

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4章

Staphylococcus warneri ISK-1 のプラスミドキュアリング

4-1 緒言

これまでに報告されているバクテリオシンの生合成遺伝子群の多くはプラスミドにコードされている(1-3)。*S. warneri* ISK-1は2種のプラスミド、pPI-1(約53 kb)およびpPI-2(約2 kb)を保持していることが明らかとなっているが、pPI-2をキュアリングしてもnukacin ISK-1の生産性に影響がないことが明らかとなっている(4)。また、2 kbという小さなサイズから考慮しても、本プラスミドはバクテリオシン生産能に全く関与しないと考えられる。一方、pPI-1とnukacin ISK-1生産能の関係は未だ明らかとなっていない(4)。nukacin ISK-1生合成遺伝子群の局在性を明らかにすることは、今後、生合成遺伝子の機能解析を行うための戦略を決定する上で重要である。そこで、本章ではpPI-1のプラスミドキュアリングを行い、nukacin ISK-1の生合成遺伝子群の局在性について検討した。

4-2 実験方法

4-2-1 使用菌株、培地および培養条件

Staphylococcus warneri ISK-1 およびそのプラスミドキュアリング株は、10 ml の MRS 培地 (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) または 1.6 M (8% w/v) の NaCl を含む MRS 培地で、37°C で 12 時間、100 strokes/min で振とう培養後、100 ml の MRS または 1.6 M の NaCl が入っている MRS 培地を含む 300 ml のコニカルフラスコに接種して、37°C で 100 strokes/min で振とう培養を行った。また、これらの培地には生成する酸による pH の低下を防ぐため、10 g/l の CaCO₃ を添加した。検定菌は *Pediococcus pentosaceus*

JCM 5885 を用いた。本菌は 5 ml の MRS 培地で *S. warneri* ISK-1 と同様の条件で 18 時間培養を行った。

4-2-2 分析方法

菌体濃度は培養液の 562 nm における吸光度を測定し、これを予め作成しておいた検量線から培地 1 liter 当たりの乾燥菌体重量 (DCW; Dry Cell Weight (g/l)) に換算することにより求めた。グルコースおよび DL-乳酸濃度は Aminex HPX-87 (0.78 x 30 cm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) のカラムを接続した HPLC (638-30 HPLC, Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて測定した。また、分析条件は、カラム温度 65°C、50 mM の硫酸で流速 0.2 ml/min で行った。検出は Refractive index detector (RID-6A; Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いた。

抗菌活性の測定は寒天拡散法によるバイオアッセイ法 (5) で行った。すなわち、培養液を濃塩酸で pH 3.0 に調整し、16000 x g で 10 分間遠心分離した培養液上清をろ過滅菌フィルター (EB-Disk13, Kanto Kagaku, Tokyo, Japan) で除菌したものをサンプルとした。このサンプルを滅菌水で順次 2 倍希釈し、それぞれ 40 μ l を乾熱滅菌したペーパーディスク (直径 8 mm) にしみ込ませ、検定菌を含む寒天プレートの表面にのせた。このプレートを 37°C で 18 時間培養し、ペーパーディスク周辺の検定菌の生育阻止円の大きさを測定した。

検定菌を含む寒天プレートは以下のようにして調製した。まず、検定菌を 5 ml の MRS 培地に接種し、37°C で 18 時間静置培養した。培養液を滅菌水で 100 倍希釈し、A562 が 0.072 の希釈液を 50 μ l 接種するように 1.4% の寒天を含む MRS 培地に接種した。この培地をプレートに 10 ml ずつ注入した。

自己耐性能の実験は、精製したバクテリオシン (5)、それぞれ 500、250、125、62.5 ng を 40 μ l の滅菌水に溶解し、上述した抗菌活性測定方法に従って行った。なお、検定菌は *S. warneri* ISK-1 およびそのプラスミドキュアリング株を用いた。

nukacin ISK-1 の抗菌活性、nukacin ISK-1 の *S. warneri* ISK-1 またはそのプラスミドキュアリング株に対する最小生育阻止濃度 (MIC; Minimum Inhibitory Concentration) は、Parente らの方法 (6) を用いて数値化した。

4-2-3 プラスミドキュアリング

S. warneri ISK-1 を、5 ml の MRS 培地で 37°C、100 strokes/min で振とう培養を行った。A562 が 0.5 に達したところでアクリフラビンを 25 mg/l の終濃度で添加し、さらに 18 時間培養を行った。培養液を MRS プレートに 1 プレートあたり 30 コロニーとなるように希釈して塗抹した。37°C で一晩培養を行い、コロニーが約 1 mm に成長したところで、5 ml の MRS 培地で一晩培養した *P. pentosaceus* JCM 5885 の培養液を 10^4 倍希釈となるように 1.0% の寒天を含む MRS 培地に混釈し、*S. warneri* ISK-1 のコロニーの上に重層した。37°C で一晩培養し、生育阻止円の有無を確認した。生育阻止円が確認されなかったコロニーを単離し、遺伝子解析および生理学的解析を行った。

4-2-4 DNA 解析

ISK-1 およびそのプラスミドキュアリング株からのプラスミド抽出は、Anderson と McKay の方法 (7) を用いた。菌体の培養は、10 ml の MRS 培地で 37°C、120 strokes/min で 1 晩振とう培養し、約 9 ml の培養液から集菌した。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。トータル DNA の抽出は「2-2-2 SSP-PCR」の項と同様の方法で行った。

サザンブロットハイブリダイゼーションは Alkphos (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom) を用い、SSP-PCR により増幅した約 720 bp の DNA 断片（「2-2-2 SSP-PCR」の項を参照）をプローブとして行った。ハイブリダイゼーション膜は Hybond-N⁺ (Amersham) を用いて 55°C で行った。プローブの標識やハイブリダイゼーションの操作は Alkphos のプロトコールに従って行った。その他の基本的な DNA 操作技術、使用試薬および培地は第 2 章および Molecular Cloning の第二版 (8) に従った。

4-3 結果と考察

4-3-1 プラスミドキュアリング

まず、プラスミドキュアリングは種々の変異原性剤、SDS、エチジウムブロマイド、アルリジンレッドをそれぞれ、500、40、16 mg/l の終濃度で添加して行った。しかし、プラスミドキュアリング株はこれらの変異原性剤ではほとんど得られなかった。一方、アクリフラビンを終濃度 25 mg/l で添加した場合、約 30 個のコロニーに 1 つの確率で抗菌活性を失った株を効率よく得ることができた。

Fig. 4-1 にアクリフラビンを用いてプラスミドキュアリングを行った際の、スクリーニングの代表的な結果を示す。この変異株を単離し、プラスミド DNA の抽出を行った。その結果、Fig. 4-2 (A) に示すように、変異株から得られたプラスミド DNA は親株と比べて約 53 kb のプラスミド、pPI-1 のみを欠失していた。そこで、nukacin

1 2



Fig. 4-1. Antimicrobial activity of *Staphylococcus warneri* ISK-1 (1) and the mutant strain (2). *Pediococcus pentosaseus* JCM 5885 was used for indicator strain.

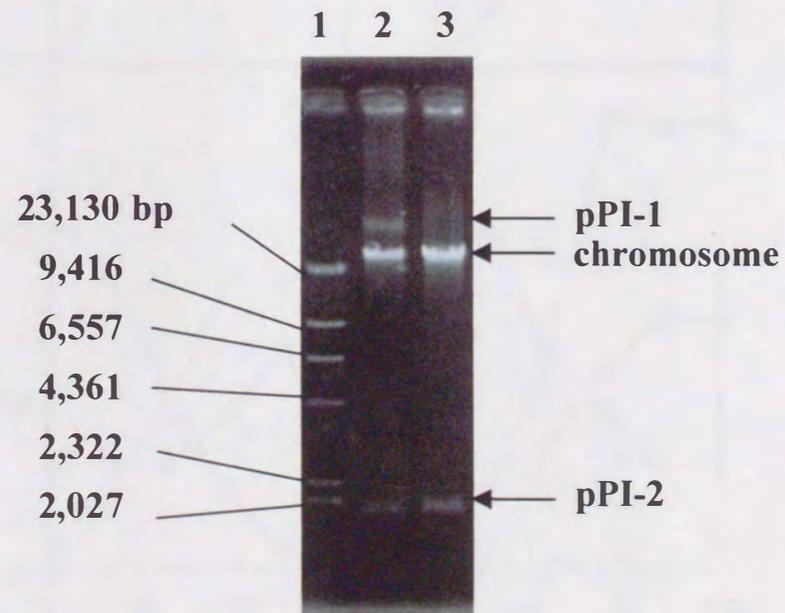
ISK-1 の構造遺伝子を含む約 720 bp の DNA 断片をプローブとして、サザンブロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、親株から抽出したトータル DNA では pPI-1 のシグナルが得られるのに対し、プラスミドキュアリング株では全くシグナルが得られなかった (Fig. 4-2 (B))。以上のことから nukacin ISK-1 生合成遺伝子群は pPI-1 上にコードされていることが明らかとなった。

4-3-2 プラスミドキュアリング株の諸性質

プラスミドキュアリング株の性質について検討した。まず、MRS 培地でフラスコ培養を行い、その培養特性について調べた。その結果、プラスミドキュアリング株は抗菌活性を全く示さなかったが、増殖速度、グルコース消費速度、乳酸生産性などの諸性質に変化は見られなかった (Fig. 4-3 A, C)。また、1.6 M の NaCl を添加した MRS 培地では、*S. warneri* ISK-1 の生育は阻害されるが、nukacin ISK-1 の生産量が 1.6 倍に促進されることが明らかとなっている (Fig. 4-3 A, B) (9)。そこで、プラスミドキュアリング株についても、1.6 M の NaCl 存在下で培養を行った。MRS 培地の場合と同様に抗菌活性は示さなかったが、増殖速度やグルコース消費速度、乳酸生産性は親株と同じであった (Fig. 4-3 B, D)。

nisin を生産する *L. lactis* MG1614 では、nisin 生合成遺伝子群はスクロース代謝を行うスクロース-6-リン酸ヒドロラーゼ (*sacA*) とともに接合トランスポゾン (Tn5301) 上にコードされている (10)。これらの遺伝子は密接に関係しており、nisin を生産する株は必ずスクロース資化能を有することが報告されている (11-13)。そこで、*S. warneri* ISK-1 についても糖の資化性と nukacin ISK-1 の関連性について検討した。API50 CH (Bio Merieux, Marcy-Étoile, France) を用いて糖類発酵性試験を行ったが、プラスミド

(A)



(B)

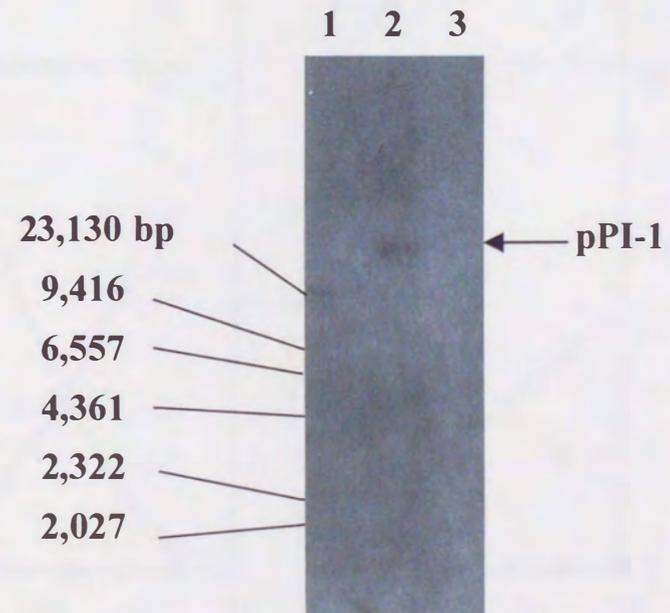


Fig. 4-2. Plasmid curing of *Staphylococcus warneri* ISK-1.

Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot hybridization (B) of total DNA of ISK-1 strain (lane 2) and the mutant strain (lane 3). Lane 1, λ -HindIII marker. 720-bp fragment containing *nukA* was used for hybridization experiment as the probe.

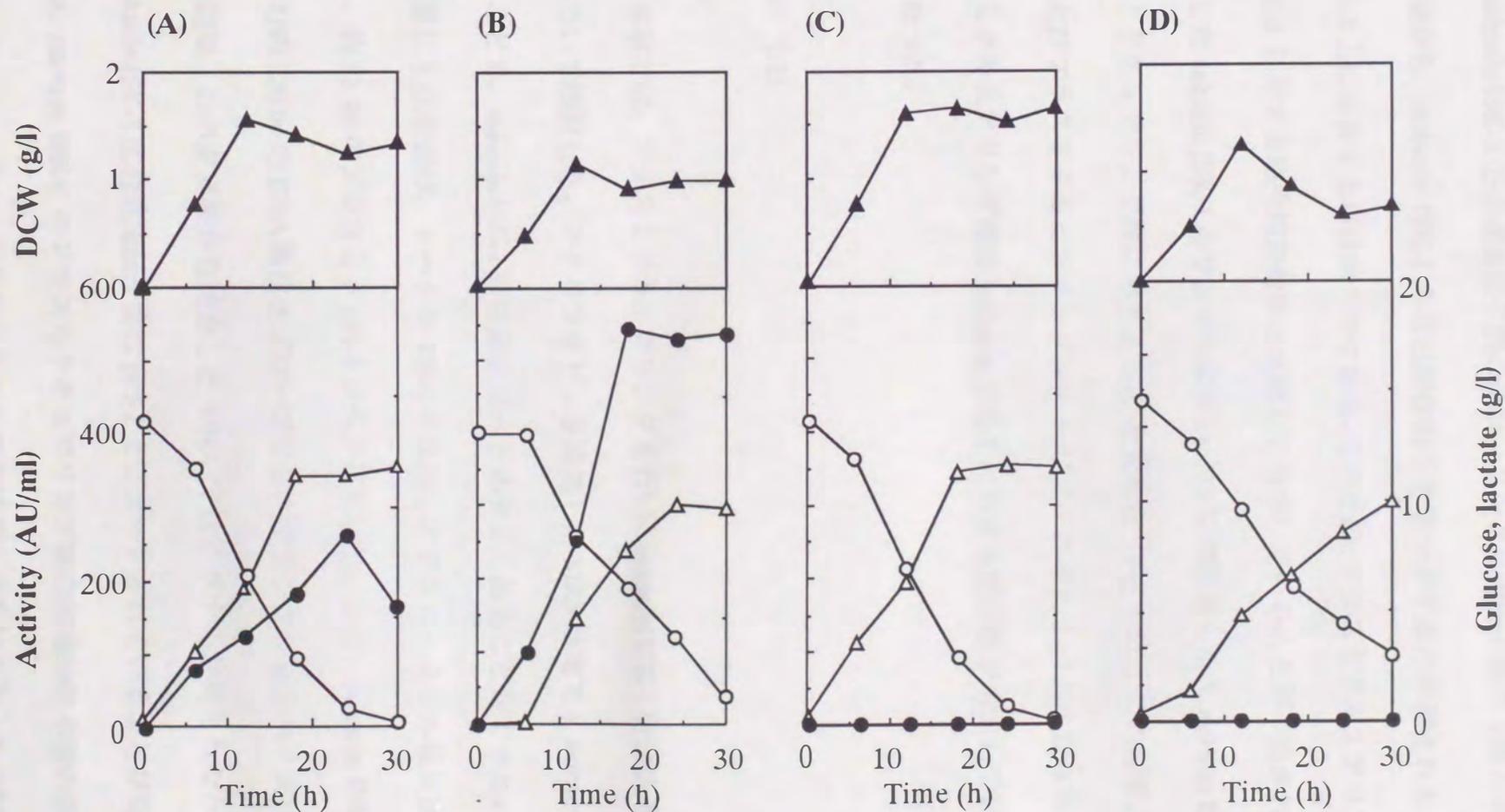


Fig. 4-3. Comparison of fermentation profiles of *S. warneri* ISK-1 (A, B) and the pPI-1-cured strain (C, D).

The cultivations were carried out at 37°C in 300-ml flasks containing 100 ml of MRS medium with 10 g/l CaCO₃ (A, C). NaCl was added to the medium at 1.6 M (B, D). Symbols; ● nukacin ISK-1 activity, ○ Glucose, ▲ Dry cell weight (DCW), △ Lactate.

キュアリング株の性質は親株と比べて全く変化が確認されなかった (data not shown)。

nukacin ISK-1 生合成遺伝子群のクローニングと遺伝子解析 (第3章) および本章の結果から、nukacin ISK-1 の自己耐性因子をコードすると予測される *nukF*, *-E*, *-G* も pPI-1 上に位置する事は明らかである。このため、プラスミドキュアリング株は nukacin ISK-1 に対する感受性が親株と比較して増大していることが予測された。そこで、精製した nukacin ISK-1 をサンプルに用い、18時間培養した *S. warneri* ISK-1 およびプラスミドキュアリング株に対する MIC を求めた (Fig. 4-4)。この結果、*S. warneri* ISK-1 およびプラスミドキュアリング株の MIC はそれぞれ 2 g/l および 0.79 g/l となり、プラスミドキュアリング株は nukacin ISK-1 に対する感受性が増大していることが明らかとなった。

4-4 小括

本章では、プラスミドキュアリングを行い、nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の局在性について検討した。アクリフラビンを添加した MRS 培地で *S. warneri* ISK-1 を培養することで、nukacin ISK-1 非生産変異株を効率よく得ることができた。これらの株から任意に 1 株を選び、トータル DNA を抽出してアガロースゲル電気泳動を行ったところ、約 53 kb のプラスミド pPI-1 が欠失していた。また、nukacin ISK-1 構造遺伝子を含む約 720 bp の DNA 断片をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションの結果、この変異株から抽出した DNA ではシグナルが得られなかった。従って、nukacin ISK-1 生合成遺伝子群は pPI-1 上にコードされていることが明らかとなった。

S. warneri ISK-1 のプラスミドキュアリング株の培養特性や糖の資化性を検討したところ、nukacin ISK-1 生産性以外の生理的性質に変化はなかった。すなわち、*S. warneri*

(A)



(B)

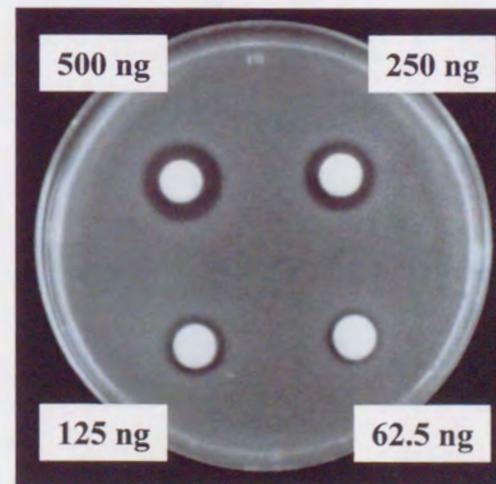


Fig. 4-4. Effect of nukacin ISK-1 on the immunity of *S. warneri* ISK-1 (A) and the $\Delta pPI-1$ variant (B).

Pure nukacin ISK-1 of the indicated amount was dissolved in water 40 μ l and loaded to paper disk on the medium agar inoculated with ISK-1 strain and the mutant.

ISK-1では、nukacin ISK-1 生合成遺伝子群と糖資化や生育に関与する他の遺伝子との関係は認められなかった。一方、プラスミドキュアリング株の nukacin ISK-1 に対する感受性について検討した結果、*S. warneri* ISK-1 およびそのプラスミドキュアリング株の MIC はそれぞれ 2 g/l および 0.79 g/l であり、プラスミドキュアリング株の感受性が増大していることが明らかとなった。

本プラスミドキュアリング株は、nukacin ISK-1 の生産能および自己耐性能がないことから、nukacin ISK-1 生合成遺伝子の機能解析を行う際の宿主として重要な役割を果たすと考えられる。

4-5 参考文献

1. Ersfeld-Dressen, H., Sahl, H.-G. and Brandis, H. (1984) Plasmid involvement in production of and immunity to the staphylococcin-like peptide Pep5. *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 3029-3035
2. Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. and Lacroix, C. (1991) Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3450-3455
3. Casla, D., Requena, T. and Gómez, R. (1996) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**: 35-41
4. 今林寛和 (1994) めか床より分離した *Pediococcus* sp. ISK-1 が生産するバクテリオシンの構造解析のための遺伝子面からのアプローチ : 修士論文
5. 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

6. Parente, E., Brienza, C., Moles, M. and Ricciardi, A. (1995) A comparison of methods for measurement of bacteriocin activity. *J. Microbiol. Methods*, **22**: 95-108
7. Anderson, D. G. and McKay, L. L. (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 549-552
8. Sambrook, J., Fritsh, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y
9. 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.
10. Horn, N., Swindell, S., Dodd, H. and Gasson, M. J. (1991) Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.*, **228**: 129-135
11. Hirsch, A. and Grinsted, E. (1951) The differentiation of the lactic streptococci and their antibiotics. *J. Dairy Res.*, **18**: 198-204
12. Gasson, M. J. (1984) Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiology Lett.*, **21**: 7-10
13. Steele, J. L. and McKay, L. L. (1986) Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 57-64

第5章

nukacin ISK-1 生合成遺伝子のオペロン構造の解析

5-1 緒言

これまでに、nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群は少なくとも *nukA*, -*M*, -*T*, -*F*, -*E*, -*G* で構成されることが推察された。また、*nukA* および *nukG* の下流には nukacin ISK-1 の生合成に関与するか明らかでない2つの ORF (それぞれ ORF1 および ORF7) が位置していた。ORF7 の機能は全く不明であったが、ORF1 の推定産物は2成分調節系の応答制御因子と相同性を示した (1)。しかし、ORF1 産物は通常の応答制御因子と異なり、DNA 結合部位やシグナルとなるリン酸基の受容に必須なアミノ酸残基を欠如すること、またこれまでに明らかとなった生合成遺伝子群にはヒスチジンキナーゼ遺伝子が存在しないなど、いくつかの点でその機能の発現に疑問がもたれた (1)。推定アミノ酸配列からの機能推定だけでは、これらの ORF が遺伝子として実際に発現し、機能しているか明らかにすることはできず、mRNA の解析や遺伝子欠損などの方法を用いたより詳細な検討が必要である。

一方、nukacin ISK-1 は浸透圧ストレスによって生産性が増大し、これは少なくとも構造遺伝子 (*nukA*) の転写レベルで制御されていることが明らかとなっている (2)。この転写促進機構は分子レベルでは全く解明されていないが、ORF1 と浸透圧ストレス応答因子が共役して機能している可能性も考えられる。これまでに報告されている2成分調節系の転写調節因子は、標的とする遺伝子のプロモーター領域にある反復配列または逆向反復配列に結合することが明らかになっている (3, 4)。*nukA* やその他の生合成遺伝子のプロモーターを決定する事ができれば、その周辺領域でこのような転写因子の結合部位の検索を行い、転写因子の存在を明確にするための重要な手がかりとなる。

本章では nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群の構造、およびその機能についてより詳

細に解析するために、これらの mRNA の解析を試みた。

5-2 実験方法

5-2-1 RNA の抽出

Staphylococcus warneri ISK-1 を 10 ml の MRS 培地 (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) で、37°Cで一晩前培養を行った。1 ml の前培養液を 10 ml の MRS 培地に添加し、37°Cで 2~4 時間培養を行った。3~6 ml の培養液から菌体を回収し、0.5 ml の溶菌バッファー (30 mM Tris-Cl (pH7.4), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% SDS) に懸濁し、液体窒素で急速凍結した。菌体をミクロスパーテルで破碎した後、0.5 ml のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25: 24: 1) (PCI) を添加した。混合液をボルテックスで 15 秒間混合し、1,000 rpm で 15 分間、室温で遠心分離した。RNA を含む水層 (上層) を回収し、15 μ l の 5 M NaCl と 0.8 ml の 100%エタノールを添加した後、氷浴で 30 分間静置した。10,000 rpm で 15 分間、4°Cで遠心分離し、上清を除去した。70%エタノールで沈殿を洗浄し、さらに 10,000 rpm で 5 分間、4°Cで遠心分離し、上清を除去した後、5 分間自然乾燥した。沈殿物を 95 μ l の DNase バッファーによく溶解した後、2.5 mg/ml の DNase I (Boehringer, Mannheim, Germany) を 4 μ l 加え、37°Cで 1 時間放置した。上記と同様の方法で PCI 抽出およびエタノール沈殿を行い、20 μ l の diethylpyrocarbonate で処理した水に溶解した。RNA の濃度は 260 nm の吸光度から換算して求めた。

5-2-2 ノーザンブロットハイブリダイゼーション

8 μg の RNA を 18% のホルムアミドを含む 1.2% のアガロースゲルで、100 V の電圧で約 30 分間電気泳動を行った後、Molecular Cloning の第二版 (5) の方法に従ってナイロン膜 (Hybond-N⁺; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom) に転写した。DNA プローブは Table 5-1 に示すプライマーを用いて、「3-2 実験方法」の項と同様の条件で PCR を行って調製した。各 PCR の鋳型 DNA は、*nukA*, *-M* および ORF1 では 3.6-kb *Hind*III 断片、ORF7 では 2.7-kb *Hind*III-*Eco*RI 断片を用いた (Fig. 3-2 を参照)。増幅した DNA 断片は Multiprime DNA labeling system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて [α -³²P]dCTP で標識した。未標識のヌクレオチドは NICK column (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて除去した。ハイブリダイゼーションは、4 x SSC (1 x SSC; 0.15 M NaCl, 15 mM trisodium citrate, pH7.0) , 50 mM NaH₂PO₄ (pH 6.5), 100 mg/l yeast tRNA (Boehringer) , 1% SDS, 1 x Denhart's solution (1 g/l ficoll, 1 g/l polyvinylpyrrolidone, 1 g/l bovine serum albumin) , 50%ホルムアミドを含む溶液中で、42°Cで一晩行った。過剰なプローブの洗浄は、0.1% SDS を含む 1 x SSC および 0.1 x SSC を用いてそれぞれ 30 分間、42°Cで行った。キット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。ハイブリダイゼーション膜に X 線フィルム (RX-U; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) を重ね、-70°Cで一晩感光させた。

5-2-3 プライマー伸長法

nukA, *-M*, ORF1 に対応するアンチセンスプライマーを次のように作製した。*nukA* (*nukAp5*; 5'- ACT TCA ATG TCC TTC ATA ACT TTA GA-3'); *nukM* (*nukMp5*; 5'- AAT

Table 5-1. Sequence of primers used for amplification of genes.

Names	Sequences (5' - 3')	Target genes	Positions *
pnuk8	ATATAAGGTTTCAATACTCTCCA	<i>nukA</i>	1129 - 1151
pnuk12	GGAGGTAACAAACATGGAAA	<i>nukA</i>	1491 - 1510
pnukMe5B	GTTATATGAATTAGGATCCTTAATAGGAGATGATATT	<i>nukM</i>	1857 - 1896
pnukA4	ATATTCCAATTATATCTCCACC	<i>nukM</i>	2801 - 2822
pnukOe5N	GGGAAAATTGATTTTATGAAAAAAT	ORF1	141 - 166
pnukOe3B	TGTAATAGAACCAGATTAATAATCC	ORF1	889 - 914
pnukO7e5N	GAGAGGGTTAATTTTCATATGAAAAGAA	ORF7	9157 - 9183
pnukO7e3N	AAAATTTTGTAGGATCCTGCTATTA	ORF7	9461 - 9487

* Position of primers in the 10-kb *HindIII-EcoRI* region was shown.

TGT TCA ACT TTA ATG TTG TTC AT -3'); ORF1 (nukOp5; 5'- ATA ATA ATA GCA TTT ATT TTT TTC ATA -3')。それぞれのプライマーを、T4 polynucleotide kinase (Takara, Tokyo, Japan) を用いて、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mM) で標識した。逆転写反応は AMV reverse transcriptase を用いた Primer Extension System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った。DNA シーケンス反応は T7 Sequence Quick Denature Plasmid Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (3000 Ci/mM) で標識して行った。電気泳動は 6% のポリアクリルアミドゲルを用いて、2,500 V の定電圧で 2 時間行った。電気泳動後、ゲルをろ紙に張り付けて乾燥させ、X 線フィルムを重ねて -70°C で一晩感光させた。操作は各メーカーのプロトコールに従って行った。

5-3 結果と考察

5-3-1 nukacin ISK-1 生合成遺伝子の転写領域の決定

Fig. 5-1 にノーザンプロットハイブリダイゼーションの結果を示す。まず、*nukA* に特異的なプローブを用いた時、約 0.2 kb の位置にシグナルが得られた。また、*nukM* および ORF7 に特異的なプローブを用いた時、どちらの場合も約 9 kb の位置にシグナルが得られ、これらは同一であると思われた。従って、*nukM*, -*T*, -*F*, -*E*, -*G* および ORF7 は 1 つのオペロンであることが明らかとなった。この結果は、第 3 章で述べたように、*nukM* の上流および ORF7 の下流にそれぞれプロモーターおよび ρ 因子非依存性ターミネーター様配列が位置し、*nukM*, -*T*, -*F*, -*E*, -*G*, ORF7 のスペーサー領域にはこれらが見つからなかったことと一致した。

一方、ORF1 をプローブに用いた場合、全くシグナルが得られなかった。mRNA が

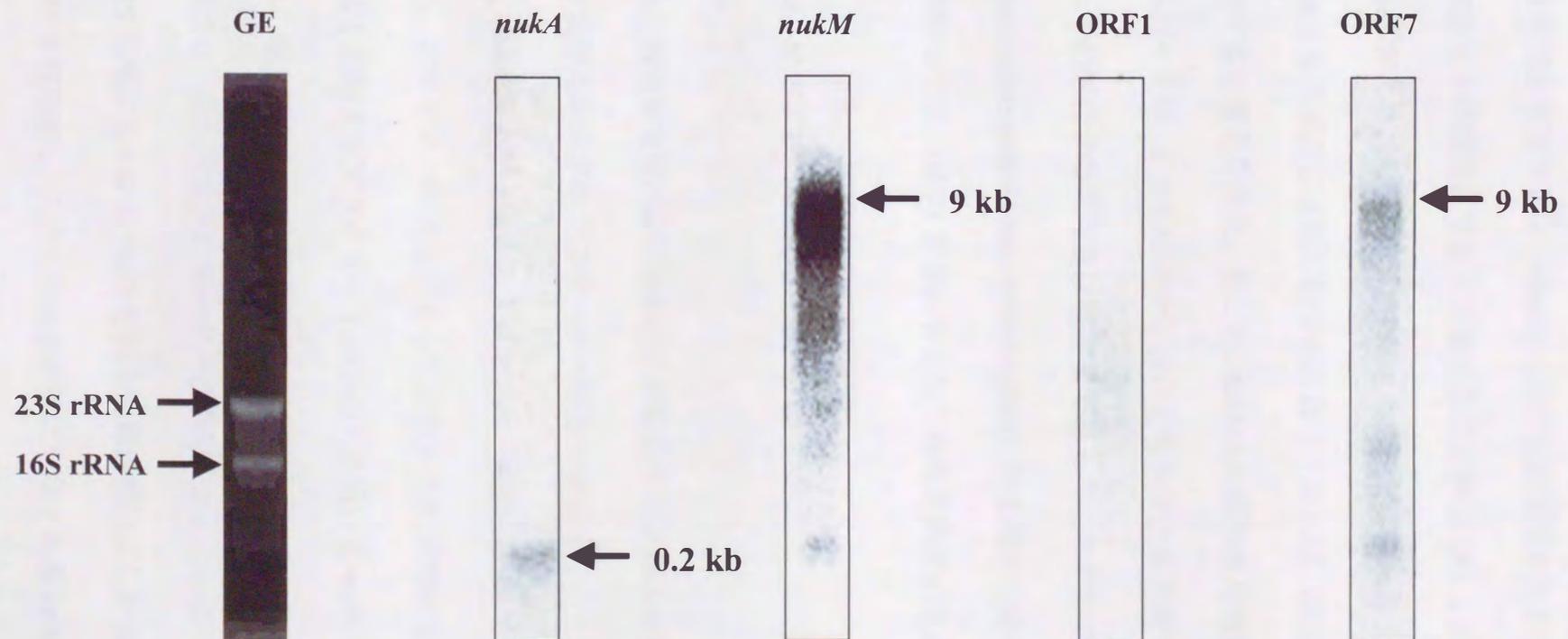


Fig. 5-1. Northern blot analysis of RNA isolated from *S. warneri* ISK-1.

Probes used in this study were shown above each panel. GE indicates agarose gel electrophoresis of total RNA used in this study. In all the panels RNA from the same isolations was used.

転写される時期は遺伝子により異なるため、ノーザン解析を行う場合、用いた菌体サンプルの培養時間が重要である。nukacin ISK-1 の菌体当たりの生産量が対数増殖期中期（培養開始から 6 時間後）で最大に達することから (6)、nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群の転写がこれ以前の時期に活発になることは明らかである。さらに、ORF1 が nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の転写活性因子であれば、ORF1 はそれよりも早い時期に多く発現すると考えられた。そこで、mRNA の調製を培養後 2 時間および 4 時間目の菌体から行ったが、どちらの場合においてもシグナルが得られなかった。しかし、このような転写調節因子の転写量は極微量であることも否定できず、今後、RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法を用いての ORF1 の発現解析が必要である。現時点では、ORF1 が遺伝子として転写されているか不明である。

5-3-2 *nukA*, -*M* および ORF1 の転写開始点の決定

一般に 2 成分調節系では、応答制御因子が結合するための反復配列または逆向反復配列が制御を受ける遺伝子のプロモーター領域に存在することが報告されている (3, 4)。そこで、*nukA* および *nukM* のプロモーター領域にこのような配列が存在するか調べるために、プライマー伸長法によってこれらの転写開始点の決定を試みた (Fig. 5-2 A)。*nukA* と相補するプライマー (*nukAp5*) を用いて *nukA* の転写開始点の決定を行ったところ、転写開始点は翻訳開始コドンの 30 bp 上流に位置しており、その 8 bp 上流に大腸菌の σ^{70} 様の構成プロモーター (TTGACA/TATAAT) が確認された (Fig. 5-2 B)。また、MRS 培地に 1.6 M の NaCl を加えて高浸透圧にした培地では、nukacin ISK-1 の生産量が約 1.6 倍増加し、この生産促進機構は少なくとも *nukA* の転写レベルで起こることがこれまでに明らかとなっている (2)。このようなストレス応答機構は様々

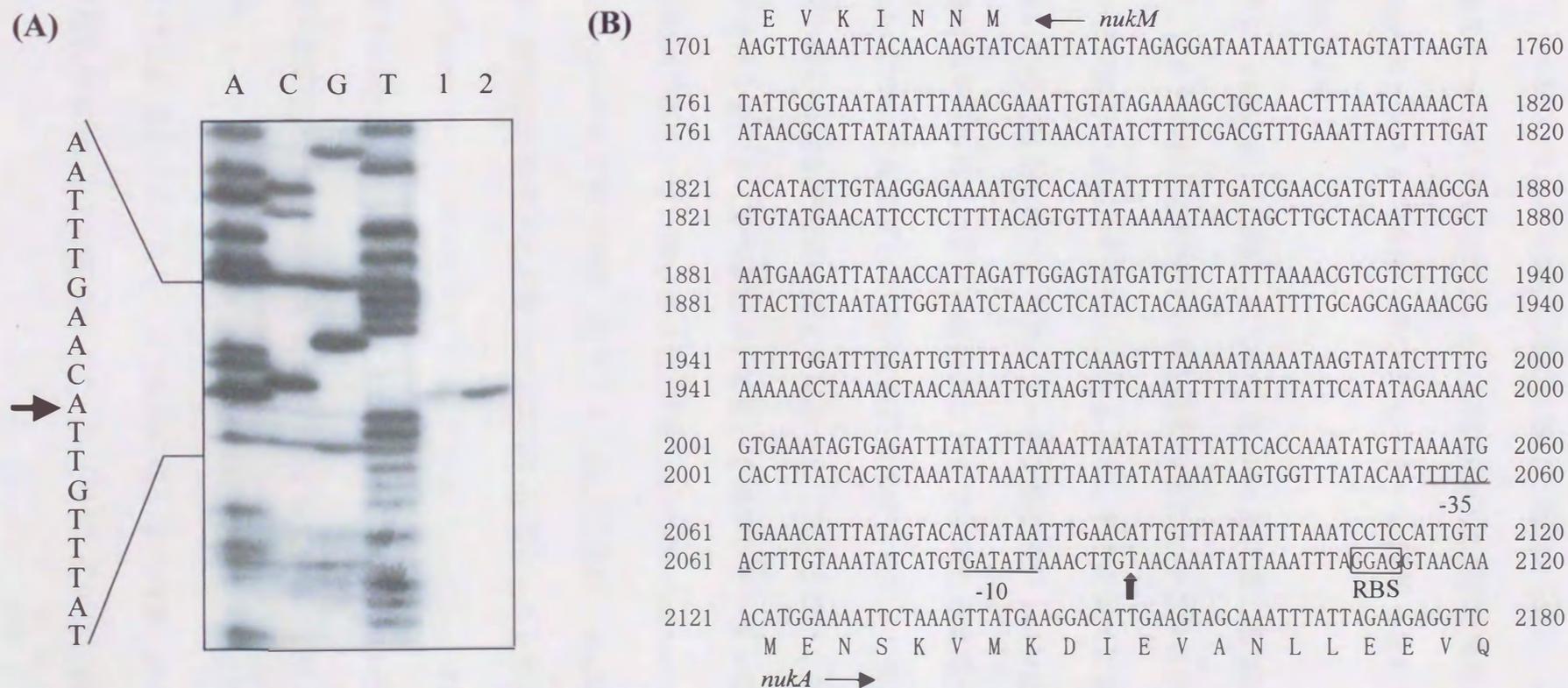


Fig. 5-2. Primer extension analysis of the transcription of nukacin ISK-1 structural gene *nukA*.

(A) Lanes A, C, G and T contain a dideoxy sequencing ladder carried out with the same primer. Lane 1 and 2, the mRNAs extracted from the cells grown in MRS medium without or with 1.6 M of NaCl, respectively. The transcription start site of *nukA* is indicated by an arrow. (B) Nucleotide sequence of the spacer region between *nukA* and *nukM*. The Nucleotide sequence of the region between 1701 to 2180 in the 10-kb *HindIII-EcoRI* region containing nukacin ISK-1 biosynthetic genes was shown, and in the 3' to 5' direction from 1701 to 1760 while from 1761 to 2120, the sequence was shown in both directions. The transcription start site of *nukA* is indicated by a vertical arrow. The putative promoter sequence and the ribosome binding site are noted as -35/-10 and RBS, respectively.

であるが、ストレス応答プロモーターが存在することが報告されている (7, 8)。そこで、1.6 M NaCl 含有 MRS 培地で培養した菌体から抽出した mRNA を用いて同様の実験を行った。しかしながら、その転写開始点は通常の条件下でのものと同一であり、浸透圧ストレス下でも同一のプロモーターが機能していることが明らかとなった (Fig. 5-2A)。

次に、*nukM* および ORF1 についても *nukA* と同様に転写開始点の決定を試みた。しかし、どちらの場合も明確な転写産物を得ることができなかった。ORF1 については、ノーザン解析の結果からも明らかなように、その発現量は極端に低いか全く発現していないためと考えられた。一方、ノーザン解析から *nukM* は十分に発現しており、逆転写産物が得られないことの原因はこれまでに明らかになっていない。

nukA について反復または逆向反復配列の検索を行ったが、*nukA* と *nukM* の間の塩基配列にはこの様な配列は確認できなかった (Fig. 5-2B)。2成分調節系による転写調節を受ける遺伝子 (標的遺伝子) でも、そのプロモーター領域に反復配列または逆向反復配列が存在しない場合もある。実際、*Staphylococcus aureus* の α および β hemolysin や enterotoxin B の転写制御に関与する 2成分調節系の AgrA は、標的遺伝子のプロモーター領域に結合することなく転写活性を促進することが報告されている (9)。また、*Clostridium perfringens* は α 毒素 (phospholipase C)、 θ 毒素 (perfringolysin) や κ 毒素 (collagenase) などを生産するが、これらの遺伝子 (それぞれ *plc*, *pfoA*, *colA*) も 2成分調節系 (VirR, VirS) によって制御されている (10)。しかし、VirR が直接そのプロモーター領域に結合する事で転写活性が促進される遺伝子は *pfoA* のみで、*plc* および *colA* 遺伝子のプロモーター領域には反復配列または逆向反復配列はなく、VirR との結合性もないことが報告されている (11)。このことは、転写調節にはさらに他

の因子が関与しており、より複雑な調節機構も存在することを示唆している。今後さらに、ORF1の遺伝子破壊や精製したORF1を用いたゲルシフトアッセイなどを行い、ORF1と *nukacin* ISK-1の生合成の関係を明らかにすることが必要である。

5-4 小括

本章では、*nukacin* ISK-1生合成遺伝子群をより詳細に解析するために、オペロン構造、および転写開始点の同定を試みた。まず、ノーザンプロットハイブリダイゼーションにより、生合成遺伝子のオペロン構造について解析した。この結果、*nukA*に特異的なプローブを用いた時に約0.2 kb、*nukM*およびORF7の時に約9 kbのシグナルが得られた。このことから、*nukA*はモノシストロンとして転写されているのに対して、*nukM*、*-T*、*-F*、*-E*、*-G*およびORF7はポリシストロンとして転写される、すなわちオペロンを構成していることが明らかとなった。この結果は、*nukM*の上流およびORF7の下流にそれぞれプロモーターおよび ρ 因子非依存性ターミネーター様配列が位置し *nukM*、*-T*、*-F*、*-E*、*-G*、ORF7のスペーサー領域にはこれらが見つからなかったことと一致した。一方、ORF1をプローブとした場合、全くシグナルが得られなかった。

*nukA*の転写開始点の決定を試みた結果、翻訳開始コドンの38 bp上流に位置する、大腸菌の σ^{70} 様の構成プロモーターが確認された。本プロモーターは高浸透圧条件下でも通常の条件と同様に機能していた。また、この上流領域には転写調節因子が結合する反復または逆向反復配列は存在しなかった。一方、原因は不明であるが *nukM*の転写開始点を明らかにすることはできなかった。

ORF1が遺伝子として機能し *nukacin* ISK-1の生合成に関与しているかについては、本章では明確な情報は得られなかった。今後さらに、ORF1の遺伝子破壊や精製した

ORF1 を用いたゲルシフトアッセイなどを行い、ORF1 と nukacin ISK-1 の生合成の関係を明らかにすることが必要である。

5-5 参考文献

1. 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
2. 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.
3. Mills, S. D., Lim, C.-K. and Cooksey, D. A. (1994) Purification and characterization of CopR, a transcriptional activator protein that binds to a conserved domain (*cop* box) in copper-inducible promoters of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 341-351
4. Head, C. G., Tardy, A. and Kenney, L. J. (1998) Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the *ompF* and *ompC* regulatory sites. *J. Mol. Biol.*, **281**: 857-870
5. 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
6. 木村宏和 (1999) *Pediococcus* sp. ISK-1 が生産する新規抗菌ペプチドに関する研究: 博士論文
7. Chan, P. F., Foster, S. J., Ingham, E. and Clements, M. O. (1998) The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor σ^B controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J. Bacteriol.*, **180**: 6082-6089

8. Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J. and Boor, K. J. (1998) General stress transcription factor σ^B and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, **180**: 3650-3656
9. 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
10. Shimizu, T., Ba-Thein, W., Tamaki, M. and Hayashi, H. (1994) The *virR* gene, a member of a class of two-component response regulators, regulates the production of perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, **176**: 1616-1623
11. Cheung, J. K. and Rood, J. I. (2000) The VirR response regulator from *Clostridium perfringens* binds independently to two imperfect direct repeats located upstream of the *pfoA* promoter. *J. Bacteriol.*, **182**: 57-66

6-1 緒言

これまでの生合成遺伝子群の塩基配列の決定やノーザン解析などから、nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群は *nukA*, -*M*, -*T*, -*F*, -*E*, -*G* の他に、ORF7 も何らかの機能を担っていることが推察された。一方、ORF1 は遺伝子として機能しているか未だ明らかではない。これらの機能不明な ORF の解析を行うためには、異種の菌での ORF 産物の発現や、遺伝子破壊による性質の変化について検討を行うことが必要である。

そこで本章では、これまでにクローニングした nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群を異種の菌、または第 4 章で取得した *Staphylococcus warneri* ISK-1 の nukacin ISK-1 非生産変異株、 Δ pPI-1 株に導入し、nukacin ISK-1 の発現を確認することを試みた。

6-2 実験方法

6-2-1 使用菌株、培地および培養条件

Staphylococcus carnosus TM300 は LB 培地(1)を用いた。*Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T は MRS 培地 (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) を用いた。これらの菌は 5 ml の培地で 37°C、120 strokes/min で一晩振とう培養を行った。nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群の再構築は *Escherichia-Staphylococcus* 属のシャトルベクター、pCU1 (2) を用いた。本プラスミドは Tübingen 大学 (Germany) の Prof. F. Götz より提供された。クローニング操作は全て *Escherichia coli* JM 109 を宿主に用いた。本菌の培養は「2-2-1 使用菌株、培地および培養条件」の項と同様に行った。

6-2-2 DNA 操作

ISK-1 株および *S. carnosus* TM300 からのプラスミド DNA の抽出は「4-2-4 DNA 解析」の項と同様に行った。ただし、*S. carnosus* の場合、溶菌はリゾチームの代わりに 1 g/l の lysostaphine (Sigma, Steinheim, Germany) を 5 μ l 加えて行った。制限酵素処理後の末端の平滑化は Blunting high (Toyobo, Tokyo, Japan) を用いた。操作はメーカーのプロトコールに従って行った。その他の DNA 操作は第 2 章および第 3 章と同様に行った。

6-2-3 形質転換

pCnuk (後述) を、*L. plantarum* ATCC 14917^T, *S. carnosus* TM300, *S. warneri* ISK-1 (Δ pPI-1) に形質導入した。形質転換法は、*L. plantarum* は Bringel と Hubert (3)、*S. carnosus* は Götz と Schumacher (4) の方法に従って行った。*S. warneri* ISK-1 (Δ pPI-1) の形質転換法は、Bringel と Hubert (3) と Schenk と Laddaga (5) の方法を組み合わせて行った。すなわち、基本的な操作方法は Bringel と Hubert の方法に従ったが、菌の培養に B2 培地 [1.0% casein hydrolysate, 2.5% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.5% glucose, 2.5% NaCl, (pH 7.5)] (5) を、エレクトロポレーション後の選択培地に NYE 寒天培地 (1.0% casein hydrolysate, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) (6) を用いた。形質転換後の選択培地には、*E. coli* の場合は終濃度 40 mg/l のアンピシリンを、その他の菌の場合は終濃度 6 mg/l のクロラムフェニコールを添加した。nukacin ISK-1 を生産する形質転換菌のスクリーニングは、「4-2-3 プラスミドキュアリング」の方法と同様に、コロニーに直接 *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885 を含む軟寒天を重層し、生育阻止円の形

の形成の有無により判断した。

6-3 結果と考察

6-3-1 nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の再構築

nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の再構築の操作法を Fig. 6-1 に示す。また、用いた DNA 断片と制限酵素部位を Fig. 3-1, 2 に示す。まず、ORF1, *nukA* および *nukM* の一部を含む 3.6 kb の *Hind*III 断片を pUC18 にクローニングして構築した pPUH4 を *Sty*I および *Bam*HI で消化し、2.9 kb の *Sty*I-*Bam*HI 断片を得た。*nukM* と *nukT* の一部を含む 4.5 kb の *Xba*I 断片を pUC18 にクローニングして構築した pPUX5 も同様に *Sty*I および *Bam*HI で消化し、この部位に 2.9 kb の *Sty*I-*Bam*HI 断片を組み込み *nukA*, -*M*, -*T* および ORF1 を含む pUT1 を構築した。*nukA*, -*M*, -*T* および ORF1 を含む断片を *Pst*I 部位で切りだした後、pCU1 に *Pst*I 部位で組み込み、pCT1 を構築した。一方、*nukT*, -*F*, -*E*, -*G* および ORF7 を含む 6 kb の *Bcl*I-*Eco*RI 断片を、pUC18 の *Eco*RI および *Bam*HI 部位で組み込み、pUT7 を構築した。pUT7 を *Eco*RI で消化した後に末端を平滑化し、さらに *Mro*I で消化して 6 kb の *Mro*I-*Eco*RI (Blunt end) 断片を得た。本断片を pCT1 に *Mro*I および *Sma*I 部位で組み込み、約 12 kb の nukacin ISK-1 生合成遺伝子群 (*nukA*, -*M*, -*T*, -*F*, -*E*, -*G*, ORF1, ORF7) を再構築し、pCnuk と命名した。

得られた pCnuk を種々の制限酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動で組み換えが正確であるか確認した (Fig. 6-2)。*Eco*RI で処理した場合に約 5.2 kb の pUC1 と nukacin ISK-1 生合成遺伝子群を含む DNA 断片の他に、約 9.6, 1.2, 1.0 kb の DNA 断片が確認された。同様に、*Hind*III および *Xba*I で処理した場合、それぞれ約 6.5, 3.6, 3.1, 2.7 kb

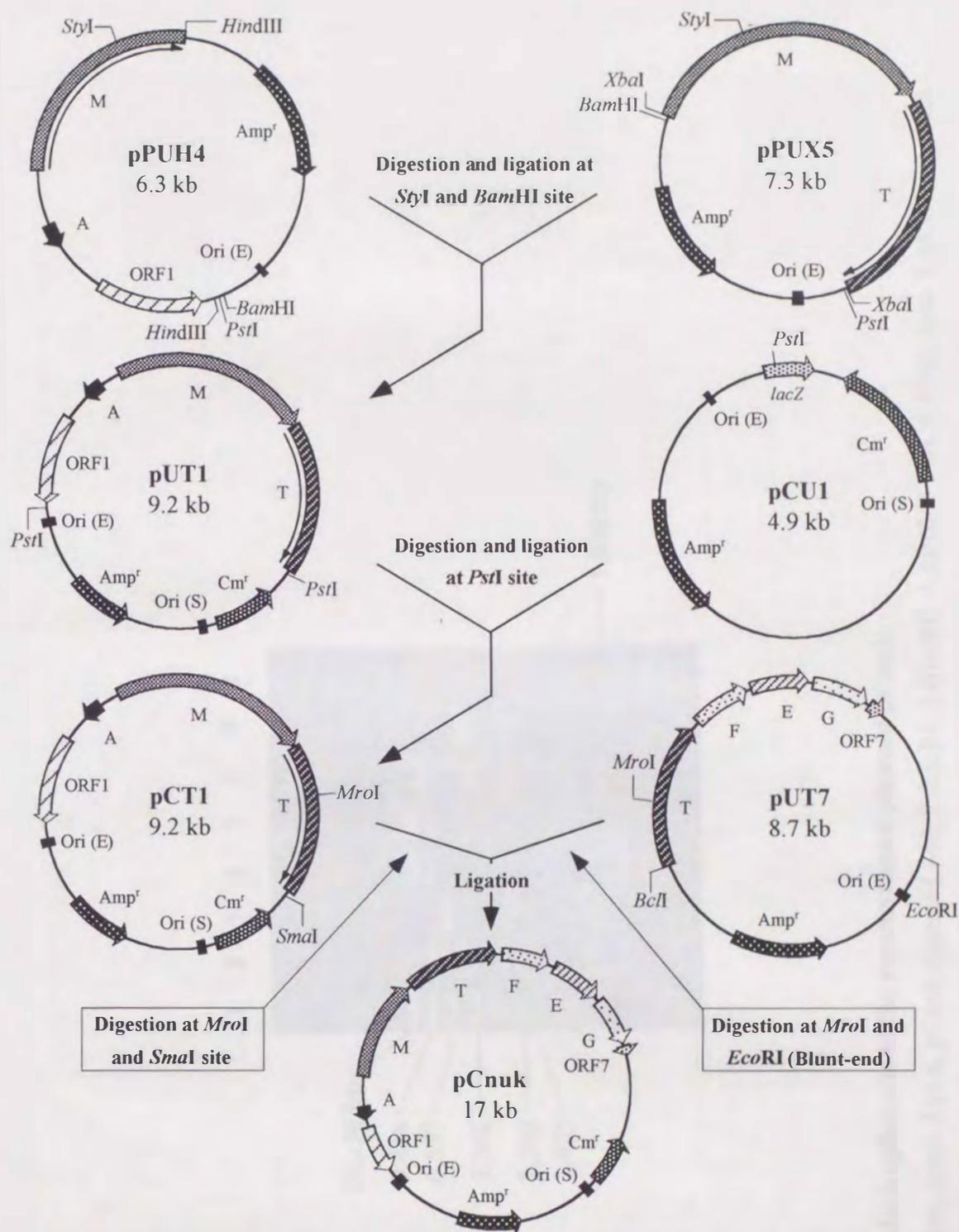


Fig. 6-1. Strategies used for re-constitution of nukacin ISK-1 biosynthetic gene cluster.

nukA, -*M*, -*T*, -*F*, -*E* and *nukG* are designated A, M, T, F, E and G, respectively. Ori (E) and Ori (S) indicate replication origin in *E. coli* and staphylococci, respectively. Amp^r and Cm^r indicate resistance genes for ampicillin and chloramphenicol, respectively.

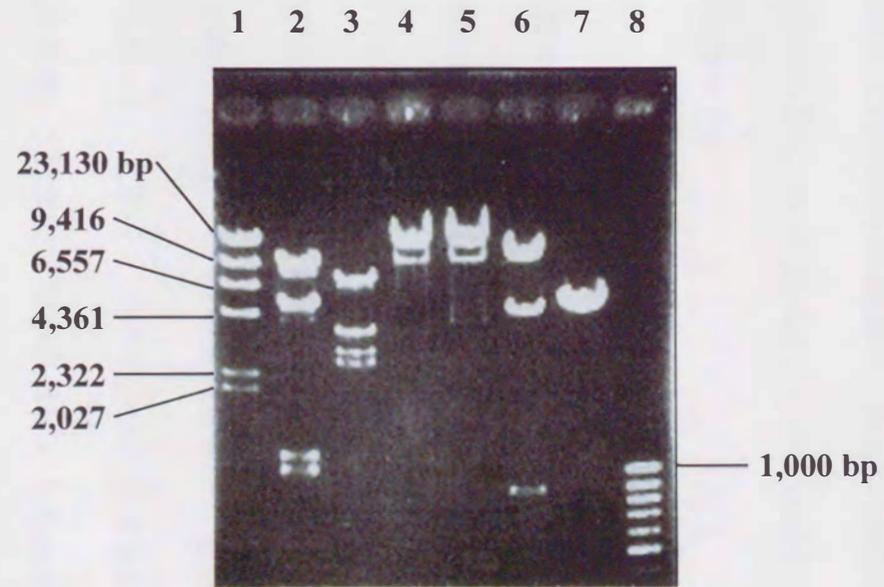


Fig. 6-2. Agarose gel electrophoresis of the reconstructed plasmid pCnuk.

Lane 1, λ -*Hind*III marker; lanes 2 to 6, pCnuk digested with 2 *Eco*RI, 3 *Hind*III, 4 *Mro*I, 5 *Pst*I, 6 *Xba*I; lane 7, pCU1 digested with *Pst*I; lane 8, 100-bp ladder marker.

および 11.6, 4.5, 0.9 kb の DNA 断片が確認された。一方、*MroI* および *PstI* で処理した場合、どちらも約 17 kb の DNA 断片が確認され、これらの結果は Fig. 3-1 の制限酵素地図と一致した。

6-3-2 *S. carnosus* および *L. plantarum* への形質導入

まず、*S. carnosus* TM300 および *L. plantarum* ATCC 14917^T を pCnuk で形質転換した。得られた形質転換菌をそれぞれ約 30 個選び、新たに MRS 寒天培地に移した後、寒天拡散法で生育阻止円の有無について調べた。しかしながら、生育阻止円を形成する形質転換菌は得られなかった。

S. carnosus および *L. plantarum* の形質転換菌は、菌体を直接 PCR 反応溶液に加えて鋳型とする *in situ* PCR 法によって、nukacin ISK-1 生合成遺伝子群が存在していることを確認した (data not shown)。さらに、*S. carnosus* について、プラスミドを抽出した後、*nukA* を含む約 720 bp の DNA 断片 (「2-3-1 SSP-PCR 法による nukacin ISK-1 構造遺伝子の増幅」の項を参照) をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションによってもその存在を確認した (data not shown)。しかし、これらの菌で nukacin ISK-1 が生産されなかったことから、この生合成にはさらに転写調節因子などが必要ではないかと考えられた。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、構造遺伝子が他の修飾酵素や自己耐性因子をコードする遺伝子と同じ DNA 鎖上に位置している (Fig. 3-13) (7, 8)。しかし、nukacin ISK-1 の場合、構造遺伝子のみが逆鎖にコードされていたことから (Fig. 3-2)、本生合成遺伝子群は DNA 組み換えを起こしていると推察される。転写調節に関与する遺伝子がさらに DNA 組み換えによって、nukacin ISK-1 生合成遺伝子群と全く異なる座に位置することも考え

られる。ノーザン解析による mRNA の確認などを行い、この原因について詳細に検討する必要がある。

6-3-3 *S. warneri* ISK-1 (Δ pPI-1) への形質導入

S. warneri ISK-1 (Δ pPI-1) も同様に形質転換を行い、nukacin ISK-1 の生産能を調べた。しかし、本菌を宿主とした場合でも、nukacin ISK-1 の生産能を回復した形質転換菌は得られなかった。転写調節因子が DNA 組み換えによって染色体に移ったのであれば、*S. warneri* ISK-1 (Δ pPI-1) を宿主とした場合、nukacin ISK-1 が生産されるはずである。このため、nukacin ISK-1 を生産しなかった原因の1つとして、プラスミドキュアリングにより pPI-1 上にコードされていた nukacin ISK-1 の発現に必要な遺伝子も欠失したことが考えられた。この場合、ショットガンクローニングによる必須因子の検索が有効であろう。すなわち、pPI-1 を適当な制限酵素で処理し、不和合性を起こさない pCU1 以外のベクターにクローニングして、pCnuk 保有菌にランダムに導入する。必須因子を含む DNA 断片が導入された場合、他の生合成遺伝子と相補して nukacin ISK-1 の発現が回復される。

さらに *S. warneri* ISK-1 (Δ pPI-1) の場合、クロラムフェニコールあるいはアンピシリンの存在下で液体培養では全く生育しなかった。nukacin ISK-1 が発現されなかったことと合わせて、この原因を解明することは重要である。原因として、プラスミドのコピー数が多く、菌体内で不要なタンパク質が大量に生産されたために生理機能のバランスを崩したことが考えられる。pCnuk の個々の遺伝子、または複数の遺伝子を同時に欠失させた後、*S. warneri* ISK-1 (Δ pPI-1) に再び導入することで、解明の手がかりがつかめるのではないかとと思われる。

6-4 小括

本章では、nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群の同定および機能解析を目的として、これまでにクローニングした nukacin ISK-1 の生合成遺伝子を含む DNA 断片を組み換え、生合成遺伝子を再構築して発現することを試みた。まず、これまでの nukacin ISK-1 生合成遺伝子群を含む種々の DNA 断片を組み換えて再構築し、*E. coli* と staphylococci で複製可能なシャトルベクター、pUC1 にクローニングした。再構築した nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群は、種々の制限酵素で処理をした後にアガロースゲル電気泳動を行い、そのバンドパターンをこれまでに作製した制限酵素地図と比較することで確認を行った。

次に、得られた組み換えプラスミド pCnuk を用いて *S. carnosus* および *L. plantarum* の形質転換に成功した。しかし、これらの形質転換菌は nukacin ISK-1 を生産せず、この生合成にはさらにヒスチジンキナーゼ遺伝子など他の因子が必要ではないかと推察された。そこで、nukacin ISK-1 非生産プラスミドキュアリング株、*S. warneri* ISK-1 (Δ pPI-1) を pCnuk で形質転換したが、nukacin ISK-1 を生産する形質転換菌を得ることはできなかった。この原因として、プラスミドキュアリングにより pPI-1 上にコードされていた nukacin ISK-1 の発現に必須な遺伝子も欠失したことが考えられ、必須因子の検索が必要であると思われた。さらに *S. warneri* ISK-1 (Δ pPI-1) の場合、クロラムフェニコールあるいはアンピシリンの存在下で液体培養では全く生育しなかった。プラスミドのコピー数が多く、菌体内で不要なタンパク質が大量に生産されたために生理機能のバランスを崩したことがその理由として考えられた。これらの原因の解明して nukacin ISK-1 の発現を行い、新たな nukacin ISK-1 の生合成因子の同定および機能不明な ORF の機能解析を行う必要がある。

6-5 参考文献

1. 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
2. Augustin, J., Rosenstein, R., Wieland, B., Schneider, U., Schnell, N., Engelke, G., Entian, K.-D. and Götz, F. (1992) Genetic analysis of epidermin biosynthetic genes and epidermin-negative mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Eur. J. Biochem.*, **204**: 1149-1154
3. Bringel, F. and Hubert, J.-C. (1990) Optimized transformation by electroporation of *Lactobacillus plantarum* strains with plasmid vectors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**: 664-670
4. Götz, F. and Schumacher, B. (1987) Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **40**: 285-288
5. Schenk, S. and Laddaga, R. A. (1992) Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **94**: 133-138
6. Babich, K., Engle, M., Skinner, J. S. and Laddaga, R. A. (1991) Deletion mutant analysis of the *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 mercury-resistance determinant. *Can. J. Microbiol.*, **37**: 624-631
7. Rincé, A., Dufour, A., Uguen, P., le Pennec, J.-P. and Haras, D. (1997) Characterization of the lacticin 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
8. Chen, P., Qi, F., Novak, J. and Caufield, P. W. (1999) The specific genes for lantibiotic mutacin II biosynthesis in *Streptococcus mutans* T8 are clustered and can be transferred en bloc. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 1356-1360

此其の概況に於ては、本邦の事情も亦、その概況に照準して、その要領を述べ、

第7章

総括

本邦の事情に於ては、本邦の事情も亦、その概況に照準して、その要領を述べ、

本邦の事情に於ては、本邦の事情も亦、その概況に照準して、その要領を述べ、

近縁の細菌に対して抗菌作用を示すタンパク質性の物質はバクテリオシンと呼ばれ、細菌ではグラム陽性および陰性菌に関わらず生産する菌が広く認められている。ランチビオティックはグラム陽性菌により生産されるバクテリオシンの1種で、通常のアミノ酸以外にランチオニン、3-メチルランチオニン、デヒドロアラニン、デヒドロブチリンなどの通常のタンパク質では例を見ない異常アミノ酸を含む独特のペプチドである。これらは耐熱性、耐酸性であり、中には酵素阻害活性、抗ウィルス活性、免疫増強作用など多様な生物活性を示すものも存在するため、その特性にランチオニン環構造が果たす役割が注目されている。このようなことからランチビオティックの増殖阻害作用機作のみならず生合成遺伝子の解析と生合成・分泌プロセスの分子機構についても欧米を中心に盛んに研究が行われている。

当研究室でぬか床から単離した *Staphylococcus warneri* ISK-1 はバクテリオシン、nukacin ISK-1 を生産する。これまでの nukacin ISK-1 の精製および構造解析の結果、本バクテリオシンは分子量 2.9 kDa の低分子ペプチドであることが明らかとなった。また、nukacin ISK-1 は少なくとも 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むランチビオティックであり、N 末端の 7 個のアミノ酸配列は lacticin 481 タイプのランチビオティックと相同性を示した。しかしながら、8 番目以降はエドマン分解が停止したため解析することができなかった。本研究では、nukacin ISK-1 の構造解明を目的として、その構造遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定など、遺伝子からのアプローチによる構造決定を行った。さらに、nukacin ISK-1 が lacticin 481 タイプのランチビオティックであれば、その生合成・分泌プロセス、特にランチオニンの形成機構は nisin と異なることが推測される。そこで、nukacin ISK-1 の生合成に関与する遺伝子群の同定を行い、その機能の解明も試みた。

これまでのアミノ酸組成などのペプチド構造解析から、nukacin ISK-1 はランチビオティックであることが示唆されていた。ランチビオティックは不飽和アミノ酸やチオエーテル結合を含むランチオニンなどの異常アミノ酸を有するため、ペプチドからの構造解析はきわめて困難である。nukacin ISK-1 についても、¹H-NMR や二次元 NMR による構造解析が試みられたが、多量の高純度サンプルが必要なため、完全な構造決定に至らなかった。そこで、第 2 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の nukacin ISK-1 の構造について推察した。*nukA* を含む DNA 断片をクローニングし、その塩基配列を解析した結果、nukacin ISK-1 プレカーサーペプチドは 30 個のアミノ酸より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されることが明らかとなった。また、活性型の nukacin ISK-1 は lacticin 481 タイプのランチビオティックと高い相同性を示し、その高次構造を推定した。

第 3 章では、nukacin ISK-1 の生合成機構の解明を行うために、生合成に関与する遺伝子群の塩基配列の決定を行った。その結果、nukacin ISK-1 の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。また、*nukA* および *nukG* の下流には、それぞれ ORF1 および ORF7 が位置していた。ORF1 翻訳産物は 2 成分調節系の転写制御因子と相同性を示した。しかし、通常の転写制御因子がもつシグナル (リン酸基) 受容部位として機能する N 末端側の 3 つのアミノ酸残基のうち、ORF1 翻訳産物では 1 つしか確認できなかった。また、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を周辺領域で見いだせなかったことから、本 ORF が遺伝子として機能しているか不明であった。一方、ORF7 の推定産物はデータベース上の既知タンパク質と相同性

を示さなかった。しかし、nukacin ISK-1 と同様に lacticin 481 タイプのランチビオティックである butyrivibriocin OR79A の 生合成遺伝子群にコードされる ORF4 と 28.3%の 相同性を示した。また、プロモーターおよびターミネーターの解析の結果、*nukM*, *-T*, *-F*, *-E*, *-G*, ORF7 はオペロンを形成していると予測され、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。

nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の局在性を明らかにすることは、今後、生合成遺伝子の機能解析を行うための戦略を決定する上で重要である。そこで、第4章では nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の局在性について検討した。これまでに報告されている多くのバクテリオシン生合成遺伝子群はプラスミドにコードされている。ISK-1 株は2種のプラスミド、pPI-1 (約 53 kb) および pPI-2 (約 2 kb) を保持していることが明らかとなっているが、pPI-2 をキュアリングしても nukacin ISK-1 の生産性に影響がないことが明らかとなっている。一方、pPI-1 と nukacin ISK-1 生産能の関係は未だ明らかとなっていない。*S. warneri* ISK-1 を変異原性剤であるアクリフラビンを含む培地で培養を行うことで、プラスミドキュアリングを行った。得られた nukacin ISK-1 非生産変異株からトータル DNA を抽出してアガロースゲル電気泳動を行ったところ、約 53 kb のプラスミド pPI-1 が欠失していた。また、*nukA* をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションの結果、この変異株から抽出した DNA ではシグナルが得られなかった。従って、nukacin ISK-1 生合成遺伝子群は、pPI-1 上にコードされていることが明らかとなった。また、プラスミドキュアリング株の性質について検討したところ、親株と比較して、nukacin ISK-1 の生産能および自己耐性能以外に変化はなく、本株は今後 nukacin ISK-1 の生合成機構の解明を行う際の宿主として重要な役割を果たすと考えられた。

第5章では、nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の構造、およびその機能についてより詳細に検討するため、mRNAの解析を行った。まず、ノーザン解析を行ったところ、*nukA* はモノシストロンとして転写されるのに対して、*nukM*, -*T*, -*F*, -*E*, -*G*, ORF7 はオペロンとして転写されることが明らかとなった。一方、ORF1の転写は確認されなかった。しかし、転写調節因子は、通常のタンパク質より転写量が微少であることも考えられ、他の解析法を用いて明らかにする必要がある。一方、プライマー伸長法により *nukA* の転写開始点の決定を行ったところ、翻訳開始コドンから 30 bp 上流に開始点が位置していた。転写開始点のさらに 8 bp 上流には大腸菌の σ^{70} 様の構成プロモーターが確認された。これまでに nukacin ISK-1 の生産は浸透圧によって促進され、この作用は少なくとも *nukA* の転写レベルで起こることが明らかとなっている。そこで、浸透圧ストレス条件下での *nukA* のプロモーターを解析したところ、通常の条件下と同じプロモーターであることが明らかとなった。また、通常、転写制御因子は標的遺伝子のプロモーターの上流領域に位置する反復または逆向反復配列に結合することが報告されている。しかし、*nukA* のプロモーター上流領域にはこのような配列は存在しなかった。*nukM*, -*T*, -*F*, -*E*, -*G*, ORF7 オペロンについてはプロモーター領域を決定することができなかった。

第6章では nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の同定および機能不明な ORF の機能解析を目的として、種々の菌で nukacin ISK-1 の発現を試みた。*Escherichia coli* および *staphylococci* で複製可能なシャトルベクター、pCU1 を用いて、これまでにクローニングした nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群を含む DNA 断片を組み換え、nukacin ISK-1 の生合成遺伝子群を再構築し、組み換えプラスミド pCnuk を得た。*Staphylococcus carnosus* TM300 および *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014^T を pCnuk で形質転換した。

しかし、nukacin ISK-1 を生産する形質転換菌は得られなかった。このことから、nukacin ISK-1 の生合成には、これらの菌に導入した ORF1, *nukA*, -*M*, -*T*, -*F*, -*E*, -*G*, ORF7 では不十分であり、例えばヒスチジンキナーゼ遺伝子など他の因子が必要であると推察された。そこで、第4章で得られた nukacin ISK-1 非生産プラスミドキュアリング株 *S. warneri* ISK-1 (Δ pPI-1) を pCnuk で形質転換した。しかし、本形質転換菌も nukacin ISK-1 を生産しなかったことから、nukacin ISK-1 の生合成に必須な他の因子が pPI-1 上にコードされていると推察された。今後、これらの形質転換菌のノーザン解析を行って mRNA の転写が行われているか確認した後、pPI-1 から必須因子をコードする遺伝子の検索が必要である。

以上、本研究では、*S. warneri* ISK-1 が生産する nukacin ISK-1 の遺伝子から構造解析を行い、nukacin ISK-1 が新規なランチビオティックであることを明らかにした。また、nukacin ISK-1 の生合成に関与する遺伝子群の解明を行い、これまでに報告されているランチビオティックと異なる生合成機構が存在することを示した (Fig. 7-1)。本研究で得られた成果は、いまだどのランチビオティックでも明らかになっていない異常アミノ酸の生合成機構の解析や、新規な転写調節機構の発見に寄与すると期待される。

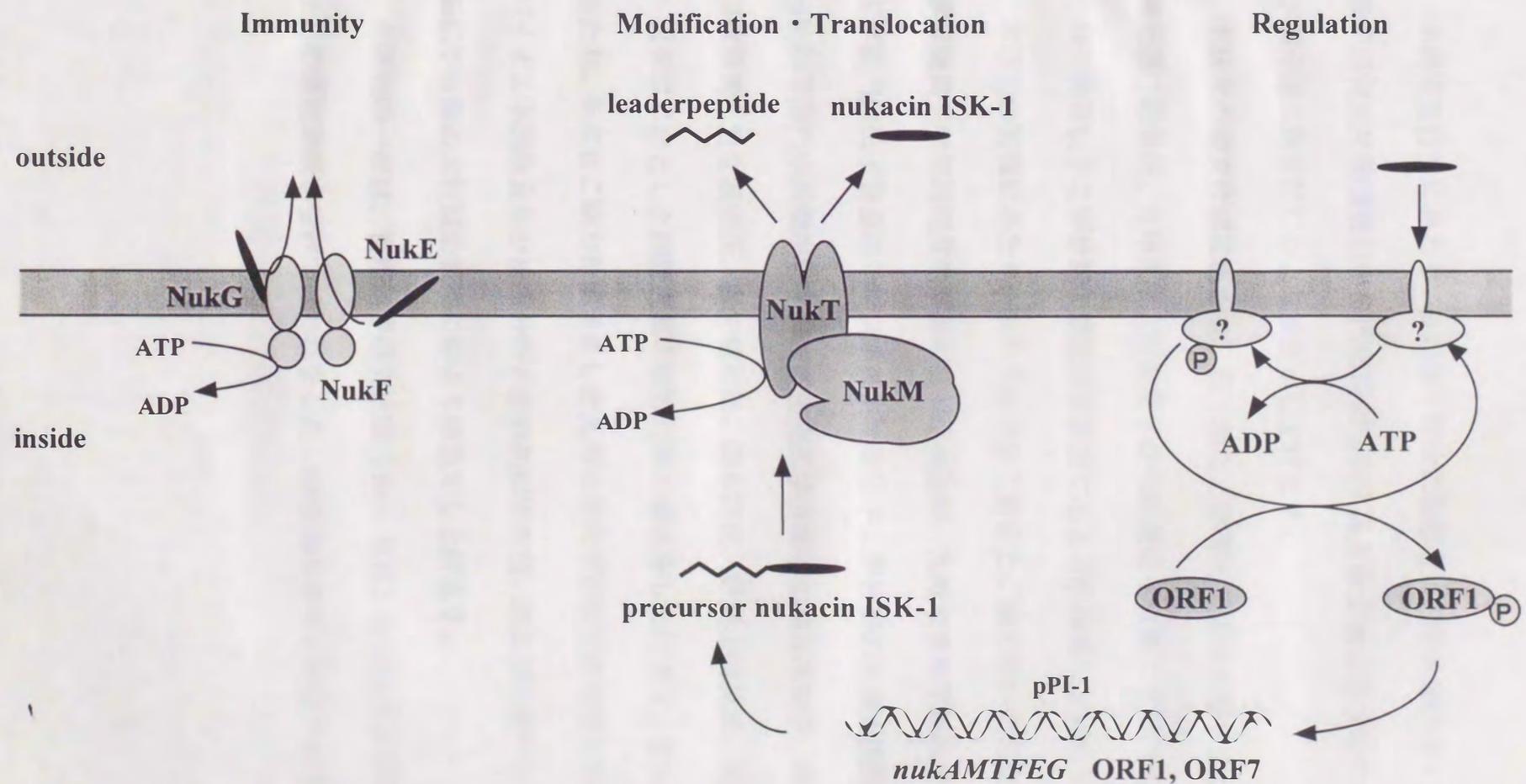


Fig. 7-1. Model for nukacin ISK-1 biosynthesis, self-protection (immunity) and regulation.

The functions of ORF1 and ORF7 are not clarified. The histidine kinase gene is not found in the nukacin ISK-1 biosynthetic gene cluster. Interaction of the proteins relating to the nukacin ISK-1 biosynthesis and self-protection was analyzed by Sashihara *et al* (unpublished data).

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御丁寧なご指導とご助言を賜りました九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座微生物工学分野の石崎文彬教授および園元謙二助教授に心より感謝申し上げます。

本研究の論文作成にあたり、御丁寧なご指導とご助言を賜りました石崎文彬教授、園元謙二助教授、九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門遺伝子資源開発学講座微生物遺伝子工学分野の緒方靖哉教授に心より感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、絶えず有益なご助言とご協力をいただきました熊本県立大学環境共生学部環境共生学科の松崎弘美講師、九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門遺伝子資源開発学講座微生物遺伝子工学分野の土居克美講師、同研究院生物機能科学部門応用微生物学講座微生物工学分野の小林元太助手、および同研究室の樋口敏将氏、足立朝穂氏、麻生祐司氏、橋本拓氏、野見山晴美氏、金政庸平氏、永尾潤一氏をはじめとした同研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。また、本実験の実施に当たり、多大なご協力を頂きました九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門食品バイオ工学講座食品分析学分野の松井利郎助教授、および同部門生物機能化学講座生物化学分野の木村誠助教授に心より感謝申し上げます。

本研究の一部は、笹川科学研究助成（1999年度）および日本学術振興会（2000年度）の研究助成を受けて行われました。同財団の方々に心より感謝を申し上げます。

