

## 「銅イオンによる抗菌物質産生の賦活化メカニズムと その利用に関する研究」

上田賢志

### 第1節 目的

*Streptomyces* 属に代表される糸状性の土壌細菌である放線菌は、抗生物質をはじめとする様々な有用生理活性物質を生産することで知られる工業微生物である。この菌群がこれらの代謝物を生産する背景には、その環境適応に複雑に介在する遺伝制御ネットワークの存在があり、それらを如何に理解し利用するかが、放線菌の潜在能力を活かした今後の研究開発の鍵になる。本研究は、微量の銅イオンの添加が放線菌の抗生物質生産と孢子への分化を誘発する現象に基づいて、その分子メカニズムを詳しく理解すると同時にその利用性を幅広く開拓することを目的とした。特に、銅を活性に必要とする呼吸酵素シトクロムオキシダーゼ (COX) ならびに分泌性の酸化酵素群の役割に着目した研究を展開した。

銅イオンの COX への配位に関わる *ScoI/SenC* ファミリーの銅シャペロンは、好気呼吸を行う生物に広く分布し、それをコードする遺伝子の破壊によって、COX 活性が顕著に低下することが報告されている。そして、この蛋白質は、*Streptomyces* において銅イオンの利用に関する機能をもつことが予想される遺伝子で構成されるユニークかつ高度に保存された遺伝子クラスターにコードされている。そこで、本研究では、この遺伝子群を *sco* (*Streptomyces* copper-utilization) と呼称し、銅依存的な分化の促進機構との関連を調査した。

## 第2節 材料と方法

### A. 遺伝子破壊株ならびに相補株の作製

次に示す相同組換え技術によって、標的の遺伝子をアプلاميシン耐性遺伝子に組換えられた破壊株を *S.coelicolor*A3(2)を用いて作製した。使用した PCRプライマーの配列は巻末の表にまとめた。当研究室に保存されているコスミドライブラリーから、破壊する遺伝子が挿入された pSuperCos1を有する *E.coli* SURE を探索した。QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出したコスミドクローン (SCO1E4) を、*E.coli* BW25141/pKD78 にエレクトロポレーション法によって導入した。それに続いて、pIJ773 を鋳型としたPCR によってアプلاميシン耐性遺伝子のカセットを作製し、EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (BIO BASIC) を用いて精製した。そのときに使用したプライマーセットは、DisAc-F/DisAc-R (*scoA*)、DisBc-F/DisBc-R (*scoB*)、DisCc-F/DisCc-R (*scoC*)、DisDc-F/DisDc-R (*scoD*)、DisEc-F/DisEc-R (*scoE*)、DisFc-F/DisF-R (*scoF*)、DispheA-F/DispheA-R (*pheA*) である。その後、コスミドベクターを導入した *E.coli* BW25141/pKD78 の増殖培地に、終濃度 10mM L-arabinose を添加し Redリコンビナーゼを発現させ、精製した遺伝子破壊のカセットを導入した。pKD78が脱落し、アプلاميシン耐性能を獲得した *E.coli* BW25141より抽出したベクターを用いて、*E.coli* GM2163 を形質転換した。そして、*E.coli* GM2163の形質転換体からベクターを抽出し、標的の遺伝子がアプلاميシン耐性遺伝子に組換わり、かつメチル化されていないコスミド DNA を取得した。構築したコスミドベクターをプロトプラスト-PEG法によって *S.coelicolor* の野生株に導入し遺伝子破壊株を作製した。生育した形質転換体は、アプلاميシン耐性かつカナマイシン感受性のもので選択し、PCRによって遺伝子が破壊されていることを確認した。*scoC* の遺伝子破壊株については、極性効果による下流の遺伝子の発現への影響を回避するために、pUWLhygFLPを用いてマーカース破壊株を作製した。

遺伝子相補株の作製に用いた pKU460-*scoC* は次のように構築した。*scoC* とそのプロモーターの DNA 断片を得るために、P*scoAc*-F/P*scoAc*-R と *scoCc*-F/*scoCc*-Rのプライマーを用いて、それぞれ PCR を行った。取得した DNA 断片を Bg/II (タカラバイオ) で処理し、ライゲーションした。次にライゲーションしたサンプルを鋳型とし、

P*scoAc-F/scoCc-R*のプライマーを用いて PCRをすることによって、正確に融合させた DNA断片を取得し、TAクローニングによって pMD19に挿入した。その後、*Hind* III (タカラバイオ) でインサートを切断し、pKU460にクローニングした。構築した pKU460-*scoC* を *scoC* マーカーレス変異株に導入し、カナマイシン耐性を有する形質転換体を取得した。*scoC* (C86S/C90S) の部位特異的変異は次に示す方法で行った。pKU460-*scoC* を鋳型として、P*scoAc-F/scoCmt-MR* と *scoCmt-MF/scoCc-R* を用いてそれぞれ PCR を行った。その産物を混合し、P*scoAc-F/scoCc-R* のセカンド PCR によって得られた挿入断片を上述と同様に処理することによって pKU460-*scoC* (C86S/C90S) を作製した。

*S.griseus* の *scoC* を破壊するために、隣接領域を DisCg-F/DisCg-MR と DisCg-MF/DisCg-R のプライマーを用いた PCR によって増幅した。それらの断片を *Bam* H I (タカラバイオ) と *Bg*II で処理し、*loxP* 配列が隣接したカナマイシン耐性遺伝子のカセットとライゲーションした。そのカナマイシン耐性遺伝子のカセットは、pKU474を鋳型として *aphII-F/aphII-R* のプライマーを使用した PCR を行い作製した。ライゲーションサンプルは DisCg-F/DisCg-R のセカンド PCR の鋳型とした。増幅産物をTA クローニングによって pMD19 に挿入し、*Eco*R I (タカラバイオ) /*Hind* III で切断した断片を pUC19 にクローニングした。構築したプラスミドを *E.coli* GM2163 から回収し、*Alu* I Methyltransferase (New England Biolabs) と *Hpa*II Methyltransferase (New England Biolabs) によってメチル化させた後に、*S.griseus*に導入した。形質転換体は、カナマイシンによる選択と PCR を行い、遺伝子が破壊されていることを確認した。マーカーレスの *scoC* 破壊株は、カナマイシン耐性の *scoC* 破壊株に pKU250*cre* を導入することによって作製した。遺伝子相補の pKU464-*scoC* は次のように構築した。*S.griseus* の *scoC* とそのプロモーター領域をP*scoAg-F/PscoAg-R*と *scoGg-F/scoGg-R* のプライマーを用いて、それぞれ増幅した。*Sph* I (タカラバイオ)/*Bam*H I で処理した断片を、*Bam*H I で切断した pKU464 に3断片ライゲーションによって挿入した。*S.griseus hyaS* 破壊株は上述の相同組換え技術によって作製した。コスミドクローンは SGR2G5 を用いた。また、アプラマイシン耐性遺伝子のカセットは Dis*hyaSg-F/DishyaSg-R* のプライマーで調製した。各プライマーの配列は表1. 2に示す。

## B. 走査型電子顕微鏡

菌体を 2% 四酸化オスmium で 30h 固定し、凍結乾燥によって脱水した。試料を E-1010 ion sputter (日立工機) を用いて、パラジウム/金によるスパッターコーティングを行った後に、VE-8800 (KEYENCE) で観察した。

## C. 酵素活性の測定

*N, N, N', N'*-テトラメチル-*p*-フェニレンジアミン二塩酸塩 (TMPD) を電子受容体とした方法で COX 活性を測定した。酸化された TMPD は  $\lambda = 520 \text{ nm}$  の吸収波長をもつことが知られている。*S. coelicolor* と *S. griseus* を 100ml の培地 (*S. coelicolor* は Bennett's, *S. griseus* は YMP) が入った 500ml 容バツフル付き三角フラスコに植菌し、135rpm、28°C にて培養した。5ml の培養液をサンプリングし、7,940g、4°C にて 5m 遠心した。その後、得られた菌体を 0.85% NaCl で 2 回洗浄した。次に 50mg/ml となるように菌液を 0.85% NaCl を用いて調製し、5mg をキュベット内で 1.4ml の 33 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) に添加した。反応は 5  $\mu$ l の 0.54M TMPD を加えることで開始した。0m における 520nm の吸光度を測定したのち、菌体の沈降による測定値への影響を防ぐため 20s 毎に懸濁した。そして得られた吸光度から、酸化型 TMPD のミリモル吸光係数である 6.1 を用いて COX 活性を算出した<sup>64)</sup>。

HyaS 活性は次のようにして検出した。10ml の TSB 液体培地を含む直径 21mm の試験管に菌株を植菌し、28°C、300rpm の条件で 3d 振盪培養した。菌体を 1630g にて 5m 遠心して回収し、本培養に用いる培地で 2 回洗浄した。菌液を約 100mg/ml に調製し、ガラスホモジナイザーで均質化した後に、1mg (wet weight) /ml となるように植菌した。本培養の開始から 8h 経過後に、終濃度 0.1mg/ml の 3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB) を添加し、さらに 16h 培養した。そして、細胞を BZ-9000 光学顕微鏡 (KEYENCE) で観察した。

ラッカーゼ様フェノールオキシダーゼ活性は *N, N*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミン硫酸塩 (DMP) を基質として測定を行った。0.3g の *S. griseus* の菌体をセロファンで覆った Bennett's-1% maltose 固体培地から回収し、1ml の破砕バッファー (100mM NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>、10% glycerol (pH 6.5)) で懸濁した後に、ソニケーションによって細胞を破砕した。破砕液を 4°C にて 8000g、10m 遠心し、上清を回収した。次に、0.1ml の上清 (4.0mg/ml 蛋白質濃度) を 0.1ml

のDMP溶液 (20mg/ml) と2.5ml のクエン酸バッファー (37mM クエン酸と 180mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>を混合して pH6.5 に調整したもの) に加えて、反応を開始した。550nmにおける初期の吸光度の増加をU-2800A分光光度計(日立) を用いて、40°Cにて 100sインキュベートし測定した。そして、酸化型 DMP のマイクロモル吸光係数である0.2と測定値から酵素活性を算出した。

#### D. S1ヌクレアーゼマッピング

RNA抽出と S1 ヌクレアーゼマッピングは報告されている方法と条件に従った。プローブは、SS1-F/SS1-R\* (*Psc0A*) と HS1-F/HS1-R\*会 (*PhrdB*) のプライマーセット (表3) を用いた PCR で作製した (\*は [ $\gamma$  <sup>32</sup>-P]-ATP と T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (タカラバイオ) を使用して、5'末端を標識したことを示す)。

### 第3節 結果

#### A. 銅の利用に関わる遺伝子クラスターの構成

図1はゲノム情報を用いて解析した *sco* 遺伝子群の構成を示している。それらの遺伝子は以下のような機能とドメインを有することが予想される (カッコ内のアミノ酸残基の数は *S.coelicolor* のものを示している)。

ScoA (284 aa): 内在性膜蛋白質。

ScoB (253 aa): 真核生物型リジン-オキソグタル酸還元酵素/サッカロピン脱水素酵素 (LOR/SDH)の二機能性酵素の保存された領域をもつ機能未知蛋白質。

ScoC (216 aa): N末端側 1-16aa は原核生物の細胞膜リポ蛋白質に結合するサイトをもつ ScoI/SenC様蛋白質。

ScoD (178 aa): 機能未知蛋白質。

ScoE (680 aa): N末端側 1-21aa は原核生物の細胞膜リポ蛋白質に結合するサイトであり、13-128aa は CopC、341-420 と 498-540aa は CopD ドメイン。

ScoF (445 aa): 1-64aa のツインアルギニントランスポケーション (Tat) シグナルペプチドと 87-433aa に dye-decolorizing peroxidase (Dyp) 型ペルオキシダーゼドメインを有する。

PheA (340 aa): フェニルアラニン生合成に関わるプレフェネート脱水酵素。

そしてゲノム配列が決定された全ての *Streptomyces* に、それら 7 つの遺伝子が保存されている。

ScoC と ScoE 以外の遺伝子は、機能が知られている他の遺伝子と端々まで相同ではなかった。ScoB は、真核生物において mRNA の輸送と翻訳の終結に関わる Gle1 との相同性を示すが、機能上の相同性は明らかになっていない。ScoB ホモログをコードする遺伝子は、CopC およびまたは CopD 様の蛋白質をコードする遺伝子とクラスターを形成し、広く Actinobacteria に保存されている。*B. subtilis* において ScoB ホモログの YcnI は、銅制限下で転写が誘導される *ycnKJI* のオペロン様構造にコードされている。YcnK と YcnJ はそれぞれが、このオペロンの銅依存的な転写抑制に関わる制御蛋白質と銅を取り込む膜蛋白質であると想定されている。

ScoE は、*Pseudomonas* の銅耐性のオペロンにコードされている CopC と CopD に、部分的な相同性を示した。それらの蛋白質は銅の取り込みに関与していることが考えられている。CopC とそのホモログの銅結合様式は、正確に特徴付けされている。上述の *B. subtilis* における推定上の銅トランスポーターである YcnJ は、ScoE と端々までの相同性を示す。CopC または CopD のドメインを有さない ScoE は広範囲の Actinobacteria のゲノムに保存されている。それらはしばしば ScoD と ScoF のホモログをコードする遺伝子とクラスターを構成している。

*Streptomyces* における Sco 蛋白質の機能に関する明確な情報はないが、細胞膜と細胞質外に関連し、銅の取り込みと利用に関与することが考えられる。

## B. *scoC* 破壊株の表現型

ScoI/SenC ファミリー銅シャペロンの役割を明らかにするために、*S. coelicolor* A3 (2) の *scoC* 遺伝子のマーカーレス破壊株を作製した。図 2. 3A に示すように、Bennett's-1% glucose 固体培地上で *scoC* 破壊株は気中菌糸形成と色素性抗生物質生産が顕著に遅れていた。走査型電子顕微鏡によって細胞を観察したところ、気中菌糸と胞子が多量に存在している野生株に比べて、*scoC* 破壊株は基底菌糸しか伸長していなかった。しかしながら培養後期では、*scoC* 破壊株は野生株と同等の気中菌糸形成能と抗生物質生産能を示した。マ

ルトース培地においても同様の形質を示したことから、グルコース特異的な効果ではないことが考えられた。また、この *scoC* 破壊株の分化の遅れは、 $10\ \mu\text{M}$  の  $\text{CuSO}_4$  の培地中への添加または遺伝子相補用のベクターの導入によって回復した (図2) *S.coelicolor* と同様に、*S.griseus* の *scoC* 破壊株もまた、気中菌糸形成の開始が遅延していた (図4)。 *S.coelicolor* において取得した *scoA* と *scoD* の変異株は、グルコース培地上で分化の開始が遅れていたが、マルトース培地では正常に分化した (図5)。逆に *scoB* 破壊株はグルコース培地において、野生株に比べて色素性抗生物質生産能が増大していた (図5)。 *scoF* と *pheA* の破壊株は *scoC* 破壊株と同様の形質を示したが (図6)、その程度は *scoC* 破壊株で観察されたような顕著なものではなかった。また、*scoF* 以外の *sco* 遺伝子群の変異株の形質は銅イオンの添加によって回復しなかった。これらの結果から、*ScoC* による銅イオンの利用とそれに続くいくつかの銅依存的な機能の活性化が分化の開始に重要な役割をもつことが示唆された。

*B.subtilis* の *ScoI/SenC* ホモログである *YpmQ* では、2つの保存されたシステイン残基が *COX* の活性に重要であることが示されている (図1B)。この報告から、*scoC* 遺伝子に *C86S/C90S* の部位特異的な変異を導入したベクターを作製し、*scoC* 破壊株を形質転換した (図3B)。変異型 *scoC* を導入した *scoC* 破壊株では野生株の表現型に回復しなかったことは、それら2つのシステイン残基が *ScoC* の機能に必須であることを示している。

### C. 生育の特性と *COX* 活性

Bennett's 液体培地における *scoC* 破壊株の生育曲線を図7に示す。 *scoC* 破壊株は細胞収量が野生株に比べて増加していた。これは *ScoC* が一次代謝とエネルギー生産の過程に関わっていることを示している。また、グルコース培地の培養初期において *scoC* 破壊株の培養上清の pH が低下していた (図7)。この培養液の酸性の pH は、培養後期になるに従って中和され、8.6 まで上昇した。これと同様の pH の低下は、 $400\ \mu\text{M}$  の BCDA (銅キレーター) を添加したグルコース培地で培養した野生株においても観察された。しかし、マルトース培地ではこのような pH のシフトは生じなかった。このことから *ScoC* 依存的な機能はグルコース代謝の効率に関与していることが示唆された。

また  $10\ \mu\text{M}$  の  $\text{CuSO}_4$  を添加したグルコース培地において、*scoC* 破壊株は高い細胞収

量を示した。この条件下における培養 128h では野生株に比べて3倍以上、湿重量が増加していた。BCDA を添加した培地では、この生育の促進は観察されなかった。

ScoI/SenC 蛋白質は COX に銅イオンを運搬するため、TMPD を用いてその活性を測定した。図8A に示すように、Bennett's-1% glucose 培地の培養初期において *S.coelicolor* の野生株は高い COX 活性を示した。対照的に *scoC* 破壊株は著しく活性が低下していた。*scoC* 破壊株における活性は、CuSO<sub>4</sub> を添加することによって野生株よりも高いレベルまで回復した。BCDA を添加した培地では COX の活性が顕著に低下していた。*S.griseus* の *scoC* 破壊株は、*S.coelicolor* と同様の COX 活性を示した。

*sco* 遺伝子と COX の関連を明らかにするために、グルコース培地とマルトース培地の培養初期における *sco* 遺伝子破壊株の COX 活性を測定した(図8B)。その結果、*socC* と *scoF* 以外の遺伝子は、破壊による COX 活性への影響はなかった。また、BCDA の添加によって全ての変異株における活性は顕著に減少した。*scoF* 破壊株は、低い COX 活性を示したが、CuSO<sub>4</sub> の添加によって *scoC* 破壊株と同じレベルまで回復した。このことは、*scoF* がコードするベルオキシダーゼドメインを有する分泌蛋白質もまた、末端酸化酵素の活性に重要な役割をもつことを示している。

#### D. 細胞凝集とモノアミノキシダーゼ活性

*scoC* 破壊株は、細胞凝集の表現型が野生株と異なっている。培養初期における *S.coelicolor* と *S.griseus* の野生株の細胞は、振盪したフラスコから静置した試験管に移すことによって速やかに沈降する。それらの細胞は凝集し、大きなペレットを形成していた。対照的に *scoC* 破壊株は沈降もペレット形成もしていなかった(図9A, B)。この *scoC* 破壊株の細胞凝集は、遺伝学的相補または CuSO<sub>4</sub> の添加によって回復した。

最近、*S.coelicolor* A3(2) に極めて近縁の *S.lividans* の細胞凝集に、HyaS と呼ばれるモノアミノキシダーゼが関わっていることが報告されている。HyaS は、その分子内に銅イオンを含み、モノアミンの酸化を触媒してアルデヒドとアンモニア、過酸化水素を生じる分泌型酵素である。上述の細胞凝集の表現型と HyaS の関連を検証するために、DAB を用いて *in situ* の酵素活性を検出した。DAB は過酸化水素によって重合し、赤みがかった茶色を呈する。*S.griseus* 野生株の細胞は、高いレベルの過酸化水素によって茶色に染まって



いたが、*scoC* 破壊株はバックグラウンドと変わらなかった (図9C)。この酵素活性は遺伝子相補または  $\text{CuSO}_4$  の添加によって回復した。

細胞凝集における HyaS の関与を検証するために、*S.griseus* の *hyaS* (*SGR3840*) 遺伝子破壊株を作製した。この破壊株は、細胞の沈降性と凝集性およびモノアミノキシダーゼ活性が低下していた (図9)。このことは *SGR3840* がコードする酵素が *S.griseus* の細胞凝集に関わっていることを示唆している。

#### E. フェノールオキシダーゼ活性

*ScoC* による銅イオンの利用が COX やモノアミノキシダーゼだけではなく、フェノールオキシダーゼの活性に関わっているのではないかと考え、DMPを基質としたラッカーゼ様フェノールオキシダーゼの活性を *S.griseus* において試験した。*scoC* 破壊株の細胞粗抽出液における DMP の酸化活性は、野生株に比べて減少していた (図10)。この活性は、培地に  $\text{CuSO}_4$  を添加することによって回復した。

#### F. *sco* の転写

*sco* 遺伝子の転写レベルを解析するために、*scoA* のプロモーター領域をプローブとして *S.griseus* を用いた S1 ヌクレアーゼマッピングを行った。高解像度の解析によって、*ScoA* の翻訳開始コドン ATG の A から 4bp 上流の G から転写が開始されることが明らかになった (図11A)。また -35と-10のヌクレオチド配列は、*S.griseus*、*S.coelicolor*、*S.avermitilis* に保存されていた (図11C)。低解像度の解析では、YMP-1%glucose 培地において野生株のプロモーターは3日開通して活性化されていたが、 $\text{CuSO}_4$  の添加によって抑制された (図11B)。

*sco* 遺伝子の保存された局在は、その発現が銅によって抑制されるポリシストロンを構成していることを示唆している。このオペロン様の構造には *pheA* が存在しているため、フェニルアラニン生合成が銅によって抑制されることが予想された。そのことから銅イオンを添加した最小培地で菌株を生育させたところ、*S.coelicolor* と *S.avermitilis* はフェニルアラニン要求性を生じた (図12)。これらの菌株はフェニルアラニンを添加することによって、 $10\ \mu\text{M}$  の  $\text{CuSO}_4$  を含む最小培地においても生育が可能になった。このことは、これら 2 つの菌株にお

ける *pheA* の発現が、銅によって転写が抑制される *scoA* のプロモーターに従っていることを示している。その一方で、*S.griseus* は銅イオンを添加した培地においても正常に生育したことから、この菌株の *pheA* は他のプロモーターによって転写されることが考えられた。*S.griseus* の *scoF* と *pheA* の遺伝子間には 285bp もの介在配列があり、別のプロモーター領域が含まれていることが予想される。また、環境中から単離した4株の放線菌についても同様に試験し、その内の2株が銅依存的なフェニルアラニン要求性を示した(図12)。

#### 第4節 考察

本研究では、Scol/SenC ファミリー蛋白質である *ScoC* が *Streptomyces* における銅依存的な酵素の活性に重要な役割をもつことを明らかにした。それぞれの *Sco* 蛋白質の役割は不明ではあるが、*sco* オペロンが *Streptomyces* に高度に保存されていることから、このグループによる銅の利用に *Sco* が協調した機能を有することが推測される。高濃度の銅イオン ( $10 \mu\text{M}=0.6\text{ppm}$ ) によって *sco* オペロンの転写が抑制されることは、銅イオンが低濃度のときにこのオペロンが活性化されることを示している。通常の土壌は 0.01-0.06ppm の銅を含有している。そのため通常的环境中では、*Streptomyces* は銅を利用するために *sco* を発現していることが考えられる。

Scol/SenC ファミリーの蛋白質は、COXの  $\text{Cu}_A$  複核中心に銅イオンを運搬する。高度に保存された2つのシステイン残基を有することは、*Streptomyces* の *ScoC* が類似の機能をもつことを示している。*scoC* 破壊株における低いCOX活性は、銅イオンの取り込み能の低下に起因することが予想される。また  $\text{CuSO}_4$  の添加によって *scoC* 破壊株のCOX活性が回復したことは、高濃度の銅イオン存在下では、*ScoC* とは独立して銅イオンがCOXに取り込まれることを示唆している。

*ScoC* がCOXの配位に関わることから、*scoC* 破壊株の形質は末端呼吸系の低下に起因することが考えられた。最近、Worrall は *Streptomyces* の銅依存的な機能に関する総説を発表し、*S.lividans* における *scoC* ホモログの研究から、COX活性がこの菌の分化に重要であることを述べている。*S.coelicolor* と *S.griseus* の *scoC* 破壊株が分化の遅れを示したこともまた、末端酸化の効率と分化の制御の関連を反映しているかもしれない。

グルコース培地で培養した *scoC* 破壊株は pH の低下を引き起こした。これと同様の酸性化は、BCDA を添加したグルコース培地で培養した野生株においても観察された。これらの結果から、この現象は COX 活性の低下に起因することが推測された。*Streptomyces* は COX とは異なる末端酸化酵素であるシトクロム *bd* 型キノール酸化酵素を有している。*scoC* 破壊株では低い COX 活性のために、この代替の酵素が働いていることが予想されるが、グルコース代謝のバランスに影響してエネルギー生産の効率が低下していることが考えられる。

グルコース培地に  $\text{CuSO}_4$  を添加することによって、*scoC* 破壊株の細胞収量が野生株に比べて2-3倍増加していた。この特筆すべき現象は、*scoC* がいくつかの銅依存的なエネルギー生産過程を負に制御しており、脱制御によって銅イオンが高いレベルのときに増殖促進が引き起こされたことが推測される。つまり、*ScoC* は銅イオンの取り込み効率を制御して COX の活性化と非活性化を調節していることが考えられる。実際に銅イオンを添加した条件では、*scoC* 破壊株は顕著に COX 活性が増加していた。しかし培養後期において、野生株と *scoC* 破壊株が共に COX 活性が顕著に低下していたことは、*scoC* とは独立した COX 活性の抑制機構が存在することを示唆している。

*scoC* 遺伝子の破壊は、分泌型銅酵素であるモノアミノキシダーゼとフェノールオキシダーゼの活性に影響した。このことは、*ScoC* による銅イオンの利用が、COX だけではなく、他の分子内に銅イオンを有する酵素の活性に重要な役割をもつことを示している。リジロオキシダーゼである *HyaS* は、*S.lividans* の細胞凝集とペレット形成に関与することが示されている。本研究では *S.griseus* における *HyaS* についても同様の機能をもつことが確認された。真核生物のリジロオキシダーゼの研究から、この酵素は菌糸に関連する蛋白質の架橋構造形成を促進するアミノキシダーゼであることが推測される。また当研究室では、フェノールオキシダーゼが *S.griseus* の気中菌糸形成を促進することを明らかにした。従って、銅依存的な酸化酵素の活性化が *Streptomyces* の細胞構造に関連し、それらの機能に *ScoC* による銅イオンの利用が必要であることが考えられる。

転写解析の結果から、*scoA* のプロモーターが銅イオンの添加によって抑制されることが明らかになった。これは、銅依存的な転写制御機構によってこのプロモーターが調節されていることを示している。プロモーター配列の同定から、*Streptomyces* において銅依存的な転

写抑制が広く観察されることが示唆された。金属イオンの恒常性に関わる転写制御は、鉄イオンの獲得に関係する Fur の研究を通じて特徴づけられている。*Pseudomonas aeruginosa* では、鉄イオンが Fur と結合して、鉄イオンの獲得に関連する遺伝子の転写を抑制することが報告されている。金属ホメオスタシスにおけるこの Fur ファミリーの転写制御蛋白質には、亜鉛やマンガン、ニッケルに関連するものが知られている。*S.coelicolor* では、Zur が細胞内の酸化還元を制御する  $\sigma^R$  の活性化を通じて亜鉛の恒常性を調節している。

原核生物の銅イオン恒常性に関連する知見の多くは、過剰なレベルの銅に応答する機構である。多様なタイプの転写抑制蛋白質が、銅イオン恒常性の遺伝子における銅依存的な転写活性化に関わっている。その一方で、銅イオンの制限に応答するものは上述の *B.subtilis* における *ycnKJI* オペロンしか知られていない。この系では DNA と Cu(I) の結合ドメインを有する YcnK が、このオペロンの銅依存的な転写抑制に関わっていることが予想されている。しかし、*Streptomyces* のゲノムには YcnK の相同蛋白質が存在しないことから、*Streptomyces* における銅依存的な転写抑制には別の制御機構が関係していることが推測される。

また、いくつかの *Streptomyces* の種における銅依存的なフェニルアラニン要求性を発見した。このことは高濃度の銅イオンが存在すると、これらの細菌における蛋白質の合成にはフェニルアラニンの添加が必要であることを示している。このような要求性が起こる理由是不明ではあるが、自然環境におけるそれらの生物の生存を改善することが期待される。それぞれの銅依存的な機能の詳細な役割には今後の解析が必要ではあるが、本研究は *Streptomyces* の生理において銅イオンの利用が重要な因子であることを示している。

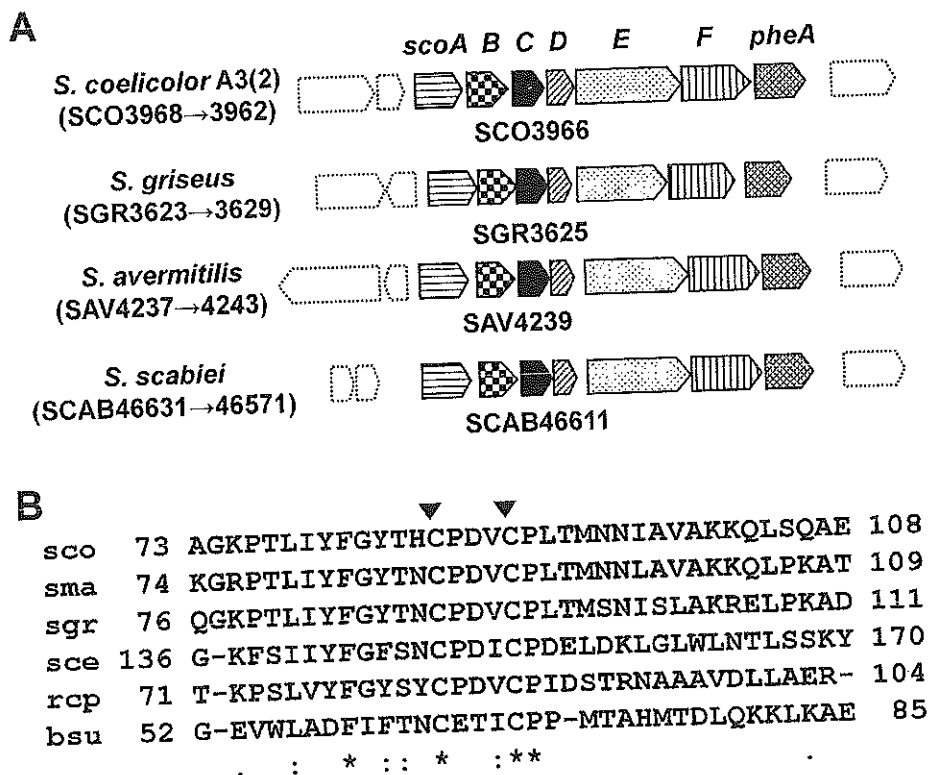


図1 *Streptomyces* の *sco* オペロン。

A. ゲノム解読株におけるオペロンの局在。

B. Scol/SenC ファミリー蛋白質のアミノ酸配列。アスタリスクは保存されたアミノ酸を示す。sco, *S.coelicolor*A3(2); sma, *S.avermitilis*; sgr, *S.griseus*; sce, *S.cerevisiae*; rcp, *R.capsulatus*; bsu, *B.subtilis*。

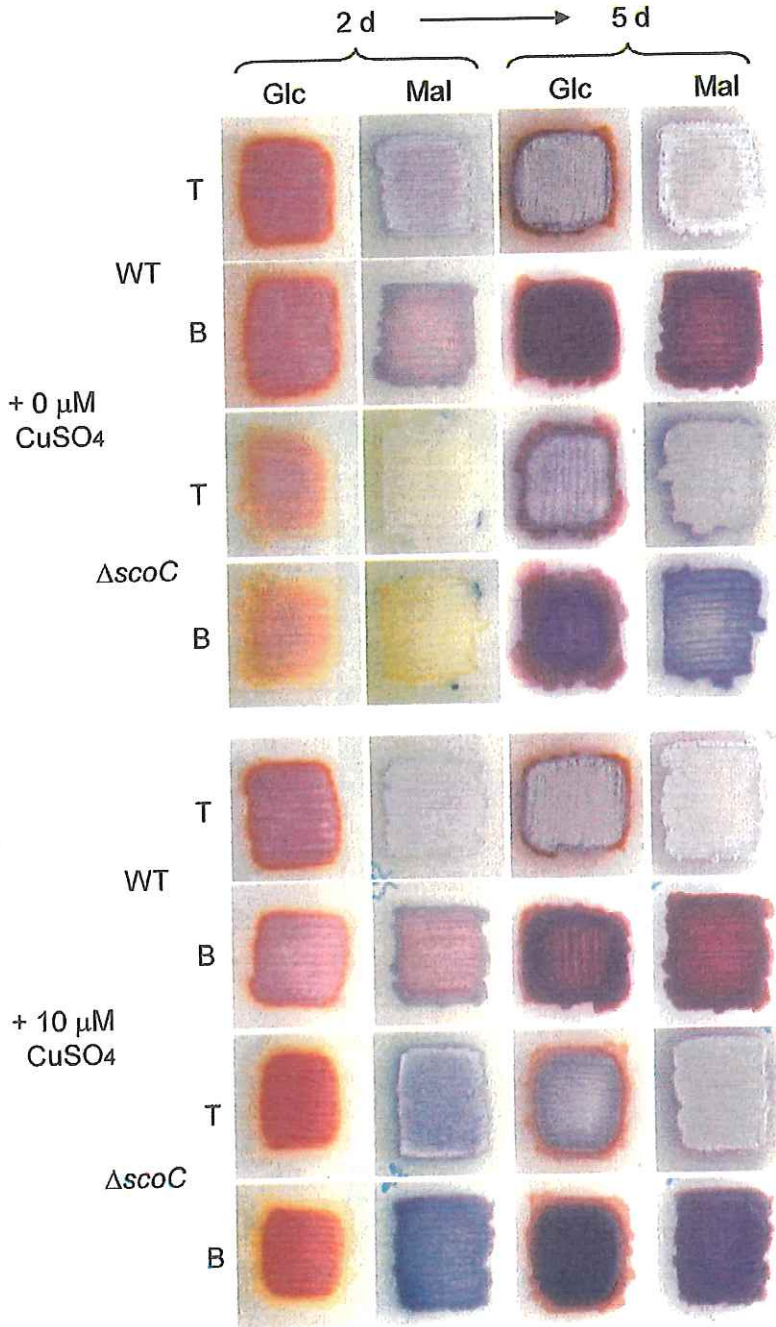


図2 固体培地における *S.coelicolor* の *scoC* 破壊株の表現型 (1)。

T, top; B, bottom。

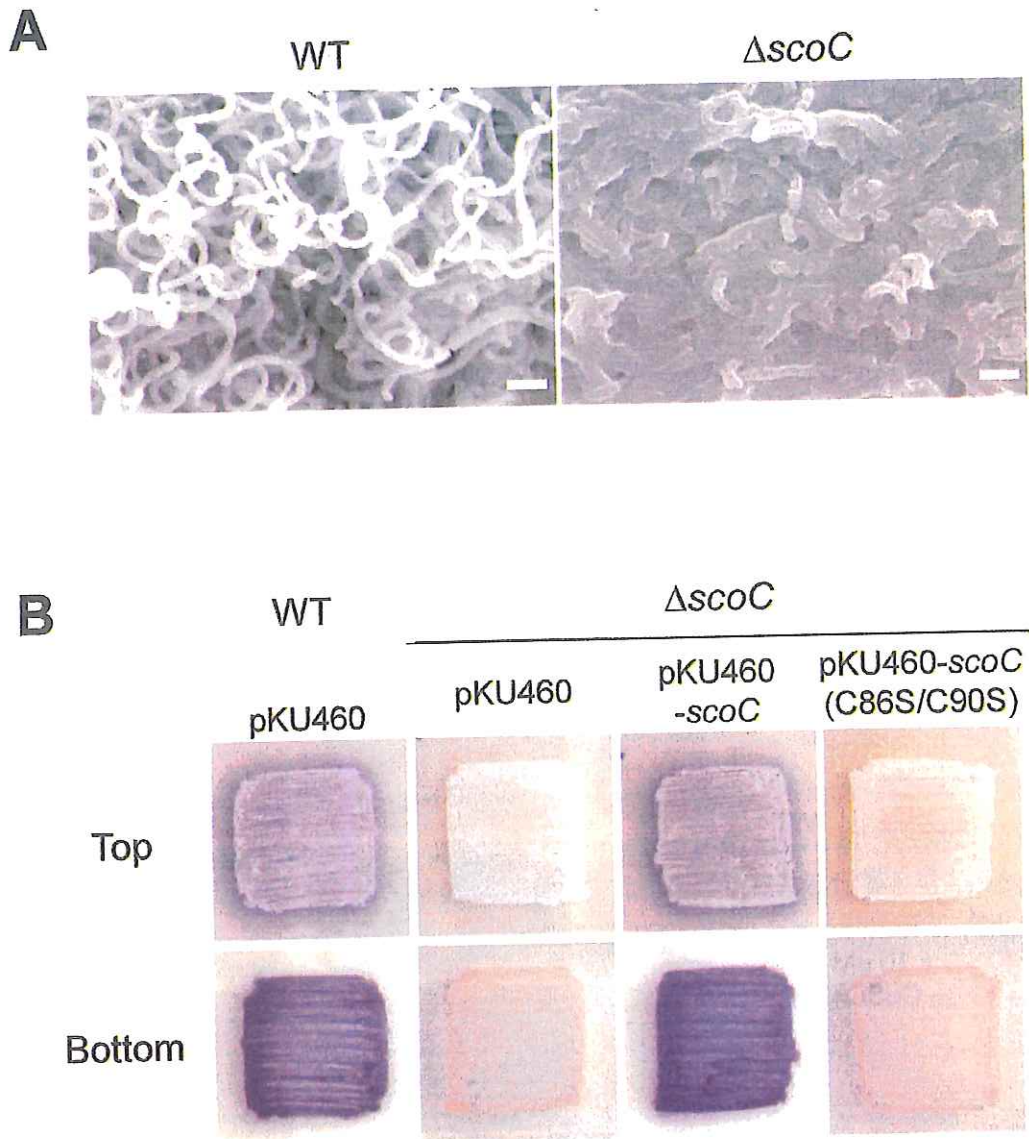


図3 固体培地における *S.coelicolor* の *scoC* 破壊株の表現型 (2)。

A. Bennett's-1% glucose 固体培地上で 3d 培養した菌糸を走査型電子顕微鏡で観察した写真。  
Bar, 2  $\mu$  m.

B. Bennett's-1% maltose 固体培地上で 2d 培養した *scoC* 破壊株の遺伝子相補株。

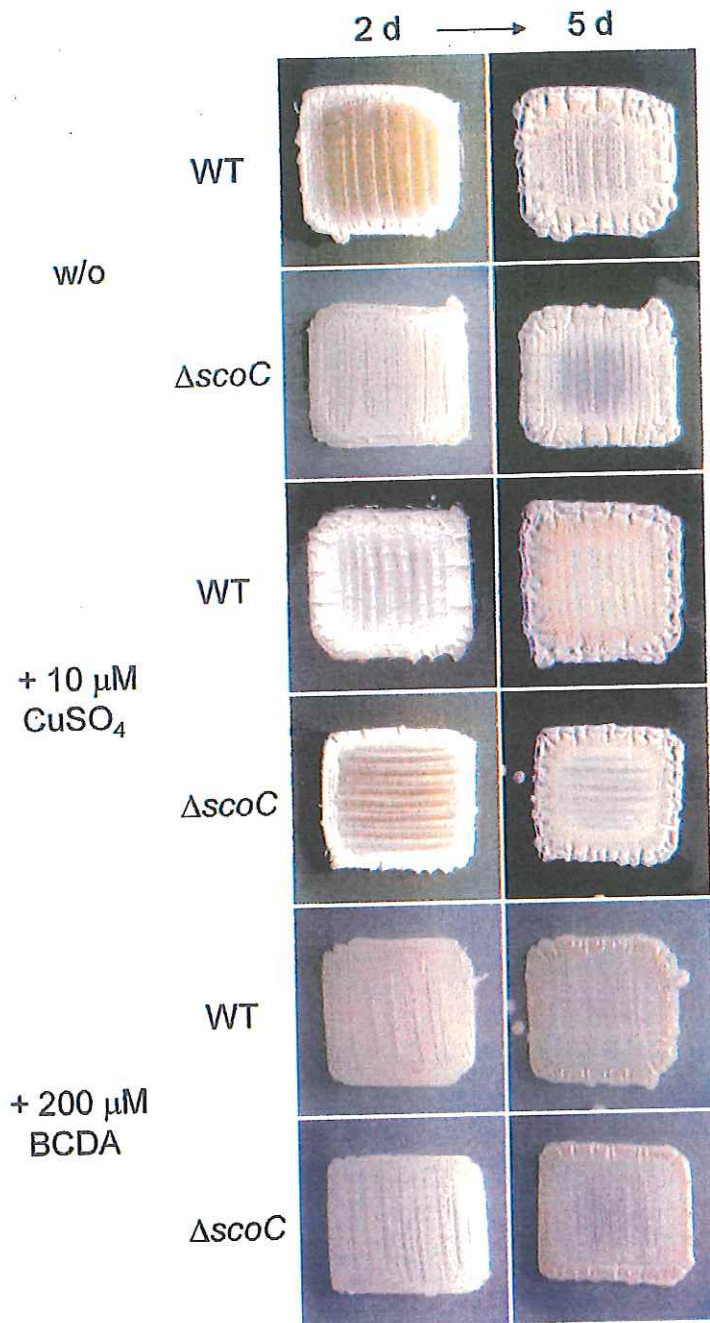


図4 固体培地における *S.griseus* の *scoC* 破壊株の表現型。

YMP-1% glucose 固体培地で培養した写真。



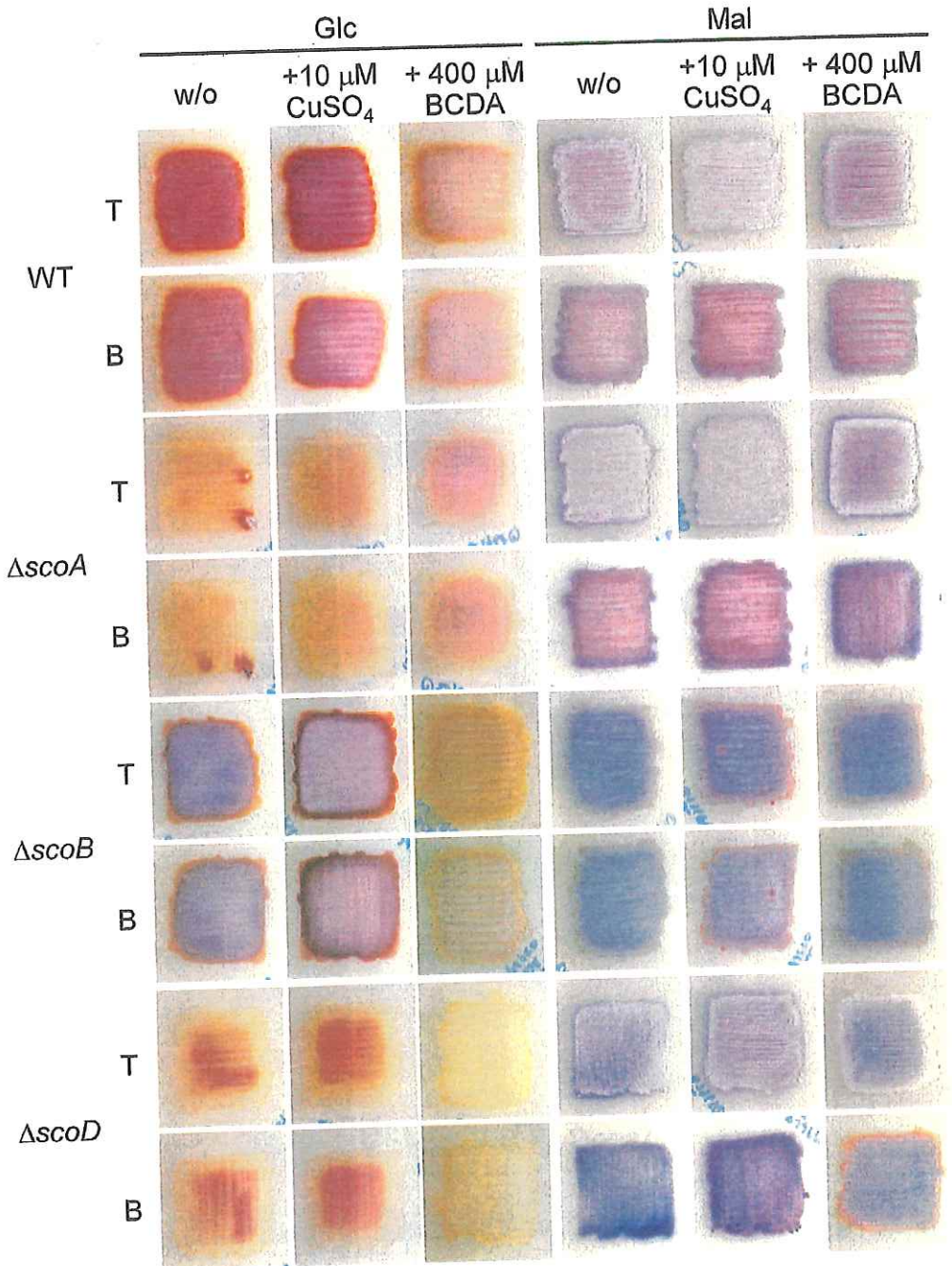


図5 固体培地における *S.coelicolor* の *sco* 遺伝子群の変異株の表現型 (1)。

Bennett's 固体培地上で 2d 培養した写真。T, top; B, bottom。

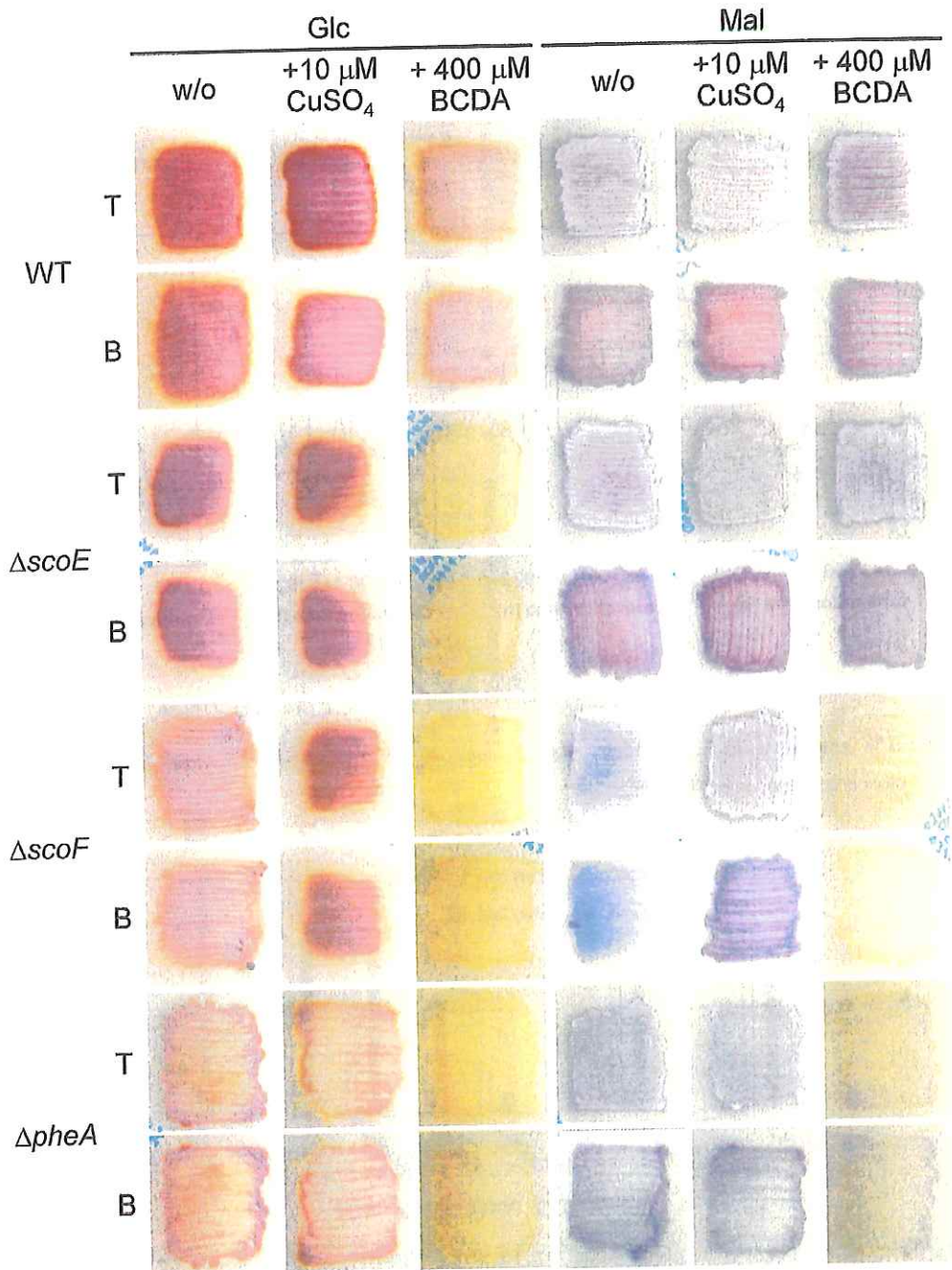


図6 固体培地における *S.coelicolor* の *sco* 遺伝子群の変異株の表現型 (2)。

Bennett's 固体培地上で 2d 培養した写真。T, top; B, bottom。

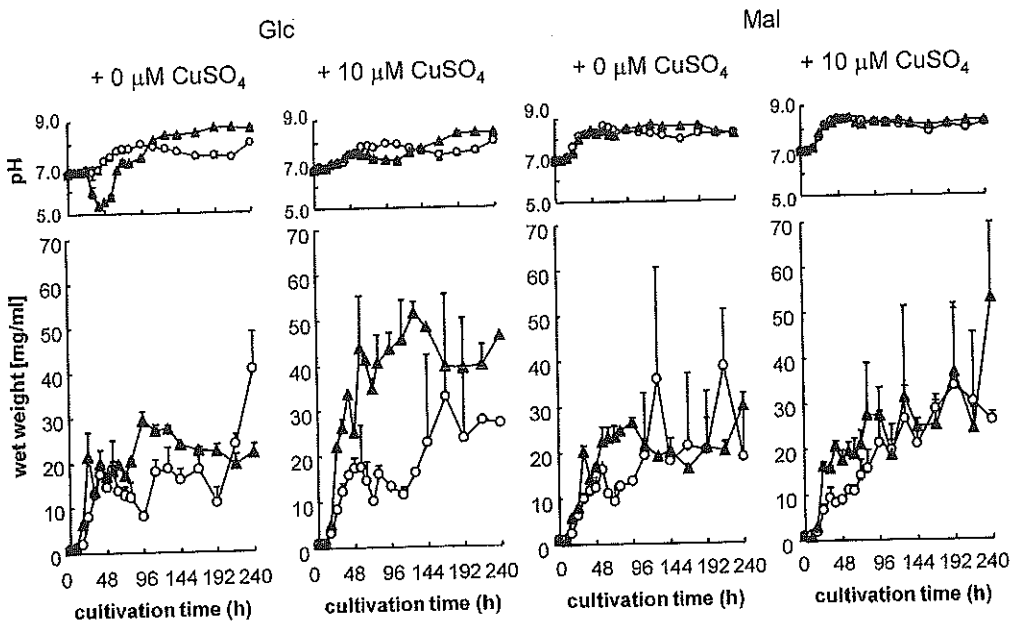


図7 *S.coelicolor* の *scoC* 破壊株の細胞収量と培養上清の pH の推移。

Bennett's-1% glucose (Glc) または Bennett's-1% maltose (Mal) の液体培地で培養した。open circle, 野生株 ; closed triangle, *scoC* 破壊株。

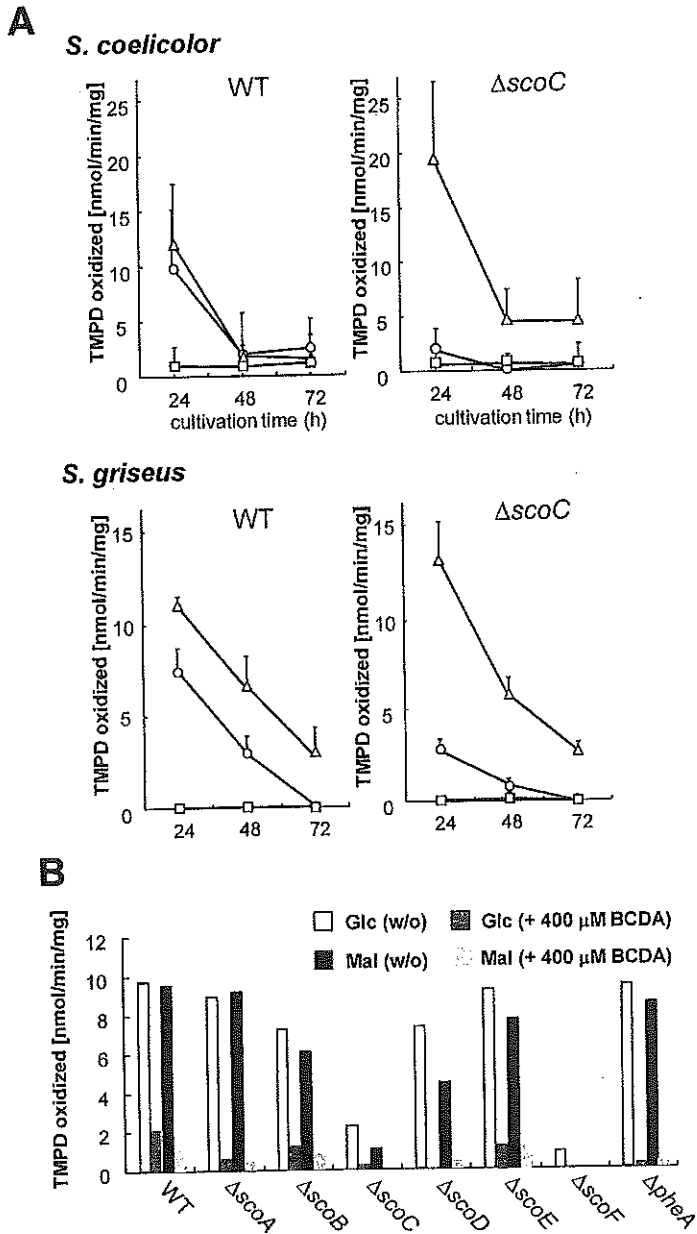


図8 *sco* 破壊株の COX 活性。

A. 炭素源が 1% glucose の液体培地を用いて測定した。open circle, w/o; open triangle,  $10 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ; open square,  $400 \mu\text{M}$  (*S. coelicolor*) または  $200 \mu\text{M}$  (*S. griseus*) BCDA。

B. 培養 24h における *sco* 破壊株の COX 活性。

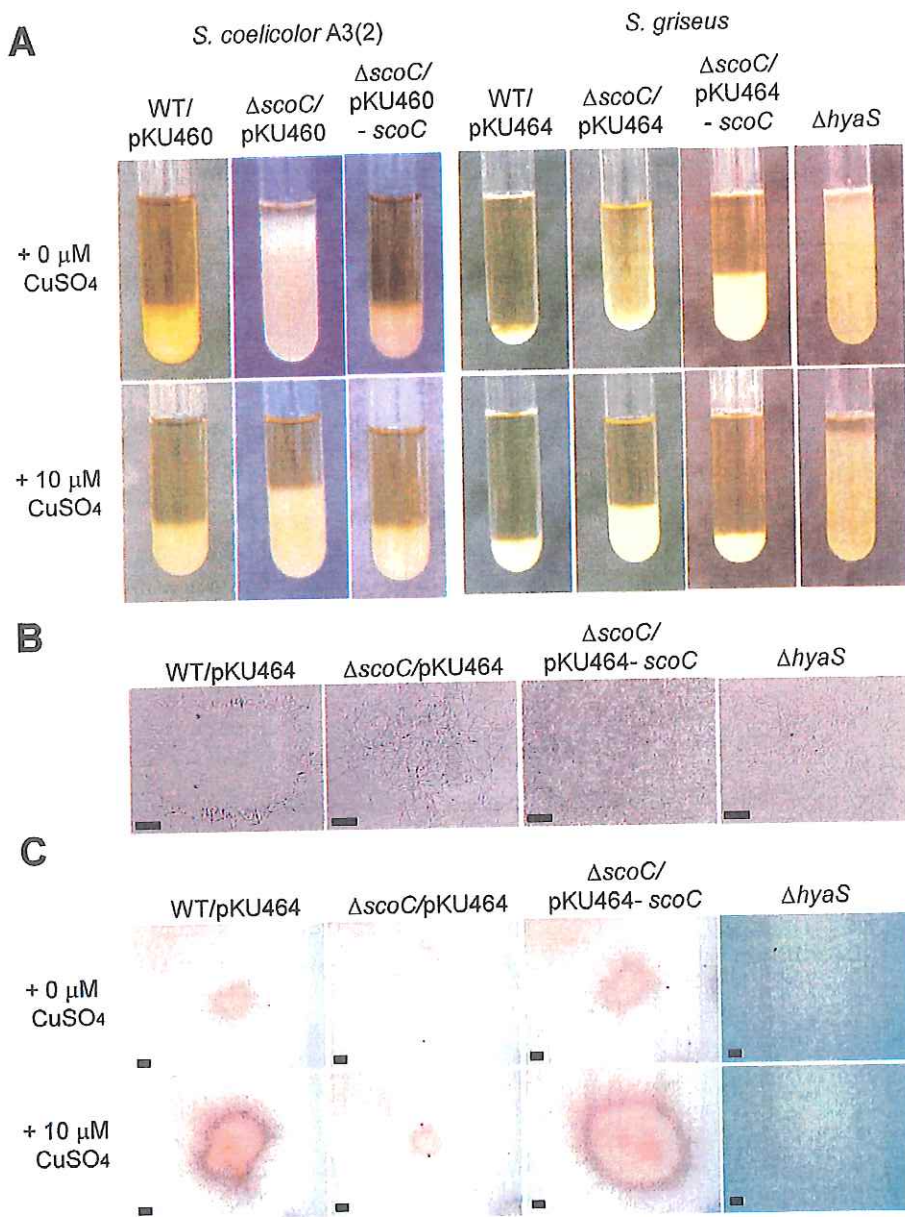


図9 *S.coelicolor* と *S.griseus* の細胞の凝集と沈降。

- A. 24h 液体振盪培養した細胞を試験管に移して静置した写真。  
 B. 培養 24 h における *S.griseus* の *scoC* 破壊株の細胞を光学顕微鏡で観察した写真。  
 C. 24h 液体振盪培養した *S.griseus* の細胞におけるモノアミノキシダーゼ活性を検出した写真。

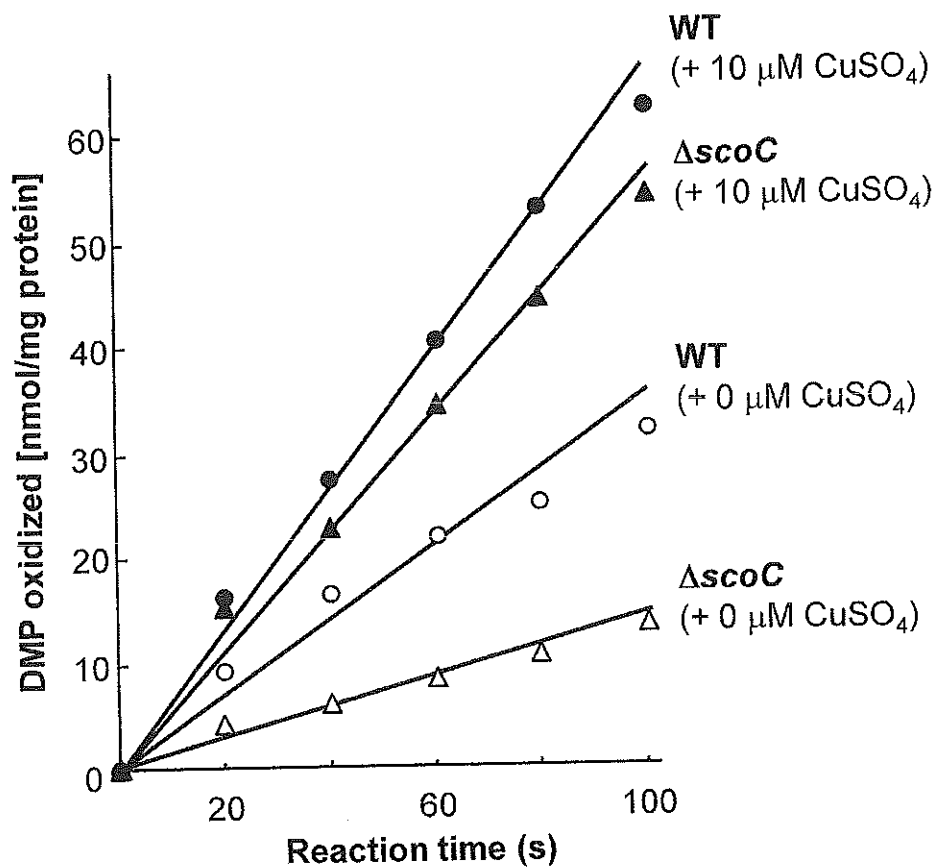


図10 *S.griseus* のラッカーゼ様フェノールオキシダーゼ活性。  
5d 培養した菌体を破碎し、酵素活性を測定した。

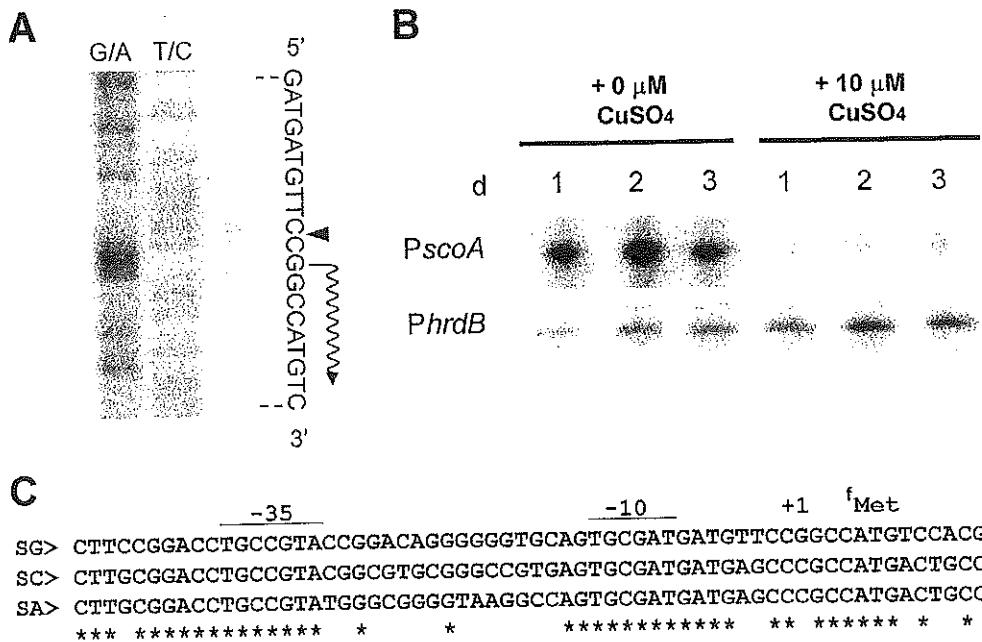


図11 *S. griseus* を用いた *scoA* のプロモーター領域の転写解析。

- A. 高解像度 S1 ヌクレアーゼマッピングによる転写開始点の決定。G/A と T/C のレーンはマクサム-ギルバート法によって、標識した DNA を化学的に切断したものを電気泳動した。右端のレーンは、DNA-RNA のハイブリッドを S1 ヌクレアーゼで処理したサンプルを泳動した。
- B. 低解像度 S1 ヌクレアーゼマッピング。コントロールは *PhrdB* を用いた。
- C. *scoA* のプロモーター領域の DNA 配列。アスタリスクは相同配列を示す。SG, *S. griseus*; SC, *S. coelicolor* A3(2); SA, *S. avermitilis*。

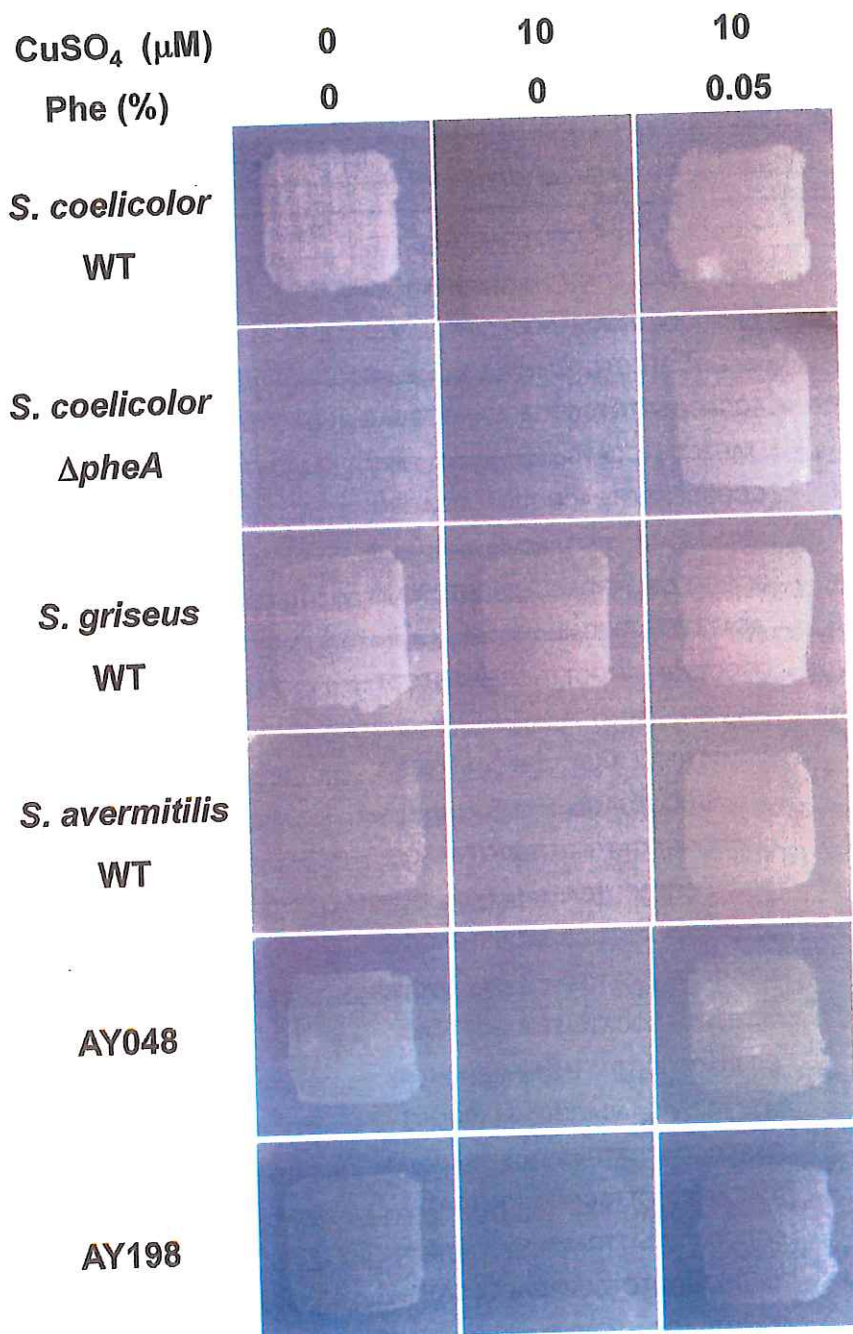


図12 銅依存的なフェニルアラニン要求性。最小培地上で 2d 培養した菌体の写真。

AY048 と AY198 は当研究室にて環境中から単離された菌株。



表1 遺伝子破壊と遺伝学的相補のベクター構築に用いたプライマーの配列(1)。

a, アブラマイシン耐性遺伝子は小文字の配列 ; b, 認識部位は配列中のアンダーライン ; c, <http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>を参照。

Primer Name	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Restriction Enzyme <sup>b</sup>	Position (nt) <sup>c</sup>
DisAc-F	CGGCGTGCGGGCCGTGAGTGCATGA		4297663-4297702
DisAc-R	TGAGCCCGCCATGattccggggatccgctgacc CGGCCCTCCCGAAGCGGGACGGCG		4298589-4298551
DisBc-F	GTCGCGTCGTGTCAtgtaggctggagctgcttc AGCACCGGTGTCCCCACGAAGCGGAG		4298645-4298684
DisBc-R	TACTCCGTCCATGattccggggatccgctgacc CCGCGGAGGTCACGCCGACGCACCG		4299478-4299440
DisCc-F	GCACGGCGCTGTTAtgtaggctggagctgcttc GCGCACCGGAGCACCTCACATCTGGG		4299539-4299577
DisCc-R	ACATTTTTCTATGattccggggatccgctgacc CCCCTTGATGAGCTTGGGGAGGTCCT		4300213-4300175
DisDc-F	TGGTGTAGTCGTctgtaggctggagctgcttc GGACCTCCCCAAGCTCATCAAGGGGG		4300189-4300227
DisDc-R	AGAACCCGTGAGGattccggggatccgctgacc CGCGGGGCGATGGTCTGCGTCAAGG		4300794-4300756
DisEc-F	TGGTCCCTCCCTCAgttaggctggagctgcttc ACTCCGAAGACTCCGGACACTGAGGG		4300736-4300775
DisEc-R	AGGGACCACCTTGattccggggatccgctgacc ACTGGTCGGGCATGGTGC GGTT CAG		4302835-4302797
DisFc-F	CCGATCTGCGTGTttaggctggagctgcttc CATCTCCAAGAACACGCAGATCGGCT		4302787-4302825
DisFc-R	GAACCGCACCATGattccggggatccgctgacc GCACAAGCCCTTCCGCGGGGTGATA		4304196-4304158
DispheAc-F	CGCCCCGGATTCAgttaggctggagctgcttc TGAGCCGGGTGTCCCAGAGCCCATT		4304205-4304243
DispheAc-R	AGGGTGAGGACATGattccggggatccgctgacc CTGTGGACAACGAAAATCAGCAGAT		4305209-4305171
PSCOc-F	AGGCCCGAGGGTCAgttaggctggagctgcttc CTCGAGAAGCTTCCAGATGCTCATGCTCCA	HindIII	4297446-4297463
PSCOc-R	CTCGAGAGATCTGGATCCGGAGATCGTTCC	BglII	4297750-4297733

表2 遺伝子破壊と遺伝学的相補のベクター構築に用いたプライマーの配列 (2)。

a, アプラーマイシン耐性遺伝子は小文字の配列 ; b, 認識部位は配列中のアンダーライン ; c, <http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>を参照。

Primer Name	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Restriction Enzyme <sup>b</sup>	Position (nt) <sup>c</sup>
scoCc-F	CTCGAGAGATCTCACCTCACATCTGGGACA	<i>Bgl</i> II	4299550-4299567
scoCc-R	CTCGAGAAGCTTGAGCCGTCTCACGGGACC	<i>Hind</i> III	4300257-4300240
scoCcmt-MR	ATGTTGTTTCATGGTCAGCGGGGAGACGTCG GGGGAGTGGGTGTAG		4299864-4299820
scoCcmt-MF	TCTACTTCGGCTACACCCACTCCCCGACG TCTCCCCGCTGACCA		4299810-4299854
DisCg-F	<u>GAATCC</u> AAATGGAGAGACCACCAGATGC	<i>Eco</i> RI	4234645-4234627
DisCg-MR	<u>AGATCT</u> GAAAGAGATGTCCTGAACGTGGTG	<i>Bgl</i> II	4236737-4236713
DisCg-MF	<u>AGATCT</u> ACGGACGAGGGCTATGTGCTCTAC	<i>Bgl</i> II	4237304-4237327
DisCg-R	<u>AAGCTT</u> CGTATCCGCTTCTTCTTCGTGCG	<i>Hind</i> III	4239293-4239271
P <sub>sco</sub> Cg-F	<u>GGATCC</u> TCATACGGCGGATGTGGATATTC	<i>Bam</i> HI	4234716-4234740
P <sub>sco</sub> Cg-R	CTCGAGCATGCCGGGAACATCATCGCACTG	<i>Sph</i> I	4234927-4234904
scoCg-F	CTCGAGCATGCCGAACAGAAAAGCAGTGAC	<i>Sph</i> I	4236736-4236759
scoCg-R	<u>GGATCC</u> TTCACGGCGTCTCCCCCTTGATC	<i>Bam</i> HI	4237397-4237375
aphII-F	CTCGAGGATCCCAGTGAGTTCGAGCGAC TCGAGA	<i>Bam</i> HI	
aphII-R	CTCGAGGATCCCTGGTACCGAGCGAAC GCGTA	<i>Bam</i> HI	
DisCa-F	CCATGAAGCTTAGTCGTCACTTCTGTGAG	<i>Hind</i> III	5197506-5197523
DisCa-MR	GGCATAGATCTTCTTGCGCATAGAAAAATG	<i>Bgl</i> II	5198443-5198422
DisCa-MF	ACGGAGATCTATGTGCTGTACGACGACCAG	<i>Bgl</i> II	5199003-5199024
DisCa-R	CGAGTGAAGCTTGACGCCGTACGTCTGATACC	<i>Hind</i> III	5200005-5199976
DishyaSg-F	CCGTCACGCACCCCGGAAGCCGGAAGTACG AGGAATGATGattccgggatccgctgacc		4498971-4498932
DishyaSg-R	ACGGTACGGAGCGCGTCAACGCGCCTCGT ATCAGGACTAtgtaggctggagctgcttc		4497106-4497144

表3 S1ヌクレアーゼマッピングに用いたプライマーの配列。

a, <http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>を参照。

Primer Name	Sequence (5'-3')	Position (nt) <sup>a</sup>
SS1-F	TITCCATGGTGCCGAGCAGAAAAC	4234547-4234570
SS1-R	ACGCAGACCGCGGTGAACAC	4234998-4234979
HS1-F	TCGGCCCATTTTCGTCACGTATGAG	2007659-2007636
HS1-R	TCGATGAGCGCCATCACAGACTCG	2007346-2007369