

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

前節で述べたように、AdpA の標的遺伝子として分泌型プロテアーゼをコードする *sgmA* を形態分化・二次代謝に関与する遺伝子群を含む AdpA レギュロンの一員として同定した。分泌プロテアーゼはアポトーシス様の菌糸分解を行うことによって形態分化に関与していることが示唆されており、様々な種類の分泌プロテアーゼが菌糸分解に関与していることが予想される。このような分泌プロテアーゼが、形態分化を制御する AdpA により転写制御を受けることは、これらのモデルに矛盾しないものである。そこで、*sgmA* 以外の分泌プロテアーゼも AdpA により転写活性化され、菌糸分解を介して形態分化に関与するのではないかと考えた。多くの *Streptomyces* 属では形態分化の進行とともにトリプシン型分泌プロテアーゼの活性が上昇し、トリプシン阻害剤を添加した場合形態分化が抑えられる、という報告があった (Kim *et al.*, 1995b)。さらに、*S. exfoliatus* SMF13 においてはトリプシン阻害剤を添加した場合もしくはトリプシン活性を失った株では正常な形態分化能を失い、かつ自身が生産するトリプシン阻害蛋白質、ロイペプチンによって細胞外トリプシン活性を厳密に調節しているとの報告があった (Kim *et al.*, 1995a; Kim *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998)。*S. antibioticus* ATCC11891 においてはアポトーシス様の菌糸分解に関わるヌクレアーゼのプロセッシングにトリプシン型プロテアーゼが関与し、TLCK によりトリプシン活性を阻害すると形態分化も抑制されることも報告されていた (Nicieza *et al.*, 1999)。これらのことから、特にトリプシン型プロテアーゼに着目し、既に *S. griseus* ATCC 10137 からクローニングされていたトリプシン型プロテアーゼ遺伝子 *sprT* について AdpA による制御を調べることから研究をスタートした。

なお、この研究は「*sgmA* 以外の分泌プロテアーゼ遺伝子も AdpA により転写活性化されるのではないか」という独自のアイデアをもとに、データベースよりトリプシン型分泌プロテアーゼをコードする *sprT* を見だし、上流への AdpA 結合、および転写の AdpA 依存性を調べたことから始まっているが、*sprT* の AdpA による転写活性化の発見と同時期に、韓国の Hong らのグループが生化学的な解析から A-ファクター依存的に発現する分泌蛋白質として SprT を同定していた。このことから、*sprT* の研究は Hong らのグループとの共同研究になった。この共同研究部分については結果の最初の項に記述している。

2.1.2-II 結果

トリプシン型プロテアーゼ SprT の発現は A-ファクターに応答している (共同研究)

野生株と A-ファクター欠損変異株 HHI の分泌蛋白のプロファイルを比較することにより、A-ファクター依存的に発現する分泌蛋白の同定を行った。分泌蛋白を多く生産する R2YE 培地にてそれぞれの株を液体培養し、培養上清を TCA 沈殿することにより分泌蛋白を濃縮した。リン酸バッファーで透析した後、陽イオン交換カラムに通し、未吸着画分を SDS-PAGE にて比較し (図 2.1.2-1)、A-ファクター依存的に発現している蛋白のうち 1 つの N 末端配列を解説すると、VVGGTFAAQGEFPFM であった。この配列は、6 番目のアミノ酸残基についてフェニルアラニンがアルギニンになっているという違いはあったものの、*S. griseus* ATCC 10137 からとられた SprT の N 末端配列 (Kim *et al.*, 1991) と一致した。

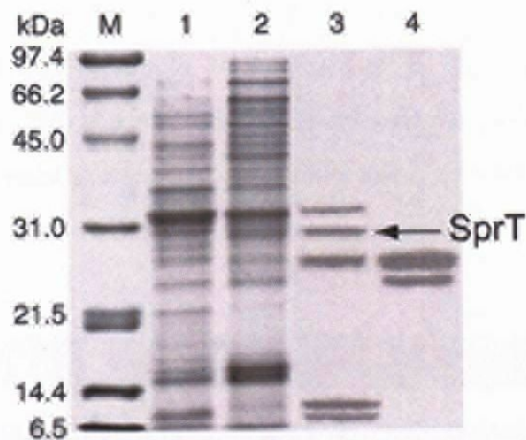


図 2.1.2-1 A-ファクター依存的に発現する分泌蛋白のプロファイル

(韓国の Hong らのグループによる解析)

SDS-PAGE により解析した。M : マーカー、レーン 1 : TCA 沈殿後の野生株培養上清、レーン 2 : TCA 沈殿後の HHI 株 (A-ファクター欠損株) 培養上清、レーン 3 : TCA 沈殿-カラム処理後の野生株培養上清、レーン 4 : TCA 沈殿-カラム処理後の HHI 株 (A-ファクター欠損株) 培養上清

sprT および sprU のクローニングと塩基配列決定

S. griseus ATCC 10137 由来の *sprT* については既にアミノ酸配列、塩基配列ともに報告されていた。そこで ATCC 10137 株由来の *sprT* をプローブとして IFO13350 株の *sprT* および周辺配列を含む 6.6 kb の DNA 断片をクローニングした。また、*sprT* をプローブとしたサザンブロットイング (後述) によりパラログである *sprU* を発見したので同様にクローニングを行った。両方

の塩基配列を決定し、ORF 解析を行った結果を図 2.1.2-2 に示した。SprT と SprU は 80%ほどの相同性を示し、どちらも触媒残基は保存され、N 末端に pre-pro 配列を持っていた (図 2.1.2-3)。

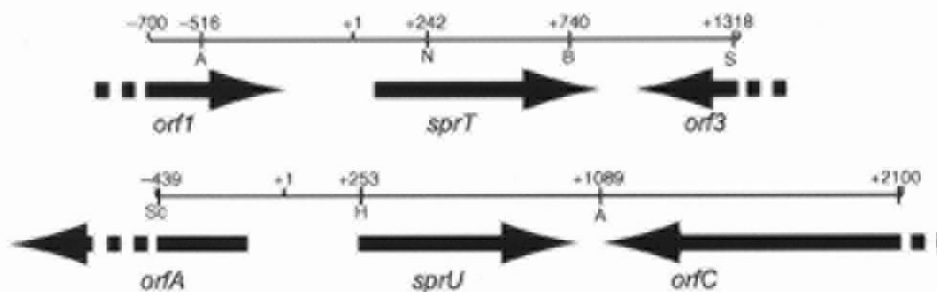


図 2.1.2-2 *sprT* および *sprU* 周辺の遺伝子配列

ORF については Frame Plot Analysis (Ishikawa and Hotta, 1999) を用いて予測した。位置番号は転写開始点を+1 として示した (転写開始点決定については後述)。制限酵素サイトについては、A, *Aor*51HI; B, *Bam*HI; H, *Hind*III; N, *Nco*I; S, *Sal*I; Sc, *Sac*I である。Orf1 は *S. avermitilis* の putative oxidoreductase、Orf3 は *S. coelicolor* A3(2) の hypothetical protein と相同性をもつ。OrfA は *S. avermitilis* の hypothetical protein、OrfC は β -galactosidase と相同性をもつ。

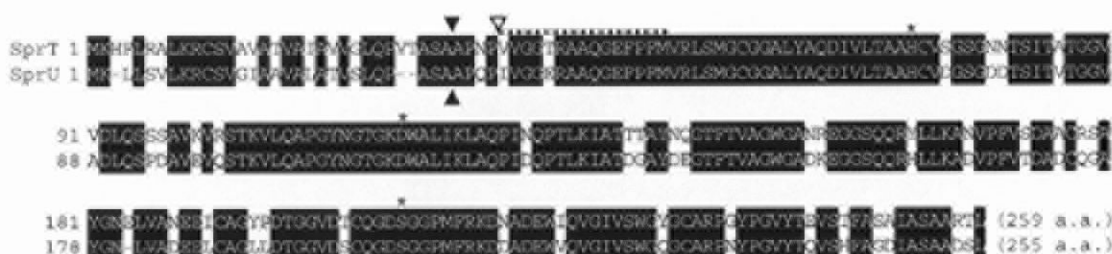


図 2.1.2-3 *SprT* および *SprU* のアミノ酸配列

点線は培養上清より精製した *SprT* の N 末端配列を決定した際に読んだ配列。▼は成熟体の *SprT* の N 末端を示す。▲は PSORT program により予測した、シグナルペプチダーゼにより認識され切断される pre-pro 配列の境界を示す。★は保存された触媒残基の catalytic triad、His-Asp-Ser を示す。

sprT および sprU は AdpA 依存的転写を示す

sprT および *sprU* が A-ファクターカスケード、特に AdpA の制御下にあるかどうかを調べるため、転写の AdpA 依存性を調べた。プレート培養した野生株および *adpA* 遺伝子破壊株 ($\Delta adpA$ 株) の菌体より RNA を抽出し、S1 マッピング法により転写量を比較した (図 2.1.2-4)。その結果野生株では *sprT* は培養 48 時間から転写があり、72 時間に非常に強い転写を示した。*sprU* は *sprT* より弱いものの培養 72 時間で転写が見られた。なお、48 時間培養では基底菌糸と気中菌糸が混じった状態、72 時間では気中菌糸と胞子が混じった状態であり、トリプシン型プロテアーゼをコードする *sprT* と *sprU* は胞子形成時期に転写されることがわかった。一方で、 $\Delta adpA$ 株では *sprT* と *sprU* いずれも転写量はほぼゼロになり、AdpA 依存的な転写を示したことから、*sprT* と *sprU* が AdpA レギュロンに含まれ、AdpA により直接的に転写活性化されることが考えられた。

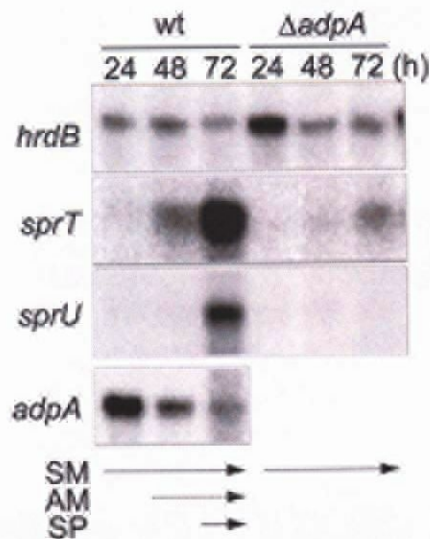


図 2.1.2-4 低解像度 S1 マッピングによる *sprT* および *sprU* の転写解析

YMPD 固体培地において野生株 (wt) および *adpA* 遺伝子破壊株 ($\Delta adpA$) を 28°C で培養した。24, 48, 72 時間で菌体を回収し、RNA を抽出、それぞれの遺伝子の転写量を比較した。*hrdB* は恒常的に発現するシグマ因子で RNA 量のコントロールである。SM: 基底菌糸、AM: 気中菌糸、SP: 胞子、を表す。

また、高解像度の S1 マッピング法によりそれぞれ転写開始点を決定した (図 2.1.2-5)。*sprT* の転写開始点は開始コドンの 80 bp 上流に位置し、*sprU* の転写開始点は開始コドンより 248 bp 上流に位置していた (図 2.1.2-6)。どちらも -35 および -10 領域は主要シグマ因子により認識さ

AdpAは *sprT* および *sprU* の上流に結合する

AdpA により直接転写活性化を受けるのであれば、遺伝子上流に AdpA が結合するはずである。そこで、*sprT* および *sprU* の上流配列をプローブとしてゲルシフトアッセイにより AdpA の結合を調べた。AdpA は遺伝子上流の様々な位置に結合することがわかっていたため、*sprT* および *sprU* それぞれ種々のプローブを作製してアッセイを行った。

sprT については、probe T1 (-448~+61、転写開始点を+1 とする)、probe T2 (-112~+7)、probe T3 (-448~-61)、probe T4 (-34~+61)、probe T5 (-238~-61)、probe T6 (-448~-219) について調べた。その結果、probe T1 と T2 に結合が見られ、シフトバンドが1本、プローブに AdpA ダイマーが1分子結合した位置に見られた。それ以外のプローブには結合が見られず、AdpA は-112~+7の領域1カ所に結合することが推測された。

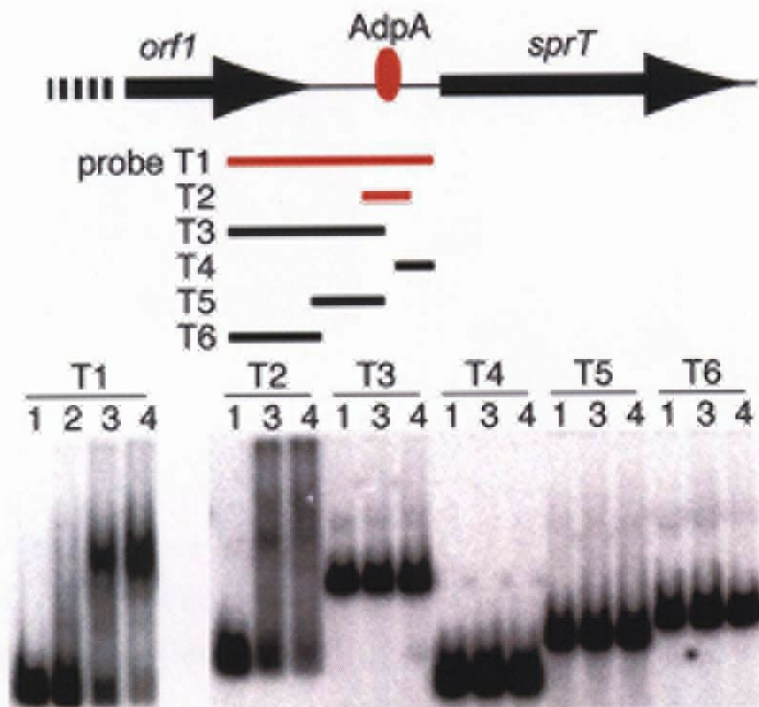


図 2.1.2-7 ゲルシフトアッセイ法による *sprT* 上流への AdpA 結合解析

加えた AdpA 量はレーン 1~4 で順に、0 μg (レーン 1)、0.04 μg (レーン 2)、0.2 μg (レーン 3)、0.4 μg (レーン 4) である。プローブの位置は、probe T1 (-448~+61、転写開始点を+1 とする)、probe T2 (-112~+7)、probe T3 (-448~-61)、probe T4 (-34~+61)、probe T5 (-238~-61)、probe T6 (-448~-219) である。AdpA との結合が見られたプローブを赤で示した。

sprU については、probe U1 (-444~+96)、probe U2 (-200~+277)、probe U3 (+77~+566)、probe U4 (-444~-181)、probe U5 (-193~-67)、probe U6 (-24~+277)、probe U7 (-24~+96) について調べた。その結果、probe U1 と U2 に結合が見られ、シフトバンドが 1 本、プローブに AdpA ダイマーが 1 分子結合した位置に見られた。それ以外のプローブには結合が見られず、AdpA は -67~-24 の領域 1 カ所に結合することが推測された。

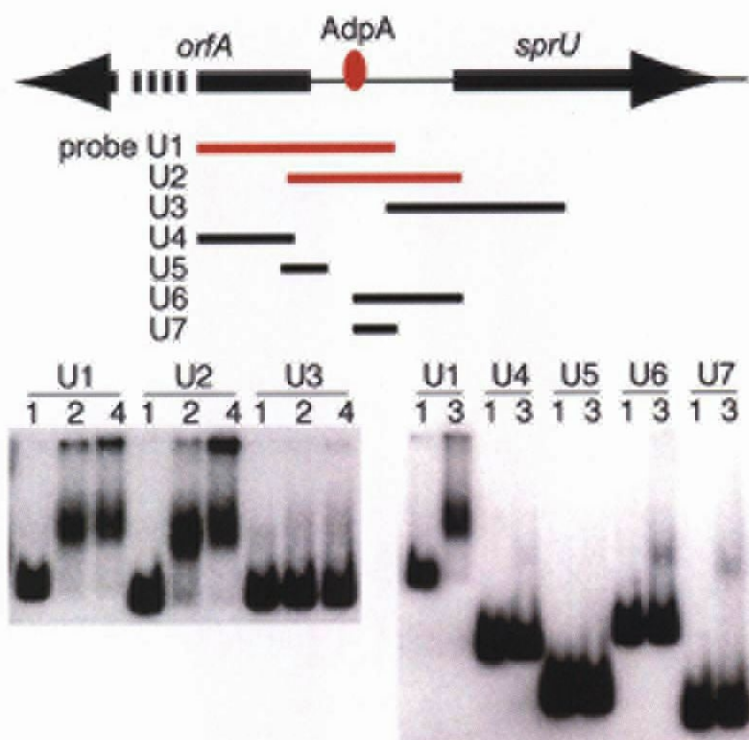


図 2.1.2-8 ゲルシフトアッセイ法による *sprU* 上流への AdpA 結合解析

加えた AdpA 量はレーン 1~4 で順に、0 μg (レーン 1)、0.04 μg (レーン 2)、0.2 μg (レーン 3)、0.4 μg (レーン 4) である。プローブの位置は、probe U1 (-444~+96)、probe U2 (-200~+277)、probe U3 (+77~+566)、probe U4 (-444~-181)、probe U5 (-193~-67)、probe U6 (-24~+277)、probe U7 (-24~+96) である。AdpA との結合が見られたプローブを赤で示した。

DNase I フットプリント法による *sprT* および *sprU* 上流における AdpA 結合部位の決定

ゲルシフトアッセイにより *sprT* および *sprU* 上流に AdpA が結合することがわかったため、それぞれの位置を決定するために DNase I フットプリント法を行った。種々のプローブを用いたゲルシフトアッセイで推測された結合位置を含むプローブを用いて DNase I フットプリント法を行った結果、*sprT* と *sprU* 上流の予想された 1 カ所の結合位置を決定することができた (図

2.1.2-9 および図 2.1.2-10)。 *sprT* はセンス鎖の-68~-36、アンチセンス鎖の-35~-57 に AdpA が結合することがわかり、またフットプリントにおいては-39、-40 の位置にハイパーセンシティブサイトが見られた。ハイパーセンシティブサイトは DNA が蛋白質と複合体を形成した結果表面に露出してより DNase I による切断を受け易くなった部位のことである。結合領域の中には AdpA 結合コンセンサス配列 (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) と相同性のある配列、5'-TGGCCGAAAT-3' (-53~-44) が見いだされた (図 2.1.2-11 中にコンセンサス配列は示した)。

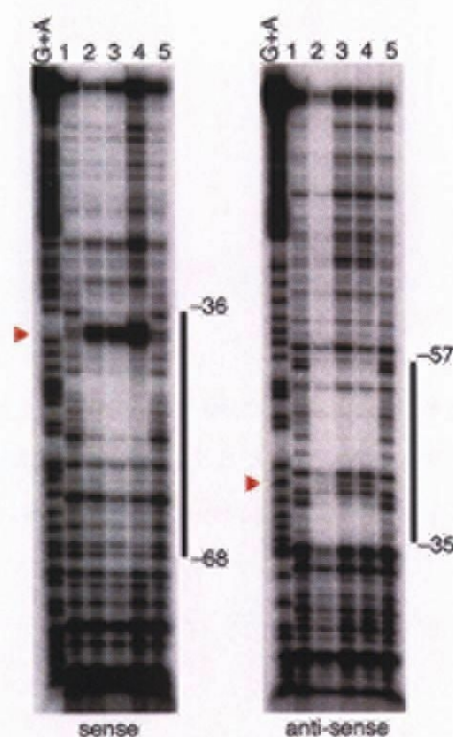


図 2.1.2-9 DNase I フットプリント法による *sprT* 上流の AdpA 結合部位の決定

センス鎖、アンチセンス鎖両方を行った。加えた AdpA の量は、レーン 1~5 で順に、0, 0.2, 0.4, 0.8, 0 μ g。赤い三角で示したのはハイパーセンシティブサイトである (センス鎖、アンチセンス鎖ともほぼ同じ位置)。

sprU はセンス鎖の-69~-32、アンチセンス鎖の-34~-55 に AdpA が結合することがわかり、*sprT* と同様に-38、-39 の位置にハイパーセンシティブサイトが見られた。結合コンセンサス配列も 5'-TGGCCGAAAA-3' (-52~-43) が見いだされた。以上より、*sprT* と *sprU* いずれもプロモーターのすぐ上流 1 カ所に AdpA が結合することが明らかとなった。

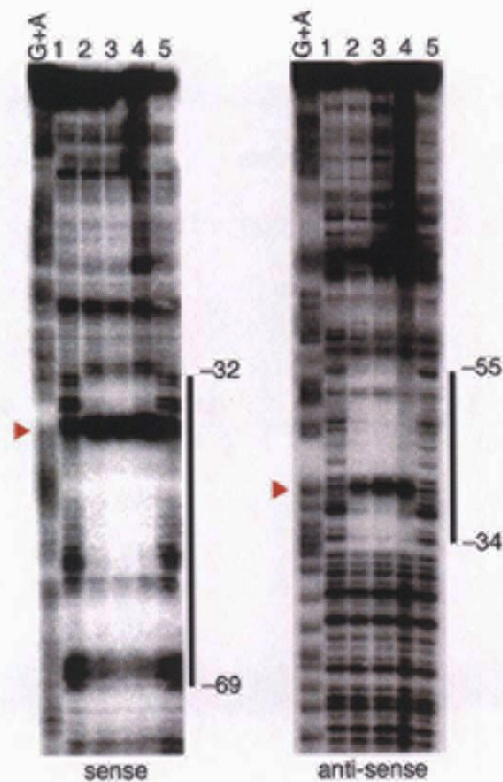


図 2.1.2-10 DNase I フットプリント法による *sprU* 上流の AdpA 結合部位の決定

センス鎖、アンチセンス鎖両方を行った。加えた AdpA の量は、レーン 1~5 で順に、0, 0.2, 0.4, 0.8, 0 μ g。赤い三角で示したのはハイパーセンシティブサイトである（センス鎖、アンチセンス鎖ともほぼ同じ位置）。

sprT と *sprU* は AdpA により直接転写活性化される

これらの AdpA 結合の意義、すなわち、AdpA 結合が *sprT* と *sprU* の転写活性化を促すのか、を調べるために結合部位に変異を導入し、転写への影響を調べることにした。結合配列中の、特に結合コンセンサス配列に着目して図 2.1.2-11 のように PCR を用いて変異導入を行った。この変異導入配列をプローブとしてゲルシフトアッセイを行うと、確かに AdpA が結合しなくなっていることが確認できた。また、1 カ所の変異で AdpA が結合しなくなったことから、AdpA が *sprT* と *sprU* の上流 1 カ所にのみ結合することも再確認できた (図 2.1.2-11)。

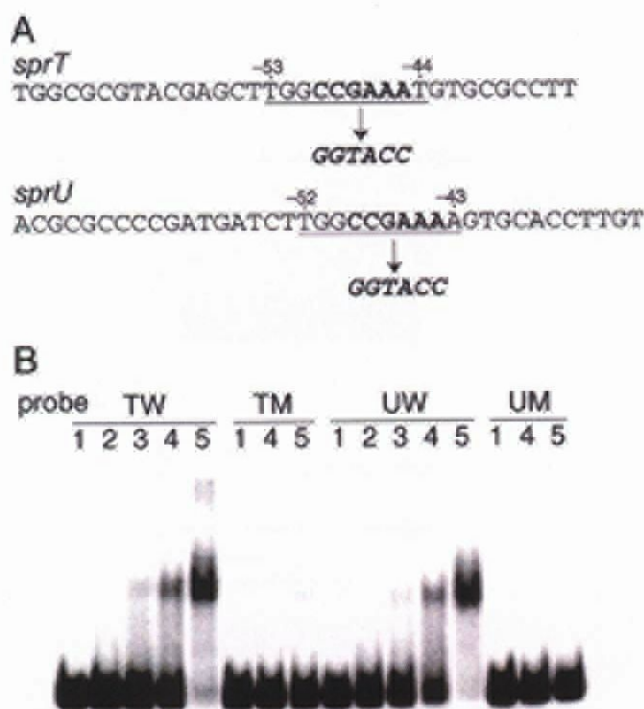


図 2.1.2-11 AdpA 結合部位への変異導入

(A)DNAase I フットプリント法により決定した AdpA 結合配列。下線は結合コンセンサス配列を示す。太字の塩基を *KpnI* の認識配列に置換した。(B)ゲルシフトアッセイによる AdpA の結合の確認。probe TW (-162~+77) は *sprT* 上流の野生型プローブ、probe TM は変異導入プローブ。probe UW (-164~+76) は *sprU* 上流の野生型プローブ、probe UM は変異導入プローブ。加えた AdpA の量は、レーン 1~5 で順に、0, 15, 45, 150, 300 ng である。

次に、これらの変異導入を行った *sprT* および *sprU* の遺伝子全長およびその周辺を低コピープラスミドに組み込み、それぞれの遺伝子破壊株（作製については後述する）に導入して、プラスミド由来の転写を RT-PCR により検出することで変異導入が転写に及ぼす影響を調べた。その結果、*sprT* と *sprU* ともに変異を導入した場合には転写が消失し、AdpA の結合が転写活性化に必須であることが明らかとなった（図 2.1.2-12）。

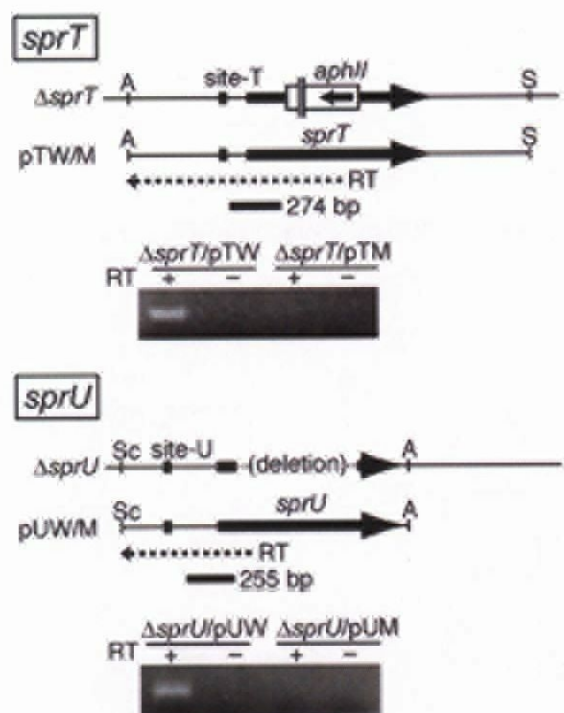


図 2.1.2-12 RT-PCR による AdpA 結合部位への変異導入の転写への影響解析

野生型および変異型 AdpA 結合部位 (site-T : *sprT* 上流, site-U : *sprU* 上流) をもつ相補プラスミドをそれぞれの遺伝子破壊株に導入した。プラスミド由来の転写のみを検出するプライマーセットを用いた RT-PCR により転写解析を行い、変異導入の転写への影響を調べた。遺伝子破壊により染色体上では失われた領域内に逆転写用プライマーが設計してある。RNA は YMPD 固体培地上で 28°C、72 時間培養した菌体から抽出した。計 100 μl の PCR 反応液のうち、*sprT* は 10 μl、*sprU* は 20 μl を 2%アガロースゲルの電気泳動で解析した。制限酵素サイトは、A, *Aor51HI*; S, *Sall*; Sc, *SacI* を表す。

sprT および *sprU* の遺伝子破壊株の形質

背景と目的で述べたように、*Streptomyces* においてトリブシン型分泌プロテアーゼは形態分化に何らかの形で寄与していることが示唆されていた。しかしながら、トリブシン型プロテアーゼをコードする遺伝子を単独で欠損させた変異株はこれまで取得されておらず、その関与を決定的に示すデータはこれまでで示されていない。そこで、*sprT* および *sprU* の遺伝子破壊株 (Δ *sprT* 株、 Δ *sprU* 株)、さらには *sprT* と *sprU* の両遺伝子破壊株 (Δ *sprTU* 株) を作製し形質を観察することにした。

sprT については薬剤耐性遺伝子を *sprT* と置換するような方法で遺伝子破壊を行った。なお、ここで遺伝子破壊の確認を *sprT* の内部領域をプローブとしたサザンブロッティングにより行ったが、期せずして野生型の染色体に対して 2 本のバンドが検出された (図 2.1.2-13)。このバン

ドの片方は *sprT* 由来の DNA 配列とハイブリダイゼーションしたものであるが、もう片方が *sprT* のパラログである *sprU* であった。詳細は省略するが、ここで発見した *sprU* を含む配列を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を行うことでクローニングし、塩基配列を決定して上述した解析を行っている。*sprU* についてはインフレーム欠失の方法を用いて遺伝子破壊を行った。また、得られた $\Delta sprU$ 株に対して *sprT* 遺伝子破壊を行うことによって $\Delta sprTU$ 株を取得した。

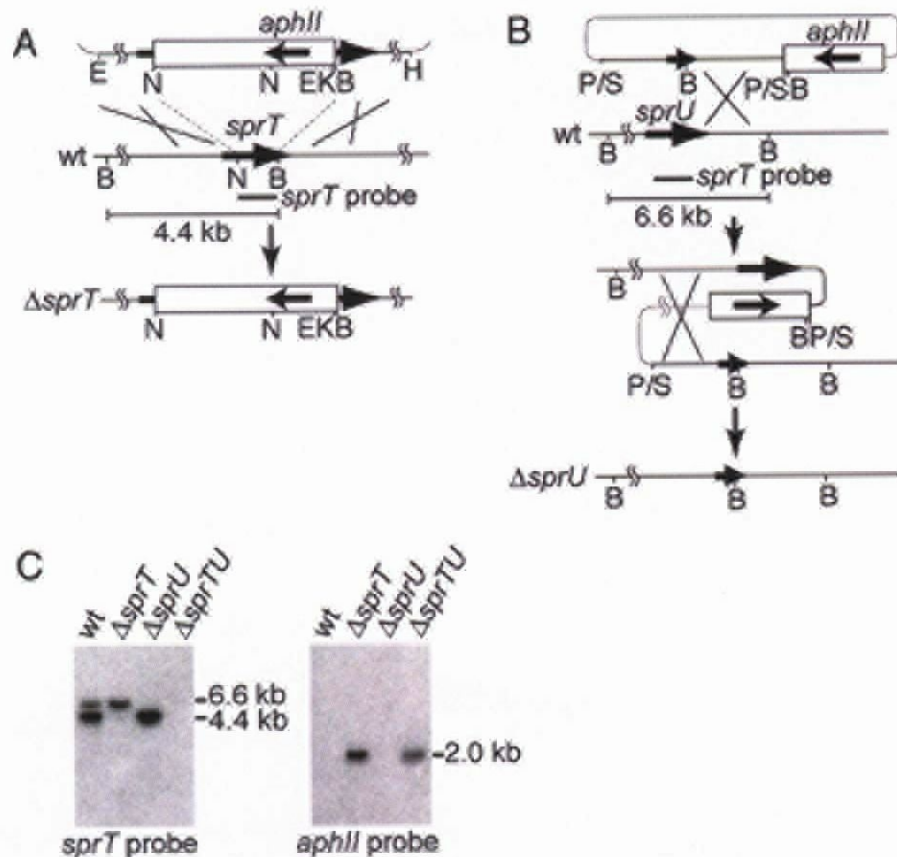


図 2.1.2-13 *sprT* 遺伝子破壊株、*sprU* 遺伝子破壊株、*sprTU* 同時破壊株の作製

詳細は材料と方法を参照。制限酵素は、N, *NcoI*; B, *BamHI*; K, *KpnI*; P, *PvuII*; Sm, *SmaI*; H, *HindIII*; E, *EcoRI* と略した。(A) *sprT* 遺伝子破壊株の作製スキーム。(B) *sprU* 遺伝子破壊株の作製スキーム。(C) サザンハイブリダイゼーションによる遺伝子破壊の確認。*sprT* 内部のプローブを用いているが、野生株の染色体では2本のバンドが検出される。4.4 kbのバンドは *sprT*、6.6 kbのバンドは *sprU* に対応する。

野生株、 $\Delta adpA$ 株、および取得した種々のトリブシン遺伝子破壊株について細胞外トリブシン活性の測定を行った (図 2.1.2-14)。転写解析を行った際と同様にプレート培養し、培地中の

トリプシン活性を測定すると、野生株では *sprT* および *sprU* の転写パターンと一致して培養時間を経るにつれてトリプシン活性の上昇が見られた。 $\Delta adpA$ 株および $\Delta sprTU$ 株では培養を通じてほぼゼロに近いトリプシン活性を示した。このことは、*S. griseus* における細胞外トリプシン活性は *AdpA* 制御下の *sprT* と *sprU* に由来するものがほぼ全てであることを示す。また、 $\Delta sprT$ 株では野生株に比べて細胞外トリプシン活性が激減しており、 $\Delta sprU$ 株は野生株とほとんど同じ細胞外トリプシン活性を示した。このことから、細胞外トリプシン活性の大部分は *sprT* に由来し、*sprU* に由来するトリプシン活性は非常に少ないことがわかった。これは、転写解析を行った際に *sprT* の転写量は非常に多く、*sprU* の転写量は *sprT* に比べてかなり少なかった結果と一致するものである。

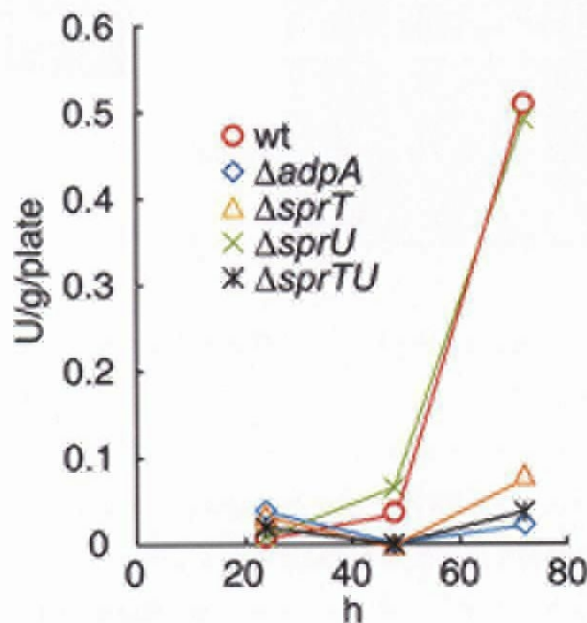


図 2.1.2-14 分泌トリプシン活性測定

野生株および各種変異株を YMPD プレート上、28°C で培養した。24, 48, 72 時間培養したところで菌体を除いた培地から蛋白質を抽出し、トリプシン活性を測定した。活性値は 1 枚あたりのプレートの活性値を菌体量で割った値とし、2 回行った実験の平均値をとった。

期待した形態分化については、様々な培養条件により観察を行ったものの、野生株との差は見られなかった。しかしながら、トリプシン阻害剤であるロイペプチン (2 mg) をペーパーディスクを用いてプレート培養した野生株に添加すると孢子形成に遅れが見られた (図 2.1.2-15)。また、破壊株のロイペプチン感受性は野生株とは異なっており、ロイペプチンによる孢子形成阻害は見られない傾向があった。これは、「目に見えないレベルではあるが $\Delta sprTU$ 株ではトリ

ブシンを失った影響で胞子形成が遅れており、ロイペプチンによる影響を受けなくなっている。」と解釈できる。しかしながら、この形質の違いは解釈が難しく複雑であり、通常の条件での形態分化には差が見られないことから、形態分化の形質に明らかな違いは見られない、と結論づけた。

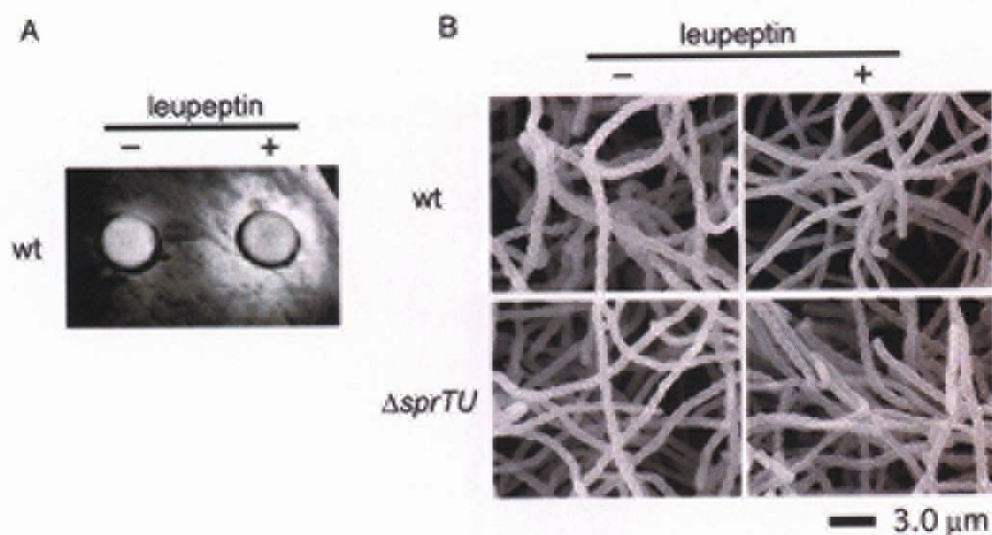


図 2.1.2-15 ロイペプチン（トリプシン阻害剤）による胞子形成阻害

(A) YMPD 培地に野生株の胞子をつまようじでぬり、28°C で 12 時間培養後、ロイペプチン (2 mg) をペーパーディスクにのせた。コントロール(-)は滅菌水をのせた。その後さらに 60 時間培養した。ロイペプチンのまわりでは胞子色素の生産の阻害が見られる。(B) ロイペプチン、または蒸留水をのせたペーパーディスクのまわりを走査型電子顕微鏡で観察。野生株では胞子形成阻害が見られるが、 $\Delta sprTU$ 株ではロイペプチンに対する感受性が弱くなる傾向があった。

また、*S. antibioticus* の例では、トリプシン型プロテアーゼは分泌型ヌクレアーゼのプロセッシングを介して菌糸分解に関与し、形態分化に寄与していると報告されている (Nicieza *et al.*, 1999)。そこで、野生株、 $\Delta adpA$ 株、 $\Delta sprTU$ 株について分泌型ヌクレアーゼの活性発現パターンを調べてみた (図 2.1.2-16)。トリプシン型プロテアーゼがヌクレアーゼのプロセッシングを行っているならば、野生株では検出されるが $\Delta adpA$ 株、 $\Delta sprTU$ 株では検出されない、または非常に弱い活性発現を示すヌクレアーゼがあるはずである。しかし、そのような挙動を示すヌクレアーゼは検出できなかった。むしろ $\Delta adpA$ 株のほうが細胞外ヌクレアーゼは多く発現しているようであった。少なくとも *S. griseus* ではトリプシンは分泌型ヌクレアーゼのプロセッシングを行ってはいないようである。

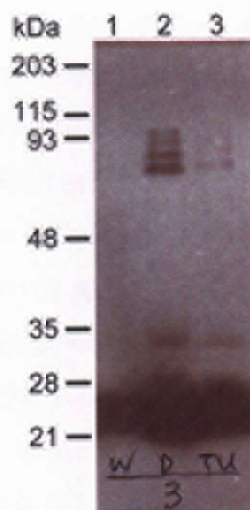


図 2.1.2-16 分泌型ヌクレアーゼの活性染色による検出

1、野生株、2、 $\Delta adpA$ 株、3、 $\Delta sprTU$ 株をそれぞれ YMPD 固体培地で 28°C、72 時間培養し、分泌蛋白質のヌクレアーゼ活性を検出した。 $\Delta adpA$ 株で強く検出されるヌクレアーゼがあるが、野生株と $\Delta sprTU$ 株はほぼ同じパターンを示した。24、48、96 時間においても調べたが、プロセッシングの影響を受けていると見られるものはなかった。

2.1.2-III 討論

sprT と sprU の転写制御

本研究により、分泌型金属プロテアーゼをコードする *sgmA* だけでなく分泌型トリプシン型プロテアーゼをコードする *sprT* と *sprU* も A-ファクターにより転写活性化される、AdpA レギュロンの構成員であることが明らかになった。*sprT* と *sprU* のプロモーターすぐ上流に AdpA が結合することで転写活性化が起こり、胞子形成時期にあたるかなり遅い時期に SprT と SprU は発現する。*sprT* および *sprU* の転写量・時期と細胞外トリプシン活性が上昇する時期・量とは一致していたので、これらの活性発現調節は転写調節によるものと考えて良いだろう。分泌型トリプシン活性に主に寄与していた SprT の強いトリプシン活性は転写量の多さを反映したものと考えたほうが合理的である。SprT と SprU はアミノ酸配列で 80%ほどの高い相同性を持っており、蛋白質としての活性・安定性は両者ほぼ同じなのではないだろうか。*sprT* および *sprU* は異なる転写量を示したが、プロモーター周辺配列は非常に高い相同性を示した。したがって、転写量の違いは両者で唯一異なる、5'非翻訳領域の長さ由来のもと考えられる。*sprU* は非常に長い非翻訳領域を持っているが、ここが mRNA の安定性に寄与しているのだろう。

しかし、AdpA は気中菌糸形成前から発現してはたらいっているのにも関わらず、なぜ *sprT* と *sprU* の AdpA による転写活性化が起こる時期はこれほど遅いのだろうか。転写パターンだけを見れば *adpA* と *sprT* および *sprU* は逆である (図 2.1.2-4)。*adpA* は 24 時間で最大の転写量を示し培養が進むにつれ転写量が減っていくのに対し、*sprT* および *sprU* は 72 時間で最大の転写量を示す。これは *sgmA* の例と同じように考えられる。つまり、*sprT* および *sprU* の転写が活性化するときまで転写抑制因子がはたらき、AdpA による転写活性化は抑えられている。そして胞子形成時期が近づいた頃、転写抑制因子が何らかの機構によって外れ、転写量は少ないものの細胞内蛋白質量は十分あると考えられる AdpA が結合して転写活性化を行うのである。*sprT* および *sprU* はどちらも同じようなプロモーターをもち、AdpA 結合部位もほぼ同じである。この仮定した転写抑制因子は-35 および-10 周辺に直接結合し RNA ポリメラーゼの結合を阻害するか、AdpA 結合部位に結合して AdpA の結合を阻害しているか、どちらかであろう。他にもキモトリプシン型の分泌プロテアーゼも AdpA により制御されることが明らかとなった (Tomono *et al.*, 2005) が、キモトリプシン型プロテアーゼをコードする *sprA* と *sprB* は培養 24 時間で転写が見られるものの 48 時間では転写が消失し、72 時間で再度転写が現れるという AdpA による制御のみでは説明できない複雑な転写パターンを示した。AdpA により制御される分泌プロテアーゼには、他にも共通の、または異なる制御様式が絡んでいるのだろう。

分泌型トリプシン型プロテアーゼの生理的機能

背景で述べたように、これまで数種の *Streptomyces* で分泌型トリプシン型プロテアーゼの形態分化への関与が報告されていた。しかし、これまで分泌型トリプシン型プロテアーゼの形態分化への寄与が示されている一方、分泌型トリプシン型プロテアーゼをコードする遺伝子のみを破壊するという試みはなされていなかった。そのため本研究は分泌型トリプシン型プロテアーゼの形態分化への寄与を真に評価できる実験として期待は大きく、また *S. griseus* において *sprT* および *sprU* は孢子形成の時期に発現し、実際細胞外トリプシン活性も上昇していたため、孢子形成に関与することを期待した。形態分化の段階において、気中菌糸形成時と孢子形成時で2段階の菌糸分解があることが報告されており (Miguélez *et al.*, 2000)、この報告に一致するものだと考えられたからである。しかし、期待に反して結果は *S. griseus* では分泌型トリプシン型プロテアーゼは形態分化に明らかな寄与をしているとは言えない、ネガティブな結果であった。

SprT をプローブとして全ゲノムが明らかになった *S. coelicolor* A3(2) および *S. avermitilis* の遺伝情報を調べると、*S. avermitilis* には81%という高い相同性を示す SAV6208 のほか、3つの ORF、SAV2034, SAV2443, SAV4044 をコードする ORF があった。しかし、*S. coelicolor* A3(2) にはかろうじて30%程度の相同性を示す SCO5821, SCO7461 をコードする ORF があるのみであった。また、Kim らは様々な *Streptomyces* の細胞外トリプシン活性を調べている (Kim *et al.*, 1995) が、細胞外トリプシンの形態分化への寄与が示されている *S. exfoliatus* は気中菌糸形成の開始とともに急激にトリプシン活性が上昇する一方、*S. roseus* は気中菌糸形成の時期には既に高い細胞外トリプシン活性を示していた。また、*sprT* と高い相同性のある ORF を持たない *S. coelicolor* A3(2) ではこれらの *Streptomyces* と比べて細胞外トリプシン活性は低いものであった。*S. antibioticus* では細胞外トリプシンがヌクレアーゼのプロセッシングを担うと報告されていたが、*S. griseus* で簡単に調べた結果では同じ役割を果たしてはいないようであった。細胞外トリプシンの形態分化への寄与は種によりその程度は異なるのかもしれないが、AdpA によって栄養増殖後である孢子形成時に細胞外トリプシン活性が活性化されるその生物学的な意味は非常に興味深い。

2.1.2-IV 材料および方法

以下、特に記載のないものはこれまで述べた実験と同様の材料・方法である。以下の記述で名前のみ記したプライマーの位置・配列等については表 2.1.2-1 にまとめた。

分泌蛋白質の部分精製と *sprT* の同定

S. griseus IFO13350 と HH1 株を 60 ml の R2YE 液体培地に植菌し、28°C で 3 日間前培養した。これを 6 L の R2YE 液体培地に植菌して 28°C で 3 日間本培養した。培養液を 4°C、15,000rpm で 30 分遠心し、上清を TCA 沈殿することにより培地中の分泌蛋白質を濃縮した。沈殿をバッファーA (10 mM potassium phosphate, pH7.0) にとかし、バッファーA で一晚透析した。透析したサンプルをバッファーA で平衡化しておいた Resource-S 陽イオン交換カラム (Amersham) にロードし、NaCl グラジエント (0–1 M, 流速 1 ml/min) で溶出した。蛋白質が含まれる画分を TCA 沈殿して濃縮し、SDS-PAGE を 4–20% グラジエントゲルで行い分泌蛋白質のプロファイル解析をした。*S. griseus* IFO13350 と HH1 株で発現が異なる蛋白質については polyvinylidene difluoride Immobilon membrane (Millipore) にトランスファーし、切り出してエドマン分解を用いたプロテインシーケンスにより N 末端のアミノ酸配列を決定した。

sprT および *sprU* を含む DNA 断片の取得

NCBI データバンクに登録された *sprT* の塩基配列をもとに *S. griseus* IFO13350 の染色体を鋳型として PCR を行い、DNA プローブとした。これを用いたサザンハイブリダイゼーションとコロニーハイブリダイゼーションにより *sprT* を含む 6.6 kb の DNA 断片を取得した。また、パラログの *sprU* は *sprT* 内の *NcoI*-*Bam*HI、0.5 kb の領域の DNA 断片をプローブとして同様に取得した。*sprT* とその周囲を含む約 2.0 kb、*sprU* とその周囲を含む約 2.6 kb の塩基配列を決定した。

ゲルシフトアッセイ法による AdpA 結合解析

AdpA の調製方法、プローブの作製方法、反応条件などは前章までと同様である。プローブ作製に用いたプライマーの組み合わせについて記述する。

sprT について、

probe T1 : T1-F+T1-R、probe T2 : T2-F+T2-R、probe T3 : T1-F+T3-R、probe T4 : T4-F+T1-R、probe T5 : T5-F+T3-R、probe T6 : T1-F+T6-R

sprU について、

probe U1 : U1-F+U1-R、probe U2 : U2-F+U2-R、probe U3 : U3-F+U3-R、probe U4 : U1-F+U4-R、

probe U5 : U5-F+U5-R、probe U6 : U6-F+U2-R、probe U7 : U6-F+U1-R

S1 マッピング法による転写解析

RNA 抽出法、および S1 マッピング法は前章までと同じ方法である。*hrdB* の転写は 5'-TCGATGAGCGCCATCACAGACTCG-3' (+193 to +170) と 5'-TCGGCCCAATTCGTCACGTATGAG-3'* (-121 to -98) の組み合わせ (*のプライマーを ³²P ラベルした)、*adpA* の転写は 5'-CGGTTCGGTAATCCGGCCCTG-3' (-274 to -255) と 5'-TCTACTGCGTCGCGTGGTCC-3'* (+150~+131) の組み合わせを用いて作製したプローブを用いて検出した (Ohnishi *et al.*, 1999; Shinkawa *et al.*, 1995)。*sprT* および *sprU* の高解像度 S1 マッピング法には TS1H-F と T1-R*、および U5-F と U1-R*を用いた。*sprT* および *sprU* の低解像度 S1 マッピング法には TS1L-F と TS1L-R*、および U5-F と U1-R*を用いた。

RT-PCR による転写解析

S1 マッピング法と同様に ISOGEN 法により抽出した RNA を用いた。逆転写反応は 3 μg の RNA を鋳型として、2 pmol の T-RT プライマー (*sprT* 用) または U-RT プライマー (*sprU* 用) と SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて行った。*sprT* の cDNA 検出には Trt-F と Trt-R、*sprU* の cDNA 検出には Urt-F と Urt-R のプライマーセットを用いて PCR を行い、それぞれ 274 bp および 255 bp のバンドを電気泳動で検出した。PCR 条件 : 98°C 20 秒、61°C 30 秒、72°C 45 秒、合計 25 サイクルで行った。

DNase I フットプリント法による AdpA 結合部位の決定

AdpA の調製方法、プローブの作製方法、反応条件などは前章までと同様である。プローブ作製に用いたプライマーの組み合わせは TS1H-F と Tfp-R (*sprT* 用)、Ufp-F と Ufp-R (*sprU* 用) であり、各々 ³²P ラベルによりセンス鎖、アンチセンス鎖を検出した。

AdpA 結合部位への変異導入

sprT 上流の AdpA 結合部位の中ほどにある CCGAAA 配列を GGTACC (*KpnI* 認識配列) に PCR を用いて置換した。2 つの DNA 断片を、5'-GGAATTCGACGACGATCCCGTCCTCG-3' (-540 ~ -521、下線は *EcoRI* 認識配列) と 5'-CGGGGTACCCCAAGCTCGTACGCGCCACC-3' (-51 ~ -70、下線は *KpnI* 認識配列)、および 5'-CGGGGTACCTGTGCGCCTTGTGGCAGCGG-3' (-44 ~ -25、下線は *KpnI* 認識配列) と 5'-CCTGGATCCACTCGTCGGCGTTG-3' (+747 ~ +725、下線は *BamHI* 認識配列) のプライマーセットを用いて増幅し、pUC19 の *EcoRI*-*BamHI* サイトに *KpnI* を介してつなげて組み込んだ。DNA シークエンスで PCR エラーがないことを確認し、この変異を TM

と呼ぶことにする。

sprU 上流の AdpA 結合部位の中ほどにある CCGAAA 配列を GGTACC (*KpnI* 認識配列) に PCR を用いて置換した。2 つの DNA 断片を、RV (Takara Shuzo) と 5'-CGGGGTACCCCAAGATCATCGGGGCGCGT-3' (-51~-69、下線は *KpnI* 認識配列)、および 5'-CGGGGTACCAGTGCACCTTGTGGCAGCGG-3' (-43~-24、下線は *KpnI* 認識配列) と M4 (Takara Shuzo) のプライマーセットにより PCR で増幅し、pUC19 の *EcoRI*-*BamHI* サイトに *KpnI* を介してつなげて組み込んだ。PCR の鋳型には pUC18 に *SacI*-*HindIII* (-439~+253) 断片をクローニングしたものを用いた。DNA シークエンスで PCR エラーがないことを確認し、この変異を UM と呼ぶことにする

TM および UM の AdpA 結合をゲルシフトアッセイで調べる際には、それぞれ Tbd-F と Tbd-R および Ubd-F と Ubd-R のプライマーセットを用いて PCR 増幅して得た、239 bp (-162~+77) および 240 bp (-164~+76) のプローブを ³²P ラベルして用いた。

野生型のプロモーターと *sprT* 全長をもつ低コピープラスミド pTW、および TM 変異導入型 pTM は以下のように作製した。*sprT* を含む 3.5 kb の *Aor51HI* (-516 位) -*BamHI* 断片を pUC19 にクローニングした。ここで、pTM 作製用には 1.3 kb の *Aor51HI*-*BamHI* 領域 (-516~+740) を TM 変異導入の施した断片と置換しておいた。*EcoRI* (マルチクローニングサイト) と *SalI* (+1318 位) で全長 *sprT* とその上流領域を切り出し、低コピーベクター pKU209 の *EcoRI*-*XhoI* サイトに導入し、pTW および pTM を作製した。

同様に、pUW および pUM を以下のように作製した。1.5 kb の *SacI*-*Aor51HI* 断片 (-439~+1089) を pUC19 にクローニングした。ここで、pUM 作製用には 0.7 kb の *EcoRI* (マルチクローニングサイト) -*HindIII* (+253 位) 断片を UM 変異を含む断片で置換しておいた。マルチクローニングサイトを利用して *EcoRI*-*SalI* 断片として切り出し、低コピーベクター pKU209 の *EcoRI*-*XhoI* サイトに導入し、pUW および pUM を作製した。

sprT 遺伝子破壊株の作製

sprT 遺伝子破壊は薬剤耐性遺伝子を挿入することにより行った。*sprT* 上流領域 4.6 kb と下流領域 2.0 kb (いずれも *BamHI* 断片) を pUC19 の *BamHI* サイトにクローニングした。*sprT* の 5' 領域を含む 1.7 kb の *EcoRI*-*NcoI* (+242 位) 断片と Tn5 から切り出したカナマイシン耐性遺伝子を含む 2.4 kb の *NcoI*-*KpnI* 断片を、pUC19 に *sprT* 下流領域 2.0 kb (+740 位より下流) をクローニングしたプラスミドの *EcoRI*-*KpnI* サイトに 3 断片ライゲーションで挿入した。これにより、*sprT* 内の *NcoI*-*BamHI* 領域 (*SprT* の Met-56-Ile-222 に対応する) にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されている。このプラスミドを *E. coli* JM110 株により大量調製し、*DraI* で切断して線状にした後、0.1 M NaOH でアルカリ変性-中和を施し、*S. griseus* IFO13350 に形質転換した。破壊

株は染色体を抽出してサザンハイブリダイゼーションを行うことで確認した。

sprU 遺伝子破壊株の作製

sprU 遺伝子破壊はインフレーム欠失株 (sprU の+366~+1004、SprU の Ala-40-Ala-252 に対応する領域の欠失) を作製することにより行った。Arg-39 にあたるコドンから上流 1.1 kb と Asp-253 にあたるコドンから下流 1.1 kb を以下のプライマーの組み合わせを用いて PCR で増幅した。5'-CCGGAATTCGTACGCCGTGTACGCCTGGG-3' (下線は EcoRI サイトを示す) と 5'-CGCGGATCCGCGTTCCCCGCCGACGATCG-3' (下線は BamHI サイトを示す) で上流を、5'-CGCGGATCCGACTCGCTCTGACCCCGGTC-3' (下線は BamHI サイトを示す) と 5'-CCCAAGCTTCAGGACGAGTCGTTCCAGCC-3' (下線は HindIII サイトを示す) で下流を増幅した。pUC19 にクローニングしてシーケンスチェックを行うことで PCR エラーがないことを確認した。続いて 2 つの断片を BamHI を介して結合して pUC19 の EcoRI-HindIII サイトに挿入した。pUC19 のマルチクローニングサイト外側にある PvuII で切り出し、Tn5 由来カナマイシン耐性遺伝子を pUC19 にクローニングしておいたプラスミドの SmaI サイトに挿入し、破壊用プラスミドとした。これを E. coli JM110 株により大量調製し、アルカリ変性-中和を施して S. griseus IFO13350 に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、プラスミドが抜け落ち sprU 欠失株となったものを選択・取得した。

sprTsprU 遺伝子同時破壊株の作製

sprU 遺伝子破壊株を親株として同様に sprT 遺伝子破壊を行うことで同時破壊株を取得した。

トリプシン活性測定

プレート培養菌体からの RNA 抽出と同様に YMPD 培地の上にセロハンをひいて植菌し培養した。菌体とセロハンを取り除き、菌体量をはかった後、プレート培地から 5 cm×5 cm の正方形で培地を切り出し、10 ml のトリプシンアッセイバッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 20 mM CaCl₂) とともに 50 ml のシリンジを数回通し粉碎・懸濁することで培地中の分泌蛋白質を抽出した。遠心して寒天を除き、分泌蛋白質溶液とした。890 μl のトリプシンアッセイバッファー、10 μl の 50 mM N-benzoylarginine p-nitroanilide (BAPNA) と混合し合計 900 μl とし、37°C で 5 分間インキュベート後、100 μl の分泌蛋白質溶液を混合して 37°C で 15 分間インキュベートして反応させた。30%酢酸 (in dioxane) を 400 μl 加えることで反応を止め、405 nm の吸光度を

測定することで BAPNA から遊離した *p*-nitroanilide 量を測定した。活性の 1 ユニットは 1 分間に 1 μ mol の *p*-nitroanilide を生成するのに必要な酵素量とした (Sarath *et al.*, 1989)。

ヌクレアーゼ活性染色

菌株はトリプシン活性測定と同様に、ただしセロハンをひかずに YMPD 固体培地で 72 時間培養した。菌体ごと培地の分泌蛋白質を、トリプシン活性測定と同様にサンプルバッファー (20 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM NaCl) 10 ml に懸濁・抽出した。遠心して寒天を除き、上清を 0.22 μ l のフィルターでろ過した後、3 倍量のアセトンを加え -20°C で 45 分放置。 4°C , 13,000 rpm で 20 分遠心し、蛋白質を濃縮した。沈殿をサンプルバッファー 500μ l にとかして分泌蛋白質溶液とした。これをサケ精子 DNA 10 mg/ml を含む SDS-PAGE ゲルにて分離した後、ゲルをサンプルバッファーに浸し、 4°C で 2 時間振とう (途中 2 回ほどバッファーを新鮮なものにかえる) することにより蛋白質を再生した。蒸留水で数回すすぎ、反応バッファー (20 mM Tris-HCl(pH8.0), 7 mM 2-mercaptoethanol, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 10% DMSO) に浸して 37°C で 4 時間反応した。エチジウムブロマイド染色後、UV イルミネーターでサケ精子 DNA の分解をヌクレアーゼ活性として検出した。以上は、Nicieza *et al.*, 1999 を参照した。

走査型電子顕微鏡観察

各種寒天培地上で適宜培養したプレートから培地ごと菌体を切り出したサンプルを 2% osmium tetroxide で 40 時間固定処理した。風乾後、白金処理を行い、Hitachi S4000 走査型電子顕微鏡にて観察した。

表 2.1.2-1 使用したプライマー

Gene	Primer	Positions	Sequence(5' to 3')
<i>sprT</i>			
	T1-F	-448 to -429	CCCGGGGCATCGCCCGCCGC
	T1-R	+61 to +42	TGGGGGGTTCGCTGTGGGAAC
	T2-F	-112 to -93	GCGTCCCCGGTCCGCGTGAC
	T2-R	+7 to -13	TCAAGATGCTGCGATTGTCG
	T3-R	-61 to -80	ACGCGCCACCACCGCCCCTC
	T4-F	-34 to -15	GTGGCAGCGGCCACCCGTTC
	T5-F	-238 to -219	GCCCTCCGGCAGACGGGTAG
	T6-R	-219 to -238	CTACCCGTCTGCCGAGGGC
	TS1H-F	-112 to -93	GCGTCCCCGGTCCGCGTGAC
	TS1L-F	-313 to -294	AACTGTCCGCGCCCGTCGAG
	TS1L-R	+60 to +41	GGGGGGTTCGCTGTGGGAACC
	Tfp-R	+7 to -13	TCAAGATGCTGCGATTGTCG
	T-RT	+629 to +610	CTCGTTGCCGTAGGCGGAGC
	Trt-F	+5 to +24	TGACGGGTGCATGACCATGC
	Trt-R	+278 to +259	GATGTCCTGGGCGTAGAGGG
	Tbd-F	-162 to -143	GGCGTACGTGACACGACCGC
	Tbd-R	+77 to +58	GGATTGCCTTCTTTTCGTGGG
<i>sprU</i>			
	U1-F	-444 to -425	GAGCTCGATGAAGTACTCGG
	U1-R	+96 to +77	GGAAGTGCTGTGGGTTCGCGC
	U2-F	-200 to -181	GAGCGGACCGTGTCCAGATG
	U2-R	+277 to +258	CACCTTTTCAGCACGCTCAG
	U3-F	+77 to +96	GCGCGACCCACAGCACTTCC
	U3-R	+566 to +547	GGCCTGGAGGACCTTGGTGG
	U4-R	-181 to -200	CATCTGGACACGGTCCGCTC
	U5-F	-193 to -174	CCGTGTCCAGATGCGGAAAG
	U5-R	-67 to -86	CGTTCGCGGCCCCCTCCTCC
	U6-F	-24 to -5	GTCACGCGGCACCGATAATC

Ufp-F	-113 to -94	GTCGACGGACTCCACTGTAT
Ufp-R	+29 to +10	CCGAACTAGTCATGTACTCG
U-RT	+392 to +373	CATGAACGGGAACTCGCCCT
Urt-F	+77 to +96	GCGCGACCCACAGCACTTCC
Urt-R	+331 to +312	GAGGCGGGCTGGAGACTGAC
Ubd-F	-164 to -145	ACAGGTGCGCCCGGAGGGCC
Ubd-R	+76 to +57	GGTCCGGCACGCGTGTCCCG