

Staphylococcus warneri ISK-1(JCM11004)が生産するランチビオテック、nukacin ISK-1の遺伝生化学的解析

指原, 紀宏
九州大学農学研究科食糧化学工学専攻

<https://doi.org/10.11501/3180523>

出版情報：九州大学，2000，博士（農学），課程博士
バージョン：
権利関係：



第2章

nukacin ISK-1 の構造遺伝子のクローニング

およびその高次構造の予測

2-1 緒言

これまでのペプチド構造解析の結果、nukacin ISK-1 はランチオニンなどの異常アミノ酸を含むランチビオティックであることが示唆されている (1)。ランチビオティックはその異常アミノ酸のために、完全に構造を決定するためには二次元 NMR スペクトル分析が必要である。しかしながら、分析を行うためには、少なくとも 10 mg の精製したサンプルが必要であり、精製時の収率の低さからもランチビオティックの構造決定を行うことはきわめて困難であり、多くのランチビオティックについて明らかにされていない。そこで、本章では nukacin ISK-1 の構造遺伝子を解析し、その推定アミノ酸配列から nukacin ISK-1 の一次構造を決定し、さらに高次構造を予測することを試みた (2)。

2-2 実験方法

2-2-1 使用菌株、培地および培養条件

nukacin ISK-1 生産菌として、*Staphylococcus warneri* ISK-1 (3) を用いた。本菌は 1% のグリシンを含む MRS 培地 (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) を 300 ml 入れた坂口フラスコで 37°C、100 strokes/min で 12 時間振とう培養を行った。遺伝子クローニングの宿主は *Escherichia coli* JM109 [*recA1*, Δ (*lac-proAB*), *endA1*, *gyr96*, *thi-1*, *hsdR17*, *relA1*, *supE44*, {*F'**traD36*, *proAB*, *lacI*, *ZAM15*}] を用いた。本菌は 5 ml の LB 培地 (4) で 37°C、120 strokes/min で一晩振とう培養を行った。

クローニングベクターは pUC18 (Toyobo) を用いた。

2-2-2 Single-specific-primer-PCR (SSP-PCR)

S. warneri ISK-1 からのトータル DNA の抽出は乳酸菌実験マニュアルの方法に従って行った (5)。ただし、溶菌はリゾチームの代わりに 0.1 g/l の *N*-アセチルムラミダーゼを用いて行った。

SSP-PCR (6) は LA PCR *in vitro* Cloning Kit (Takara) を用いて行った。まず、抽出した *S. warneri* ISK-1 のトータル DNA を *Xba*I で消化し、得られた DNA 断片にカセット DNA をライゲーションした。これを鋳型として、カセットに特異的な C-1 プライマーと、*nukacin* ISK-1 構造遺伝子の 3' 末端に相補すると推定される PI-7 プライマーを用いて PCR を行った。PCR の条件は変性を 94°C で 1 分間、アニーリングを 55°C で 1 分間、伸長を 72°C で 2 分間とし、このサイクルを 30 回行った。用いたカセット DNA およびプライマーの配列を Table 2-1 に示す。

PCR 産物のアガロースゲルからの抽出は GeneClean II Kit (Bio 101, Vista, CA, USA) を用いて行った。PCR 産物のクローニングは pUC18 を用いて作製した T ベクターを用いた。すなわち、pUC18 を *Sma*I で消化した後、*Taq* DNA polymerase を用いてジヌクレオチドチミジン三リン酸を切断面に付加した (4)。*E. coli* の形質転換はエレクトロポレーション法により行った (7)。エレクトロポレーションは Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて行い、電極間 0.2 cm のキューベットを用い、25 μ F、抵抗 200 Ω 、電圧 2.5 kV で行った。エレクトロポレーション後、形質転換菌を SOC 培地 (4) で 37°C で 1 時間培養し、アンピシリン、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-- β -D-ガラクトシド (X-gal)、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) をそれぞれ 40, 25, 20 mg/l 含む LB 寒天培地に塗抹し、目的の DNA 断片を含むクローンのスクリーニングを行った。キットなどを用いる操作は各メーカーのプロトコールに従っ

Table 2-1. Sequence of oligonucleotides used in this study.

Names	Sequences (5'-3')	Notes
PI-7	CA(A/G)CA(A/C/G/T)GT(A/G)AA(A/G/T)AC(A/G)AA(C/T)TG(A/G)AA	The synthetic oligonucleotide corresponding to the putative 3' region of nukacin ISK-1 structural gene
C-1	GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGA	The primer corresponding to the cassette oligomer
Cassette	5'-OH GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAT-3' 3'-CATGTATAACAGCAATCTTGCGCATTATGCTGAGTGATATCC <u>CTCT</u> AGATC OH-5'	Cassette oligomer

The underlined letters indicate the sequence of *Xba*I site.

て行った。また、その他の基本的な DNA 操作技術、使用試薬および培地は Molecular Cloning の第二版 (4) に従った。

2-2-3 DNA クローニング

S. warneri ISK-1 から抽出したトータル DNA を *Eco*RI、*Hind*III で消化してサザンハイブリダイゼーション (8) を行った。プローブは SSP-PCR で増幅した約 720 bp の DNA 断片を用いた。3.6-kb *Hind*III 断片は *S. warneri* ISK-1 のトータル DNA ライブラリーからスクリーニングを行った。サザンブロットハイブリダイゼーション、およびコロニーハイブリダイゼーション (4) は DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer, Mannheim, Germany) を用いて行った。ハイブリダイゼーション膜は Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom) を使い、過剰なプローブの洗浄は 0.1% の SDS を含む 2 x SSC および 0.2 x SSC を用いて 68°C で行った。

2-2-4 塩基配列の決定

塩基配列の決定は ALF express sequencer (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて行った。シーケンス反応は Sanger 法 (9) に基づいた、Auto Sequencer Core Kit (Toyobo) を用いて行った。また、シーケンスを行う DNA 断片は double-strand Nested Deletion Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて欠失クローンを作製して行った。キットなどを用いる操作は各メーカーのプロトコールに従って行った。

2-2-5 塩基およびアミノ酸配列の解析

塩基配列およびアミノ酸配列の解析は SDC-GENETYX 遺伝子情報解析ソフトウェア (Software Development) を用いて行った。相同性検索は BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラムを用いて行った (10)。アミノ酸配列の複数配列編集は PAPIA (Parallel Protein Information Analysis) プログラムを用いて行った (11)。解析した塩基配列は EMBL、GenBank、DDBJ に登録番号 AB034941 で登録した。

2-3 結果と考察

2-3-1 SSP-PCR 法による nukacin ISK-1 構造遺伝子の増幅

まず、アミノ酸配列分析により得られた N 末端の 7 個のアミノ酸配列を基に作成したオリゴヌクレオチドをプローブ、またはプライマーとしたサザンブロットハイブリダイゼーションまたは SSP-PCR 法による nukacin ISK-1 構造遺伝子のクローニングを試みた。しかしながら、この部位から作成したオリゴヌクレオチドを用いた場合、揺らぎが大きいためか、特異的なシグナルまたは増幅断片を得ることができなかった。

nukacin ISK-1 はこれまでのペプチド構造解析の結果、lacticin 481 タイプのランチビオティックと相同性を示している。lacticin 481 タイプのランチビオティックでは、その C 末端領域は -F-Q-F-V-F-T-C-C-S-COOH と高度に保存されている。そこで、-F-V-F-T-C-C-S を基にオリゴヌクレオチド、PI-7 を構築し、これを用いて SSP-PCR を行った。その結果、Fig. 2-1 に示すように、約 720 bp の DNA 断片が特異的に増幅された。この DNA 断片をアガロースゲルから抽出し、TA クローニング法を用いて

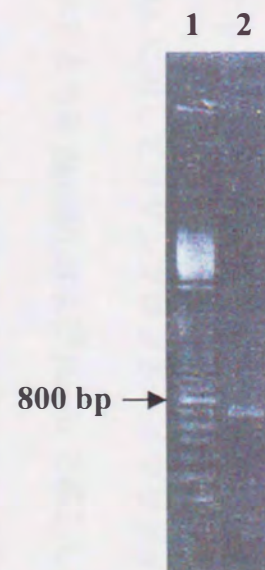


Fig. 2-1. SSP-PCR using C-1 and PI-7 primers, and cassette ligated *Xba*I fragment of total DNA from ISK-1 strain as the template.

Lane1; 100-bp ladder marker, lane 2; amplified DNA fragment.

pUC18 にクローニングし、その塩基配列の決定を行った。

本断片に含まれる塩基配列から推定したアミノ酸配列の一部は、ペプチド構造解析により明らかにした nukacin ISK-1 の N 末端から 7 個のアミノ酸配列と完全に一致した。また、その N 末端側には、リーダー配列と推定されるアミノ酸配列が確認された。しかしながら、本操作では lacticin 481 タイプのランチビオティックの C 末端側の相同領域から構築したプライマーを用いたため、この部位の塩基配列を決定することができなかった。そこで、本断片をプローブとして、完全な nukacin ISK-1 構造遺伝子を含む DNA 断片のクローニングを試みた。

2-3-2 nukacin ISK-1 構造遺伝子のクローニング

SSP-PCR 法により得られた DNA 断片をプローブとして、*S. warneri* ISK-1 から抽出したトータル DNA に対してサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、Fig. 2-2 に示すように *Hind*III および *Eco*RI で消化した *S. warneri* ISK-1 のトータル DNA 断片では、それぞれ約 3.6 kb および約 800 bp の位置にシグナルが得られた。そこで、*Hind*III を用いて *S. warneri* ISK-1 のトータル DNA ライブラリーを作製し、SSP-PCR により増幅した約 720 bp の DNA 断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション法により、nukacin ISK-1 の構造遺伝子を含むと推定される 3.6-kb *Hind*III 断片のスクリーニングを行い、その塩基配列の決定を行った。

2-3-3 nukacin ISK-1 の推定アミノ酸配列の解析

本 DNA 断片上には 3 つの ORF (Open Reading Frame) が確認された (Fig. 2-3)。

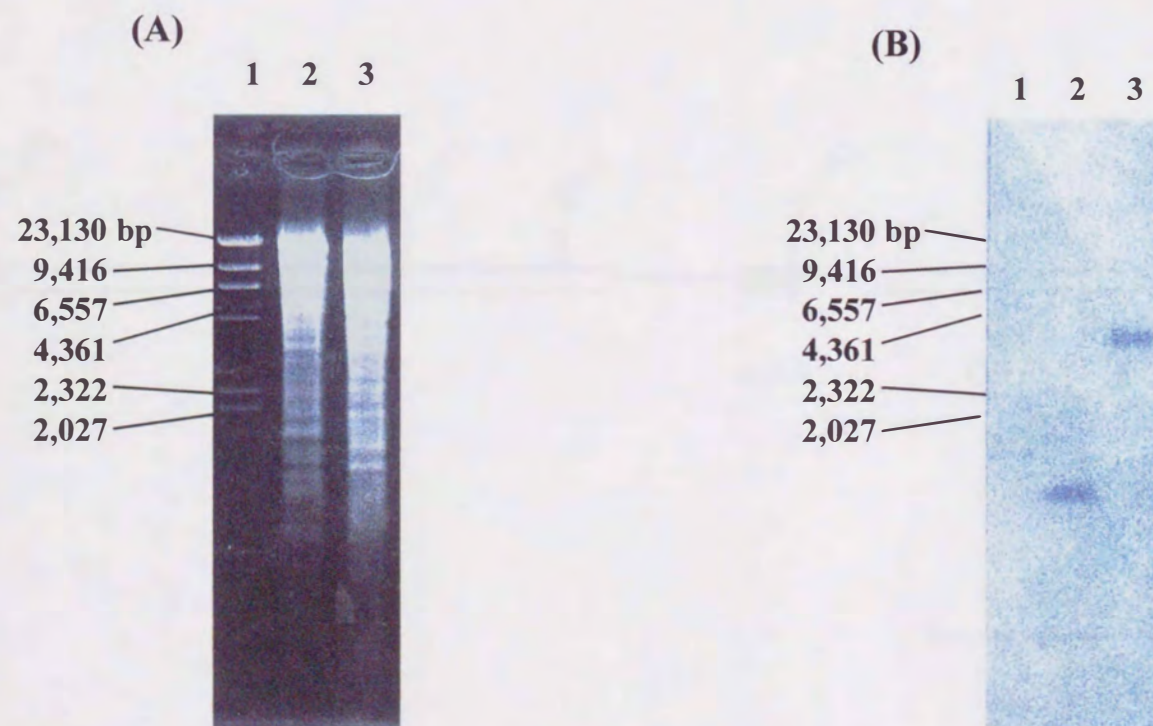


Fig. 2-2. Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot hybridization (B) of ISK-1 total DNA digested with *Eco*RI and *Hind*III using 720-bp fragment amplified by SSP-PCR as a probe.

Lane 1; λ -*Hind*III marker, 2; ISK-1 total DNA digested with *Eco*RI, 3; ISK-1 total DNA digested with *Hind*III.

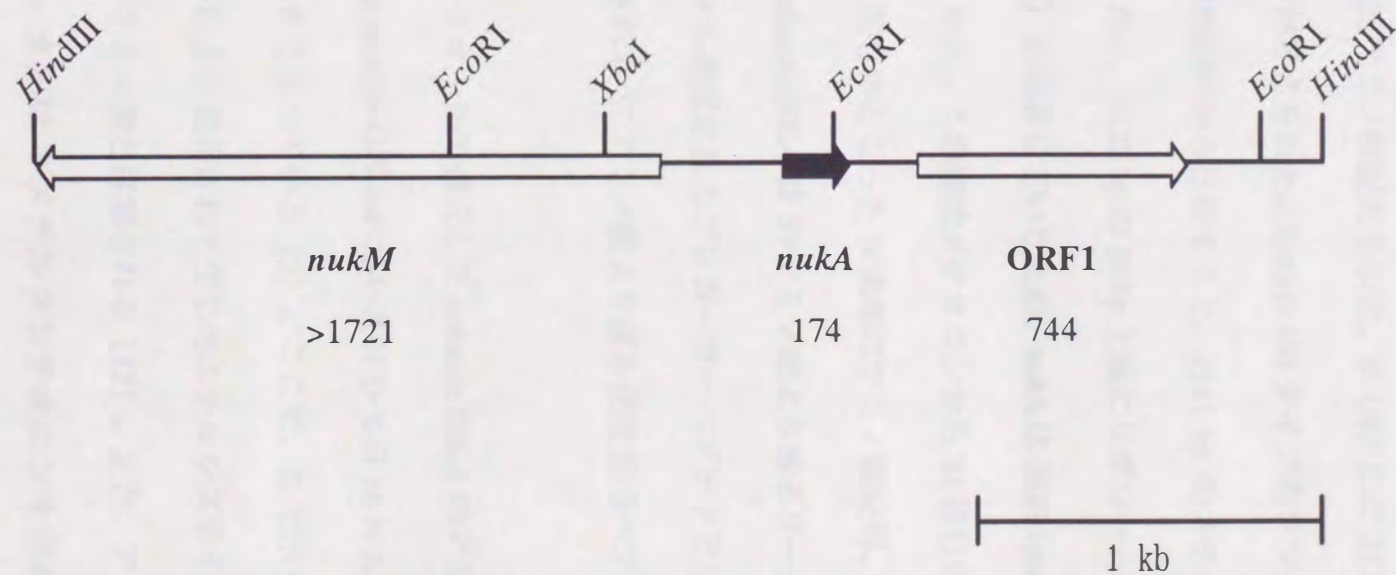


Fig. 2-3. Restriction map of the 3.6-kb *Hind*III fragment and organizationn of *nukA* and the other ORFs.
 The number of nucleotides involved in each gene is indicated below its name.

他の2つのORFについては第3章で述べるが、このうち174 bpからなるORFは *nukacin* ISK-1 をコードする構造遺伝子であることが明らかとなり、*nukA* と命名した。Fig. 2-4 に3.6-kb *Hind*III 断片の2001 から2500 bpの *nukacin* ISK-1 の構造遺伝子を含む領域の塩基配列とその推定アミノ酸配列を示す。本ORFには2123と2141 bpの位置にメチオニン開始コドンが考えられた。*lactacin* 481 タイプのランチビオティックのリーダーペプチド配列との相同性から比較すると、2141 bpのメチオニンコドンが開始コドンと考えられた。しかし、2123 bpの10 bp上流にリボソーム結合部位(RBS)と推定される配列(GGAG)が位置していたため、*nukA* は2123 bpのメチオニンコドンから翻訳されると推察された。この開始メチオニンから31番目の位置から *nukacin* ISK-1 のペプチド解析より明らかとなったN末端のアミノ酸配列、K-K-K-S-G-V-I-が位置していた。これより、*nukacin* ISK-1 は30アミノ酸より成るリーダーペプチド配列を含む、57個のアミノ酸から構成されるプレカーサーペプチドとして合成された後、Ala⁻¹とLys⁺¹の間で切断されて27アミノ酸より成る活性型のペプチドとなることが推察された。

アルカリエタンチオールで還元した *nukacin* ISK-1 のアミノ酸配列を分析した結果、その配列は NH₂-K-K-K-S-G-V-I-P-X-V-X-H-D-X-H-M-N-X-F-Q-F-V-F-X-X-X-S-COOH であることが明らかとなっている(2)。ここで、Xで示す7個のアミノ酸はアルカリエタンチオールにより還元されて生じたエチルシステイニル誘導体であり、翻訳後修飾を受けているアミノ酸と推察される(12)。また、アミノ酸組成分析から3分子のランチオニン、または3-メチルランチオニンを含んでいる(1)。Fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS)で測定した *nukacin* ISK-1 の分子量は2,960である(1)。一方、遺伝子から推定したアミノ酸配列からの *nukacin* ISK-1 の推定分

2001 CACTTTATCACTCTAAATATAAATTTTAATTATATAAATAAGTGGTTTATACAATTTTACACTTTGTAAATATCATGTGATATTAACTTGTAACAAATA

2101 TTAAATTTAGGAGGTAACAAACATGGAAAATTCTAAAGTTATGAAGGACATTGAAGTAGCAAATTTATTAGAAGAGGTTCAAGAAGATGAATTGAATGAA
M E N S K V M K D I E V A N L L E E V Q E D E L N E
→ *nukA*

2201 GTCTTAGGAGCTAAGAAAAAGTCAGGAGTAATCCCAACTGTGTACACGATTGCCATATGAATTCTTCCAATTTGTATTTACTTGTTGTTTCATAAAAAG
V L G A K K K S G V I P T V S H D C H M N S F Q F V F T C C S *

2301 GGGAATGTTGTAAATCAGTAAAAATAACTTTAAGTGATACTTACTTTAGTTTTTTTATTGATTAACATGATACTAATATTATGGCATGGCGAAAATCCG

2401 TAGTTTTGAAAAGAACTACGGATTTTTTATGAACCGTAAACATATATAGTGTCTTTAGTTATTGTATTTTGGAGAGTATTGAAACCTTAATATTTTGTT

Fig. 2-4. Nucleotide sequence of the nukacin ISK-1 structural gene and the deduced amino acid sequence.

The putative ribosome binding site is boxed and indicated by RBS. Termination codon is indicated by an asterisk. The vertical arrow indicates cleavage site of the propeptide to form active nukacin ISK-1. Only the most relevant portion of the sequence (nucleotides 2001-2500) in the 3.6-kb *HindIII* fragment is shown.

分子量は 3,031 であった。デヒドロアラニンなどの不飽和アミノ酸が形成される脱水過程では分子量は 18 減少することから (Fig.1-7)、nukacin ISK-1 では 4 分子のセリンまたはスレオニンが脱水されていることになる。このことから、nukacin ISK-1 は 3 分子のランチオニンまたは 3-メチルランチオニンの他に 1 分子の不飽和アミノ酸を含むと推察された。この時、nukacin ISK-1 の推定分子量は 2,959 であり、FAB-MS により得た値とほぼ一致した。

nukacin ISK-1 のアミノ酸配列は lacticin 481 タイプのランチビオティック (13-20) と高い相同性を示した (lacticin 481 と 74%、variacin と 81%)。nukacin ISK-1 とこれらのアミノ酸配列の複数配列編集を行ったところ、翻訳後修飾を受けるセリン、スレオニン、システインの位置は高度に保存されていた (Fig. 2-5)。また、そのリーダーペプチド配列は nisin タイプのランチビオティックのものとは異なり、クラス II (IIc を除く) のバクテリオシンと同様に Gly⁻²-Ala/Gly⁻¹ で切断され、中央の領域にグルタミン酸を多く含む保存性の高い領域を有していた (21)。

2-4 小括

本章では、lacticin 481 タイプのランチビオティックの C 末端側の相同領域を基に構築したプライマーを用いて SSP-PCR を行い、約 720 bp の増幅断片を得た。この断片をプローブとして、nukacin ISK-1 構造遺伝子を含む 3.6 kb の *HindIII* 断片のクローニングを行った。その塩基配列を決定したところ、本断片上に 3 つの ORF が確認されたが、このうち 174 bp からなる ORF は nukacin ISK-1 構造遺伝子をコードしており、*nukA* と命名した。*nukA* の推定アミノ酸配列から nukacin ISK-1 プレカーサーペプチドは 30 個のアミノ酸からなるリーダーペプチド配列を含む、57 個のアミノ酸から構成

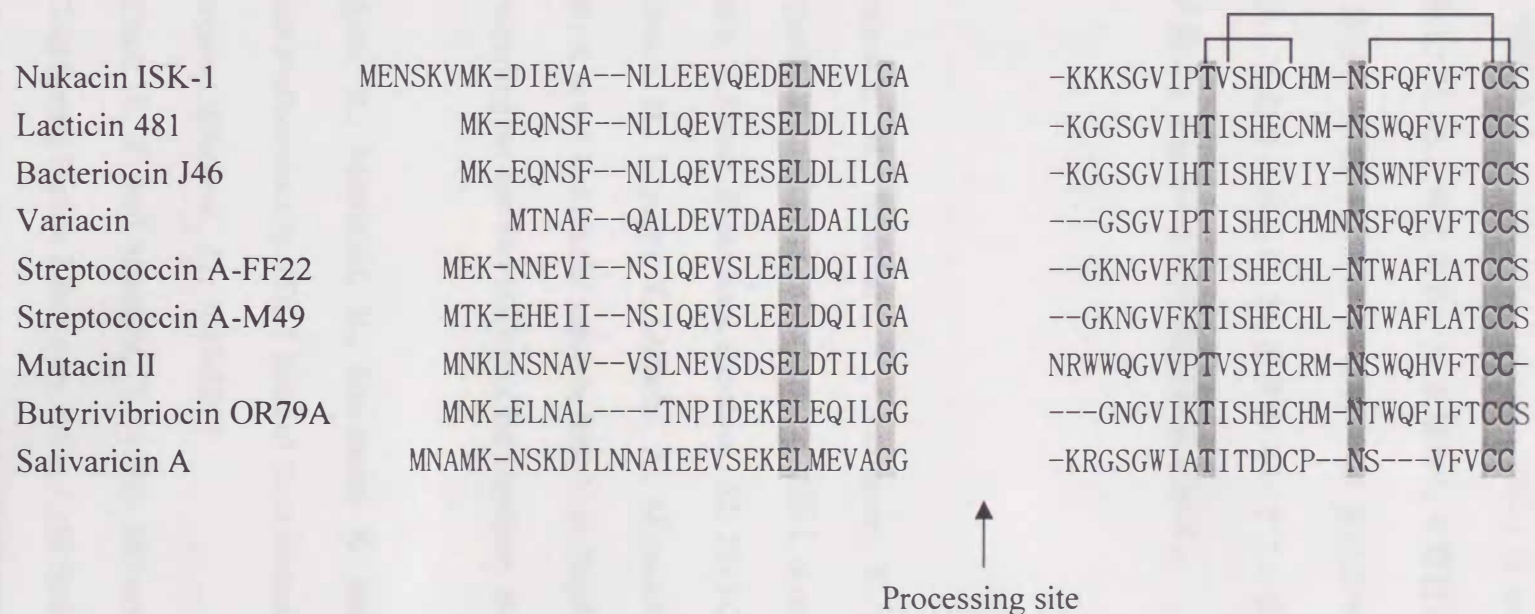


Fig. 2-5. Sequence comparison of the precursor of nukacin ISK-1 with those of lacticin-481 type lantibiotics.

Identical residues are indicated by shaded boxes. The thioether bridges as determined for lacticin 481 are given above the sequence. The vertical arrow indicates the processing site.

されると推察された。また、その配列は lacticin 481 などと高い相同性を示すが、新規であることが明らかとなった。このタイプでは lacticin 481 についてのみ、そのランチオニン環構造が明らかとなっている (22)。ペプチド構造解析の結果および *nukA* から推定したアミノ酸配列との比較から、nukacin ISK-1 も lacticin 481 と同様のランチオニン環構造を有していると考えられ、N 末端から 9 番目と 14 番目のスレオニンとシステイン、11 番目と 25 番目および 18 番目と 26 番目のセリンとシステインがランチオニン環を形成しており、さらに 24 番目のスレオニンがデヒドロブチリンに変化していると推察された。Fig. 2-6 にその推定構造を示す。

2-5 参考文献

1. Kimura, H., Matsusaki, H., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (1998) Purification and partial identification of bacteriocin ISK-1, a new lantibiotic produced by *Pediococcus* sp. ISK-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**: 2341-2345
2. Sashihara, T., Kimura, H., Higuchi, T., Adachi, A., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2000) A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and elucidation of the structure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**: 2420-2428
3. Kimura, H., Nagano, R., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (1997) A bacteriocin of strain *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from *Nukadoko*, bed of fermented rice bran. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**: 1049-1051
4. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y
5. 小崎道雄監修、内村泰、岡田早苗共著 (1992) 乳酸菌実験マニュアル 朝倉書店

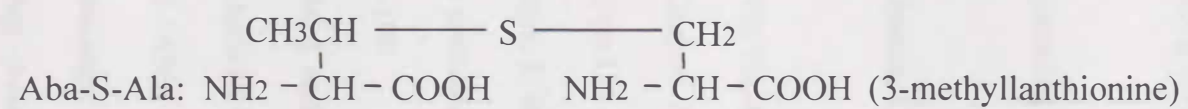
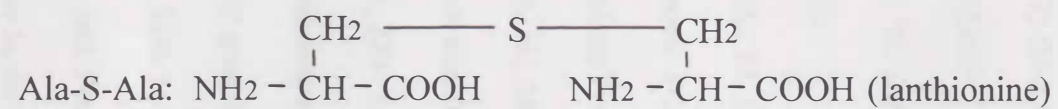
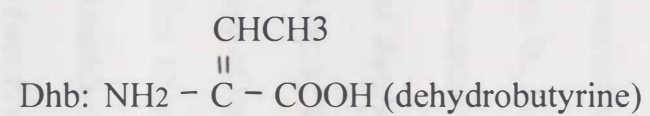
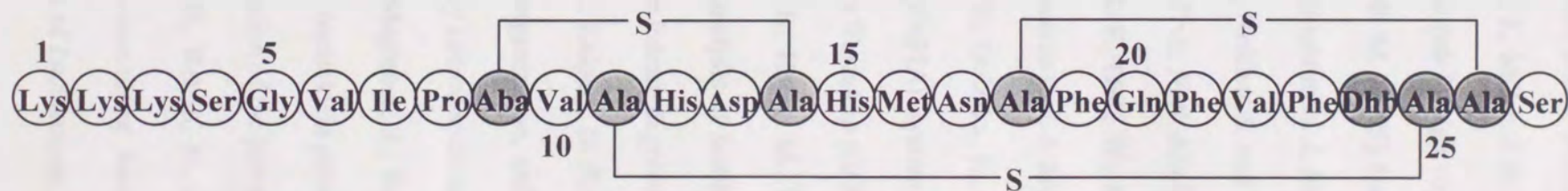


Fig. 2-6. Proposed structure of nukacin ISK-1.

6. Shyamala, V. G. and Ames, F.-L. (1993) Genome walking by single-specific-primer-polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.*, **217**: 436-446
7. Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 6127-6145
8. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517
9. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467
10. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410
11. Akiyama, Y., Onizuka, K., Noguchi, T. and Ando, M. (1998) Parallel Protein Information Analysis (PAPIA) system running on a 64-node PC Cluster. *Proc. the 9th Genome Informatics Workshop (GIW'98)*, Universal Academy Press, pp.131-140
12. Meyer, H. E., Heber, M., Eisermann. B., Korte, H., Metzger, J. W. and Jung, G. (1994) Sequence analysis of lantibiotics: Chemical derivatization procedures allow a fast access to complete Edman degradation. *Anal. Biochem.*, **223**: 185-190
13. Piard, J.-C., Kuipers, O. P., Rollema, H. S., Desmazeaud, M. J. and de Vos, W. M. (1993) Structure, organization, and expression of the *lct* gene for lacticin 481, a novel lantibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, **268**: 16361-16368
14. Huot, E., Meghrous, J., Barrena-Gonzalez, C. and Petitdemange, H. (1996) Bacteriocin J46, a new bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46: isolation and characterization of the protein and its gene. *Anaerobe*, **2**: 137-145
15. Pridmore, D., Rekhif, N., Pittet, A.-C., Suri, B. and Mollet, B. (1996) Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: comparison to lacticin 481 of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1799-1802

16. Hynes, W. L., Ferretti, J. J. and Tagg, J. R. (1993) Cloning of the gene encoding streptococcin A-FF22, a novel antibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*, and determination of its nucleotide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1969-1971
17. Hynes, W. L., Friend, V. L. and Ferretti, J. J. (1994) Duplication of the lantibiotic structural gene in M-type 49 group A *Streptococcus* strains producing streptococcin A-M49. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 4207-4209
18. Woodruff, W. A., Novak, J. and Caufield, P. W. (1998) Sequence analysis of *mutA* and *mutM* genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene*, **206**: 37-43
19. Kalmokoff, M. L., Lu, D., Whitford, M. F. and Teather, R. M. (1999) Evidence for production of a new lantibiotic (Butyrvibriocin OR79A) by the ruminal anaerobe *Butyrvibrio fibrisolvens* OR79A: characterization of the structural gene encoding butyrvibriocin OR79A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2128-2135
20. Ross, K. F., Ronson, C. W. and Tagg, J. R. (1993) Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2014-2021
21. Klaenhammer, T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 39-86
22. Van den Hooven, H. W., Lagerwerf, F. M., Heerma, W., Haverkamp, J., Piard, J.-C., Hibers, C. W., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and Rollema, H. S. (1996) The structure of the lantibiotic lacticin 481 produced by *Lactococcus lactis*: location of the thioether bridges. *FEBS Lett.*, **391**: 317-322

第3章

nukacin ISK-1 生合成遺伝子群のクローニング

およびその遺伝子解析

ランチビオティックでは、その構造遺伝子の他に翻訳後修飾（ランチオニン形成やリーダーペプチド配列の切断）に関与する修飾酵素、輸送タンパク質、自己耐性や転写調節に関与するタンパク質をコードする遺伝子が生合成遺伝子群を形成している（1,2）。第2章で述べたように 3.6-kb *Hind*III 断片上にも、nukacin ISK-1 構造遺伝子上流および下流にランチビオティックの生合成に関与すると思われる遺伝子が確認されており（3）、さらにその周辺領域にも生合成に関与する遺伝子がコードされると推察される。

ランチビオティックの生合成遺伝子群は一樣でなく、自己耐性や転写調節機構もランチビオティックにより異なっている（2）。これまでに報告されている lacticin 481 タイプのランチビオティックでは、構造遺伝子（*lanA*）、修飾酵素遺伝子（*lanM*）、ABC トランスポーター（*lanT*）、自己耐性因子をコードする遺伝子（*lanFEG*）は全てに共通して存在している。しかし、転写調節機構に関しては、streptococcin A-FF22 の様に nisin と同様な 2 成分調節系を持つもの（4）、mutacin II の様に恒常的に遺伝子の転写を促進する因子（MutR）を持つもの（5）、lacticin 481 の様に持たないもの（6）もある。また、butyrovibriocin OR79A では機能不明な ORF をコードするものも報告されており（7）、その機能は興味深い。

これまでに、nukacin ISK-1 の生産は浸透圧ストレスにより転写レベルで促進されることが明らかとなっている（8）。この機構は未だ詳細には明らかにされていないが、転写調節因子が nukacin ISK-1 生合成遺伝子群にコードされており（後述）、この因子が浸透圧ストレスに関連している可能性も考えられる。このようなことから、nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群を同定し、それらの機能を解析することは重要である。

そこで、本章では、nukacin ISK-1 の生合成に関与する遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定を行い、その生合成遺伝子群の特定を行った。

3-2 実験方法

4.5-kb *Xba*I 断片は 3.6-kb *Hind*III 断片に含まれる 1.6 kb の *Eco*RI-*Hind*III 断片をプローブとして、*Xba*I を用いて作製した *S. warneri* ISK-1 のトータル DNA ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーション法を用いてスクリーニングした。2.7-kb *Hind*III 断片のクローニングは、*S. warneri* ISK-1 のトータル DNA ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。プローブはプライマー、ncp-50 および ncp-27 を用いて PCR を行い、増幅した約 400 bp の断片を用いた。PCR の条件は変性を 95°C で 1 分間、アニーリングを 55°C で 1 分間、伸長を 72°C で 1 分間とし、このサイクルを 35 回行った。2.7-kb *Eco*RI-*Hind*III 断片のクローニングは SSP-PCR を用いた。nuk-GE および C-1 をプライマーとして、*Eco*RI カセットをライゲーションした *S. warneri* ISK-1 トータル DNA の *Eco*RI 断片を鋳型とした。PCR の条件は変性を 94°C で 30 秒間、アニーリングを 55°C で 2 分間、伸長を 72°C で 1 分間とし、このサイクルを 35 回行った。増幅した 2.7 kb の断片を、*Hind*III および *Eco*RI 部位で pUC18 にクローニングした。3.7-kb *Eco*RI 断片は 3.6-kb *Hind*III 断片に含まれる 0.2 kb の *Hind*III-*Eco*RI 断片をプローブとして、*Eco*RI を用いて作製した *S. warneri* ISK-1 のトータル DNA ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。用いたカセット DNA およびプライマーの配列を Table 3-1 に示す。

ハイブリダイゼーションは、すべて Alkphos (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom) を用いて 55°C で行った。シグナルの検出は CDP-Star

Table 3-1. Sequences of oligonucleotides used in this study.

Names	Sequences (5'-3')	Notes
nep-50	CAATCGTATAAATATATATAGAAATGTTTGA AAAATAGTCAATATAGCG	The sense primer corresponding to the position 6547 to 6596 in the 10-kb <i>HindIII-EcoRI</i> region
nep-27	CCCTTCAGTAGGGTGCAAGAGACCTAG	The anti-sense primer corresponding to the position 6926 to 6950 in the 10-kb <i>HindIII-EcoRI</i> region
nuk-GE	GGTGGTG TACTAGGTCTTCTAACA	The sense primer corresponding to the position 8961 to 8984 in the 10-kb <i>HindIII-EcoRI</i> region
C-1	GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGA	The primer corresponding to the cassette oligomer
<i>EcoRI</i> -Cassette	5'-OH GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAG-3' 3'-CATGTATAACAGCAATCTTGCGCATTATGCTGAGTGATATCCCTCTCTTAA OH-5'	Cassette oligomer

(Amersham Pharmacia Biotech) を用いた発光法で行った。2.7-kb *Hind*III 断片及び、2.7-kb *Eco*RI-*Hind*III 断片の塩基配列の決定は、Gene Rapid DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech) で行った。シーケンス反応は Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。操作は全て各メーカーのプロトコールに従った。その他の実験方法は第2章と同様の方法で行った。

タンパク質のモチーフ構造予測は *Pfam* プログラムを用いて行った(9)。解析した塩基配列は EMBL、GenBank、DDBJ に登録番号 AB034941 で登録した。

3-3 結果と考察

3-3-1 生合成遺伝子群のクローニング

コロニーハイブリダイゼーション法などにより、3.6-kb *Hind*III 断片の上流に位置する 4.5-kb *Xba*I 断片、その上流に位置する 2.7-kb *Hind*III 断片をクローニングした。さらにその上流の断片は、塩基配列の決定により明らかにした 2.7-kb *Hind*III 断片の一部を基にプライマーを構築し、SSP-PCR 法により断片を増幅し、これを pUC18 にクローニングした。また、3.6-kb *Hind*III 断片の下流に位置する 3.6-kb *Eco*RI 断片もクローニングした(3)。クローニングした断片およびその制限酵素の部位を Fig. 3-1 に示す。

3-3-2 ORF 解析

これらの断片の塩基配列を決定した。その結果、Fig. 3-2 に示すように *nukA* の上流に、逆向きに 6 つの ORF が確認された。これらは以下に述べるような相同性やモチ

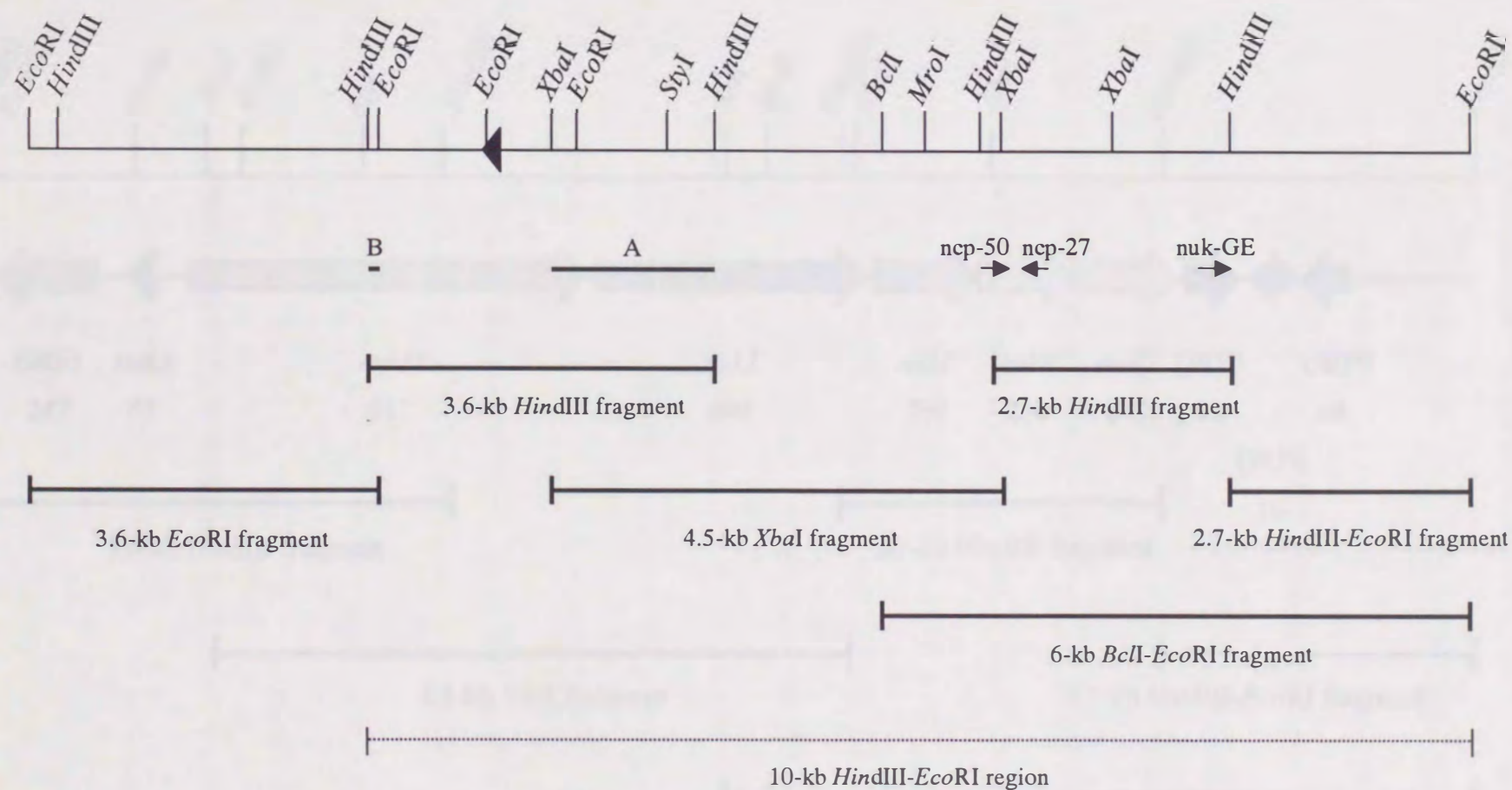


Fig. 3-1. Fragments cloned in this study.

nukacin ISK-1 structural gene is indicated by an arrow. A and B represent fragments used as probes to clone 4.5-kb *XbaI* fragment and 3.6-kb *EcoRI* fragment, respectively. Locations of *nuc-50*, *nuc-27* and *nuc-GE* used as primers for PCR are shown. 6-kb *BclI-EcoRI* fragment is described in Chapter 6.

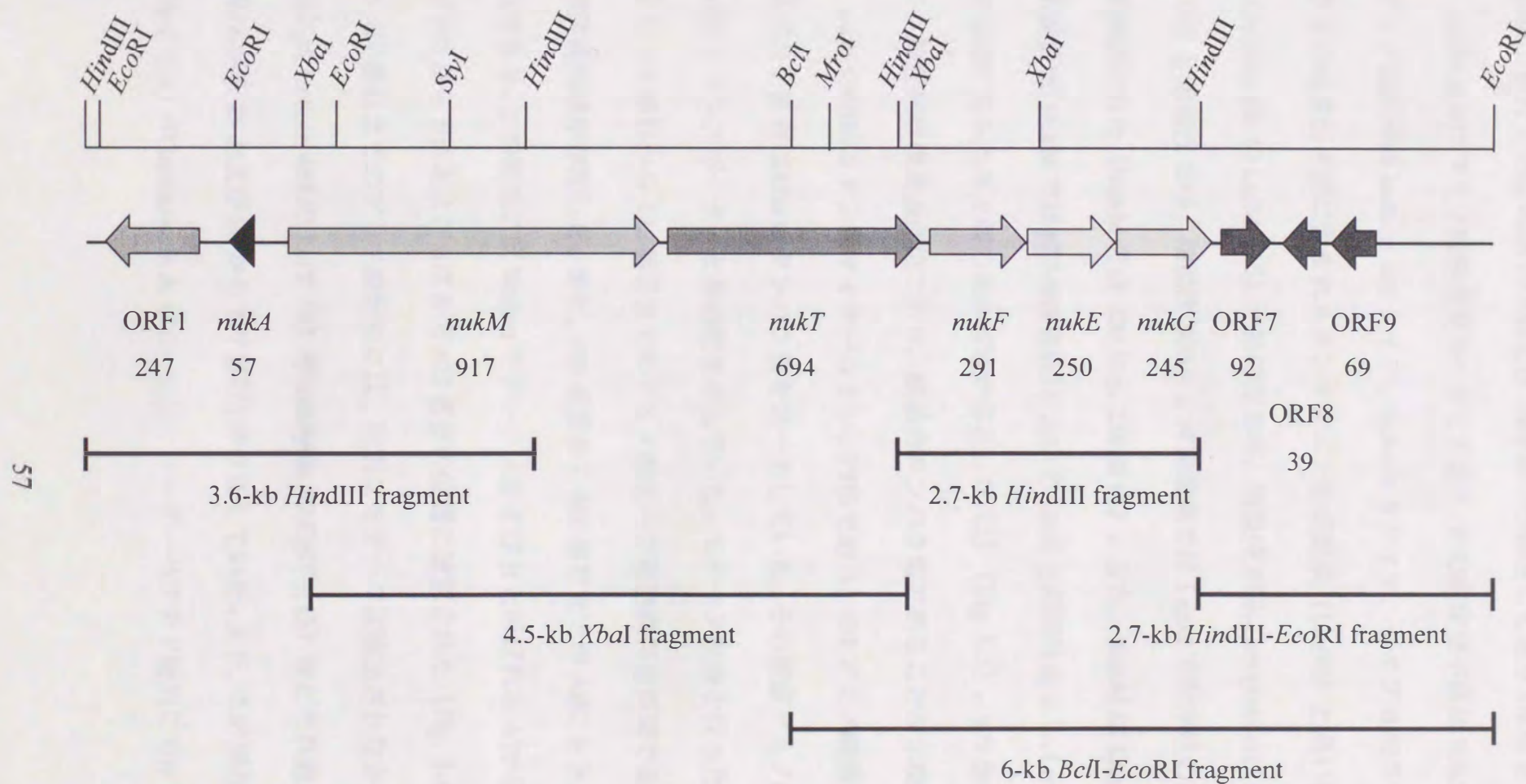


Fig. 3-2. Organization of genes for biosynthesis of nukacin ISK-1 and other ORFs.

The numbers of amino acid residues within each encoded protein are shown below the corresponding genes or ORFs. Nucleotide sequence of 2.7-kb *HindIII*-*EcoRI* fragment is not completed. 6-kb *BclI*-*EcoRI* fragment is described in Chapter 6.

ーフ検索の結果、それぞれ *nukM*, *nukT*, *nukF*, *nukE*, *nukG*, ORF7 と命名した。また、3.6-kb *HindIII* 断片上では *nukA* の下流には ORF が一つ存在しており ORF1 とした。

nukM は 917 アミノ酸残基をコードしており、その推定分子量は 106.7 kDa であった。アミノ酸配列は lacticin 481 タイプ、lactocin S タイプ、タイプ B のランチビオテック生合成遺伝子群に含まれるランチオニン形成酵素 (LanM) と高い相同性を示した (lacticin 481 の LctM (10) と相同性 40%、類似性 59%。streptococcin A-FF22 の ScnM (4) と相同性 29%、類似性 50%)。N 末端側では LanM で保存性の高い部位が 1 か所確認された (NukM では 220 から 259 番目)。また、NukM は LanM と同様に、C 末端領域 (NukM では 637-903 番目) において LanC と相同性を示し、LanC および LanM で共通に見られる 6 個の保存領域が存在した (2) (Fig. 3-3)。875 から 901 番目のアミノ酸配列は膜貫通部位であり、膜結合タンパク質であることが示唆された。

nukT の開始コドンはマイナーコドン、TTG であり、694 アミノ酸残基をコードする推定分子量 80.2 kDa のタンパク質をコードしていた。その推定アミノ酸配列は種々の ABC トランスポーターと相同性を示していた。モチーフ検索を行ったところ、N 末端から 155 番目から 425 番目までのアミノ酸配列が細胞膜貫通領域であり、5 つの細胞膜貫通領域が存在した。また、490 番目から 666 番目までが ABC トランスポーター領域であり、この領域には Walker モチーフ A および B と呼ばれる ATP 結合部位 (11,12) が 495 から 506 および 612 から 622 番目の位置に確認された (Fig. 3-4)。また、1 から 154 番目までのアミノ酸配列には、特別なモチーフは検出されなかったが、この領域には lacticin 481 の LctT (6) や cytolyisin の CylT (13) などと共通に保存された配列 (6 から 25 および 90 から 107 番目) が存在していた。また、この保存配列は pediocin PA-1 (14) や lactococcin A (15) など、リーダーペプチド配列に Gly⁻²-Gly (Ala, Ser)⁻¹

```

NukM  MNNI--K-VEQFRGFSNFILK-KYS----KQ-ELNTLIDW-NYLRSIILDICGKSLIVLINEK-RLNKK-LNGNTPPEERYKYFDEELCEKGIIVEELNKSYPYI-INDLEQTLNSYFSFLKDIENK 113
LctM  ---MKKKTY-Q---FEKF-LKNTFDQFSIKQNE--VLV-EDD-LNDIIMNVCGKALVLMINEKREM--NLLMGNTPEERYQYFENEYSSTGKAFFEEKDKFPVYI-DLKNINSYLKLVSQIMKD 111
      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      *
      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      *

FNQ-EKKKLL-EANLIKTEKETICHISILGDLHGGKAVTKVTTDKSQLLYKPRSLNDSFFL-EFLEFMY-S-FQKNEIS-TYY-KYKF-I-DY--KDHGWMEYIEKQPTS-KNKINMYKRLGYL 227
FKKDY--SLLVERKIE-EHSTISTMKIKGDLHNGKAVIEITTNKSLIYKPKSLNDVF-FNNFLKY-MDSFFIKEGKSTK-YKENFYLVNTLDMKTYGWVEYVDKPKINSFEEARNYYRKIGVL 231
*      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

LSIGYLLNISDLHFENILCSSNFP-ILIDLETIFHTSIYESKFRNLATKNIE-DKAANSVFATGMLP-ISKKDKKYGGDISGILGGVFNKHERTISN-PNRDDIKFEKRLVR--VKRNDHIPFYME 347
LSVAYTLNLTDLHFENVISQGENPCI-IDLETMFNMPMFVKDYKNE-SRNIINGKIMDSVSTGMLPVLGI-DSLFGGDPGSGILGGTFSKEERVIINPF-RDDIKFQKIVVRSVFKD--HIPFFNN 351
** * ** * ** *      * * * ** *      *      * * * * *      *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

ND-KKRRFS-PEVFIEDIQEGF--KGYELFLNNRKE-ILHYIKTSSEVEVRI-LPRSTIEYSVLIAAKSPLYANKRKSFLNKEEYGENLLSDKLINSEIKQIETLSVPYFYTKVQSVS-VKD 466
NNEK--RYCKPKDYVNDIIGFEKT--YKIIIVKNK-EKILGFLKKESSVTCLILF-RNTMEYSVLLNAAKSPVYSNKREEIFEKLSTFNRG-LGNDIIKSEISQINTLSIPYFNCQVDS-NLIKN 469
* * * * *      * * * * *      *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

IKNNTV-HHLLKNPLNVFLEKTQRYSLKDLLF--QCKLIKFSLESQNKLFIDGNNGFINYGYEIVNSDNIDDA---IDNLVSIINNNAVIDEKDGSVNMNLGISKGEEIIFESLSDLYKGLSGIG 586
MDGETIFEHTLT-PFKCFLSKYRRLCVDD--MEQQVKLIRFSIQSQEQLFKDGEQF-SL-YKKQKGS-QEDLLIAINELSSILENNAYIGTSDDTINWMSLGIADNDQILFESLENDIYKGISGIG 589
      * * * * *      *      * * * * *      * * * * *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

IALKYYEINKNLKDM SRLKKILSS-IYSSILS-N-INTNSSKEKDLS--FFNGE-IGKIAF--LYNQIEF-KEN-CDSS---KNYM---KHILGIILSSEFEMNDIAGLPGIISYLY-NQ-E 693
LALLEYEFYFNINTK----KIL-KLIYKN-ISKDFINTNNEPQ---NYGFYV-GLIGEYSFLRK--YEKVFHKTSSCNILKNILKDFTPKQCT---ILPS-DDV---IAGEAGIIY-ISNLNN 695
*** ** *      *** ** *      * * * * *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

I--FSK-ELVIMGDRLLKDLNNTM-----AYYAHGKSGVMVSL-PLYDLTKDKKYLK-FHQEWKENTLKEIGWKDVRQNEETYSVSWCNGVTGQLISRL--VALEIHDKV-KIFDAVNK- 805
YLEY-RDEIDI---L-LKSLSNKKIKLESIAS-YAHGNSGIATAFVHG-YKVTKNEKYL-KIFHELWNLENSSKLRRGWTDSRKVDSSYSQWCHGASGQAIARMEWIT--VN-KTAR--F-LSNS 807
      * *      * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      *

KLMQ-K-EIEELLYLLKEEG-LEQNNFCLCHGVMGNLLVL-NYYQKKFENTNIHLANK-IDSHFYSVANFGLNKGWICGLGNFYSFISMTGISGILYAFI-KYKTKDT-ELGILLPNI- 917
ELIKVKKELGELIDILKKEGMYTD-NFCLCHGILGNLLILNT-YQENFDNKNINLKNEILNNY-YSCVNYGLNKGWICGLGTEFYSYGLMTGISGILYGLI-RQVKQKNNFGVLMYPYVD 922
* * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

```

Fig. 3-3. Amino acid sequence similarity between NukM and LctM.

Asterisks indicate identical amino acid residues. The N-terminal conserved region among LanM is indicated by a dark gray box. The C-terminal conserved regions among LanM and LanC are indicated by light gray boxes. The membrane spanning segment predicted in NukM is indicated by a clear box.

Fig. 3-4. Amino acid sequence similarity between NukT and LctT.

Asterisks indicate identical amino acid residues. The N-terminal conserved regions among LctT, CylT, *etc* are indicated in dark gray boxes. The membrane spanning segments predicted in NukT are indicated by gray boxes. The C-terminal conserved region among LanT is indicated by a light gray box. The Walker motifs A and B are indicated by boxes.

の共通配列を持つクラス IIa および IIb のバクテリオシンの生合成に参与する ABC トランスポーターでも見つかっており、この保存領域が Gly⁻²-Gly (Ala, Ser)⁻¹ 部位でリーダーペプチドを切断するペプチダーゼの機能を果たしていることが報告されている (16)。以上のことから、NukT は合成された nukacin ISK-1 プレカーサーペプチドのリーダーペプチド配列を切断して、活性型の nukacin ISK-1 を菌体外に輸送していると思われた。

nukF, -*E*, -*G* はそれぞれ 291, 250, 245 アミノ酸からなる推定分子量 32.8, 28.8, 28.0 kDa のタンパク質をコードしていた。*nukG* は *nukT* と同様に TTG をメチオニン開始コドンとしており、*nukE* と 4 bp 重複していた。これらと相同性を示すタンパク質は nisin タイプ、lactacin 481 タイプのランチビオティックの自己耐性に参与するタンパク質と相同性を示した。NukF は lactacin 481 の LctF (6)、*Clostridium difficile* において A および B 毒素の生合成に参与する Cdd4(17)、mutacin II の MutF(5)、streptococcin A-FF22 の ScnF (4) 等と高い相同性を示し、これらのアミノ酸配列のマルチプルアライメントを行ったところ、Walker モチーフ A および B は高度に保存されていた (Fig. 3-5)。モチーフ検索を行った結果、N 末端から 31 番目から 209 番目までのアミノ酸が、ABC トランスポーター領域に対応することが明らかとなった。しかし、このタンパク質には細胞膜貫通領域がなく、サブユニットとして機能することが示唆された。Kyte と Doolittle (18) の方法により NukE および NukG の疎水プロットを解析した結果、これらには 6 つの疎水領域が存在していた (Fig. 3-6)。また、これらのアミノ酸配列は互いに類似しており、相同性を調べたところ 20.3% のアミノ酸が完全に一致した。以上から、これらはともに 6 回細胞膜を貫通する膜局在タンパク質であると推察された。epidermin を生産する *Staphylococcus epidermidis* では EpiF, -*E*, -*G* が複合体を形成して

Walker motif A

NukF	M-INNVQTQNLTKKFSYSVDNLSLNGSKEIY	GFLGPNAGAGSTT	MKMLLGLMQPTKGNIKIFNQDISKN-RDEILMHV GALIEEPS	88				
LctF	MHIEKILETKKLSKKFGKEYSVRNLTI	SVKKGDI	GFLGPNAGAGSTT	MKMLLGLLHPTGEVEKVF	GKKLDNSVKNSVLKDV	GCLIEEPS	90	
Cdd4	M-EMI I-RTQRLSKEYNKIFRVK	DIDL	RVPGAVY	GFLGPNAGAGSTT	LKMLLGLAKPTQGNINIL	GKELNEKNRISILKD	IGSLIESPS	88
MutF	M-TKPLLSINNLSKSGFNQKVLDHLNMTIS	PGEIY	GFLGVNGAGAGSTAM	KIILGL-LPKDSGEI	VALGRPLPENRSQIL	PEIGALIEEPA	88	
ScnF	M-KNAI-ELRKLSKVYQDITTV	DLEKITV	REGEIY	GFLGPNAGAGSTT	MKMLLSLVSPTLGEIL	INGEDIKG-NH-AYLRVIGSMIEEPS	86	
	* . . *. *	****.*****.*.***.*						

Walker motif B

	YYKNLTGLENLQVIQRLNLP	SKNVKEALKIVRL--TEHKDKLV	KNYS	SGMKQRLGIALAIVKFPKIL	LILDEPTNGLD	PSGIEIRELIK	176		
	FYPNLSGLENLKL	VQKLLNLPYHNIEKVLNIVKL--EDQKNKL	VKNYS	SGMKQRLGIALALIKFPKIL	LILDEPTNGLD	PTGIREIRELIK	178		
	YYGHLTGLENMTIMQRLDL	PKKNVNEALKIVRL-ENQKNK	-VSQYSL	SGMKQRLGIAMAIMKFPKIL	LILDEPTNGLD	PAGIEEIRELIK	176		
	FYPNLTG	FENLQLIQELANLPKDN	IKVMEATGI--YAKDKLV	RNYS	SGMKQRLGISMALIKFPKIL	LILDEPTNGLD	PDGIHQMRQLIR	176	
	YYPNL	TGYENLLVFQKMVG	FDESNIWPTLALVGLAEENN	RRKKLV	KAYSL	SGMKQRLALAFALVKKPKIL	LLDEPTNGLD	PAGIHEIRELIV	176
	.*..*.*.*.*. *	 *		. *.*..*****...	*. *.*.*.*****	** ..*.*.*.			

	SFPKTYGMTVL	ISSHLLSEIEHMANTVGI	INRGKL-LFEGKLTELEE	QNKILI-NTN	NNSSEINLLQSKGYNL--ENNEKPL-LLD	TTQK	261
	SLPEKYGITVL	ISSHLLSEIEQIANTVAI	IKKGEL-LYEGELSKLEE	QIFEI-QTN	LINQSFEVLQGLGYTVK-QQ	SNDTIQIMNSDLN	265
	SLPEKYGMTVL	ISSHLLSEIDQIATSIGI	INHGEL-VFQDSIKELHNR	QGSQIAIKTKNVVSAQKLL	NTKGYMSL-IDQGYLT	IENLKDS	264
	SLPQKF	NMTILISSHILSEIENLADTVGI	IKDGHLIYEGGINQLLNQE	QYQLKVN	NLEKAAQIIQHYDNKIGIVK	NDDILLISLPDCT	266
	KLAK	EGLTVFISSQILSEIEHIADRVGI	INHGR-LVYEGEIEA	KSN	TWIEIGGDFSQNNIVQSLINYGQ	VEVLGASASHVKFNIDND	265
	*	*****.****.	* ..**.	* *			

	DISTAVKLLVNNKFEIYQVQSVQKSLEENL-----	291
	KRAAAIEALVSQIKIYEAKSVTKNLEQVFIEMTSDLERKF	306
	DVAKINGMLVHSNIDVFRIEEHKKSLIEDIFLEL---LVRR-	301
	LVPDLIAQLVYNELQIYEIYGVKKTLESVFLDLTKE----	302
	KLADVGTYLIENDYRIFRVVRESENLEDIF-PL---FN---	299

*. . . . *

Fig. 3-5. Similarities among NukF, LctF, Cdd4, MutF and ScnF.

Asterisks and dots indicate identical amino acid residues and similar amino acid residues in all five proteins, respectively. The Walker motifs A and B are indicated by boxes.

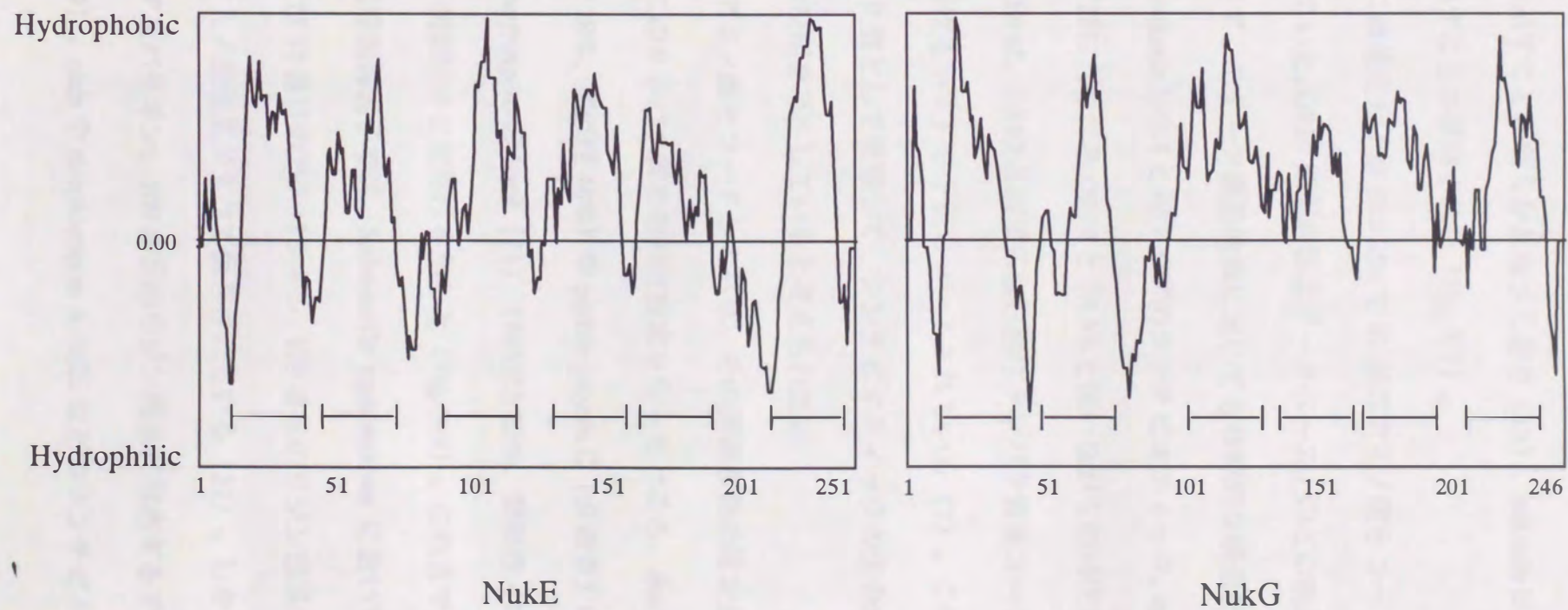


Fig. 3-6. Hydrophobicity profiles of NukE and NukG.

Bars indicate the hydrophobic segments proposed to be membrane-spanning site.

細胞膜に局在しており、細胞膜へ侵入してきた epidermin を細胞壁側へ押し出すことで自己耐性を示すことが明らかとなっており (19)、nukacin ISK-1 でも同様の機構で自己耐性を示すことが推察された (Fig. 3-7)。

nukG の下流には推定分子量 10.6 kDa で 92 個のアミノ酸をコードすると推定される ORF7 が位置していた。ORF7 翻訳産物はデータベース上のどの既知タンパク質とも高い相同性を示さず、モチーフ構造検索においても特徴的な構造を有していなかった。しかしながら、nukacin ISK-1 と同タイプのランチビオティック、butyrovibriocin OR79A の生合成遺伝子群に含まれる ORF4 と 28.3% と低いながら相同性を示した (7) (Fig. 3-8)。この ORF4 は、ORF7 と同様に自己耐性タンパク質をコードする ORF3 (*nukG*, *lctG* などと相同性を示す) の下流にコードされている (7)。このようなことから、ORF7 はタンパク質として発現して、ランチビオティックの生合成あるいは自己耐性機構に何らかの役割を果たしていると考えられた。

ORF1 は 247 アミノ酸をコードしており、その翻訳産物の推定分子量は 28.8 kDa であった (3)。このタンパク質の相同性検索を行ったところ、*Bacillus subtilis* の LytT (20) (相同性 28%、類似性 48%) や perfringolysin O (θ 毒素) の発現調節因子である *Clostridium perfringens* の VirR (21) (相同性 23%、類似性 44%) など種々の 2 成分調節系の転写制御因子と相同性を示した (Fig. 3-9)。これまでに報告されている 2 成分調節系の転写制御因子では、*Salmonella typhimurium* において走化性に関与する CheY の 13 および 57 番目のアスパラギン、109 番目のリジン残基のようにリン酸基の受容に必要なアミノ酸残基がすべて保存されている (22)。しかし、ORF1 翻訳産物では 57 番目のアスパラギン、109 番目のリジン残基に対応するアミノ酸が見られなかった (Fig. 3-9)。nisin や streptococcin A-FF22 などのランチビオティックではその

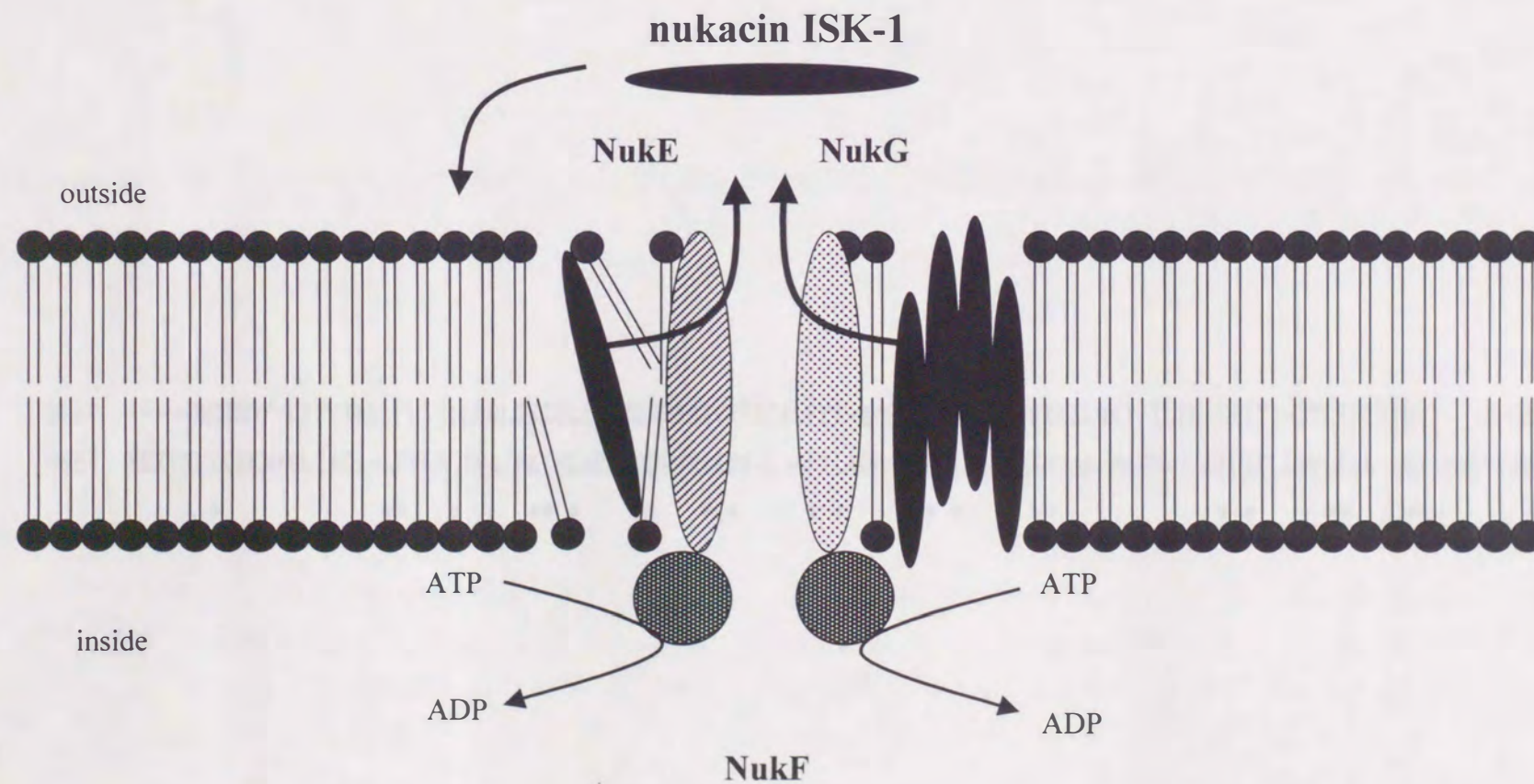


Fig. 3-7. Proposed self-protection model for nukacin ISK-1 by NukEFG.

The model shows the NukE and NukG proteins situated within the cytoplasmic membrane and NukF dimer bound to the complex at the cytoplasmic side of the membrane and harbouring the ATPase binding site.

ORF7 ----MKRKDY-LFFVIALPLISLLQLTKISLIHNYQSFFSIVNIICILFT^I-AysiILVIN-SK-KKNNLQKT-ILIL-SIIYI-LTLIFISFGVI---I---NMFN 92
 ORF4 MEKTNVKKIENMGLIACI-LPVLALVPAIFK^IHLAPAVQSVWGIANV-L--FV AGF-V-LTITALRMKKT-R-NAVNI- ASCICLLWVLILL--GVI VVVVVSNM-- 96

* ** * *** ** * * * * * * * * * * * * * *

Fig. 3-8. Amino acid sequence similarity between ORF7 of *S. warneri* ISK-1 and ORF4 of *Butyrivibrio fibrisolvens* OR79A.
 Asterisks indicate identical amino acid residues.

ORF1 product	MKKINAI IIDDNASTREDLKVNSYFS-FVSCKGTSEYIE-A-KNTLD-KKDIDLIFLKIN-TNNKFIDIANNINSIHKH-IQIVFLS	84
LytT	MLRV--LIVDDEMLARDELAYLLKRTNDEMEIN-E-AENIESAFDQMD-QKP-DLLFLDVDLSGENGF-DIAKRLKKM-KHPPAIVFAT	82
VirR	MFSI-A-LCEDNSLQREELKNNLSKVLDEIGVEYKLL-TFETGEDLLREYPENLDMLFLDIQMGELTG-METARKVRKYD-DKVEIIFIT	85
	* * . . * . * . * * * * *	
	SDSKHAHKSFEAHPFDYLIQVPEPIKLEKCLLHFKNRCRK--KFDLN-NLKNRKIAIKKGKSLYFLEI-DKI--TTAECCGRKIIITLDD	168
	AYDQYALKA FEVDALDYLT KPFDEERIQQTLKKYKKVNRDIVETE QNSHAGQHLALS VGESIVIVDTKDIIY-AGTE-DGHVNVKTFDH	170
	ALWDYIQKGYEVRAFRLIKPVKFELQEQV-TA-CVE-NILHKRY-T-YITIK---DK-NNVLKIRTEDILFLETFE-R-KVIIHTNSQ	164
	. . . * . * . . . * . * * * *	
	KETVSYNGSLKYLEKKLYSYGFILVSRSLIPLKSIKNI-I-FDKHSCYILKSIKNNTVKITPEK-Y-KKVKQTLSE--FNWII	247
	SYTVS-D-TLVVIEKKLPDSDFIRVHRSFVVNTEYIKEIQPWF--NST-YNL-IMKDGS-KIPVSRTYAKELKK-L----LH--I	241
	DYIVK-MS-MNKLEKELNNKGFFR-CHT-SYIVNLIK-IEE-I-K-KD-YLL-INK-FTLPVSKHR--MKNLKLRLTSLGDLIC	236
	. . * * . * . * . * * * *	

Fig. 3-9. Amino acid sequence similarity among ORF1 product, LytT of *Bacillus subtilis*, and VirR of *Clostridium perfringens*.

Asterisks and single dots indicate identical amino acid residues and similar amino acid residues, respectively. The conserved amino acid residues among response regulatory proteins are indicated by shaded boxes.

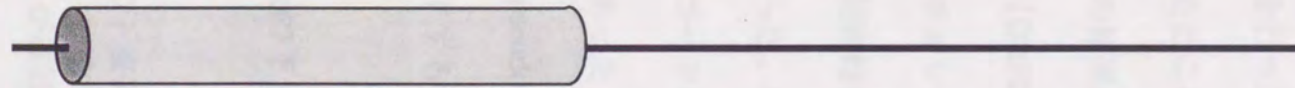
生合成遺伝子群の転写調節にはヒスチジンキナーゼと転写制御因子から構成される 2 成分調節系により正に調節されている (1,2)。これらに含まれる転写制御因子、それぞれ NisR (23) および ScnR (4) は N 末端領域にリン酸基受容部位、C 末端領域に DNA 結合部位を有している (Fig. 3-10)。また、epidermin や mutacin II などのランチビオティックでは、他のタイプの転写制御因子、それぞれ EpiQ (24) および MutR (5) が存在している。しかし、これらの転写制御因子は N 末端側のリン酸基受容部位を有しておらず、その調節の様式からも 2 成分調節系による転写調節ではないと考えられる (Fig. 3-10)。一方、ORF1 の翻訳産物のモチーフ検索を行ったところ、ORF1 翻訳産物の N 末端領域の 112 個のアミノ酸配列 (N 末端から 4 から 115 番目まで) はリン酸基受容部位と高い相同性を示した。しかし、LytT や VirR と同様に、本翻訳産物は C 末端側の DNA 結合部位を有していなかった (Fig. 3-10)。なお、DNA 結合部位を欠く VirR は転写制御因子として働くことが報告されている (21)。さらに、*S. aureus* の α および γ 毒素遺伝子の制御を行う AgrA も ORF1 翻訳産物と同様のモチーフ構造を有すが、標的遺伝子のプロモーター領域に結合することなく、その転写を活性化する事が報告されている (25)。以上のことから、ORF1 の機能は未だ不明であり、今後さらに分子生物学的手法を用いた ORF1 の機能解析が必要である。

3-3-3 ORF1 下流領域の DNA 断片のクローニング

通常、2 成分調節系に含まれるヒスチジンキナーゼおよび転写制御因子をコードする遺伝子是对をなして位置している (1,2)。このことから、ORF1 が転写制御因子をコードしていれば、その下流にヒスチジンキナーゼがコードされている可能性が高い

ORF1 product; 247 aa (nukacin ISK-1; *Staphylococcus warneri*)

Response regulator receiver domain



NisR; 229 aa (nisin; *Lactococcus lactis*)

ScnR; 231 aa (streptococcin A-FF22; *Streptococcus pyogenes*)

Response regulator receiver domain

Transcriptional regulator domain



EpiQ; 205 aa (epidermin; *Staphylococcus epidermidis*)

MutR; 287 aa (mutacin II; *Streptococcus mutans*)

Transcriptional regulator domain

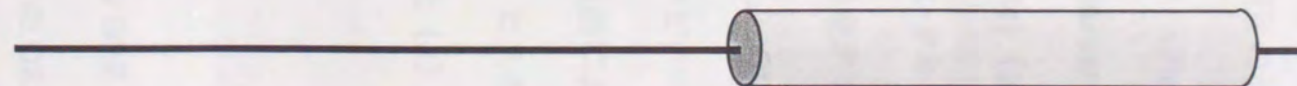


Fig. 3-10. Predicted motifs of ORF1 product and other transcriptional regulators found in lantibiotics.

と考えられる。そこで、3.6-kb *Hind*III 断片の ORF1 下流に位置する 0.2-kb *Hind*III-*Eco*RI 断片をアガロースゲルから抽出し、これをプローブとして *S. warneri* ISK-1 のトータル DNA ライブラリーから ORF1 下流領域を含む DNA 断片を有す形質転換菌のスクリーニングを行った。その結果、3.6-kb *Eco*RI 断片を得た。本 DNA 断片の塩基配列の決定を行ったところ、5つの ORF が存在する事が明らかとなった (3) (Fig. 3-11)。相同性検索の結果、これらの ORF の推定アミノ酸配列は *Staphylococcus aureus* のリコンビナーゼ (ORF2, 3) (26)、*S. aureus* の DNA-インベルターゼ (ORF4) (27)、*Bacillus subtilis* のチオレドキシン (ORF5) (28)、*Arabidopsis thaliana* のチオレドキシン (ORF6) (29) と相同性を示した。ORF2 と ORF3 は、N 末端から 78 個の推定アミノ酸は全く同一であった。しかし、ORF2 が 78 アミノ酸をコードするのに対し、ORF3 は 202 アミノ酸をコードしており、ORF3 のアミノ酸数は *S. aureus* のリコンビナーゼのそれと同じ数であった (26)。従って、ORF2 は遺伝子組み換えなどの理由により、機能していない pseudo 遺伝子に変異していると推察された。このように、ヒスチジンキナーゼをコードすると思われる遺伝子はこの領域には見つからなかった (3)。

3-3-4 ORF7 下流領域の塩基配列の解析

ORF7 の下流領域の塩基配列の決定を行った結果、さらに 2 つの ORF (ORF8 および ORF9) が確認された (Fig. 3-2)。ORF8 は *Staphylococcus simulans* の ORF2 と、ORF9 は *S. simulans* の ORF1 とそれぞれ高い相同性を示した。これらの機能は明らかになっていないが、*S. simulans* ORF2 および ORF1 はそれぞれ細胞壁溶解酵素である lysostaphin およびその自己耐性因子をコードすると推察されている (30)。しかしながら、ORF1, 2 がそれぞれ 168, 69 アミノ酸をコードするのに対し、*S. warneri* ISK-1

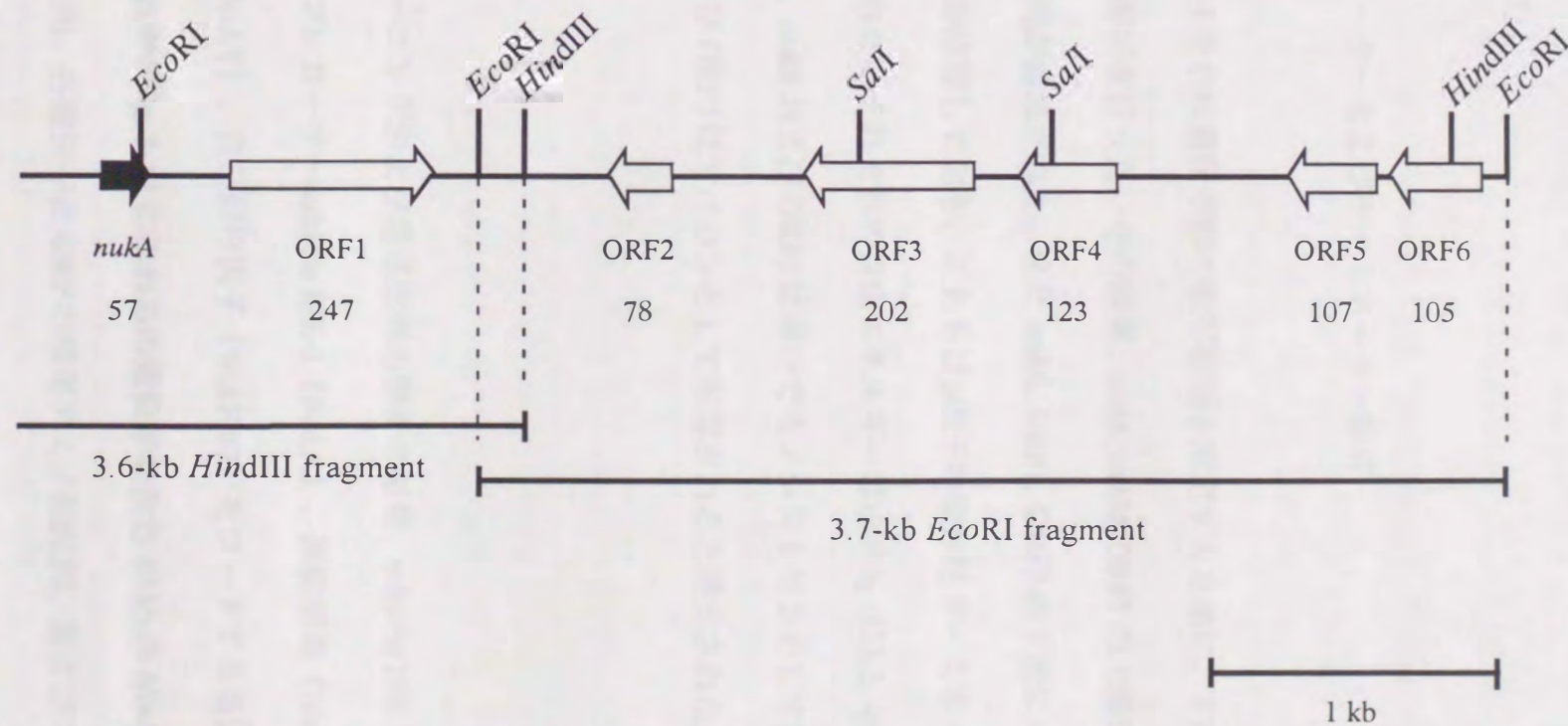


Fig. 3-11. Restriction map of the 3.7-kb *EcoRI* fragment downstream of ORF1 and the organization of ORFs.
The numbers of amino acid residues within each encoded putative protein are shown below the corresponding ORFs.

の ORF9, ORF8 はそれぞれ 60, 39 アミノ酸しかコードしていなかった。以上の結果から、ORF8, ORF9 は遺伝子として機能しておらず、nukacin ISK-1 の生合成に関与しないと推察された。

3-3-5 プロモーターおよびターミネーター解析

nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の転写領域を推定するために、プロモーターおよびターミネーター解析を行った。その結果、*nukA*, *nukM*, ORF1 の上流にいくつかのプロモーター様の配列が確認された。また *nukA*, ORF1, ORF7 の下流にそれぞれ 1 つずつ逆方向反復配列が位置しており、これらは ρ 因子非依存性ターミネーター (31) として働くと推察された。それぞれの自由エネルギーは -105.6 , -123.2 , $-89.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。これより、*nukA* および ORF1 は単一でモノシストロンとして転写され、*nukM*, *-T*, *-F*, *-E*, *-G* および ORF7 はオペロンとして転写されると推察された。

3-4 小括

遺伝子クローニングおよび塩基配列の解析の結果、nukacin ISK-1 生合成遺伝子群は少なくとも、プレカーサーnukacin ISK-1 (NukA)、修飾酵素 (NukM)、ABC トランスポーター (NukT)、自己耐性因子 (NukFEG) をコードする遺伝子から構成されることが確認された。Fig. 3-12 にこれらの遺伝子を含む 10 kb の *HindIII*-*EcoRI* 領域 (Fig. 3-1) の塩基配列、各遺伝子と ORF の推定アミノ酸配列、およびプロモーターとターミネーターの配列を示す。これらは、現在までに報告されている lacticin 481 タイプのランチビオティック全てに共通する遺伝子であるが、ORF1 および ORF7 が存在する

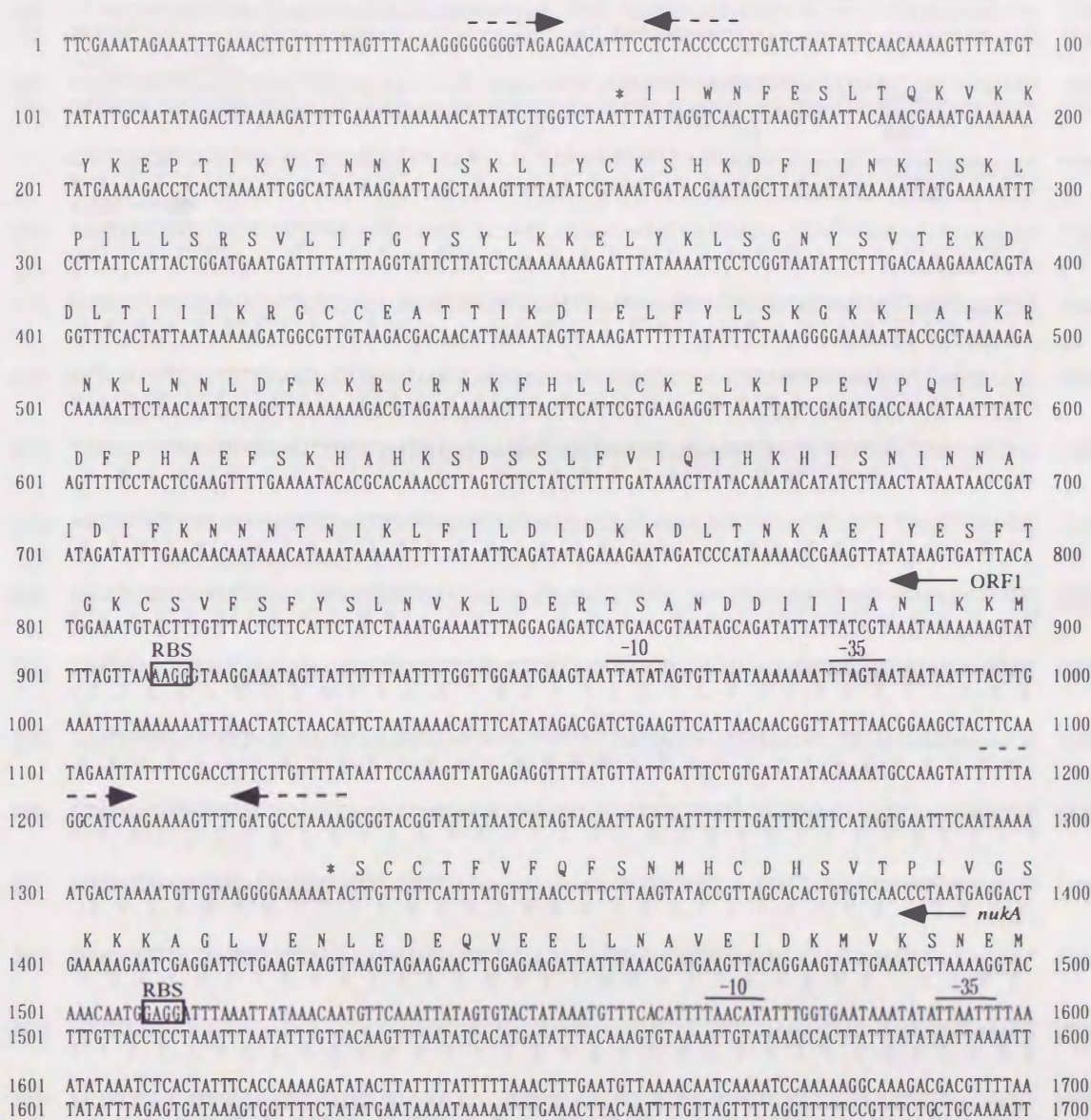


Fig. 3-12. Nucleotide sequence of 10-kb *HindIII-EcoRI* region containing nukacin ISK-1 biosynthesis genes and the deduced amino acid sequences.

The nucleotide sequence was shown in the 3' to 5' direction from 1 to 1500 and 9601 to 9957 while from 1501 to 1900 and 9501 to 9600, the sequence was shown in both directions. The putative ribosome binding sites are boxed and indicated by RBS. The putative promoter sequences (-35 and -10) are underlined. Termination codons are indicated by asterisks. The vertical arrow indicates cleavage site of the propeptide to form active nukacin ISK-1. The horizontal dashed arrows below the nucleotide sequence indicate putative transcriptional terminators.

1701 ATAGAACATCATACTCCAATCTAATGGTTATAATCTTCATTTTCGCTTTAACATCGTTTCGATCAATAAAAAATTTGTGACATTTTCTCCTTACAAGTATGT 1800
 1701 TATCTTGTAGTATGAGGTTAGATTACCAATATTAGAAGTAAAGCGAAATTTAGCAAGCTAGTTATTTTATAACACTGTAAAAGAGGAATGTTCATACA 1800
 1801 GTAGTTTTGATTAAAGTTTGCAGCTTTTCTATACAATTTTCGTTTAAATATATTACGCAATATACTTAATACTATCAATTATTATCCTCTACTATAATTGA 1900
 1801 CATCAAACTAATTTCAAACGTCGAAAAGATATGTTAAAGCAAATTTATATAATGCGTTATATGAATTATGATAGTTAATAATAGGAGTGTATATTA 1900
 1901 ATGAACAACATTAAAGTTGAACAATTTAGAGGATTTTCAAATTTTATTTAAAAAAATACTCTAAACAAGAACTTAACACATTAAATTGATTGGAACACT 2000
 M N N I K V E Q F R G F S N F I L K K Y S K Q E L N T L I D W N Y L
 nukM →
 2001 TAAGATCTATTATTCTAGATATTTGTGGAATCATTGATTGTTTAAATTAATGAAAAAGATTAAACAAAAAACTCAATGGAATACTCCTGAAGAACG 2100
 R S I I L D I C G K S L I V L I N E K R L N K K L N G N T P E E R
 2101 CTATAATATTTTGTGGAAGATTATGTGAAAAAGGATTATATGAAGAGTTAAATAAAAGTTATCCATCAATAATAATGATTTAGAGCAAACTTTA 2200
 Y K Y F D E E L C E K G I I Y E E L N K S Y P S I I N D L E Q T L
 2201 AACTCATATTTTTCGTTTTGAAAAGAAATCGAAAATAAATCAATCAAGAAAAAGAACTTTTGAAGCCAATTAAATAAAACTGAAAAAGAAACGA 2300
 N S Y F S F L K E I E N K F N Q E K K K L L E A N L I K T E K E T I
 2301 TTTGTATATCAGTATTTTAGGAGATTACATGGAGGTAAAGCGGTGACTAAAGTAACCACTGATAAATCTCAATTATTATATAAACTAGGTCATTAGA 2400
 C H I S I L G D L H G G K A V T K V T T D K S Q L L Y K P R S L E
 2401 AAATGATAGTTTCTTTTGAAGATTCTAGAATTTATGTACAGTTTCAAAAAAATGAAATATCAACATACTATAAGTATAAATTCATAGATTATAAGAC 2500
 N D S F F L E F L E F M Y S F Q K N E I S T Y Y K Y K F I D Y K D
 2501 CACGGTTGGATGGAATATAGAAAAGCAACCTACCTCTAAAAATAAAATAATATGTATTACAAAAGATTGGGATATTTATTGTCTATAGGATATTTAT 2600
 H G W M E Y I E K Q P T S K N K I N M Y Y K R L G Y L L S I G Y L L
 2601 TAAATATAAGTGATTTACATTTGAAAAATATACTGTGTTCCAGTAATTTTCCAATTAATTGATTTAGAACTATATTTATACGTCATATATGAATC 2700
 N I S D L H F E N I L C S S N F P I L I D L E T I F H T S I Y E S
 2701 AAAATTTGTAATTTAGCTACAAAAGATATAGAAGATAAAGCTGCTAATTCTGTATTGCTACCGGAATGTTACCGATATCCAAAAAGACAAAAATAC 2800
 K F R N L A T K N I E D K A A N S V F A T G M L P I S K K D K K Y
 2801 GGTGGAGATATAAGTGAATATTAGGTGAGTATTTAATAAACACGAAAGAACTATAAGTAATCCTAATAGAGATGATATAAAATTCGAAAAGAGATTAG 2900
 G G D I S G I L G G V F N K H E R T I S N P N R D D I K F E K R L V
 2901 TAAGAGTTAAAAGAAATGATCATATCCCATTTTATATGAAAAATGATAAAAAAGGAGATTTTCTCCGAAATTTTATAGAAGATTTCAAGAAGGCTT 3000
 R V K R N D H I P F Y M E N D K K R R F S P E V F I E D I Q E G F
 3001 TAAATATGGTACGAATTTTCTTAACAATAGAAAAGAAATACTACATTATATAAGAAAACGTCATCAGAAGTAGAAGTGAGAATTTTACCAAGAAGT 3100
 K Y G Y E L F L N N R K E I L H Y I K K T S S E V E V R I L P R S
 3101 ACAATTGAGTACTCAGTATTAATACAAGCTGCTAAATCACTCTTTATGCAATAAGCGAAAGAGCTTGTAAACAACTAGAAGAGTACGGTGAATTT 3200
 T I E Y S V L I Q A A K S P L Y A N K R K S L F N K L E E Y G E N L
 3201 TATTAAGTGATAAGTTAATAAATTCAGAAATAAAACAAATAGAACTCTTTTACGTACCTATTTTATACTAAGGTCCAAGTGTTCGGTAAAAGATAT 3300
 L S D K L I N S E I K Q I E T L S V P Y F Y T K V Q S V S V K D I
 3301 TAAAAATAATACGGTACATCACTTATTGAAAAACCACTCAATGATTTTTAGAAAAACGCAAGATATTCTTTGAAAGATTGTTGTTTCAATGTAAA 3400
 K N N T V H H L L K N P L N V F L E K T Q R Y S L K D L L F Q C K
 3401 CTAATAAAATTTTCATTAGAAAGTCAAAATAAATTTATTGATGGTAATGGATTATAAATTTATGGATATGAAATAGTAAATTCAGACAATATTGACG 3500
 L I K F S L E S Q N K L F I D G N G F I N Y G Y E I V N S D N I D D
 3501 ATGCAATCGACAATTTAGTAAGCATTATAATTAATATGCAATCATAGATGAAAAAGATGGTTCTGTAATTTGGATGAATTTAGGCATATCAAAAGGAGA 3600
 A I D N L V S I I I N N A V I D E K D G S V N W M N L G I S K G E
 3601 AGAAATAATATTTGAAAGCTTGTGAGATGACTTATATAAGGATTGTGAGGAATAGGAATAGCTTTATTAATAATTTATGAAATTAACAAAACTTAAAA 3700
 E I I F E S L S D D L Y K G L S G I G I A L L K Y Y E I N K N L K

Fig. 3-12-Continued.

3701 GATATGAGTAGACTAAAAAATACTAAGCAGTATTTATTCTTCTATATTAAGTAATATAAACTAATTCTAGTAAAGAAAAGGATTTATCTTTTITA 3800
D M S R L K K I L S S I Y S S I L S N I N T N S S K E K D L S F F N

3801 ATGGTGAAATAGGTAAATCGCATTTTATATAATTACCAGATTGAATTTAAAGAAAATTGCGACAGCAGTAAAAATTATATGAAACATATTTTAGGGAT 3900
G E I G K I A F L Y N Y Q I E F K E N C D S S K N Y M K H I L G I

3901 CATTTTATCTAGTGAATTTGAAATGAATGACATTATAGCCGGATTACCAGGAATTTTCATATTTATATAATCAAGAAATATTTCTAAAGAACTTGTA 4000
I L S S E F E M N D I I A G L P G I I S Y L Y N Q E I F S K E L V

4001 ATAATGGGAGATAGACTATTAAGAACTTAGACAATAATCCAATATGGCCTACTACGCTCAGGTAAGTGGGGTAATGGTTTCATTATTATATTTAT 4100
I M G D R L L K D L D N N P T M A Y Y A H G K S G V M V S L L Y L Y

4101 ATGATTTAACTAAAGACAAAAAGTATCTAGTTAAATCCATCAGGAATGAAAAAGAAAACACATTAATTTGGAATAGGATGGAAGATGTAAGACA 4200
D L T K D K K Y L V K F H Q E W K K E N T L K L E I G W K D V R Q

4201 AAATGAAGAAACCTACTCTGTATCATGGTGTACGGAGTTACAGGACAGTTAATAAGTAGACTAGTTGCTTTAGAAATTCATGATAAAGTAAAAATATT 4300
N E E T Y S V S W C N G V T G Q L I S R L V A L E I H D K V K I F

4301 GATGCTGTAATAAAAAAGTTAATGCAAAAAGAAATTGAAGAATTACTTTATTTATTGAAAGAAGAGATTAGAACAAAATAATTTTGCCTATGTCATG 4400
D A V N K K L M Q K E I E E L L Y L L K E E G L E Q N N F C L C H G

4401 GCGTCATGGGAAATTTACTGGTTTTAAATTAATCTCAAAAAAATTTGAAATACAAACATTCATTTAGCCAATAAAATAGACAGTCATTTTATTCAGT 4500
V M G N L L V L N Y Y Q K K F E N T N I H L A N K I D S H F Y S V

4501 AGCTAATTTTGGTTTAAATAAAGGATGGATATGTGGCTTAGGAAATAACTTTTACTCTTTTAGCATTATGACAGGAATATCAGGTATTTATATGCTTTT 4600
A N F G L N K G W I C G L G N N F Y S F S I M T G I S G I L Y A F

4601 TTAAGTATAAACTAAGGATACTGAATTAGGTATATTGTTACCAACATTTAGTTTGGAAAGGTGATGACAATTGAAAATCGCATTACAAAATAGTG 4700
L K Y K T K D T E L G I L L P N I * RBS L K I A L Q N S D
nukT →

4701 ACCAAGACTGTCTATTAGCGTGTATTCAATGATTTTGAGTTATTTTGGTAAAAATGTATCTATAAATAGTCTTTACAAAAGAGAGATGATACCACTGA 4800
Q D C L L A C Y S M I L S Y F G K N V S I N S L Y K R E M I P P D

4801 TGGTCTATCAATATCTTATTTGAAAGAATTAAATATTAAGTACGAACCTAATATGAAAGTATATAGAATTAAAGATAAAGAAAAACATTCAGGTAATA 4900
G L S I S Y L K E L N I K Y E L N M K V Y R I K D K E K T F R V I

4901 AGTAAATAAAGAAACCAATAATTGTCATTTGGGATTTAAATCATTTTGTATAGTAAAAACGTTAAAAAACCATATAGAAATAGTCAACCCAGAGA 5000
S K I K K P I I V H W D L N H F V I V K N V K K N H I E I V N P E I

5001 TAGGAAAAGTAAAAATTTCAAAGAGATGTTTTGGAACATTTTCAAATGTTCTATTAATGTTTGATCCTAAGAGCGATTTTCAAAGGATAAAGAAA 5100
G K V K I S K E M F L E H F S N V L L M F D P K S D F P K D K E K

5101 AATTGAGTTCTTTGACGATTTAAAAAGTGTTTAATGATTAATAACATAATCTTTTTTTCATTTTCAGTGATGTTAGCTCAAATTGTAGCTCTAATTTT 5200
I E F F D D L K S V L M I K N I I L F S F S V M L A Q I V A L I F

5201 TCAATAGTTGTTAGAGATATAATAAATCAAAAATATACATACCTAATATCATTATCAATGCTATTAATGATGATTATTATCAAAATATTTCTTTAGTTT 5300
S I V V R D I I N Q K Y T Y L I S L S M L L M M I I I Q I F S L V F

5301 TTAAGCAAAAGCTCAAATTAAGAGAATAAATATATGAAAAAATCATTTCTTATACATGTTTGAAGGATTATTAACAAGCCCTTATTATACTTTAG 5400
K Q K A Q I K E N K I Y E K I I S Y N M F E G L F N K P L L Y F R

5401 AAATAGCACAATAGGTACTTTGATGAAAAAGATAAATAAAGACTACTATAAGGGACAACACTGCTTAAATATTGCCATCATTCTTAACTTCTTT 5500
N S T I G T L M E K I N I K T T I R D N I L L K I L P S F L N F F

5501 TCCGTTACGGTATTGTTTATATATTGTTAACTGTATCACTGCTATTATCATTATTACTTTTAGGTATGTCCATTATATATTGTTAATCAGTGTGTTTA 5600
S V T V L F I Y L L T V S L L L S L L L L G M S I I Y L L I S V F I

5601 TATATATAAAGAAAAATCAATTGAATATTGAGTATATGCAGAGAACTATACAATTTAGTTCTTTAGCTCAAGAATCATTAAAGTCAAATGATCAAATTA 5700
Y I K K N Q L N I E Y M Q R T I Q F S S L A Q E S L S Q I D Q I K

Fig. 3-12-Continued.

5701 GGCCCAAGCTCAAGAATCATCAACAATAAATAACTGGAAAGAAAAAGTTGGAATATAGTTAACTCTTATAATTCAATTTTGAAAATTGAAGGATTATCA 5800
A Q A Q E S S T I N N W K E K S W N I V N S Y N S I L K I E G L S

5801 TATACTTTTAATCAAAATTTTCAATTACAGTAGCATAATACTTTTAATGATTTTGGTATTCATCTTACAAAATACGGGAATATAACCATAGCAGATTTAA 5900
Y T F N Q I F N Y S S I I L L M I F G I H L T K Y G N I T I A D L I

5901 TCTTATTTCAAACCGGTATGTCTATATTTAGTTTCATCTGTTTCACTACAAGACATTACGTTTGAATATCAAAAATTAAAGTGTCCGGCGAGAAAAAT 6000
L F Q T G M S I F S F I C S Q L Q D I T F E I S K I K V S G E K I

6001 CAATGACTTATTTTTAAAAATAATACTAAAAGAAAAGTAATCGAGCAGAAATCTAATAATGCTTTTATCACTTAAGAATGTTACTTTTGGTTTGTATGAA 6100
N D L F L K N N T K R K V I E Q K S N N A L S L K N V T F G F D E

6101 AAAGCCCTATATTGAAAAACATTACTTTCCAAGTAAAAAGGTGAAAAAGTAGCTATAGTAGGAGACTCCGGATCAGGTAAAAAGTACTATGTTAAATG 6200
K A P I L K N I T F Q V K K G E K V A I V G D S G S G K S T M L N V

6201 TTCTGTTAGGTCTCTATACATGTGATGGTGAAGTAGTTTACGGTTATAGAGATTTTGGAAAAATAACAGGGGTCTCTTACAGAATATGACGTTAAGTAA 6300
L L G L Y T C D G E V V Y G Y R D F R K I T G V V L Q N M T L S K

6301 ACAATCTATTTATAATAATTTGGTGGATGAAGGAAATGATAGCAATATGCAAAAATTAAACCAATACTATACGATGTTAATATTATAAACTTGATAAAT 6400
Q S I Y N N L V D E G N D S N M Q K L N Q I L Y D V N I I N L I N

6401 TCTTACCTAATAAAATATATTCTAGTGTATTTCAAAATGAAAAATCTATCTGGTGGTCAAATTCAAAGGCTATTAAATGCTAAATCTCTATTTAATA 6500
S L P N K I Y S S V F Q N G K N L S G G Q I Q R L L I A K S L F N K

6501 AAAAATAATTTTTGGGATGAAGCTTTTAGCAGTTTGGACAATTACAATCGTATAAATATATAGAAATGTTTTGAAAAATAGTCAATATAGCGATAA 6600
K L I F W D E A F S S L D N Y N R I N I Y R N V L K N S Q Y S D K

6601 AACTATAGTACTCATAAGTCACCATCTAGATGTTTATCATATGTGACAAAAGTAATGTTTATTGAAAACGGAAACGCTTTTTTGAACACATAATGAA 6700
T I V L I S H H L D V L S Y V D K V M F I E N G N A F F G T H N E

6701 TTAATTAATAAATAAATAATATAGAAGATTCTTAGATACTGCCAATACTAATAATTAACGAGTTCAATTATGATTAACAATATTGTACAAACCCAAA 6800
L I K N N K N Y R R F L D T A N T N N * RBS M I N N I V Q T Q N
nukF →

6801 ATTTAACAAAAAGTTTTCAGATAGTTATTCAGTAGACAATCTATCACTAAATATTGGTTCGAAAGAAATATATGGATTTTATAGGTCCAAATGGTGCTGG 6900
L T K K F S D S Y S V D N L S L N I G S K E I Y G F L G P N G A G

6901 TAAAAGTACTACAATGAAATGTTACTAGGTCTCATGCAACCACTAAAGGTAATATTAATAATTCAATCAAGATATTTCAAAAAATAGAGATGAGATA 7000
K S T T M K M L L G L M Q P T K G N I K I F N Q D I S K N R D E I

7001 TTAATGCATGTAGGGGCATTAATTGAAGAACCTTCTTATTATAAAAAATTAAGTGGTTAGAAAATTTGCAAGTTATTCAAAGATTACTAACTTACCTT 7100
L M H V G A L I E E P S Y Y K N L T G L E N L Q V I Q R L L N L P S

7101 CTAAAAATGTTAAAGAAGCTCTGAAAATGTACGTTTAACTGAACACAAGGATAAATTAGTCAAAAATTATTCATTAGGTATGAAACAAAGGTTAGGTAT 7200
K N V K E A L K I V R L T E H K D K L V K N Y S L G M K Q R L G I

7201 TGCTTTAGCTATAGTAAATTTCCAAAATATTGATATTAGATGAACCTACTAACGGCTTAGATCCTTCTGGTATACAAGAAATTAGAGAATTAATAAAA 7300
A L A I V K F P K L L I L D E P T N G L D P S G I Q E I R E L I K

7301 TCTTTTCCAAAACCTTATGGAATGACTGTACTTATCTAGTCATTTATTATCTGAAATTGAACATATGGCTAATACAGTAGGTATCATCAATAGAGGGA 7400
S F P K T Y G M T V L I S S H L L S E I E H M A N T V G I I N R G K

7401 AACTATTGTTTGAAGGAAAGTTAACAGAATTAGAAGAACAGAACAAAATATTGATAAATACTAACAATAACAGTGAGAGTATAAACTTGCTTCAATCAAA 7500
L L F E G K L T E L E E Q N K I L I N T N N N S E S I N L L Q S K

7501 AGGATATAATCTAGAAAAATGAAAAACCTCTCCTATTAGATACAACCTAAAAAGATATATCTACAGCCGTTAAATTTAGTTAATAATAAGTTCGAA 7600
G Y N L E N N E K P L L L D T T Q K D I S T A V K L L V N N K F E

7601 ATTTACCAAGTACAATCAGTTGAGAAAAGTTTGAAGAAAAATTTATAGAAATACTAATGATGGAAACGAAATTATATAATGTTAAAGCTATAAATTT 7700
I Y Q V Q S V Q K S L E E N L * RBS M L K A I N L
nukE →

Fig. 3-12-Continued.

7701 AGAATTTTCAAATGCGGAGAAGAAAATTTATCCTTCCAATACTACTGATTACCTTTGTTGGTATATTGTGGTTTGTGCTATAGCAATTAAGAGTTA 7800
E F F K M R R R K F I L P I L L I T F V G I L W F C A I A I K E L

7801 AATATTACTGATACAAAGTATGGTATTTATATGCTCATTCTAATATTCTAACTATCGACAGCATGATTATCCAATTAATAGGTATTTATGCTCAA 7900
N I T D T K Y G I Y M L I S N I L T I D S M I Y P I L I G I L C S R

7901 GACTTGCGATATAGAACATCAAGGAAAAACCTTTCAGTTATTAATACTAGTAAACAAAGTGTTCATTTGTTTACTAGTAAAGTTGGTGTTCGCT 8000
L A D I E H Q G K T F Q L L N T S K Q S V F N L F T S K V G V S L

8001 TATTATTTATTTGTAATTGACATTATACAATTAACGACCATTCTACTAATTGCTAATTCACATAATATCAGTTTGAACTAGAAATCATTTCAAAATTC 8100
I I L F V I D I I Q L T T I L L I A N S H N I S L K L E I I S K F

8101 ATGCTAAGTTTATAATTGCTAGTTTCTTCTAATATTAATTCATATGGCAGTTTCTTTCTTTTGGAAAAACAATCAGTTAGCATTGTATCAGCATTAG 8200
M L S F I I A S F F L I L I H M A L S F F F E K Q S V S I V S A L V

8201 TAGGAAGTTTTTAGGATTAGTAACAGGAGGGATGTTGCCTTCATATATTAATAATTTTTGCCTTGGCAATATTATTCATTACTAAATCCAGTTCATAA 8300
G S F L G L V T G G M L P S Y I K I F L P W Q Y Y S L L N P V H K

8301 AAAGATGGTTCACAAAGGATATGAATATTCAAATAATGACTATTATTTTATTTACATTTTATTTCTATTCTAGTAATAGTAATCTTTCTTTATTATT 8400
K M V H K G Y E Y S N N D Y Y F I Y I F I S I L V I V I L F F I I

8401 AAAGCCTTAATAAAAAAGGATTTAAATGATTCTTTTATTAAGCATAGAATTACGCCAACTACAAAATAATTATATTTAATCTTCTATTAGTTTT 8500
K A L I K R R D L N *
RBS L I S L L S I E L R K L Q N N Y I L I F L L V F
nukG →

8501 TAATATATTAAGCGTATCTATAGGAAGTATGATATTTTATTTAATCAAGCGCTTTTCTAATTCAAATAATAGAGATTTAATATTGTGGGGCAAGAA 8600
N I L S V S I G S M I F Y F N Q S A F P N S N N R D L I L W G Q E

8601 ACTTTATATACTTCACAACTTTTCTTCCCTACTGATAGGTGTTTTATGTTCAATAAGTTGGCAATTTGAGGAGTCTAATAATAATGGATGAGAATGA 8700
T L Y T S Q L F F P I L I G V L C S I S W Q F E E S N N N W M R M K

8701 AAACATACTTTTAAAGAAAGTAAAGATGTTTATCAAAATTTTATCTCTTTTCTTACTTACTTAAATCAAATTATATTTTGTATTATTTG 8800
T I P L K E S K I V L S K F L S L F L L T L L N Q I I F F V L F C

8801 TATCTCAGCCTCAATAGTAATGTATCCTTGAAGGATTACTTAAATTTCTATACTGGGACTTTATAGGTTGGATAGGTACAGCATCTATTGTTGCTATA 8900
I S A S I V N V S L E G L L K F L Y W D F I G W I G T A S I V A I

8901 CAATTATATTGTGAGTGGGACTAGAAATTTCACTTTCTCAATTTAATATCAACTATTGGTGGTGTACTAGGTCTTCTAACATTGTTTATTAGCAATT 9000
Q L Y L S V A T R N F T F S I L I S T I G G V L G L L T L F I S N F

9001 TTATTTTAAATATTTCCATATTCACAAATTACAGTTGGTGTGAGAGCCAGATCTTTGATGAACCTCACTTTTTCAGAAATGTTACTTTTCTTATAAT 9100
I F K I F P Y S Q I T V G V R A R S L M N F T F S E M L L F L I I

9101 AAATGAGCTTATATAACAGTTTTTTGACACTTACTACTTTAAAGCTTAAAAAAGAGGATTTAATTTAAATGAAAAAGAAAGACTACTTATTTTT 9200
N V A Y I T V F L T L T T L K L K K R E G * M K R K D Y L F F
RBS ORF7 →

9201 GTAATTGCACTTTTACCTTTAATTAGTTGTTATTACAGTTAACGAAAAATTCCTTATCCATAATTATCAAAGTTTTTCTCTATAGTTAATATCATCT 9300
V I A L L P L I S L L L Q L T K I S L I H N Y Q S F F S I V N I I C

9301 GCATACTTTTACTATTGCTTATTCAATTATTTAGTTATTAATAGCAAGAAAAAGAATAATTTGCAGAAAAACAATCTTATTTTGTCTATTATCTATAT 9400
I L F T I A Y S I I L V I N S K K K N N L Q K T I L I L S I I Y I

9401 ATTAACCTTAATTTTATCTCTTTTGGAGTAATAATTAATATGTTAATTAATAATTTTAAATAGCAAAATACTATCAAAAATTTCCACATAAAAAAG 9500
L T L I F I S F G V I I N M F N * - - - -

9501 AGTGTATTTAAATAGCACTGAAAAATTACGATAAGTAAAAATGCCTATGATACGGTCAAGTTATTGAAAAAAGATTTTGTAGTAAATTTGTAAT 9600
9501 TCACGATAAATTTATCGTGACTTTTAAATGCTATTCTTTTACGGATACTATGCCAGTTCAATAACCTTTTTTTCTAAAACTCATTTAAACATTA 9600
- - - - -

Fig. 3-12-Continued.

* S L R K K L N T D V R M T T S K S I

9601 AGTTGTTAGCGAAATTATCTACATAGAACTAGATTACGGTAAATTGAATTTGCAAAAAAATTAAACATAGGTGTGCGTAGCATCATGAAATCTTTATC 9700

← ORF8

P K Y N E T Y K V S S T D I D D L F G A M * E S E I V Q I R D V

9701 CAAATATTAAGTCATATAAACTGACTGCTTCATAGATATAGTAGATTTTAGGACGGTAATAAAAGTGACTGAAAGTTAGTGAACATAAGATAGATGG 9800

L E I Y V K N F M H I V K K D H M D K N R I G E A G F K K I R E R

9801 TTAAGATATATTTGAAATAATTTGTACACATAATGAAAAAATAGTACGTATAGAAATAAAGAATATGGGACTCGTGGTTAAAAAATTAAGAAAGAGAAA 9900

← ORF9

Q Y I Q N E F L A Q S F A T K S M

9901 CTATTTAACTAAAGTTTATCTCGAACACTTTTACGTCAAATCTGTATAAATTAT 9957

Fig. 3-12-Continued.

点で他のものと異なっていた (Fig. 3-13)。 *nukG* の下流には ORF7 がコードされていたが、この推定翻訳産物の機能は全く不明であった。しかし、butyrivibriocin OR79A では ORF7 と低いながら相同性を示す遺伝子 (ORF4) がみついている (7)。また、ターミネーター解析の結果、*nukM*, -*T*, -*F*, -*E*, -*G*, ORF7 はオペロンとして転写されると推定される。このことから、ORF7 も *nukacin* ISK-1 の生合成に何らかの機能を果たしていると推察された。

nukA の下流には、種々の 2 成分調節系の転写制御因子と相同性を示すタンパク質をコードすると考えられる ORF1 が位置していた (3)。しかし、ORF1 翻訳産物は N 末端側のリン酸受容部位および C 末端側の DNA 結合部位を欠いていた。さらに、これまでに明らかにした *nukacin* ISK-1 の生合成遺伝子群には、2 成分調節系のシグナル感知分子であるヒスチジンキナーゼをコードする遺伝子は存在しておらず、ORF1 の機能は不明であった。

今後さらに分子生物学的手法を用いた ORF1 および ORF7 の機能解析が必要である。

3-5 参考文献

1. Sahl, H.-G., Jack, R. W. and Bierbaum, G. (1995) Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, **230**: 827-853
2. Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and de Vos, W. M. (1996) Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie Leeuwenhoek*, **69**: 171-184
3. Sashihara, T., Kimura, H., Higuchi, T., Asaho, A., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2000) A novel lantibiotic, *nukacin* ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and elucidation of the structure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**: 2420-2428

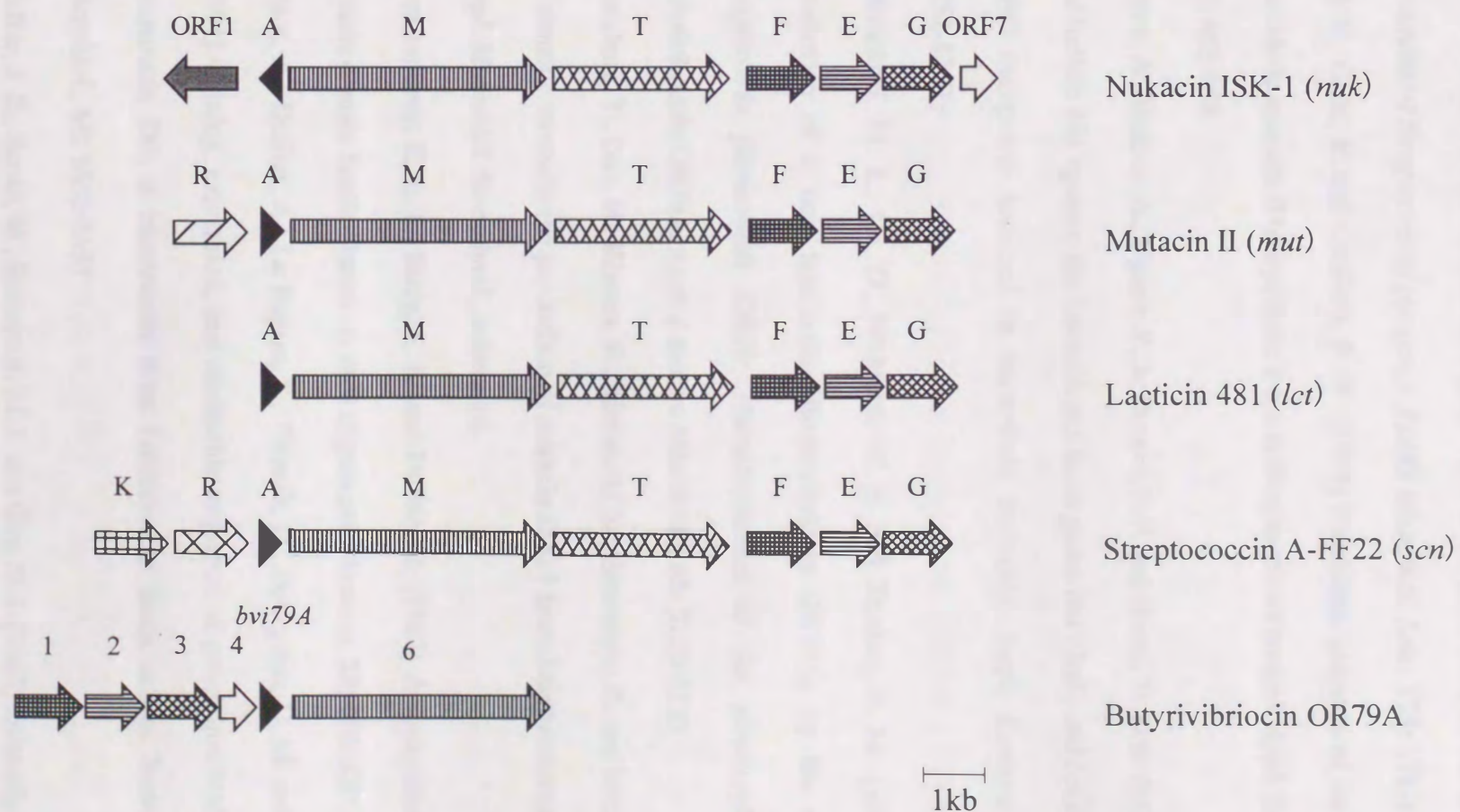


Fig. 3- 13. Organization of the gene clusters involved in the biosynthesis of lacticin-481 type lantibiotics.

Genes with similar proposed function or substantial sequence similarity are given by suffixes and are highlighted in the same manner.

4. McLaughlin, R. E., Ferretti, J. J. and Hynes, W. L. (1999) Nucleotide sequence of the streptococcin A-FF22 lantibiotic regulon: model for production of the lantibiotic SA-FF22 by strains of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **175**: 171-177
5. Qi, F., Chen, P. and Caufield, P. W. (1999) Functional analyses of the promoters in the lantibiotic mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 652-658
6. Rincé, A., Dufour, A., Uguen, P., le Pennec, J.-P. and Haras, D. (1997) Characterization of the lactacin 481 operon: the *Lactococcus lactis* genes *lctF*, *lctE*, and *lctG* encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4252-4260
7. Kalmokoff, M. L., Lu, D., Whitford, M. F. and Teather, R. M. (1999) Evidence for production of a new lantibiotic (Butyriovibriocin OR79A) by the ruminal anaerobe *Butyriovibrio fibrisolvens* OR79: characterization of the structural gene encoding butyriovibriocin OR79A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2128-2135
8. Sashihara, T., Dan, M., Kimura, H., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. The effect of osmotic stress on the production of nukacin ISK-1 from *Staphylococcus warneri* ISK-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, submitted.
9. Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R. and Durbin, R. (1997) A comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins*, **28**: 405-420
10. Rincé, A., Dufour, A., Le Pogam, S., Thuault, D., Bourgeois, C. M. and Le Pennec, J. P. (1994) Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1652-1657
11. Walker, J. E., Sarste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring

- enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**: 945-951
12. Fath, M. J. and Kolter, R. (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.*, **57**: 995-1017
13. Gilmore, M. S., Segarra, R. A. and Booth, M. C. (1990) An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin. *Infect. Immunity*, **58**: 3914-3923
14. Marugg, J. D., Gonzalez, C. F., Kunka, B. S. Ledebøer, A. M. Pucci, M. J., Toonen, M. Y., Walker, S. A., Zoetmulder, L. C. M. and van den Bergh, P. A. (1992) Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2360-2367
15. Stoddard, G. W., Petzel, J. P. van Belkum, M. J., Kok, J. and McKay, L. L. (1992) Molecular analysis of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1952-1961
16. Venema, K., Kok, J., Marugg, J. D., Toonen, M. Y., Ledebøer, A. M., Venema, G. and Chikindas, M. L. (1995) Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.*, **17**: 515-522
17. Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M. and von Eichel-Streiber, C. (1996) Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene*, **181**: 29-38
18. Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-132
19. Otto, M., Peschel, A. and Götz, F. (1998) Producer self-protection against the lantibiotic epidermin by the ABC transporter EpiFEG of *Staphylococcus epidermidis* Tü3298. *FEMS Microbiol. Lett.*, **166**: 203-211

20. Göthel, S. F., Schmid, R., Wipat, A., Carter, N. M., Emmerson, P. T., Harwood, C. R. and Marahiel, M. A. (1997) An internal FK506-binding domain is the catalytic core of the prolyl isomerase activity associated with the *Bacillus subtilis* trigger factor. *Eur. J. Biochem.*, **244**: 59-65
21. Shimizu, T., Ba-Thein, W., Tamaki, M. and Hayashi, H. (1994) The *virR* gene, a member of a class of perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, **176**: 1616-1623
22. Stock, J. B., Ninfa, A. J. and Stock, A. M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **53**: 450-490
23. Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G. G. A., Luesink, E. J. and de Vos, W. M. (1995) Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **270**: 27299-27304
24. Peschel, A., Augustin, J., Kupke, T., Stevanovic, S. and Götz, F. (1993) Regulation of epidermin biosynthetic genes by EpiQ. *Mol. Microbiol.*, **9**: 31-39
25. Morfeldt, E., Panova-Sapundjieva, I., Gustafsson, B. and Arvidson, S. (1996) Detection of the response regulator AgrA in the cytosolic fraction of *Staphylococcus aureus* by monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.*, **143**: 195-201
26. Paulsen, I. T., Gillespie, M. T., Littlejohn, T. G., Hanvivatvong, O., Rowland, S. J., Dyke, K. G. H. and Skurray, R. A. (1994) Characterisation of *sin*, a potential recombinase-encoding gene from *Staphylococcus aureus*. *Gene*, **141**: 109-114
27. Rowland, S. J. and Dyke, K. G. (1989) Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. *EMBO J.*, **8**: 2761-2773
28. Ogasawara, N., Unpublished data.
29. Uziel, O., Borovok, I., Schreiber, R., Cohen, G. and Aharonowitz, Y., Unpublished data.
30. Thumm, G. and Götz, F. (1997) Studies on polysostaphin processing and characterization

of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*.

Mol. Microbiol., **23**: 1251-1265

31. Platt, T. (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev.*

Biochem., **55**: 339-372