

ATPヌクレオチド3'-ピロホスホキナーゼ生産菌
*Streptomyces morookaensis*の形質転換ならびに非生
産性変異株との遺伝子、ゲノムの比較に関する研究

牟田, 滋

<https://doi.org/10.11501/3100010>

出版情報：九州大学, 1994, 博士（農学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：

ATPヌクレオチド3'-ピロホスホキナーゼ生産菌 *Streptomyces morookaensis* の
形質転換ならびに非生産性変異株との遺伝子、ゲノムの比較に関する研究

李 昌 滋

1998

①

ATPヌクレオチド3'-ピロホスホキナーゼ生産菌 *Streptomyces morookaensis*
の形質転換ならびに非生産性変異株との遺伝子、ゲノムの比較に関する研究

牟田 滋

1995年

(1)

略語表

本論文では以下の略語を使用した。

AcCoA	acetyl coenzyme A
ApnA	diadenosine 5', 5'-polyphosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
bp	base pairs
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CoA	coenzyme A
cpm	counts per minute
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GTP	guanosine 5'-triphosphate
kbp	kilobase pairs
Mbp	megabase pairs
mRNA	messenger RNA
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
PEG	polyethylene glycol
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
ppApp	adenosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate

ppC _{pp}	cytosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate
ppG _{pp}	guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate
PPKase	nucleotide 3'-pyrophosphokinase
pppG _{pp}	guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate
ppppA	adenosine 5'-tetraphosphate
RNA	ribonucleic acid
RNase A	ribonuclease A
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	standard saline citrate
TAE	Tris-acetate/EDTA
TBE	Tris-borate/EDTA
TE	Tris-EDTA
TES	N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	ultraviolet

目次

緒章	1
第一章 実験材料	10
第一節 試薬	10
第二節 培地	16
第三節 使用菌株、ベクター及び組換えプラスミド	23
第二章 <i>Streptomyces morookaensis</i> 野生型株のプロトプラスト 再生法の確立	25
緒言	25
第一節 <i>S. morookaensis</i> 野生型株及び <i>S. lividans</i> TK24のプロト プラスト調製法	25
第二節 <i>S. morookaensis</i> 野生型株のプロトプラスト再生培地の 検討	27
第三節 <i>S. morookaensis</i> 野生型株のプロトプラスト再生実験の 結果	28
第三章 <i>Streptomyces morookaensis</i> 野生型株の形質転換法の検討	33
緒言	33
第一節 <i>S. morookaensis</i> 野生型株のプロトプラストのpANT3-1に よる形質転換実験	33
第二節 <i>S. morookaensis</i> カナマイシン耐性体中のpANT3-1の確認	34
第三節 <i>S. morookaensis</i> 野生型株のプロトプラストのpANT3-1によ る形質転換実験の結果	35

第四章	<i>Streptomyces morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株の 全DNAのハイブリダイゼーション分析	38
緒言		38
第一節	<i>S. morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株の全DNAの調製	38
第二節	<i>S. morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株の全DNAのサザ ンプロットティング	39
第三節	PPKase構造遺伝子を含むプローブDNA断片の調製	40
第四節	<i>S. morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株の全DNAのハイ ブリダイゼーション分析	42
第五節	<i>S. morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株の全DNAのハイ ブリダイゼーション分析の結果	43
第五章	<i>Streptomyces morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株の全 DNAのパルスフィールドゲル電気泳動による分析	45
緒言		45
第一節	<i>S. morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株の全DNAのパル スフィールドゲル電気泳動用サンプルの調製	46
第二節	パルスフィールドゲル電気泳動の操作法	48
第三節	パルスフィールドゲル電気泳動による <i>S. morookaensis</i> 中の 巨大線状プラスミドの検索	51
第四節	<i>S. morookaensis</i> の染色体中に認識部位の少ない制限酵素の 選択	51
第五節	パルスフィールドゲル電気泳動用サンプルの前処理	52
第六節	巨大DNA分子のサザンプロットティングとハイブリダイゼー ション分析	53

第七節	<i>S. morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株の全DNAのパルスフィールドゲル電気泳動による分析結果	53
第六章	<i>Streptomyces morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株206Bのゲノムサイズの決定	63
緒言		63
第一節	蛍光測定による重複して泳動されている制限断片の確認	63
第二節	二次元パルスフィールドゲル電気泳動による重複して泳動されている制限断片の確認	64
第三節	<i>S. morookaensis</i> 野生型株及び非生産性変異株206Bのゲノムサイズ	66
第七章	総合考察	73
謝辞		77
参考文献		78

緒章

現在知られている3'-ピロリン酸型ヌクレオチド合成酵素には次の3種がある。まず *Escherichia coli* や他の細菌類のリボゾームに存在するストリンジェントファクター (1)は、アミノ酸等の栄養飢餓時にATPの β , γ ピロリン酸をG(D)TPの3'水酸基に転移して(p)ppGppを合成する。また *Bacillus brevis* と *B. stearothermophilus* の菌体内可溶性画分にはストリンジェントファクターとは別種の(p)ppGpp合成酵素 (2, 3)が存在している。そして筆者等が研究している *Streptomyces morookaensis* 他数種の放線菌が生産するATPヌクレオチド3'-ピロホスホキナーゼ (EC 2. 7. 6. 4 以下PPKaseと略す) である。PPKaseはATPやdATPの β , γ ピロリン酸を、さらにppppAの γ , δ ピロリン酸をもプリン、ピリミジン、リボ及びデオキシリボヌクレオチドとその誘導体の3'水酸基に転移する(4, 5)。またApnA (n=3~5) (6)をも基質とする(Fig.0-1)。同様の機構でATPからG(D)TPにのみ塩基特異的にピロリン酸を転移する他の2種に比べ、この酵素はかくも広い受容体活性を示す。その生産物のうち3者に共通の(p)ppGpp (1)は細菌一般の多面的な緊縮制御の信号物質として知られており、またppApp (7)は枯草菌の孢子形成に関与していると言われていた。また、当研究室で各種3'-ピロリン酸型ヌクレオチド類の生理活性を調べたところ、ppCpp (8)は蚕さなぎのコリオンmRNAの翻訳を *in vitro* において3倍に促進することが示された。さらに3'-ピロホスホNAD (9)は酵母のアルコールデヒドロゲナーゼに対する補酵素活性を完全に失い、3'-ピロホスホCoA (10)は細菌のホスホトランスアセチラーゼに対して通常のCoAに比べ2倍の補酵素活性を示し、また3'-ピロホスホAcCoA (10)は *E. coli* のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼに対して6倍のallosteric effector活性を示すことが判っている(Table 0-1)。

このPPKase生産菌 *S. morookaensis* が属する放線菌は過去にかびの一種とみなされたほど形態分化の進んだ生物である。また、*Streptomyces* 属が作る抗生物質などの様々な二次代謝産物の種類は微生物中で最も変化に富んでいる。この複雑な分化や代謝を行う *Streptomyces* 属にはいまだ知られていない新規物質を介した制御系の存在が予想されるが、PPKaseによって合成される3'-ピロリン酸型ヌクレオチド類もその候補になり得る。しか

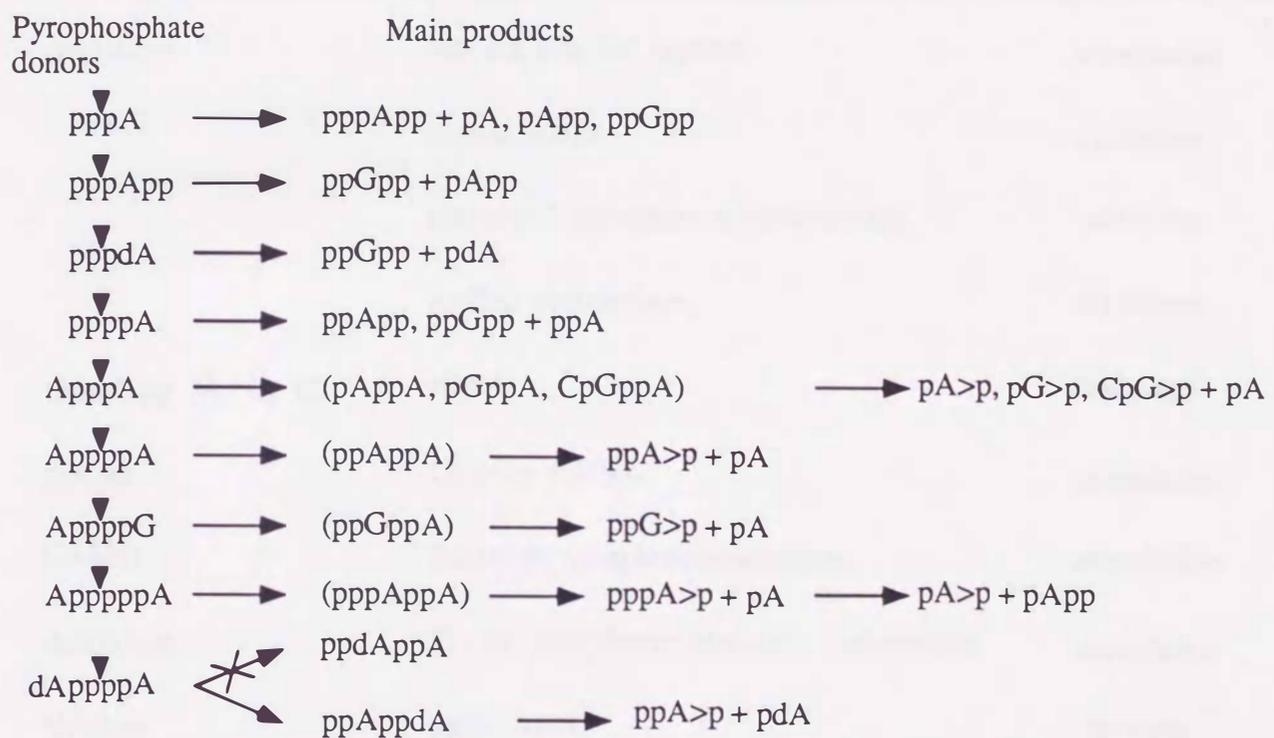


Fig. 0-1. Mode of action and substrate subsites shown by mark ▼ of *Streptomyces* nucleotide 3'-pyrophosphokinase.

Table 0-1. Effects of 3'-pyrophospho nucleotides on a variety of gene expression processes and enzyme activities.

(p)ppGpp	<i>trp, his, ara, lac</i> operon	stimulation
	tDNA, rDNA	inhibition
	glycerol-3-phosphate acyltransferase	inhibition
	AcCoA carboxylase	inhibition
(p)ppNpp (A, U, C)	rDNA	inertness
ppCpp	Chorion mRNA	stimulation
CoApp	Bacterial phosphotransacetylase	stimulation
AcCoApp	<i>E. coli</i> phosphoenolpyruvate carboxylase	stimulation
NADpp	yeast ADH	inertness

も本酵素は緊縮制御非依存性 (11) のため、菌の生育が旺盛な時期での制御に関わっている可能性がある。あるいは本酵素が菌体外に分泌されることから、細胞間での情報伝達の役割を受け持っているかもしれない。この緊縮制御非依存性は本酵素の応用面においても重要と思われる。(p)ppGppが細菌の生理に及ぼす影響を *in vivo* で検討する場合、ストリンジェントファクターを利用する限り細菌をアミノ酸飢餓等の生育に不都合な状態に置かねばならない。しかし本酵素を用いて(p)ppGppを合成させれば、生育の旺盛な時期でも人為的に緊縮制御状態を作りうる可能性がある。このことは実用面への応用についても言いうることであろう。

しかし、本酵素の生産菌そのものでの生理的な役割はまったく不明である。そこで本酵素の生理的意義の解明と応用のために本酵素の精製や生理的基質の探索、遺伝子のクローニング等が行われてきた。1981年にNishino等 (12) は *S. morookaensis* をアクリフラビンで処理することで本酵素非生産性変異株を得た。当時アクリフラビンはプラスミドの除去剤と考えられていたため、彼等と我々は本酵素遺伝子がプラスミド上に存在するものと予想していた。さらにこの変異株がPPKase活性を失うと同時に孢子形成や気菌糸形成の不全を示したため、我々は特にPPKaseによって合成されているであろう未知の3'-ピロリン酸型化合物を通して、PPKaseが孢子形成や気菌糸形成に何らかの密接な関係を持つと予想していた。そこで当研究室の岸原は *S. morookaensis* をアクリフラビンで処理し、孢子と気菌糸の形成不全を第一指標として選別を行い、形質の安定な酵素非生産性変異株を二株取得してそれぞれ203C株、206B株と名付けた。このうち206B株は複合培地中で野生型株と同程度の生育を示した(Fig. 0-2 and 3)。また本酵素遺伝子を取得するために、西山等は超遠心法等いくつかの方法によって *S. morookaensis* 中のプラスミドの検索を行ったが確認できなかった。

この実験と並行して当研究室の生田等はPPKaseの精製を、小路は抗PPKase抗体の作製とPPKaseのイムノディテクション法の開発を行った。更に住近 (14) は *Streptomyces lividans* TK24とプラスミドベクター-pIJ699、そしてこのイムノディテクション法を用いて本酵素構造遺伝子を含むDNA断片のクローン化を行った(Fig. 0-4)。現在までに我々は本酵素遺伝

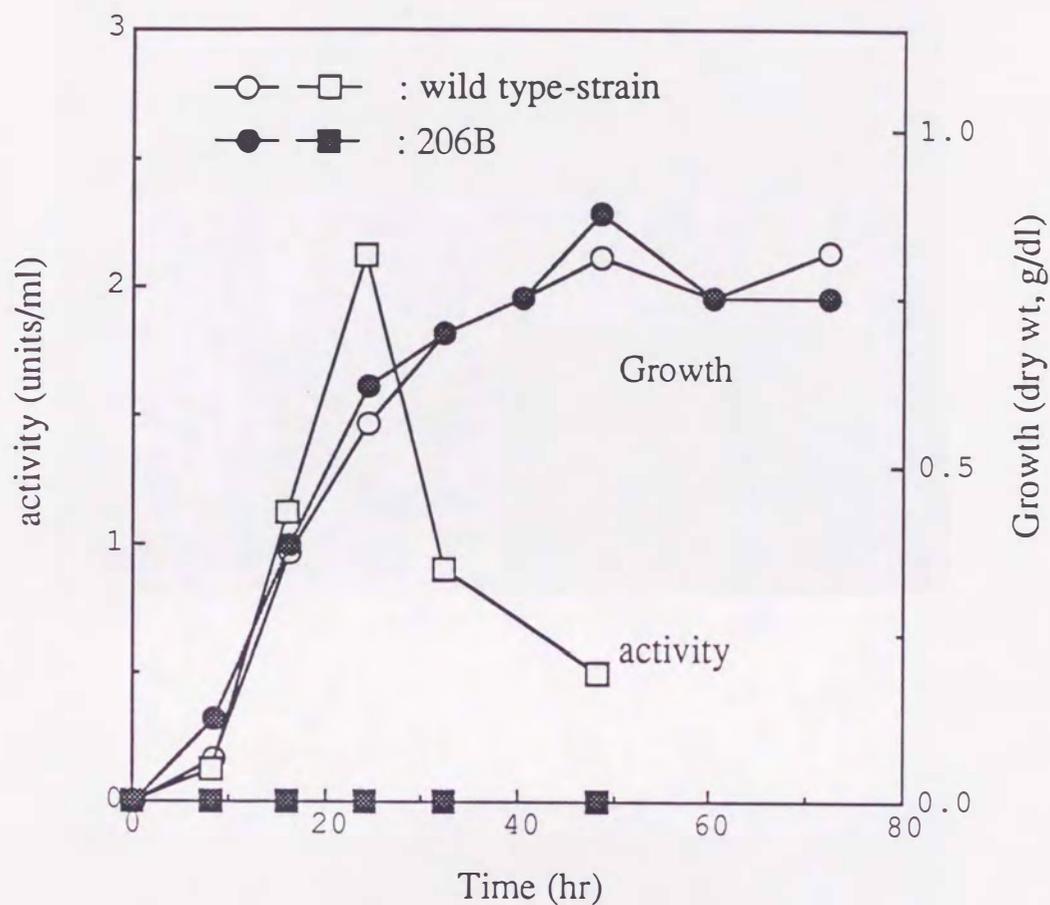


Fig. 0-2. Cellular growth and PPKase activity of *S. morookaensis* wild type-strain and its PPKase-minus acriflavine mutant 206B.

Cellular growth was monitored by dry weight determination, and extracellular PPKase activity was measured as follows. The reaction mixture contained 125mM glycine-NaOH buffer, pH 10, 6.25mM ATP, 6.25mM MgCl₂ and culture filtrate in a final volume of 255 μ l. After incubation at 37°C for 20min, the reaction was terminated by addition of 250 μ l of 5% perchloric acid, and the mixture was chilled on ice. Inorganic phosphate liberated from the acid-labile 3'- β position was determined with amidol reagent. Estimation of the enzyme production was based on the enzyme units (13) per volume of the culture filtrate.

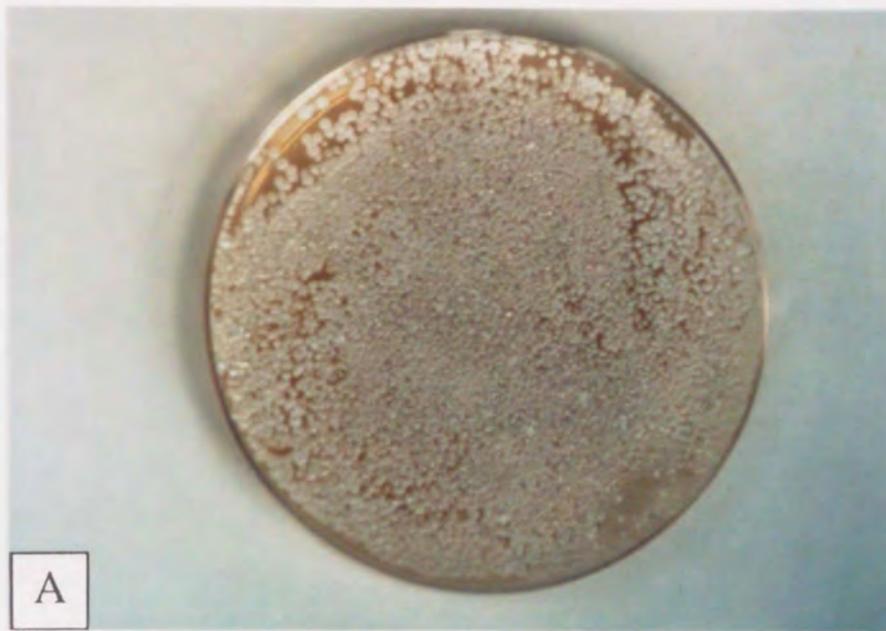


Fig. 0-3. *Streptomyces morookaensis* wild type-strain (A) and its PPKase-minus acriflavine mutant 206B (B).

Both strains were grown on ISP No. 2 medium at 28°C for 2weeks.

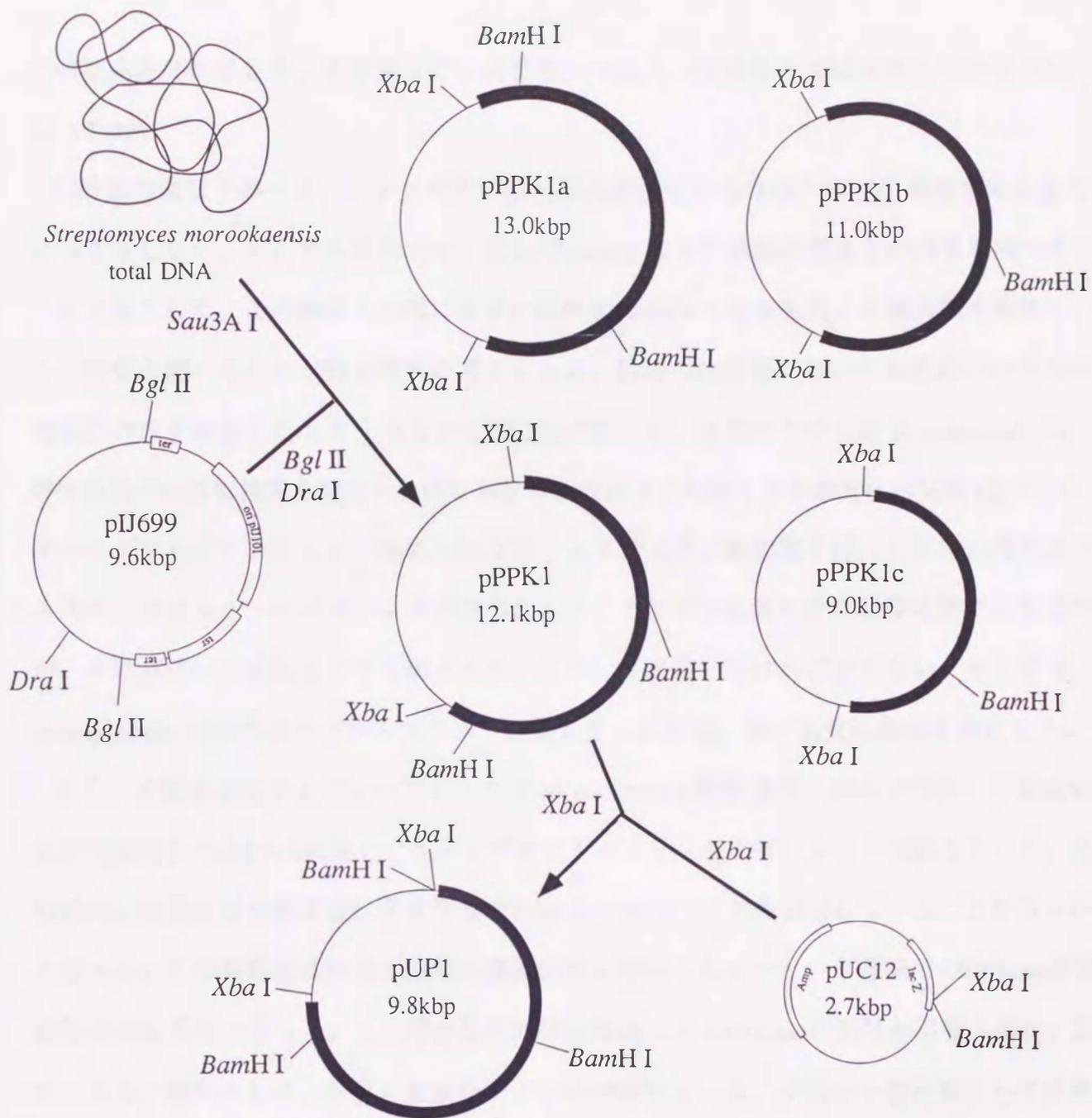


Fig. 0-4. Subcloning of *Streptomyces morookaensis* PPKase gene-containing restriction fragments in *Streptomyces lividans* TK24/pIJ699 and *Escherichia coli* JM83/pUC12.

S. morookaensis PPKase gene-containing restriction fragments were subcloned in *S. lividans* TK24/pIJ699 and *E. coli* JM83/pUC12 as described in ref. (14).

子の塩基配列の決定や、大腸菌などの異種菌への導入・発現等の実験を行っている (15, 16, 17, 18)。

本酵素の遺伝子のクローニングやその塩基配列の決定はなされたが、生理的意義は未だはっきりしない。そこで本研究では、当初PPKaseと孢子や気菌糸形成との関係を調べることを目的とした。この関係を明確にするにはPPKase遺伝子のみを失った変異株を取得し、その性質を調べるのが最も確実と考えられる。数種の放線菌において染色体中の目的の遺伝子のみを破壊したと言う報告 (19, 20, 21)があるが、実現のためには *S. morookaensis* 野生型株の形質転換法を確立せねばならない。放線菌を対象とする形質転換実験 (22)には、菌体をプロトプラストにし、外来DNAを取り込ませて再び細胞壁を持った菌体に再生させるステップがある。このステップを効率良く行うことが放線菌の形質転換実験では重要だが、その方法は実験対象とする菌それぞれについて決定しなければならない。そこで *S. morookaensis* 野生型株のプロトプラスト調製および再生法、更に形質転換法を確立した。

また、本酵素遺伝子をプローブとして *S. morookaensis* 野生型株と岸原が取得した酵素非生産性変異株の全DNAに対してサザンブロットハイブリダイゼーション実験を行った。その結果、変異株は本酵素遺伝子を含んだ7kbp以上のDNAを欠失 (23)していることが明らかとなった。この変異株は培養上清中に酵素活性が認められないという意味でのPPKase非生産性突然変異株であった。この場合菌体外分泌酵素であるPPKaseの活性が培養上清中に認められない理由として、分泌に必要なシグナルが壊れている、不活性な蛋白質として生産されている、PPKase生産は何らかの制御系の支配下にありその制御系が壊れている等が考えられていた。しかし、本研究結果から確かにPPKaseを生産していないことが明らかとなった。また、欠失しているDNAの大きさがPPKase遺伝子以外の遺伝子を十分含むことができることから、PPKaseと孢子形成や気菌糸形成との間の密接な、例えばカスケード的な関係は疑問視されるにいたった。更に欠失変異という事実は、1987年に発見された放線菌の巨大線状プラスミド (24)の関与を考えさせるものである。そこでこの変異株の性質をDNA、特にゲノムレベルで調べることにした。まず、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) (25)による巨大線状プラスミドの検索を行ったが確認されなかった。次に放線菌の染色体中にそ

の認識部位が少ない制限酵素で野生型株と206B株の全ゲノムを切断してPFGE後サザンブロットハイブリダイゼーション実験を行ったところ、野生型株では数百kbp以上の大きさの断片にハイブリダイズを認めたのに対して変異株ではその断片が認められなかった。従って後者ではプラスミドではなく本来のゲノムからPPKase遺伝子を含む非常に大きなDNAの欠失をおこしているものと予想された。変異誘導によるゲノムの大きな欠失が放線菌 *Streptomyces ambofaciens* 等 (26, 27)で報告されているため、変異株の欠失の大きさについて更に検討を加えた。本論文はこれらの結果を総合して述べたものである。

第一章 実験材料

第一節 試薬

本研究で使用した試薬と材料の主なものを示す。

制限酵素はTOYOBO、New England Biolabs、倉敷紡績等から購入した。RNase Aとリゾチームはシグマ社、Proteinase Kはメルク社、アクチナーゼEは科研化学株式会社、そしてアクロモペプチダーゼは和光純薬より購入した。lambda DNAはTOYOBO、yeast chromosome PFG marker と lambda ladder PFG marker はNew England Biolabsより購入した。

250mM TES (pH 7.2)

NaOHでpHを調整後、オートクレーブして4℃で保存する。

trace element solution

以下のものを脱イオン水1 literに溶解したもの。4℃で保存する。

ZnCl ₂	40mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	200mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	10mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	10mg
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	10mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	10mg

アンピシリン溶液

アンピシリンナトリウム（ナカライテスク）を50mg/mlの濃度に純水に溶解し、0.45μmのフィルターで除菌したもの。-20℃で保存する。

カナマイシン溶液

カナマイシン硫酸塩（和光純薬）を50mg/mlの濃度に純水に溶解し、0.45 μ mのフィルターで除菌したもの。-20 $^{\circ}$ Cで保存する。

RNase A溶液

RNase Aを10mg/mlの濃度に10mM Tris-HCl, 15mM NaCl (pH 7.5)に溶解後、15分間沸騰処理してDNaseを失活させた。-20 $^{\circ}$ Cで保存する。

Proteinase K溶液

Proteinase Kを20mg/mlの濃度に純水に溶解したもの。-20 $^{\circ}$ Cで保存する。

TE buffer

10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)。オートクレーブし、室温で保存する。

TE飽和フェノール

融解したフェノールに等容の0.5M Tris-HCl (pH8.0)を加えて混和し、静置して生じた水層を除く。等容の0.1M Tris-HCl (pH8.0)を加え、水層のpHが7.8以上になるまでこの溶液で平衡化する。終濃度0.1%の8-hydroxyquinolineを加え、遮光して4 $^{\circ}$ Cで保存する。

STE2 buffer

0.4M sucrose, 25mM Tris-HCl, 25mM EDTA (pH 8.0)。

alkaline SDS

0.3M NaOH, 2% SDS。使用直前に調製する。

acid phenol/chloroform

5g phenol, 5ml chloroform, 5mg 8-hydroxyquinoline, 1ml H₂Oの混合液。遮光して4℃で保存する。

5×TBE buffer

445mM Tris-borate, 10mM EDTA (pH7.6)。オートクレーブし、室温で保存する。

50×TAE buffer

2M Tris-acetate, 50mM EDTA (pH 8.0)。

BPB loading buffer

0.25% BPB, 50% sucrose, 0.25% EDTA

lambda DNAのHind III分解物

終濃度0.1μg/μlのlambda DNAを制限酵素Hind IIIで完全分解したもの。65℃で15分間処理して酵素を失活させた後、4℃で保存する。

エチジウムブロマイド染色液

エチジウムブロマイドを10mg/mlの濃度に脱イオン水に溶解したもの。暗所に保存する。強力な発癌物質のため、廃棄の際は過剰量のさらし粉を加えて分解する。

20×SSC

3M NaCl, 0.3M trisodium citrate。オートクレーブし、室温で保存する。

脱イオン化formamide

100mlのformamideに5gのmixed bed resin (BioRad)を加えて30分間攪拌した。resinが黄色に変色したらformamideを濾過して新しいresinを加え、resinが変色しなくなるまでこの操作を繰り返した。50mlずつ分注して-20℃で保存する。

50×Denhardt's solution

1% BSA, 1% ficoll, 1% polyvinyl pyrrolidone。0.45μmのフィルターで除菌し、-20℃で保存する。

sheared salmon sperm DNA

サケ精子DNAを10mg/mlの濃度に純水に溶解した後、18ゲージのシリンジ針を4回通して剪断したもの。-20℃で保存する。

プレハイブリダイゼーション溶液

50% 脱イオン化formamide, 6×SSC, 5×Denhardt's solution, 10mM EDTA, 0.5% SDS, 100μg/ml sheared salmon sperm DNA。sheared salmon sperm DNAは加える前に沸騰処理し、一本鎖に変性させて加える。

ハイブリダイゼーション溶液

プレハイブリダイゼーション溶液に10%のdextran sulfateを加えたもの。

reagent mix [³²P QuickPrime™ Kit (Pharmacia)]

100mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 50mM DTT, 250mM NaCl, 0.1mM dATP, 0.1mM dGTP, 0.1mM dTTP, 1.4mg/ml random deoxynonucleotides (pH 7.5)

液体シンチレーションカクテル

OMUNIFLUOR (NEN) 0.4%のトルエン溶液。

10×TSE buffer

0.3M Tris-HCl, 0.5M NaCl, 50mM EDTA (pH 8.0)。オートクレーブし、室温で保存する。

0.5M sucrose-TSE

0.5M sucrose, 30mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 5mM EDTA (pH 8.0)。オートクレーブし、室温で保存する。

sucrose-TSE-EDTA溶液

0.5M sucrose-TSEと0.5M EDTA (pH 8.0)を5:1に混合したもの。

低融点アガロース溶液

0.5M sucrose-TSEで調製した1.5% 低融点アガロース (TP TAKARA 宝酒造) 溶液。オートクレーブして核酸分解酵素を失活させる。

プロナーゼ処理液

5% SDS, 2.5mg/mlアクチナーゼE, 30mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 5mM EDTA (pH 8.0)。ヌクレアーゼを失活させるために、37°Cで2時間自己消化を行う。

10×制限酵素buffer (-DTT)

10×H buffer (-DTT)

0.5M Tris-HCl, 1M NaCl, 0.1M MgCl₂ (pH 7.5)。

10×M buffer (-DTT)

0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, 0.1M MgCl₂ (pH 7.5)。

10×制限酵素buffer

TOYOBO H buffer

0.5M Tris-HCl, 1M NaCl, 0.1M MgCl₂, 10mM DTT (pH7.5)

TOYOBO M buffer

0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, 0.1M MgCl₂, 10mM DTT (pH7.5)

TOYOBO L buffer

0.1M Tris-HCl, 0.1M MgCl₂, 10mM DTT (pH7.5)

Ssp I専用buffer

0.2M Tris-HCl, 70mM MgCl₂, 1M NaCl, 1mM DTT (pH 7.4)

New England Biolabs, Inc. NEB buffer 2

0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, 0.1M MgCl₂, 10mM DTT (pH 7.9)

孢子懸濁液

斜面培地、平板培地上で十分に孢子を着生した菌に滅菌水を加えて白金耳で孢子を分散させる。綿フィルターで寒天培地片や菌糸を取り除いた後、遠心（4700g, 10min, 4℃）して可溶性の培地成分を除く。終濃度50%のグリセロール溶液として-30℃で保存する。

グリセロールストック

培養物に等容のグリセロールを加え、-30℃あるいは-85℃に保存する。-85℃で保存したものは、融解せずに白金線の一部をかき取って使用する。

第二節 培地

当研究室で *Streptomyces* 属菌と大腸菌の一般的な培養や、継代による保存に使用している培地を示す。また、本研究で使用した、*Streptomyces* 属菌のプロトプラスト調製と再生培地も示す。

ここにあげた培地は全て121℃15分間のオートクレーブを行う。

放線菌用培地

ISP No. 2 (28)

per liter

malt extract 10.0g

yeast extract 4.0g

glucose 4.0g

NaOHでpH 7.3に調整

固形培地として使用する場合には15.0gの寒天末を加える。

rye flakes agar (29)

per liter

rye flakes	10.0g
glucose	2.0g
yeast extract	1.0g
CaCO ₃	2.0g
寒天末	15.0g

GP medium (30)

per liter

glycerol	20.0 g
polypeptone	40.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g
MnSO ₄ · nH ₂ O	0.01g

NaOHでpH7.3 に調整

固形培地として使用する場合には15.0gの寒天末を加える。

GPGS medium

per liter

glycerol 20.0 g

polypeptone 40.0 g

glycine 5.0 g

KH_2PO_4 1.0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g

$\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g

sucrose 137.0 g

NaOHでpH7.2に調整

TSB medium (22)

per liter

tryptic soy broth (Difco) 30.0g

固形培地として使用する場合には15.0gの寒天末を加える。

TSMG medium (22)

per liter

tryptic soy broth 30.0g

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0g

glycine 5.0g

NaOHでpH7.3に調整。

YEME medium (22)

per liter

yeast extract 3.0 g

polypeptone 5.0 g

malt extract 3.0 g

glucose 10.0 g

sucrose 340.0 g

MgCl₂ · 6H₂O 1.15 g

NaOHでpH7.3に調整。

固形培地として使用する場合には15.0gの寒天末を加える。

大腸菌用培地

LB medium (31)

per liter

yeast extract 5.0g

tryptone 10.0g

NaCl 10.0g

NaOHでpH7.5に調整。

固形培地として使用する場合には15.0gの寒天末を加える。

Streptomyces 属菌のプロトプラストの調製と再生培地

Streptomyces morookaensis 用

medium MP3

per liter

sucrose 137.0 g

glucose 5.0 g

NaCl 0.41g

MgCl₂ · 6H₂O 1.02g

CaCl₂ · 2H₂O 0.74g

使用直前に90mlにつき10mlの割合で250mM TES (pH7.2)を加える。

medium MPWP

per liter

sucrose 137.0 g

glucose 5.0 g

MgCl₂ · 6H₂O 2.03g

CaCl₂ · 2H₂O 2.94g

使用直前に90mlにつき10mlの割合で250mM TES (pH7.2)を加える。

Streptomyces coelicolor A3(2) と *Streptomyces lividans* 用

lysozyme solution (22)

per liter

sucrose	100.0 g
TES	5.72 g
K ₂ SO ₄	0.434g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.506g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.366g
trace element solution	2.0 ml

NaOHでpH7.2に調整。

使用直前に100mlにつき0.5mlの割合で1% KH₂PO₄を加える。

medium P (22)

per liter

TES	5.73g
sucrose	103.0 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2.03g
K ₂ SO ₄	0.5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	3.68g
trace element solution	2.0 ml

NaOHでpH7.4に調整。

使用直前に100mlにつき1mlの割合で1% KH₂PO₄を加える。

R2 agar (22)

R2/A, R2/Bの二つに分けて調製する。

R2/A

per liter

K_2SO_4 0.5g

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 20.2g

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5.9g

glucose 20.0g

L-proline 6.0g

casamino acids 0.2g

trace element solution 4.0ml

寒天末 44.0g

R2/B

per liter

TES 11.5g

yeast extract 10.0g

sucrose 203.0g

NaOHでpH7.4に調整。

使用直前に等容のR2/AとR2/Bを混合し、更に200mlにつき1mlの割合で1% KH_2PO_4 を加える。

第三節 使用菌株、ベクター及び組換えプラスミド

本研究において使用した菌株、ベクター及び組換えプラスミドは以下のとおりである。

菌株

Streptomyces morookaensis IFO 13416

大阪醸酵研究所より購入した。

Streptomyces morookaensis 206B

Streptomyces morookaensis 203C

両菌株は当研究室の岸原健二博士により、アクリフラビン処理によって構築された PPKase非生産株である。

Streptomyces lividans TK24

英国John Innes Institute のDavid A. Hopwood博士より恵与された。

Streptomyces coelicolor A3(2) M-130

玉川大学の岡西昌則博士より恵与された。

Escherichia coli K12 JM83

九州大学生体防御医学研究所の岸原健二博士より恵与された。

ベクター及び組換えプラスミド

pIJ699

英国John Innes InstituteのDavid A. Hopwood博士より恵与された。

pANT3-1

国立予防衛生研究所の堀田国元博士より恵与された。

pUC12

九州大学生体防御医学研究所の岸原健二博士より恵与された。

pUP1

本組換えプラスミドは当研究室の住近により、*S. morookaensis* のPPKase構造遺伝子を含む7.1kbpのDNA断片をpUC12へサブクローニングして構築された。

第二章 *Streptomyces morookaensis* 野生型株のプロトプラスト再生法の確立

緒言

放線菌を対象とした遺伝子操作実験は大腸菌のそれと比べると困難な点が多いため、限られた数種の菌以外では遺伝子操作実験が行われていない。その難点のひとつに、宿主として用いる菌体を等張液中で溶菌酵素により細胞壁を取り除いたプロトプラストにし、外来DNAを取り込ませ、再び細胞壁を持った本来の姿に再生させる面倒な操作(22)がある。他に放線菌のもつ強い制限修飾系や、生育速度の遅さなどもあげられる。

我々は *S. morookaensis* のもつ PPKase の生理的意義解明と、その上での応用を最終の目的としているが、そのためにはどうしても本菌を宿主とする遺伝子操作実験が必要である。そこで本菌のプロトプラスト再生法の確立を行った。本菌のプロトプラスト調製法は、既に岸原等によって確立されているのでそれに従った。放線菌のプロトプラストには単層寒天法で再生するものがあるが、本菌はこの方法ではほとんど再生しない。そこで再生しにくい放線菌のために、Shirahama等(32)が報告した重層寒天法で本菌のプロトプラストの再生を試みることにし、彼等のR3再生培地を基にして培地組成の検討を行った(Table 2-1)。また、この再生培地が他の放線菌プロトプラストに対しても有効であるかどうかを、宿主として広く使用されている *Streptomyces lividans* TK24について検討した。

第一節 *S. morookaensis* 野生型株及び *S. lividans* TK24株のプロトプラスト調製法

方法

S. morookaensis 野生型株が十分に生育した斜面培地より数白金耳量を10mlのGP mediumに接種し、30℃で2日間前培養した。その1mlを50mlのGPGS mediumに接種して目的の増殖段階まで30℃で更に培養を行い、遠心(1800g, 10min, 4℃)により集菌した。得られた菌体は氷冷0.4 Mシュークロース溶液で2回洗浄し、その湿菌体量約1gを2.4mlのmedium MP3に懸濁し、10mg/ml濃度になるようにリゾチームとアクロモペプチダーゼをmedium MP3に

Table 2-1. Regeneration medium (R3)

polypeptone	0.4 %
yeast extract	0.4 %
glucose	1 %
disodium succinate·6H ₂ O	15 % (0.555M)
K ₂ HPO ₄	0.02%
KCl	0.05%
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.81% (40mM)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.22% (15mM)
TES	0.6 % (25mM)
agar (for under-layer)	1.8 %
low gelling temperature agarose (Sigma; type VII) (for upper-layer)	0.4 %
adjust pH to	7.2

These medium components were autoclaved in four separate groups (MgCl₂, CaCl₂, TES and the rest of medium) to prevent precipitation of salts and amino-carbonyl reaction, and then mixed to establish the complete medium.

溶解した溶液各0.3mlを加えて37℃で30分間穏やかに振盪しながらプロトプラストを形成させた。5mlのピペットマン用チップに脱脂綿を詰めた綿フィルターを準備し、少量のmedium MP3で脱脂綿を膨潤させた後、目づまりを防ぐために上澄みから菌体残渣へと綿濾過を行って菌体残渣を除いた。続いて遠心（1800g, 10min, 4℃）によりプロトプラストを沈殿させ溶菌酵素を除き、器壁に残っている残液にプロトプラストの沈殿をクリーム状に分散させた後にmedium MPWPを徐々に加えて均一に分散させた。遠心（1800g, 10min, 4℃）後、同様の操作を2回繰り返してプロトプラストを十分に洗浄した。プロトプラストを2mlのmedium MPWPに懸濁し、その一部を適当にmedium MPWPで希釈して血球計測器によりプロトプラストの数を求めた。保存する場合は100μlずつ分注して-30℃で凍結保存した。

S. lividans TK24のプロトプラストの調製はHunterの方法(22)に基づいて行った。孢子懸濁液0.2mlを50mlのTSMG mediumに接種し、45℃で10分間の加熱によって孢子を覚醒させた後、30℃で2日間培養した。遠心（1800g, 10min, 4℃）により集菌し、得られた菌体は氷冷0.3 Mシュークロース溶液で2回洗浄し、このうち湿量約1gを使用直前に1mg/mlの濃度でリゾチームを溶かしたlysozyme solution 4mlに懸濁し、37℃で30分間穏やかに振盪しながらプロトプラストを形成させた。次に、前述と同様に綿フィルターを通した後、medium Pで遠心洗浄してプロトプラストを調製した。

第二節 *S. morookaensis* 野生型株のプロトプラスト再生培地の検討

方法

前節で調製したプロトプラストを *S. morookaensis* の場合はmedium MPWPで、*S. lividans* TK24の場合にはmedium Pで $10^3 \sim 10^7$ 個/mlの濃度に希釈し、その0.2mlを培地組成を様々に変えた下層再生培地に接種した。予め融解して32℃に保温しておいた4mlの上層培地を直ちに注ぎ、この培地中にプロトプラストを均一に広げた。上層培地が固化した後、28℃で培養した。

プロトプラストは-30℃で保存可能であるが、再生率が低下することを避けて、本再生実験に使用するプロトプラストは調製した直後のものを使用した。また、再生培地は使用前に重量の10%程度の水分を表面から乾燥させておいたほうが再生率が良い、との報告(22)があるためそのようにした。ただし培地表面が乾燥しているため、プロトプラストを下層培地に接種後、プロトプラストが接種された部分で固まらないように直ちに上層培地を加え広げねばならない。

実験後約1ヵ月にわたって再生コロニーを計数し、接種したプロトプラスト数に対するパーセントをもって再生率とした。また菌の生育の時期がプロトプラストの再生率に影響を与えると考えられるので、この点についても検討した。

第三節 *S. morookaensis* 野生型株のプロトプラスト再生実験の結果

以上の諸実験結果に基づいて再生培地を改良した(Table 2-2)。上層培地の低融点寒天の濃度は1.2%が良かったが、これでは非常に粘性が高くまた下層培地上に広げている最中に固まるほどであるために1%とした。肉エキスや、trace element solution、*S. morookaensis* の死菌体の添加等は効果がなかった。改良点のうち最も効果が認められたのは、炭素源のグリセロールへの変更であった(Table 2-3)。またプロトプラスト調製に使用する菌は、多くの放線菌(22)の場合と同様に対数増殖期後期のものが良いことが判った(Fig. 2-1)。この時期の菌から調製したプロトプラストを改良した再生培地で再生させると、最高34%、平均して10%程の再生率が得られるようになった。また、この改良再生培地の汎用性を *S. lividans* TK24のプロトプラストを用いて単層法で試験したところ、この菌の再生に通常使用されているR2培地で0.3%しか再生しないプロトプラストであっても7.6%の再生率が得られ、確かに汎用性を持つことが判った(Table 2-4)。この再生培地をMR3(modified R3)再生培地と命名し、以降の実験に使用した。

Table 2-2. Regeneration medium for *S. morookaensis* (MR3)

polypeptone	4 %
yeast extract	0.5 %
glycerol	1 %
sucrose	13.7 % (0.4M)
K ₂ HPO ₄	0.02%
KCl	0.05%
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.81% (40mM)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.22% (15mM)
TES	0.6 % (25mM)
agar (for under-layer)	2.7 %
low gelling temperature agarose (Sigma; type VII) (for upper-layer)	1.0 %
adjust pH to	7.2

Table 2-3. Effects of carbon source on *S. morookaensis* protoplast regeneration

	1% glucose	1% glycerol (MR3)
Regeneration frequency (%)	5.9	10.2

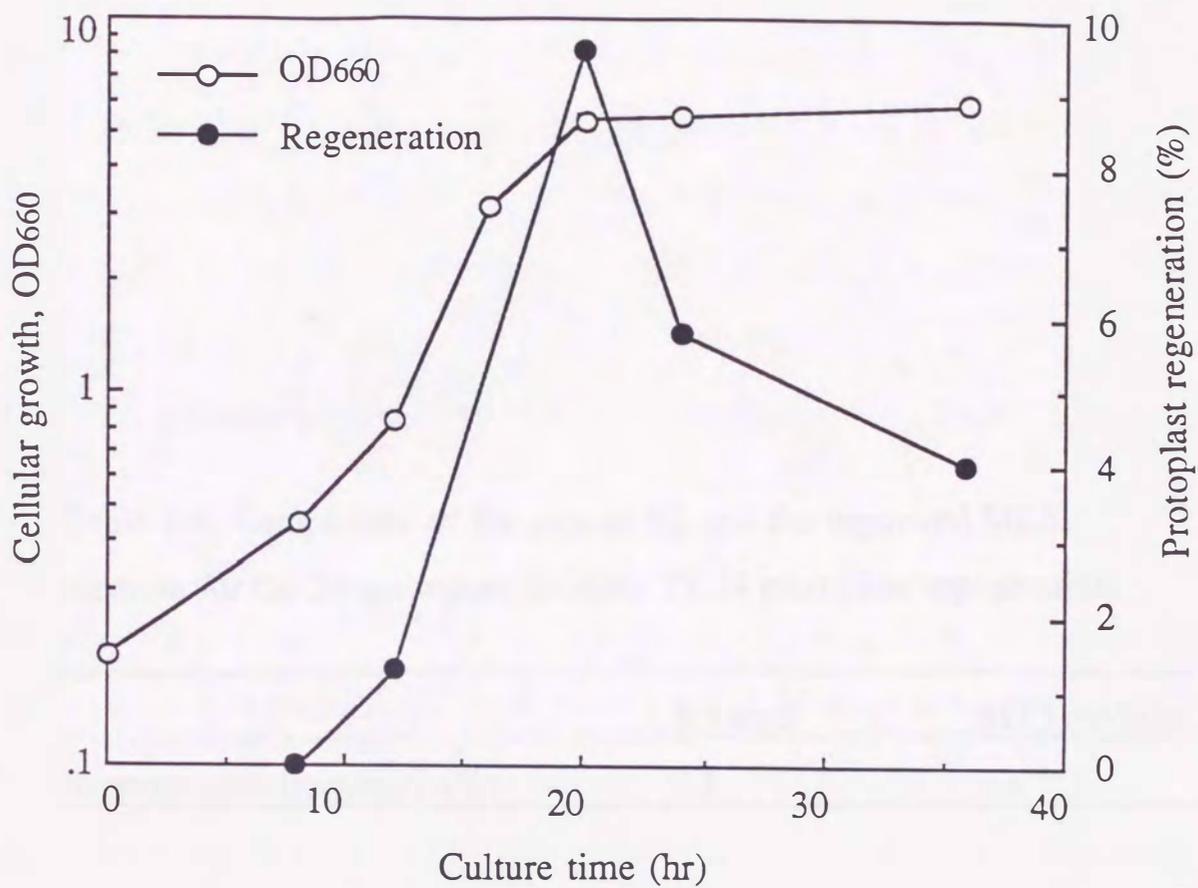


Fig. 2-1. Effects of the growth stage of *Streptomyces morookaensis* wild type-strain on the protoplast regeneration.

Cellular growth was assayed turbidometrically at 660nm, and regeneration frequency was expressed as a percentage of the number of regenerated protoplasts per inoculated protoplasts.

Table 2-4. Comparison of the current R2 and the improved MR3 medium for the *Streptomyces lividans* TK24 protoplast regeneration.

	R2 agar	MR3 medium
Regeneration frequency (%)	0.3	7.6

第三章 *Streptomyces morookaensis* 野生型株の形質転換法の検討

緒言

第二章に述べたように *S. morookaensis* 野生型株のプロトプラスト再生法が確立したため、次に形質転換法を検討した。*S. morookaensis* は抗生物質カナマイシンに感受性であるため、*Streptomyces griseus* 由来のカナマイシン耐性遺伝子を持つプラスミド pANT3-1 (33) の導入によるカナマイシン耐性能の獲得を指標とした形質転換系の確立を目指した。

第一節 *S. morookaensis* 野生型株のプロトプラストの pANT3-1 による形質転換実験

方法

形質転換操作は *S. lividans* で用いられた方法 (22) に若干の変更を加えて行った。-30℃ に保存しておいた *S. morookaensis* 野生型株のプロトプラスト 100μl を氷上で緩やかに融解した後、約 1μg/μl の濃度の pANT3-1 を含む TE buffer 10μl を容器の側壁に付け、これを PEG 1540 の 25% MPWP 溶液 500μl でプロトプラスト中へ洗い落とし、直ちに先端を切り孔径を大きくしたチップを用いて穏やかに混合後、うち 300μl を氷上に置いた新しいチューブに移した。それぞれのチューブに 1ml の medium MPWP を加え、倒置法によって十分に混和して、遠心 (2300g, 10min, 4℃) し、上澄みを除いて残った液にプロトプラストを再懸濁した。全量を MR3 再生培地 1 枚に第二章第二節の方法で接種し、再生してきたコロニーが培地表面にミスト状に認められる迄、28℃ で約 1.5 日間培養した。目的の形質転換体の選択のために、1.3mg/ml の濃度のカナマイシンと 0.4% の低融点寒天を含んだ 1.5ml の MR3 再生培地を重層して培養を続けた。

第二節 *S. morookaensis* カナマイシン耐性体中のpANT3-1の確認

方法

第一節で得られたカナマイシン耐性体からのプラスミドの抽出を、Kieserの方法(34)に基づいて行った。100 μ g/mlのカナマイシンを含む3mlのGPGS mediumに前節で得られたカナマイシン耐性体を接種し、30 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。500 μ lを保存用に取り、残りを遠心(2300g, 10min, 4 $^{\circ}$ C)して集菌した。氷冷0.4Mシュクロース溶液で2回遠心洗浄し、得られた菌体を300 μ lのSTE2 bufferに懸濁した。続いてSTE bufferに10mg/mlの濃度になるようにリゾチームとアクロモペプチダーゼを溶かした溶液を各100 μ lずつ加えて37 $^{\circ}$ Cで30分間、時折穏やかに攪拌しながらプロトプラスト化を行った。これに250 μ lのalkaline SDSを加えて良く混和して完全に溶菌させ、直ちに70 $^{\circ}$ Cで15分間加熱した。室温に冷やした後に80 μ lのacid phenol/chloroformを加えて混和し、遠心(21000g, 5min, 4 $^{\circ}$ C)後、その上層に1/10容の3M酢酸ナトリウムと等容の2-プロパノールを加えて室温に5分間置いた。遠心(21000g, 5min, 4 $^{\circ}$ C)し、沈殿を50 μ lのTE bufferに溶解し、次いで5 μ lの3M酢酸ナトリウムと25 μ lのTE飽和フェノールを加えて良く混和した後に遠心(21000g, 5min, 4 $^{\circ}$ C)した。上層に等容の2-プロパノールを加えて室温に5分間置いた後に遠心(21000g, 5min, 4 $^{\circ}$ C)し、沈殿は500 μ lのTE bufferに溶解した。25 μ lの100mM spermine - HClを加えて良く懸濁し、氷上に15分間以上置き、遠心(21000g, 5min, 4 $^{\circ}$ C)し、得られた沈殿を300 μ lの0.3M酢酸ナトリウム-10mM MgCl₂混合液に溶解し、700 μ lのエタノールを加えてエタノール沈殿を行った。沈殿は75%エタノールでリンスし、減圧乾燥した後に50 μ lのTE bufferに溶解した。終濃度50 μ g/mlになるようにRNase Aを加え、50 $^{\circ}$ Cで1時間反応させてRNAを分解し、続いて45 μ lの20% PEG 8000-2.5M NaCl混合液を加え、氷上に1時間置き、遠心(21000g, 5min, 4 $^{\circ}$ C)してプラスミドを回収した。プラスミドは75%エタノールでリンスし、減圧乾燥した後に20 μ lのTE bufferに溶解した。

得られたプラスミドは常法にしたがって制限酵素*Sph* Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によって分析し、pANT3-1の*Sph* I切断パターンとの比較を行った。

第三節 *S. morookaensis* 野生型株のプロトプラストのpANT3-1による形質転換実験の結果

形質転換体の選択を行った結果、カナマイシン耐性体と思われる1個のコロニーが出現した。このコロニーをカナマイシンを含むGP mediumに接種したところ、生育を認めため本菌中のプラスミドの確認を行った。pANT3-1(Fig.3-1)を *Sph* Iで消化した場合に生じる4.2kbpと5.8kbpのバンドが、*S. morookaensis* カナマイシン耐性形質転換体中のプラスミドの *Sph* I消化物にも認められたことから(Fig. 3-2)、このプラスミドはpANT3-1であると判断した。

現在本実験は当研究室の豊野によって継続されている。筆者の場合には1回の実験でただ1個の形質転換コロニーが得られただけという非常に低い転換効率であったが、同氏はPEG 1540の25% T mix溶液(2.5% sucrose, 100mM CaCl₂, 2.5mM K₂SO₄, 0.58% maleic acid, 0.2% trace element solution (v/v)) (22)とmedium P (22)のシユークロース濃度を0.4Mに変えたmedium Q-2を使用することで、1μg DNAあたり 5.5×10^4 個の形質転換効率を達成した。現在、同氏によって *S. morookaensis* 野生型株のPPKase遺伝子のみを破壊する実験が進行している。

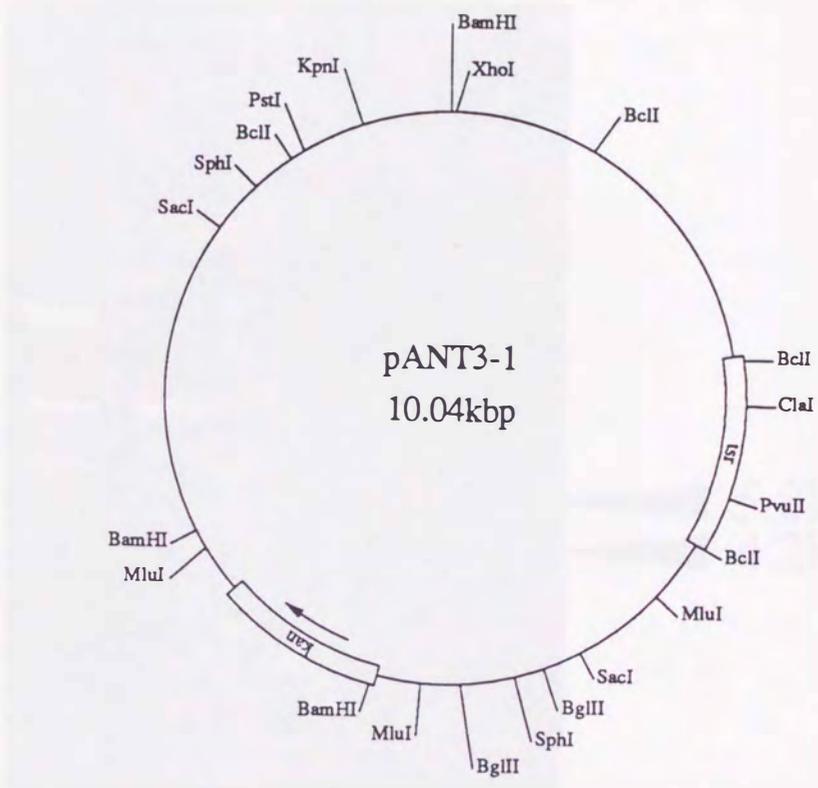


Fig. 3-1. Restriction map of pANT3-1.



Fig. 3-2. Identification of pANT3-1 from *Streptomyces morookaensis* transformant.

Lane 1, molecular weight standards (*Hind* III-digested λ DNA); lane 2, pANT3-1; lane 3, a plasmid from transformant; lane 4, pANT3-1 digested with *Sph* I; lane 5, a plasmid from transformant digested with *Sph* I. Running conditions were 100V for 1hr in 0.7% agarose gel in TAE buffer.

第四章 *Streptomyces morookaensis* 野生型株及び非生産性変異株の全DNAのハイブリダイゼーション分析

緒言

緒章に述べたように、*S. morookaensis* のPPKase非生産性変異の原因は不明なままである。そこで、本酵素遺伝子をプローブとするハイブリダイゼーション実験により、この変異株中の本酵素遺伝子の有無を調べることにした。もし遺伝子が存在するにもかかわらず本酵素が発現されていないのならば、フレームシフト等によるPPKase蛋白質の不活性化や本酵素の発現制御系の何らかの段階でのターミネーション等が考えられる。また、遺伝子が欠失しているとすれば、その原因としてKinashi等によって放線菌に広く分布することが新しく指摘された巨大線状プラスミド(24)が*S. morookaensis*にも存在し、そこに存在していた本酵素遺伝子がプラスミドの除去とともに失われた可能性、あるいは本酵素遺伝子の染色体中からの欠失等が考えられる。そこで*S. morookaensis*の各株から全DNAを調製して制限分解の後、サザンブロットハイブリダイゼーション分析を行った。

第一節 *S. morookaensis* 野生型株及び非生産性変異株の全DNAの調製

方法

全DNAの調製はHunterの方法(22)に基づいて行った。菌が十分に生育している斜面培地から数白金耳量の胞子を、また胞子を形成できない変異株については菌糸をGP medium 10mlに接種して30°Cで2日間前培養を行った。GPGS medium 100mlにGP培養物2mlを接種して同じ条件で更に2日間本培養後、遠心分離(10000g, 10min, 4°C)して集菌した。得られた菌体は氷冷0.4M シュークローズ溶液で2回遠心洗浄した。湿量約5gをチューブに移し、氷上で氷冷TE bufferを少量ずつ加えながら再分散させて全量を8mlにした。続いて10mg/mlの濃度のリゾチームとアクロモペプチダーゼを含んだTE bufferを各1mlずつ加え、30°Cで時々穏やかに攪拌しながら1時間酵素を作用させた。続いて1mlの20% SDSを加えて、穏や

かに攪拌して溶菌し、ただちに1.5mlの5M NaClと10mlのTE飽和フェノールを加えて20分間穏やかに攪拌して蛋白質を変性させた後に遠心分離（650g, 10min, 室温）し、変性蛋白質とフェノールを分離除去した。上層は等容のTE飽和フェノールで再度処理し、得られた核酸層からフェノールを除くために、中間層が形成されなくなるまで等容のクロロホルムを用いて抽出を行った。核酸層をシリコン処理を施した100ml容ビーカーに移して界面を乱さぬようにビーカーの壁面を伝わらせて等容の2-プロパノールを重層し、界面に出現してくる糸状DNAを室温で巻取った。得られたDNAは70%エタノールでリンス後、減圧乾燥した。得られたDNAを少量のTE bufferを加えては毛細管で押しつぶすようにしてできる限り小容のTE bufferに溶解し、終濃度20 μ g/mlになるようにRNase Aを加えて50 $^{\circ}$ Cで1時間反応させてRNAを分解した。次に終濃度100mMになるようにNaClを、0.4%になるようにSDSをそれぞれ加えた後、終濃度100 μ g/mlになるようにProteinase Kを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させて除蛋白後、2-プロパノールでDNAを沈殿させた。DNAを適当量のTE bufferに溶解して以降の実験に使用した。

第二節 *S. morookaensis* 野生型株及び非生産性変異株の全DNAのサザンブロッティング

方法

野生型株と変異株それぞれの全DNA 5 μ gに3.3unitsの*Bgl* IIを37 $^{\circ}$ Cで12時間反応させて分解し、0.7%のアガロースゲルで電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色して写真を撮影したゲルを0.25N HCl溶液中で穏やかに振盪しながら、室温で15分間DNAの脱プリン化を行った。ゲルを脱イオン水で濯いだ後、0.2N NaOH-0.6M NaCl溶液に浸し、室温で30分間穏やかに振盪してDNAを変性させる操作を2回繰り返した。ゲルを脱イオン水で濯いだ後に0.6M NaCl-0.2M Tris-HCl (pH 7.5)溶液を交換しながら溶液のpHが変化しなくなるまで室温で中和処理を行った。テフロン製の板の上に6 \times SSCに浸したワットマン3MM濾紙、ゲル、ニトロセルロースフィルター（Nitroplus 2000, MSI）、4枚の乾いたワットマン3MM濾紙およびペーパータオルを30枚程重ね6 \times SSCを使用したキャピラリー法

(35)で一晩転写を行った。転写終了後、ニトロセルロースフィルターをゲルから剥がし、フィルターについたゲル片を6×SSC中で完全に洗い、疑似シグナルが現われないようにした。フィルターをペーパータオルに挟んで水気を除き、次いで清浄な濾紙に挟んで80℃で2時間加熱してDNAを固定した。ゲルはエチジウムブロマイドで再染色し、ゲル中にDNAが残っていないことを確認後廃棄した。

第三節 PPKase構造遺伝子を含むプローブDNA断片の調製

住近によって作出された *S. morookaensis* のPPKase構造遺伝子を含むDNA断片を持つ組換えプラスミド(14)の中で、PPKaseの生産性が最も良い7.1kbpのDNA断片を持つプラスミド(pPPK1)をPPKaseの分子生物学的手法による実験の出発とした。このDNA断片はpUC系のプラスミドを用いて大腸菌にサブクローニングされ、さらに塩基配列の決定等のために様々に切り縮められた組換えプラスミドが多数作出されている。本研究ではpPPK1中の挿入DNA断片(7.1kbp)をプラスミドpUC12に組み込んだプラスミド(pUP1)を増幅精製し、その中から7.1kbp断片を抽出してハイブリダイゼーション用プローブとして用いた(Fig. 4-1)。

方法

グリセロール100 μ lとアンピシリン溶液300 μ lを添加した50mlのLB mediumに、*E. coli* JM 83/pUP1のグリセロールストック100 μ lを接種して37℃で16時間培養した。遠心分離（16000g, 10min, 4℃）で集菌した菌体を、3mlの50mM glucose-25mM Tris-HCl (pH 8.0)-10mM EDTA溶液に再懸濁した。続いて10mg/mlの濃度のリゾチームを含んだ同溶液2mlを加えて良く混合し、室温に5分間静置した。10mlのalkaline SDSを加えて穏やかに振り混ぜて氷上に5分間置き溶菌させた。続いて7.5mlの5M酢酸カリウムを加えて穏やかに混合して氷上に30分間静置した。遠心分離（16000g, 10min, 4℃）し、上清に等容のTE飽和フェノールを加えて十分にエマルジョン化させた後に遠心分離（650g, 10min, 10℃）を行い変性蛋白質とフェノールを分離除去した。次に上層に等容のクロロホルムを加えてフェノールを抽出

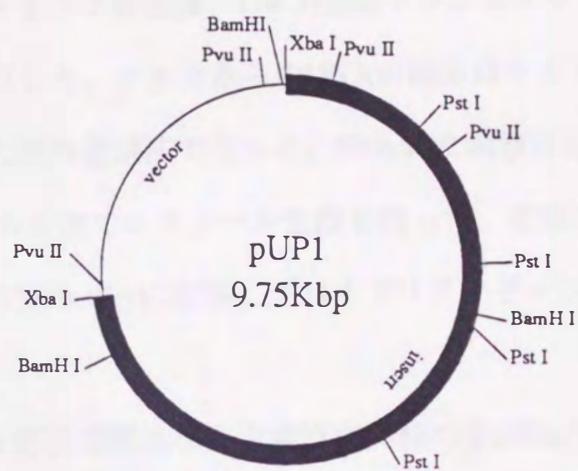


Fig. 4-1. Restriction map of pUP1.

除去した。次に得られた上層にその1/10容の3M 酢酸ナトリウムと2容のエタノールを加えてエタノール沈殿を行った。沈殿は75%エタノールでリンスした後に減圧乾燥した。得られた核酸は1mlのTE bufferに溶解し、RNase A 溶液80 μ lを加えて50 $^{\circ}$ Cで1時間反応させてRNAを分解後、450 μ lの20% PEG 6000-2.5M NaClを加えて氷上に1時間静置した。遠心分離(16000g, 10min, 4 $^{\circ}$ C)を行い沈殿させたpUP1を75%エタノールでリンス後、減圧乾燥して200 μ lのTE bufferに溶解した。そのXba I完全分解物(150 μ g)を0.7%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV 312nmトランスイルミネーター上で7.1kbpのDNAを含むゲル片を回収した。ゲル片からのDNAの抽出はウルトラフリーC3HVフィルター(ミリポア)を用いた限外濾過法で行った。得られた溶液に1/2容の7.5M 酢酸アンモニウムと3.5容のエタノールを加えてエタノール沈殿を行った。沈殿は75%エタノールでリンスして減圧乾燥後、20 μ lのTE bufferに溶解してハイブリダイゼーション実験に用いた。

第四節 *S. morookaensis* 野生型株及び非生産性変異株の全DNAのハイブリダイゼーション分析

方法

ハイブリダイゼーションに使用するプローブの標識法には、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを用いたランダムプライミング法(36)を使用した。13~25ng/17 μ lの7.1kbpのDNA断片を3分間沸騰処理後、氷水中で急冷して一本鎖に変性させた。次に5 μ lの 17 QuickPrimeTM Kit (Pharmacia)の reagent mix、2.5 μ lの $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (3000 Ci/mmol)、0.5 μ lのT7 DNA polymerase (8units/ μ l)の順に加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。未反応の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP をNICK-Column Sephadex G-50 (Pharmacia)で除き、得られた標識プローブ(約400 μ l)を前述のようにして一本鎖に変性した。また、このうち2 μ lを10mlの液体シンチレーションカクテル中で測定し、放射活性を求めた。

並行して、本章第二節で準備したアガロースゲルから転写したフィルターを2 \times SSCで湿らせた後、フィルター100cm²あたり5mlのプレハイブリダイゼーション溶液を加えて55 $^{\circ}$ C

で保温した。3時間後、プレハイブリダイゼーション溶液をハイブリダイゼーション溶液と交換し、フィルター100cm²あたり10⁷cpmの標識プローブをフィルターに直接当たらないように注意して加え、55℃で終夜ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、フィルターを2×SSCで濯いで余分なハイブリダイゼーション溶液を除いた。続いてフィルターを放射活性の強い部分と弱い部分が明確に別れるまで、2×SSC-0.1% SDS溶液と0.2×SSC-0.1% SDS溶液を使用して温度を55℃から70℃まで段階的に上げながら洗浄した。洗浄終了後、-80℃でオートラジオグラフィーを行った。

第五節 *S. morookaensis* 野生型株及び非生産性変異株の全DNAのハイブリダイゼーション分析の結果

プローブDNAは両変異株には全くハイブリダイズせず、変異株中ではPPKase遺伝子が完全に欠失していることが判った(Fig. 4-2)。これまで変異株においてPPKaseの活性が培養上清中に認められない理由がいくつか考えられていたが、この結果から明らかに遺伝子を欠失したためにPPKaseを生産していないことが判った。更にこのプローブの鎖長が7.1kbpであることから、変異株は少なくとも7kbpのDNAを欠失していることが判った。この欠失の大きさはPPKase以外のものをコードする遺伝子を十分含むことができるため、この事実は我々が当初予想していたPPKaseと孢子形成や気菌糸形成との間の密接な関係を疑問視させるものである。また、欠失変異という事実はプラスミドの関与を再考させるものでもあり、最近放線菌に広く分布することが指摘された巨大線状プラスミド(24)の検索を含めて、この欠失変異をDNAレベルで詳しく調べる必要性が生じた。

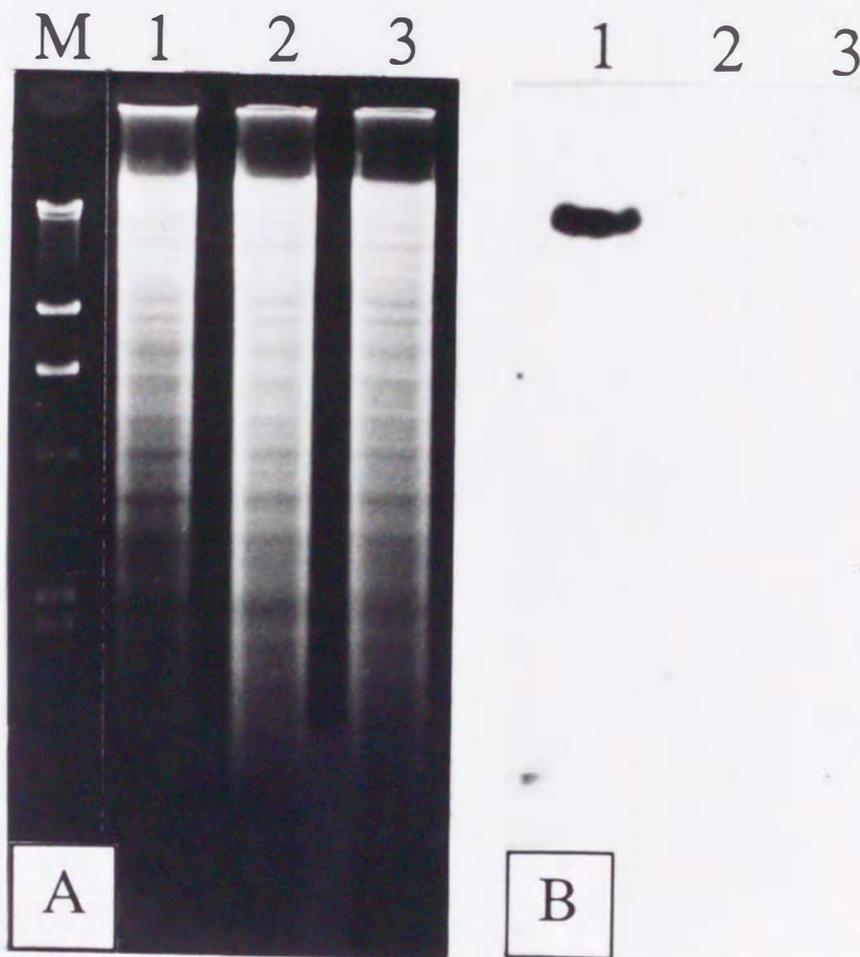


Fig. 4-2. Agarose gel electrophoretic (A) and Southern blot analyses (B) of *Streptomyces morookaensis* total DNA.

Lane M, molecular weight standards (*Hind* III-digested λ DNA); lane 1, wild type-strain total DNA digested with *Bgl* II; lane 2, 206B total DNA digested with *Bgl* II; lane 3, 203C total DNA digested with *Bgl* II.

Running conditions were 30V for 10hr in 0.7% agarose gel in TAE buffer.