

## 要約

### 第1章 緒言

*N*-アセチルグルコサミンが $\beta$ -1,4結合した高分子アミノ糖であるキチンは、セルロースに次いで、自然界に最も大量に存在する高分子化合物であり、キチンの分解、無機化の過程は、生態系の炭素および窒素循環において重要である。自然界においてキチン分解の役割を担っているのは、キチン分解能を有する細菌および糸状菌であり、それらの細菌はキチンを加水分解する酵素キチナーゼを生産することで、キチンを炭素あるいは窒素源として資化する。本研究では、土壤中の主要なキチン分解細菌である*Streptomyces*属放線菌のキチン分解機構に関する知見を得ることを目的として、キチナーゼ遺伝子についてそれらの構造と発現制御について研究を行った。

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

(目的) *Streptomyces*属放線菌のキチナーゼ生産は、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、それらの生産制御は、キチナーゼ遺伝子の転写の段階で行われている。この発現制御には、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配列が重要な要素であることが示されている。しかし、その他の発現誘導のメカニズムについては、ほとんど不明である。本章では、形質転換および宿主ベクター系が確立されており、すでに3つのキチナーゼ遺伝子がクローニング、解析されている*S. lividans*を対象として、キチナーゼ生産変異株を取得し、それらの解析を行うことによって、キチナーゼ遺伝子の発現制御機構の解明を目的として研究を行った。

**(方法と結果)** *S. lividans* TK24株の胞子について紫外線の照射により変異を誘発し、キチナーゼ生産変異株を7株取得した。1株はキチン高生産変異株、残りの6株はグルコース抑制変異株であった。これらの変異株のキチナーゼ生産におけるグルコース抑制について液体培地を用いて調べた結果、*S. lividans* G015株は、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。また、*S. lividans* のキチナーゼ遺伝子の1つ*chiA*についてレポーター遺伝子を用いて転写レベルでグルコース抑制を調べた結果、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*遺伝子産物に関しては、転写レベルで起きていることが示された。以下に、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G015株についてさらに解析を行った。

糖の資化能と2-DOGに対する耐性を調べた結果、*S. lividans* G015株は、親株と異なり、セロビオースおよびグルコースが資化できず、2-DOG耐性であることが判明した。このことから、G015株は、*S. coelicolor* の2-DOG耐性かつグルコース資化能が欠損した変異株と同様、グルコースリン酸化酵素をコードする*glkA*遺伝子に変異があることが予測された。そこで、*S. coelicolor* 由来の*glkA*遺伝子を低コピー数のプラスミドベクター(pXE4)を用いて*S. lividans* G015株に導入したところ、グルコース資化能および2-DOG感受性が回復した。また、グルコースリン酸化活性も親株程度のレベルに回復した。この結果から、*S. lividans* G015株は、*glkA*変異株であることが示された。さらに、*S. lividans* G015株に同様に*glkA*遺伝子を導入した株について、液体培地でのキチナーゼ生産を調べたところ、親株と同様にグルコース存在下ではキチナーゼ生産が抑制された。すなわち、キチナーゼ生産におけるグルコース抑制が欠損した変異株*S. lividans* G015株に対し、*glkA*遺伝子導入によってキチナーゼ生産におけるグルコース抑制が相補された。これらの結果から*S. lividans*のキチナーゼ生産におけるグルコース抑

制には $glkA$ 遺伝子が関与することが示された。

さらに、 $glkA$ 遺伝子を高コピー数のプラスミドベクターを用いて親株である*S. lividans* TK24株に導入し、液体培地でのキチナーゼ生産を調べたところ、グルコースによるキチナーゼ生産の抑制が解除された。同様の現象は、*S. coelicolor* のアガラーゼ（寒天分解酵素）遺伝子の発現におけるグルコース抑制にも知られており、メカニズムの詳細は不明であるものの、この両者のグルコース抑制には、 $glkA$ 遺伝子が関与しており、*Streptomyces*放線菌のグルコース抑制における $glkA$ 遺伝子の重要性が示唆された。

一方、*S. plicatus*のキチナーゼ遺伝子 ( $chi63$ ) を用いた実験から、*S. coelicolor*では、 $chi63$ 遺伝子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が示唆されていた (IngramとWestpheling, 1995)。これは、*S. lividans* に関して本研究で得た知見と相反するものであった。そこで、*S. coelicolor*の $glkA$ 変異株について、液体培地で自身のキチナーゼ生産を調べたところ、グルコースによる抑制は親株と同様におこった。このことから、*S. coelicolor*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示唆された。この事実は、*S. coelicolor*と*S. lividans* が極めて近縁な関係にあることと、両細菌がほぼ同一のキチナーゼ遺伝子を持つこと (第3章参照) を考慮すると興味深いものである。

### 第3章 *Streptomyces coelicolor* のキチナーゼ遺伝子の構造

**(目的)** 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、クローニングされていいる。これらの遺伝子のコードするキチナーゼは、触媒ドメインの一次構造およびドメイン構造の面から、5つのタイプに分けられる (Fig. 1-3)。*S. lividans*は、これらのうち、3つのタイプのキチナーゼ遺伝子を

有するが（MiyashitaとFujii、1993；FujiiとMiyashita、1993；Miyashitaら、1997）、それら3つの他にも、キチナーゼ遺伝子が存在することが示唆されている（Miyashitaら、1997；大野ら、1997）。これらの遺伝子をクローニング、解析することは、キチン分解のメカニズムを解明する上で重要である。

近年、*S. lividans*と近縁関係にある*S. coelicolor*の染色体整列コスミドライブラリーが作成され、種々の遺伝子のクローニングが容易となった（Redenbachら、1996）。そこで、本章では、1つの株の*Streptomyces*属放線菌が有する全てのキチナーゼの構造を明らかにすることを目的として、*S. coelicolor*の染色体ライブラリーを用いて、既知の*Streptomyces*属放線菌由来のキチナーゼ遺伝子に相同意を示すDNA断片をクローニングし、解析を行った。また、*S. coelicolor*の有するキチナーゼ遺伝子の他の*Streptomyces*属放線菌における分布を調べた。

**（方法と結果）**これまでに*Streptomyces*属放線菌からクローニングされている7つのキチナーゼ遺伝子の全てを検出できるよう、*S. lividans*の $chiA$ 、 $chiB$ 、 $chiC$ （いずれもファミリー18キチナーゼ）、および*S. griseus*の $chiC$ （ファミリー19キチナーゼ）をプローブとし、*S. coelicolor*の染色体整列ライブラリーを構成する各コスミドDNAを固定したメンブランに対してハイブリダイゼーションを行った。その結果、それぞれのプローブに相同意を示す座位は、*S. lividans*の $chiA$ と $chiB$ ではそれぞれ1箇所、 $chiC$ では2箇所、また、*S. griseus*の $chiC$ では2箇所存在することが示唆された。

これらのコスミドクローンより各キチナーゼ遺伝子に相同意を示すDNA断片をクローニングし、塩基配列を決定し、解析を行った結果、*S. coelicolor*の染色体コスミドライブラリーには以下に示すキチナーゼ遺伝子が存在することが明らかとなった。

(1)  $chiA$ ：*S. lividans*の $chiA$ とハイブリダイズしたコスミドK15よりクローニ

ングされ、*S. lividans*の*chiA*と塩基配列で99.5%の相同性をもつ。大腸菌で発現し、キチナーゼ活性を示した。*chiA*の産物は、571個のアミノ酸より構成される58.0kDaのタンパク質と推定され、ファミリー18グループBに属する。

(2) *chiB* : *S. lividans*の*chiB*にハイブリダイズしたコスミド8B7よりクローニングした。*S. lividans*の*chiB*と塩基配列で99.7%の相同性を示した。大腸菌で発現し、キチナーゼ活性を示した。*chiB*の産物は、ファミリー18グループBに属する、610個のアミノ酸、64.0kDaのタンパク質と推定された。

(3) *chiC* : *S. lividans*の*chiC*と強くハイブリダイズしたクローン(6G5)よりクローニングした。*S. lividans*の*chiC*と塩基配列で99.7%一致した。大腸菌で発現し、キチナーゼ活性を示した。本遺伝子産物ChiCタンパク質は、ファミリー18グループAに属し、610個のアミノ酸より構成され、63.6kDaと予測された。

(4) *chiD* : *S. lividans*の*chiC*と弱くハイブリダイズしたコスミド(G9)よりクローニングした。*chiD*の産物は、417個のアミノ酸よりなる44.0kDaのタンパク質であり、*S. coelicolor*のChiCが4つのドメインから構成されるのに対し、シグナル配列と触媒ドメインのみから構成されていた。*S. lividans*のChiCの触媒部位と73.5%のアミノ酸配列の相同性を有する。*chiD*は、大腸菌で発現し、キチナーゼ活性を示した。ChiDは、ファミリー18のグループAに属する。

(5) *chiF* : *S. griseus*の*chiC*にハイブリダイズしたコスミド7A12よりクローニングした。*chiF*は、296個のアミノ酸、32.0kDaのタンパク質をコードしていると予測された。また、ChiFのカルボキシル末端のアミノ酸配列は*S. griseus*のChiCと80%一致し、ファミリー19に属することが判明した。ChiFは、*S. griseus*のChiCと同様、シグナル配列、基質結合ドメイン、および触媒ドメインから構成される。

(6) *chiG* : *S. griseus*の*chiC*にハイブリダイズしたコスミドF80よりクローニン

グした。*chiG*は、244個のアミノ酸よりなる26.0kDaのタンパク質をコードしていた。ChiGのカルボキシル末端のアミノ酸配列は、*S. griseus*のChiCと75%一致し、ファミリー19に属する。ChiGは、ChiFや*S. griseus*のChiCと異なり、シグナルドメインと触媒ドメインのみから構成されていた。

また、*S. coelicolor*のゲノム計画（Sangar Centre、イギリス）によってもう1つのファミリー18のグループAに分類されるキチナーゼ遺伝子の存在が示唆された。本遺伝子は、大腸菌での発現実験の結果、キチナーゼ遺伝子であることが確認されたので、*chiE*と命名した。ChiEは、765個のアミノ酸よりなる80.0kDaのタンパク質であると予想された。また、ChiEは、ChiC、ChiDと異なり、5つのドメイン（シグナル配列、基質結合ドメイン、直列につながった2つのフィブロネクチンタイプIII様配列、触媒ドメイン）から構成されていた。

以上の結果から、*S. coelicolor*には、5つのファミリー18キチナーゼ遺伝子と2つのファミリー19キチナーゼ遺伝子が存在することが示され、*S. coelicolor*が、キチナーゼの触媒ドメインの一次構造でも、ドメイン構造でも、多様なキチナーゼ遺伝子を有することが明らかとなった。また、1種の細菌がファミリー18と19の両キチナーゼ遺伝子を有することが、初めて示された。

さらに、*S. coelicolor*の有する多様な7つのキチナーゼ遺伝子について、他の*Streptomyces*属放線菌における分布をサザンハイブリダイゼーションによって調べた。その結果、これらのキチナーゼ遺伝子は、ファミリー18及びファミリー19を問わず、*Streptomyces*属放線菌を通じて広く分布することが示唆され、*Streptomyces*属放線菌においてキチナーゼ遺伝子の多様性が進化上重要であったことが示唆された。

#### 第4章 キチナーゼ遺伝子の発現誘導の解析

**(目的)** *S. coelicolor*は、7つの異なるキチナーゼ遺伝子を有する。本章では、*S. coelicolor*の有する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。

**(方法と結果)** *S. coelicolor* M145株を液体培養し、コロイダルキチンの添加してから、1、2、4、6、12、24時間培養した後に全RNAを調製し、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*については、コロイダルキチンの存在下で、転写産物が検出されたが、*chiE*、*chiG*については、転写産物は検出されなかった (Fig. 4-3)。このことから、*S. coelicolor*の有する7つのキチナーゼ遺伝子のうち、少なくとも5つのキチナーゼ遺伝子については、コロイダルキチンの添加によって、転写が誘導されることが示された。

発現が確認された5つのキチナーゼ遺伝子は、いずれもコロイダルキチンの添加後4時間で、転写産物の量が最大となり、培養上清液中の有意なキチナーゼ活性が検出される6時間後には、転写産物量は減少し始めていた。キチナーゼはキチンに対して高い結合能を有することから、一度生産されたキチナーゼが培養液中のコロイダルキチンに吸着したために、転写産物の検出と培養上清液中のキチナーゼ活性の検出の間には、差が生じたものと考えられた。また、コロイダルキチンの代わりにN-アセチルグルコサミンの二量体であるキトビオースを添加した場合、コロイダルキチンによって転写が誘導された5つのキチナーゼ遺伝子の全てにおいて、転写が誘導された。*S. lividans* のキチナーゼ遺伝子 *chiA* は、*S. coelicolor*の*chiA*と塩基配列が95%以上一致するが、その直接的な発現誘導物質は、キトビオースであることが示されている。*chiA*を含む5つの*S. coelicolor*のキ

チナーゼ遺伝子は、キトビオースによって誘導され、また、コロイダルキチンの存在下で同時期に転写の誘導が起こることから、これら5つのキチナーゼ遺伝子 (*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*) の直接的な転写誘導物質は、*S. lividans*の*chiA*と同様にキトビオースであると考えられた。

一方、第2章において、*S. lividans*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*) が関与することを示した。また、*S. lividans*は、*S. coelicolor*の有する7つのキチナーゼ遺伝子の全てを有することが、サザンハイブリダイゼーションによって示唆された（第3章）。そこで、コロイダルキチンの存在下で転写が確認された*S. coelicolor*の5つのキチナーゼ遺伝子の*S. lividans*におけるホモログ遺伝子の転写のグルコース抑制が、*S. lividans*において *glkA*に依存してい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。その結果、*chiA*、*chiB*、*chiC*、*chiD*、*chiF*のいずれのキチナーゼ遺伝子のアンチセンスRNAをプローブとした場合にも、親株TK24では、コロイダル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た。それに対し、TK24株の*glkA*変異株G015では、それら全てのキチナーゼ遺伝子のホモログ遺伝子は、グルコースの存在に関わらず、コロイダルキチンの存在下でキチナーゼ遺伝子の転写が誘導された。すなわち、*S. lividans*では、*glkA*遺伝子の変異によって、5つのキチナーゼ遺伝子のホモログのグルコース抑制が解除されることが明らかとなり、*S. lividans*のキチナーゼ遺伝子の転写のグルコース抑制には、*glkA*遺伝子が関与することが強く示唆された。

## 第5章 総合考察

本研究では、*S. coelicolor*が、7つの異なるキチナーゼ遺伝子を有し、他のキチン分解細菌に比べて、極めて高いキチナーゼ遺伝子の多重性を有することを示し

た。また、他の*Streptomyces*属放線菌も、*S. coelicolor*と同様に極めて高い多重性を有することを示唆した。さらに、*S. coelicolor*の有する7つのキチナーゼ遺伝子のうち5つの遺伝子について、コロイダルキチンの存在下で同時期に発現すること、ならびに、それら5つのキチナーゼ遺伝子の発現が、キトビオースによつて誘導されることを示した。一方、*S. lividans*のキチナーゼ遺伝子の発現のグルコース抑制には、グルコースキナーゼ遺伝子 (*glkA*) が関与することを示した。また、*S. coelicolor*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が関与しないことを示唆した。本研究で得られたこれらの知見と、既に得られている*Streptomyces*属放線菌のキチナーゼに関する知見から、考えられるキチナーゼ遺伝子の発現制御の1つのモデルをFig. 5-1に記した。

培養液中に炭素源としてキチンが存在する場合、構成的に発現する低いレベルのキチナーゼによって、少量のキチンが分解される。その結果、分解最終産物として生じるキトビオースによって、多様な複数のキチナーゼ遺伝子の発現が誘導される。生産された複数の多様なキチナーゼは菌体外に分泌された後、共同して効率的にキチンを分解し、キトビオースとN-アセチルグルコサミンが生じる。キトビオースやN-アセチルグルコサミンは、炭素及び窒素源として資化される。

一方、培養液中にキチンとともにグルコースが存在する場合には、*S. lividans*では、GlkAタンパク質が関与する系によって、キチナーゼ遺伝子の発現が抑制される。*S. coelicolor*では、GlkAタンパク質が関与しない系によって、キチナーゼ遺伝子の発現が抑制されると考えられる。