

第1章 緒言

生態系における炭素循環は、(1) 植物および藻類などの光合成生物による二酸化炭素からの有機化合物の生産、(2) 動植物による有機化合物の変換、消費、および、(3) 微生物による有機化合物の分解、無機化、の3つの過程よりなる。地球上に存在する有機化合物のうち、蓄積され、分解、無機化の過程にある有機物炭素は、地球上で約150億トンにのぼるが、これは、炭素循環における他の2つの過程、すなわち、生産、変換、消費の過程にある有機物炭素量の約3倍にあたる(BrockとMadigan、1988)。また、微生物による分解、無機化の対象となる有機化合物は、単糖や有機酸といった容易に細胞内に取り込まれて代謝される物質から、難分解性の高分子化合物である腐植に至り、極めて多様である。

キチンは、セルロースに次いで、自然界に大量に存在する高分子化合物であり、構造は強固である。キチンもまた他の有機化合物と同様に、微生物によって分解、無機化される。自然界に大量に存在し、強固な構造をとるキチンを分解し、無機化することは、生態系の炭素循環において重要な過程の1つである。

本研究では、キチン分解に関わる微生物の中でも、土壌中の主要なキチン分解細菌である*Streptomyces*属放線菌を対象とし、それらの有するキチナーゼ遺伝子の構造、および発現制御の解析を行うことによって、強固な構造をもつキチンの分解機構に関する基礎的な知見を得ることを目的とした。

1-1 キチンの分布と応用

キチンは、N-アセチルグルコサミンが β -1, 4 結合した直線状の不溶性天然高分子アミノ糖(Fig. 1-1)であり、その生産量は、1年当たり、10億トンと推定

される (Tracyら、1957)。カニやエビなどの甲殻類の殻のクチクラ層の主成分として最もよく知られているが、昆虫の外骨格のクチクラ層や糸状菌の細胞壁の主成分でもあり、その他の生物にも広く分布する (Muzzarelli、1977)。一方、キチンは、その立体配座から、多糖鎖が互いに逆方向に配向する α -キチン、同方向に配向する β -キチン、 α -キチンと β -キチンが混合した γ -キチンに分類され、キチン鎖を構成する *N*-アセチルグルコサミンも様々な割合で脱アセチル化されており (キチンキトサン学会編、1988)、構造的に多様である。

キチンは主にカニ殻として大量に廃棄されるが、セルロースが木材、纖維、紙などとして大量に利用されているのに対し、キチンは、一部が脱アセチル化によりキトサンに変換されて凝集剤として利用されているにすぎない (キチンキトサン学会編、1988)。機能性資材としてのキチンの利用方法が開発されているが、そのほとんどは未だ研究段階にある。一方、キチンの分解生成物であるキチンオリゴ糖は、それ自身が植物に病原性糸状菌に対する抵抗性を誘導するエリシターとしての活性を持つ (古賀、1994) だけではなく、その誘導体がマメ科植物の根粒菌形成における根粒菌から宿主植物へのシグナル物質 (Nod factor) として機能しており (Lorkiewicz、1997)、その他にも様々な生理活性を持つことで注目を集めている。キチンを分解する酵素、キチナーゼに関する研究は、炭素循環の観点において重要なばかりではなく、様々な生理活性をもつキチンオリゴ糖の生産においても注目されている。

1-2 キチナーゼの分布、機能、分類

キチナーゼ (EC 3. 2. 1. 14) は、キチンを加水分解する酵素であり、キチンを生体の構成成分としてもつ甲殻類、昆虫、菌類はもとより、キチンを生体成分として持たない哺乳動物、植物、細菌、ウイルスなどの多くの生物にも存在する。

生体の構成成分としてキチンを持つ甲殻類、昆虫、菌類などでは、キチナーゼは、脱皮や菌糸伸長など、生物の生育、生長に必須である。キチンを生体成分に持たない生物のうち、植物では、キチナーゼが糸状菌の生育を抑制すること（Leahら、1991）、および、病原性糸状菌の進入によって誘導されるキチナーゼが存在すること（Kogaら、1992）から、植物のキチナーゼは、キチンをもつ病原性糸状菌を溶菌するか、あるいは、何らかの機作によって生育を阻害するなどの生体防御が主要な役割であると考えられている。また、マツ科のトウモ（*Picea abies*）の生産するある種のキチナーゼが菌根菌の生育を阻害せず、菌根菌からのエリシターを不活性化することから、植物キチナーゼの一部は、菌根菌の植物体への進入を可能にする役割をもっていると考えられる（Salzerら、1997）。哺乳動物においては、キチナーゼの生理的機能はほとんど不明であるが、モルモットの血中のキチナーゼ活性が病原性糸状菌の感染によって上昇すること（渡辺、1997）や、人のマクロファージでキチナーゼ遺伝子に高い相同意を示すキトトリオシダーゼ遺伝子が発現すること（Bootら、1995）から、哺乳動物においても、キチナーゼは、生体防御に関与していると考えられている。キチン分解能を有する細菌は、海洋、土壤を問わず、様々な環境に分布する。これらの細菌は、細胞外（グラム陰性菌のペリプラズムを含む）にキチナーゼを分泌することによって、環境中に存在するキチンを加水分解し、炭素源あるいは窒素源として資化する。細菌のキチナーゼは、自然界に大量に存在するキチンを分解することで、炭素や窒素の循環において重要な役割を担っている。

以上のように、キチナーゼは生物に広く分布し、多様な役割をもっている。それゆえ、キチナーゼは、様々な観点から研究されている。これまでに、様々な生物から多くのキチナーゼが精製され、クローニングされたキチナーゼ遺伝子は、cDNA由来のものを除いても既に100（このうち、細菌および植物由来のものが

それぞれ30以上を占める) を超え、cDNAを加えると200を超える。その数は現在も増加しつづけている。Henrissatら (1991、1993) は、キチナーゼを含む全ての糖加水分解酵素をアミノ酸配列の相同性に基づいて57のファミリーに分類し、上記の遺伝子によってコードされる全てのキチナーゼが、ファミリー18とファミリー19に分類されることを示した (Fig. 1-2)。これら2つのファミリーに属するキチナーゼは、アミノ酸配列の相同性はなく、タンパク質としての立体構造が全く異なる (DaviesとHenrissat、1995)。また、キチンの加水分解における反応機構も異なり (Armandら、1994; Iseliら、1996)、両ファミリーに属するキチナーゼは進化的に起源が全く異なるものと考えられている。ファミリー18キチナーゼがキチナーゼを有する生物全般に分布するのに対し、ファミリー19キチナーゼが、ただ1つの例外を除いて、高等植物に特異的に分布することは、両ファミリーのキチナーゼの進化を考える上で興味深い点である。ファミリー19キチナーゼを有する高等植物以外の生物としては、これまで、本研究で対象とした *Streptomyces* 属放線菌のうちの1種、*S. griseus*のみが知られていた (Ohnoら、1996)。これについては、1-4で詳しく記す。

1-3 放線菌の特徴と研究の歴史

放線菌は、胞子発芽→基底菌糸伸長→気中菌糸形成→胞子形成、というはつきりとした形態分化を行うことを特徴とする細菌であり (Holtら、1994)、分類的には、グラム陽性の高GC含量グループに属する。また、抗生物質や除草剤をはじめとする多くの生理活性を有する二次代謝産物を生産することから、産業的に重要視される細菌である。

放線菌は、古くは1870年代に動物の病原性細菌として見出されているが、当時は純粋培養技術が普及しておらず、それらの株は現存していない (堀田と堀之内、

1994）。20世紀になると、Beijerinck、Krainsky、Conn、Waksman、Curtisなどの土壤微生物学者によって多くの放線菌が分離、記載されるようになった。それらの放線菌は、土壤微生物のフローラ解析を行った際に分離されたもので、分類上の多様性、土壤中での有機物分解における役割、糸状菌や細菌に対する拮抗能、ならびに形態分化についての研究が行われていた（Waksman、1959）。放線菌の研究にとって大きな転機となったのは、WaksmanとWooruff（1940）による、*S. antibioticus*からの抗生物質アチノマイシンの発見である。以来、放線菌は、抗生物質のみならず、除草剤や免疫抑制剤など様々な有用生理活性物質の探索対象となり、産業的にも重要視されるようになった。放線菌を対象とした生理活性物質の探索が盛んに行われる一方で、1950年代になるとHopwoodらのグループによって、主として*S. coelicolor*を対象とした地道な遺伝学的解析が開始され、1980年代には*S. coelicolor*や*S. lividans*における形質転換や宿主ベクター系が確立、普及した（Hopwoodら、1985）。1980年代以降、*Streptomyces*属放線菌を中心として、抗生物質生合成経路、形態分化などについて、遺伝学的、分子生物学的な研究が盛んに行われるようになった。

一方、放線菌は、菌体外に多様な多糖加水分解酵素を分泌することが知られていた。1980年後半になり、放線菌における分子生物学的研究方法が普及すると、*Streptomyces*属放線菌から、アミラーゼ（デンプン分解酵素）、キシラナーゼ（キシラン分解酵素）、アガラーゼ（寒天分解酵素）、セルラーゼ（セルロース分解酵素）およびキチナーゼといった様々な多糖加水分解酵素の遺伝子がクローニングされた。これらの事実から、放線菌の土壤中における役割の1つは多糖類の分解であり、地球上の炭素及び窒素の循環に重要な役割を果たしていると考えられるようになった。キチナーゼに関しては、土壤中のキチンを分解する酵素としてだけではなく、キチンを細胞壁成分としてもつ植物病原性糸状菌の防除への

応用が期待され、研究が行われてきた。

1-4 *Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼに関するこれまでの研究

1-4-1 *Streptomyces* 属放線菌によるキチン分解と病原性糸状菌にを 原因とする植物病害の抑制

土壤中に存在する*Streptomyces* 属放線菌の特徴の1つは、キチン分解能を有することであり (WilliamsとRobinson、1981) 、*Streptomyces* 属放線菌の計数、分離のための選択培地としてもキチン培地が用いられてきた (LingappaとLockwood、1962；HsuとLockwood、1975)。MitchelとAlexander (1962) およびSnehら (1971) は、土壤にキチン添加することにより、*Streptomyces* 属放線菌数が増加すること、ならびに、糸状菌による植物病害が軽減されることを見いたした。これにより、*Streptomyces* 属放線菌の栄養源としてのキチンの重要性が示唆されるとともに、*Streptomyces* 属放線菌による土壤中の病原性糸状菌の抑制効果が初めて示唆された。その後、*Streptomyces* 属放線菌が糸状菌溶菌活性を有し、それにキチナーゼが関わることが示された (Lloydら、1964；Skujinsら、1965)。一方で、キチナーゼタンパク質に関する酵素学的な研究が行われた。BergerとReynolds (1958) は、*S. griseus* より、2つのキチナーゼを精製し、キチナーゼが多重酵素 (multiple enzyme) であることを示し、それぞれのキチナーゼの酵素学的な性質を決定した。しかし、キチナーゼの多重性の要因が、単一のタンパク質のプロセシングであるのか、あるいは、異なったキチナーゼ遺伝子の存在であるのかを結論づけることはできなかった。これ以降も、複数のキチナーゼが*Streptomyces* 属放線菌より精製された (Skujinsら、1970；TominagaとTsujisaka、1976) が、キチナーゼタンパク質の多重性の要因を解明するには至っていない。Romagueraら (1992) は、*S. olivaceoviridis* の培養上

清液から複数のキチナーゼタンパク質を精製し、抗体を用いた実験から、キチナーゼタンパク質の多重性が単一の遺伝子産物のプロセシングによることを示唆した。しかし、これ以後の遺伝子レベルの研究から、キチナーゼの多重性の要因は単一の遺伝子産物のプロセシングだけではないことが示された。キチナーゼの多重性の要因をタンパク質レベルでの研究から解明するには、限界があったといえる。

1-4-2 *Streptomyces*属放線菌のキチナーゼ遺伝子のクローニングとキチナーゼの構造

*Streptomyces*属放線菌における形質転換系および宿主ベクター系が確立された1980年代になると、キチナーゼをコードする遺伝子を対象とした研究が開始された。その結果、これまでに5種の*Streptomyces*属放線菌から7つのキチナーゼ遺伝子がクローニングされ、それらの塩基配列から、キチナーゼタンパク質の一次構造が推測された（Fig.1-3）。なかでも、*S. lividans*からは3つの異なったキチナーゼ遺伝子（*chiA*、*chiB*、*chiC*）がクローニングされ（Miyashitaら、1991； MiyashitaとFujii、1993； FujiiとMiyashita、1993； Miyashitaら、1997）、これによって、*Streptomyces*属放線菌のキチナーゼの多重性の要因の1つが、複数のキチナーゼ遺伝子の存在によることが明らかとなった。また、*S. lividans*の3つのキチナーゼ遺伝子のうち*chiC*の産物が、培養液中で時間とともにプロセシングを受けることから（FujiiとMiyashita、1993）、タンパク質のプロセシングもキチナーゼの多重性の要因であることが示された。

*Streptomyces*属放線菌由来の7つのキチナーゼを、触媒ドメインの一次構造から、糖加水分解酵素の分類群に基づいて分類する（1-2参照）と、そのうち6つはファミリー18に属し、残りの1つがファミリー19に属する。このファミリー19キチナーゼ遺伝子は、*S. griseus*よりクローニングされ、高等植物以外で見出され

た唯一の例外であった (Ohnoら、1996)。残りの6つのファミリー18キチナーゼ遺伝子は、更に、Watanabeら (1993) による細菌キチナーゼの分類群におけるグループAとグループBに分類される (Fig. 1-3)。これらの異なるグループに属するキチナーゼの触媒ドメインのアミノ酸配列は、お互いに、活性中心付近のモチーフ配列は保存されているものの、その他の部分の相同性はない。

キチナーゼは、ドメイン構造をもつことが特徴の1つであるが、*Streptomyces* 属放線菌由来のキチナーゼも例外ではない。*Streptomyces* 属放線菌由来の6つのファミリー18キチナーゼのうち5つは、同様のドメイン構造をもつ (Fig. 1-3)。すなわち、アミノ酸末端からカルボキシル末端に向かって、シグナル配列、基質結合ドメイン、フィブロネクチンタイプIII様ドメイン、触媒ドメイン、の順で構成される。これらの同一の構造をもつキチナーゼうち、一部のキチナーゼの基質結合ドメインは、セルラーゼのセルロース結合ドメインと相同性を示す (Robinsら、1992; FujiiとMiyashita、1993)。また、フィブロネクチンタイプIII様ドメインは、哺乳動物の結合組織に存在するフィブロネクチンの構成単位と高い相同性を示すドメインであり、哺乳動物と細菌にしか存在しないため、分子進化上興味深い。しかし、フィブロネクチンタイプIII様ドメインのキチン分解における機能は不明である。ファミリー18キチナーゼの残りの1つは、高熱性である*S. thermophilaceus* 由来の熱安定性のキチナーゼ、Chi40である (Tsujiboら、1993)。Chi40は、ドメイン構造をとらず、シグナル配列と触媒ドメインのみから構成される。ファミリー19キチナーゼである*S. griseus* のChiCは、N末端からC末端に向かって、シグナル配列、基質結合ドメイン、触媒ドメイン、というドメイン構造をもつ (Ohnoら、1996)。

1-4-3 *Streptomyces* 属放線菌におけるキチナーゼ遺伝子の発現制御

一般に土壤細菌の生産する菌体外酵素は、基質の存在下で誘導される誘導酵素

であり、グルコースの共存下で抑制を受けると考えられている。Naugebauerら(1991)は、*S. lividans*のキチナーゼが、キチン添加によって生産が誘導される、誘導酵素であることを示した。また、Miyashitaら(1991)は、*S. lividans*のキチナーゼが、誘導酵素であることを示すとともに、グルコースの共存下で生産が抑制されることを示した。さらに、*Streptomyces*属放線菌由来のキチナーゼ遺伝子を用いたいくつかの研究から、それらの転写が基質であるキチンの存在下で誘導され、また、グルコースの共存下で転写が抑制されることが示され、キチナーゼの生産制御が転写のレベルで起こっていることが示された(Robbinsら、1992；Miyashitaら、1991；MiyashitaとFujii、1993；FujiiとMiyashita、1993)。キチナーゼ遺伝子のキチンによる転写誘導およびグルコースによる転写抑制の機構の解明は、*Streptomyces*属放線菌の遺伝子の発現制御機構の解明におけるモデルとして興味深い。

*S. lividans*由来の $chIA$ 遺伝子および*S. plicatus*の $chi63$ 遺伝子のプロモーター領域には12bpよりなる繰り返し様配列が存在し、この配列中に点変異が起こると、キチナーゼ遺伝子の転写誘導及び抑制に異常が生じることから、この配列がキチナーゼ遺伝子の発現制御に関与する重要な因子であることが示されている(Delicら、1992；Miyashitaら、1993；NiとWestpheling、1997)。この繰り返し様配列は、*Streptomyces*属放線菌由来の全てのキチナーゼ遺伝子のプロモーター領域に、例外なく存在することから(Fig. 1-4)、*Streptomyces*属由来のキチナーゼ遺伝子は、共通のメカニズムによる発現制御を受けていると考えられている(Miyashitaら、1997)。しかし、プロモーター領域に存在する繰り返し様配列に関する知見を除くと、キチナーゼ遺伝子の発現制御のメカニズムは、ほとんど不明である。

1-4-4 *Streptomyces*属放線菌のグルコース抑制機構

一般に、誘導的に生産される多糖加水分解酵素や糖代謝酵素は、グルコースなどの代謝しやすい糖によって生産が抑制される。この現象はカタボライト抑制と総称され、そのなかでも、グルコースによる抑制現象をグルコース抑制という。細菌において糖代謝酵素遺伝子のグルコース抑制に関する研究が最も進んでいるのは、大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子に関するものであり、グルコースの輸送系であるPTS系 (Phosphoenol-pyruvate:sugar Phosphotransferase System) を構成する1つのタンパク質 (IIAGlc) のリン酸化とそれに起因するサイクリックAMPの濃度の変化が、グルコース抑制の中心的な役割をもつ (Postma, 1993)。また、グラム陽性の枯草菌では、グラム陰性の大腸菌とは異なり、グルコース抑制にサイクリックAMPの濃度が関与せず、グルコースの輸送系であるPTS系の1つのタンパク質 (HPr) のリン酸化がグルコース抑制において中心的な役割を果たすことが明らかとなっている (Saier Jr., 1996)。Streptomyces属放線菌に関しては、*S. coelicolor*においてグルコース培地での生育時に細胞内のサイクリックAMPの濃度の変動がないこと (Hodgson, 1982)、および*S. aureofaciens*にはPTS系が存在しないこと (NovotnáとHostálek, 1985) から、Streptomyces属放線菌のグルコース抑制のメカニズムは、サイクリックAMPの濃度変化が関与する大腸菌や、PTS系が関与する枯草菌のグルコース抑制のメカニズムとは異なるものと考えられている。Streptomyces属放線菌のグルコース抑制機構の解明は、細菌におけるグルコース抑制機構の多様性を知る上で興味深いものである。

Hodgson (1982) は、*S. coelicolor*より、グルコースのアナログである2-デオキシグルコース (2-DOG) に耐性を示す自然変異株を複数取得した。これらの2-DOG耐性変異株中には、グルコース資化能が欠損した株 (DOG^r-Glc⁻株) も

存在し、これらのDOG^r-Glc⁻株では、親株とは異なり、アラビノース輸送系やグリセロールキナーゼの生産、ならびにアガラーゼ遺伝子発現におけるグルコース抑制が欠損していることが見いだされた (Hodgson、1982；SenoとChater、1983；Angellら、1992)。このDOG^r-Glc⁻株に対して、遺伝学的な解析を行った結果、グルコースの資化能を相補する遺伝子が、グルコースキナーゼ遺伝子 (*glkA*) であることが示され (Ikedaら、1984)、DOG^r-Glc⁻株に対し、*glkA* 遺伝子を導入すると、グルコース資化能や2-DOG感受性だけでなく、アガラーゼ遺伝子発現のグルコース抑制が回復したことから、*S. coelicolor*のグルコース抑制には、*glkA*遺伝子が関与していることが示されている (Angellら、1992)。さらに、*Zymomonas mobilis*由来のグルコースキナーゼ遺伝子を*S. coelicolor* のDOG^r-Glc⁻株に導入しても、グルコースキナーゼ活性や2-DOG感受性は回復するものの、グルコース抑制が回復しないことから、*S. coelicolor* のグルコースキナーゼ遺伝子 (*glkA*) の産物であるタンパク質そのものが、グルコース抑制において調節因子として関与していることが示唆されている (Angellら、1994)。しかし、GlkAタンパク質の調節因子としての機能は不明である。また、*Streptomyces*属放線菌のグルコース抑制機構に関してはこれらの点を除くとほとんど解明されていない。

1-5 本研究の位置

*Streptomyces*属放線菌のキチナーゼの生産は、キチンの存在下で誘導され、グルコースの共存下で抑制されるが、これらの生産制御はキチナーゼ遺伝子の転写のレベルで行われている (1-4-3参照)。この発現制御に関わる因子として、

それらの遺伝子のプロモーター領域に存在する共通の繰り返し様配列が知られている（1-4-3参照）が、キチナーゼ遺伝子の発現制御機構は、ほとんど不明である。基質の認識から遺伝子発現および抑制に至る情報の流れから成るキチナーゼ遺伝子の発現制御のメカニズムの解明は、*Streptomyces*属放線菌の環境中の栄養獲得戦略の解明や、病原性糸状菌のバイオコントロールへの応用に重要である。*S. lividans*は、複数のキチナーゼ遺伝子がクローニングされ（Miyashitaら、1991；MiyashitaとFujii、1993；FujiiとMiyashita、1993；Miyashitaら、1997）、形質転換系および宿主ベクター系が確立されていることから（1-3参照）、キチナーゼ遺伝子の発現制御のメカニズムの解明の対象としては、最も適した*Streptomyces*属放線菌である。第2章では、キチナーゼ遺伝子の発現制御のメカニズムを明らかにすることを目的として、*S. lividans* のキチナーゼ生産変異株を取得しそれらの解析を行った。その結果、*S. lividans*のキチナーゼ生産のグルコース抑制に必要な因子を明らかにすることができた。

一方、これまでに、*Streptomyces*属放線菌の5つの種から、7つのキチナーゼ遺伝子がクローニングされており、それらのコードするキチナーゼは、触媒ドメインの一次構造やドメイン構造から5つのタイプに分けられる（1-4-2参照、Fig. 1-3）。*S. lividans*からは、これらのうちファミリー18に属する3つのタイプのキチナーゼの遺伝子がクローニングされている。しかし、大野ら（1997）は、*S. griseus*以外の*Streptomyces*属放線菌（*S. lividans*を含む）にもファミリー19キチナーゼ遺伝子が存在することを示唆しており、Miyashitaら（1997）も、*S. lividans*には、これまでにクローニングされた3つのキチナーゼ遺伝子以外にそれらのホモログが存在することを示唆している。すなわち、1株の*Streptomyces*属放線菌には、*S. lividans*から既にクローニングされている3つよりも、さらに多数の異なるキチナーゼ遺伝子が存在する可能性が考えられた。近年、Redenbach

ら（1996）によって、*S. lividans*と極めて近縁な関係にある*S. coelicolor*（Leblondら、1993）について染色体整列コスミドライブラリーが作成された。この染色体整列ライブラリーを用いることにより、これまでに得られた*Streptomyces*属放線菌由来のさまざまな遺伝子のホモログの染色体上での位置の決定や、それらのホモログのクローニングを容易に行うことができる。第3章では、1株の*Streptomyces*属放線菌がもつキチナーゼ遺伝子の全貌を明らかにすることを目的として、*S. coelicolor*の染色体整列ライブラリーを用いて、*Streptomyces*属放線菌由来の既知のキチナーゼ遺伝子のホモログの染色体上における位置を決定し、さらには各ホモログをクローニングし、構造を解析した。その結果、*S. coelicolor*は、他のキチン分解能を示す細菌で明らかにされているよりも、多くの、多様性に富んだキチナーゼ遺伝子を有することを明らかにした。さらに、第4章では、第3章で明らかにした*S. coelicolor*の有する複数のキチナーゼ遺伝子の発現誘導現象をノーザンハイブリダイゼーションによって転写レベルで解析した。

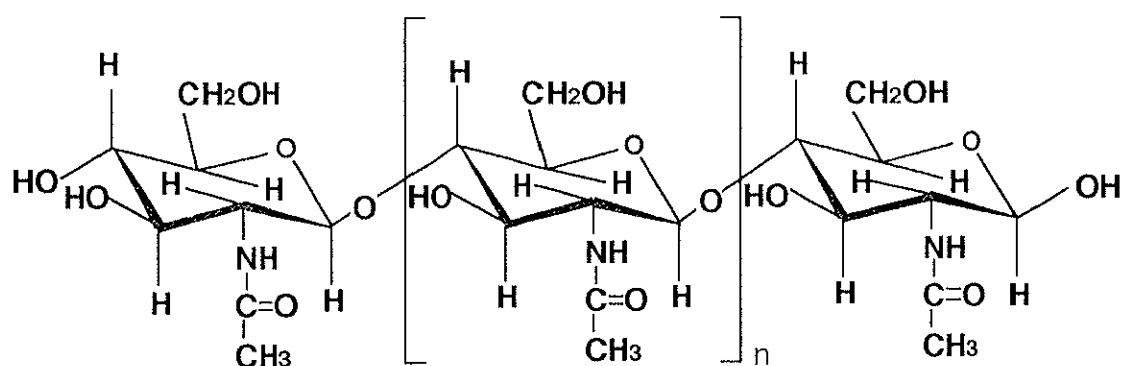


Fig. 1-1. Structure of chitin, a polymer of *N*-acetylglucosamine linked by β -1, 4 bonds.

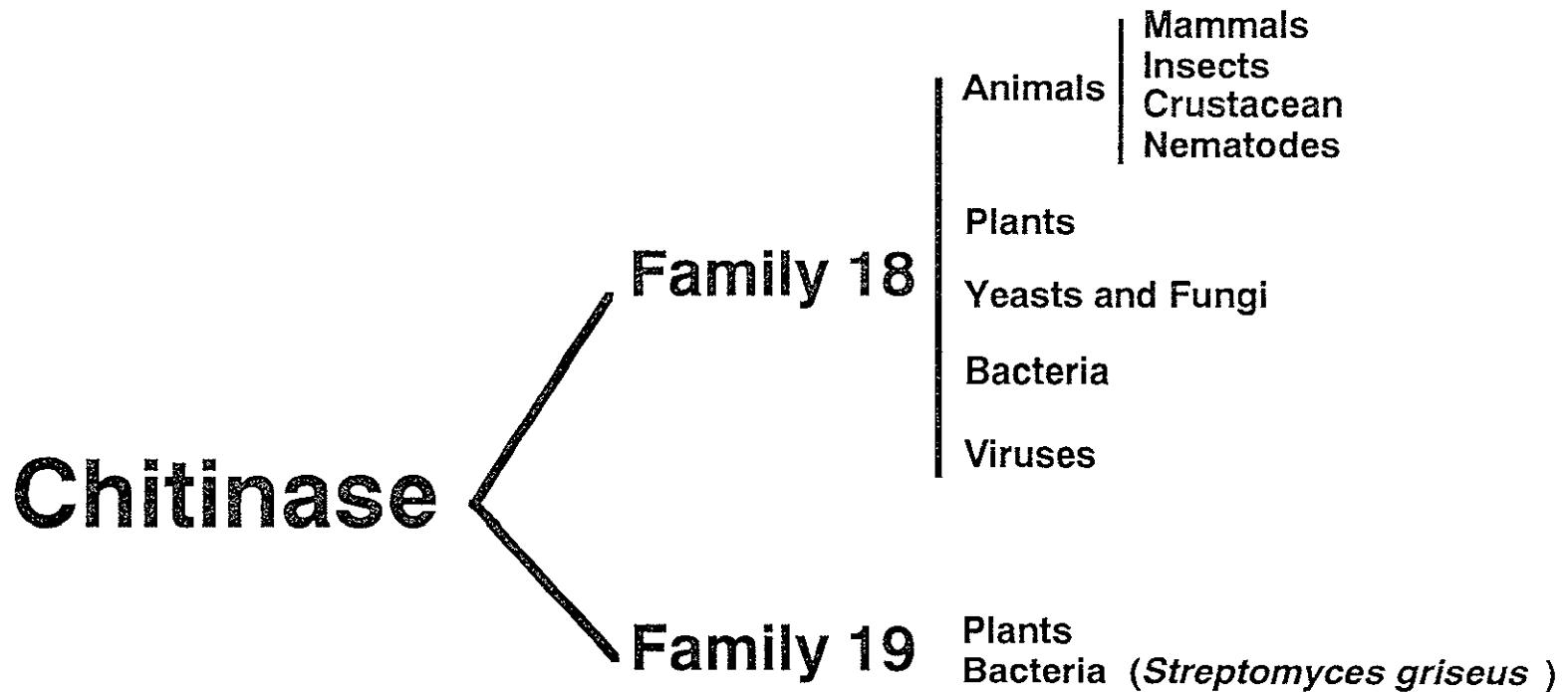


Fig. 1-2. Classification and distribution of chitinases. Chitinases present in mammals, insects, plants, fungi, bacteria and viruses belong to either family 18 or family 19 of the glycosyl hydrolase classification scheme (Henrissat, 1991; Henrissat and Bairoch, 1993).

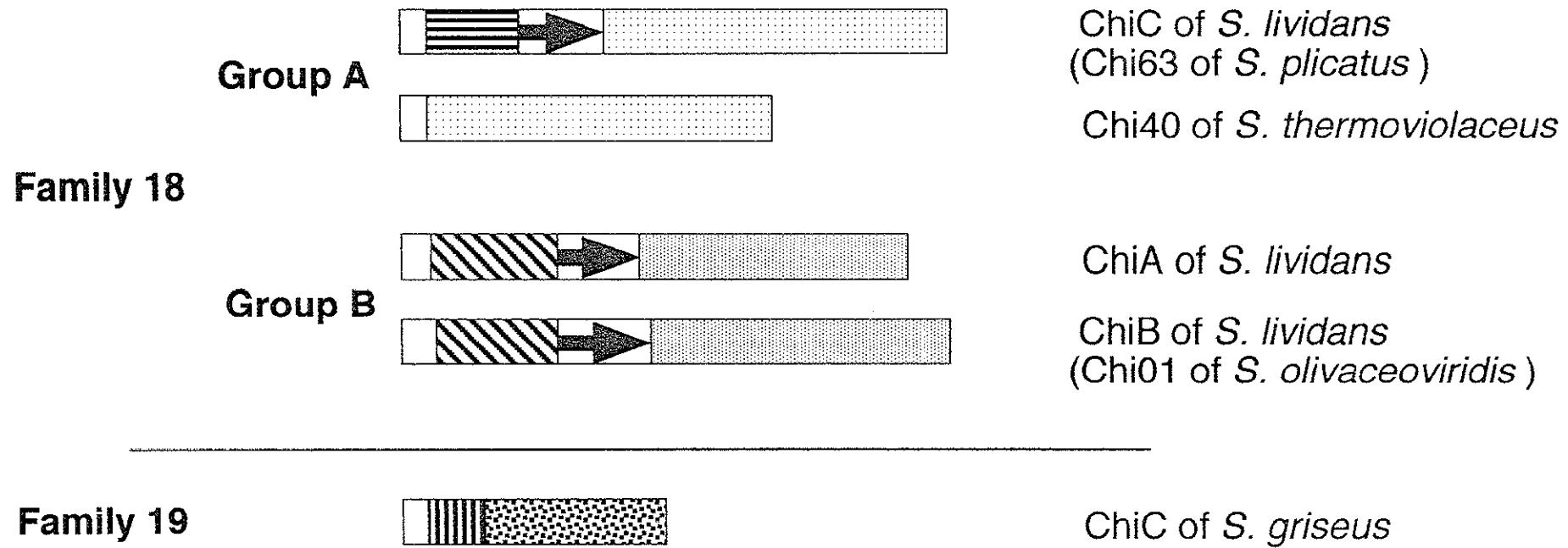


Fig. 1-3. Multiple domain structures and classification of chitinases of *Streptomyces*. Open boxes, striped boxes, boxes with arrows, and dotted boxes indicate signal domain, substrate binding domain, fibronectin type III-like domain, and catalytic domain, respectively.

P-chi63 (<i>S. plicatus</i>)	ttcaaccccccgggcgccacat	TGGTCCAGACCT	<u>ttgacc</u>	ta	TGGTCCAGACCT	<u>ttctatttcgcgg</u>
P-chiC (<i>S. lividans</i>)	ttcaaccactggccgccacat	TGGTCCAGACCT	<u>ttgacc</u>	tg	TGGTCCAGACCT	<u>ttctatttcgcgg</u>
P-chi40 (<i>S. thermophilaceus</i>)	actgatgcgtgaccgttat	TGGTCCAGACCC	<u>ttgacc</u>	cag	TGGTGGAGACCT	<u>ttctatattcgcc</u>
P-chiA (<i>S. lividans</i>)	ggccgccaact	TGGTCCGTACCT	<u>accc</u>	tttcaat	TGGTGTGACCC	<u>accc</u> ttgtacgtcagc
P-chiB (<i>S. lividans</i>)	cgccgacgact	TGGTGTGAGGTGCG	<u>Caagggg</u>	ttqacaacagaat	TGGTGTGACCC	<u>Aatt</u> gagcgcgc
P-chi01 (<i>S. olivaceoviridis</i>)	-----	ggccggccgtcgccg	<u>gagaacc</u>	ttqacaacagtgtat	TGGTGTGACCC	<u>aagt</u> ttgtggcg
P-chiC (<i>S. griseus</i>)	ggtggcacccggcacctt	TGGTGTGAGGTGCG	<u>tgg</u>	ttqac	TGGTCCAGACCA	<u>Atcctcgcttqagta</u>
P-chb1 (<i>S. olivaceoviridis</i>)	gat <u>ttcc</u> ATGGACCA	TGGTGTGAGGTGCG	<u>ttt</u>	catgtgacggcaataat	TGGTGTGACCT	<u>tgacggctactgc</u>

Fig. 1-4. Alignment of the nucleotide sequences of the promoter regions of chitinase genes from *Streptomyces* spp. and that of a chitin binding protein gene (*chb1*) from *S. olivaceoviridis*. The putative -35 and -10 sequences of each promoter are boxed and underlined, respectively. Direct repeats are printed in upper case and the sequences identical to those of *chi63* from *S. plicatus* are printed in white on black background.