果、野生株では 1 日目から転写が見られ、3 日目に特に多くなるのに比べ、*adpA* 破壊株では転写がなくなり (少なくとも S1 マッピング法では全く検出されなかった)、*sgmA* が AdpA によって転写活性化されていることを示唆していた。AdpA 過剰発現株では *sgmA* の転写量が増加していたことも AdpA による制御を示唆していた。また、HH1 株では野生株よりも転写量が多くなっていた。*adpA* の制御下であるならば HH1 株においても転写はなくなるはずであるが、これは予想に反した結果であった。

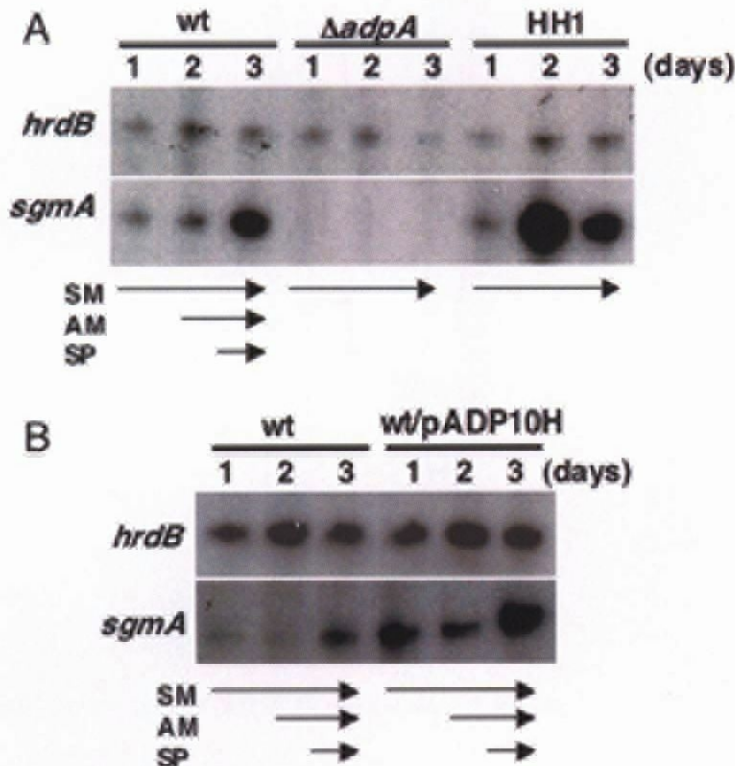


図 2.1.1-4 S1 マッピング法による *sgmA* の転写解析

YMPD 固体培地上で 28°C においてそれぞれの時間培養した菌体より RNA を抽出した。*hrdB* は恒常的に発現するシグマ因子であり、RNA 量のコントロールである。(A)野生株 (wt) と *adpA* 遺伝子破壊株 ($\Delta adpA$)、A-ファクター欠損株 (HH1) の比較。(B)野生株と AdpA 過剰発現株 (wt/pADP10H) の比較。SM: 基底菌糸、AM: 気中菌糸、SP: 胞子。

以上より、HH1 株における転写解析の結果以外は AdpA による転写制御を示唆するものであった。HH1 株は染色体末端の欠失により生じた変異株であるので、A-ファクター欠損だけでな

く、その他の様々な遺伝子の欠損による影響もみられる可能性が十分あり得る。したがって、HHI 株による結果については後ほど検討することとし、さらに以後の解析を行った。

次に、*sgmA* のプロモーター領域の解析に必須である転写開始点の決定を高解像度の S1 マッピング法を用いて行った (図 2.1.1-5)。転写開始点は開始コドンの 74 bp 上流であった。また、プロモーターの-10 および-35 領域は主要シグマ因子により認識される配列と相同性があり、スペーサーも一般的な 16 bp であった (Brown *et al.*, 1992; Strohl, 1992)。図 2.1.1-3 にプロモーター周辺の塩基配列を示してある。



図 2.1.1-5 高解像度 S1 マッピング法による *sgmA* の転写開始点決定

転写開始点の位置は図 2.1.1-3 の中で示してある。

DNase I フットプリンティング法を用いた AdpA 結合部位の決定

AdpA と AdBS18 との結合をゲルシフトアッセイ法により調べた結果を図 2.1.1-6 に示す。また、*sgmA* の上流領域の AdpA 結合部位が AdBS18 の領域以外にもあるかを同様にして調べた。その結果上流にもう 1 か所 AdpA の結合部位があることが判明し、*sgmA* の上流には 2 か所の AdpA 結合部位があることがわかった。

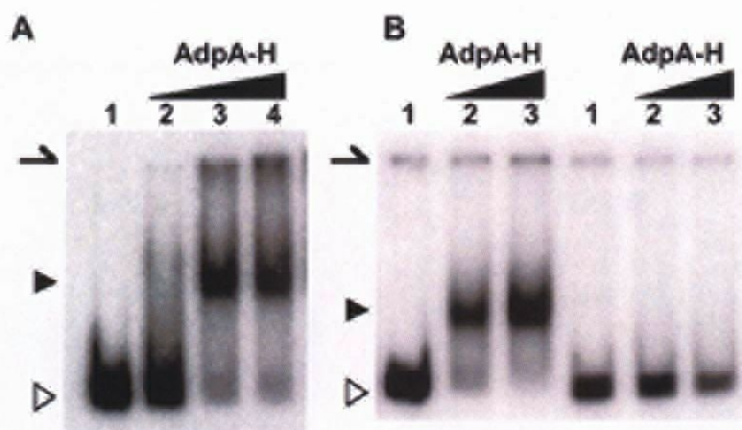


図 2.1.1-6 ゲルシフトアッセイによる AdBS18 および周辺領域への AdpA 結合解析

(A) AdBS18 (-249~+192 の領域) への結合。加えた AdpA (AdpA-H, His タグつき AdpA) の量は、レーン 1: 0 μg 、レーン 2: 0.02 μg 、レーン 3: 0.2 μg 、レーン 4: 0.4 μg 。矢印はウェル、▼はシフトバンド、▽はプローブの位置を示す。(B)左は AdBS18 の上流領域 (-741~209)、右は下流領域 (+135~+641) への結合。加えた AdpA の量は、レーン 1: 0 μg 、レーン 2: 0.2 μg 、レーン 3: 0.4 μg 。

これらの部位を正確に決定することを目的として、DNase I フットプリント法を行った (図 2.1.1-7)。まず、DNase I フットプリント法を行う前に、それぞれの結合領域に関し、長さ、位置を変えたプローブを作製し、AdpA との結合をゲルシフトアッセイ法により調べることで、結合領域を絞り込んだ。そして絞り込んだ領域について DNase I フットプリント法を行い、2つの結合部位を決定した。その結果、*sgmA* の転写開始点を+1 として、AdpA 結合部位は-73~-49 (センス鎖: -73~-52、アンチセンス鎖: -49~-71) および-273~-242 (センス鎖: -271~-246、アンチセンス鎖: -242~-273) であった。以下では、これらの部位をそれぞれ A-site、B-site と表記する。塩基配列は図 2.1.1-3 の中で示した。DNA に蛋白質が結合すると DNA の構造がゆがみ、結果露出した部位が DNase I に対する感受性が高くなる。この部位をハイパーセンシティブサイトと呼ぶが、*sgmA* 上流では-64、-65 と-68、-69 (A-site) および-260 (B-site) に見られた。後に決定された AdpA 結合コンセンサス配列 (Yamazaki *et al.*, 2004) もそれぞれの部位に1つずつ見いだされた (図 2.1.1-3)。AdpA 結合コンセンサス配列は 5'-TGGCSNGWWY-3' (S: G または C, W: A または T, Y: T または C, N: A, C, G, T いずれでも) である。また、結合部位を正確に決定した後に再度、結合部位に近接した領域に結合部位がないことをゲルシフトアッセイ法で確認した。

A-site は-35 および-10 のプロモーター領域に近接しており、転写活性化因子として一般的な

結合位置であった。一方、B-site についてはプロモーター領域よりかなり離れた位置にあり、その役割と A-site との関係に興味を持たれた。

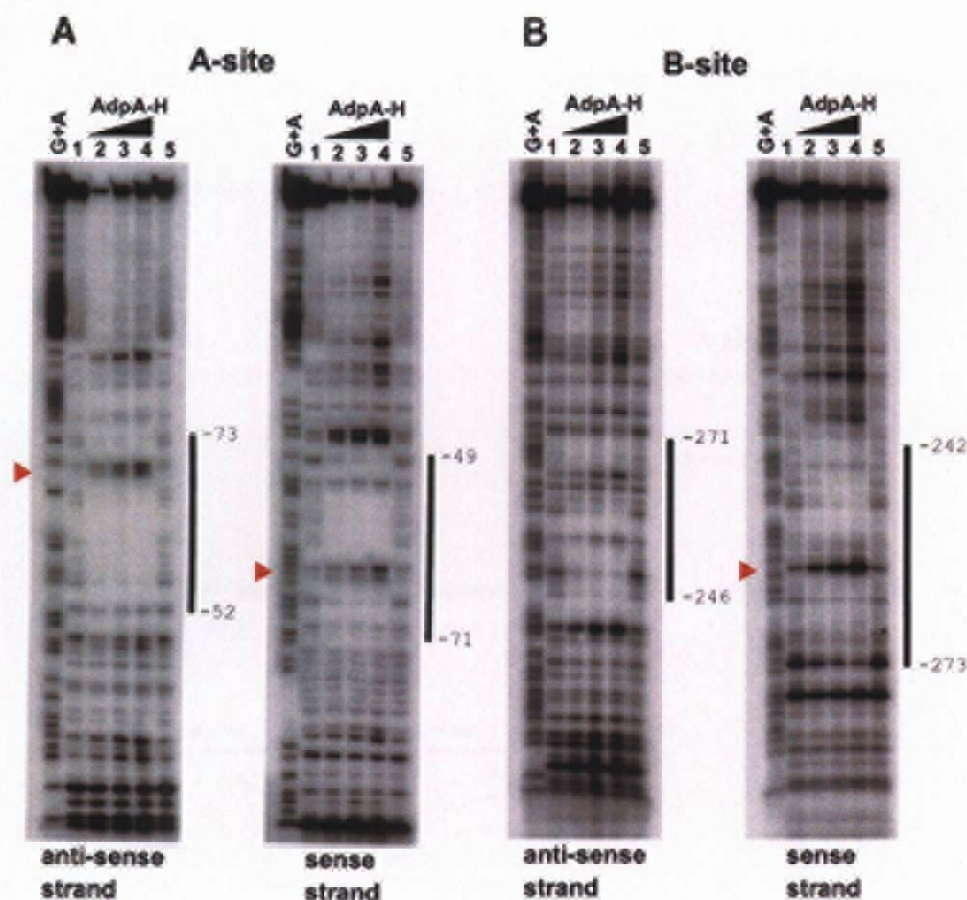


図 2.1.1-7 DNase I フットプリント法による *sgmA* 上流の AdpA 結合部位の決定

A、B はそれぞれ A-site、B-site を表す。加えた AdpA の量は、レーン 1 および 5 : 0 μ g、レーン 2 : 0.2 μ g、レーン 3 : 0.4 μ g、レーン 4 : 0.8 μ g。▼はハイパーセンシティブサイトを示す。

AdpA 結合部位への変異導入による転写への影響

これまでの結果から、AdpA は *sgmA* の上流 2 カ所に結合することにより *sgmA* の転写を活性化していることが示唆された。しかし、これら 2 カ所の結合のそれぞれの役割の解析、また、そもそもこれらの結合が *sgmA* の転写活性化を直接制御しているのかについての証明はなされていない。そこで、これらの結合部位に変異を導入して AdpA が結合しない配列に置換し、*sgmA* の転写に与える影響を調べた。

変異導入については、当時 AdpA の結合コンセンサス配列が決定されてはいなかったもの、それまでの AdpA 結合配列の検討から AT リッチである領域が多いことが傾向としてわかって

いたので、そのような部位を選び変異を導入した (図 2.1.1-8)。変異導入は 6 塩基を制限酵素部位に置換することで行った。変異導入後、AdpA と結合しなくなったことをゲルシフトアッセイ法により確認した (図 2.1.1-9)。また、結合の確認の際には、A-site、B-site をそれぞれ中心に位置する同じ長さのプロープ (図 2.1.1-9(A)) および同時にこれらの領域を含むプロープ (図 2.1.1-9(B)) を用いて AdpA とのアフィニティの比較も行ったが、顕著な差はみられなかった。もし AdpA と結合部位とのアフィニティに A-site と B-site で差があるならば、それらの役割を考える上で有益な情報となると考えたからである。

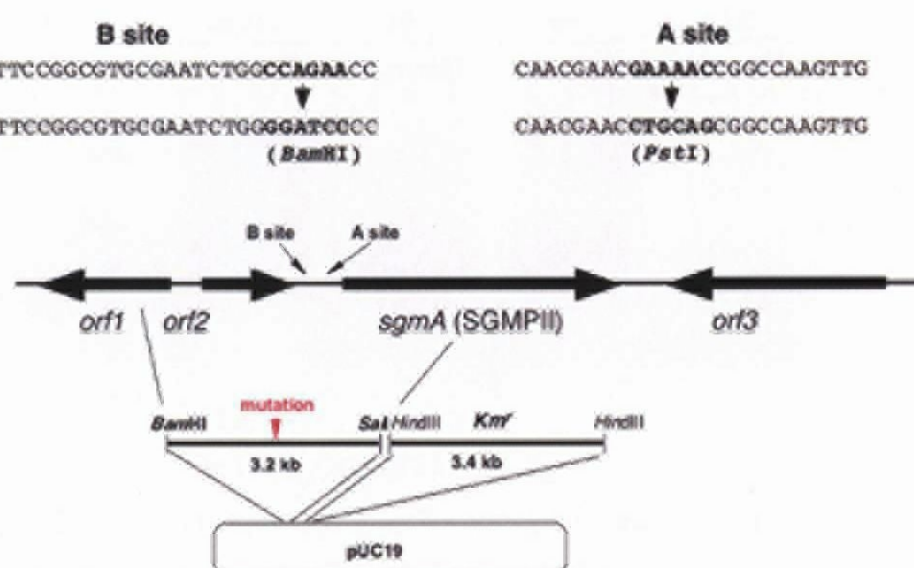


図 2.1.1-8 *sgmA* 上流の AdpA 結合部位への変異導入

上に A-site および B-site の配列、変異導入後の配列を示した。下のプラスミドは 2 回組み換えによる染色体への変異導入用プラスミド (後述) である。

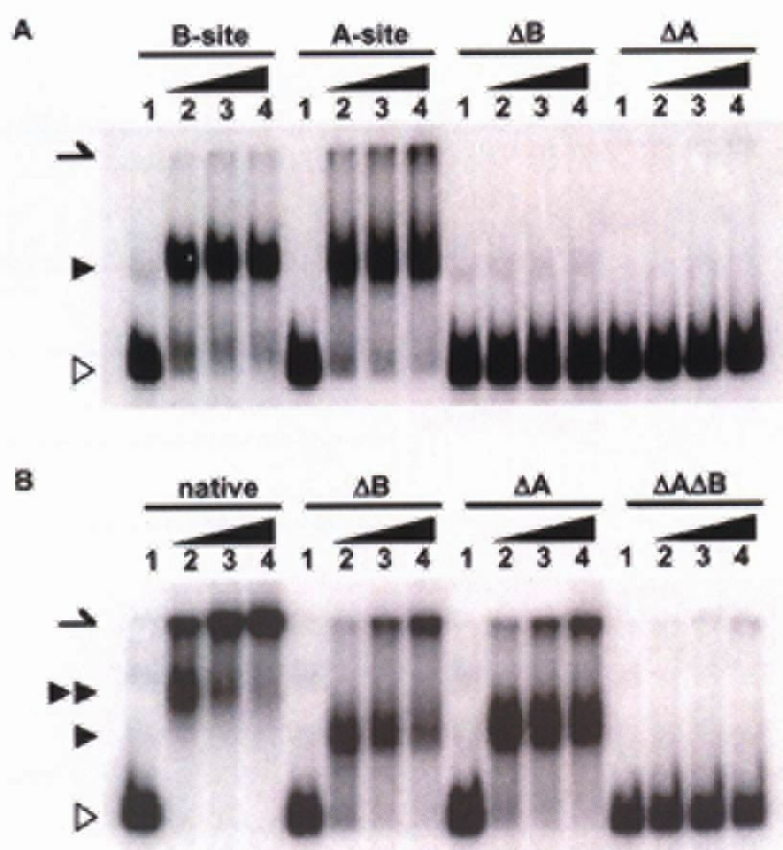


図 2.1.1-9 ゲルシフトアッセイによる変異導入による AdpA 結合確認

(A) B-site を含む-399~-100 の領域、および A-site を含む-228~+56 の領域をプローブとして用いた。(B) A-site と B-site 両方を含む-378~+75 の領域をプローブとして用いた。どちらの場合も加えた AdpA 量は、レーン 1 : 0 μ g、レーン 2 : 0.2 μ g、レーン 3 : 0.4 μ g、レーン 4 : 0.8 μ g。矢印はウェル、▼1 つは AdpA が 1 つ結合したシフトバンド、▼2 つは AdpA が 2 つ結合したシフトバンド、▽はプローブの位置を示す。いずれの場合でも A-site と B-site のアフィニティの違いを示すような結果は得られなかった。

変異導入の転写への影響を調べる際には、まず MDH を用いたプロモータープローブアッセイを行った (図 2.1.1-10)。これはプロモーターを MDH (malate dehydrogenase) をコードする遺伝子上流につなぎ、プロモーター活性を MDH 活性で評価する系である (Kieser *et al.*, 2000; Nishiyama *et al.*, 1986)。しかし、コントロールとした変異を導入していないプロモーターでも活性が検出されず、系がよく機能しなかった。他の AdpA 標的プロモーターである *strR* を用いた場合は問題なく系が機能することは確認したので、*sgmA* プロモーター自体がこの系との相性が悪いと考えられる。

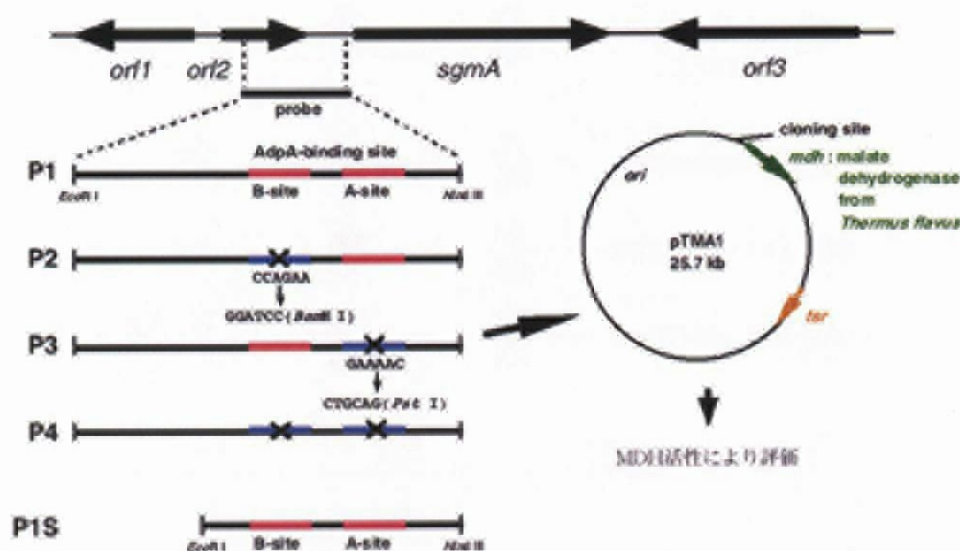


図 2.1.1-10 MDH を用いたプロモータープローブアッセイ用プラスミドの構築

sgmA のプロモーター領域を含む断片を pTMA1 の *mdh* 上流にあるクローニングサイトに導入した。P1 および P1S (P1 を短くしたもの) は野生型、P2~P4 は変異導入型のプローブである。

このような実際の試みと同時に、*Streptomyces* では安定性、精度の高いプロモーターアッセイ系が確立していないため、プロモータープローブアッセイは用いず、変異を直接染色体に導入し、*sgmA* の転写量を調べることにした。変異導入用プラスミド (図 2.1.1-8) を用い、2 回組み換えによるインフレーム欠失による遺伝子破壊の要領 (Ohnishi *et al.*, 1999) を応用して染色体に AdpA 結合部位への変異を導入した株を作製した。これらの変異株の作製後、RNA を抽出し、S1 マッピング法により転写量の比較を行った (図 2.1.1-11)。その結果、野生株と比べ、B-site への変異では 3 日目の転写量の顕著な増加がみられなくなった。さらに、A-site のみ、および A-site と B-site の両方に変異を導入した株においては転写が検出されず、*adpA* 破壊株と同様の結果が得られた。

以上のことから、AdpA は *sgmA* 上流領域に結合することによって直接 *sgmA* を転写活性化することが証明された。また、A-site への AdpA の結合は転写活性化に必須であり、B-site への AdpA の結合は 3 日目に転写量を増幅させるために必要であることが明らかとなった。

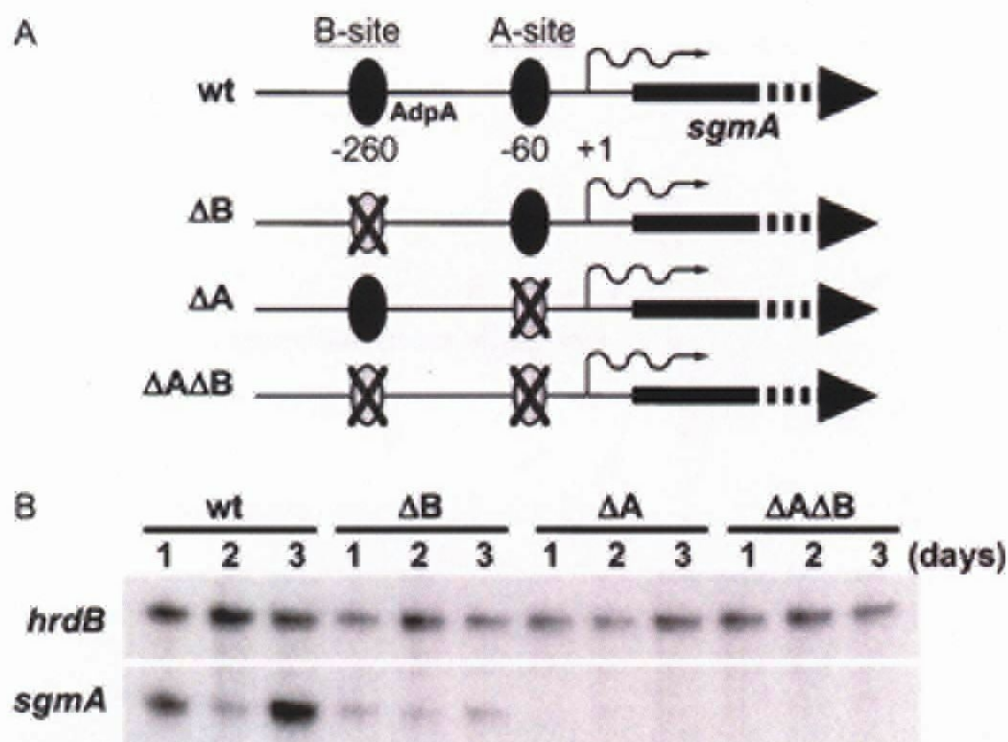


図 2.1.1-11 AdpA 結合部位への変異導入が *sgmA* の転写に及ぼす影響

(A)各変異株の変異導入領域の概略図(B)S1 マッピング法による各変異株における *sgmA* の転写量の比較。図 2.1.1-4 と同様にして行った。

sgmA 遺伝子破壊および過剰発現による機能解析

sgmA の AdpA による制御についてここまで述べてきたが、AdpA は二次代謝および形態分化の形質を同時に制御する転写因子であるので、その標的遺伝子は二次代謝や形態分化に関与する機能を持っている可能性が高い。*sgmA* は分泌型金属プロテアーゼをコードする遺伝子であるが、機能としては二次代謝として発現していることや、形態分化を補助する役割をしていることなどが考えられる。これらを検証するため、*sgmA* 遺伝子の破壊および過剰発現を行った。

遺伝子破壊については相同組み換えによりカナマイシン耐性遺伝子を *sgmA* 領域と置き換えることにより行った。これにより *sgmA* は上流領域をわずかに残すのみであり、*sgmA* の機能が完全に失われた株が得られた (図 2.1.1-12)。*sgmA* 遺伝子破壊株の形質について、二次代謝および形態分化について野生株と比較した。二次代謝については、*Streptomyces griseus* の代表的二次代謝産物であり、A-ファクターによりその生産が制御されているストレプトマイシンおよび黄色色素について比較したが、いずれについても野生株との差はみられなかった。一方、形態分化について比較すると、形態分化の開始時期に約半日の遅れがみられた (図 2.1.1-13)。ま

た、*sgmA* を低コピーベクターpKU209 にて破壊株に導入すると、ベクターのみを導入した株と比較して約半日開始時期が早まった。以上のことから、SgmA は形態分化に何らかの形で関与していることが示唆された。

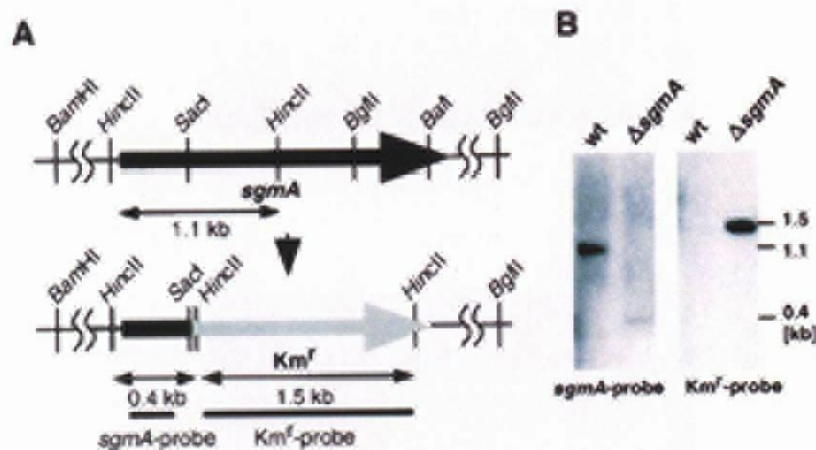


図 2.1.1-12 *sgmA* 遺伝子破壊株の作製

(A)遺伝子破壊のスキーム。サザンブロットによる確認に用いたプローブの位置も示した。(B)サザンブロットによる遺伝子破壊の確認。

材料と方法の項も参照。

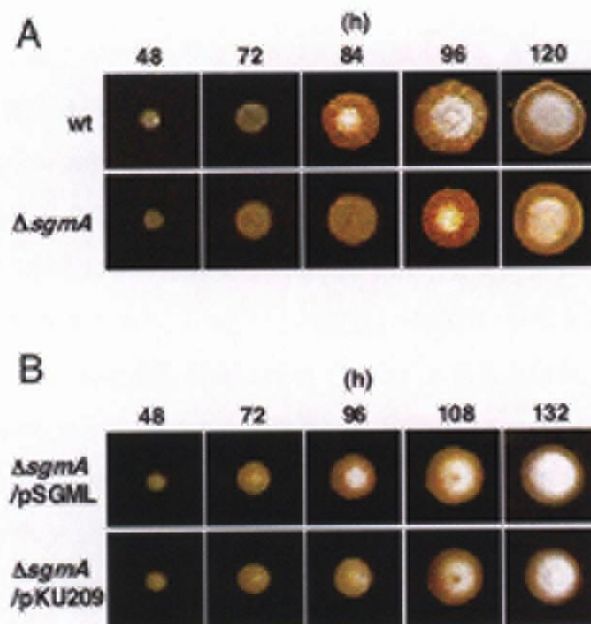


図 2.1.1-13 *sgmA* 遺伝子破壊株の形質

(A)野生株 (wt) と *sgmA* 遺伝子破壊株 (Δ *sgmA*) の比較。胞子液を YMPD 固体培地に植菌し、シングルコロニーの形態を時間を追って撮影した。肌色部分は基底菌糸、白色部分は気中菌糸である。(B) *sgmA* 遺伝子破壊株に低コピーベクターで *sgmA* を相補した株 (Δ *sgmA*/pSGML) とベクターのみを導入した株 (Δ *sgmA*/pKU209) の比較。

また、高コピーベクター pIJ702 を用いて *sgmA* を野生株に導入することにより SgmA 過剰発現株を作製し (図 2.1.1-14)、形態分化に影響があるかどうかを調べたが明らかな差はみられなかった。

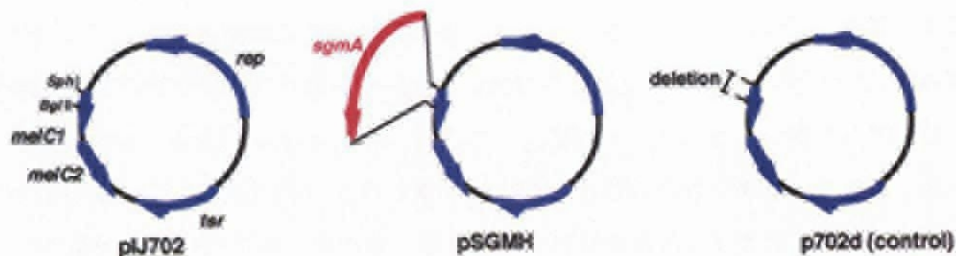


図 2.1.1-14 SgmA 過剰発現用プラスミドの構築

pIJ702:元のベクター、pSGMH: pIJ702 の *melC1* 上流に *sgmA* を組み込んだもの、p702d: *melC1* 上流を欠失させたもの (コントロール)。pIJ702 そのものは MelC1 の発現により生育に影響を及ぼすのでコントロールとして *melC1* を欠失させた pIJ702d を作製した。

2.1.1-III 討論

ゲルシフト PCR 法を用いてゲノムライブラリーから取得した AdpA 結合断片 AdBS18 の解析から、AdpA の新たな標的遺伝子 *sgmA* を同定し、その AdpA による転写活性化機構についての知見、および標的遺伝子の機能についての知見を得ることができた。

まず、*sgmA* の AdpA による転写活性化についてであるが、AdpA 結合部位への変異導入解析から、*sgmA* は AdpA の結合により直接転写活性化されることを証明した。これは AdpA の標的遺伝子の解析では初めての例である。一方で、AdBS17 の近傍に位置する *mreB* については同様の解析により AdpA により直接的な制御は受けていないと結論を得た。本論文で詳細は述べていないが、同じくゲルシフト PCR 法によって取得した AdBS17 は *mreB* の上流に位置しており、AdpA は AdBS17 に結合しかつ *mreB* は AdpA 依存的な転写を示していた。さらに、この結合部位を DNase I フットプリント法により決定し、*sgmA* と同様に染色体上の AdpA 結合部位に変異を導入した株を作製した。しかしながら、この変異株の *mreB* の転写パターンを調べたところ、AdpA による制御とは無関係であることを示す結果であった。*mreB* は原核生物におけるアクチンをコードする遺伝子であることが明らかにされており (Jones *et al.*, 2001; van den Ent *et al.*, 2001)、さらに AdpA 依存的な転写を示すことで形態分化への関与が非常に期待されたが、逆に否定する結果を得てしまい、残念であった。しかし、AdpA 標的遺伝子上流に AdpA が結合する位置と転写活性化への関係に関する知見が少なかった当時としては、重要な実験であったと同時にこのような知見の蓄積に寄与できたことは大きいだろう。現在では、直接の転写活性化を証明された標的遺伝子に関してはプロモーターのすぐ上流に 1 カ所、*sgmA* における A-site と同様な AdpA 結合部位を持ち、活性化を受けるのに必須な役割を持っていることが明らかになりつつある。*mreB* は転写開始点よりもかなり下流 (+107~+142) に AdpA 結合部位を持っていた。

また、*sgmA* の上流には AdpA が 2 カ所結合するが、A-site は転写活性化に必須であり、B-site は生育後期にさらに転写を増幅させるのに必要であることを示した。しかし、序論でも述べたように AdpA による転写活性化機構については RNA ポリメラーゼをリクルートし、DNA との開鎖複合体形成を助けることが示されているのみで、複数結合部位を持つ場合に如何に協調的に転写活性化に働いているかについてのメカニズムはいまだに不明である。ただし、生育後期の B-site での活性化については、今のところもう一つ時期特異的な転写因子の存在を予想している。すなわち、B-site 周辺には抑制因子が結合し、AdpA の結合を押さえているが、生育後期になるとそれが外れて AdpA が結合、転写活性の増幅を促す、というモデルである。これについては、HH1 株での転写解析の結果からも同じことがいえる。HH1 株では A-ファクター欠損であるために *sgmA* の転写がみられないはずであるのに対し、逆に顕著な増加がみられた。HH1

株においては仮定している転写抑制因子も欠失していると考えられるのである。HHI 株では AdpA の発現がほとんどないものの、完全になくなっているわけではないため、この仮定した抑制因子がなければ強く活性化が起こると考えれば説明がつく。sgmA の転写制御については少なくとも AdpA だけではない他の因子も関わった、複雑な制御がなされていると考えられる。実際、sgmA 上流領域をプローブとして用い菌体粗抽出液でゲルシフトアッセイを行うと、時期特異的に発現する蛋白質との結合が確認された (data not shown)。この因子についての詳細な解析はまだ行っていないが、AdpA により制御される遺伝子、特にプロテアーゼについては同様の制御機構が共通に存在することも考えられ、興味深い。また、sgmA の後に同定・解析された AdpA 標的の分泌プロテアーゼ遺伝子である、sprT および sprU (次の節で述べる) や、sprA および sprB (Tomono *et al.*, 2005) に関しても同様の複雑な制御が考えられている。

SgmA の機能については、遺伝子破壊で形態分化の時期に影響がみられたことから、形態分化への関与が明らかになった。sgmA 遺伝子破壊は形態分化の完全な欠損とはならなかったので SgmA は形態分化の補助的な役割を行っていると考えられる。形態分化との関係上、ペプチド性のシグナル分子のプロセッシングも考えられるが、もしそうであればより強い形質が現れると考えられる。補助的役割が考えられる点でやはり自身の基底菌糸分解との関係が考えられる。しかし実際 SgmA が直接菌糸分解を担っているのかについてはこれから解析を要するところであり、また SGMPHII でプロナーゼ中での活性が微弱であったとの報告 (Tsuyuki *et al.*, 1991) があること、また液体培養中ではあるが SgmA の酵素活性を測定したところ活性が非常に微弱であったこと (data not shown) からすると、直接ではなく他の加水分解酵素のプロセッシングのような間接的な働きを介している可能性もある。これらについては他の加水分解酵素と形態分化との関わりの詳細が明らかになってくれば、それらとの関係や機能の比較などの情報から解明へのアプローチができるのではないかと考えている。

2.1.1-IV 材料および方法

以下に記述した材料および方法は本研究の大部分を通じて使用しているため、最初の本章で詳しく記載した。

菌株及び培地組成

[菌株]

- ・ *E. coli* JM109 : 大腸菌を用いた実験のうち、DNA を扱う実験について特に記載がない場合は全てこの菌株を用いた。
- ・ *E. coli* BL21 (DE3) : pET ベクターによる蛋白質大量発現用宿主
- ・ *E. coli* JM110 : *dam*, *dcm* メチラーゼ遺伝子変異株。*E. coli* JM109 で構築したプラスミド及び遺伝子を放線菌に形質転換する前に、*E. coli* JM110 を宿主として大量調製し、メチラーゼによる大腸菌型の修飾を外した。
- ・ *Streptomyces griseus* IFO13350 : 醗酵学研究室で使用している *S. griseus* の野生株
- ・ *Streptomyces griseus* HH1 株 : *S. griseus* IFO13350 を高温培養することにより得た変異株。A-ファクター生産能を欠失しており、ストレプトマイシン生産能、孢子形成能、黄色色素生産能を失っている。外部からの A-ファクター添加により形質は回復する。
- ・ *Streptomyces griseus* $\Delta adpA$: *adpA* 遺伝子破壊株。ストレプトマイシン生産能、気中菌糸形成能、黄色色素生産能を失っている。
- ・ *Streptomyces griseus* wt/pADP10H : プラスミド pADP10H (Ohnishi *et al.*, 1999) を *S. griseus* IFO13350 に導入した、AdpA 過剰発現株。
- ・ *Bacillus subtilis* (孢子) : ストレプトマイシン生産能解析用

[培地]

大腸菌培養用

・ 2×YT

1.6% bacto tryptone, 1.0% bacto yeast extract, 0.5% NaCl

・ LB (Luria-Bertani) broth

1.0% bacto tryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1.0% NaCl

プレートの時は 2.2% agar powder を添加

Streptomyces griseus 培養用

・ YMPD : 通常培養用

0.2% meat extract, 0.2% yeast extract, 0.4% bacto peptone, 0.5% NaCl, 0.2% MgSO₄·7H₂O, 1.0% glucose, pH 7.0~7.2

液体培地の時は終濃度 0.5%の glycine を添加、プレートの時は 2.2% agar powder を添加

・ R2YE+Asn : プロトプラスト再生培地 (500 ml)

51.5 g Sucrose, 0.125 g K₂SO₄, 5.06 g MgCl₂·6H₂O, 5.0 g glucose, 0.05 g Difco casaminoacids, 1 ml Trace element solution, 2.5 g yeast extract, 2.865 g TES, 1.5 g L-asparagine monohydrate, 11 g agar powder

5 ml 0.5% KH₂PO₄, 2 ml 5M CaCl₂·2H₂O, 3.5 ml 1N NaOH

・ Trace element solution (1 L)

40 mg ZnCl₂, 200 mg FeCl₃·6H₂O, 10 mg CuCl₂·2H₂O, 10 mg MnCl₂·4H₂O, 10 mg Na₂B₄O₇·10H₂O, 10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O

・ SNA (soft nutrient agar) : Sm 生産能解析用重層培地

0.8% nutrient broth, 0.35% agar noble

・ Bennett (グルコース無添加) プレート : Sm 生産能解析用

0.1% meat extract, 0.1% yeast extract, NZ amine type A, pH 7.0~7.2,

2.2% agar powder

・ SMM-PO₄ プレート (SMM : Standard Minimal Medium) :

黄色色素生産能解析用リン酸欠乏最小培地

50 mM glucose, 60 mM L-asparagine monohydrate, 15 mM (NH₄)₂SO₄,

20 mM Trizma base, 17 mM NaCl, 3 mM K₂SO₄, 0.8 mM MgSO₄·7H₂O,

0.7 mM CaCl₂·2H₂O, 10 ml/l Trace element solution, KH₂PO₄ 0.25 mM

2.2% agar powder

DNA の調製・クローニング・塩基配列の決定など

以下に示す実験手法以外の、日常的に行われる実験手法については定法 (Ausubel *et al.*, 1987) によった。

ゲルシフトアッセイによる AdpA 結合解析

(1) AdpA-H の発現および精製

pET26adpA (C 末に His-タグを付加した AdpA を大腸菌で大量生産させるための発現ベクター) を保持した *E. coli* BL21 (DE3) を薬剤入り (終濃度 50 µg/ml Ampicillin Sodium or Kanamycin Sulfate) の 2 ml 2×YT 培地に植菌して 37°C で 7~12 時間の前培養後、薬剤入り 10 ml LB broth に 0.5% 植菌し、30°C で約 15 時間振とう培養した。菌体を集菌し、適量の Lysis buffer (50 mM KH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol) に懸濁して超音波破碎を行い、4°C 15,000 rpm で 30 分遠心して可溶性画分と不溶性画分に分離した。可溶性画分から His-タグ付加 AdpA を Ni-NTA Spin Column (QIAGEN) を用いて精製した。精製方法は添付のプロトコルによった。カラムからの elute buffer 組成は 50 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 10% glycerol である。精製結果は SDS-PAGE にて確認した。

(2) プローブ調製

PCR で増幅した DNA 断片 (ゲルシフト PCR 法により単離した AdpA 結合断片は pUC ベクターにクローニングされているので、M13 系プライマー (Takara shuzo) を用いた) の 5' 末端を [γ-³²P] ATP 及び T4 polynucleotide kinase を用いて標識した。AdBS18 の上流プローブの作製には、5'-CGGCGGAGCGATGCCTGGAG-3' (-741 to -722) と 5'-GGGGTGTGATGACCGCCTGA-3' (-209 to -228) を用いた。下流プローブの作製には、5'-CTCATAGCCGTCGCCGTTCC-3' (+135 to +154) と 5'-GCCAGCCAGACCACCTTGC-3' (+641 to +622) を用いた。AdpA 結合部位への変異導入後のゲルシフトアッセイ (図 2.1.1-9) では、以下のプライマーの組み合わせを用いた。A-site のみを含む 303 bp のプローブは、5'-TCAGGCGGTCATCACACCCC-3' (positions -228 to -209) と 5'-CGCGGACTCCTTCTGCGAGG-3' (+75 to +56) のプライマーセット、B-site のみを含む

む 300 bp のプローブは、5'-CCACGCTCGCGGCGTCGGGG-3' (-399 to -380) と 5'-ACGTTTCGCCGATCAATTGCC-3' (-100 to -119) のプライマーセット、A-site、B-site 両方を含む 453 bp のプローブは、5'-TGGACGACCCGGACCGCTTC-3' (-378 to -359) と 5'-CGCGGACTCCTTCTGCGAGG-3' (+75 to +56) のプライマーセットを用いてプローブを作製した。

(3) ゲルシフトアッセイ反応液組成

精製 AdpA、1 µg poly(dI-dC)-poly(dI-dC)、0.01%BSA、50~100 cps RI 標識プローブ、desalt buffer (50 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH 8.0、10% glycerol) / 40 µl

(4) 泳動用アクリルアミドゲル組成

6 ml (6%) acrylamide solution (acrylamide : N, N'-methylene-bis(acrylamide) = 79 : 1), 4 ml 10×TAE for gel-shift (400 mM Trizma base, 200mM sodium acetate, 10mM EDTA, pH 7.8 adjusted by acetic acid) / 40 ml, 300 µl 10% APS, 40 µl TEMED

(5) アッセイ方法

上記組成にて 40 µl の反応容量で 25°C、30 分反応させ、6%のアクリルアミドゲルで 35 mA 定流、2 時間泳動した。泳動後、Image Analyzer で検出をした。

S. griseus からの RNA 抽出

RNA 抽出は *sgmA* の実験まで Kirby 法 (Kieser *et al*, 2000) により行っていたが、試薬 sodium tri-isopropylphthalenesulfonic acid sodium salt (Kanto Kagaku) が生産中止になり、Modified Kirby mixture の作製が不可能になった。それにともない、私は ISOGEN (Nippon Gene) を用いた放線菌からの RNA 抽出プロトコルを作成した。RNA 抽出法を変えたことによる実験結果への影響は特に見られていない。

(1) 菌体の培養・回収

100 ml YMPD, final 0.5%グリシン/坂口フラスコ・綿栓で 30°C、3 日間振とう培養し、全量を集菌して YMPD で二回洗浄した後、30 ml の YMPD に再懸濁してホモジナイズし、50~100 µl を YMPD プレート上 (菌体を回収しやすいようにセロファンを敷いておく) に均一に広げる。28°C で本培養し、定時に菌体を回収した。

(2) Kirby 法

Hopwood らによるマニュアル (Kieser *et al*, 2000) によった。

試薬 (Kirby 法)

- Modified Kirby mixture : 1% (w/v) sodium tri-isopropylphthalenesulfonic acid sodium salt (Kanto Kagaku), 6% (w/v) 4-aminosalicylic acid sodium salt (Tokyo Kasei), 6% (v/v) phenol : chloroform (1 : 1) pH 7.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.3
- acid-PC : 500 g phenol, 500 ml chloroform, 100 ml DW, 500 mg 8-quinolinol (Wako)
- 10 x DNase buffer : 0.5 M Tris-HCl pH 7.8, 50 mM MgCl₂
- 4 M sodium acetate pH 7.0
- 3 M sodium acetate pH 6.0

(3) ISOGEN 法

ガラスビーズ (直径 1 mm) を 5 ml のラインまであらかじめ入れておいた 50 ml チューブ (Corning) に放線菌菌体約 0.5 g および ISOGEN 5 ml を加える。ボルテックスで 5 分間激しく混ぜ、55°C に 30 分間つける。55°C インキュベート中は 10 分ごとにボルテックスで混ぜる。その後さらにボルテックスで 3 分間激しく混ぜる。アシストチューブ (15 ml) に移し、9,000 rpm、4°C で 10 分間遠心。上清を新しいアシストチューブに移す。クロロホルムを 1 ml 加え、ボルテックスで混合、室温で 3 分間放置。9,000 rpm、4°C で 15 分間遠心。上清を新しいアシストチューブ (15 ml) に移し、等量イソプロパノールを加えて混合後、10 分間室温で放置。10,000 rpm、4°C で 20 分間遠心。ペレットを 70% エタノール (0°C) 5 ml でリンスし、7,500 rpm、4°C で 5 分間遠心。最後にペレットを 250 µl の DW にとかす。

また、RNA イソプロパノール沈殿のステップは high-salt precipitation により代替でき、より高純度の RNA を得ることができる。ただし、収量は減る。この場合、遠心後の上清と等量のイソプロパノールのかわりに、上清の半分量のイソプロパノール、半分量の 1.2 M NaCl-0.8 M sodium citrate を加え、10,000 rpm、4°C で 15 分間遠心する。その後は同様にリンスして DW に RNA をとく。

S1 マッピング法

(1) 試薬

- 10× kination buffer : 500 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT
- 5× S1 nuclease digestion buffer : 1.4 M NaCl, 150 mM sodium acetate, 22.5 mM zinc acetate, pH 4.4
- 1 ml S1 nuclease digestion solution : 0.2 ml 5× S1 nuclease digestion buffer, 0.8 ml DW, 4 µl salmon sperm DNA (5 mg/ml), 3 µl S1 nuclease (100~200 U /µl)
- S1 nuclease termination solution : 2.5 M ammonium acetate, 50 mM EDTA
- 4 M NaTCA buffer : 4 M NaTCA, 40 mM PIPES, 1 mM EDTA, pH 7.0

- ・ formamide loading dye : 80% formamide, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1 mg BPB
- ・ 6%アクリルアミドゲル組成 : 21 g urea, 21.5 ml DW, 7.5 ml 40% acrylamide solution (acrylamide : N, N'-methylene-bis(acrylamide) = 19 : 1), 5 ml 10×TBE buffer
- ・ 10×TBE buffer : 162 g Tris, 27.5 g boric acid, 9.5 g EDTA · 2Na / l l

(2) プロブの調製

転写開始点があると思われる領域を中心として、約 400 bp の DNA 断片を PCR で増幅できるプライマーを設計した。mRNA と相補する側の DNA 断片をラベルするため、5' 末端を[γ - ^{32}P] ATP でラベルした下流側のプライマーと標識していない上流側のプライマーを用いて PCR 増幅した。*hrdB* の転写は 5'-TCGATGAGCGCCATCACAGACTCG-3' (+193 to +170) と 5'-TCGGCCCATTTTCGTACGTATGAG-3'* (-121 to -98) の組み合わせ (*のプライマーを ^{32}P ラベルした) を用いた (Shinkawa *et al.*, 1995)。*sgmA* では 5'-CGACGCTGTCTCATCAGGCG-3' (-241 to -222) と 5'-GGAGGTGGCGGTTCGCGGCGC-3'* (+179 to +160) を用いた (*のプライマーを ^{32}P ラベルした。)

標識する側のプライマー (10 pmol/ μl) 1 μl 、DW 10 μl 、10 x kination buffer 2 μl 、グリセロール 1 μl 、[γ - ^{32}P] ATP 5 μl 、T4 Polynucleotide kinase 10 U を混合し、37°C、30 分インキュベートした。その後さらに T4 polynucleotide kinase 10 U を加え、37°C、30 分インキュベートした。

鋳型 DNA、標識しない側のプライマー 10 pmol、RI 標識したプライマー液を用い、Takara Ex Taq で PCR 反応。増幅された DNA 断片をアガロースゲルに泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) にて抽出した。

(3) ハイブリダイゼーション～S1 反応

抽出した RNA 40 μg を乾燥させ、調製した約 500 cps の RI 標識プロブを含んだ 5 μl DW に溶かし、さらに 15 μl の 4 M NaTCA を添加して混合した。65°C 15 分の後、インキュベーターの設定温度を 45°C にセットして 12~15 時間放置し、ゆっくりと温度を下げた。反応後、300 μl の S1 nuclease digestion solution を加え、素早くボルテックスして氷上に移した。37°C 1 時間の S1 ヌクレアーゼ処理の後、75 μl の S1 nuclease termination solution、2 μl の yeast t-RNA (10 mg/ml) を加えてボルテックスし、400 μl の 2-プロパノールで沈殿させた。沈殿は 4 μl の formamide loading dye に溶かしサンプルとした。これを煮沸急冷し、アクリルアミドゲルにて 40 mA 定流で泳動した。泳動後、Image Analyzer で検出をした。マーカーとして Marker 10 (pBR322/MspI digest, Nippon Gene) を脱リン酸化し、[γ - ^{32}P] ATP で 5' 末端を標識したものをを用いた。

(4) 高解像度の S1 マッピング法

低分解能 S1 マッピング法において転写開始点の位置を予想し、その 60~70 bp 下流がプローブの端になるように約 200 bp のプローブを PCR で増幅して作製するため、適当な位置にプライマーを設計する。このプローブを用いてマキサムギルバート法の G+A 反応及び T+C 反応で配列ラダーを作成し、RNA 40 µg と約 500 cps の RI 標識プローブを S1 反応したサンプルと共に塩基配列解析用アクリルアミドゲル（組成は低分解能 S1 マッピングと同じ）に泳動した。泳動は 1500 V 定圧で行い、泳動後、Image Analyzer で検出をした。sgmA では 5'-GCGGCAATGATCGGCGAAAC-3' (-121 to -102) と 5'-CGCGGACTCCTTCTGCGAGG-3'* (+75 to +56) のプライマーを用い、*のプライマーを ³²P ラベルした。

DNaseI フットプリンティング法による AdpA 結合部位の決定

(1) 試薬

- 2×binding buffer : 50 mM HEPES-KOH (pH7.9), 1 mM EDTA-NaOH (pH8), 100 mM KCl, 20% glycerol
- 10×DNase I : 150 mg/ml DNase I
- stop solution : 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 100 mM NaCl , 1% sodium N-lauroyl sarcosinate , 10 mM EDTA-NaOH (pH 8.0) , 25 mg/ml salmon sperm DNA

(2) DNase I 反応

約 10 kcpm の RI 標識プローブ (S1 マッピング法と同様にして作製)、適当量の AdpA を 1 × binding buffer 中で混合する。反応液量は 50 µl とした。25°C で 30 分反応させた後、DNase I を最終濃度 15 µg/ml となるように加え、25°C にて 1 分反応させた。その後、すばやく 100 µl stop solution、150 µl phenol-CHCl₃ を加え、3 分間激しくボルテックスして反応を止めた。遠心して上清を別のマイクロチューブに移し、エタノール沈殿し、3 µl の formamide loading dye に溶解し泳動サンプルとした。同じプローブを用いてマキサムギルバート法の G+A 反応で配列ラダーを作成し、サンプルとともに泳動した。泳動・検出は高分解能 S1 マッピング法と同様に行った。

プローブの位置は、ゲルシフトアッセイを様々な位置のプローブを用いて行うことにより結合位置のたまかな位置を決定して決めた。それをもとにプライマーを設計して作製している。sgmA の site-A には、5'-CGGCAATGATCGGCGAAACG-3' (-120 to -101) と 5'-AACGGGGTGAAGAGTGTCAG-3' (+3 to -17) のプライマーの組み合わせ、site-B には、5'-GCAACCGCCTGAGCGACGCG-3' (-322 to -303) と 5'-GCACGGTCGCGGGCGGGAAG-3' (-190 to -171) のプライマーの組み合わせを用いてプローブを作製した。

S. griseus のプロトプラスト調製法および形質転換

(1) プロトプラスト調製用試薬

- conc P buffer : 30.9 g Sucrose, 75 mg K₂SO₄, 0.6 ml Trace element, 609 mg MgCl₂·6H₂O / 240 ml
- P buffer : 240 ml conc P buffer, 30 ml 0.25 M TES (pH7.2), 30 ml 3.68% CaCl₂·2H₂O, 3 ml 0.5% KH₂PO₄
- Lysozyme solution : 40 mg lysozyme in 20 ml P buffer
- PEG solution : 1 g polyethylene glycole # 1000 (nacalai tesque), 3.85 ml P buffer

(2) S. griseus のプロトプラスト調製

終濃度 0.5% glycine を添加した 100 ml YMPD/坂口フラスコ・綿栓に *S. griseus* を植菌し、30°C にて 36 時間振とう培養した。集菌し、P buffer で洗浄した後、20 ml の Lysozyme solution を添加し、菌体を懸濁して 28°C、30~60 分処理してプロトプラスト化した。これを cotton wool filter (脱脂綿を詰めたろうと) に二回通してプロトプラストのみを回収した。回収したプロトプラストを P buffer で洗浄後、1 ml の P buffer に懸濁し、適宜希釈して形質転換に用いた。

sgmA 上流の AdpA 結合部位への変異導入

PCR を用いて変異導入を行った。図 2.1.1-10 も参照。用いたプライマーは以下の通り。

PA-F : 5'-GGCGAAATTCCCATCGAGGTGCTGGCCAGG-3' (下線は *EcoRI*)

PA-R : 5'-GGCAAGCTTGGGTACCGCGCGCTGGAC-3' (下線は *HindIII*)

PA-AF : 5'-GGGCTGCAGCGGCCAAGTTGTTGACGCGC-3' (下線は *PstI*)

PA-AR : 5'-GGCTGCAGGTTCGTTGCTGGAAAGGTCG-3' (下線は *PstI*)

PA-BF : 5'-GGCGGATCCCCCGACGCTGTCTCATCAGG-3' (下線は *BamHI*)

PA-BR : 5'-GGGGGATCCCCAGATTCGCACGCCGGAAC-3' (下線は *BamHI*)

まず、A-site と B-site を両方含む断片 (-867 to +54) を PA-F と PA-R を用いて PCR 増幅し、pUC19 の *EcoRI-HindIII* サイトにクローニングした。これを鋳型として、PA-F と PA-AR、および PA-AF と PA-R を用いて PCR 増幅した断片を *PstI* サイトを介してつなげ、pUC19 の *EcoRI-HindIII* サイトにクローニングした。これで A-site の内部の 6 塩基が *PstI* サイトに置換された配列を作製した。同様に、PA-F と PA-BR、および PA-BF と PA-R を用いて PCR 増幅した断片を *BamHI* サイトを介してつなげ、pUC19 の *EcoRI-HindIII* サイトにクローニングして B-site に変異を導入した。これらを組み合わせることで A-site と B-site 両方に変異を導入した配列も作製した。PCR エラーがないことは DNA シークエンスにより確認している。

まず、これらの断片を用いて MDH を用いたプロモーターアッセイを行った (下記参照)。

その後、これらを染色体に組み込んだ変異導入株を作製した。変異導入用プラスミドは *sgmA*

周辺約 6.0 kb のうち、*Bam*HI-*Sal*I 断片約 2.3 kb を pUC19 にクローニングしたものを用いた。このプラスミドに対し、上記で作製した変異導入プラスミドから切り出した、変異を含む *Sac*I-*Hinc*II 断片約 0.4 kb で対応する断片を制限酵素部位で置換した。この変異を組み込んだ約 2.3 kb の断片を含むプラスミドに、*Hind*III サイトを用いて Tn5 由来のカナマイシン耐性遺伝子を組み込んだ。完成したプラスミドを *E. coli* JM110 株を用いて大量調製し、アルカリ変性-中和を施して *S. griseus* IFO13350 を形質転換することで染色体に組み込み、ネオマイシンで選択後、組み換えをサザンハイブリダイゼーションで確認した。得られた株を薬剤なしの培地で数回うえついだ後、胞子を回収してまくことでシングルコロニーを得、薬剤感受性になった株の染色体を用いてサザンハイブリダイゼーションを行って、プラスミドが野生型配列とともに抜け落ち変異型配列のみが残ったものを選択・取得した。

MDH を用いたプロモータープローブアッセイ

Thermus flavus 由来 MDH (malate dehydrogenase) (Nishiyama *et al.*, 1986) は耐熱性のリンゴ酸脱水素酵素である。低コピープラスミド pTMA1 はこの MDH の遺伝子 (*mdh*) 上流にマルチクローニングサイトが位置しており、ここにプロモーター活性を評価したいプローブを組み込むことができる。このプラスミドの形質転換体の MDH 活性がプロモーター活性に対応する (Kieser *et al.*, 2000)。

用いたプローブは「AdpA 結合部位への変異導入」で作製したプローブ (*Eco*RI-*Hind*III 断片) であり、また系がうまく動かなかったため、短いプローブ (P1S) も作製した。このとき用いたプライマーは

PA-F2 : 5'- GGCGAATTCCTCCTGGACACGGTGTACCC -3' (下線は *Eco*RI)

と他のものを組み合わせたものである。

MDH 活性の測定

YMPD 培地で培養し、菌体を 100 mM の potassium phosphate buffer (pH 7.0) にとかした。液体培養の場合はソニケーション、固体培地上での培養の場合は乳ばちで菌体を破碎した。遠心したのち、上清を 80°C で 30 分処理して耐熱性 MDH 以外の酵素を失活させた。この溶液適量と、potassium phosphate buffer (pH 7.0) 33 mM、oxaloacetate 0.17 mM、NADH 0.15 mM を混合し、30°C で反応した。反応中の 340 nm の吸光度 (NADH に対応) 減少を測定することにより活性の評価を行った。

sgmA 遺伝子破壊株の作製

sgmA の遺伝子破壊は sgmA に薬剤耐性遺伝子を挿入することにより行った。図 2.1.1-12 も参照。以下に破壊用プラスミドの構築について述べる。

取得した sgmA を含む約 6.0 kb 中 (pUC19 にクローニングしてある) の、SacI と Aor51H I の間をカナマイシン耐性遺伝子 (Tn5 由来) Sac I-Aor51H I 断片で置換したプラスミドを作製した。これによって、sgmA の 83 番目のロイシンから 655 番目のアラニンにあたる配列が欠失する。

完成したプラスミドを *E. coli* JM110 株で大量調製し、DraI 処理の後、1 N NaOH で一本鎖にしたもので *S. griseus* 野生株を形質転換した。遺伝子破壊は HincII 処理した変異株の染色体に対してカナマイシン耐性遺伝子および sgmA 内の 5'領域 220 bp の断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行うことにより確認した (図 2.1.1-12)。

sgmA 遺伝子破壊株相補用プラスミド pSGML 作製

orf1 の 5'末端、orf2 全長、sgmA 全長、および orf4 の 3'末端を含む 4.2 kb の BamHI-PvuII 断片を pUC19 の BamHI-SmaI サイトにクローニングした。さらに SacI 断片 3.0 kb を pUC18 の SacI サイトにクローニングし、EcoRI-SalI 断片として切り出し、放線菌と大腸菌のシャトルベクター (低コピー) である pKU209 にクローニングした。これを *E. coli* JM110 株を用いて大量調製し、sgmA 遺伝子破壊株に導入した。

SgmA 過剰発現株の作製

5'-GCCGCATGCGATCCACGCCAGCCGTCGC-3' (下線は SphI サイトであり、開始コドンを斜体で示す。) と 5'-GCCGGATCCCTTCGGGCGTTCGTTTCGC-3' (下線は BamHI サイト) の組み合わせのプライマーを用いて PCR で sgmA 遺伝子を増幅した。pUC ベクターにクローニングして PCR エラーがないことを確認した後、放線菌の高コピーベクター pIJ702 の SphI-BamHI サイトにクローニングした (pIJ702-sgmA)。これにより、sgmA が melC1 のプロモーターにより転写される。また、コントロールとして、SphI-BamHI サイトを欠失させたプラスミド (pIJ702-d) を作製し、それぞれ *S. griseus* 野生株に導入した。