

第4章 キチナーゼ遺伝子の発現誘導の解析

S. coelicolor は、異なる7つのキチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, *chiE*, *chiF*, *chiG*) を有する (第3章参照)。本章では、これらの7つのキチナーゼ遺伝子の発現の有無を調べるとともに、各キチナーゼ遺伝子間での発現誘導の時期やレベルの異同を明らかにすることを目的として、ノーザンハイブリダイゼーションによって各キチナーゼ遺伝子の発現を転写のレベルで解析した。

4-1 方法

4-1-1 培養条件

S. coelicolor M145株あるいは*S. lividans* TK24株の孢子懸濁液を30mlのLB液体培地 (Sambrookら、1989) に植菌し、30℃で、*S. coelicolor*は24時間、*S. lividans*は48時間、振とう培養後、遠心集菌し、10mlのYE培地 (1-1-5参照) に懸濁して2つに分けた。それぞれを再度遠心集菌後、1つは30mlのYE培地に、もう1つは、誘導物質 [0.05%(w/v) のコロイダルキチン あるいは 1mMキトビオース] を添加したYE培地に再懸濁した。これらを30℃で振とう培養し、経時的に5mlの培養液を採取した。採取した培養液は冷却した後、冷却遠心により培地液を除き、1.5mlのプラスチックチューブに菌体を回収し-80℃で保存した。培養上清液中のキチナーゼ活性は、4MU-(GlcNAc)₂または4MU-(GlcNAc)₃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)。

4-1-2 RNA の調製

菌体に対し、ほぼ等体積のアルミニウム粉末 (Sigma、アメリカ) と50μlの

RLT buffer [RNeasy preparation kit (Qiagen、ドイツ)]を添加し、ポリプロピレン製のペレットミキサーで菌体を物理的に破壊した。これに350 μ lのRLTバッファーを加えて混合後、遠心し、得られた上澄液をもとに、RNeasy preparation kitを用いて説明書に従って全RNAを調製した。

4-1-3 ノーザンハイブリダイゼーション

プローブは、Fig.4-1に示した各キチナーゼ遺伝子中の領域を鋳型DNAとし、*in vitro* transcription DIG-labelling kit (Boehringer Mannheim、ドイツ)を用いて、DIGにより標識したアンチセンスRNAを調製した。各菌体より得た全RNA3 μ gをホルムアルデヒドを含む0.9%(w/v)アガロースゲルで電気泳動後、キャピラリー法によってRNAをナイロンメンブランに移し、254nmの紫外線に照射することで、RNAを同メンブランに固定した (Sambrookら、1989)。このメンブランを用いて、取扱説明書 (Boehringer Mannheim) に従い、ノーザンハイブリダイゼーションおよびプローブの検出を行った。

4-2 結果

4-2-1 コロイダルキチンによる*Streptomyces coelicolor* のキチナーゼ

生産の誘導と各キチナーゼ遺伝子の転写誘導

S. coelicolor M145株のコロイダルキチンの存在下におけるキチナーゼ生産を液体培地で調べた。*S. coelicolor* は、*S. lividans*と同様に、コロイダルキチンの存在下でキチナーゼ生産が誘導された。培養上清液中のキチナーゼ活性は、コロイダルキチンの添加後、24時間で確認され、50時間後には、活性のレベルが最大に達した (Fig. 4-2A)。

S. coelicolor の有する7つのキチナーゼ遺伝子の発現を転写レベルで調べるため、コロイダルキチンの添加後、1、2、4、6、12、24時間培養した菌体より調製したRNAを用いて、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。プローブには、各キチナーゼ遺伝子の転写産物に対して、特異的な検出を行えるような領域の標識アンチセンスRNAを用いた (Fig. 4-1)。その結果、*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*の5つのキチナーゼ遺伝子で、コロイダルキチンの添加によって転写の誘導が確認された。*chiE*の転写産物は検出されなかった。また、*chiG*の場合には、バンドは検出されたものの、そのサイズが*chiG*と高い相同性を示す*chiF*の転写産物に一致したことから、*chiG*の転写産物は検出されなかったと判断された。*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*の主要な転写産物のサイズは、それぞれ1.8k、2.0k、2.0k、1.4k、1.4kであり、*chiF*以外は遺伝子の塩基配列から予想されるサイズと一致した。*chiF*は、翻訳終了コドンの下流にターミネーター構造を取る配列が存在しないことから (Fig. 2-3 E)、*chiF*プロモーターから*chiF*の下流約500bpまでの転写産物が検出されたと考えられる。*chiD*については、主要なバンドの他に、2.0kの位置に弱いシグナルを示すバンドが検出された。これは、*chiD*の転写産物の検出に用いたプローブとして、*chiC*の転写産物と80%の相同性を有する部分を用いたことから (Fig. 4-1)、*chiC*の転写産物に由来するものと考えられる。また、*chiC*については、2.0kの主要なバンドの他に、2.4kの微弱なバンドが確認された。*chiC*の転写産物の検出に用いたプローブは、*chiC*の転写産物が特異的に検出されるように設計したことから、2.4kの微弱なバンドは、*chiC*の上流に存在する別のプロモーターからの転写によるものか、あるいは、*chiC*プロモーターから、*chiC*遺伝子直後のターミネーターよりさらに0.4kb下流に存在するターミネーターまでの転写産物によるものと考えられる。

転写産物が確認された*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*は、ともに、コロイダ

ルキチンの添加後、2時間後に転写産物が検出され、4時間後に転写産物の量が最大となった。また、6時間後には、転写産物は減少し始め、12時間後及び24時間後には、キチナーゼ遺伝子の転写産物は、ほとんど検出されなかった (Fig. 4-3)。キチナーゼ遺伝子の転写が最大となる4時間後には、培養上清液中のキチナーゼ活性は全く検出されず、また、キチナーゼ遺伝子の転写産物が減少しはじめる6時間後に微弱なキチナーゼ活性が検出された (Fig. 4-2B)。各キチナーゼ遺伝子の転写産物の量が最大となったのが、コロイダルキチンの添加後4時間後であったのに対し、培養上清液中のキチナーゼ活性は50時間後に最大に達したことから、キチナーゼ遺伝子の転写と培養上清液中のキチナーゼ活性の検出の間には、時間的に大きなずれがあることが示された。

4-2-2 キトビオースによる *Streptomyces coelicolor* のキチナーゼ遺伝子の転写誘導

S. lividans のキチナーゼ遺伝子 *chiA*、*chiC* は、コロイダルキチンの添加によって、発現が誘導される。Miyashita ら (1998) は、さらに、レポーター遺伝子を用いた実験から、*S. lividans* の *chiA* 遺伝子の直接的な誘導物質は、キチンの分解産物であるキトビオース (N-アセチルグルコサミンの二量体) であることを示している。そこで、*S. coelicolor* の有する各キチナーゼ遺伝子のうち、コロイダルキチンの存在下で発現が誘導された *chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF* の5つのキチナーゼ遺伝子について、キトビオースによって転写が誘導されるか否かを調べるために、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダーゼーションに用いたRNAは、キトビオースを添加してから、30分、1時間、および2時間、培養した菌体より調製した。その結果、*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF* の全てのキチナーゼ遺伝子の転写産物は、キトビオース添加後1時間で検出され、2時間後

にはさらに転写産物の量が増加した (Fig. 4-4)。一方、キトビオースを添加しなかった場合には、培養2時間後にも、転写産物は検出されなかった。また、キトビオースを添加した際の培養上清液中のキチナーゼ活性は、遺伝子の転写量の増加に平行して、増加した (Fig. 4-4, 4-5)。

4-2-3 *Streptomyces lividans* G015株における各キチナーゼ遺伝子の転写のグルコース抑制の解除

S. lividans TK24株のグルコースキナーゼ遺伝子 (*glkA*) 変異株G015では、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ている (2-2-1参照)。また、レポーター遺伝子を用いた実験によって、*S. lividans*の有するキチナーゼ遺伝子のうち、*chiA*に関しては、*S. lividans* G015株において、転写レベルでグルコース抑制が解除されている (2-2-2参照)。*S. lividans*は、*S. coelicolor*の有する多様な7つのキチナーゼ遺伝子のホモログを全て有することが、サザンハイブリダイゼーションの結果から示唆されている (3-2-4参照)。そこで、コロイダルキチンの添加によって発現が誘導された*S. coelicolor*の5つのキチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, *chiF*) のホモログそれぞれについて、それらの転写におけるグルコース抑制が、*glkA*変異株*S. lividans* G015株において、解除されているか否かをノーザンハイブリダイゼーションによって調べた。ハイブリダイゼーションに用いたRNAは、コロイダルキチンを添加してから、4時間培養した菌体より調製した。その結果、調べた全てのキチナーゼ遺伝子において転写のグルコース抑制が解除されていることが示され、*S. lividans*において、キチナーゼ遺伝子の転写のグルコース抑制には、*glkA*が関与することが強く示唆された。

4-3 考察

S. coelicolor は、7つの異なったキチナーゼ遺伝子を有する。本章では、これらの7つのキチナーゼ遺伝子のうち、5つのキチナーゼ遺伝子 (*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*) の転写が、コロイダルキチンあるいはキトビオースの存在下で誘導されること、ならびに、それらの転写誘導は同時期に起こっていることを示した。また、*S. lividans* の *glkA* (グルコースキナーゼ遺伝子) 変異株を用いた実験から、*glkA* 変異株ではこれら全てのキチナーゼ遺伝子の転写のグルコース抑制が解除されていることを示した。

4-3-1 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の保存性と発現誘導

S. coelicolor の有する7つのキチナーゼ遺伝子のうち、コロイダルキチンの存在下での発現誘導が確認されたものは5つであり、残りの2つのキチナーゼ遺伝子、*chiE*、*chiG* については、コロイダルキチンの存在下において転写産物は検出されなかった。また、転写が確認された5つのキチナーゼ遺伝子のうち、*chiB* の転写産物量は、他の4つのキチナーゼ遺伝子よりも低かった。*S. lividans* においても、*chiB* の発現量は、*chiA* や *chiC* に比べて低い (Miyashita ら、1997)。*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は、キチナーゼ遺伝子の発現制御に関与する12bpよりなる繰り返し様配列 (Direct-Repeat Sequence : 以下、DR配列) が存在するが、*S. coelicolor* や *S. lividans* の *chiB* のプロモーター領域に存在するDR配列の保存性が低い (Fig. 1-4)。このことが、他のキチナーゼ遺伝子よりも *chiB* の発現量が低い原因である可能性が考えられる (Miyashita ら、1997)。

発現が確認されなかった *chiE* は、プロモーター領域に DR 配列のうち 1 つの配列しか存在せず、繰り返し配列の形態を失っている。これまでに *Streptomyces* 属放線菌よりクローニングされたキチナーゼ遺伝子のうち、DR 配列の保存性が最も低い遺伝子は、*S. olivaceoviridis* の *chi01* であり、*S. coelicolor* の *chiE* と同様に、プロモーター領域には DR 配列のうち 1 つの配列しか存在しない (Fig. 1-4)。しかし、Chi01 の生産は、他の *Streptomyces* 属放線菌由来のキチナーゼと同様に、*S. olivaceoviridis* で、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 (Blaak ら、1993)。したがって、*chi01* と同様に DR 配列のうち 1 つしかプロモーター領域に存在しない *chiE* の転写も、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ものの、発現レベルが極めて低いために、転写産物が検出されなかったと考えられる。

ノーザンハイブリダイゼーションにおいて、*chiG* およびその上流に位置する ORF (以下、ORF-G) についても、コロイダルキチンの存在下で転写産物は検出されなかった (Fig. 4-3)。ORF-G のプロモーター配列には、*chiB* と同程度に保存された DR 配列が存在する。しかし、転写産物が検出された 5 つのキチナーゼ遺伝子 (*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*) に存在する DR 配列が、1 つは -10 と -35 の間に存在し、もう一方は -35 の上流に存在するのに対し、ORF-G の DR 配列は、1 つは -10 と -35 の間に存在するが、もう一方は、-10 より下流に存在する。ORF-G の予想遺伝子産物のアミノ酸配列と相同性を示す *S. olivaceoviridis* のキチン結合タンパク質をコードする遺伝子 *chb1* は、キチンの存在下で発現することが示されている (Schnellmann ら、1994)。この *chb1* のプロモーター領域に存在する DR 配列の保存性は ORF-G と同様に低く、また、*chb1* の DR 配列のプロモーター領域における位置は ORF-G に類似しており、キチナーゼ遺伝子のそれとは異なる (Fig. 1-4)。したがって、ORF-G は、*chb1* と同様に、コロイダルキチンの

存在下で発現していると考えられるが、DR配列の保存性が低いことと、それらのプロモーター領域における存在位置が他のキチナーゼ遺伝子と異なるために極めて低いレベルで発現しており、その結果、転写産物が検出されなかった可能性が考えられる。

4-3-2 キチナーゼ遺伝子の発現誘導物質について

コロイダルキチンを添加した場合、培養上清液中のキチナーゼ活性がほとんど検出されないコロイダルキチン添加後4時間後に、5つのキチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, *chiF*) の転写産物量は最大となった。培養上清液中のキチナーゼ活性は、6時間後に微弱な活性が確認され、48時間後に最大のレベルに達した。すなわち、キチナーゼ遺伝子の転写産物量と培養上清液中のキチナーゼ活性の間には、40時間もの大きなずれが存在した。一般的に、キチナーゼタンパク質は、基質であるキチンに対して強い吸着性を示すことが知られている。したがって、キチナーゼ遺伝子の転写とキチナーゼ活性の間に時間的なずれが生じた理由として、コロイダルキチンの添加後、発現したキチナーゼタンパク質がキチンに吸着したことが、1つの可能性として考えられる。

*S. coelicolor*の*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, *chiF*の転写がコロイダルキチンの添加後、同時期に最大となったこと、ならびに、それらの転写がキトビオースによって誘導されたことから、これらの5つのキチナーゼ遺伝子の直接的な発現誘導物質は、*S. lividans*の*chiA*と同様に、キトビオースであることが推定される。この仮説に基づくと、何らかの機作によって、培養液中のコロイダルキチンが分解されてキトビオースが生じ、それによって*S. coelicolor*の5つのキチナーゼ遺伝子の発現が誘導されるという、キチナーゼ遺伝子の発現誘導の1つのモデルが考えられる。

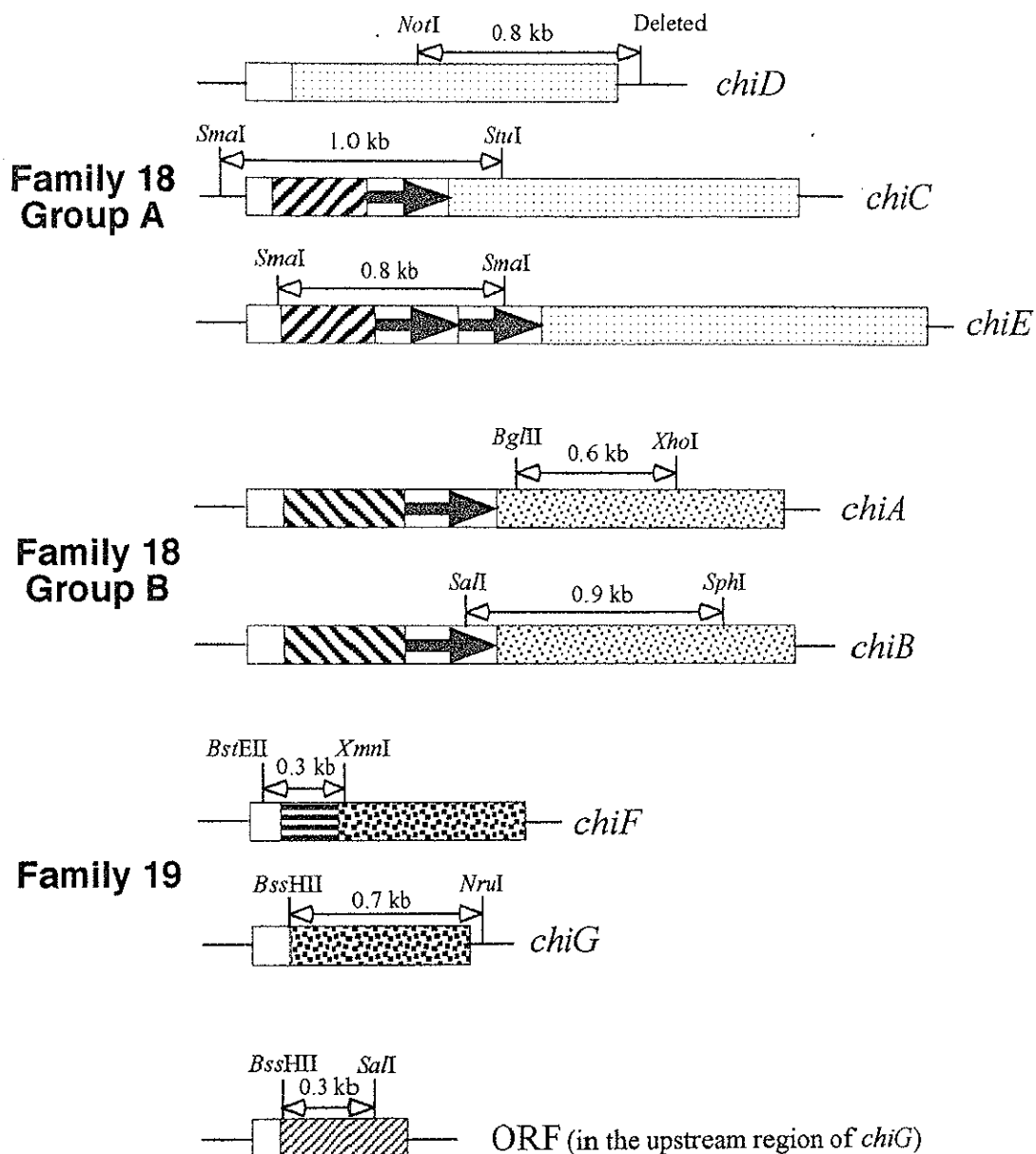


Fig. 4-1. Structure of the chitinase genes (*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, *chiE*, *chiF*, and *chiG*) and the ORF upstream of *chiG* of *Streptomyces coelicolor* A3(2). In each gene, arrows with open heads mark the portions used as templates for RNA labelling. The open boxes, the striped boxes, the boxes with arrows, and the dotted boxes indicate portions encoding signal sequences, substrate-binding domains, fibronectin type III-like domains, and catalytic domains, respectively.

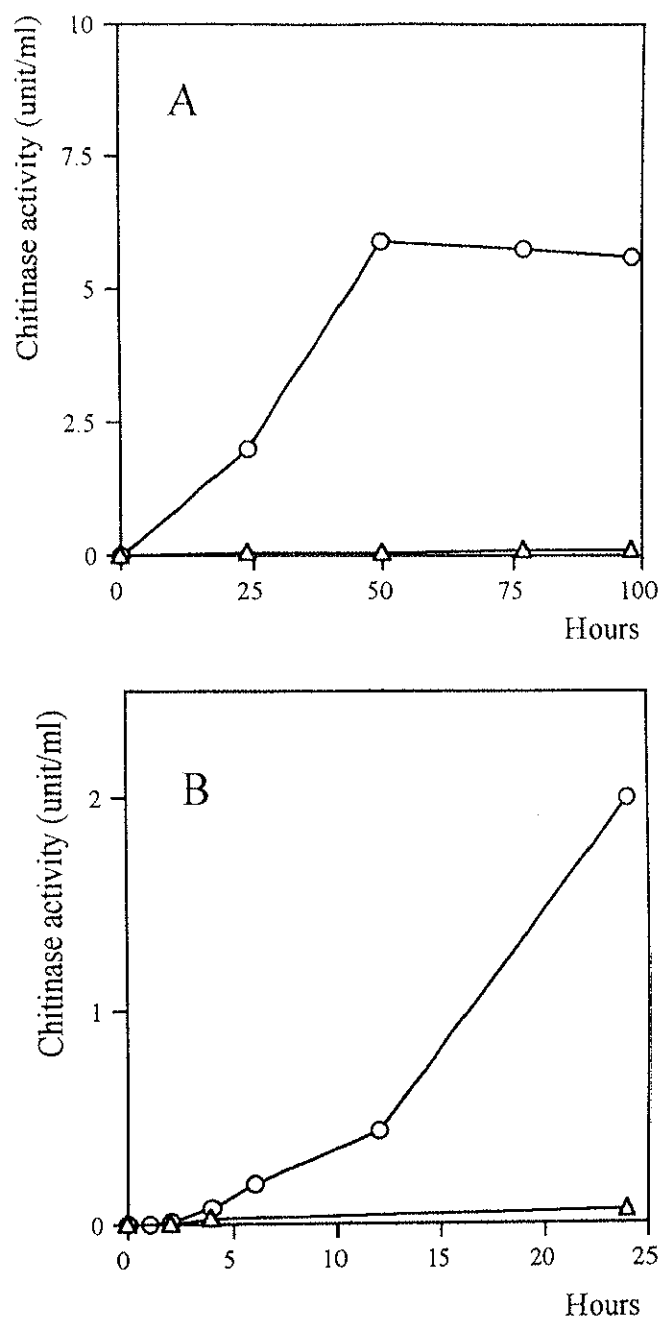


Fig. 4-2. Induction of chitinase activity in the presence or absence of colloidal chitin in *S. coelicolor* A3(2) strain M145. Time scales in panel A and B are different. Panel B shows the chitinase activity of the supernatant of the culture of which mycelia were used for RNA preparation. Chitinase activity was measured using 4MU-(GlcNAc)₂. At time zero, cultures grown in LB medium at 30°C for 24 hours were divided into two aliquots and the mycelia in each aliquot were suspended in YE medium (triangles) and YE medium + 0.05%(w/v) colloidal chitin (circles).

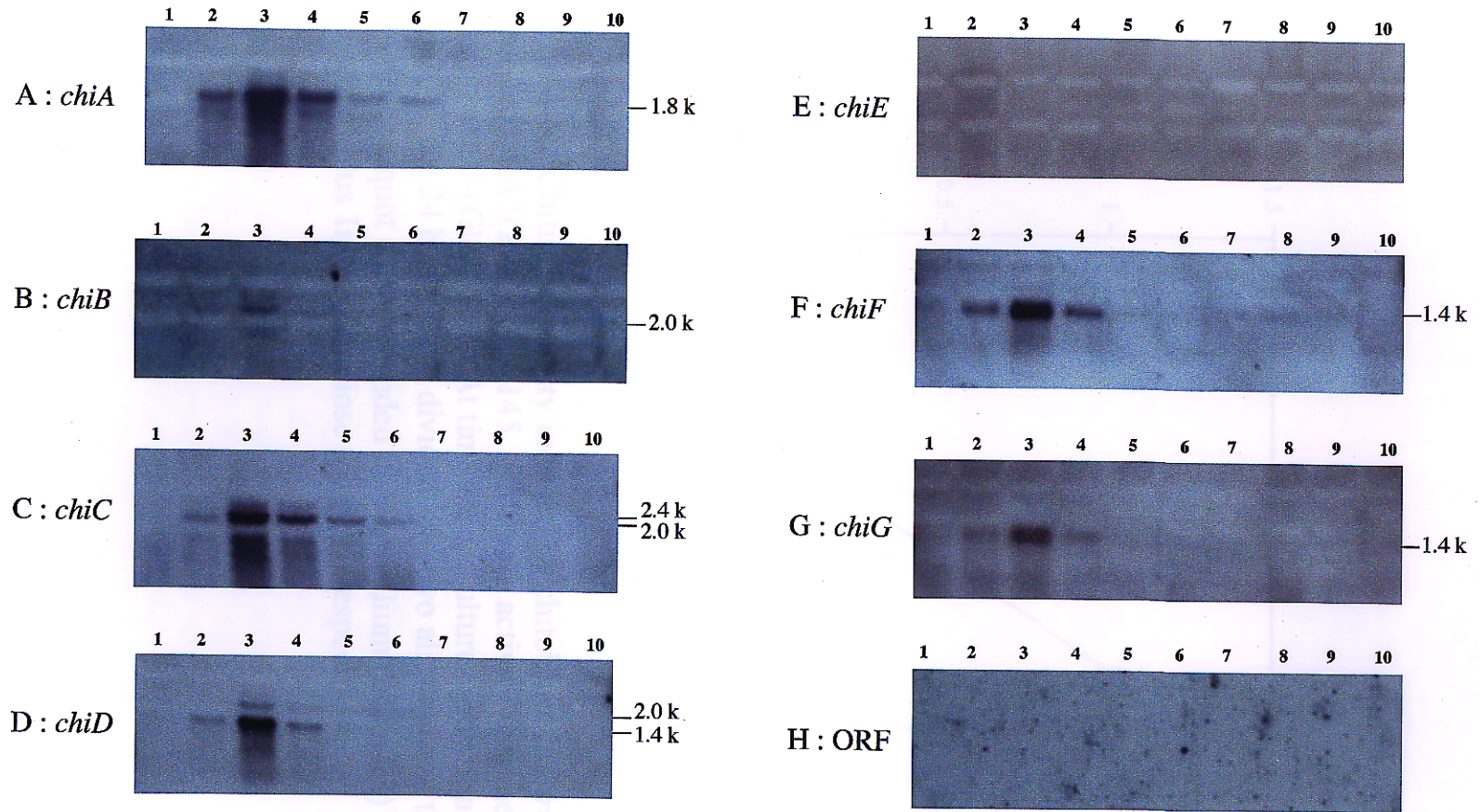


Fig. 4-3. Transcriptional products of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) strain M145. Transcriptional products were detected by Northern hybridization using the anti-sense RNAs of *chiA* (A), *chiB* (B), *chiC* (C), *chiD* (D), *chiE* (E), *chiF* (F), *chiG* (G), and the ORF upstream of *chiG* (H) as probes. The approximate sizes of transcriptional products are indicated. Cultures grown at 30°C for 24 hours in LB medium were divided into two aliquots, and the mycelia in each aliquot were suspended in YE medium or in YE medium supplemented with 0.05%(w/v) of colloidal chitin. Total RNAs were prepared from the mycelia grown in the YE medium supplemented with colloidal chitin for 1 (lane 1), 2 (lane 2), 4 (lane 3), 6 (lane 4), 12 (lane 5), and 24 (lane 6) hours, and from the mycelia cultured in the YE medium for 0 (lane 7), 2 (lane 8), 6 (lane 9), and 24 (lane 10) hours.

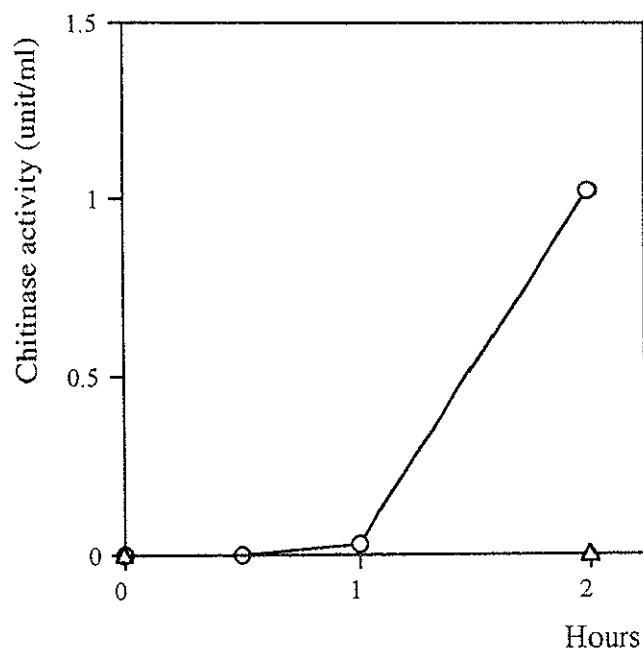


Fig. 4-4. Chitinase activity induced by chitobiose in *Streptomyces coelicolor* A3(2) strain M145. Chitinase activity was measured using 4MU-(GlcNAc)₂. At time zero, cultures grown in LB medium at 30°C for 24 hours were divided into two aliquots and the mycelia in each aliquot was suspended in YE medium (triangles) and YE medium plus 1mM chitobiose (circles), respectively.

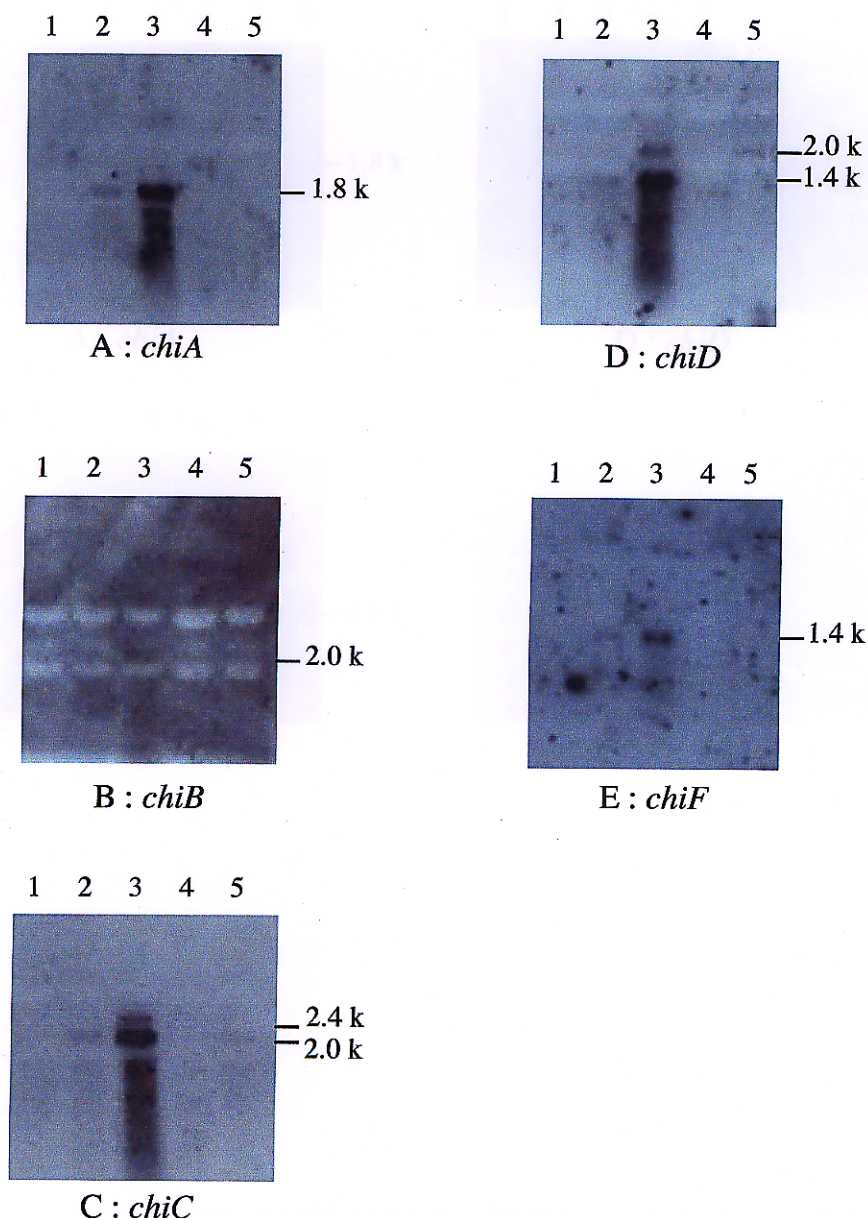


Fig. 4-5. Transcription of chitinase genes in the presence or absence of chitobiose in *S. coelicolor* A3(2) strain M145. Transcriptional products were detected by Northern hybridization by using anti-sense RNAs of *chiA* (A), *chiB* (B), *chiC* (C), *chiD* (D), and *chiF* (F) as probes. The approximate sizes of transcriptional products are indicated. At time zero, cultures grown in LB medium at 30°C for 24 hours were divided into two aliquots, and the mycelia in each aliquot were suspended in YE medium or in YE medium supplemented with 1 mM chitobiose. Total RNAs were prepared from the mycelia cultured in the YE medium supplemented with chitobiose for 30 min (lane 1), 1 hour (lane 2), and 2 hours (lane 3), and from the mycelia cultured in the YE medium for 0 (lane 4) and 2 hours (lane 5).

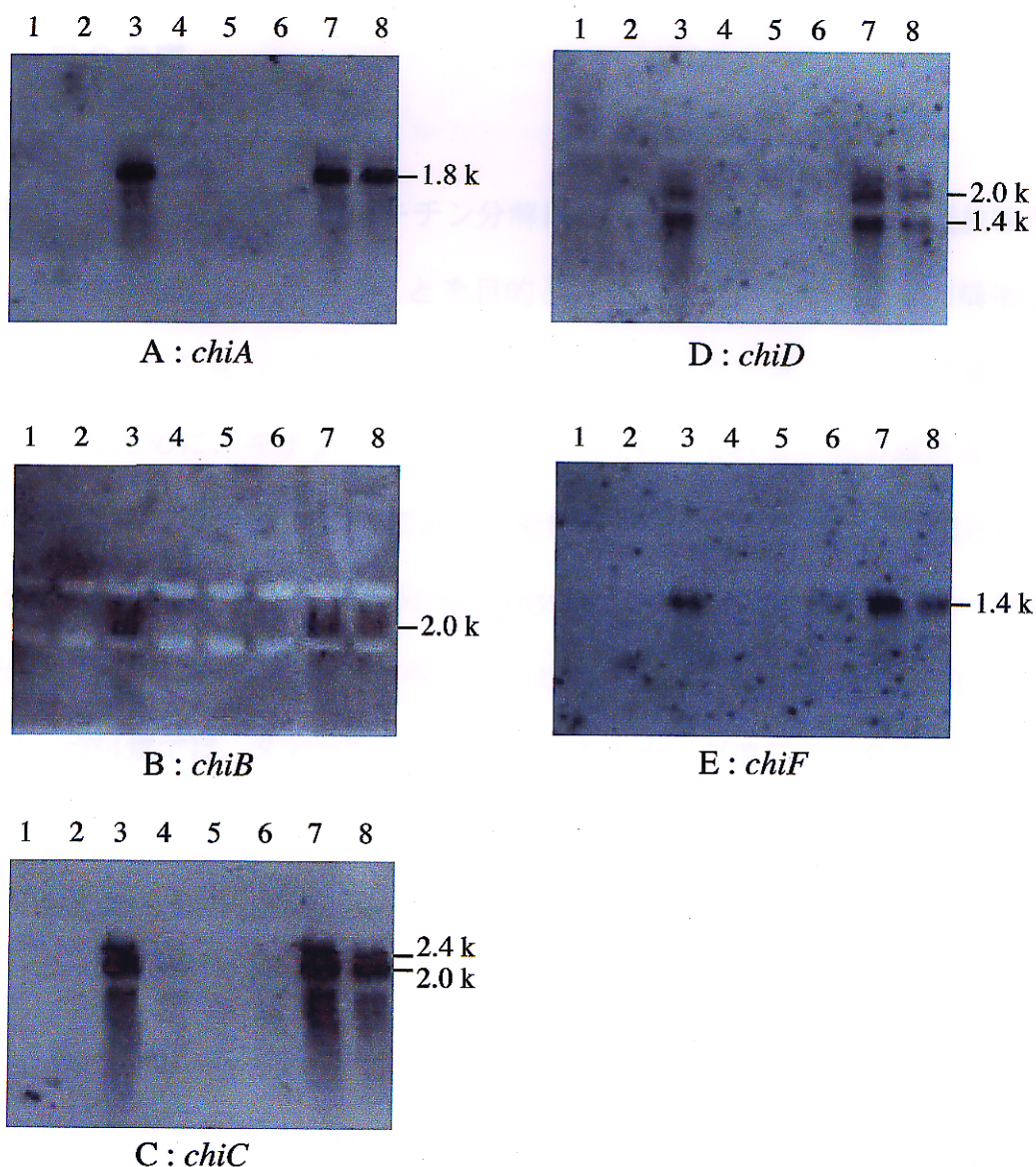


Fig. 4-6. Transcription of chitinase genes in the presence of colloidal chitin with or without glucose in *S. lividans* strain TK24 (lane 1-4) and its *glkA* mutant G015 (lane 5-8). Transcriptional products were detected by Northern hybridization by using anti-sense RNAs of *chiA* (A), *chiB* (B), *chiC* (C), *chiD* (D), and *chiF* (E) from *S. coelicolor* A3(2) as probes. The approximate sizes of transcriptional products are indicated. 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 were suspended in YE medium, in YE medium plus 0.05%(w/v) of colloidal chitin, or in YE medium plus 0.05%(w/v) of colloidal chitin plus 1.0%(w/v) of glucose. Total RNAs were prepared from the mycelia at time zero (lane 1 and 5), and from the mycelia cultured for 4 hours in the YE medium (lane 2 and 6), in the YE medium supplemented with colloidal chitin (lane 3 and 7), and in the YE medium supplemented with colloidal chitin and glucose (lane 4 and 8).