

## 第2章 *Streptomyces lividans*のキチナーゼ生産変異株の取得と解析

*S. lividans*のキチナーゼは、キチンの存在により生産が誘導される誘導酵素であり、グルコースの共存下で生産が抑制される（Naugebauerら、1991；Miyashitaら、1991）。この生産制御は、遺伝子の転写のレベルでの調節によって行われており（MiyashitaとFujii、1993；FujiiとMiyashita、1993）、キチナーゼ遺伝子のプロモーター領域に存在する繰り返し様配列がこれらの発現調節において重要な役割を果たしている（MiyashitaとFujii、1993）。

一方、*S. coelicolor*では、グルコースキナーゼ遺伝子（*glkA*）がアラビノース、グリセロール、および寒天などの様々な糖の代謝系酵素のグルコース抑制に関与することが示されているが（1-4-4参照）、IngramとWestpheling（1995）は、*S. plicatus*のキチナーゼ遺伝子（*chi63*）を用いた実験から、*S. coelicolor*における*chi63*遺伝子の転写のグルコース抑制には*glkA*が関与しないことを示唆しており、キチナーゼ遺伝子の発現のグルコース抑制のメカニズムは、他の糖代謝酵素とは異なる可能性が示唆されている。しかし、キチナーゼ遺伝子の発現制御についてのメカニズムについては、ほとんど不明である。

*S. lividans*は、形質転換系および宿主ベクター系が確立され、すでに3つのキチナーゼ遺伝子が取得解析されていることから、キチナーゼ遺伝子の発現制御のメカニズムを解明するには最も適当な対象である（1-5参照）。そこで本章では、*S. lividans*のキチナーゼ生産変異株を取得し、それらについて遺伝学的な解析を行うことによって、キチナーゼ遺伝子の発現制御のメカニズムを解明することを目的として研究を行った。

## 2-1 材料及び方法

### 2-1-1 使用菌株およびプラスミド

本章の実験で用いた菌株およびプラスミドをTable2-1に示した。pEMX151は、低コピー数プラスミドpXE4 (Ingramら、1989) 由来のプラスミドであり、*S. lividans*由来の*chiA*遺伝子のプロモーターからの転写活性測定に用いた。pXE4に存在するレポーター遺伝子、*xyIE* (カテコール-2,3-ジオキシゲナーゼをコードする) の上流の*Bam*HI-*Hind*III断片を*chiA*遺伝子の転写開始点の上流及び下流を含む約1kbの断片で置き換えたものが、pEMX151である (Miyashitaら、1998)。pGA01とpGA02は、pXE4の*Bam*HIサイトに対し、pIJ2423の1.2kbの*Bgl*II断片 (*S. coelicolor* の*glkA*遺伝子の構造遺伝子と2つのプロモーターのうちの1つを含む。) を挿入したプラスミドである。pGA01中の*glkA*は、pXE4の*xyIE*と同一の向きであり、pGA02の*glkA*はそれとは逆の向きである。pGAH01は、高コピー数プラスミドpIJ486の*Bam*HIサイトに上記の*glkA*遺伝子を含む1.2kbの*Bgl*II断片を挿入したものである。

### 2-1-2 DNA取り扱い技術

*S. lividans*のプロトプラストの調製と形質転換は、Hopwoodらの方法 (1985) に従って行った。すべてのDNA組換え技術は、Sambrookら (1989) によって記載されている方法に従って行った。

### 2-1-3 キチナーゼ生産変異株の取得

*S. lividans* TK24株の胞子に対し、生存率が0.4%となるまで紫外線 (302nm) を照射した後、ISCG寒天平板培地 [0.15%(w/v) コロイダルキチン (Lingappaら、1962) 、5mM MgSO<sub>4</sub>、15mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、25mM TES (pH7.2)、0.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1%(v/v) 微量要素液 (ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>・

7H<sub>2</sub>O、MnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O、およびNaClを各0.1g/lを含む。）、1.0%(w/v) グルコース、および1.5%(w/v) 寒天] またはISC寒天平板培地（グルコースを添加していないISCG培地）に暗所で塗布した。30℃で約1カ月培養後、ISCG培地上ではコロニーの周囲にコロイダルキチンの分解によって生じるクリアゾーンを形成する株を、また、ISC培地上では、クリアゾーンが他のものに比べて大きい株を選択した。

#### 2-1-4 糖の資化性および2-デオキシグルコース耐性試験

各糖の資化性試験では、各糖100mMを炭素源とするNMMB平板培地（Hodgson, 1982）に、SFM培地（Hobbsら、1989）で形成させた胞子を植菌し、30℃で1週間培養した。コントロールとして使用した炭素源を添加しないNMMB培地と生育を比較することで、各糖に対する資化性を判定した。また、液体培地でのグルコースの資化性試験では、発芽処理（Hopwoodら、1985）を行った胞子を、1.0%(w/v) グルコースを含むSMM培地（カザミノ酸とポリエチレングリコールを含まない）（Strauchら、1991）に植菌し、30℃で200rpmで振とう培養し、以後、経時的に培養液を採取して、菌体タンパク質量を測定した。タンパク質量の測定は、以下のように行った。遠心集菌した菌体を2回蒸留水で洗浄した後、蒸留水に再懸濁し、超音波処理によって菌体を破碎した。破碎液に対し、2分の1量の3M NaOHを添加して、30分間煮沸後、室温で7000g、10分遠心し、上清液についてタンパク質量をBradfordの方法（1976）で測定した。標準タンパク質には、牛血清γ-グロブリンを用いた。

2-デオキシグルコース（2-DOG）の耐性試験は以下のように行った。胞子を100mMの2-DOGと10mMのアラビノースを含むNMMB平板培地に接種し、5日間30℃で培養した。2-DOGを含まない上記平板培地で培養した菌体をコントロールとして生育を比較し、2-DOGの有無に関係なく良好に生育するものを2-

DOG耐性、2-DOGを含む培地での生育が極度に悪いものを2-DOG感受性と判定した。

#### 2-1-5 キチナーゼ活性測定

発芽処理を行った胞子を20mlのLB液体培地（Sambrookら、1989）に植菌し、30℃で48時間、150rpmで振とう培養した。培養液を3等分した後、菌体を遠心集菌し、10mlのYE培地（0.7g/l K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3g/l KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5g/l MgSO<sub>4</sub>, 0.01g/l FeSO<sub>4</sub>, 0.3g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, および 1.0g/l 酵母エキス）で洗浄した。この時点で菌体タンパク質量を測定し（2-1-4参照）、3つの画分をそれぞれYE培地、0.05% (w/v)コロイダルキチンを含むYE培地、0.05% (w/v)コロイダルキチンと1.0% (w/v)グルコースを含むYE培地に、菌体タンパク質量が100  $\mu$ g/mlになるように希釈調整した。以後、30℃、150rpmで培養し、経時的に培養液を採取し、遠心分離後、上清液についてキチナーゼ活性を、沈殿物（菌体およびコロイダルキチンを含む）についてはタンパク質量を測定した。キチナーゼ活性は、4-methylumbelliferyl-*N,N'*-diacetylchitobioside [4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>] または4-methylumbelliferyl-*N,N',N''*-triacetylchitotrioside [4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub>] を基質として測定し、1分間に1nmolの4MUを遊離する酵素量を1unitとした（Miyashitaら、1991）。菌体タンパク質量は2-1-4に記した方法で測定した。

#### 2-1-6 カテコール-2,3-ジオキシゲナーゼ活性測定

*S. lividans* TK24株およびG015株をpEMX151で形質転換した株を培養した（2-1-5参照）。ただし、培地には2  $\mu$ g/mlのチオストレプトンを添加し、G015（pEMX151）株の培養時間は、72時間とした。培養時間の延長は、G015（pEMX151）株の生育がTK24（pEMX151）株のそれに比べて遅いためである。細胞抽出液の調製とカテコール-2,3-ジオキシゲナーゼ活性の吸光度による測定は、文献（Ingramら、1995；Zukowskiら、1983）の記載に従って行った。カテコ

ール-2,3-ジオキシゲナーゼ活性は、1mgタンパク質あたりの1分間の375nmの吸光度の増加量で表した。

#### 2-1-7 グルコースキナーゼ活性測定

細胞抽出液のATP依存性グルコースキナーゼ活性は、Angellら（1992）の方法で行った。

### 2-2 結果

#### 2-2-1 *S. lividans*のキチナーゼ生産変異株の特徴

##### 2-2-1-① キチナーゼ生産変異株の取得

紫外線を照射した*S. lividans* TK24株の胞子を無機塩キチン培地（ISC平板）および1%のグルコースを含む無機塩キチン培地（ISCG平板）に塗布し、コロイダルキチンの分解によって生じるクリアゾーンの形成が親株TK24と異なる変異株をスクリーニングした。30℃で1カ月培養後、ISC平板上で生育した約200個のコロニーのうち1つ（C008）は、親株よりもはっきりとした大きなクリアゾーンをコロニーの周囲に形成した。ISCG平板では約5000個のコロニーより、親株と異なり、コロニー周囲にクリアゾーンを形成する株を6株（G015、G017、G018、G019、G020、G021）得た。これら7株のキチナーゼ生産変異株について、以下、キチナーゼ生産、キチナーゼ生産におけるグルコース抑制、各糖の資化性、および2-DOG耐性に関して、解析を行った。

##### 2-2-1-② キチナーゼ生産変異株のキチナーゼ生産の解析

7株のキチナーゼ生産変異株について、ISCおよびISCG平板培地上でのクリアゾーンの形成を同平板培地上で再確認した（Fig. 2-1）。C008株は、ISCG平板

では、親株TK24と同様にクリアゾーンを形成しないものの、ISC平板で親株TK24より大きなはっきりとしたクリアゾーンを形成したことから (Fig. 2-1A)、グルコース抑制は正常であるが、キチナーゼ生産量が過剰である変異株、あるいは、活性の高い変異型キチナーゼを生産する株であると予測された。G015、G018、G019、G020、およびG021株は、親株TK24がISCG平板上でコロニー周囲にクリアゾーンを形成しないのに対し、ISC平板およびISCG平板のいずれにおいても、クリアゾーンを形成したことから (Fig. 2-1B)、これら5株の変異株は、キチナーゼ生産におけるグルコース抑制が欠損した株であることが推測された。G017株は、前述の5つの変異株よりも時期が遅れてISCG平板でクリアゾーンを形成した (Fig. 2-1B)。また、ISC平板でTK24株に比べて生育は著しく不良であったものの、コロニー直下のコロイダルキチンは分解され透明になっていた (Fig. 2-1A)。これらのことから、G017株は、キチンを資化できないものの、キチナーゼは生産し、そのグルコース抑制が解除された株であると考えられた。

次に、G015、G017、G018、G019、G020、およびG021株について、液体培地を用いて培養上清液中のキチナーゼ活性を測定した (Fig. 2-2)。親株TK24では、基礎培地にコロイダルキチンを添加した場合にキチナーゼ活性が誘導され、グルコースの存在下ではその誘導が抑制されたのに対し、G015株では、グルコースの存在に関係なく、コロイダルキチン存在下でキチナーゼ活性が誘導された。本結果から、G015株は、キチナーゼ生産におけるグルコース抑制が完全に解除された株であることが示された。G017株は、コロイダルキチン添加によってキチナーゼ活性は極めて弱く誘導された。また、グルコース存在下ではTK24より若干高いレベルのキチナーゼ活性が誘導された。G019、G020、G021の3株は、グルコース存在下で弱くキチナーゼ活性が誘導され、キチナーゼ生産におけるグルコース抑制が部分的に解除された株であることが示唆された。G018株は、キチナー

ゼ活性の誘導時期がTK24株より早く、また、誘導される活性のレベルは、TK24の約2倍高かった。また、極めて低いレベルではあるが、グルコースの共存下でのキチナーゼ活性が確認された。

#### 2-2-1-③ 変異株の糖の資化性と2-DOG耐性

7株のキチナーゼ生産変異株について、糖の資化性を平板培地で試験した(Table 2-2)。TK24, C008, G018, G019, G020, 及びG021株は、試験したすべての糖を炭素源として資化することができた。G015株は、グルコースおよびセロビオースを資化できなかったことから、グルコース代謝系に欠損があると予想された。G017株は、*N*-アセチルグルコサミンの資化能が欠損していた。

グルコースのアナログである2-DOGに対する耐性試験においては、G015株のみが耐性を示した。

以下、取得されたキチナーゼ生産変異株のうち、グルコース抑制が完全に解除されていたG015株について、さらに解析を行った。

#### 2-2-2 *S. lividans* グルコース抑制変異株G015の解析

##### 2-2-2-① レポーター遺伝子を用いた*chiA*プロモーターからの 転写活性

キチナーゼ生産におけるグルコース抑制が欠損したG015株について、グルコース抑制の解除が転写レベルで起こっているか否かを調べるため、*S. lividans* 由来のキチナーゼ遺伝子の1つである*chiA*の転写のグルコース抑制に関し、カテコール-2, 3-ジオキシゲナーゼをコードする*xylE*遺伝子をレポーター遺伝子として用いて解析を行った。

低コピー数プラスミド、pXE4中の*xylE*上流に*chiA*のプロモーター領域を含む約1.0kbの断片を挿入したプラスミドpEMX151を、*S. lividans* TK24株および

G015株に導入した。得られた形質転換株における *chiA* プロモーターからの転写活性を調べた結果を、Fig. 2-3に示した。TK24 (pEMX151) 株では、コロイダルキチンの存在下で *chiA* プロモーターからの転写が起こり、グルコースの共存下で転写が強く抑制されるのに対し、G015 (pEMX151)株では、グルコースの共存下でも *chiA* プロモーターからの転写活性が確認された。また、G015 (pEMX151)株における *chiA* プロモーターからの転写活性は、コロイダルキチンのみを添加した場合よりも、グルコースとともにコロイダルキチンを添加した場合の方が、2倍から3倍高かった。本結果から、G015株におけるキチナーゼ生産のグルコース抑制の解除は、少なくとも *chiA* に関しては、転写のレベルで起こっていることが示された。

#### 2-2-2-② *glkA*によるグルコース資化性、2-DOG感受性、グルコースリン酸化活性、およびキチナーゼ生産におけるグルコース抑制の相補

G015株はグルコース資化性が欠損しており、2-DOG耐性株である (2-2-1-③参照)。このことから、*S. coelicolor* で示されているように (Ikedaら、1988) (1-4-4参照)、G015株はグルコースキナーゼをコードする *glkA* 遺伝子の変異株であることが示唆された。そこで、*S. coelicolor* 由来の *glkA* 遺伝子を低コピー数プラスミド pXE4を用いてG015株に導入し、グルコースキナーゼ活性、グルコース資化性、2-DOG感受性、およびキチナーゼ生産におけるグルコース抑制を調べた。

まず、グルコースキナーゼ活性、グルコース資化性、および2-DOG感受性の表現型を調べた結果をTable 2-3 に示した。プラスミドベクターのみを導入したG015 (pXE4)株では、グルコースキナーゼ活性がTK24 (pXE4)株の10分の1以下であり、グルコース資化能もなく、2-DOG耐性であった。しかし、低コピー数プ



ラスミドベクターpXE4を用いて*S. coelicolor* の*glkA*を導入したG015(pGA01)株では、グルコースキナーゼ活性がTK24 (pXE4) 株と同レベルであり、グルコース資化能を有し、2-DOG感受性であった。すなわち、*glkA*遺伝子によりG015株はグルコースキナーゼ活性、グルコース資化性、および2-DOG感受性が相補された。これらの結果より、G015株が*glkA*遺伝子に変異を有することが示された。

次に、TK24 (pXE4) 株、G015 (pXE4) 株、およびG015(pGA01)株について液体培地を用いてキチナーゼ生産におけるグルコース抑制を調べた (Fig. 2-4) 。G015 (pXE4) 株では、コロイダルキチンの添加により、グルコースの存在下でもキチナーゼ活性が誘導されるのに対し、TK24 (pXE4) 株のキチナーゼ活性の誘導は、グルコースの共存下で抑制された。一方、G015(pGA01)株では、TK24 (pXE4) 株と同様、グルコースの存在によってキチナーゼ生産の誘導が抑制された (Fig. 2-4 C) 。すなわち、低コピー数プラスミドベクターを用いた*glkA*の導入によって、G015株でのキチナーゼ生産におけるグルコース抑制が相補された。なお、*glkA*遺伝子をpGA01と逆向きにベクターに挿入したプラスミドpGA02を用いた場合にも、同様の結果が得られた。これらの結果から、*S. lividans* TK24株のキチナーゼ生産におけるグルコース抑制には、*glkA*遺伝子が関与することが示された。

#### 2-2-2-③ 多コピー数のプラスミドベクターを用いた*glkA*の導入

*S. coelicolor*のアガラーゼ遺伝子 (*dag*) の発現に対するグルコース抑制には、*glkA*遺伝子が関与するが、*glkA*遺伝子を多コピー数のプラスミドベクターを用いて導入するとグルコース抑制が解除される (Angellら、1994) 。このような現象が、*S. lividans* TK24株のキチナーゼ生産におけるグルコース抑制についても観察されるか否かを調べるため、多コピー数ベクターpIJ486を用いて*glkA*遺伝子を野生株TK24に導入し、キチナーゼ生産におけるグルコース抑制を調べた。その

結果、*glkA*遺伝子をpIJ486に挿入したプラスミドpGAH01をもつTK24(pGAH01)株は、コロイダルキチンの添加により、グルコースの存在下でもキチナーゼ生産が誘導された (Fig. 2-5)。すなわち、*glkA*遺伝子を高コピー数で導入することにより、キチナーゼ生産におけるグルコース抑制は解除された。

### 2-2-3 *Streptomyces coelicolor* のキチナーゼ生産のグルコース抑制と *glkA* 遺伝子

IngramとWestpheling (1995) は、*S. coelicolor* のキチナーゼ遺伝子の転写のグルコース抑制を調べるために、レポーター遺伝子上流に *S. plicatus* 由来の *chi63* 遺伝子のプロモーター領域を挿入したプラスミドを作成した。これを *S. coelicolor* の *glkA* 変異株に導入し、*chi63* 遺伝子のプロモーターからの転写解析実験を行った結果、*chi63* プロモーターからの転写のグルコース抑制には *glkA* 遺伝子が関与しないことを示唆した。この結果は、*S. lividans* TK24株のキチナーゼ生産におけるグルコース抑制には *glkA* 遺伝子が関与するという、本研究で得られた結論と反するものであった。

Ingramら (1995) の実験では、*glkA* および機能不明の座位 *ccrA1* に変異をもつ *S. coelicolor* の株を用いており、さらには、他種の放線菌由来のキチナーゼ遺伝子を用いたものであった。そこで、*S. coelicolor* 自身のキチナーゼ生産を野生株と *glkA* 変異株について調べることで追試を行った。供試菌株には、Ingramら (1995) が用いた *S. coelicolor* の *glkA-ccrA1* 二重変異株の親株である *glkA* 変異株 J1668 とその親株である J1501 を用いた。その結果、J1501 株、J1668 株のいずれでもキチナーゼ生産はグルコースの共存下で抑制された (Fig. 2-6)。この結果は、先に記した Ingramら (1995) によって得られた結果と一致するものであり、*S. coelicolor* J1501 株のキチナーゼ生産におけるグルコース抑制には、*glkA*

遺伝子が関与しないことが再確認された。

## 2-3 考察

### 2-3-1 *glkA*変異株、G015

*Streptomyces*属放線菌のキチナーゼ遺伝子は、キチンの存在下で転写が誘導され、グルコースの共存下で転写が抑制される。この発現制御機構に関しては、それらのプロモーター領域に存在する繰り返し様配列が遺伝子の転写の誘導と抑制に関与していることが示されているものの、その他の点はほとんど解明されていなかった（1-4-3参照）。本章では、キチナーゼ生産のグルコース抑制が完全に解除された変異株G015の遺伝的な解析によって、*S. lividans* TK24株のキチナーゼ生産のグルコース抑制には、グルコースキナーゼ遺伝子（*glkA*）が関与することを明らかにした。

#### 2-3-1-① 変異について

G015株が*glkA*変異株であることは、*S. lividans*の近縁種である*S. coelicolor*（Leblondら、1993）の*glkA*を低コピー数プラスミドを用いてG015株に導入すると、グルコースキナーゼ活性、グルコース資化能、および2-DOG感受性が回復すること（Table 2-2）により示された。しかしながら、G015株の*glkA*変異が欠失によるものなのか、点変異によるものであるのかは確認されていない。そこでこの点を簡単に調べるため、*S. coelicolor* の*glkA*をプローブとして、*S. lividans*の親株と変異株の全DNAに対して、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、異なる数種類の制限酵素を用いた場合、いずれも検出されたバンドのサイズが親株TK24とG015株で一致した（データ非掲載）ことから、

G015株の*glkA*遺伝子の変異は、紫外線照射による点変異であると考えられる。

### 2-3-1-② *S. lividans*のキチナーゼ生産のグルコース抑制における *glkA*の役割

*glkA*の産物はグルコースキナーゼ活性をもち、グルコースの6位の炭素をリン酸化する役割をもつ (Angellら、1992)。G015株は、このグルコース代謝系の最初の反応を担う*glkA*遺伝子に変異があるためグルコースが資化できないと考えられる。では、その遺伝子産物であるGlkAタンパク質はどのようにキチナーゼ生産のグルコース抑制に関与しているのでしょうか？ 1つの可能性は、GlkAの作用によって生じたグルコース-6-リン酸以降の代謝中間産物がグルコース抑制に関与している可能性であり、もう1つの可能性は、GlkAがグルコースキナーゼとしての役割の他に、グルコース抑制を担う調節因子としての役割も持っている可能性である。

この点に関して、Angellら (1992) は、*S. coelicolor* の*glkA*変異株に対して、*Zymomonas mobilis*由来のグルコースキナーゼ遺伝子を導入し、その表現型を調べている。その結果、*Z. mobilis*のグルコースリン酸化酵素の遺伝子を導入した*glkA*変異株では2-DOG感受性、グルコースキナーゼ活性、ならびにグルコースの資化能は回復したが、グルコース抑制を受ける*dagA* (アガラーゼ遺伝子) のP4プロモーターからの転写のグルコース抑制は回復しなかった。これにより、*S. coelicolor* のグルコース抑制には、グルコース-6-リン酸ではなく、GlkA自身が調節因子として関与している可能性が示唆された。

GlkAを含む一部の糖リン酸化酵素は、転写調節因子とともにROKファミリーを形成しており、これらのタンパク質は進化起源において共通であると考えられている (Titgemeyerら、1994)。GlkAは、ROKファミリーの系統において、糖リン酸化酵素のグループと転写調節因子のグループの中間的な位置にあり、

*Bacillus subtilis*のXylRをはじめとした転写調節因子とアミノ酸配列で20%程度の相同性を示す。したがって、アミノ酸配列の一次構造の点からもGlcAが転写因子として機能する可能性が考えられる。しかし、GlcAにはXylRのアミノ末端に存在するDNA結合部位が存在せず、その他の調節因子としてのモチーフも存在しない。GlcAの調節因子としての機能を証明するにあたっては、ランダム変異を導入するなどの方法が必要になると考えられる。*Streptomyces*属放線菌の多くの糖代謝系酵素生産のグルコース抑制では、*glkA*遺伝子が必要とされ、重要な役割を担っている(1-4-4参照)。GlcAの機能を解析することは、*Streptomyces*属放線菌のグルコース抑制機構の解明において重要であると考えられる。

#### 2-3-1-③ グルコース添加による*chiA*転写量の増大について

*xyIE*をレポーター遺伝子として*chiA*プロモーターからの転写活性を測定した際、G015株では、基礎培地にコロイダルキチンのみを添加した場合より、コロイダルキチンとともにグルコースを添加した場合の方が約2倍高い転写活性を示した(Fig. 2-3)。*glkA*変異株において、グルコースを誘導物質とともに加えると、グルコースを加えない場合に比べて、誘導される遺伝子の転写量が増大することは、*S. coelicolor*の*dagA*(アガラーゼ遺伝子)のP4プロモーターからの転写でも認められている(Angellら、1994)。一方、*glkA*遺伝子の取得のきっかけとなった*S. coelicolor*の2-DOG耐性(DOG<sup>r</sup>)変異株は、グルコースを資化できない(Glc<sup>-</sup>)が、グルコースの輸送系は正常であり、細胞内にグルコースを取り込むことができる(Hodgson、1982)。G015株は、*S. lividans*由来のDOG<sup>r</sup>-Glc<sup>-</sup>変異株である。しかし、*S. coelicolor*のDOG<sup>r</sup>-Glc<sup>-</sup>変異株と同様に考えると、基礎培地にコロイダルキチンのみを添加した場合より、コロイダルキチンとともにグルコースを添加した場合の方が*chiA*プロモーターからの転写活性が約2倍高か

グルコースを添加した場合の方が*chiA*プロモーターからの転写活性が約2倍高かったのは、グルコースの輸送系か、あるいは細胞内に取り込まれ、リン酸化されずに蓄積したグルコースの影響による可能性が考えられる。

#### 2-3-1-④ *S. coelicolor* と *S. lividans* のグルコース抑制機構の相違について

本章の結果から、*S. lividans* TK24株のキチナーゼ生産のグルコース抑制には、*glkA*が関与することが示された。しかし、*S. plicatus*の*chi63*のプロモーターを用いた研究から、*S. coelicolor* におけるキチナーゼ遺伝子の発現のグルコース抑制には、*glkA*が関与しないことが示唆されている (IngramとWestpheling, 1995)。本章では、*S. coelicolor* の*glkA*変異株自身のキチナーゼ生産を調べることと追試を行ったが、結果は、Ingramらの結果を支持するものであった (Fig. 2-6)。 *S. coelicolor* と *S. lividans* は、16S rDNAの塩基配列の解析から系統的に極めて近く (Kataokaら、1997)、ゲノムの構造もよく似ている (Leblondら、1993)。また、次章で示すとおり、*S. coelicolor* は、*S. lividans* のもつ *chiA*, *chiB*, *chiC* に対応する遺伝子を持っており、両株間のそれぞれの遺伝子の塩基配列は99.5%以上の高い相同性を示し、プロモーター部位の配列もほぼ完全に一致する。このように、両種の細菌は様々な点から極めて近縁であることが示されているにも関わらず、キチナーゼ生産のグルコース抑制における*glkA*の必要性に大きな相違が存在することは、興味深い点である。

#### 2-3-2 キチナーゼ生産変異株 C008、G017、G018、G019、G020、 G021

本章では、複数のキチナーゼ生産変異株を *S. lividans* TK24株より得た。ここでは、G015株以外のキチナーゼ生産変異株6株について、考察する。

### 2-3-2-① 高キチナーゼ活性変異株、C008

C008株は、無機塩コロイダルキチン平板培地において、コロイダルキチンの分解によって生じるコロニー周囲のクリアゾーンが親株TK24よりも大きかった (Fig. 2-1A)。それゆえ、C008株はキチナーゼ活性が高い株であると考えられる。キチナーゼ活性が高い原因としては、キチナーゼ生産量が親株に比べて高くなっていることによる場合と、キチナーゼタンパク質自身のキチン分解能が上昇している場合が考えられる。C008株は、紫外線の照射によって点変異を誘発して得られた変異株であることから、キチナーゼタンパク質自身の変異よりも、キチナーゼ生産量が親株よりも上昇するような変異が起こっている可能性が高い。

### 2-3-2-② キチン資化性欠損株、G017

G017株は、グルコースを含む無機塩コロイダルキチン平板培地上でコロニーの周囲にクリアゾーンを形成することから、キチナーゼ生産におけるグルコース抑制が解除した株であると考えられる (Fig. 2-1)。一方、キチンおよびその構成単糖であるN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が資化できなかった (Fig. 2-1、Table 2-1) ことから、G017株は、GlcNAcの代謝系に変異があると考えられる。さらに、G017株は、グルコサミンは資化することができた (Table 1-1) ことから、GlcNAc代謝系のなかでも、GlcNAcリン酸化酵素、あるいはGlcNAc-リン酸脱アセチル化酵素に変異がある可能性が高いと考えられる。

### 2-3-2-③ グルコース抑制変異株、G018, G019, G020, G021

変異株、G018, G019, G020, G021 は、グルコース入りの無機塩コロイダルキチン平板で、コロニー周囲にクリアゾーンを形成し (Fig. 2-1)、キチナーゼ生産におけるグルコース抑制が解除された株として取得された。しかし、G019, G020, G021株は液体培地では、完全にグルコース抑制が解除されたG015株とは異なり、部分的にグルコース抑制が解除された株であった (Fig. 2-2)。また、

G018株は、Fig. 2-2では明らかではないが、スケールを拡大してみるとキチナーゼ生産の有意なグルコース抑制の解除が認められた。これら4つの変異株は、いずれもグルコースの資化能を有し、2-DOGに感受性であることから、G015株とは異なる変異をもつ可能性が高い。すなわち、*S. lividans*のキチナーゼ生産におけるグルコース抑制には、*glkA*遺伝子だけでなく、その他の因子が関与していることが、これらの変異株の取得により示唆された。



Table 2-1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strains	Genotypes and characteristics	References
<i>Streptomyces lividans</i> 66		
TK24	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup>	Hopwood <i>et al.</i> , 1985
G015	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup> <i>glkA</i> ; a derivative of TK24 mutagenized by UV-irradiation	This study
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)		
J1668	<i>hisA1 uraA1 strA1 pgl</i> NF SCP2 <sup>-</sup> <i>glkΔ119</i> ; a spontaneous mutant of J1508 (Ikeda <i>et al.</i> , 1984)	Fisher <i>et al.</i> , 1987
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA4 thi relA1 lac</i> F' [ <i>proAB+</i> <i>lacIq</i> <i>lacZ</i> <i>DM15::Tn10</i> (tet <sup>r</sup> )]	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Plasmids	Description	
pXE4	Low-copy number plasmid with <i>xylE</i> as a reporter gene	Ingram <i>et al.</i> , 1989
pEMX151	pXE4 containing a 1.0kb insert with the <i>chiA</i> promoter	Miyashita <i>et al.</i> , 1998
pGA01	pXE4 containing a 1.2kb insert with <i>glkA</i> gene of <i>S.coelicolor</i> A3(2); the orientation of <i>glkA</i> is the same with <i>xylE</i> gene.	This study
pGA02	pXE4 containing a 1.2kb insert with <i>glkA</i> gene of <i>S.coelicolor</i> A3(2); the orientation of <i>glkA</i> is opposite to <i>xylE</i> gene.	This study
pIJ486	High-copy number plasmid	Hopwood <i>et al.</i> , 1985
pGAH01	pIJ486 containing a 1.2kb insert with <i>glkA</i> gene of <i>S.coelicolor</i> A3(2)	This study
pIJ2423	pIJ 2925 (Janssen and Bibb, 1993) containing a 1.2kb insert with <i>glkA</i> gene of <i>S.coelicolor</i> A3(2)	Angell <i>et al.</i> , 1994

Table 2-2. Utilization of carbon sources by various *Streptomyces lividans* strains.

Carbon source	<i>Streptomyces lividans</i> strains							
	TK24	C008	G015	G017	G018	G019	G020	G021
Glucose	+	+	-	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	-	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>N</i> -acetylglucosamine	+	+	+	-	+	+	+	+
Glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+

+: utilizable as carbon source.

-: unutilizable as carbon source.

Table 2-3. Glucose kinase activity, glucose utilization, and resistance to 2-DOG of the transformants of *S.lividans* strains TK24 and G015.

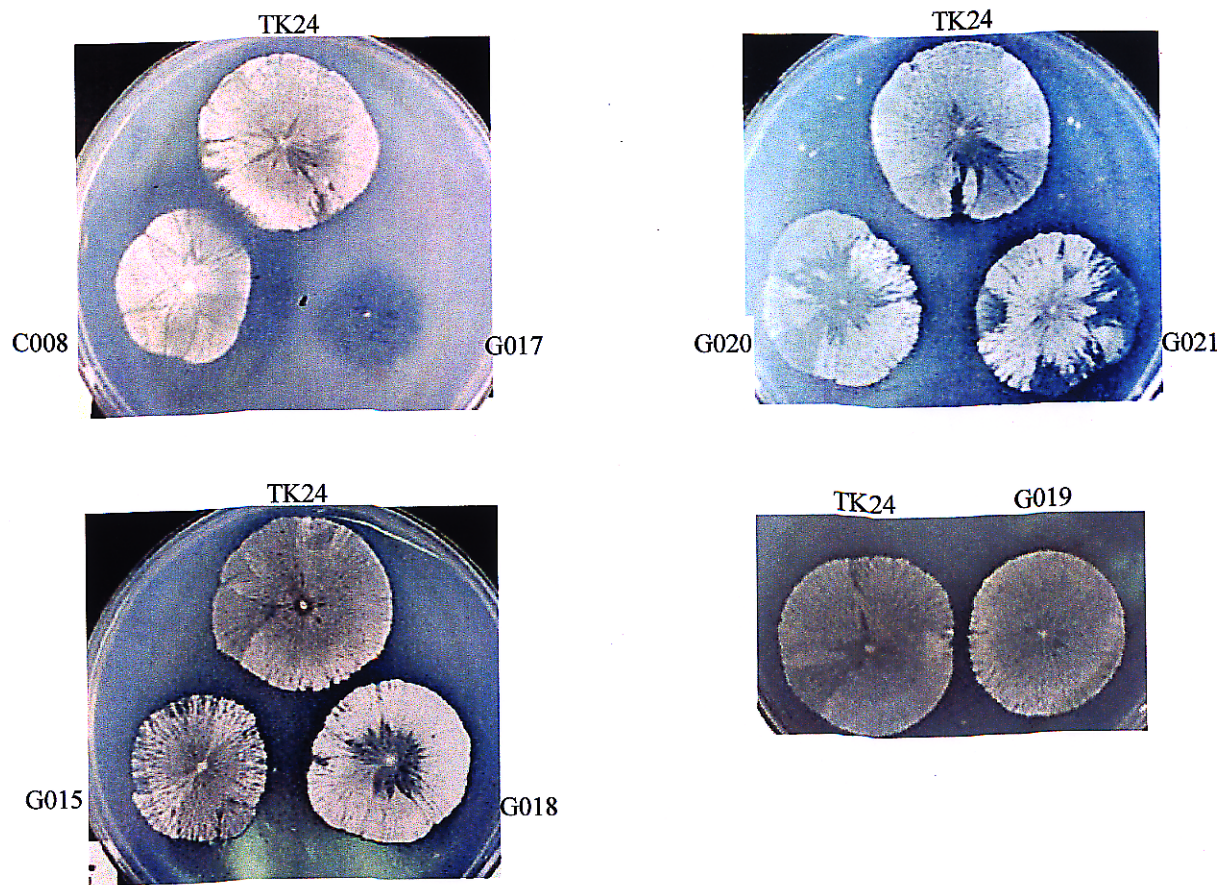
	TK24(pXE4)	G015(pXE4)	G015(pGA01)
Glucose kinase activity (unit)	23	2	19
Glucose utilization <sup>1</sup>	+	-	+
Resistance to 2-DOG <sup>2</sup>	S <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	S

<sup>1</sup>, Glucose utilization was estimated by the growth on NMMB agar medium containing 1.0%(w/v) glucose and 50µg/ml thiostrepton.

<sup>2</sup>, The resistance to 2-DOG was judged from the growth on NMMB agar medium containing 10mM arabinose, 100mM 2-DOG, and 50µg/ml thiostrepton:

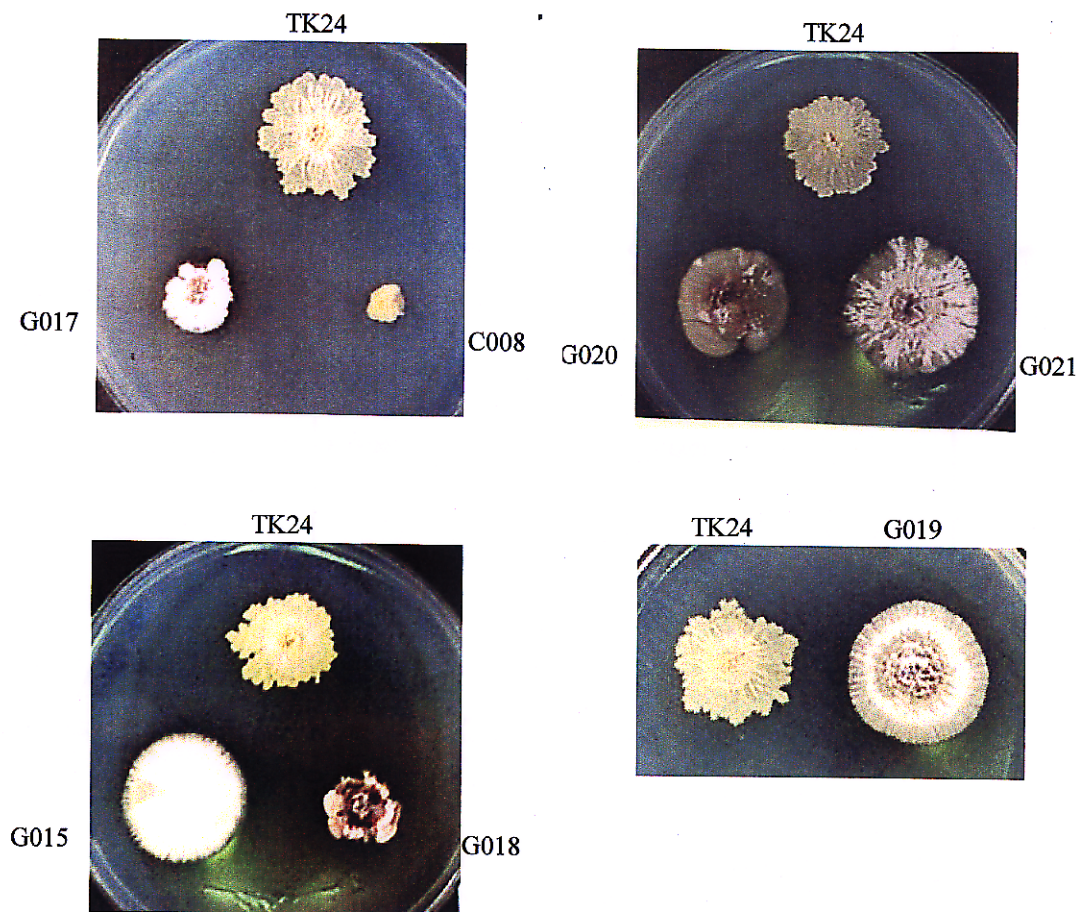
<sup>3</sup>, sensitive to 2-DOG.

<sup>4</sup>, resistant to 2-DOG.



A

Fig. 2-1. Growth of *Streptomyces lividans* strain TK24 mutants and the formation of clear zones around their colonies on ISC agar (A) and ISCG agar medium (B).



**B**

Fig. 2-1B. See p. 37 for legend.

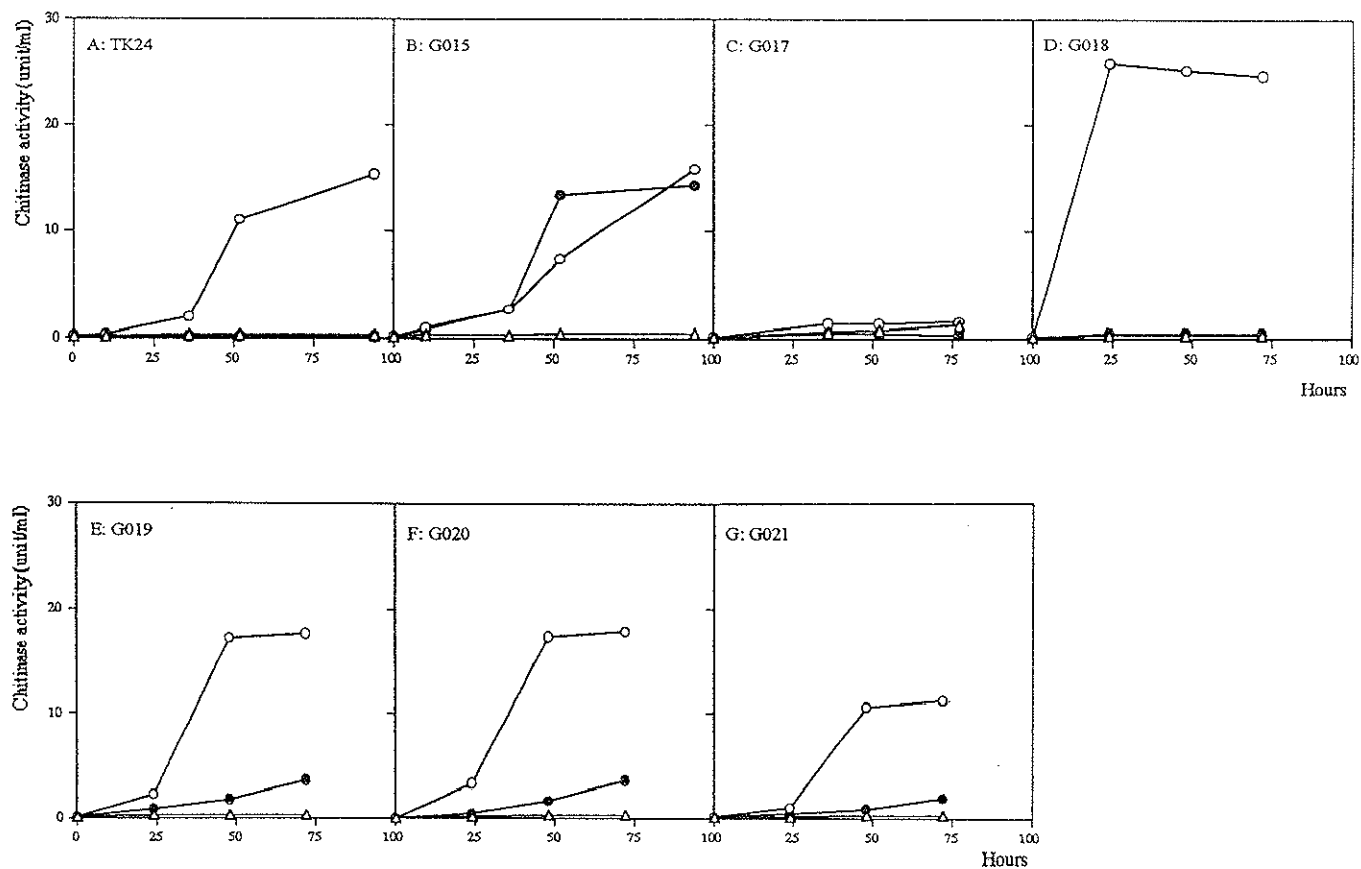


Fig. 2-2. Chitinase activity induced by colloidal chitin in the presence or absence of glucose in *Streptomyces lividans* TK24 (A), G015 (B), G017 (C), G018 (D), G019 (E), G020 (F), and G021 (G). Chitinase activity was measured using 4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub>. At time zero, cultures grown in LB medium at 30°C for 48 hours were divided into three aliquots and the mycelia in each aliquot was suspended in YE medium (triangles), YE medium + 0.05%(w/v) colloidal chitin (open circles), or YE medium + 0.05%(w/v) colloidal chitin + 1.0%(w/v) glucose (closed circles).

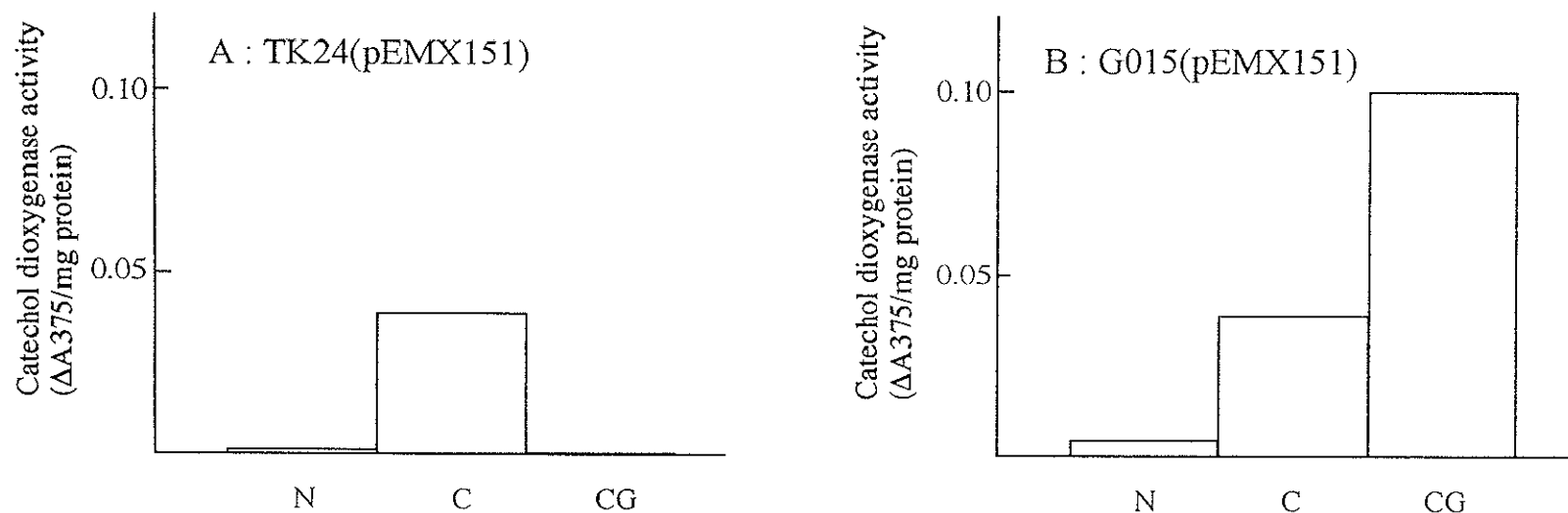


Fig. 2-3. Catechol dioxygenase activity of *Streptomyces lividans* TK24(pEMX151) (A) and G015(pEMX151) (B). Catechol dioxygenase activity was measured at 45 hours after subculturing (see legend of Fig. 2-2 for culture condition) in LB medium supplemented with 2μg/ml of thiostrepton. ΔA375 indicates the increase in optical density per minute at 375 nm. N, YE medium; C, YE medium + 0.05%(w/v) colloidal chitin; CG, YE medium + 0.05%(w/v) colloidal chitin + 1.0%(w/v) glucose.

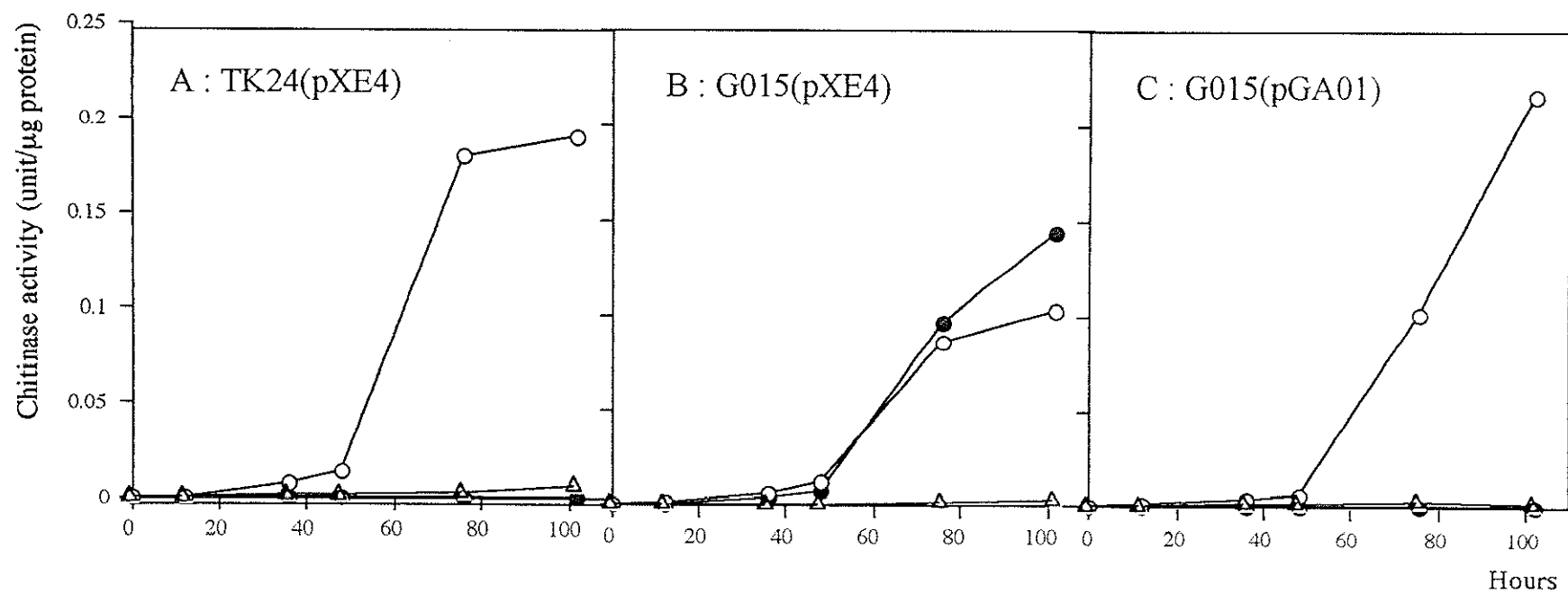


Fig. 2-4. Chitinase activity of *Streptomyces lividans* TK24(pXE4) (A), G015(pXE4) (B), and G015 (pGA01) (C). Chitinase activity was measured using 4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>. Culture conditions and symbols are as described in the legend to Fig. 2-2.



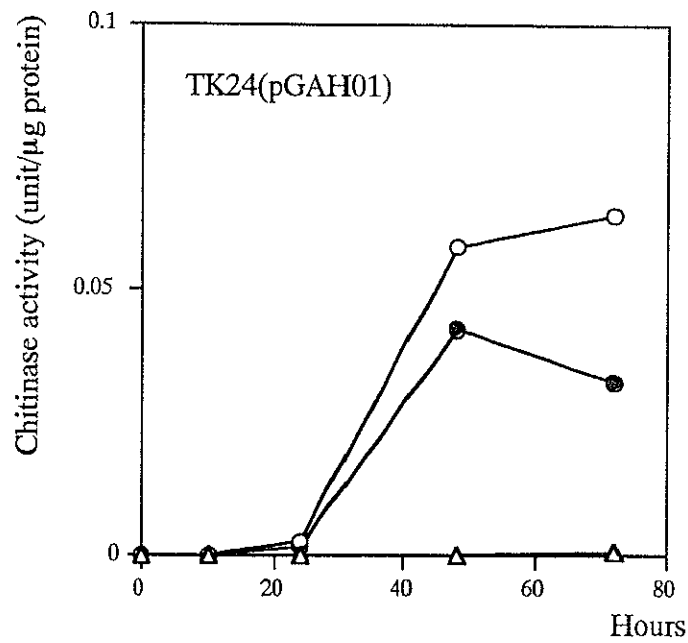


Fig. 2-5. Chitinase activity induced by the addition of colloidal chitin in the presence or absence of glucose in *Streptomyces lividans* strain TK24(pGAH01). Chitinase activity was measured using 4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>. Culture conditions and symbols are as described in the legend of Fig. 2-2.

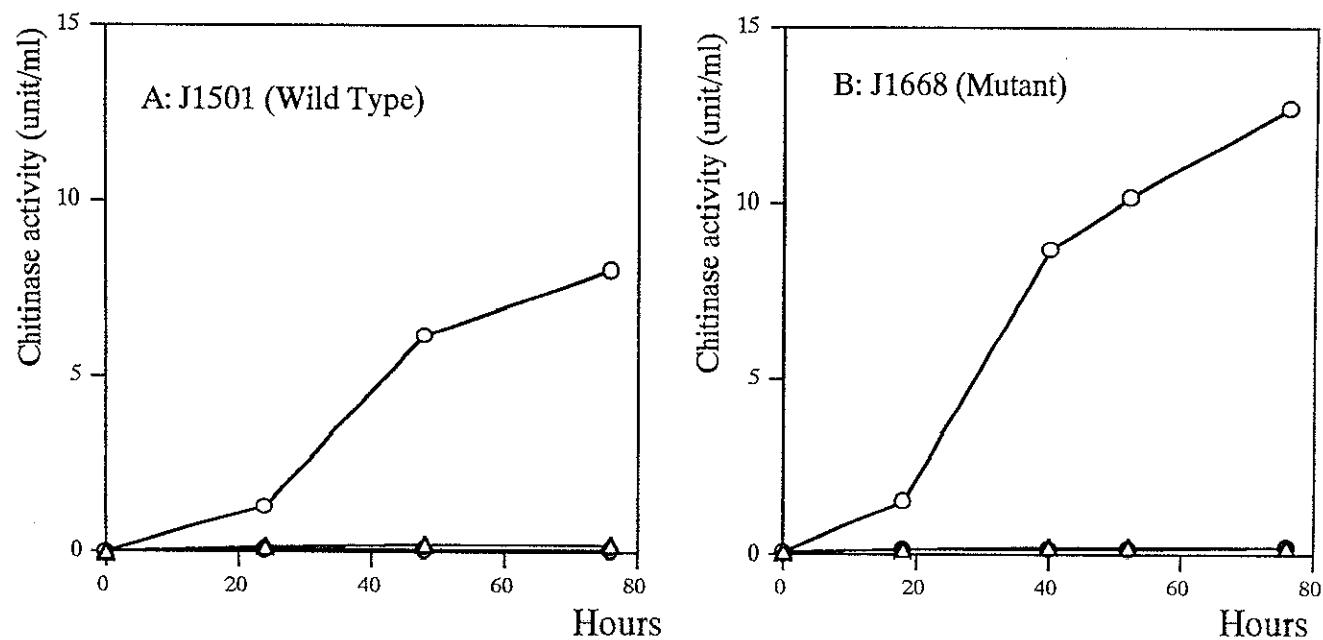


Fig. 2-6 Chitinase activity induced by colloidal chitin in the presence or absence of glucose in *Streptomyces coelicolor* A3(2) strain J1501 (A) and J1668 (B). Chitinase activity was measured using 4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub>. Culture conditions and symbols are as described in the legend of Fig. 2-2.