

第二章 ArpA の A-ファクター結合変異体の解析

—カスケードの主要な役割を担う ArpA の標的遺伝子は *adpA* のみである

2.2-I 背景および目的

「A-ファクターがその特異的受容体 ArpA と結合することでカスケードが動き始める」というモデルは遺伝学的解析により構築された。序論にも述べたが、まず A-ファクター欠損株である HHI が取得され、この株は形態分化・二次代謝を行わず、その形質は A-ファクターの添加により回復することが示された。さらに HHI のサプレッサー変異体である KM7 および HO1 株は各々 A-ファクター非依存的に形態分化・二次代謝を行うが、一方ではこれらの細胞抽出液からは野生株でみられるような A-ファクター結合蛋白質の活性は見いだされなかった (Miyake *et al.*, 1990; Onaka *et al.*, 1997)。こうして、形態分化と二次代謝を抑制している、その特異的受容体を介して A-ファクターは働いていることが推測された。

その後 ArpA をコードする遺伝子がクローニングされ、引き続いて DNA 結合能を *in vitro* に於いて解析すると、ArpA は 5'-GG(T/C)CGGT(A/T)(T/C)G(T/G)-3' のパリンδροーム配列に結合することも明らかとなった (Onaka and Horinouchi, 1997)。このようなコンセンサス配列をオペレーターにもつ遺伝子を標的として ArpA は転写抑制を行っていることが推測されたが、ストレプトマイシン生合成の経路特異的転写因子である StrR をコードする遺伝子上流にはコンセンサス配列は見られず、実際 ArpA は結合しなかった。したがって、少なくとも二次代謝の、ストレプトマイシン生合成への A-ファクターシグナルの到達には他の因子の介在が必要であり、ArpA と形態分化・二次代謝をつなぐシグナル伝達経路は全く不明のままであった。一方で、A-ファクター制御カスケードの解析は *strR* 上流に A-ファクター依存的に結合する転写因子の同定という、「下流からの」アプローチも行われた。その結果、*strR* 上流に結合することによって *strR* の転写を促し、ストレプトマイシン生産を開始させる転写活性化因子、AdpA が取得された (Ohnishi *et al.*, 1999)。*adpA* 遺伝子破壊株は予想通りストレプトマイシン生産能を失ったが、意外にも形態分化能も失っていた。さらに、*adpA* のプロモーター領域の塩基配列を調べると、ArpA 結合配列が見いだされ、実際 *in vitro* での結合も確認された。こうして、A-ファクターシグナルはその受容体 ArpA と転写活性化因子 AdpA を介して形態分化・二次代謝を引き起こすことが明らかとなった。

このようにして A-ファクターと受容体 ArpA による制御モデルは構築されたが、依然としてこれまで解析されてきた *arpA* 変異株は全て HHI 由来であった。HHI は *afsA* 遺伝子を含む染色体領域が大きく欠失した変異株であり、A-ファクター生合成のみならず他の遺伝子の変異も含まれる。*arpA* のみを欠失した変異株は解析されていなかったため、これまで観察された *arpA*

変異株の形質は他の変異によるものであることも否定できないことから、まず *arpA* 遺伝子破壊株の作製を行い、形質を観察することにした。

ところで、A-ファクターの ArpA との結合については *in vitro* 解析により詳しく調べられている。部位特異的変異によるアラニンスキャニングにより、119 番目のトリプトファン (W119) が A-ファクター結合に必須であることが示されている (Sugiyama *et al.*, 1998) (図 2.2-1)。ArpA の *S. coelicolor* A3(2)におけるホモログである CprB の結晶構造 (Natsume *et al.*, 2004) によれば、W119 はリガンドポケット内でブチロラクトン骨格と相互作用すると予想された。W119A 変異の ArpA は DNA 結合を保持しつつ A-ファクター結合を失う。したがって、この変異を染色体に導入すれば A-ファクター非感受性の形質を示すはずである。*arpA* 遺伝子破壊株の作製と同時にこのような点変異導入株を作製することによっても ArpA の機能解析を行うことにした。

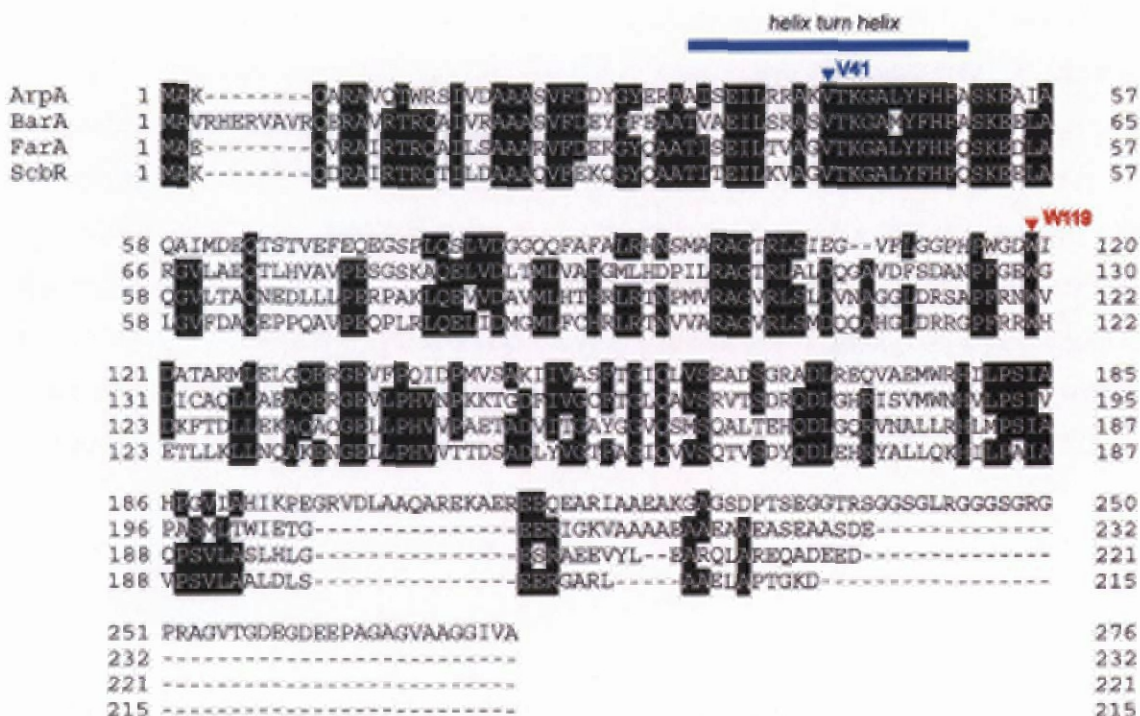


図 2.2-1 γ-ブチロラクトン受容体のアミノ酸アラインメント

ArpA (*S. griseus*)、BarA (*S. virginiae*)、FarA (*S. lavendulae*)、ScbR (*S. coelicolor* A3(2)) について表した。青色で DNA 結合ドメインであるヘリックス-ターン-ヘリックスとアラニン置換が DNA 結合を失わせる V41 残基の位置を示した (Sugiyama *et al.*, 1998)。赤色は A-ファクター結合に必須の W119 残基である。

また、他の *Streptomyces* では γ -ブチロラクトン受容体がその特異的なリガンドの生産調節に関与することが示されており、A-ファクターにおいて同様な機構が存在するか否かにも興味を持たれた。*S. virginiae* における *arpA* ホモログ *barA*、および *S. coelicolor* A3(2)における *scbR* の遺伝子破壊を行うと対応する γ -ブチロラクトンの生産量が消失することが示されている (Nakano *et al.*, 1998; Takano *et al.*, 2001)。また、*S. lavendulae* における *arpA* ホモログ *farA* の遺伝子破壊は対応する γ -ブチロラクトンの生産量が激減する (Kitani *et al.*, 2001)。この点について比較を行うため上記の *arpA* 変異株を用いて解析を行った。

ArpA の標的遺伝子探索は、*in vitro* 解析により決定された結合配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション、あるいはゲルシフト PCR 法を用いた染色体上の結合 DNA 配列の取得といったアプローチによって醗酵学研究室で精力的になされてきた。その結果、結合 DNA 断片として ABS2、および ABS3 が取得された (ABS : ArpA-binding sequence、ABS1 は *adpA* のプロモーターである)。しかし、ABS2 に関しては ArpA 結合配列に変異を導入した株を作製しても周囲の ORF の転写に影響は見られず、またその ORF の遺伝子破壊株を作製しても顕著な形質は見られなかった。ABS3 に関してはその周囲のプロモーターからの転写を SI マッピング法により調べたところ、プロモーター活性がそもそもないことが明らかになった。このように、ArpA の標的遺伝子探索は難航を極めていた。一方、前述のように *adpA* 遺伝子破壊株は我々が観察することができる形態分化・二次代謝の形質は全て失っていた。すなわち、ArpA が形態分化・二次代謝の制御を行う上で発現調節をしている標的遺伝子は *adpA* のみであっても全く矛盾しないわけである。*arpA* 変異株を利用することにより、この章ではこの点についての解析も進めた。

2.2-II 結果

arpA 遺伝子破壊株 ($\Delta arpA$) の作製とその形質

まず、*arpA* の遺伝子破壊株の作製を行った。*arpA* の遺伝子破壊株にはインフレーム欠失の方法を用いることにした (図 2.2-2)。

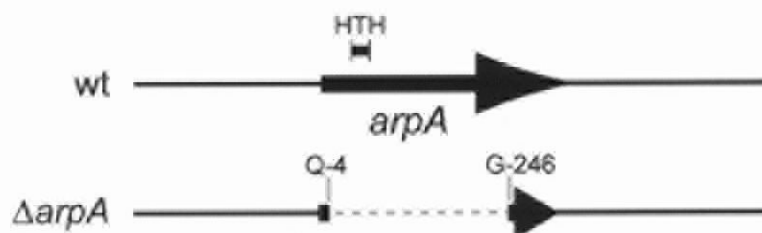


図 2.2-2 *arpA* 遺伝子破壊株の概略

インフレーム欠失によって $\Delta arpA$ 株の染色体上では ArpA の Ala-5 から Gly-245 に対応する塩基配列が欠失している。この中には DNA 結合ドメインであるヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) も含まれる。

作製した $\Delta arpA$ 株の形質を観察すると、「無秩序に A-ファクターカスケードが動き出す」という、これまでのモデルから予想された通りの *arpA* 欠損の形質が形態分化・二次代謝両方において見られた。野生株では 36 時間培養より白色の気中菌糸形成が観察され、60 時間でコロニー全体が気中菌糸となっているのに対し、 $\Delta arpA$ 株では 24 時間の早い段階で既に気中菌糸形成は開始しており、36 時間でコロニー全体が気中菌糸形成を行った状態となっていた (図 2.2-3)。 $\Delta arpA$ 株は栄養増殖が十分でない早期から形態分化を行うため、形成するコロニーは小さくなる傾向があった (図 2.2-12 の液体培養の生育曲線も参照)。また、ストレプトマイシン生産も野生株では 2 日目から見られるのに対し、 $\Delta arpA$ 株では培養 1 日目からわずかながら生産が見られ時期が早まっており、かつ $\Delta arpA$ 株ではより多くの生産量を示した (図 2.2-4)。低コピープラスミドで野生型の *arpA* を導入することでこれらの形質は相補された (図 2.2-5)。A-ファクター生産については後述する。

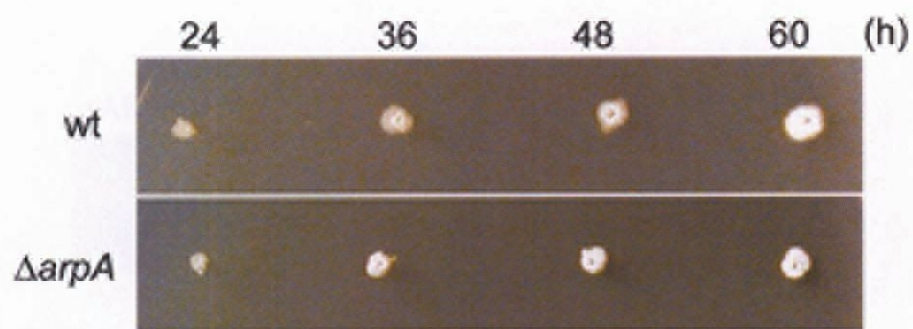


図 2.2-3 *arpA* 遺伝子破壊の形態分化への影響

YMPD 固体培地につまようじで点植菌し、28°C でそれぞれの時間培養した。 $\Delta arpA$ 株では 36 時間で既にコロニー全体が気中菌糸（白色）を形成している。

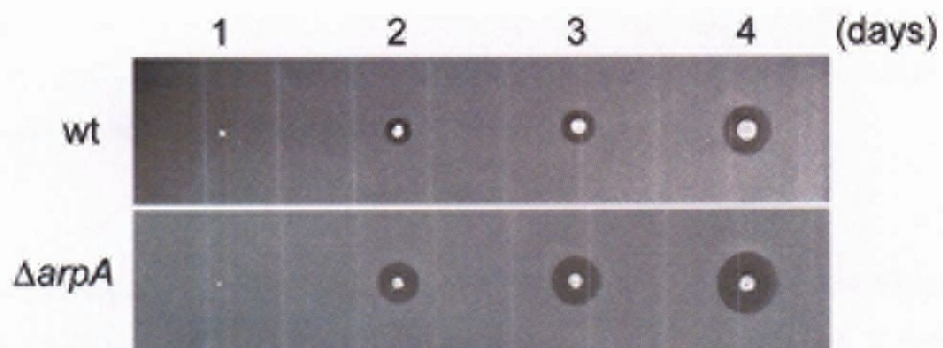


図 2.2-4 *arpA* 遺伝子破壊の二次代謝（ストレプトマイシン生産）への影響

グルコースなしの Bennett 培地につまようじで点植菌し、28°C でそれぞれの時間培養した。その後、*Bacillus subtilis* の胞子を重層し、37°C で一晩培養して阻害円の大きさをストレプトマイシン生産量として比較した。培養を通じて $\Delta arpA$ 株のストレプトマイシン生産量は多い。

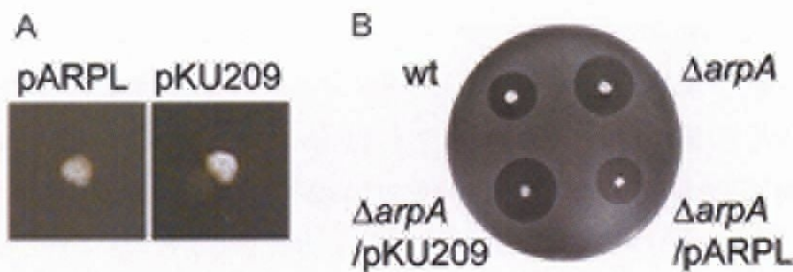


図 2.2-5 *arpA* 遺伝子破壊株の相補

(A)形態分化の比較。pARPL (相補用プラスミド) および pKU209 (コントロール) で *arpA* 遺伝子破壊株を形質転換した。これらの株を YMPD 固体培地につまようじで点植菌して 28°C で 36 時間培養した。pARPL を導入した株では形態分化が遅れ基底菌糸のみであるが、pKU209 を導入した株では $\Delta arpA$ 株と同様に形態分化が早く、気中菌糸を形成している。(B) 二次代謝 (ストレプトマイシン生産) の比較。グルコースなしの Bennett 培地につまようじで点植菌し、28°C で 3 日間培養した後、*Bacillus subtilis* 孢子液の重層により検出した。pKU209 を導入した $\Delta arpA$ 株 ($\Delta arpA/pKU209$) では $\Delta arpA$ 株と同様ストレプトマイシン生産量は多いが、pARPL を導入した株 ($\Delta arpA/pARPL$) では生産が抑制されている。

さらに、液体培養した野生株と $\Delta arpA$ 株から抽出した RNA を用い、ArpA の標的遺伝子である *adpA* の転写量を SI マッピング法により調べた (図 2.2-6)。野生株では培養 12 時間~24 時間で *adpA* の転写量はピークを迎えるのに対し、 $\Delta arpA$ 株では培養 6 時間からこのピークを上回る量の転写を示した。また、培養を通じて $\Delta arpA$ 株ではより多くの *adpA* の転写が見られた。これは、上記の形質と一致する結果であった。

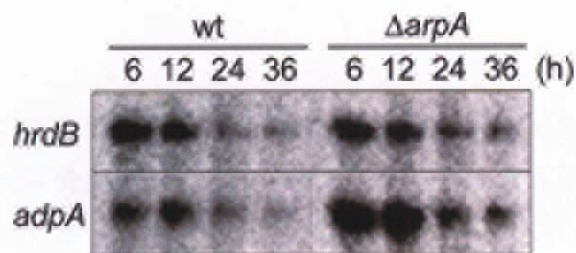


図 2.2-6 SI マッピング法による野生株と $\Delta arpA$ 株における *adpA* の転写の比較

YMPD 液体培地で 30°C においてそれぞれの時間培養した菌体から 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。

MK2 株 (*arpA::W119A* 点変異株) の作製とその形質

次に、*arpA* 遺伝子破壊とは逆の方向から A-ファクターカスケードにおける ArpA の役割と機能を調べるアプローチを行った。すなわち ArpA が A-ファクターに関係なく抑制能を保持したままであり、*arpA* より下流のシグナル伝達が全てストップした株を作製し、解析を行った。これには、ArpA が A-ファクターと結合するのに必須の残基であり、DNA 結合には関与しない 119 番目のトリプトファンをアラニンに置換した変異型 ArpA (ArpA-W119A) を持つ株を作製することにより行った。遺伝子破壊のときと同様に、変異型 *arpA* およびその上流と下流の DNA 配列を組み込んだプラスミドを形質転換により染色体に組み込み、その後野生型 *arpA* が抜け落ち変異型 *arpA* のみが残った株を得ることで *arpA::W119A* 点変異株 (MK2 株と命名) を取得した (図 2.2-7)。

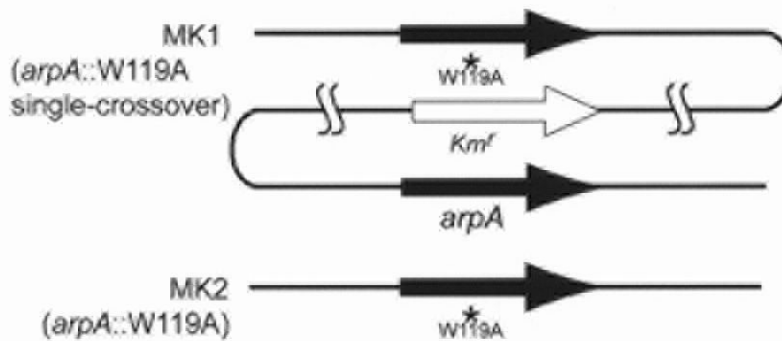


図 2.2-7 MK1 株および MK2 株の概略

MK1 株には野生型の *arpA* と変異を導入した *arpA::W119A* の変異型 *arpA* の両方が染色体上に存在する。MK2 株では野生型が抜け落ち、*arpA::W119A* の変異型 *arpA* のみが染色体上に残っている。点変異が *arpA* 内に存在する以外は野生型と同じである。

MK2 株について形質を観察すると、MK2 株は形態分化をせず肌色の基底菌糸のみであり、ストレプトマイシン生産や黄色色素生産といった二次代謝を行わない、A-ファクター非感受性の株であった (図 2.2-8)。A-ファクターカスケードのモデルがストップした場合に予想される形質と一致した、と言える。さらに、プレート培養した野生株および MK2 株の菌体から RNA を抽出し、ArpA の標的遺伝子である *adpA* の転写を S1 マッピング法により調べると、MK2 株では *adpA* の転写はほぼ完全に抑えられていた (図 2.2-9)。このことから、MK2 株の細胞内では A-ファクターの有無に関わらず ArpA-W119A が ArpA 標的プロモーターに結合したままその転写活性を強く抑制していること、ArpA の標的遺伝子は形態分化・二次代謝に必須の役割を

担っていることが示された。MK2 株の A-ファクター生産については後述する。

なお、変異導入用プラスミドを形質転換し得られた、1 回組み換え体（染色体上に野生型と ArpA-W119A の両方の ArpA をコードする配列が存在する。図 2.2-7 参照。）MK1 株は MK2 株と同様の形質を示した。このことは W119A 変異がドミナントネガティブ変異であるということを示す。すなわち、野生型 ArpA の存在如何に関わらず A-ファクター非感受性となった ArpA-W119A が十分に ArpA の標的プロモーターを抑制している、ということが言える。

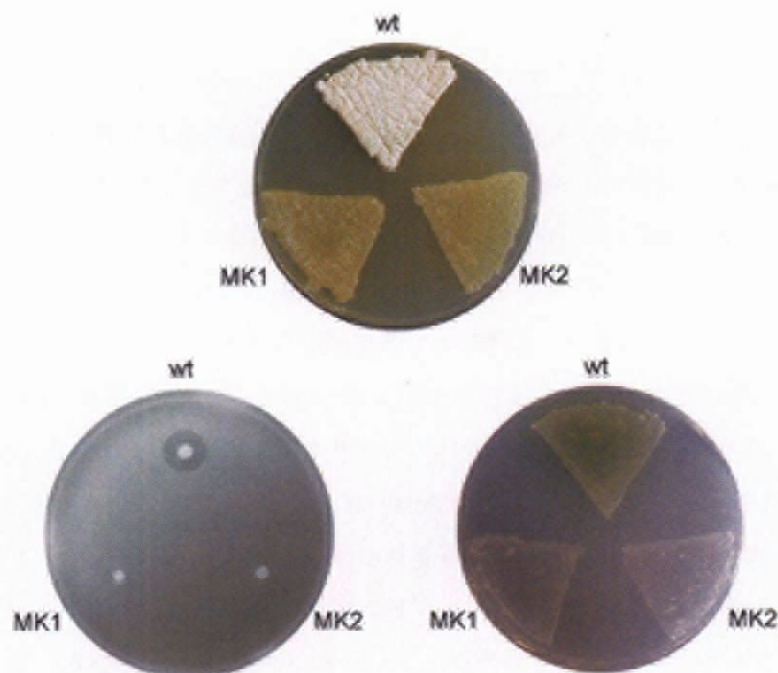


図 2.2-8 MK1 株および MK2 株の形質

[プレート上]形態分化の比較。それぞれの株を YMPD 固体培地にぬり、28°C において 3 日間培養した。wt（野生株）以外は基底菌糸（肌色）のままである。[プレート左下]二次代謝（ストレプトマイシン生産）の比較。グルコースなしの Bennett 培地につまようじで点植菌し、28°C で 3 日間培養した後、*Bacillus subtilis* 孢子液の重層による阻害円により検出した。[プレート右下] 二次代謝（黄色色素生産）の比較。それぞれの株を SMM-PO₄ プレート（黄色色素生産培地）にぬり、28°C において 3 日間培養した。wt（野生株）のみ黄色色素を生産して黄色になっている。

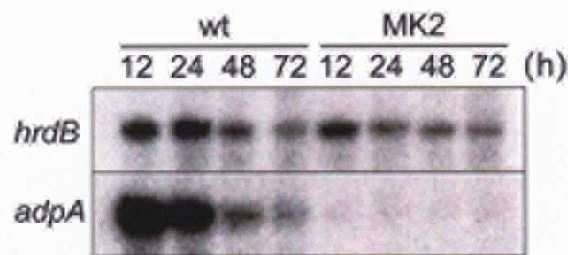


図 2.2-9 SI マッピング法による野生株と MK2 株における *adpA* の転写の比較

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から 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。

形態分化・二次代謝に関わる ArpA の標的遺伝子は *adpA* のみで十分ある

次に、MK2 株を利用することによって、「二次代謝・形態分化に関わる、ArpA の標的遺伝子は *adpA* 以外に存在するのか？」という疑問を調べる実験を行った。MK2 株は ArpA-W119A により、A-ファクターカスケードの *arpA* より下流のシグナル伝達は全てストップしている株である。ここで、*adpA* 以下のシグナル伝達経路だけを活性化させるような細工を施し、その形質を観察すれば *adpA* 以下のカスケードの役割・重要性を調べることができるはずである。この実験を行うには、*adpA* を大腸菌の *lac* プロモーターにつなぎ、A-ファクターシグナルに依存しないで AdpA を強制発現させるような低コピープラスミド、pADP20L を利用することにした。コントロールとして、プロモーターが *adpA* プロモーターそのままである pADP10L を用いた。なお、放線菌においても *lac* プロモーターが機能することはすでに報告されており (Ohnishi *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 1996)、また pADP20L を導入した際の転写も SI マッピング法により確認している。

これらのプラスミドを MK2 株に形質転換し、形質を調べた結果、AdpA を強制的に発現させた MK2/pADP20L では形態分化が回復し、ストレプトマイシン生産および黄色色素生産の二次代謝も回復していた (図 2.2-10)。形態分化については走査型電子顕微鏡でも確認したが、隔壁の異常もなく、胞子は正常に成熟しているのが確認された (図 2.2-11)。一方、プロモーターを変えずに *adpA* を導入した MK2/pADP10L ではこれらの形質の回復は見られなかった。このことから、少なくとも我々が観察している条件下において「形態分化・二次代謝に必要な ArpA の標的遺伝子は *adpA* のみで十分である」ということが明らかとなった。

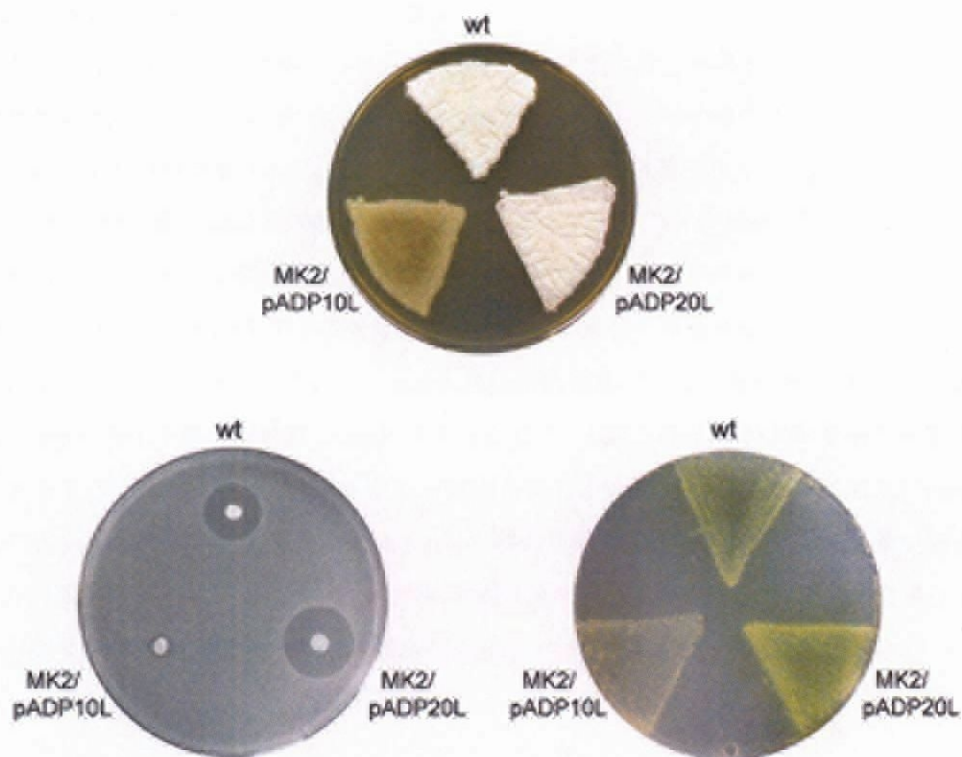


図 2.2-10 AdpA の強制発現による MK2 株の形質の相補

野生株 (wt)、pADP10L 導入株 (MK2/pADP10L)、pADP20L 導入株 (MK2/pADP20L) について調べた。それぞれの培養、検出法は図 2.2-8 と同様である。[プレート上] 形態分化の比較。[プレート左下]二次代謝 (ストレプトマイシン生産) の比較。[プレート右下] 二次代謝 (黄色色素生産) の比較。

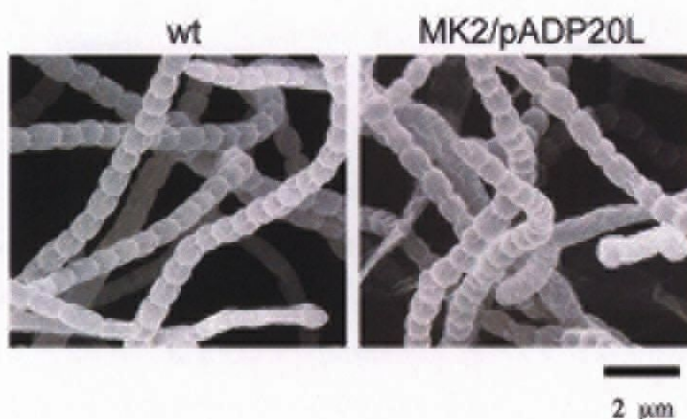


図 2.2-11 AdpA の強制発現による MK2 株の形質の相補 (電子顕微鏡観察)

野生株 (wt) および pADP20L 導入株 (MK2/pADP20L) を R2YE 固体培地上で 28°C において 3 日間培養し、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。どちらも胞子が正常に成熟している。

arpA および adpA 変異株の A-ファクター生産

これまで、A-ファクター生産については *afsA* が生合成に強く関与していること以外、その制御機構を含めて不明である。また、はじめに述べたように γ-ブチロラクトンシグナルの生産はその受容体により制御されていることが他の *Streptomyces* で報告されている。そこで、野生株、*arpA* 破壊株、MK2 株、*adpA* 破壊株について A-ファクターの生産量を調べた (図 2.2-12)。

その結果、*arpA* 遺伝子破壊株は野生株とほぼ同じ量の A-ファクターを生産しており、他の *Streptomyces* の例とは異なることが明らかになった。しかし、予想外なことに MK2 株は野生株よりも多量の A-ファクターを生産し、*adpA* 遺伝子破壊株はさらに多量の A-ファクターを生産した。*adpA* 遺伝子破壊株では AdpA が完全になく、MK2 株ではわずかながら存在するということを考えると、AdpA が A-ファクター生産を何らかの形で負に制御しており、AdpA 量の差がこの違いに表れていると考えられる。*arpA* 遺伝子破壊株では細胞内 AdpA 量が増えていると考えられるが、A-ファクター生産の抑制には野生株での AdpA 量で十分であるために *arpA* 遺伝子破壊株でより A-ファクター生産が抑制されるということはないのだろう。

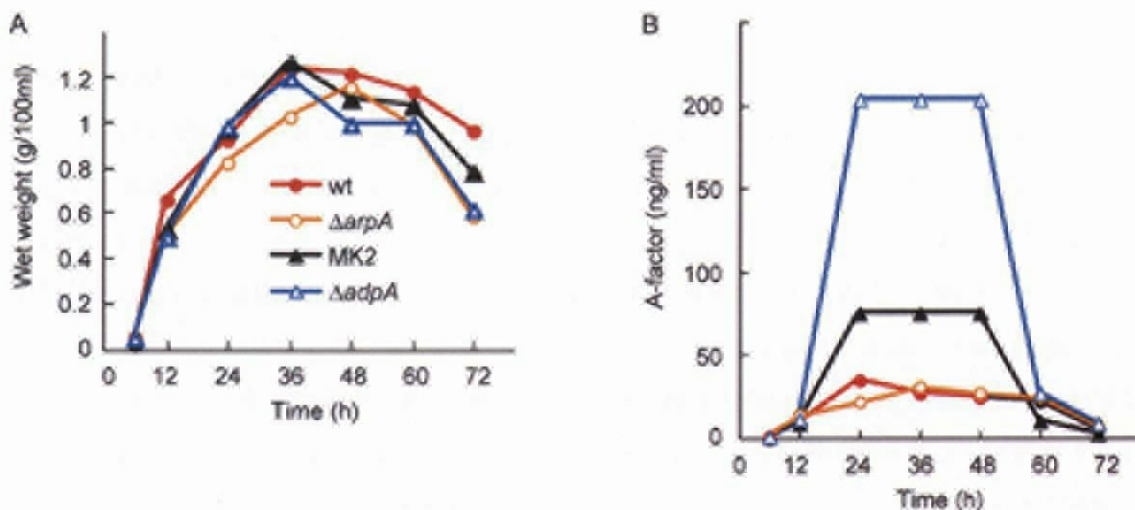


図 2.2-12 A-ファクターアッセイによる A-ファクター生産量の定量

野生株 (wt)、*arpA* 破壊株 ($\Delta arpA$)、MK2 株、*adpA* 破壊株 ($\Delta adpA$) を YMPD 液体培地で 28°C において培養した。(A)それぞれの株の生育 (液体培地 100 ml の菌体量)。 $\Delta arpA$ は A-ファクターカスケードが早く動き出すために他の株に比べて生育がやや低い。(B)A-ファクター生産量。培養上清 1 ml あたりの A-ファクター量を示した。

2.2-III 討論

arpA の各種変異株、 Δ *arpA* 株、MK1 株、MK2 株の作製と解析を行った本研究によって、A-ファクター受容体の機能についてこれまで示されてきたモデルが正しいことを確認できた。さらに、MK2 株を利用した解析によって ArpA の主要な標的遺伝子は *adpA* のみであることを証明できた。これらの結果によって、*S. griseus* と他種の制御系との比較が可能になったので、以下に述べる。

γ -ブチロラクトンシグナルによる制御システムは様々な *Streptomyces* 属でその存在が示されている。これらは γ -ブチロラクトンシグナルのみ、またはその受容体のみでの同定とその生理的機能の報告が多いが、4 種類の *Streptomyces* 属でシグナル分子と受容体の両方が同定されている。まず *S. griseus* における A-ファクターと ArpA、それから *S. coelicolor* A3(2)における SCB1 と ScbR (Takano *et al.*, 2001)、*S. virginiae* におけるバージニアブタノライドと BarA (Okamoto *et al.*, 1995)、*S. lavendulae* における IM-2 と FarA (Waki *et al.*, 1997) である。これらの制御系は各々生理的な機能を持っているが、大きな違いは A-ファクターと ArpA の系の生理的機能が二次代謝のみならず形態分化にも及んでいる点である (第一部の序論も参照)。他の 3 種は全て抗生物質生産の制御のみに働いている。

これに加えて他の 3 種とは異なり *arpA* は A-ファクター生産制御への関与はしていないということが本研究により明らかになった。他の *scbR*、*barA*、*farA* の遺伝子破壊株では対応する γ -ブチロラクトンの生産が消失、もしくは激減する。ScbR、BarA、FarA は自身の転写を抑える自己抑制を伴う制御機構を持っているが、これらはその機構とともに何らかの形で γ -ブチロラクトンの生産を正に制御しているのだろう (Kinoshita *et al.*, 1997; Kitani *et al.*, 1999; Takano *et al.*, 2001)。ArpA は自身のプロモーターへ結合せず、自己抑制機構は持っていないことがわかっている (data not shown)。*arpA* 遺伝子破壊株の A-ファクター生産は野生株と変わらず同様であるが、そのかわり ArpA の唯一の標的遺伝子である *adpA* によって A-ファクター生産は抑制的な制御を受けている。その制御機構は不明であるが、AdpA の標的遺伝子の 1 つがコードする蛋白質が生合成の制御系を負に調節しているか、もしくは A-ファクターを直接分解・修飾しているのではないかと考えている。また、いずれの株も培養後期には速やかに A-ファクター活性が失われた (図 2.2-12)。このメカニズムは不明であり興味を持たれるが、このメカニズムが A-ファクター量が多くなる 24~48 時間にも働いているとすれば、AdpA による A-ファクター抑制と関係があるかもしれない。

S. griseus では AdpA が二次代謝と形態分化の鍵となる転写因子として、様々な遺伝子の活性化を行う。この AdpA を唯一の標的として ArpA が制御を行うことにより、A-ファクターと ArpA の系が二次代謝と形態分化を同時に制御することを可能にしている。また AdpA は標的として

ストレプトマイシン生産の経路特異的転写因子である StrR の発現も制御する。他の γ -ブチロラクトン受容体の例でその標的が分かっているものでは、 γ -ブチロラクトン受容体が直接抗生物質生合成の制御を行っていると考えられるものばかりである。例えば *S. fradiae* の γ -ブチロラクトン受容体 TyIP はタイロシン生合成の経路特異的転写因子である TyIS をコードする遺伝子のプロモーターに結合してその発現を制御し (Stratigopoulos *et al.*, 2002)、また *S. pristinaespiralis* の SpbR はプリスティナマイシン生合成の経路特異的転写因子をコードする PapR1 のプロモーターを制御する (Folcher *et al.*, 2001)。また、*S. coelicolor* A3(2)の巨大プラスミド SCP1 にコードされるメチレノマイシン生合成クラスター (Bentley *et al.*, 2004) や *S. venezuelae* のジャドマイシン B の生合成クラスター (Yang *et al.*, 1995) には γ -ブチロラクトン受容体をコードする ORF が位置しており、それら抗生物質の生合成への関与を強く示唆している。上述の BarA をコードする遺伝子もバージニアマイシン生合成クラスターに位置している。 γ -ブチロラクトンによる制御系は二次代謝に関与するものが主要であるが、これは γ -ブチロラクトンシグナルが受容体を介して直接二次代謝の制御系に伝えられているからであろう。上述のように、ArpA は *adpA* を介してから A-ファクターシグナルを二次代謝生産の制御系に伝達している。

AdpA に関しては、同じく *S. coelicolor* A3(2)における AdpA ホモログ、AdpAc/BldH は形態分化に必須の役割を持っていることが明らかになっている (Nguyen *et al.*, 2003; Takano *et al.*, 2003)。しかし、こちらは γ -ブチロラクトンによる制御系とは独立な系である。すなわち、多くの場合 γ -ブチロラクトンによる制御系は二次代謝に強く関与し、AdpA の系は形態分化に強く関与しているが両者は独立な制御系であり、*S. griseus* はこの 2 つの制御系が 1 つに融合することによって A-ファクターの多様な生理的機能を生み出していると言することができる。

2.2-IV 材料および方法

arpA 遺伝子破壊株の作製

arpA 遺伝子破壊株の作製にはインフレーム欠失の方法をとった。図 2.2-1 も参照。このインフレーム欠失によって Ala-5 から Gly-245 の領域に対応する塩基配列が欠失する。以下に破壊用プラスミドの構築について述べる。*arpA* を含む 4.4 kb の *Sall* 断片は pARP-Sal として以前に pUC19 にクローニングされていた (Onaka *et al.*, 1995)。そこでさらに定法により *arpA* の下流領域 2.8 kb の *Bam*HI 断片を pARP-Bam として pUC19 にクローニングした。次に、*arpA* の Gln-4 より上流 0.3 kb をプライマー 5'-GGGTTCGGTTCGCCGGGACC-3' と 5'-CGGAATTCCTGCTTCGCCATTCCTGCC-3' (下線は *Eco*RI サイトを示す) を用いた PCR により増幅し、*Bam*HI-*Eco*RI 処理して pUC19 にクローニングした。PCR エラーがないことは DNA シークエンスにより確認した。pARP-Sal 内の領域でこの断片の *Bam*HI より下流にある領域 (1.3 kb の *Bam*HI-*Sall* 領域) を PCR により得た 0.3 kb の断片と取りかえた形の 3.4 kb の *Sall*-*Eco*RI 断片を作製し、さらに pARP-Bam から切り出した 2.8 kb の *Eco*RI-*Bam*HI 断片とつなげて pUC19 に組み込んだ。このプラスミドのマルチクローニングサイトに Tn5 から切り出したカナマイシン耐性遺伝子を含む 1.9 kb の *Bam*HI-*Hind*III 断片を組み込み、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 *arpA* 欠失株となったものを選択・取得した。

また、*arpA* の相補用プラスミド (pARPL) は *arpA* を含む 2.0 kb の *Xho*I-*Sall* 断片を pUC19 にクローニングした後、マルチクローニングサイトを利用して全長を *Eco*RI-*Sall* で切り出し、シャトルベクターである低コピーベクター pKU209 に組み込むことで作製した。

MK2 株 (ArpA-W119A 変異株) の作製

arpA::W119A 変異配列を作製し、それを第一章の *sgmA* 上流 *AdpA* 結合配列への変異導入と同じ要領で染色体に導入した。図 2.2-7 も参照。

まず、*arpA* 内の *Kpn*I-*Bam*HI 断片、0.4 kb を pKF18 に組み込んだ。これを鋳型として、5'-(Phosphate)GGGCGACgcGATCGACGCGACGGCCCGGATGC-3' (小文字が変異配列の結果 W119A のアミノ酸置換となる塩基配列、下線は変異導入確認を容易にするための *Pvu*I サイト) プライマーを用いた Mutan-Super Express Km (Takara) による変異導入で変異導入配列を作製した。変異導入が正しく行われたこと及び PCR エラーがないことを DNA シークエンスによって確認し

た。プラスミドより変異を含む *KpnI*-*Bam*HI 断片 0.4 kb を切り出し、pUC19 にクローニングした。このプラスミドの *Bam*HI サイトに pARP-Bam から切り出した *arpA* 下流の *Bam*HI-*Bam*HI 断片 2.8 kb を組みこんだ。その後上流の *XbaI*-*KpnI* 断片 (pARP-Sal 由来、*XbaI* はマルチクローニングサイト) を組みこんで、変異がほぼ真ん中に位置する *arpA* 周辺 6.9 kb の断片をもつプラスミドが完成した。この *Hind*III サイトに Tn5 から切り出したカナマイシン耐性遺伝子を含む 1.4 kb の断片を組みこんで染色体への変異導入用プラスミドを構築した。

このプラスミドを用い、*sgmA* で行った *AdpA* 結合配列への *in vivo* での変異導入と同様に *arpA::W119A* を *S. griseus* 野生株の染色体に導入した。確認はカナマイシン耐性遺伝子のサザンハイブリダイゼーションおよび PCR により行った。プライマーは W119A-F (5'-CGCGGTGGAGACCTTCCGGG-3') と W119A-R (5'-CCCGGAAGGTCTCCACCGCG-3') を用いた。これらは *arpA* 下流の配列であり、互いに相補的である。一回組み換え体において目的の位置にプラスミドが組みこまれたときのみ約 10 kb の断片が増幅される。二回めの組み換え確認は変異導入部位の塩基配列を確認することにより行い、変異導入株と野生株に戻った株を選別した。

AdpA 強制発現用プラスミド

以下、全て大西らにより構築された (Ohnishi *et al.*, 1999)。

- ・ pADP10L: プロモーターを変えずに *adpA* を低コピーベクター pKU209 にクローニングしたもの。
- ・ pADP20L: プロモーターを *lac* プロモーターに置換した *adpA* を低コピーベクター pKU209 にクローニングしたもの。

S1 マッピング法による転写解析

RNA 抽出法、S1 マッピング法の手法に関しては前章までと同様である。ただし、液体培養した菌体からの RNA 抽出については、以下のように培養を行った。YMPD 液体培地で 30°C、60 時間前培養し、菌体を同じ量の新鮮な YMPD 液体培地で 2 回洗い、再度菌体を同じ量の新鮮な YMPD 液体培地に懸濁した。これを 100 ml の YMPD (500 ml 坂口フラスコ) に 1% 植菌し、30°C で本培養した。

S1 マッピング法のプローブ作製に用いたプライマーは、*adpA* は 5'-CGGTCGGTAATCCGGCCCTG-3' (-274 to -255) と 5'-TCTACTGCGTCGCGTGGTCC-3'* (+150 to +131) であり、*hrdB* は 5'-TCGATGAGCGCCATCACAGACTCG-3' (+193 to +170) と 5'-TCGGCCCAITTCGTACGTATGAG-3'* (-121 to -98) の組み合わせ (*のプライマーを ³²P ラベルした) である。

A-ファクターアッセイ

YMPD 液体培地で培養を行った。培養については上記の SI マッピング法で液体培養した菌体からの RNA を用いる場合と同様である。サンプリングした培養上清 5 ml を等量の酢酸エチルで 2 回抽出し、エバポレーターで溶媒を除いた後、適量のエタノールにとかしてサンプルとした。バイオアッセイによる定量は原らの方法 (Hara and Beppu, 1982) によった。