

D-サイクロセリン生産菌の自己耐性機構
— その生化学的および構造生物学的研究 —

2005

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科

野田 正文

【略語一覧】

aa	amino acid
ADP	adenosine 5'-diphosphate
Ala	alanine
ALR	alanine racemase
APS	ammonium peroxodisulfate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BAP	bacterial alkaline phosphatase
bp	base pair
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
C	competitive
CBB	coomassie brilliant blue
CD	circular dichroism
Da	dalton
DAAO	D-amino acid oxyase
DAP	diaminopimelic acid
DCS	D-cycloserine
DDL	D-Ala-D-Ala ligase
DEAE	diethyl amino ethyl
DMSO	dimethylsulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
EtOH	ethanol
GTP	guanosine 5'-triphosphate
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb	kilo base
KCX	lysine N ζ -carboxylic acid
kDa	kilo dalton
LADH	L-alanine dehydrogenase
LCS	L-cycloserine
LDH	lactate dehydrogenase
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulphonic acid
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NADH	β -nicotineamide adenine dinucleotide, reduced form
NC	non competitive
ND	not determined
NTP	nucleotide 5'-triphosphate
OG	orange G
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PEP	phosphoenol pyruvic acid
P _i	inorganic phosphate
PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PK	pyruvic acid kinase
PLP	pyridoxal 5'-phosphate
PMP	pyridoxamine 5'-phosphate
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylenediamine
Tricine	<i>N</i> -[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
UDP	uridine 5'-diphosphate
UV	ultra violet
VRE	vancomycin-resistant enterococci
VRSA	vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
XC	xylene cyanol

【目次】

序章	1
第一章 DCS生産菌由来alanine racemaseおよびD-Ala-D-Ala ligaseの生化学的解析 —生産菌におけるDCS標的酵素の酵素学的諸性質—	
第一節 緒言	6
第二節 <i>S. lavendulae</i> ATCC25233からのD-Ala-D-Ala ligase遺伝子のクローニング	7
第三節 <i>S. lavendulae</i> ATCC25233からのalanine racemase遺伝子のクローニング	10
第四節 DdlSの大量発現系ならびに精製系の構築	16
第五節 AlrSの大量発現系ならびに精製系の構築	17
第六節 DdlSの生化学的ならびに速度論的解析	19
第七節 円偏光二色性 (circular dichroism; CD) スペクトルを用いたALR活性測定法の構築	20
第八節 AlrSおよびK12Alrの速度論的解析	23
第九節 DCSおよびLCSによるALRのtime-dependent inactivation	24
第十節 DCS耐性付与因子としてのDdlSとAlrS	26
第十一節 総括	29
第二章 DCS生産菌由来alanine racemaseの構造生物学的研究 —X線結晶構造解析によるDCS耐性メカニズムの解明—	
第一節 緒言	31
第二節 AlrSの結晶化	31
第三節 AlrS結晶構造の全体的な特徴	32
第四節 AlrSの活性部位周辺構造	34
第五節 DCSおよびLCS結合型AlrSにおける活性部位とPLP誘導体の構造	37
第六節 DCS耐性の構造生物学的考察	39
第七節 総括	41

実験の部

1. 使用菌株	42
2. 使用プラスミド	42
3. 使用培地	42
4. 一般的操作	45
5. 第一章の実験	57
6. 第二章の実験	72
参考文献	75
学位論文の基礎となる原著	82
謝辞	83

【序章】

「人類の歴史は感染症の歴史」とも喩えられるように、人類は有史以来、疫病すなわち感染症に長い間苦しめられてきた。実際、感染症の治療手段がまったくなかった時代には、人々は教会や寺社仏閣を訪れ、疫病を治してもらおうと真剣に祈りを捧げていた。そんな時代、病に対する恐怖はきわめて大きかったものと容易に推察できる。現代に生きる私たちも、治療法が確立されていない病気やエマージングウイルス等による感染症の不安からは開放されてはいない。

19世紀になると、ドイツのコッホ (Robert Koch) とフランスのパスツール (Louis Pasteur) らの活躍が功を奏し、細菌学は大きく発展することとなる。コッホは、疾病は病原微生物によって引き起こされるものであると考え、炭疽病菌やコレラ菌を発見したのを切っ掛けに、1882年には死の病と恐れられていた結核の起因菌を明らかにした。一方、パスツールは病原菌の発見よりもワクチンの開発研究に力を入れ、炭疽病や狂犬病の予防接種法を確立した。二人の科学者の貢献により、微生物との戦いは新たな局面を迎え、病気治しは祈りから科学へとその姿を変えていった。

20世紀の始め、ドイツのエールリッヒ (Paul Ehrlich) はサルバルサンを合成し、梅毒への有効性を実証した。これが世界初の化学療法剤である。この時、彼が主張した「標的にする病原微生物だけを狙い撃ちする魔法の弾丸」という表現にもあるように、選択毒性を有する物質を合成し、それを薬として服用することで感染症を治療することができると理解されるようになった。

1928年秋、ワクチンの研究をしていたイギリスの細菌学者フレミング (Alexander Fleming) は、黄色ブドウ球菌を培養した古いシャーレに異変を発見した。彼が見たものは青カビが黄色ブドウ球菌のコロニーを溶解している姿であり、微生物が他の微生物を攻撃しているのを目の当たりにした。のちに *Penicillium notatum* と同定された青カビの産生するこの物質がペニシリン G であり、これが世界で最初に登場した抗生物質であった。

ペニシリン G が製薬会社で大量生産され始めたのを契機に、研究者たちは感染症治療薬としての新規抗生物質を求めて探索研究に乗り出し、ここに20世紀の化学療法の新しい歴史が始まった。天然素材としての抗生物質のみならず、それをリード化合物とした化学修飾によって、より強く、より広い抗菌活性を有するよう改良が重ねられ、現在では多種多様の抗生物質が登場している。フレミングによる抗生物質の発見により、20世紀の人類は、エールリッヒが描いた夢のごとく、感染症に対する魔法の弾丸を、一瞬、手に入れたかに見えた。

ところで、なにゆえ微生物は抗生物質を生産するのであろうか。諸説が提唱されているが、納得しやすい理由として、「抗生物質生産菌自身もこの抗菌力を利用している」というものが挙げられよう。おもな抗生物質生産菌は、細菌や放線菌、カビといった微生物である。放線菌は、大腸菌のような単細胞で生育するタイプとは異なり、栄養を求めて菌糸を伸ばして成長し、増殖するため、運動性を持たない。従って、自身の生育に障害となる微生物が周辺にいる場合には、これらを取り除くため、抗生物質を生産するという考え方である。

化学療法の進歩により、人類は長い間苦しめられていた病原菌に対し、革命を起こすことに

成功したが、1940年代半ばには、ペニシリンに耐性を示す黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が初めて出現した。この薬剤耐性菌の出現により、抗生物質の地位は揺らぎ始めてゆくことになる。

病原菌が抗生物質に対抗するための最大の戦略は、自らの突然変異による薬剤耐性の獲得である。生物は一般的に 10^{-6} ~ 10^{-7} 程度の割合で、環境変化に耐えられるように突然変異種を生み出すと言われている。出現率は低くとも、増殖速度の極めて大きい細菌は、変異種の子孫を非常に速い速度で増やすことが可能である。突然変異以外に、薬剤耐性の遺伝情報を菌同士で伝達する巧妙なシステムがある。この場合に大きな役割を果たしているものとして、プラスミド DNA が知られている。「染色体 DNA とは独立に存在し、かつ、自己複製能力を持つ DNA」と定義される「プラスミド」は、接合の際に相手細胞にその DNA を移入させることができる。プラスミド上に薬剤耐性の遺伝情報が載っている場合には、受容細胞は薬剤耐性をそのまま獲得する。

このように、微生物は自分に害を及ぼす物質に対して耐性を獲得していくこと、すなわち、周囲に生じた不利な環境に対してそれらを克服する能力を獲得することができ、これは生物が本来備えている進化の能力である。安易な考えに基づく抗生物質の濫用が、この進化を加速しているのも事実であり、弱い菌を滅ぼし、強い菌を鍛えているのは我々自身に他ならないと言えよう。

薬剤耐性菌の中で、現在深刻な問題のひとつとなっているのがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA; Methicillin-resistant *S. aureus*) の出現である。黄色ブドウ球菌は健康人の鼻腔や咽頭、皮膚などに広く認められる細菌であるが、傷があるとそこに進入して化膿を引き起こす。基本的にこの細菌は弱毒性のため、通常は病因となることは少ないが、老化や術後などで抵抗力の弱った患者に感染すると病原性が現れる。MRSA は、大きな病院で感染が拡大していく、いわゆる院内感染の問題において重要な菌であり、その弱毒性ゆえに健常人での保菌者の数が増加しているのも事実である。

MRSA の出現については、1961年にイギリスで最初に報告され、アメリカでは1970年代に、わが国では1980年代になって報告された。1980年代は、緑膿菌等のグラム陰性桿菌による感染症が日本国内に蔓延し、その治療薬としてセフェム系抗生物質が使用されるようになった時期である。腸内細菌に代表されるように、人は細菌と共存している。今や細菌叢は、その時代に使用される抗生物質と共に変化していると言っても過言ではない。新たな抗菌薬が大量に用いられるようになると、その細菌叢もそれに呼応するかたちで変化していくのである。

薬剤耐性菌の出現メカニズムについては、最近ではさまざまな研究があり、実際には耐性菌は一剤ずつ耐性を獲得するのではなく、一気に多剤耐性を獲得するケースが多い。近年、多剤耐性 MRSA が数多く検出されるようになったが、現在、その治療薬として活躍しているのが、1956年に開発されたバンコマイシンである。本抗生物質は、登場以来30年以上にも渡って耐性菌が出現しなかったことから、MRSA 感染症に対する「最後の切り札」と呼ばれ、その地位を不動のものとしてきた。しかし、1986年にパリでバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE; Vancomycin-resistant enterococci) が出現して以来、瞬時に欧州に拡散してしまった。VRE は、1998年には日本国内

の臨床現場でその存在が確認されている。2002年には、ついにバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA; Vancomycin-resistant *S. aureus*) が出現するに至り、「最後の切り札バンコマイシン」もその力を失いつつある。

現在、多種多様な細菌が薬剤耐性を獲得している。人類は次々と感染症治療薬を開発してきたが、細菌は新薬が登場するたびに薬剤耐性を身につけてきた。耐性菌が出現すれば、それに対処するための新しい薬を開発することは、創薬研究者にとって不可避なものとなっている。しかしながら、このような「いたちごっこ」にも限界がある。私たちは、薬の濫用の結果として出現する薬剤耐性菌の増加という現状を見つめ直すとともに、今後の医療のあり方を、根本的に見つめ直さなければならないところまで追いつめられているのかもしれない。

かつては不治の病と言われた結核だが、コッホが証明したように、この病気はグラム陰性細菌のひとつ *Mycobacterium tuberculosis* によって引き起こされる。抗生物質の誕生により、結核発病患者数は年々減少し続けてきたが、最近では再び上昇傾向にあり、全世界では毎年300万人の死亡者を数えるに至っている [1]。先進国での結核罹患率の上昇は、生活環境や食生活の変化による免疫力の低下などがその理由として挙げられるが [2]、多剤耐性結核菌の出現もその一因となっている [3]。多くの結核患者の罹患率や死亡率は、今や多剤耐性結核菌の出現によってかなり悪化しており、治療しにくい病気のひとつとなっている [4]。

ストレプトマイシンを始めとするアミノグリコシド系抗生物質以外の結核薬として、*Streptomyces* (*S.*) *garyphalus* や *S. lavendulae* によって生産される D-cycloserine (D-4-amino-3-isoxazolidone; DCS) が開発されている。DCS は、D-alanine (D-Ala) の単なる環状アナログであり (Fig. 1)、*S. garyphalus* において、生合成経路やそれに関連した酵素群が推測されているものの [5, 6]、未だその生合成経路は証明されていない。DCS の抗結核菌作用は優れているが、神経系に重篤な副作用を与えるため、多剤併用療法にその使用が限られている [7]。この副作用は、DCS がアゴニストとして *N*-methyl-D-aspartate 受容体に結合することによって引き起こされるものであるが、最近ではこの副作用を逆手に取り、アルツハイマー病 [8] やパーキンソン病 [9] などの、精神疾患の治療薬としての使用に注目が集まっている [10]。

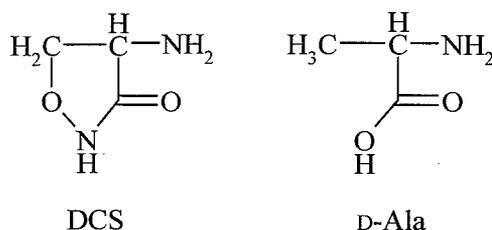


Fig. 1. DCSとD-Alaの構造類似性

細菌細胞壁の主要な構成要素であるペプチドグリカン層は、細菌に対して浸透圧抵抗性をもたらしている。ペプチドグリカン層の前駆体となるのが UDP-*N*-acetylmuramyl ペンタペプチドであり、この前駆体形成、および隣接する前駆体同士のクロスリンクの際に、D-Ala は架橋分子として

重要な働きをしている (Fig. 2) [11]。D-Ala を含め、D-型アミノ酸は基本的に栄養源としては自然界に存在しないため、細菌は alanine racemase (ALR) の触媒作用によって自身の細胞壁合成に必要な D-Ala を供給している。本酵素は補酵素として pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を必要とし、L-Ala と D-Ala との間のラセミ化反応を触媒している。ALR の働きによって生じた D-Ala は、D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) を形成するための基質として利用される [12]。D-Ala-D-Ala は、ATP 依存性酵素である D-Ala-D-Ala ligase (DDL) によってつくられた後、D-Ala-D-Ala adding enzyme の働きでペプチドグリカン前駆体に取り込まれる (Fig. 3) [11]。DCS は、細菌細胞壁のペプチドグリカン形成に必要な ALR および DDL の両活性を阻害することで細胞壁合成を阻害し、抗菌活性を示す。この両酵素は細菌特有のものであるため、新たな抗菌薬のターゲットとしての注目を集めている [13]。

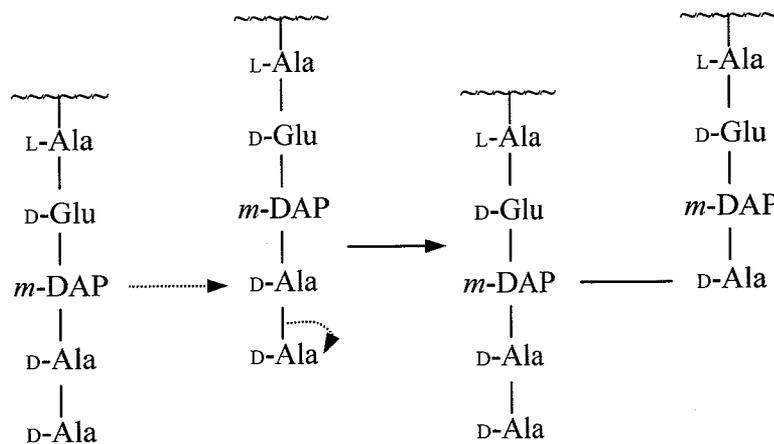


Fig. 2. ペプチドグリカン前駆体同士のクロスリンク反応

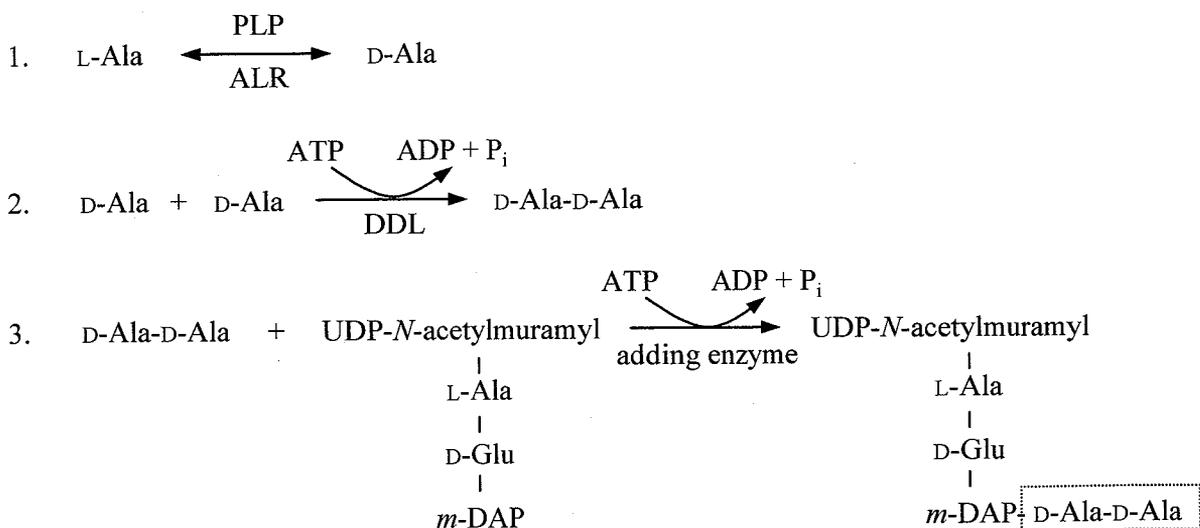


Fig. 3. D-Ala をとりまく3つの酵素

抗生物質生産菌は、自らが生産する抗生物質による致死作用から、自らを守る生体防御機構を備えている。これを自己耐性 (self-resistance) と呼ぶ。前述のように、ALR および DDL は DCS の標的酵素であるが、DCS 生産菌は自身の生産する DCS によって生育を妨げられることはない。抗生物質生産菌におけるその標的酵素の自己耐性メカニズムを解明することは、臨床現場で重篤な問題を与えている薬剤耐性菌の耐性メカニズムの起源を知り、かつ、今後その出現が加速するであろう新規薬剤耐性菌の耐性機構を予測する上でも重要である。さらに言えば、薬剤耐性菌にも有効な新規抗菌剤をデザインする上でも、きわめて有意義であると考えられる。

本研究では、DCS 生産菌 *S. lavendulae* ATCC25233 の染色体 DNA から、ALR および DDL をコードする遺伝子 (*alrS*, *ddlS*) をクローニングし、大腸菌ホスト・ベクター系による両遺伝子産物 (AlrS, DdlS) の大量発現系を確立後、それぞれ単一タンパク質として精製した。これら精製タンパク質を用いた生化学的および酵素反応速度論的解析により、AlrS および DdlS が DCS 生産菌における自己耐性因子として機能していることを明らかにするとともに、AlrS についてはそのX線結晶構造解析を行い、AlrS の DCS に対する耐性メカニズムを構造生物学的に明らかにした。

本学位論文では、この一連の研究の成果を2つの章に分けて執筆した。第一章は AlrS および DdlS の DCS 自己耐性因子としての機能を生化学的に解析した成果、第二章では AlrS の DCS 自己耐性メカニズムを構造生物学的に立証した成果を扱った。

【第一章】

DCS 生産菌由来 alanine racemase および D-Ala-D-Ala ligase の生化学的解析 —生産菌における DCS 標的酵素の酵素学的諸性質—

第一節 緒言

グラム陰性菌および陽性菌の両細菌グループにおいて、細菌細胞壁の構成成分であるペプチドグリカン層は、浸透圧に対する抵抗をもたらす主要な構造物である。ペプチドグリカン前駆体同士のクロスリンクに必要な架橋分子が D-Ala であるが、この D-Ala の前駆体への取り込みに関わる酵素は3つある。1つは L-Ala を D-Ala に変換する ALR、2つ目はその D-Ala 二分子を連結させて D-Ala-D-Ala ジペプチドを生成する DDL、3つ目の酵素はその D-Ala-D-Ala ジペプチドを UDP-N-acetylmuramyl トリペプチドに連結する D-Ala-D-Ala adding enzyme である (Fig. 3) [11]。

Escherichia (E.) coli と *Salmonella typhimurium* は、それぞれ2種類の ALR (*alr* and *dadX* in *E. coli*, *dal* and *dadB* in *S. typhimurium*) を有しており[14-16]、同化代謝あるいは異化代謝を触媒する働きをしている。例えば *S. typhimurium* では、*dal* と *dadB* のアミノ酸レベルでの相同性はおよそ40%程度である [17]。同化代謝 ALR は、上述のように細胞壁合成に必要な D-Ala を供給するためのもので、細胞内で恒常的に発現している。一方、異化代謝 ALR の発現は、生育環境中の L-Ala 量によって変化する。すなわち、L-Ala が細胞内に過剰に存在する場合には L-Ala を D-Ala に変換する働きを担っており、その後変換された D-Ala は D-amino acid oxydase、lactate dehydrogenase による反応を経て、ピルビン酸まで代謝される。

E. coli では、DdlA および DdlB と呼ばれる2種類の DDL が見つかっているが [18]、DdlA は染色体の中心領域から完全に離れた位置に存在しているため、*E. coli* における DDL 活性の本体は DdlB によるものであると考えられている [19]。

DCS はその構造の D-Ala に対する類似性のため、ALR および DDL を競合的に阻害すると考えられてきたが [18, 20]、ALR の阻害様式は、補酵素 PLP に対する time-dependent inactivation メカニズムによるものであるとする報告が成された [21]。また、DCS と同様にその光学異性体である L-cycloserine (LCS) も、ALR を始めとする PLP 依存性酵素を同様の機構で阻害するということがわかってきた [21-23]。

以前、本研究室において、DCS 生産菌のひとつである *S. garyphalus* からショットガンクローニングにより、DCS 耐性に寄与している遺伝子 (*orfB*) を含む 3.5-kb の DNA 断片がクローニングされた [24]。疎水プロット解析により、*orfB* の塩基配列から推測される遺伝子産物 (OrfB) は、10個の膜貫通ドメインを有する膜タンパク質であると予想され、このことから OrfB は DCS に対する薬剤排出膜タンパク質として機能しているものと考えられた。また、クローニングしたこの遺伝子断片上にある *orfB* の上流には、*Pseudomonas aeruginosa* の DDL [25] と 52.6%の相同性を示す、246

bp の不完全な open reading frame (ORF) が存在することがわかった。前述のごとく、DDL は DCS の標的酵素のひとつであり、この酵素をコードしている遺伝子が DCS 耐性因子と隣接して存在していることは非常におもしろい。また、DDL と同様に ALR も DCS の標的酵素のひとつであり、DCS 生産菌におけるこれらの酵素が DCS に対して耐性を示すか否かということは、大変興味の引かれるところである。

本章ではまず、DCS 生産菌 *S. lavendulae* ATCC25233 の染色体 DNA から *ddlS* および *alrS* 両遺伝子をクローニングし、両遺伝子産物の大量発現系と精製系の構築を行ったことについて述べる。次いで、精製タンパク質を用いた生化学的解析を通じ、DCS 生産菌における DCS 耐性について、*in vitro* と *in vivo* の両面から論じる。

第二節 *S. lavendulae* ATCC25233 からの D-Ala-D-Ala ligase 遺伝子のクローニング

DCS 耐性因子として *S. garyphalus* より発見された *orfB* [24] は、10個の膜貫通ドメインを有することから、DCS を細胞外へ排出する働きを担っているものと推測された。*OrfB* が他の DCS 生産菌においても保存されているか否かを調べるため、同じく DCS 生産菌である *S. lavendulae* ATCC25233 の染色体 DNA に対し、*orfB* をプローブとしたスクリーニングを行った。

まず、λファージ誘導ベクターを用い、10-20-kb 程度の長さの断片からなる *S. lavendulae* のゲノムライブラリーを作製した。得られたライブラリーに対して *orfB* をプローブとしたプライクハイブリダイゼーションを行い、*orfB* を含むと思われる約 14-kb の DNA 断片を得た。この断片のうち、*orfB* の周辺領域を含む 2,820 bp の塩基配列を決定し、Frame plot 解析 [26] を行ったところ、Fig. 4 に示すように *orf I*, *II*, *III* の3つの ORF の存在が明らかになった。決定した全塩基配列 (DDBJ accession number AB176675) を Fig. 5 に示す。

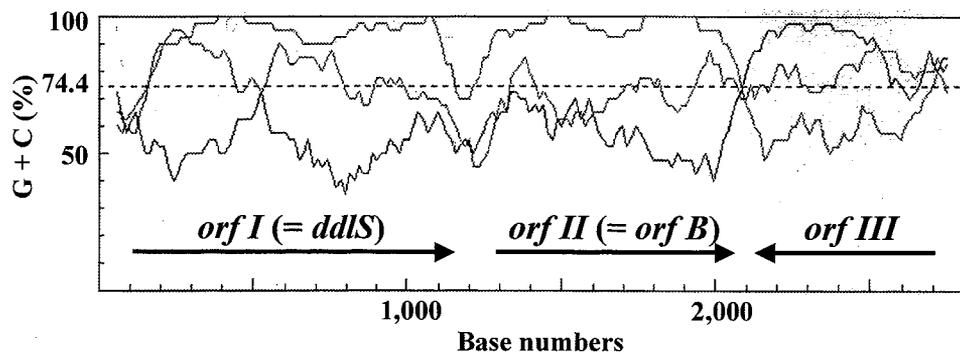


Fig. 4. *DdlS* 周辺領域の Frame plot

CTCCCCGCGAACGGCCGGTCCGGCCCTGCTGCCGTCCGCTCCGTTACTGGTGAGTTTCGGCCGGACGTCGTGTCCGGGAGG 80
GAGGGCGGCTTGCCGGCCAGGCCGGGACGACGGCAGCGCAGGCATGACCACTCAAAGCCGGCCTGCAGCACACGCCCTCC

ddlS →
M R I V I L C G G E S P E R D V S L A
GTACGGAAAGAGGACACAATACGGGCAATGCGAATCGTGATCTTGTGTGGTGGAGAAAGCCCGAACGAGACGTCTCCCTGG 160
CATGCTTCTCCTGTGTTATGCCCGTACGCTTAGCACTAGAACACACCACCTCTTTCCGGCCTTGCTCTGCAGAGGGACC

S G S S V A R A L L E R G H E V L L V D P A A G E P 240
CCTCGGGCAGCTCGGTGGCCCGCGGCTGCTGGAGCGTGGACAGAGGTGCTGGTTCGACCCGGCGGGGGAGCCC
GGAGCCCGTCGAGCCACCGGGCGCGGACACCTCGCACCTGTGCTCCACGACGACCAGCTGGGCCCGGGCCCTCGGG

V L A G P L H P G D V V D G F E V G K E P P A G H E R 320
GTACTGGCGGGACCCCTGCACCCGGGCGACGTGGTGGACGGGTTTCGAGGTCCGGAAGGAGCCCGGGCCGACGAACG
CATGACCCGCTGGGGACGTGGGCCCGCTGCACCACCTGCCAAGCTCCAGCCGTTCTCGCGGGCCGGCCGTTGCTGC

H G L R Q R M A A A F D G G A L P A L L R D A D L V F 400
GCACGGGCTCGGCGACGGATGGCGGCCCTTCGACGGCGGGGCCCTGCCGGCGCTCTGCAGCGACGGACCTGGTCT
CGTGGCCGACGCGCTGCCTACCGCCGGCGAAGCTGCCGCCCGGGACGGCCGAGGACGCGCTGCCTGGACCAGA

T A L H G G W G E D G W V Q E R L E A A G V R F T G 480
TACCCGCCCTCCACGGCGCTGGGGCGAGGACGGCTGGGTCCAGGAGCGGCTGGAGGCGGGCGGCGTCCGCTTACCGGC
AGTGGCGGGAGGTGCCCGGACCCCGCTCCTGCCAGCCACGTCTCGCGACCTCCGCCCGCCGAGCGAAGTGGCCG

A G S T A C A A A W N K E R A Q A V L A A A G V P V T 560
GCCGGCAGCAGGCTGCGCGGGCCGCGGAGGAGGAGGGCGCAGGCCGTTACTGGCGGGCGGGGGTCCCGTAC
CGCCGCTGTCGCGGACGCGCCGCGGACCTTGTTCCTCTCCCGCTCCGGCATGACCGCCGCCCGCCACGGGCACTG

E R A L W P A A A D E V P K E V R P L V A A G P V V A 640
CGAGCCCGGCTGTGGCCGGCCGCGGACGAGGTCCCAAGGAGGTGCCGGCGCTGGTCCGCGCCGACCGGTTGGTGG
GCTCGCGCGGACACCGGGCGGGCGCTGCTCCAGGGCTTCTCCACGCGGGCAGCAGCGCGGCTGGCCACCACC

K P V A D G S S V S V H R A D S L A E L E R L A P Q 720
CCAAGCCCGTCCGGACGGATCGAGCGTGTGCTGCCCGGGCCGACTCCCTCGCGAAGTGGAGCGCTCGCACCCGAG
GGTTCGGGCAGCGCTGCCTAGCTCGCACAGCCACGTGGCCCGGCTGAGGGAGCGGCTTGACCTCGCGGAGCGTGGCGT

M R A D G G D L L V E P F L S G R E F T V G V V G G Q 800
ATGGGGCCGACGGCGGATCTGCTGGTGGAGCCGTTCTGTCGGGACGGGAGTTACCGTGGGGTGGTGGGGGCCA
TAGCCCGGCTGCCCGCTAGACGACCACCTCGGCAAGGACAGCCCTGCCCTCAAGTGGCACCCACCACCCGCGGT

V L P V I E I E L S T P L F D Y A A K Y Q P G A V S E 880
GGTGTCCCGTGTATCGAGATCGAGCTGAGTACCGGCTGTTGACTACCGGCCAAGTACCAGCCGGGCGGGTACGG
CCACGAGGGGACTAGCTTAGCTCGACTCATGCGGCGACAAGCTGATGCGCGGTTTATGGTTCGGCCCGCGCCAGTCCG

V C P A R I P E E F A S R L Q Q L A L R A H E A L G 960
AGGTGTCCCGGCGGATCCCGAGGAGTTCCGCTCCCGTCCAGCAGTGGCCCTGCGCGCGCACGAGGCCCTGGG
TCCACACGGGCGGGCTAGGGCTCCTCAAGCGGAGGGCAGAGGTGCTGACCGGGACGCGCGCTGCTCCGGGACCCG

F G P H T Y S R A D F R C D A A G E P M C L E V N A L 1040
TTCGGCCCGCACACTACTCGCGCCGACTTCCGCTGTGACGCGGGCGGGGAGCCATGTGCTGGAGGTCAACGCCCT
AAGCCGGGCTGTGGATGAGCGCGGCTGAAGGCGACACTCGCCCGGCTCGGGTACACGGACCTCCAGTTGCGGGA

P G L T A T S L L P L G A S G A G W T Y A D L A E R I 1120
CCCCGGCTGACCGCCACCAGCCTGCTGCCGCTCGGGCCCTCGGGCCCGGCTGGACCTACGCCGACCTGGCCGAGCGCA
GGGCGGACTGGCGGTGCTCGGACGACGGGAGCCCGGAGGCGGGCGGACCTGGATGGGCTGGACCGGCTCGCGT

V S L A T R * *orf II* → M D A Q H S T L 1200
TCGTGCCCTCGCCACCCGCTGACCCACCGATCCGCTCTCAACCGATGTGGAAATCATGGATGCACAGCACAGCAGGCTC
AGCACAGGGAGCGGTGGCGACTGGTGCTAGGCGAGAGTTGGCTACACCTTTAGTACCTACGTGCTGCTGCTGCGAG

T L T R I S P L S N G T F L A S L G V A T F S F S F P 1280
ACACTGACAGCAATATCGCCGTTATCGAACGGGACGTTCTCGCCTCCCTCGGCGTCGCGACGTTCTCCTTACGCTTCCC
TGTGACTGTGCTTATAGCGCAATAGCTTGCCTGCAAGGAGCGGAGGGAGCCGACGCGTGCAGAGGAAGTCAAGGG

G T V W A L D G F G P W S A A G V R G V L A A L I A A 1360
GGGCACAGTGTGGGCGCTCGACGGGTTCCGGCCCGTGGAGCGCCGGGAGTCCCGGGGTCCTGGCCGCCCTGATCGCG
CCCGTGTACACCCGCGAGCTGCCAAGCCGGGACCTCGCGGCGCCCTCAGCGCCCGAGGACCGGGCGGACTAGCGCC

A A L L W T R A P A P G R A D W P A L L V V A A G C 1440
CGGCGGCCCTGTTGTTGACCCGGGACCGGCCCGGGGCGCGGACTGGCCCGGCTGCTGGTCTGCTCGCCCGGGTGC
CGCCCGGGACAACACTGGGCCGTGGCCGGGGCCCCGCGGCTGACCGGGCGGACGACCAGCAGCGGGCGGCCACG

G I G F P L L T T L A L Q T S S T A H S A V V I G L L 1520
GGCATCGGGTTCCTCGTGCACCACTCGCCCTGCAGACCTCGTCCACGGCCACTCGGCCGTCGTGATCGGCCCTGCT
CCGTAGCCCAAGGGCGACGAGTGGTGGGAGCGGGACGCTCTGGAGCAGGTGCCGGTGAAGCCGACGACTAGCCGGACGA

P M A T A T I A A L R T R R S P S A V F W A S A G T G 1600
GCCGATGGCCACGGGACGATCGCCGCGCTGCGCACCCGGGCGCTCCCCCTCGGCCGTGTTCTGGGCGTCAGCCGGGACCG
CGCTACCGGTGCCGCTGCTAGCGGGCGGACGCGTGGCCGGGAGGGGGAGCCGGCACAAGACCCGACGTCGGCCCTGGC

A L A V I V F T L S Q N R G R P T V A D L Y L F A A 1680
GGCCCTCGCCGTCGTGCTTACCCCTGTCAGAACCCGGGGGCGTCCACCGTCGGGGACCTCTACCTCTTCGGCCGC
CGCGGGAGCGGCACTAGCAGAAGTGGACAGGGTCTTGGCCCCGACGGGTGCCAGCGCTGGAGATGGAGAAGCGGCGG

L L I C A A G Y A E G G R V S A H M P G W R V I A W G 1760
CTCTGATCTGCGCCGCGGCTATGCCGAAGGGGGGCGGGTCTCCGCGCACATGCCGGGCTGGCGCGTATCGCCCTGGG
GAGGACTAGACGCGGCGCCGATACGGCTTCCCCCGCCAGAGGCGCGTGTACGGCCCGACCGGCACTAGCGGACCC

V V L A A P V N L A V S A W A L P H E P V H L T A K A 1840
GGTGGTCTCGCCGCGCCGCTGAACCTGGCGGTGTCGCGTGGGCGTCCCGCACGAGCCCGTGCACCTCACGGCGAAGG
CCACCACGAGCGGCGGGCCACTTGGACCGCCACAGGCGCACCCCGGAGGGCGTGTCCGGCACGTGGAGTCCCGCTTC

V V G M A Y I A A V S Q F G S F V L W Y Q G M G R I 1920
CCGTGGTGGGATGGCGTACATCGCCGCGGCTCGCAGTTCGGCTCGTTCCTCTGGTACCAGGGCATGGGCCGCATC
GGCACCACCCGTACCGCATGTAGCGGGCGCAGAGCGTCAAGCGGAGCAAGCAGGAGACCATGGTCCCGTACCCGGCGTAG

G V P R A S Q L Q L A Q P L L T L V W A V L L L G E H 2000
GGGGTCCCCGGGCGAGCCAGCTCCAGTGGCGCAGCCGCTGCTGACGCTCGTGGGCGTCCCTCTGCTCGGCGAACA
CCCCACGGGGCCGCTCGGTGCGAGTGCACCGGCTCGGCGACGACTGCGAGCAGACCCGGCAGGAGACGAGCCGCTTGT

L T A A A P V T P V V V L A C I V V T Q R A R A S * 2080
CCTTACGGGCGCGCGCGGCTGACGCCGCTCGTCTCGCTGCATCGTGGTACAGCAGCGGGCGGGCGTCTGTCAC
GGATGCGCGCGCGCGCCACTGCGGGCAGCAGCAGGAGCGGACGTAGCACCAGTGGTCCCGCGCCCGCAGCAGTGC

GGACTACGGGGTGGTGCGCCGAGCGGTGCGTCCCCGCCCCAGACGATCTCGAAGTACCTGACGCGCTCGTCTGTCCGG 2160
CCTGATGCGCCACCCACGCGGCTCGCCACGCGAGGGGCGGGTCTGCTAGAGCTTCATGGACTGCGCGAGCAGGACAGGCC
* A P P A G L P A D G G W V I E F Y R V R E D Q G

CGGCGGCATACCGCGCGCGCTCATGACGCGGTGGGACGCGAGGTGTGCTGGTGGCGTCCGCCCGGACGCGGGTGGCG 2240
GGCCGGCGTATGGCCCGCGGCACTACTGCGCCACCCGCGCTCCAACAGCACCAGCCGAGCGGGGCTGCGCCACCCG
A P R M G A A T M V R H S A L N D H D A D G R V R T A

CCGTGCGCGGGGCAACCCGAGCAGTTGCGCGAGGGCCTCGGAGCGTAGCCGCTGCCCGGGCCGTGGGGACGAGGCC 2320
GGCAGCGCGCCCGCTTGGCGTCTCAAGCGCTCCCGGAGCCTCCGCATCGCGCAGCGGGCCCGGCACCCCTGCTCCGG
G H A R A F R L L E R L A E S A Y G S G R A T P V L G

GTAGCCGATGGTACGACGAGCCGTTCTCGTCCGCGCTCCGTTGGAAGCCCGCGCCGATCGCGCGCCGCTCTCGCGCA 2400
CATCGGTACCACTCGCTCGGCAAGAGCAGGCGGCGAGGCACCTTCGGGCGCGCGGCTAGCGCGCGGCAGGAGCGCGT
Y G I T V C G N E D A A G H F G A G G I A R G D E R

GGCGATCTCGAAGTCCCGAACCGGTGGGGTCCCGGCTCTCCGCGGGGCGCCAGGTAGCGCGGGCGGCTAGCACG 2480
CGCCTAGAGCTTACGCGGTTGCCACCCCAAGTGGCCAGAGGCGCGCCCGCGGTCATCGCGCGCCCGGATCGTGC
L R I E F D G F P H P D G T E A R A A L Y R R A A L V

TCCCCGTCGGTGGGTACCGGGCGCCACCGGTCAGCGCGTCCGGCGCGCCCGCCACGACGCGTTCGGCTCCCGGGC 2560
AGGGGACGCCACCCATGGGCCCGGGTGGCCAGTCCCGCAGGCGCGCGGGCGTGGCTGCGCAAGCCGAGGGCCCG
D G D T P Y G P A W R D A A D P A G A M ← *orf III*

GGTCAGCGGGTGCAGTACGAGCCGTGCGGTACGAGATCCCCATGACAGGAGGACTATCACGGGGCGGACCCGGCCG 2640
CCAGTCCGCCACGTATGCTCGGCACGCCAGTGTCTAGGGGTACTGTCTCTGATAGTGCGCCCGCTGGGCCGGC

ACGGGTATTTTCGACCGGCCCGCCAGGCTGGTGGTGGCACCGTCCGTCGCCGATCACGGGGCCGCTTGGCCGTGGGG 2720
TGCCCATAAAGTGGCCGGCCGTCGGACACGCCACCGTGGCAGGCGAGGGCTAGTGGCCCGGGCAACCGGCACGCC

CCGGACCGGACGGGCGGCCGAGGCGGCGGATGGACGGGCGGACACCCATGGACACCGGGTGGCCGTC 2800
GGCTGGCTGCCCGCGGGCTCCGGCTGCCCGGCCCTACCTGCCCGGCTGTGGGGTACCTGTGGCCACCGGCAG

CGGTAGCCGTCAAGGTGATC 2820
GCCATCGGCAGTTCCTACTAG

Fig. 5. *DdlS* 周辺領域 (2,820 bp) の全塩基配列と推定される ORF のアミノ酸配列

これらの ORF のうち、中央に位置する *orf II* (903 bp) は、300 aa からなる分子量約 31 kDa のタンパク質をコードしていた。塩基配列から予測されるタンパク質のアミノ酸配列は、*S. garyphalus* 由来の *orfB* と 98.8% の相同性を示したことから、この *orf II* も *orfB* と同じ機能を有していると言える。このように、DCS 生産性の両 *Streptomyces* 属放線菌では、*orfB* が保存されていることが分かった。*Orf II* の下流に位置している *orf III* (456 bp) は、151 aa からなる分子量約 16 kDa のタンパク質をコードしていた。本遺伝子によってコードされるタンパク質は、*S. garyphalus* においてクローニングされた *orfB* を含む遺伝子断片上で、その下流側に存在している *orfC* によってコードされるタンパク質と 89.0% の相同性を示した。*Orf II* の上流側にある *orf I* (1,038 bp) によってコードされる遺伝子産物は、*P. aeruginosa* 由来の DDL [25] と 42.0% の相同性を示した。序論で述べたように、*S. garyphalus* よりクローニングされた遺伝子断片上の *orfB* の上流にも、*P. aeruginosa* の DDL と 52.6% の相同性を示す 246 bp の不完全な ORF が存在していたが、この不完全な ORF の遺伝子産物のアミノ酸配列は、その配列が明らかになっている領域においては、*S. lavendulae* の *orf I* と完全に一致していた。*Orf I* によってコードされるタンパク質 (345 aa) の推定分子量は約 36 kDa で、先の節でも述べるように、精製された本遺伝子産物が DDL 活性を示すことから、以後のページでは *orf I* を *ddlS*、DDL 活性を有するその遺伝子産物を *DdlS* とそれぞれ呼ぶこととする。

DdlS と各種細菌の DDL との間で、アミノ酸配列レベルのアライメント解析を行ったところ (Fig. 6)、ATP および基質である D-Ala の認識に重要であるとされる残基は [27]、Leu³²⁰ を除いて全て保存されていた。この Leu³²⁰ は、*E. coli* や *Haemophilus influenzae* の *DdlB* では Leu²⁸² に相当するものであるが、他の DDL ではこの Leu 残基は Met 残基に置き換わっている。DDL において保存されているコンセンサス配列である ω -loop の配列は Ser (or Ala or Thr)-Lys-Tyr-Ile (or Met or Ser) であるけれども [28]、*DdlS* における ω -loop の配列は Ala-Lys-Tyr-Gln であった。 ω -loop における Gln 残基の存在は、バンコマイシン耐性菌から発見された、D-Ala-D-Ser ligase 活性を有する VanC に属するタイプの ligase の特徴である [28, 29]。

第三節 *S. lavendulae* ATCC25233 からの alanine racemase 遺伝子のクローニング

ALR 遺伝子をクローニングするため、ゲノム解析プロジェクトにより全塩基配列が決定されている *S. coelicolor* A3(2) M145 [30] の putative ALR 遺伝子をプローブとして用い、*S. lavendulae* ゲノム DNA に対するサザン解析を行った。サザン解析の結果得られた 2.8-kb の BamH I 断片上には、*S. coelicolor* の putative ALR 遺伝子に相同性を示す不完全な ORF が存在していた。そこで、chromosomal-walking 法によってこの不完全な ORF の上流部分を取得してその塩基配列を決定し、最終的に、ALR 遺伝子と相同性を示す ORF を含む、3,296 bp の塩基配列を決定することができた (DDBJ accession number AB176676) (Fig. 7)。

		D-Ala1			
Sla	DDL	1	-----MRIVILCGGESPE RDVSLASGSSVARALLERGHEVLLVDPAAAGEPVLAGPLHPG-DVV	57	
Eco	DdlA	1	--MEKLRVGI VFGGKSAE HEVSLQSAKNIVDAIDKSRFDVLLGIDKQGWVSDASNYLLNA	61	
Sty	DdlA	1	--MAKLRVGI VFGGKSAE HEVSLQSAKNIVDAIDKTRFDVLLGIDKAGQWHVNDAAENYLQNA	61	
Eco	DdlB	1	---MTDKIAVLLGGTSAE RE VSLNSGAAVLAGLREGGIDA YPVDP-----	42	
Hin	DdlB	1	MNLKQEKIAVLLGGTSAE RE VSLNSGKAVLEALLKQGYNAHPIDP-----	45	
Efa		1	----MKIILLYGGRSE EHDVSVLSAYSVLNAIYYKYVQVQLVFTSKDQGWVKGPLLSERPQN	58	
Ega		1	----MKIILLYGGRSAE HDVSVLSAFSVVNAVYYNYVQVQLVMTTRDGOWLKGSLLTEAPTS	58	
Ehi		1	----MKITLLYGGRSAE HDVSVLSAFSVLNAIYYTYVQVQLIFISKEGQWVKGPLLTEKPTS	58	
		* * * * *			
		D-Ala1			
Sla	DDL	58	DGFEVGKEFPAGHERHGLRQRMAAFDGGALPALLRDADLVFTALH GCGWGEDGWVQERLEAAG	120	
Eco	DdlA	62	DDPAHIALRPSATSLAQVPGKHEH QLIDAQNGQPLPTVDVIFP VHGT LGEDGSLQGM LRVAN	124	
Sty	DdlA	62	DDPAHIALRPSAISLAQVPGKHQ QLINAQNGQPLPTVDVIFP VHGT LGEDGSLQGM LRVAN	124	
Eco	DdlB	43	-----KEVDVTQLKSMG -----FQKVFIALH GRGGE DGT LQGM LELMG	80	
Hin	DdlB	46	-----KEYNVANLKKDG -----FNRAFNILH GRGGE DGT MQGL LEQIG	83	
Efa		59	KEVLHLTWAQTPEETGEFSGKRIS PSEIYE EE-----AI VFPV LHGPNGE DGT IQGF METIN	115	
Ega		59	KEVLNLTDS-----AYQGTPIQ PGEI KEED-----AI VFP LLHGPNGE DGT IQGF LETIG	108	
Ehi		59	KEDLHLTWDPSGKVTDGFTGRVIN PGEI KEEG-----TI VFPV LHGPNGE DGT IQGF LETLN	115	
		* * * * *			
		ATP			
Sla	DDL	121	VRFTGAGSTACAAAWN KERAQAVLAAAGVPVTERALWPAAADEVPK-----EVRPLVAAGPVVA	179	
Eco	DdlA	125	LPFVGSVDVLSAACMDK DVKRLLRDAGLN IAPFI TL TRANRHNIS ---FAEVESK LGLPL FV	184	
Sty	DdlA	125	LPFVGSVDVLSAACMDK DVKRLLRDAGLN IAPFI TL TRNRHAFS ---FAEVESR LGLPL FV	184	
Eco	DdlB	81	LPYTGSGVMASALSMD KLRSLKLLWQAGLP VAPWVALTRA EFKGLSDKQLAEI SALGL PVIV	143	
Hin	DdlB	84	LPYTGCGVMASALTMD KMRTKMLWKAFGLP VADMKVVTRE TFSELDP---QAVVAK LGLPL MV	143	
Efa		116	MPYVGAGVLSVNAMDK KIMTKYLLQTVGIP QVPPV PVLRS DWKGNPKEVFE KCEGS LIYPV FV	178	
Ega		109	MPYVGAGVLSACGMDK KIMTKYILQAAGIP QVPPV PVLKN YWKENPKKVFE QCEGS LLYPM FI	171	
Ehi		116	LPYVGAGVLSACAMDK KIMTKYILQAAGVP QVPPV PVLKN QWKENPKKIFD QCEGS LLYPM FV	178	
		* * * * *			
		ATP D-Ala1			
Sla	DDL	180	KPVA DGSSVSVHRA DSLAE LERLAPQMRADGGDLLVEPFLSGREFTVGVVGGQVLPVIE---I	239	
Eco	DdlA	185	KPAN QSSVGVSKVT SEEQYAI AVDLA FEFDHKVI VEQGIKGREIECAVLGNDNPQASTCGEI	247	
Sty	DdlA	185	KPAN QSSVGVSKVANE AQYQ AVALA FEFDHKVV VEQGIKGREIECAVLGNDNPQASTCGEI	247	
Eco	DdlB	144	KPSR EGSSVGM SKVVAENALQDALR LAFQHD EEVLI EKWLSGPEFTVAILGEEI LPSIR---I	203	
Hin	DdlB	144	KPSL EGSSVGLTKV KAVEELK SAVEY ALKFDNT ILIEEW LAGDELTPVLDN QVLP PAIR---I	203	
Efa		179	KPAN MGSSVGI SKVENREELQ EAL EEAFY DARAI VEQGI EAREIE VAILG NEDV RTTLP GVE	241	
Ega		172	KPAN MGSSVGI TKAENREELQ NALQ EAYRY DTRAI VEQGI EAREIE VAVL GNE DVRTT MPGEI	234	
Ehi		179	KPAN MGSSVGI SKAENREELQ NALA LAYQY DSRAI VEQGI EAREIE VAVL GNE DVRTT LPGEV	241	
		* * * * *			
		ATP D-Ala2			
Sla	DDL	240	ELSTPLFDYAAKY QPGAVSEVCPARIPEEFASRLQQLALRAHEALGFGPH TYSRAD FRCDAA	301	
Eco	DdlA	248	VLTSDFYAYDTKYI DEDGAKVVVPAI APEINDKI RAIAVQAYQ TLGC--AGMARV DVFLT PE	308	
Sty	DdlA	248	VLNSEFYAYDTKYI DDNGAQVVVPAI PSEVNDKI RAIAI QAYQ TLGC--AGMARV DVFLT AD	308	
Eco	DdlB	204	QPSGTFYDYEAKY LS-DETQYFCPAGLEASQ EANLQALVLKAW TTLGC--KGWGR IDVMLD SD	263	
Hin	DdlB	204	VPEGEFYDYEAKY IS-DNTQYFCPAGLTP EREQALSTLVKRAY DAVGC--RGWGR IDVMCD AK	263	
Efa		242	VKDVAFYDYDAKYI N-NTIEMQIPAHV PEEVAHQAEYAKKAY IMLDG--SGLSRC DFFLT SK	301	
Ega		235	VKDVAFYDYNSKY LD-NKIEMQIPAI PEETQAKAQEF AKKAYTMLGG--SGLSRC DFFLT NK	294	
Ehi		242	VKDVAFYDYDAKYI N-NKIEMQIPAEV PEEVYQKAEYAKIAY TMLGG--SGLSRC DFFLT NK	301	
		* * * * *			
		ATP ATP D-Ala2 D-Ala2			
Sla	DDL	302	GPMCL EVN ALPGLTAT SLPLGASGAGWTYADLAERIVSLATR-----	345	
Eco	DdlA	309	NEVVINE INTLPGFTNI SMY PKLWQASGLGYTDLI TRLIELALERHAADN ALKTTM-	364	
Sty	DdlA	309	NEVVINE INTLPGFTNI SMY PKLWQASGLGYTDLI SRLIELALERHTANN ALKTTM-	364	
Eco	DdlB	264	GQFYL LEAN TSPGMTSH SLVPMARQAGS FSQLVVRILELAD-----	306	
Hin	DdlB	264	GNFR L EVN TNPGMTSH SLFPKSAATV GISFEQLVVKILELSL-----	306	
Efa		302	NELFL NELN TMPGFTDF SMY PLLWENMGLKYS DLIEELIQ LALNRFK-----	348	
Ega		295	NELFL NELN TMPGFTDF SMY PLLW EKTGLPYG DLIEELIQ LGVNRFK QRQA FLTDVE	351	
Ehi		302	NELFL NELN TMPGFTDF SMY PLLWENMGLK YGDLEELIQ LGINRFN QRQGF FNANE	358	
		* * * * *			

Fig. 6. *S. lavendulae* 由来 DdlS と種々の細菌由来 DDL との アミノ酸配列におけるアライメント (ClustalW) 左端の表記はそれぞれ *E. coli* (Eco DdlA, Eco DdlB), *S. typhimurium* (Sty DdlA), *Haemophilus influenzae* (Hin ddb), *Enterococcus faecalis* (Efa), *E. gallinarum* (Ega), *E. hirae* (Ehi) 由来 DDL を示す。全アミノ酸配列に共通して保存されている残基にはアスタリスク記号 (*) を付けている。

AGACGGCCTAGGGGTGTCCGGCGAGGTGGGGTGTGCCCCGCTGCCGTGGGGGGCCACCAGCCCTCGGACGCCCGGGG 80
 TCTGCCGGATCCCCACAGCCCGCTCCACCCACAGCGGGCGACGGCAGCCCCCGGGTGGCCGGAGCCTCGGGCGCCCC

alsS → M N E T P T R V Y A E I D L D

CGGCAACCGGCACGGGTTCTGAGAGACTGTGGGCGATGAACGAGACACCACGCGCGTGTACGCCGAGATCGATCTTGAC 160
 GCCGTGGCCGTGCCAAGACTCTCTGACACCCGCTACTTGCTGTGGCTGCGCGCACATGCGGCTCTAGCTAGAAGT

A V R A N V R A L R A R A P R S A L M A V V K S N A Y 240
 GCGGTACGGGCGAACGTGCGCGCACTGCGCGCACGGGCGCCGGTCCGCGCTGATGGCCGTCTCAAGTCAACGCCTA
 CGCCATGCCCGCTTGACACGCGGTGACGCGGTGCCCGGGCGCCAGGCGGACTACCGGCAGCAGTTCAGCTTCCGGAT

G H G A V P C A R A A Q E A G A A W L G T A T P E E A 320
 CGGGCACGGGCGCTCCCGTGTGCCCGCGGGCCAGGAGCCGGGGCCGCTGGCTGGGCACCGCCACCCCGAGGAGG
 GCCGTGCCCGGACAGGACACAGGGCGCGGGTCTCCGGCCCCGGCGACCGACCCGTGGCGGTGGGGGCTCCTCC

L E L R A A G I Q G R I M C W L W T P G G P W R E A 400
 CGCTGGAGCTGCGCGCCGCGGGATCCAGGGCCGGATCATGTGCTGGCTGTGGACCCCGGGCGGGCCCTGGCGGGAGGCC
 GCGACCTCGACGCGGGCGGCCCTAGGTCCCGGCTAGTACACGACCGACACCTGGGGCCCGCCGGGACCGCCCTCCGG

I E T D I D V S V S G M W A L D E V R A A A R A A G R 480
 ATCGAGACCGACATCGAGCTCTCCGTGAGCGGATGTGGGCGCTGGACGAGGTCCGCGCGCCGCCCGCGCGCCGCGG
 TAGCTCTGGCTGTAGCTGACAGGCGAGTCCCGCTACACCCGCGACCTGCTCCAGGCGCGCGGGCGCGCGCGCGG

T A R I Q L K A D T G L G R N G C Q P A D W A E L V G 560
 TACCGCCGGATCCAGCTCAAGCCGACACCGGCTCGGCGCAACGGCTGCCAGCCCGCGACTGGGCGAGCTCGTCG
 ATGGCGGCGCTAGTTCAGTTCGGCTGTGGCGGAGCCGGCGTTCGCCAGGTCGGGCGGCTGACCCGGCTCGAGCAGC

A A V A A Q A E G T V Q V T G V W S H F A C A D E P 640
 GCGCGGCGTCCCGCGCAGGCGGAGGGCACCGTCCAGGTCACCGGCGTTTGGTCGCACTTCGCTGCGCCGACGAGCCG
 CGCGCCGCGCAGGCGCGCTCCCGTGGCAGGTCCAGTGGCCGCAAACCAGCGTGAAGCGGACGCGGCTGCTCGGC

G H P S I R L Q L D A F R D M L A Y A E K E G V D P E 720
 GGCCACCCTCCATCCCGTCCAGCTCGACGCTTCCCGGACATGCTGGCTACCGGAGAGGAGGGCGTCGACCCCGA
 CCGGTGGGAGGTAGGCGAGTTCGAGCTGCGGAAGGCGCTGTACGACCGGATGCGCTCTTCTCCCGCAGCTGGGGCT

V R H I A N S P A T L T L P E T H F D L V R T G L A V 800
 GGTCCGGCACATCGCCACTCGCCCGCGACCCCTCACCTCCCCGAGACCCACTTCGACCTCGTCCGACCGGCGCTGGCCG
 CCAGCCGTGTAGCGGTTGAGCGGGCGCTGGGAGTGGGAGGGGCTTGGGTGAAGTGGAGCAGGCGTGGCCGGACCGGC

Y G V S P S P E L G T P A Q L G L R P A M T L R A S 880
 TCTACGGCGTCTCGCGTCCCGGAGCTCGGCACCCCGCCAGCTGGGCTGCGGCGCGGATGACCTCAGGGCTCC
 AGATGCCGAGAGCGGCGAGGGGCTCGAGCCGTGGGGCGGGTCCGACCCGAGCGCGGGCGTACTGGGAGTCCCGGAGG

L A L V K T V P A G H G V S Y G H H Y V T E S E T H L 960
 CTCGCGTGGTCAAAGACCGTCCCCCGCGGACGGCGTGAAGTACGGCCACCACTACGTCACCGAGTCCGAGACGCACCT
 GAGCGGACCACTTCTGGCAGGGCGGCGGCTGCCGCACTCGATGCCGTTGGTGTGATGCAGTGGCTCAGGCTCTGCGTGA

A L V P A G Y A D G I P R N A S G R G P V L V A G K I 1040
 CGCGCTCGTCCCGCGGCTACCGCGACGGCATCCCGCGCAACGCCCTCCGGCCGCGGGCCCGTGTCTGTCGCCGGGAAGA
 GCGCGAGCAGGGCGGCGGATGCGGCTGCCGTAGGGCGGTTGCGGAGGCGGCGCCCGGGCACGAGCAGCGGCCCTTCT

R R A A G R I A M D Q F V V D L G E D L A E A G D E 1120
 TCCGGCGGGCCCGGGCGGATCGCCATGGACAGTTCGTGTTGGACTCGGCGAGGACCTCGCCAGGCGGGCGACGAG
 AGGCCGCCCGGGCGGCGGCTAGCGGTACCTGGTCAAGCAGCACCTGGAGCCGCTCCTGGAGCGGCTCCGCCCGCTGCTC

A V I L G D A E R G E P T A E D W A Q A A H T I A Y E 1200
 GCCGTATCCTCGGTGACGCCGAGCGGGCGAGCCACCGCGAGGACTGGGCTCAAGCGGCGCACACGATCGCGTATGA
 CGGCAGTAGGAGCCACTGCGGCTCCGCGGCTCGGGTGGCGGCTCCTGACCCGAGTTCGCGCGTGTGCTAGCGCATACT

I V T R I G G R V P R V Y L G G * 1280
 GATCGTACCCGTATCGGAGTTCGGGTGCCCGGGTCTACCTCGGCGGCTGAGCTGAGTGAGGACGGCGACGTCGTGAGC
 CTAGCAGTGGGCATAGCCTCCAGCCACGGGGCCAGATGGAGCCGCGACTGCACTACTCCTGCGGCTGCAGCACTCG

orf 2 → S E N W R K A G W A G A A I G V I A A G A A 1360
 GGGAACGGGTCGTGAGCGAAGTGGCGAAGGCCGGTGGGCGGGCGCCGATCGCGCTATAGCGGCGGGCGCGCGG
 CCCTGCCAGCACTCGCTCTTACCAGCGTTCGGCGGACCCGGCGGGCGGCGGTAGCCGAGTATCGCCCGCCCGGGCGG

A G V A V E R I T V G R G I R R K A R L A L D A A G D 1440
 GCCGGTGTCCGGTCGAACGGATCACCGTGGGCCGGGGCATCCGCCGCAAGGCCCGCTCGCGCTGGACGCCCGGGGA
 CGGCCACAGCGGACAGTTGCCTAGTGGCACCCGGCCCCGTAGGCGGGCTCCGGGGCGGAGCGGACCTGCGGGCCCTT

Y G S L R G T E G T C R A E D G T E L Y Y E V D D L D 1520
 CTACGGCTCCCTGCGGGCACCAGGGCACCTGCCGGGCCGAGGACGGCACCGAGCTCTACTACGAGGTCGACGACCTCG
 GATGCCGAGGGACGCGCCGTGGCTCCCGTGGACGGCCCGGCTCCTGCCGTGGCTCGAGATGATGCTCCAGCTGCTGGAGC

P P S P S G K R R P R R K G P A P A T V V F C H G Y 1600
 ACCGCCCTCCCCGAGCGGCAAGCGCAGGCCGCGCCGCAAGGGCCCCCGGCCACCGTCGTCTTCTGCCACGGCTAC
 TGGGGGGAGGGCTCGCCGTTCCGCTCCGGCGGGCGTTCGCCGGGGCGGGCCGTTGGCAGCAGAAGACGGTCCGATG

C L S Q D S W H F Q R A A L R G V V R S V Y W D Q R S 1680
 TGCCCTCAGCCAGGACTCCTGGCACCTCCAGCGCGGGCCCTGCCGGAGTGTCCGCTCCGCTCTACTGGGACCAGCGCAG
 ACGGAGTCGGTCTGAGGACCGTGAAGGTCGCGCCGGGACGCGCCTCAGCAGCGAGGAGATGACCCCTGGTCCGCTC

H G R S A R G L A Q A D G E P V T I D Q L G R D L K A 1760
 CCACGGCCGACGCGCCGGGGCTGGCCAGGCCGACGGCGAGCCCGTCCACATCGACCAGCTCGGCCGCGACCTCAAGG
 GGTGCCGGCGTCCGGGCCCGGACCGGGTCCGGCTGCCGCTCGGGCAGTGGTAGTGGTCGAGCCGGCGCTGGAGTTCC

V I D A A A P E G P L V L V G H S M G G M T V M A L 1840
 CCGTCATCGACGCCCGCGCCCGAGGGCCCGCTCGTCCCTCGTCGGCCACTCCATGGGCGGCATGACCGTCATGGCCCTC
 GGCAGTAGCTGCGGGCGCGGGCTCCCGGGCGAGCAGGAGCAGCCGGTGAAGTACCCGCGTACTGGCAGTACCGGGAG

A E Q F P E L V R E R V L G V A L V G T S S G R L D E 1920
 GCCGAGCAGTTCGGGAGCTGGTGCAGCGAGCGCTGCTCGGGTGGCCCTGGTCGGCACGTCACGCGGGCGGCTCGACGA
 CGGTCGTCAGGGGCTCGACCACGCGCTCGCGCACGAGCCACCGGGACCGCGTGCAGGTCGCCCGCGAGTGTCT

V T Y G L P S I G Q G A V R R L L P G V L K A L G S Q 2000
 GGTCAAGTACGGGTCGCGTCCATCGGTCCAGGGCGAGTGCAGCGCCCTGCTGCCGGCGTGTCTAAGGCCCTCGGCTCC
 CCAGTGCATGCCGACGGCAGGTAGCCAGTCCCGCTCACGCGGGACGACGCGCCGACGAGTTCGGGAGCCGAGGG

V E L V E R G R R A T A D L F A G M I K L Y S F G S 2080
 AGGTGGAGCTGGTGGAGAGGGCCGTCGGGCCACCGCCGACCTCTTCGCCGGCATGATCAAGCTCTACTCGTTCGGCTCC
 TCCACCTCGACCACCTCTCCCCGGCAGCCCGGTGGCGGCTGGAGAAGCGGCCGTACTAGTTCGAGATGAGCAAGCCGAGG

R E V D P G V A R F A E R L I E A T P I D V V A E F Y 2160
 CGCGAAGTGGACCCGGGCTCGCGCGCTTCGCCGAGCGGCTGATCGAGGCCACCCCGATCGACGTGGTCGCCGAGTCTA
 GCGTTCACCTGGGCCCGCAGCGCGCAAGCGGCTCGCCGACTAGTCCGGTGGGGCTAGTGCACCAGCGGCTCAAGAT

P A F Q T H D K S A A L Q R F A E L P V T V V A G D R 2240
 CCCGGCCTTCAGACCCACGACAAGAGCGCCGCTCCAGCGGTTCCGGGAGTCCCGGTACCGTCTGTCGCCGGGGACC
 GGGCCGGAAGTCTGGGTCTGTTCTCGCGCGGGAGGTCGCCAAGCGCCTCGACGGCCAGTGGCAGCAGCGGCCCTGG

D M I T P A A H S V A I K E E L P A A E L V V L E E 2320
 GGGACATGATACCCCGCCGCCACAGCGTGGCGATCAAGGAGGAGCTCCCGGCCCGGAGCTGGTGGTCTTGGAGGAG
 CCCTGTACTAGTGGGGCCGGGGTGTGCGACCGCTAGTTCCTCCTCGAGGGCCGGGCTCGACCACCAGGACCTCCTC

T G H L M M L E R P E I V T G L L T G L L A R A G A V 2400
 ACCGGGCACCTGATGATGCTGGAGCGCCCGAGATCGTGACGGGGCTGCTACCCGCTGCTGGCCCGCGCCGAGCCGT
 TGGCCCGTGGACTACTACGACCTCGCGGGCTCTAGCACTGCCCGACGAGTGGCCGGACGACCGGGCGCGCCCTCGCA

P A P T N V G A H G R R T A G S A A Q P G R * 2480
 CCCCGCACCGACTAACGTTGGGGCGCATGGAAGACGTACAGCGGGAAGCGCCGCGCAGCCCGGGCGCTGAGGCCCTGGCC
 GGGCGTGGCTGATTGCAACCCCGGTACCTTCTGCATGTCGCCCTTCGCGGGCGTCCGGCCGGCGACTCCGGGACCGG

orf 3 → Q E L G R R I A G L L 2560
 GAGCCGCCCGGAGACCTGATCACCGTCCGACTCGCCGCTCCATGCGAGGAGTGGGCCCGGGATCGCCGGACTGCT
 CTCCGGCGGGCTCTGGGACTAGTGGCAGCTGAGCGGGCGGAGGTACGTCCTCGACCCGGCGGCTAGCGGCCTGACGA

R P G D L V L L T G E L G A G K T T L T R G L G E G L 2640
 GCGCCCGGCGACCTGGTCTGCTGACGGGTGAGCTCGCGCGGGCAAGACCACCTGACCCGGGGGCTGGGGGAGGGG
 CGCGGGGCGCTGGACCAGGACGACTGCCACTCGAGCCGCGCCGTTCTGGTGGGACTGGGCCCCCGACCCCTCCCGG

G V R G A V T S P T F V I A R V H P S L G D G P P L 2720
 TGGCGTGCAGGGGGCGTGCACCTCGCCGACCTTCGTGATCGCCCGGGTGCACCCGTCCTGGGCGACGGGCCCGCGCTG
 ACCCGCACGCGCCCGGCACTGGAGCGGCTGGAAGCACTAGCGGGCCACGTTGGCAGGACCCGCTGCCCGGGCGGCA

V H V D A Y R L G G G L D E M E D L D L D V S L P E S 2800
 GTGCACGTGGACGCTACCGGCTCGGGCGGGCTGGACGAGATGGAGGACTGGACCTCGACGCTCGCTGCCCCGAGTC
 CACGTGCACCTGCGCATGGCCGAGCCGCCGCCGACTGCTTACCTCCTGGACCTGGAGCTGCAGAGCGACGGGCTCAG

V V V V E W G D G K V E E L S D D R L H V V I G R A V 2880
 CGTCGTCGTCGTTGGAGTGGGGCGACGGCAAGGTGGAGGAGCTCTCCGACGACCGGCTGCACGTGGTCATCGGCCGGGCCG
 GCAGCAGCAGCACCTCACCCGCTGCCGTTCCACCTCCTCGAGAGGCTGCTGGCCGACGTGCACCAGTAGCCGGCCCGG

G H E E V L D D V R E V A L R G V G A R W A Q A G P 2960
 TCGGCCACGAGGAGTCTGGACGACGTCGCGGAGGTCGCGCTGCGCGGCGTCGGCGCGCGGTGGGCGCAGGCCGGGCCG
 AGCCGGTGTCTCTCAGGACCTGCTGCAGGCGCTCCAGCGCGACGCGCCGAGCCGCGGCCACCCGCGTCCGGCCCGG

E L A R L S A G A * 3040
 GAGCTGGCACGGCTGTCGCGGGCGGTAACGGCCGCGGGCGGTCACGGCGGGGGCGGTCACGGCCGCGGGCGGGG
 CTCGACCGTGCACAGGCGCCCGCATTGCGGGCGCCCGCAGTGCCTCCGCGCCGCGCAGTGCAGGCGCGCGCCCC

CCGGTCCGGCCGCCACGAGGTACCGACAACCTCGTCGGGAAACCGTTGCGCCGGTGCGGGCCCGCGTATGACATGGTACC 3120
 GGCCAGGCCGGCGGTGCTCCATGGCTGTTGAGCAGCCCTTTGGCAACGCGGCCACGCCGGGGCGCACTACTGTACCATGG

GAGCGCTGGTTAGTGTGCCTAAGTTCGGCGTCCCGGGTCTCAGGAGGCGCCATGTCCGCGCAGGAGCAGAGCGGAGC 3200
 CTCGCGACCAATCCACACGGATTCAAGCCGAGGGCCCCAGAGTCTCCGTGGTACAGCCGTCGTCCTCGTCTCGCTCG

GCCCCTCGTGTCCATCGGGCCCTGCTCGCGGCCGGCGTGGCCGCCACCGCGGTGTCCACACCGCCCGTACGTTCCGAGC 3280
 CGGGCAGCACAGGTACGCCGGGACGAGCGCCGGCCGACCGGGCGGTGGCGCCACAGGTGTGGCGGGCATGCAAGCCTCG

CCGGCCCGCGGGATCC 3296
 GGCCGGGCGCCCTAGG

Fig. 7. *AlrS* 周辺領域 (3, 296 bp) の全塩基配列と推定される ORF のアミノ酸配列

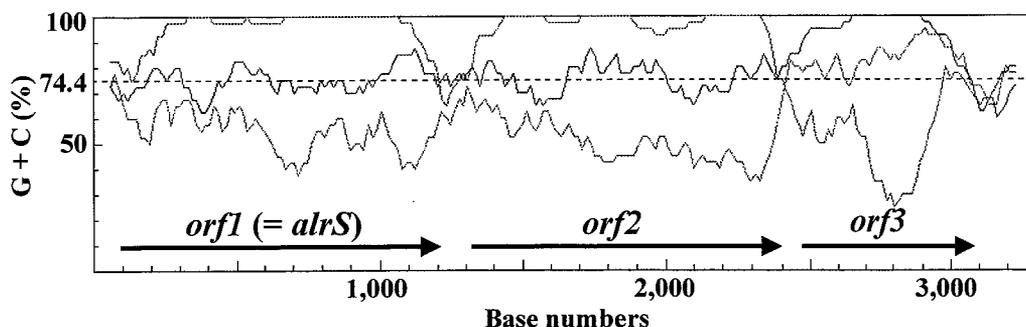


Fig. 8. *AlrS* 周辺領域の Frame plot

Frame plot 解析 [26] の結果、この塩基配列上には *orf1*, 2, 3 の、3つの ORF が存在することがわかった (Fig. 8)。*Orf1* (1,134 bp) は、378 aa からなる分子量約 39.9 kDa のタンパク質をコードしているが、塩基配列から予測される *orf1* の遺伝子産物 Orf 1 は、プローブとして用いた *S. coelicolor* の putative ALR と 74.9% の相同性を示した。従って、以後、この *orf1* を *alrS*、その遺伝子産物を *AlrS* と呼ぶことにした。*AlrS* と、種々の細菌由来の ALR との間でアミノ酸配列レベルのアライメント解析を行ったところ (Fig. 9)、補酵素である PLP 結合領域と、その領域内において PLP

が結合するとされる Lys 残基 [31, 32] (Lys³⁸)、およびアラニンのラセミ化にとって必要不可欠とされる Tyr 残基 [33] (Tyr²⁷⁰) が、いずれも保存されていた。DCS に対して強い感受性を示す mycobacteria [34] の ALR に対しても、AlrS はかなり高い相同性を示した [35, 36]。また、前述のように、*E. coli* および *S. typhimurium* では2種類の ALR のアイソザイムが存在するが [14-16]、*S. lavendulae* ゲノムのサザン解析の結果、ハイブリダイズするバンドはひとつしか確認されなかったことから、*S. lavendulae* にはただ1種類の ALR しか存在しないものと結論した。

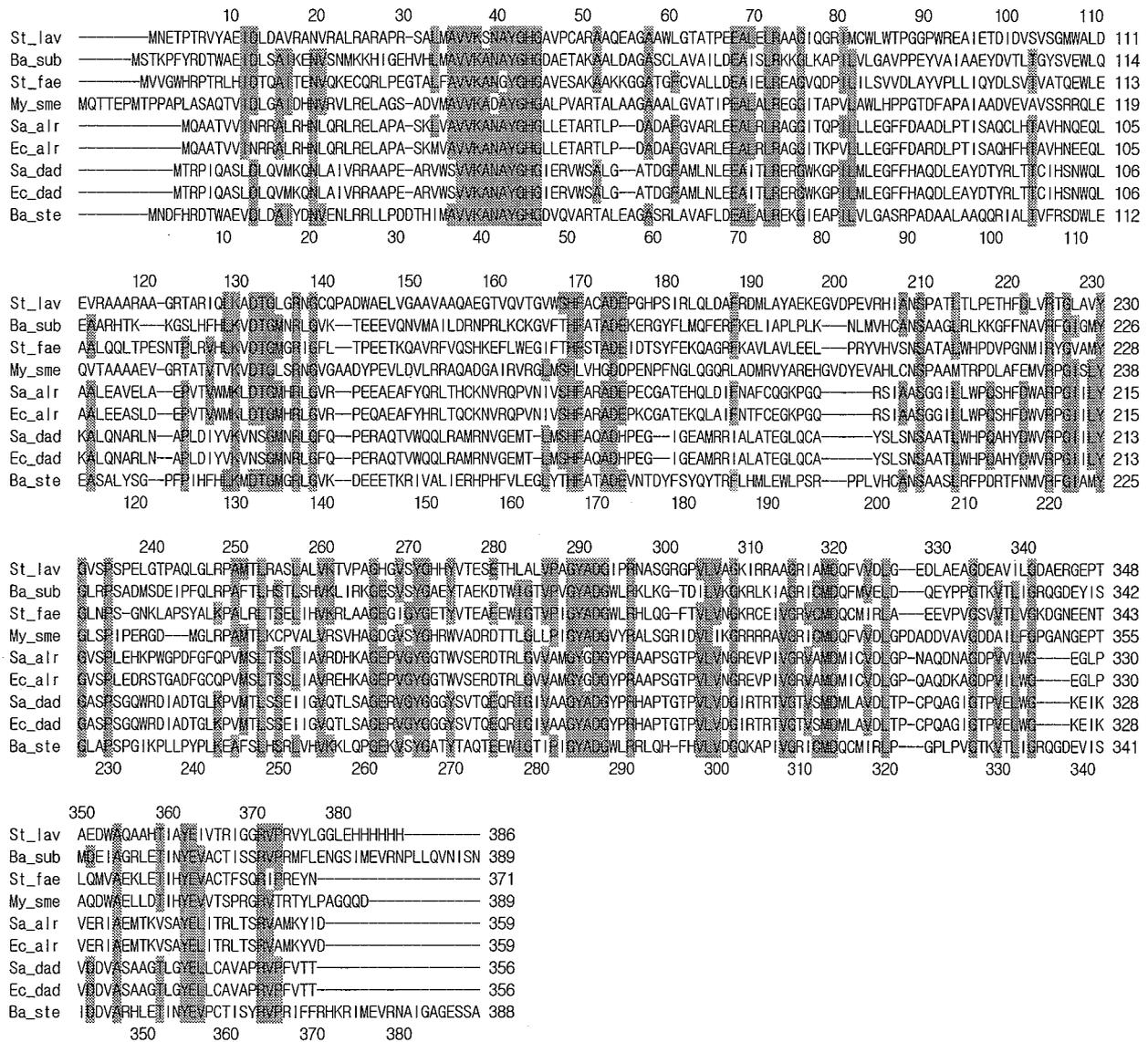


Fig. 9. *S. lavendulae* 由来 AlrS と種々の細菌由来 ALR との amino 酸配列におけるアライメント (ClustalW) 左端の表記はそれぞれ *Bacillus subtilis* ALR (*Ba_sub*), *Streptococcus faecalis* ALR (*St_fae*), *Mycobacterium smegmatis* ALR (*Ma_sme*), *Salmonella typhimurium* ALR (*Sa_alr*), *E. coli* ALR (*Ec_alr*), *S. typhimurium* DadB (*Sa_dad*), *E. coli* DadX (*Ec_dad*), *B. stearothermophilus* ALR (*Ba_ste*) を示す。アミノ酸配列にある程度の共通性がある部分は、その残基の部分に色付けをしている。

Orf 2 (1,176 bp) によってコードされる 392 aa からなるタンパク質は、*S. coelicolor* の putative lipase [30] と、そして、その下流にある *orf 3* (462 bp) によってコードされるタンパク質 (154 aa) は、*S. coelicolor* の putative ATP/GTP-binding protein [30] と、かなり高い相同性を示した (それぞれ 71.8%, 79.0%)。また、*alrS* に続くこれら3つの ORF の並び方は、*S. coelicolor* 染色体上で putative alanine racemase が存在する領域においても同じであった。

第四節 DdlS の大量発現系ならびに精製系の構築

決定した 1,038 bp の *ddlS* 遺伝子の塩基配列を基にプライマー (Fig. 10) を設計し、*ddlS* 構造遺伝子を増幅後、T₇ プロモーターを有する発現ベクター pET-21a(+)へ挿入することで、キメラプラスミド pET-*ddlS* を作製した (Fig. 11)。続いて、pET-*ddlS* を T₇ RNA ポリメラーゼ活性を有するホスト株、*E. coli* BL21(DE3)-pLysS へ導入し、*E. coli* ホスト・ベクター系による DdlS 大量発現株、*E. coli* BL21 (DE3)-pLysS [pET-*ddlS*] を得た。発現株の可溶性画分を調製後、硫酸アンモニウム分画、DEAE-Sepharose カラム、Octyl-Sepharose カラム、DEAE-Sepharose カラム (ATP 存在下) による精製を順次行うことで、Fig. 12 に示すように DdlS を均一なタンパク質として精製することができた。

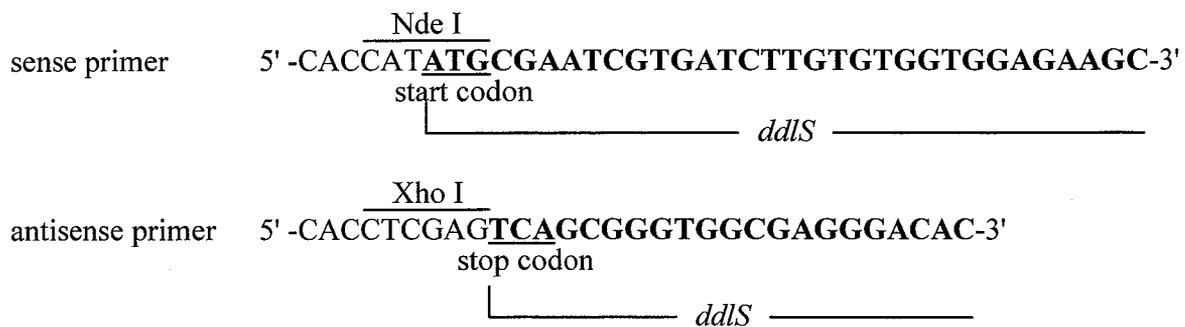


Fig. 10. *DdlS* 構造遺伝子増幅のためのプライマー配列

SDS-PAGE 上での DdlS の分子量は約 38 kDa で (Fig. 12)、そのアミノ酸配列から推定される分子量 (約 36 kDa) とほぼ同じであった。Sephacryl S-300 HR カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーの結果から推測された、非変性状態での DdlS の分子量は約 67 kDa であったことから、DdlS は *E. coli* の DdlB と同じく二量体タンパク質であることが示唆された [18]。

は、一般的に一量体もしくは二量体構造をとるが [37]、Sephacryl S-200 HR カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーの結果から推測された、非変性状態での AlrS の分子量は 80 kDa であり、このことから *S. lavendulae* の AlrS は二量体を形成していると示唆される。

第六節 DdlS の生化学的ならびに速度論的解析

E. coli 由来の DdlB は、中性付近 (pH 6.0-7.5) よりもアルカリ領域 (pH 9.2) で、より高い触媒活性を示す [38]。従って、DdlS 活性を測定する際に、種々の pH 条件下で DDL 活性の比較を行った (Fig. 17)。その結果、DdlS 活性は pH の上昇とともに増大し、pH 7.0 における DdlS の活性は $15 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ 、pH 10.0 での活性は $57 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ であった。

第二節でも述べたように、DdlS の ω -loop は Ala-Lys-Tyr-Gln 配列より成っており、DdlS が VanC タイプの ligase [28, 29] と同様に、D-Ala-D-Ser 活性を有するのではないかとの考えが浮かんだ。しかしながら、TLC によるアッセイ [39] の結果からは、DdlS には D-Ala-D-Ser ligase 活性も D-Ala-D-Lac ligase 活性も認められなかった。後者の観察結果は、D-Ala-D-Lac ligase 活性を有する、バンコマイシン耐性菌の VanA [40, 41] や VanB [42, 43] タイプの ligase において報告されている ω -loop のコンセンサス配列が Pro-Glu-Lys-Gly であること [28]、そして *Lactobacillus confusus*, *L. salivarius*, *L. plantarum* などの乳酸菌由来の D-Ala-D-Lac ligase における ω -loop のコンセンサス配列が Asn-(Lys/Met)-Phe-Val であること [28] と一致していた。

DdlS 活性の測定には continuous ADP release-coupled assay [44] を使い、*S. typhimurium* の DdlA、*E. coli* の DdlA および DdlB、そして *Enterococcus faecium* の VanA とその活性を比較した [18, 41] (Table 1)。Table 1 において、DdlS の変換効率を示す k_{cat} 値は、両 DdlA や DdlB、VanA と比較すると 3-10 倍程度低く、これらの中では VanA の値と一番近い値を示した。酵素に認識される二番目の D-Ala 基質に対する K_m 値 (K_2) は、VanA と比較すると 20 倍近い差が見られたが、両 DdlA や DdlB とは比較的似たような値を示した。ATP に対する K_m 値は、他のものが DdlS と比較して 3 倍ほど小さな値を示しているのに対し、VanA ではほぼ同じ値を示していた。DDL により生成した D-Ala-D-Ala は、正反応に対する可逆的な阻害剤として作用することが知られている。DdlS の D-Ala-D-Ala に対する K_i 値は $60 \mu\text{M}$ であり、主たる生成物が異なる VanA の値 ($2,300 \mu\text{M}$) とは大きく異なっていたが、他の DDL の値とは非常に近い値を示し、生成物の違いによる阻害度の差が明らかに表れていると言える。しかしながら、D-Ala-D-Ala による DdlS の阻害様式は、

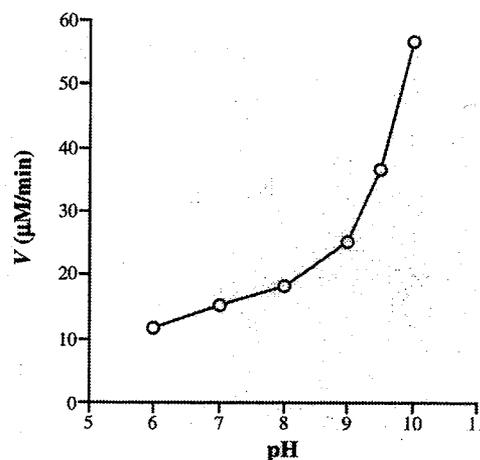


Fig. 17. DdlS 活性の pH profile

Streptococcus faecalis の DDL [45] と同じく競合阻害によるものであるが、両 DdlA および DdlB での阻害様式は非競合阻害であるとされている [18]。これらの酵素間における阻害様式の違いが何によって生じているのか、未だ明らかにはされていない。

Table 1. 各種 DDL の速度論的パラメータの比較

Substrate/inhibitor		<i>S. typhimurium.</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	VanA ^b	DdlS
		DdlA ^a	DdlA ^a	DdlB ^a		
D-alanine	k_{cat} (min ⁻¹)	644	444	1018	295	100
	K_1 (μM)	1.9	5.7	3.3	3,400	ND
	K_2 (mM)	0.54	0.55	1.2	38	2.0
ATP	K_m (μM)	38	38	40	116	120
D-Ala-D-Ala	K_i (μM)	61 (NC)	49 (NC)	70 (NC)	2,300 (NC)	60 (C)
D-cycloserine	K_i (μM)	14 (C)	8.9 (C)	27 (C)	730 (C)	920 (C)

^a [18] より抜粋, ^b [41] より抜粋

NC, noncompetitive; C, competitive; ND, not determined

DCS は、*S. typhimurium* の DdlA、*E. coli* の DdlA および DdlB を 9-27 μM の濃度範囲で競合的に阻害する。DdlS も DCS によって競合阻害を受けるが、その K_i 値は 920 μM と、両 DdlA や DdlB の値と比較して著しく大きかった (Table 1)。この K_i 値から考えると、DdlS は DCS 生産菌 *S. lavendulae* における自己耐性因子のひとつとして機能していると言える。また、VanA における DCS の K_i 値は DdlS と比較的同じ値を示した。各酵素のパラメータを比較した場合、二番目の D-Ala に対する K_m 値 (K_2) および D-Ala-D-Ala に対する K_i 値は、DdlS と両 DdlA および DdlB との間で、また k_{cat} 値、ATP に対する K_m 値、DCS に対する K_i 値においては、DdlS と VanA で、それぞれ部分的に類似していた。DCS に対する親和性の差と合わせ、これらの結果から、DDL における基質結合部位の構造は、各酵素間で比較した場合にある程度の共通性を残しながらも、耐性や活性の強さに関連する部分でそれぞれ微妙な変化を遂げて行ったものであると推測される。現在、この興味ある疑問に対して回答を見出すべく、*S. lavendulae* 由来 DdlS の X 線結晶構造解析をめざし、本タンパク質の結晶化を試みている。近い将来、本研究室において DdlS の結晶構造が明らかにされるであろう。

第七節 円偏光二色性 (circular dichroism; CD) スペクトルを用いた ALR 活性測定法の構築

現在、ALR を含めたラセミ化酵素の活性測定法として、enzyme-coupled assay 法が広く用い

られている [14, 15, 23, 33, 37, 46-49]。本研究において ALR の活性を測定する際に、まずこの enzyme-coupled assay 法を用いて解析を行った。AlrS および K12Alr の速度論的パラメータの解析結果を Table 2 に示す。Haldane の式 (k_{cat}/K_m for D-Ala) / (k_{cat}/K_m for L-Ala) [50] によって定義される平衡定数 (K_{eq}) の値をそれぞれ算出したところ、AlrS および K12Alr に対する値はそれぞれ 0.12 および 0.22 となり、この値は理論値である 1.0 から著しく離れていた。

この異常な K_{eq} 値はおそらく、吸光度の変化から推測される理論上の NADH 反応量と、カップリング反応で Ala のラセミ化に伴って実際に反応している NADH 量との間の不一致によって引き起こされているのではないかと考えた。言い換えれば、NADH の増加あるいは減少量が、ラセミ化する Ala 量と完全に一致していないのではないかとということである。また、Fig. 18 には DCS の濃度を変化させた場合の D-Ala → L-Ala 反応における double-reciprocal plot を示しているが、L-Ala → D-Ala 反応においては、enzyme-coupled assay 法で用いられている D-amino acid oxydase の活性が DCS によって阻害を受けてしまうため [51]、DCS による反応阻害解析は行うことができなかった。以上のような理由により、ALR 活性を測定するための、新たなアッセイ系を構築する必要があった。

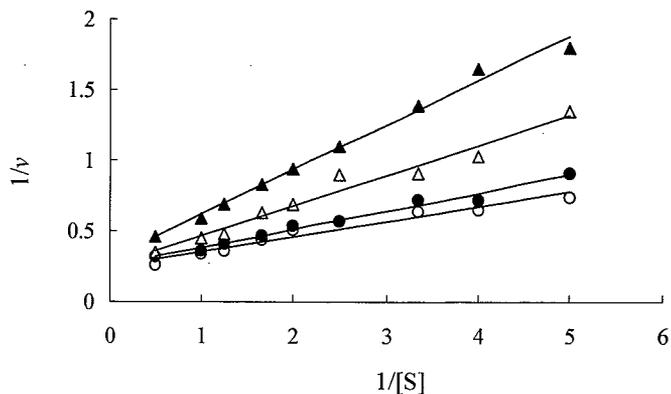


Fig. 18. Enzyme-coupled assay 法によって得られた AlrS の活性に対する Lineweaver-Burk plot (D-Ala → L-Ala 反応) ○, 0 mM DCS; ●, 0.5 mM; △, 1.5 mM; ▲, 3.0 mM

Table 2. 酵素共役法によって決定した両 ALR の速度論的パラメータ

Enzyme source	D→L direction		L→D direction	
	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})
<i>S. lavendulae</i>	0.37 (\pm 0.01)	$6.8 (\pm 0.7) \times 10^2$	0.30 (\pm 0.01)	$4.4 (\pm 0.2) \times 10^3$
<i>E. coli</i>	0.44 (\pm 0.02)	$1.8 (\pm 0.1) \times 10^2$	0.66 (\pm 0.08)	$1.2 (\pm 0.2) \times 10^3$

基質と生成物との間の CD シグナルの違いに基づいた、triosephosphate isomerase [52] や mandelate racemase [53] の活性測定法は既に考案されている。まず、1 mM の D-Ala, あるいは L-Ala のそれぞれの溶液と、両異性体の混合溶液の CD スペクトルを測定したところ (Fig. 19)、D-Ala の CD スペクトルは横軸 (wavelength 軸) を対称軸として、L-Ala の CD スペクトルと線対称の軌跡を描いた。また、両異性体の混合液は用いた buffer と同様のシグナルを示し、Ala に基づくシグナルが見かけ上消失していることが観察された。1 mM の L-Ala 溶液の CD スペクトルを ALR 反応の前後で測定した場合、シグナル強度の減少が観察されたが (Fig. 20)、このことは反応によ

って減少した L-Ala 量に比例したシグナル強度の減少と、生成したと思われる D-Ala 量に由来する L-Ala シグナルの相殺作用の結果であると考えられる。従って、ALR によって触媒される D-Ala と L-Ala との間のラセミ化率は、その反応溶液の CD スペクトルを測定することで決定できると考えた。

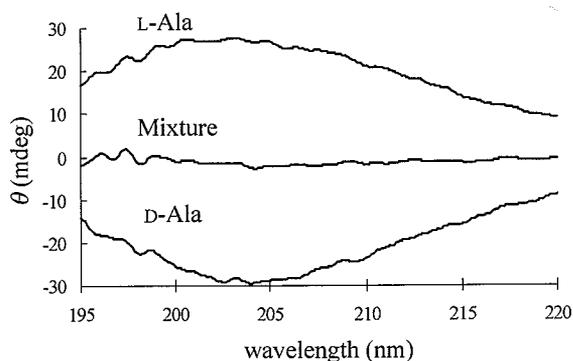


Fig. 19. 1 mM D-Ala, L-Ala および両エナンチオマーの等量混合液の CD スペクトル

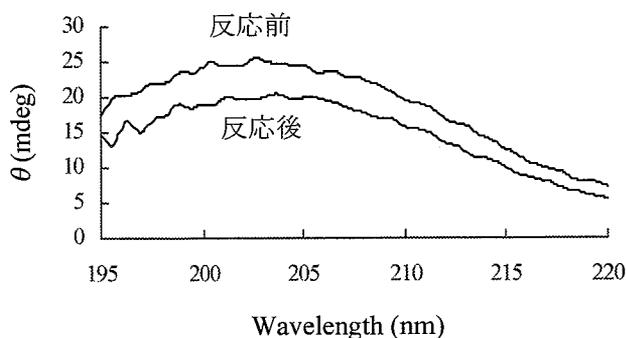


Fig. 20. ALR 反応前後における 1 mM L-Ala 溶液の CD スペクトル

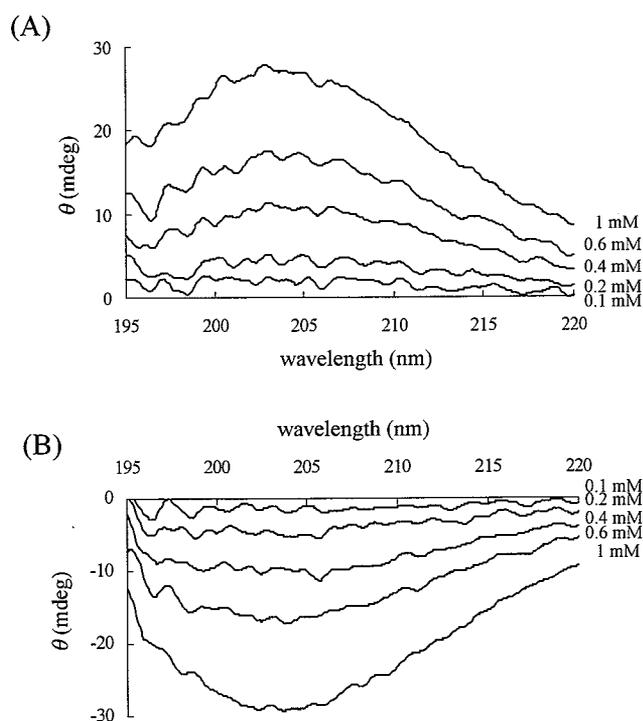


Fig. 21. 種々の濃度における L-Ala (A), D-Ala (B) 溶液の CD スペクトル

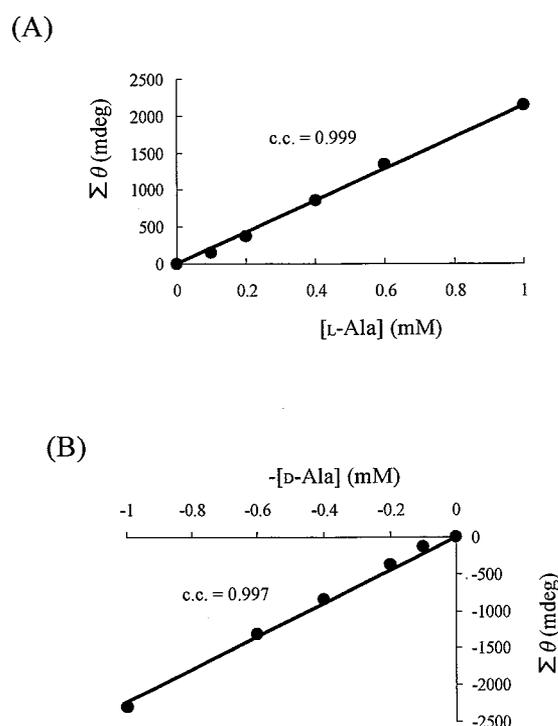


Fig. 22. CD スペクトルの積算値をもとにした、L-Ala (A), D-Ala (B) の検量線

Ala の定量にあたり、種々濃度の D-および L-Ala 溶液の CD スペクトルを測定した (Fig. 21)。より信頼性の高い検量線を作成するため、測定した CD スペクトルの 205-215 nm 間における θ の値を 0.1 nm ごとに全て積算し、その値 ($\Sigma\theta$) を Ala 濃度に対してプロットした (Fig. 22)。その結果、検量線は非常に良好な相関係数を示し、従って $\Sigma\theta$ は Ala 濃度に対して Eq. 1 に示すように、直線的に比例していることがわかった。Eq. 1 において、P は比例定数 ($2,200 \text{ mdeg}\cdot\text{mM}^{-1}$) であり、[D-Ala] および [L-Ala] はそれぞれ D-, L-Ala の濃度 (mM) を指している。

$$\Sigma\theta = P\{[\text{D-Ala}] - [\text{L-Ala}]\} \quad (\text{Eq. 1})$$

第八節 AlrS および K12Alr の速度論的解析

前節で作成した検量線をもとにして反応液中の D-, L-Ala 濃度を決定し、最小二乗法を用いた数値解析により AlrS および K12Alr の速度論的パラメータを決定した (Table 3)。この結果をもとにして導かれる K_{eq} 値は、AlrS が 1.15、K12Alr が 1.19 であり、ラセミ化反応の理想値とされる 1.0 に比較的近い値を示したことから、CD スペクトルを用いたこの解析法は、従来のラセミ化反応のアッセイ法と比較しても充分適用できるものであると考えた。両 ALR の K_{m} 値には大きな違いは見られなかったが、AlrS の k_{cat} 値は K12Alr の値と比べて2倍大きかった。

Table 3. CD スペクトル assay 法によって決定した両 ALR の速度論的パラメータ

Enzyme source	D→L direction		L→D direction	
	K_{m} (mM)	k_{cat} (min^{-1})	K_{m} (mM)	k_{cat} (min^{-1})
<i>S. lavendulae</i>	0.4 (± 0.2)	$3.8 (\pm 0.4) \times 10^3$	0.4 (± 0.1)	$3.3 (\pm 0.2) \times 10^3$
<i>E. coli</i>	0.25 (± 0.07)	$1.7 (\pm 0.1) \times 10^3$	0.29 (± 0.07)	$1.66 (\pm 0.03) \times 10^3$

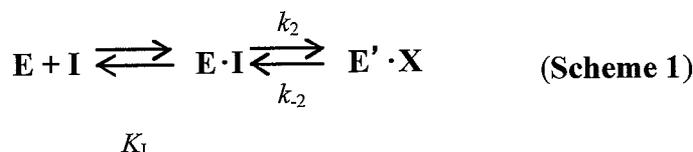
DCS に対する感受性解析を行うため、種々濃度の DCS を添加した状態で AlrS の速度論的解析を繰り返した。これまで、DCS による ALR の阻害様式に関しては色々な説が唱えられていたため [23]、得られたデータを競合阻害モデル、非競合阻害モデルの両方に当てはめて解析を行い、それぞれの場合での速度論的パラメータを決定した (Table 4)。競合阻害、非競合阻害モデルに対する平衡定数 K_{eq} の値は、それぞれ 1.27 および 1.12 であり、理論値 1.0 に近い値となっていた。しかしながら、それぞれの解析結果における相関係数の値は、競合阻害モデルで 0.977、非競合阻害モデルで 0.978 となった。また、 K_{m} 値が DCS 非存在下での値と 2 倍近く異なっており、AlrS の DCS による阻害は、どちらの様式が相応しいのか決定することはできなかった。

Table 4. 競合阻害モデルおよび非競合阻害モデルで解析を行った場合の AlrS の速度論的パラメータ

	Competitive model (c.c.= 0.977)		Non-competitive model (c.c.= 0.978)	
	D→L direction	L→D direction	D→L direction	L→D direction
K_m (mM)	0.7 (\pm 0.2)	0.7 (\pm 0.1)	1.1 (\pm 0.2)	0.9 (\pm 0.1)
k_{cat} (min^{-1})	$4.2 (\pm 0.4) \times 10^3$	$3.3 (\pm 0.2) \times 10^3$	$5.2 (\pm 0.4) \times 10^3$	$3.8 (\pm 0.3) \times 10^3$
K_i (mM)	0.09 (\pm 0.02)	0.14 (\pm 0.03)	0.24 (\pm 0.03)	0.6 (\pm 0.1)

第九節 DCS および LCS による ALR の time-dependent inactivation

前節での結果から、DCS による AlrS の阻害様式を競合モデル、非競合モデルの両方ともに決定することができなかつたため、最近報告のあった、ALR の DCS による time-dependent inactivation メカニズム [21] に基づいて阻害の解析を行うことにした。この阻害メカニズムは、ALR (E) の補酵素である PLP と DCS が反応し、PLP 非結合型の ALR (E') と 3-hydroxyisoxazole pyridoxamine 5'-phosphate 誘導体 (X) を形成するという反応様式に基づいている [21, 22] (Scheme 1)。



ALR の残存活性に対する、DCS との不活化誘導体形成による PLP の消失が与える影響を調べるため、DCS と一定時間反応させた ALR の残存活性を、反応溶液の 205 nm における CD シグナルの変化を経時的に観察することで解析した (Fig. 23)。近似曲線の傾きを ALR 活性の指標とし、それぞれ一定時間反応させた後の活性を、コントロールと比較することで残存活性を評価した。解析結果を Fig. 23 および Table 5 に示す。

Table 5. DCS および LCS による ALR の Time-dependent inactivation における速度論的パラメータ

	DCS		LCS	
	K_I (mM)	$k_2 \times 10^{-3}$ ($\text{mM} \cdot \text{s}^{-1}$)	K_I (mM)	$k_2 \times 10^{-3}$ ($\text{mM} \cdot \text{s}^{-1}$)
<i>S. lavendulae</i>	0.87 (\pm 0.08)	3.9 (\pm 0.5)	ND	ND
<i>E. coli</i>	1.2 (\pm 0.1)	11 (\pm 2)	8.2 (\pm 0.7)	3.9 (\pm 0.7)

ND, not determined

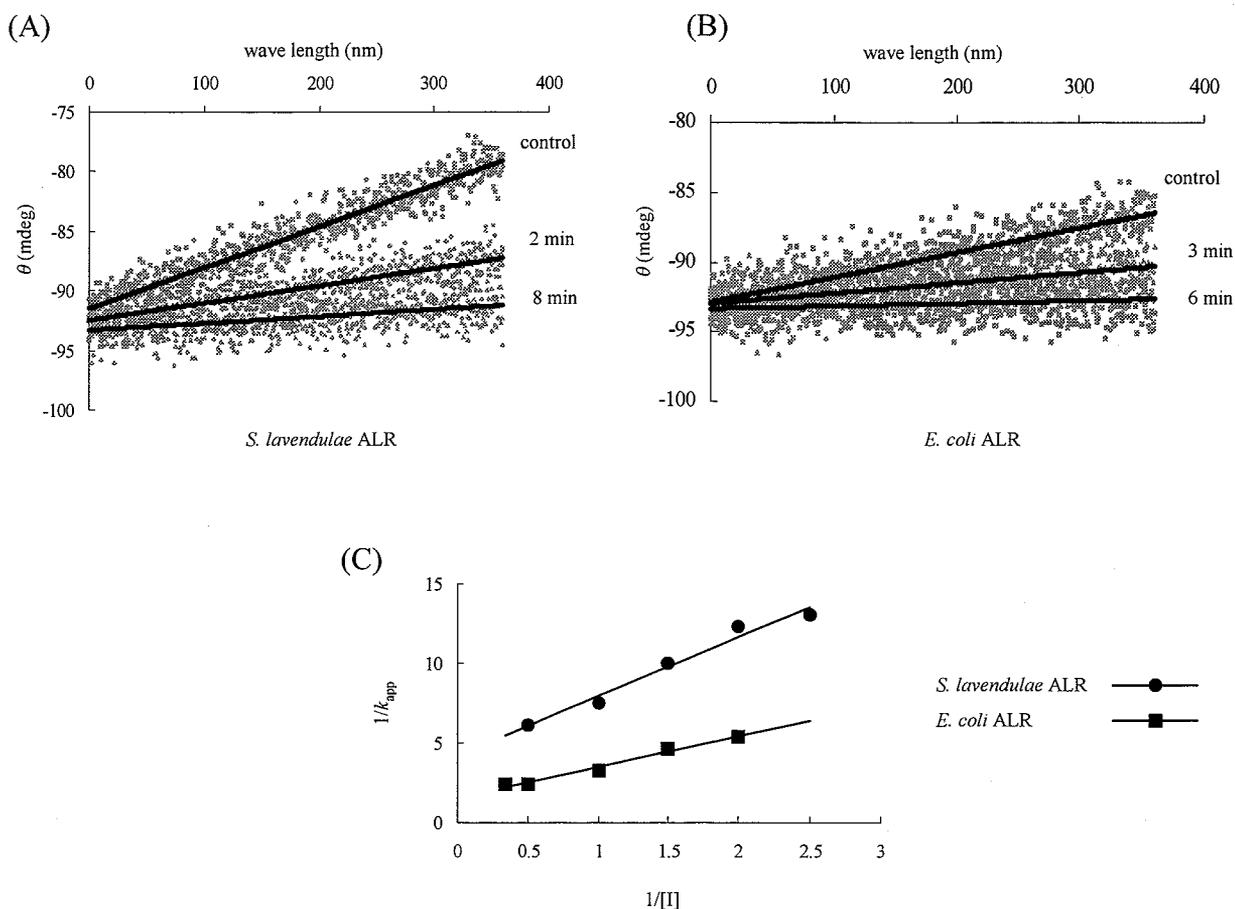


Fig. 23. DCS の PLP 不活化作用による ALR 残存活性に対する影響

205 nm でのサンプル溶液におけるシグナル強度の経時的変化(A, AlrS; B, K12Alr)

C, それぞれの酵素での二重逆数プロット

Table 5 に示すように、AlrS と K12Alr に対する DCS の K_1 値は似たような値を示したが、 k_2 値においては AlrS の方が K12Alr と比べてより小さな値を示した。つまり、AlrS の DCS による不活化速度は、K12Alr と比較して明らかに小さい。従ってこの結果から考えると、AlrS は DdlS 同様、DCS 生産菌 *S. lavendulae* における自己耐性因子のひとつとして機能していると思われる。

Aminotransferase のように、PLP を補酵素として持つタンパク質は、DCS と同じくその光学異性体である LCS によっても阻害を受ける [54]。例えば、*Bacillus stearothermophilus* の ALR は、DCS と比較するとその度合いは弱い、LCS によっても阻害を受ける [21]。そこで、AlrS と K12Alr に対し、LCS においても DCS と同様の解析を試みた (Table 5)。DCS による阻害では、AlrS における k_2/K_1 の値 ($4.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) は K12Alr の値 ($9.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) と比べて小さく、このことから AlrS の DCS に対する感受性の低さがわかる。また、LCS に対する K12Alr の k_2/K_1 値は $0.48 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であり、DCS と比較すると非常に低い。しかしながら、測定した条件の範囲内では、LCS

による AlrS の阻害は観察されなかった。従って、LCS による ALR の阻害は DCS と比べると著しく弱いと考えられる。なお、AlrS の cycloserine 耐性に関する構造生物学的な解析は、第二章で述べる。

第十節 DCS 耐性付与因子としての DdlS と AlrS

DdlS および AlrS の酵素反応速度論的解析により、両酵素は DCS 生産菌 *S. lavendulae* における自己耐性にとって重要な役割を果たしている可能性を、*in vitro* 実験系で示すことができた。そこで、*in vivo* においてもこの仮説があてはまるか否か実証するため、DdlS および AlrS を発現させた *E. coli* の DCS に対する耐性度を調べてみた。既に構築した pET-*alrS*, pET-*ddlS*, pET-K12*alr* に加え、*E. coli* 由来 *ddlA* および *ddlB* を pET-21a(+) に組み込んだベクター (pET-*ddlA*, pET-*ddlB*) を構築し (Fig. 24, 25A, B)、*E. coli* BL21 (DE3)-pLysS に導入して発現株を作製した。それぞれの発現株を、様々な濃度の DCS を添加した M9 agar 培地中で包埋培養した際の生存率を $A_{600\text{ nm}}$ の値より求め、グラフに示したのが Fig. 26 である。

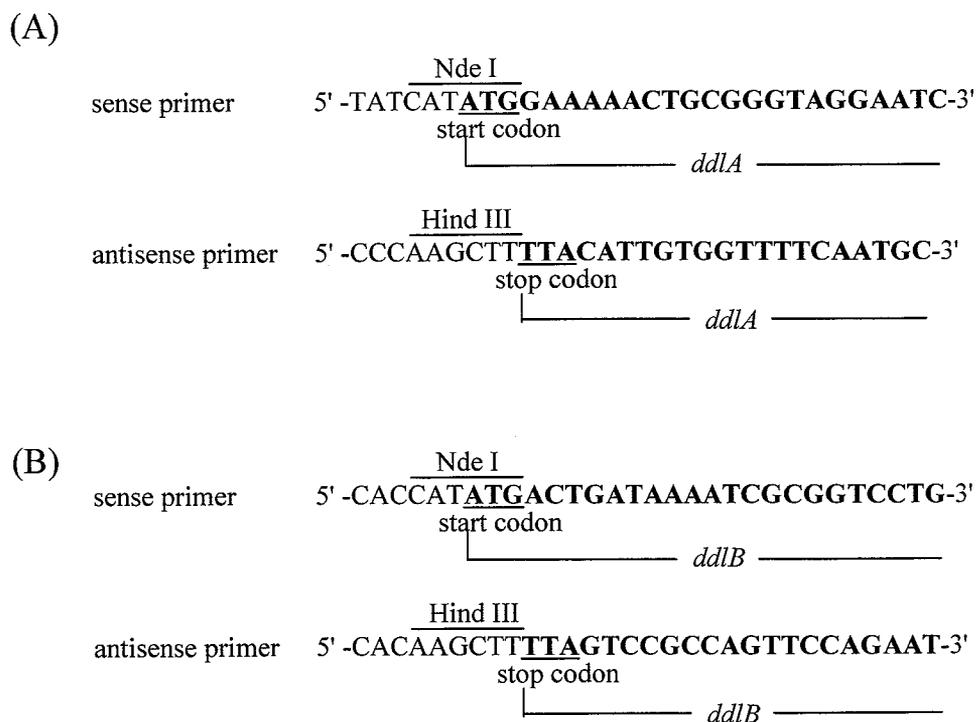


Fig. 24. *E. coli ddlA* (A) および *ddlB* (B) 構造遺伝子増幅のためのプライマー塩基配列

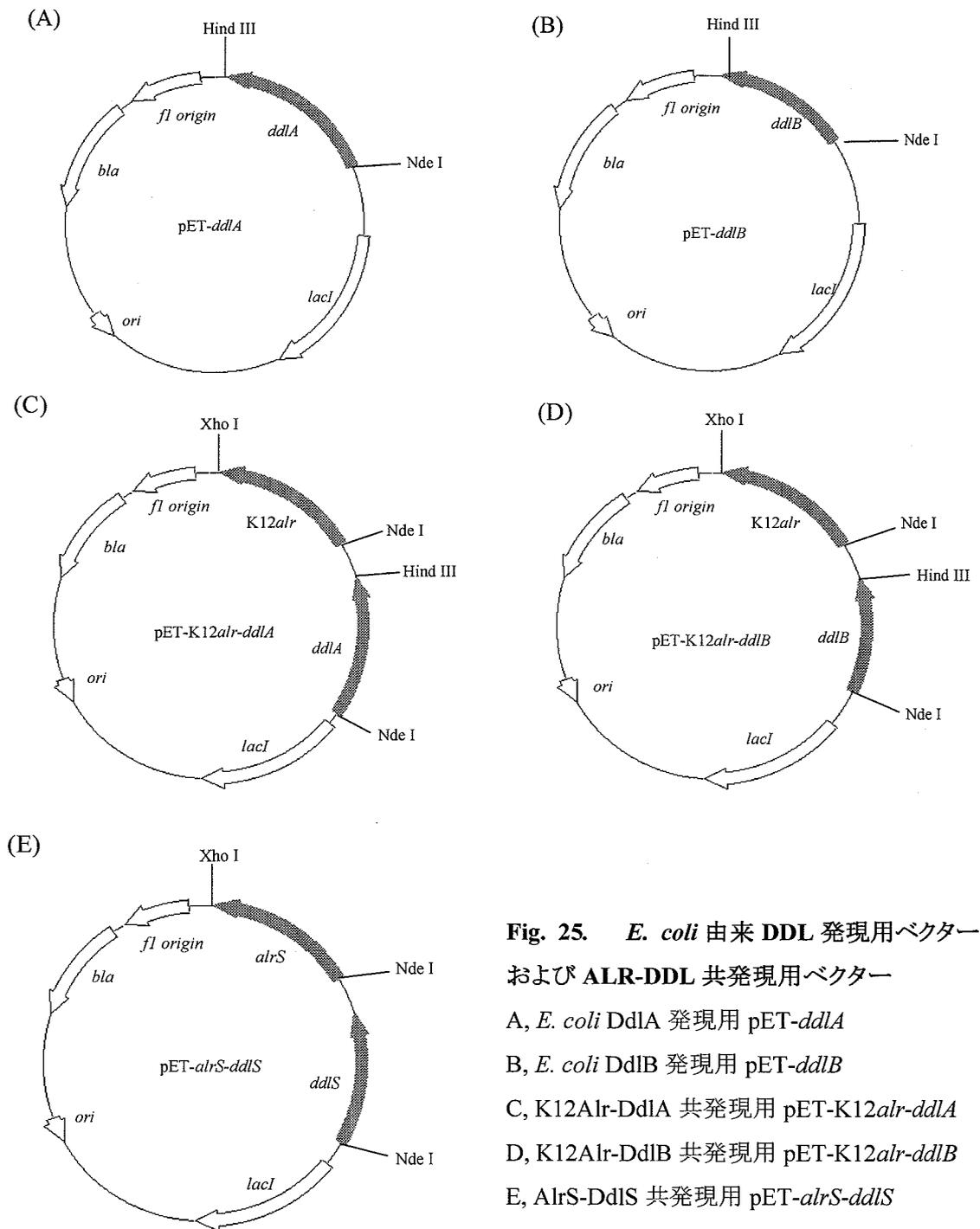


Fig. 25. *E. coli* 由来 DDL 発現用ベクター
 および ALR-DDL 共発現用ベクター
 A, *E. coli* DdlA 発現用 pET-*ddlA*
 B, *E. coli* DdlB 発現用 pET-*ddlB*
 C, K12Alr-DdlA 共発現用 pET-K12*alr-ddlA*
 D, K12Alr-DdlB 共発現用 pET-K12*alr-ddlB*
 E, AlrS-DdlS 共発現用 pET-*alrS-ddlS*

Fig. 26A にあるように、pET-K12*alr* 導入株は、コントロール株として用いた pET-21a(+) を導入したホスト株と比べ、若干の DCS 耐性を獲得しているが、これは ALR の絶対量の増加によるみかけの DCS 耐性の上昇によるものである [37, 55]。しかしながら、pET-*alrS* を有する株は、より高い

DCS 濃度の倍地中でも生育が可能であった。D-Ala-D-Ala ligase についても、その発現量の上昇によって DCS 耐性が上昇することが報告されている [55]。本研究において観察された pET-*ddlA* および pET-*ddlB* 発現株の耐性上昇もこの現象に起因するものと考えられるが、pET-*alrS* 発現株と同様に pET-*ddlS* 発現株も、より高い DCS 濃度下での生育が可能であった (Fig. 27B)。

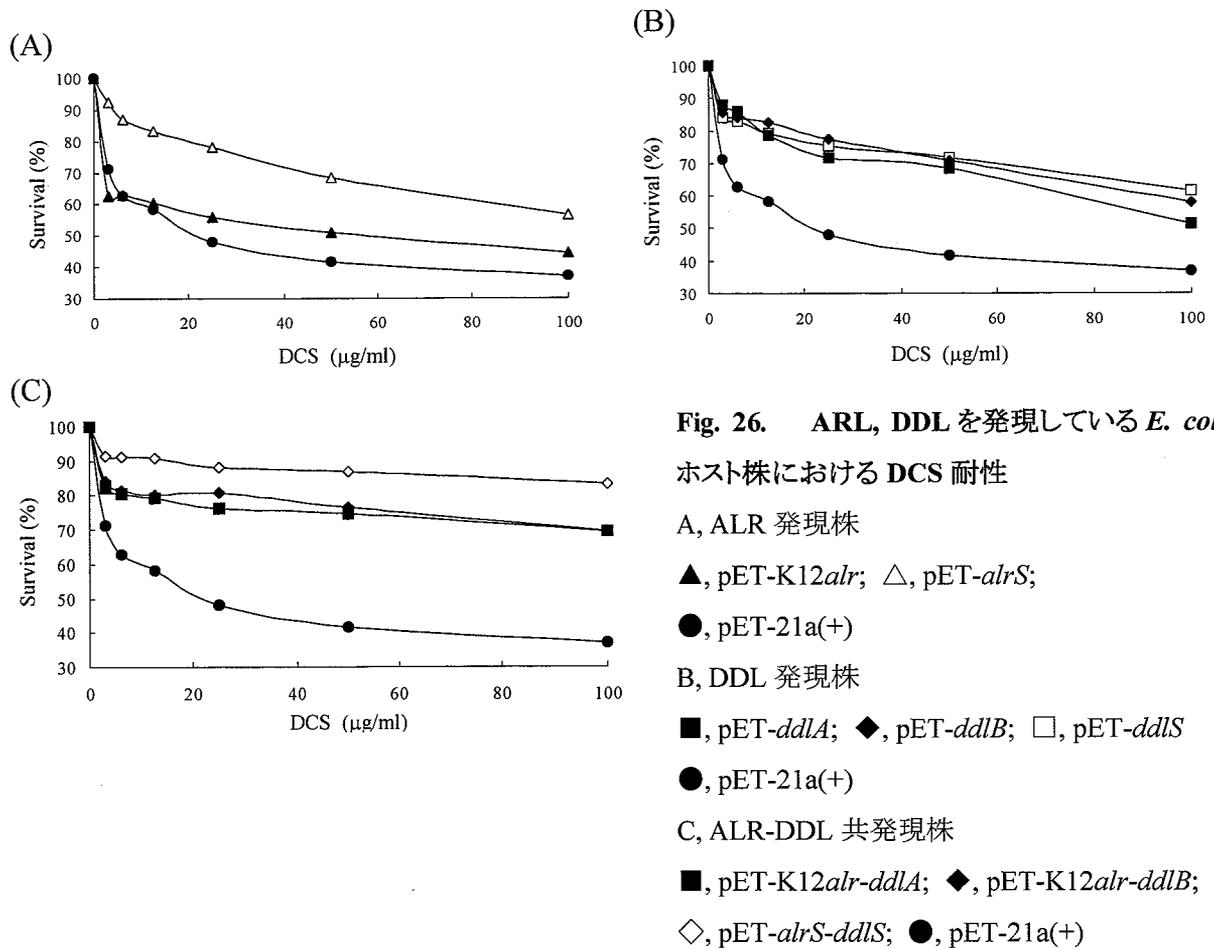


Fig. 26. ARL, DDL を発現している *E. coli* ホスト株における DCS 耐性

A, ALR 発現株

▲, pET-K12alr; △, pET-alrS;

●, pET-21a(+)

B, DDL 発現株

■, pET-ddlA; ◆, pET-ddlB; □, pET-ddlS

●, pET-21a(+)

C, ALR-DDL 共発現株

■, pET-K12alr-ddlA; ◆, pET-K12alr-ddlB;

◇, pET-alrS-ddlS; ●, pET-21a(+)

Fig. 27 は、それぞれのプラスミドを導入した *E. coli* ホスト株を、致死的な影響を及ぼさない程度の DCS 存在下で培養した際の、各発現株から調整した可溶性画分を SDS-PAGE によって確認したものである。ゲル写真から明らかなように、pET-K12alr, pET-ddlA, pET-ddlB 導入株の可溶性画分には、大量の ALR および DDL が発現している様子が観察されたが、対照的に *S. lavendulae* 由来の各酵素を発現させた *E. coli* では、その発現レベルは著しく低かった。この結果から、ある程度の濃度までは、これまでに報告されているように、ALR または DDL の絶対量の上昇により DCS に対して抵抗することができるが [55]、*S. lavendulae* 由来 AlrS および DdlS の発現株では、その発現レベルの違いを見れば明らかなように、酵素自身の耐性度の違いにより、ホスト株に DCS 耐性を付与していることが明らかとなった。

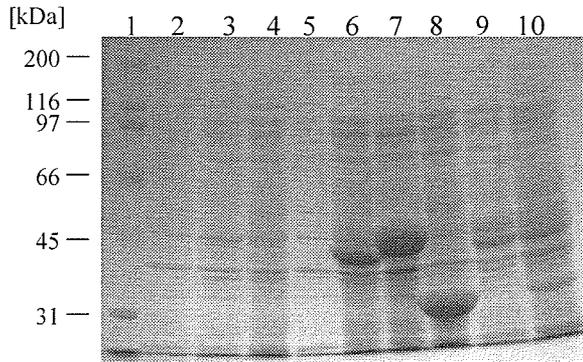


Fig. 27. それぞれの発現ベクターを有する *E. coli* ホスト株におけるタンパク質の発現レベル
 1, 分子量マーカー; 2, pET-21a(+)導入株;
 3, pET-*alsS*; 4, pET-*ddlS*; 5, pET-*alsS-ddlS*;
 6, pET-K12*alr*; 7, pET-*ddlA*; 8, pET-*ddlB*;
 9, pET-K12*alr-ddlA*; 10, pET-K12*alr-ddlB*

AlrS および *ddlS* を共発現するように構築した pET-*alsS-ddlS* (Fig. 25E) を有するホスト株は、それぞれを単独で発現している株よりもかなり高いDCS耐性を示した (Fig. 26C)。また、Fig. 27からもわかるように、確かに共発現株においては、それぞれのタンパク質の発現レベルが低下しており、相乗効果の存在が示唆された。ALRとDDLの共発現によるDCS耐性度への影響がどの程度であるかを確認するため、pET-K12*alr-ddlA* および pET-K12*alr-ddlB* を構築し (Fig. 25C, D)、それぞれの導入株の生存率を同様に評価した。その結果として、共発現の相乗効果による耐性度の上昇が認められたが、pET-*alsS-ddlS* 導入株と比較するとその耐性度の差は明らかであり、共発現株におけるDCS耐性の飛躍的な上昇は、*AlrS*と*DdlS*の相乗効果によるものだけではないと推測される。

第十一節 総括

本章では、DCS生産菌 *S. lavendulae* ATCC25233 由来の *ddlS* および *alsS* 両遺伝子をクローニングし、両遺伝子産物の大量発現系・精製系の構築、精製タンパク質を用いた速度論的解析を行ったこと、そして、両酵素の *in vivo* におけるDCS耐性への寄与について論じた。

*AlrS*と*DdlS*の共発現株においては著しいDCS耐性の上昇が認められたが、DCS生産菌の中ではこれらの酵素は共存していることから考えても、この相乗効果に酵素の持つ耐性上昇が加わることで、更なる高い耐性を獲得しているものと思われる。実際、pET-*alsS-ddlS* を導入した *E. coli* ホスト株は、栄養豊富な培地であるLB培地で培養した際には、1,600 $\mu\text{g/mL}$ の濃度のDCS存在下でも生存できる。さらに、*S. lavendulae* にはDCS排出膜タンパク質をコードしていると推測される *orfB* も存在しており、3つ目の要素が加わった場合には、きわめて高い耐性上昇が予想されるであろう。現在、本研究室においては *OrfB* の研究が進行中であり、*AlrS*、*DdlS* そして *OrfB* という3つの因子が、DCS生産菌 *S. lavendulae* の自己耐性メカニズムの本体であるという現在の予想が証明されることが期待される。

また、ALR活性の解析にあたり、CDスペクトルを利用したアッセイ法を新たに確立した。従来

の共役酵素によるアッセイ系とは異なり、反応基質および生成物そのものの変化を直接測定しているため、酵素本来の反応をより正確に捉えることが可能である。

これまで、真核生物には無用のものと思われていた D-アミノ酸であるが、比較的単純な真核生物をはじめ [4, 56-59]、哺乳類 [60-63] やヒトにおいても、D-アミノ酸の存在が確認されている [67]。また、アルツハイマー病における D-Ser の関わりが報告されるに至り [64, 65]、serine racemase の脳内分布と発症が関係しているという報告も登場した [66]。これらのことから考えても、生体内で重要な働きを担うとされる D-アミノ酸の研究が進んで行くことは明らかであり、serine racemase をはじめとする酵素の機能解析に、本アッセイ法が役立つことを期待する。

【第二章】

DCS 生産菌由来 alanine racemase の構造生物学的研究 —X線結晶構造解析による DCS 耐性メカニズムの解明—

第一節 緒言

DCS の標的酵素 ALR は、fold type III に属し、補酵素として PLP を必要とする。本酵素は D-Ala と L-Ala の間の可逆的変換を触媒している。DCS に対して感受性を示す *Bacillus stearothermophilus* の ALR [21] は、1.9 Å 分解能で、その X 線結晶構造が決定されている [31]。また、この *Bacillus* 属 ALR については、基質アナログや阻害剤との複合体タンパク質の結晶構造が決定されている [21, 67-69]。それらを通じ、ALR の触媒メカニズムに留まらず、DCS を始めとする種々の阻害剤によるその阻害様式も構造生物学的に明らかにされ始めている [11, 21, 23]。現在提唱されている DCS による ALR の阻害メカニズムは、PLP との安定な不活化誘導体を形成することによって起こるとされるが [21]、この推測は、同じく PLP を補酵素とする aminotransferase の DCS による不活化機構と類似している [70]。

DCS 生産菌は、自身の生産する抗生物質による毒性から生体を守る必要がある。前章では、DCS 生産菌 *S. lavendulae* ATCC25233 の ALR (AlrS) および DDL (DdlS) の機能解析を行い、両酵素が生産菌の自己耐性因子として機能していることを明らかにした。この結果は、DCS 耐性は標的酵素の過剰発現によるものであるとする DCS 耐性 *Mycobacterium* において提唱された仮説と異なるものである [35, 55]。本章では、AlrS の X 線結晶構造解析を通じて、DCS 生産菌における自己耐性機構を構造生物学的に論じる。

第二節 AlrS の結晶化

精製した AlrS を含む溶液を 10 mg/mL となるまで濃縮し、蒸気拡散法 [71] (sitting-drop) にて AlrS の結晶化を行った (Fig. 28)。本結晶は空間群 $C2$ に属し、格子パラメータ $a = 84.6 \text{ \AA}$, $b = 63.4 \text{ \AA}$, $c = 86.0 \text{ \AA}$, $\beta = 120.1^\circ$ を有する単斜晶系であり、非対称単位あたり AlrS 単量体一分子が含まれていた。本結晶を用いて得られた X 線回折データをもとに、AlrS の結晶構造を決定した。その結晶学的パラメータを Table 6 に示す。

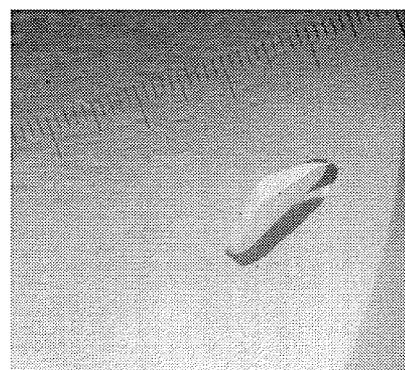


Fig. 28. AlrS 結晶写真

Table 6. 各種結晶の結晶学的パラメータ

Data collection	AlrS	DCS-AlrS	LCS-AlrS
Space group	$C2$	$P2_1$	$P2_1$
Unit cell			
a (Å)	83.98	82.96	83.77
b (Å)	63.38	63.55	63.54
c (Å)	85.95	84.62	85.32
V_m (Å ³ /Da)	2.5	2.5	2.5
Resolution range (Å)	24 – 2.0	48 – 1.9	49 – 2.3
Unique reflections	24,889	60,894	34,960
R_{merge} (%)	11.1	12.8	12.0
Completeness (%)	94.0	99.7	98.7
Redundancy	2.9	3.6	3.4
R_{work} (%)	19.7	20.9	19.7
R_{free} (%)	25.2	26.5	28.7
Residues / Waters	384 / 74	767 / 158	78 / 118

AlrS 結晶に対し DCS をソーキングすることにより、DCS 結合型 AlrS の結晶を調製後、その X 線結晶構造を解析した。本結晶は空間群 $P2_1$ に属し、格子パラメータ $a = 83.0$ Å, $b = 63.6$ Å, $c = 84.6$ Å, $\beta = 118.6^\circ$ を有する単斜晶系で、非対称単位あたり AlrS 二量体一分子を含んでいた。DCS 結合型 AlrS の格子パラメータは非結合型のものと同様の値を示したが、 $h + k$ の値が奇数の際は、より良好な signal-to-noise ratio (S/N 比) が観察された。このことから、結晶学的な二回軸と完全には一致していない、2つのサブユニットに関する部分的な二回軸が存在すること推定される。すなわち、空間群が完全に $P2_1$ に移行しているわけではなく、 $C2$ に属するタンパク質分子が部分的に残っていることが示唆される。この現象はサブユニット同士が非常に似た構造を取っている場合に観察される傾向があり、DCS 結合型 AlrS の結晶の特徴を表していると言える。同様に、LCS 結合型 AlrS の結晶も調製し、X線結晶構造解析を行った。本結晶は空間群 $P2_1$ に属し、格子パラメータ $a = 83.8$ Å, $b = 63.5$ Å, $c = 85.3$ Å, $\beta = 118.0^\circ$ を有する単斜晶系であり、非対称単位あたり AlrS 二量体一分子が含まれていた。両結晶の結晶学的パラメータも同様に Table 6 に示す。

第三節 AlrS 結晶構造の全体的な特徴

AlrS 単量体構造には、その N-末ドメインに8個のストランドよりなる、 α/β バレル構造が観察された。この構造はリン酸結合部位を有するタンパク質に特徴的なものである (Fig. 29)。AlrS は、同一の単量体同士によるホモ二量体構造を取っているが、その構造は一方のサブユニットの N-末ドメインが、もう一方のサブユニットの C-末ドメインをパートナーとすることによって生ずる。AlrS の C-末ドメインはねじれたバレル構造をとっており、その領域には Greek-key モチーフがある。サブユニット同士の関係で言えば、C-末ドメインはそのパートナーの N-末および C-末の両ドメインと相互作用しているのに対し、N-末ドメインは C-末ドメインとしか相互作用しておらず、両サブユニットの N-末ドメイン同士が接することはない。AlrS のアミノ酸配列は、*B. stearothermophilus* の ALR [21, 31, 67-69] に対して 34%の相同性しか示さないが、両タンパク質はほとんど同じ立体構造を取っている (Fig. 30)。しかしながら、*Bacillus* ALR において認められる C-末の β -strand は AlrS では認められなかった。Fig. 30A は、両 *Bacillus* ALR と AlrS の二量体構造を重ね書きした様子を示す。この場合、

二つの ALR 間における位置関係の r.m.s.偏差 (平均二乗誤差) は、二量体で 1.95 Å、一量体で 1.75 Å であった。注目すべきは、C-末ドメインと N-末ドメインとの間の位置関係が二種の ALR の間でずれていることであり、N-末ドメイン同士を重ね合わせた場合には、C-末ドメイン同士は重な

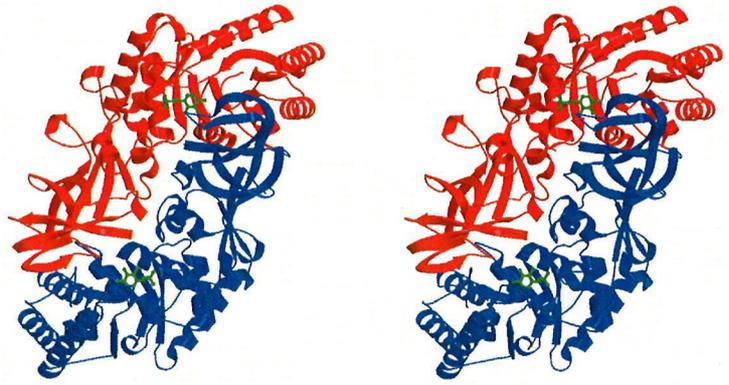


Fig. 29. AlrS 二量体結晶構造 (ステレオビュー)
補酵素 PLP を緑色、それぞれのサブユニットを赤色および青色で示している。

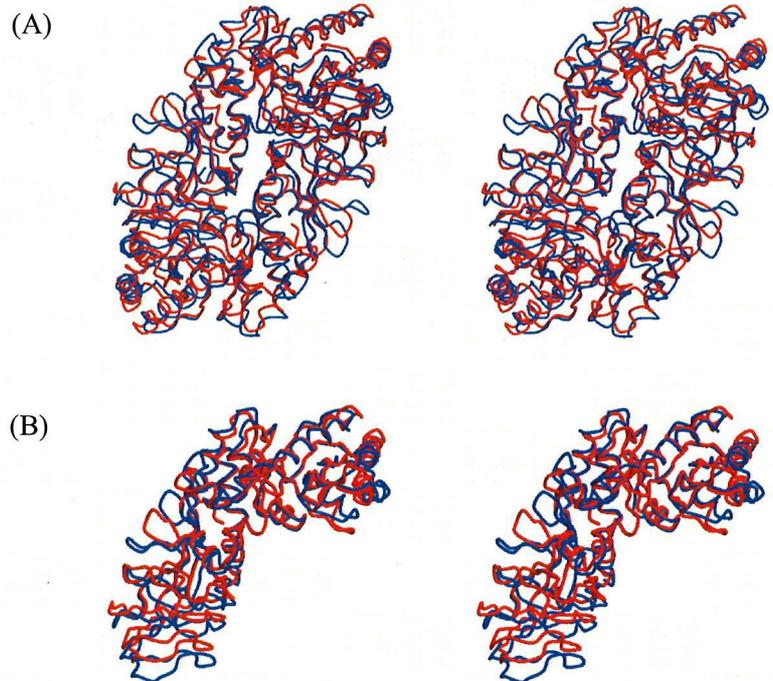


Fig. 30. AlrS と *Bacillus* ALR との重ね書き (ステレオビュー)
A, 二量体構造同士; B, サブユニット同士
AlrS を赤色、*Bacillus* ALR を青色で示す。

らない (Fig. 30B)。

残された両 ALR の C-末ドメイン間での r.m.s.偏差は 3.32 Å であった。これらの観察結果は、AlrS 単量体における N-末ドメインおよび C-末ドメインの重心間の距離が、*Bacillus* ALR と比較して約 1 Å 程小さいことからわかるように、AlrS 単量体の構造が *Bacillus* ALR に比べて、若干折り曲がった構造をとっていることに起因すると考えられる。事実、AlrS では *Bacillus* ALR と比較した場合にそのサブユニット間での相補性が低く、AlrS におけるサブユニット同士の接触面積はおよそ 2,800 Å² であるが、*Bacillus* ALR では 3,200 Å² である。従って、*Bacillus* ALR ではサブユニット間での空隙を埋めるように、両分子がしっかりと組み合わさっているように見える (Fig. 31)。

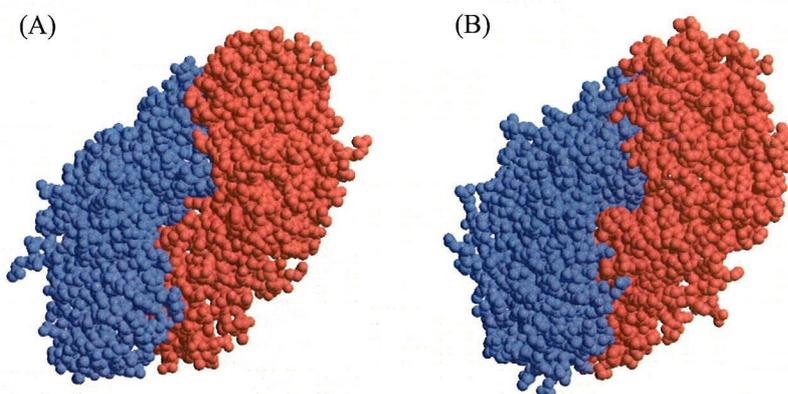


Fig. 31. AlrS (A) および *Bacillus* ALR (B) の Space filling モデル
それぞれのサブユニットを赤色と青色で区別して示す。

第四節 AlrS の活性部位周辺構造

二量体形成によって生ずる AlrS の二箇所の触媒活性部位は、PLP とその結合残基である Lys³⁸、そして PLP の周りを囲んでいる周辺残基によって構成されている。*Bacillus* ALR にも見られるような、種々の ALR にも保存されている PLP 周辺残基は (Fig. 9)、ほぼ全て保存されていた。とりわけ、PLP のリン酸基と相互作用している残基と、PLP 周辺の水素結合ネットワークを形成している残基の保存性が高い。

二箇所の活性部位にあるそれぞれの PLP は、 α/β バレルの中心に近い場所にあり、もう一方のサブユニットの C-末ドメイン側に接している。*Bacillus* ALR における Lys³⁹ と同じように、PLP は Lys³⁸ と共有結合して存在している (Fig. 32)。AlrS 中における PLP のリン酸基は、Tyr⁴²、Tyr³⁶¹、Ser²⁰⁹ の側鎖、Ser²⁰⁹、Gly²²⁶、Leu²²⁷ の主鎖と、それぞれ水素結合を形成しているが、これらの残基は *Bacillus* ALR においても完全に保存されている (Tyr⁴³、Tyr³⁵⁴、Ser²⁰⁴、Gly²²¹、Ile²²²)。

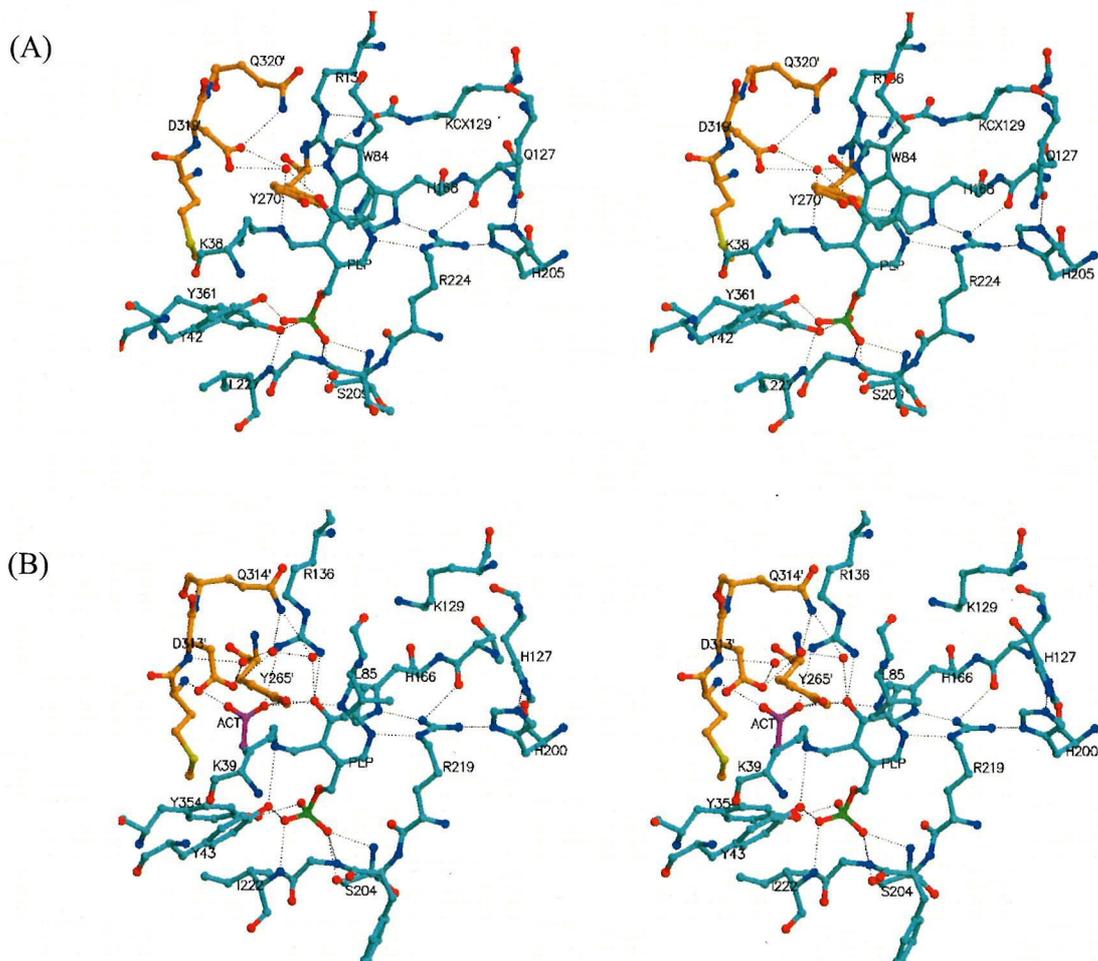


Fig. 32. AlrS (A) および *Bacillus* ALR (B) における活性部位周辺構造の比較
 それぞれのサブユニットに由来する残基はオレンジ色、水色で区別している。また、*Bacillus* ALR の構造中に含まれている酢酸分子は紫色で示す。

PLP のピリジン環は、自身の N-1 原子と Arg²²⁴ の Nε原子との間の水素結合によって固定されている。また、この Arg²²⁴ の Guanidinium 部分は、Arg¹³⁶, Tyr^{270'}, His¹⁶⁸, Arg²²⁴, His²⁰⁵, Gln¹²⁷, Asp¹⁰¹, Arg¹²⁵ と続く、長大な水素結合ネットワークの一部を形成している。これらの残基のうち、5 残基は *Bacillus* ALR においても保存されている (Arg¹³⁶, Tyr^{265'}, His¹⁶⁶, Arg²¹⁹, His²⁰⁰)。しかしながら、AlrS の Gln¹²⁷ に相当する *Bacillus* ALR の His¹²⁷ は、His²⁰⁰ と Gln¹⁶¹ の側鎖と水素結合ネットワークを形成している。また、AlrS の Arg²²⁴ は Ser¹⁶⁷ とも水素結合を形成しているが、*Bacillus* ALR では Thr¹⁶⁵ がこの残基に置き換わっている。

Arg¹³⁶ 側鎖部分の Nη-2 原子は、PLP のフェノール性水酸基と弱いながらも相互作用していると推測される。というのも、AlrS におけるこの二原子間の距離は水素結合を形成しうるには長すぎるが、*Bacillus* ALR においても Arg¹³⁶ として保存されているこの残基は、明らかに PLP のフェノール性酸素原子と水素結合を形成しているためである。この Arg¹³⁶ はまた、KCX¹²⁹ (Lysine

N ϵ -carboxylate) のカルボキシル基との間に形成される二つの水素結合によって安定化されている。PLP のフェノール性水酸基は、水一分子を介することによって、Lys³⁸ のアミン部分、Trp⁸⁴ の N ϵ -1 原子、Asp³¹⁹ のカルボキシル基と水素結合ネットワークを形成しており、更に Asp³¹⁹ のカルボキシル基から Gln³²⁰ の側鎖部分へと繋がっている。これらの残基のうち、*Bacillus* ALR においては Trp⁸⁴ だけは疎水性である Leu⁸⁵ に置き換わっていたが、残りの残基は保存されている (Asp³¹³, Gln³¹⁴)。PLP と Lys³⁸ を繋いでいる共有二重結合は、AlrS においては *trans* 型であるが、一方 *Bacillus* ALR においては *cis* 型となっている。AlrS においてはこの *trans* 型配置により、Lys³⁸ の側鎖が水素結合ネットワークに参加できるようになり、また PLP のフェノール性水酸基と Asp³¹⁹ との間の水素結合を仲介できるような場所に、水分子が位置することができている。

Bacillus ALR の結晶化には、沈澱剤として酢酸の存在が必要であると報告されているが、これは酢酸分子が Ala 分子と似たような方法で活性部位に入り込むためであると考えられる。*Bacillus* ALR において、酢酸分子は Arg¹³⁶ と Tyr²⁶⁵ の側鎖と、そして Met³¹² の側鎖とそれぞれ水素結合を形成している。これらの残基は AlrS においても保存されているが (Arg¹³⁶, Tyr²⁷⁰, Met³¹⁸)、このうち Arg¹³⁶ と Tyr²⁷⁰ は直接水素結合を形成しており、また Met³¹⁸ の主鎖も、ひとつの水分子と弱いながらも水素結合を形成している。

Bacillus ALR においては、PLP ピリジン環の非極性部分を安定化させるために、いくつかの残基が寄与していることがわかっている (Val³⁷, Ala⁶³, Ala⁶⁵, Leu⁸³, Leu⁸⁵, Tyr¹⁶⁴)。AlrS では、これらの残基はそれぞれ Val³⁶, Gly⁶², Ala⁶⁴, Met⁸², Trp⁸⁴, Trp¹⁶⁶ に相当するものである。両 ALR において、PLP 周辺にあって水素結合ネットワークを形成するような極性残基は高度に保存されているが、PLP 環自身の周辺にある疎水性残基の保存性はあまり高くはない。AlrS における、Trp⁸⁴ から Pro⁹¹ までの主鎖の原子は、*Bacillus* ALR において相当する領域である Leu⁸⁵ から Asp⁹² までの部分とは重なり合わない。特に、*Bacillus* ALR における Leu⁸⁵ に相当する Trp⁸⁴ の主鎖の C α 原子は、PLP 環からおおよそ 1 Å も遠ざかっている。しかしながら、この残基における部分的な大きなシフトは、Trp⁸⁴ 自身の持つ大きな側鎖によって埋め合わせられており、結果的には AlrS においても、PLP 環との疎水性相互作用そのものは保存されている。

分子表面から活性部位に至るまでの基質に対するチャンネルは、酵素サブユニット自身の N-末ドメインおよび C-末ドメイン、そしてもう一方のサブユニットの C-末ドメインによって形成されている。チャンネル入り口近辺の残基は極性を持つものが多く、逆に活性部位に近い方では疎水性残基が主であった。チャンネルを形成するこれらの残基 (Asp¹⁷³⁽¹⁷¹⁾, Glu¹⁷⁴⁽¹⁷²⁾, Pro²³⁴⁽²²⁹⁾, Ser²³⁵⁽²³⁰⁾, Pro²³⁶⁽²³¹⁾, Ile³⁵⁹⁽³⁵²⁾, Tyr³⁶¹⁽³⁵⁴⁾, Tyr²⁷⁰⁽²⁶⁵⁾, Gly²⁷¹⁽²⁶⁶⁾, Tyr²⁸⁹⁽²⁸⁴⁾, Arg²⁹⁵⁽²⁹⁰⁾, Arg³¹⁵⁽³⁰⁹⁾; ()内は *Bacillus* ALR におけるナンバリング) は、AlrS と *Bacillus* ALR との間のみならず、Fig. 9 に示すように全ての ALR において保存されており、このチャンネルが基質のアクセスにとって重要な働きをしていることがわかる。

第五節 DCS および LCS 結合型 AlrS における活性部位と PLP 誘導体の構造

AlrS および DCS, LCS 結合型の AlrS の結晶構造を、それぞれ 2.0, 1.9, 2.3 Å の分解能で決定した。Cycloserine 結合型 AlrS の空間群は結合型のものとは異なっていたが、全体的な構造は視覚的にはほぼ同じであり、三つの構造間における主鎖原子に対する r.m.s.偏差は 0.30, 0.43, 0.45 Å、側鎖原子に対する値は 0.62, 0.56, 0.73 Å である。

DCS および LCS 結合型 AlrS の活性部位における最終的な電子密度を観察すると、PLP の C-4'原子と Lys³⁸ のアミノ基との間の結合が消失し、その代わりに PLP の C-4'が cycloserine 環のアミノ基と新たな結合を形成していることがわかる (Fig. 33)。DCS と PLP が結合することによって生じる PLP 誘導体由来と思われる電子密度は、cycloserine 環平面と、そこから PLP の C-4'原子へ伸びる飽和結合部分から成っており、この結果から PLP が 3-

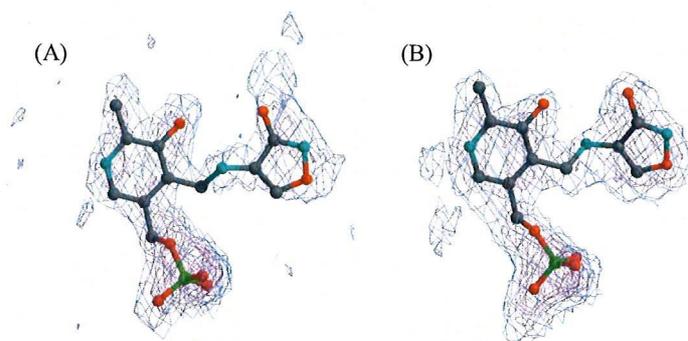


Fig. 33. AlrS の活性部位中に観察される DCS 結合型 PLP 誘導体の $F_o - F_c$ 電子密度マップ

二箇所の活性部位において、それぞれ観察される誘導体の構造を A, B に示す。

hydroxyisoxazole pyridoxamine 5'-phosphate (PMP) へと変換されたことがわかる。一方 LCS 結合型 AlrS においては、その分解能が若干低かったこともあるが、この部分の電子密度図がはっきりせず、この情報だけで LCS 結合型 PLP が PMP 誘導体に変換されていると結論づけることはできない。

DCS の活性部位への結合により、AlrS との間に新しく3つの水素結合が形成される (Fig. 34A, B)。Cycloserine 環の酸素原子と窒素原子は、それぞれ Tyr^{289'} の水酸基、Met^{318'} の主鎖アミドとそれぞれ水素結合を形成しており、イソキサゾール環の水酸基は Arg¹³⁶ のグアニジウム部分と作用している。これらの新たな水素結合の形成は *Bacillus* ALR においても見られ、ここでは DCS, LCS 結合型共に PMP 誘導体を形成していることがわかっており、ここで述べた Arg¹³⁶, Tyr^{289'}, Met^{318'} は、*Bacillus* ALR では Arg¹³⁶, Tyr^{284'}, Met^{312'} にそれぞれ相当する。

おもしろいことに、DCS 結合型 AlrS の二箇所の活性部位では、PMP 部分とイソキサゾール環はほぼ同じ位置を占めているにも関わらず、空間群からもわかるように、サブユニット同士は非対称構造をとっている (Fig. 34A, B)。これは PMP とイソキサゾール環を繋ぐ3つの結合のねじれ角の違いに由来するものであり、その結果、誘導体におけるイソキサゾール環の C α 原子は、一方の活性部位では Tyr^{270'} のフェノール性水酸基の近くに (Site-A)、もう一方の活性部位では Lys³⁸ の N ζ 原子の近くにそれぞれ位置している (Site-B)。この観察結果は、DCS が例えばラセミ化反応を含むような異なった経路を経て、最終誘導体に変換されたことを示している。この DCS の最終不

活化体への変換の違いが AlrS における DCS 耐性と深く関わっている部分であり、その詳細については次節で述べる。さらに言えば、Site-A と Site-B でその水素結合の様式は異なっており、Site-A においては Tyr²⁷⁰の水酸基と水素結合を形成しているのは PMP のアミン部分であるが、Site-B ではイソキサゾール環の水酸基である。

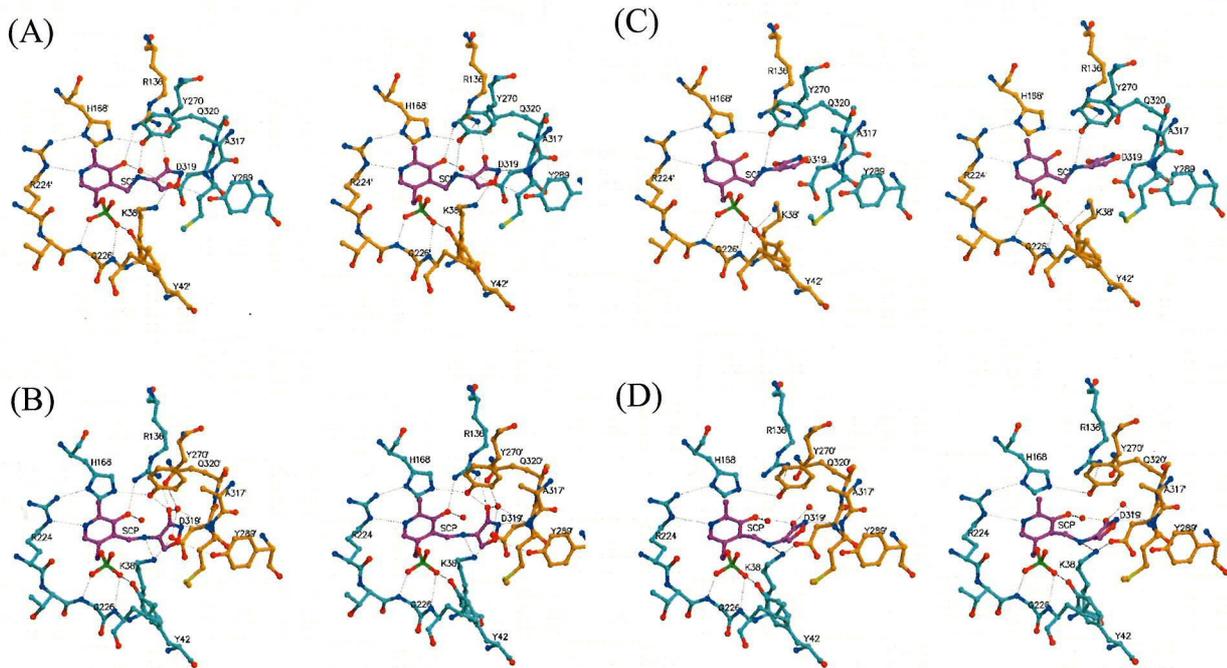


Fig. 34. DCS および LCS 結合型 AlrS における活性部位周辺の構造

それぞれ、DCS 結合型 AlrS の Site-A (A), Site-B (B)、LCS 結合型 AlrS の Site-A (C), Site-B (D) を示す。それぞれのサブユニットに由来する残基は異なる色で示している (オレンジ色, 青色)。また、SCP と名付けた cycloserine-PLP 誘導体は紫色で示す。

LCS 結合型 AlrS の活性部位における電子密度から判断すると、AlrS に対する LCS の結合性は、DCS によるものよりも弱いことが考えられる。この結果は、前章で行った *in vitro* の実験でも明らかになったように、AlrS に対する LCS の阻害速度が DCS と比べて著しく低いこととも一致している。LCS の結合により、タンパク質と PMP 誘導体の間に新たに形成される水素結合は一つのみである (Fig. 34C, D)。Site-A においてはイソキサゾール環の窒素原子と Met³¹⁸ の主鎖のアミドとの間に、一方、Site-B ではイソキサゾール環の酸素原子と Met³¹⁸ の主鎖アミドとの間に、それぞれ水素結合が形成される。DCS 結合型 PLP と比較した場合、C-4'原子とアミンの窒素原子との間のねじれ角が変化しており、イソキサゾール環が全体的に沈み込んでいる。この変化により、PMP とイソキサゾール環の2つのフェノール性水酸基の間における分子内水素結合が可能となっている。以上の内容を総括すれば、DCS および LCS の cycloserine 環は、その構造の僅かな違いにより、

LCS と比べて DCS がより強固に結合できるという、わずかに異なった様式で活性部位にまず取り込まれる。しかしながら、両異性体のアミノ基が PLP の C-4'原子と反応することができるため、結果としてアミノ基転移反応が生ずるものであると考えられる。

DCS 結合型 AlrS の構造において観察されたように、LCS と結合した PLP 誘導体もタンパク質二量体それぞれの活性部位に存在しており、非対称構造を形成している (Fig. 34C, D)。LCS 結合型誘導体のイソキサゾール部分の C α 原子は、Site-A においては Tyr^{270'}のフェノール性水酸基の近くに、Site-B では Lys³⁸の N ζ 原子の近くに位置していた。この観察結果は、DCS, LCS 共に、ラセミ化反応を伴うようなある程度の段階を経て、最終不活化体を形成するものであることを示すものである。

第六節 DCS 耐性の構造生物学的考察

Bacillus ALR では、その反応中間体アナログである *N*-(5'-phosphopyridoxyl)-L-Ala (PLP-L-Ala) および *N*-(5'-phosphopyridoxyl)-D-Ala (PLP-D-Ala) との複合体の結晶構造が明らかにされており、PLP-L-Ala の Ala 部分の α -水素は Tyr^{265'}の近くに、一方 PLP-D-Ala での α -水素は Lys³⁹の近くにあることがわかっている [69]。これらの観察結果は、Tyr^{265'}および Lys³⁹がそれぞれ L-Ala および D-Ala から触媒塩基として α -水素を引き抜くという報告にも合致するものである [33]。基質から引き抜かれた α -水素が Lys³⁹と Tyr^{265'}の間で移送されるという、この二塩基触媒メカニズムは重要であり、さもないと ALR による酵素反応は一回のラセミ化反応で終了してしまう。

Bacillus ALR においては、酵素反応速度論的解析と構造学的研究を通じ、cycloserine による ALR の不活化メカニズムが提唱されている [21]。このメカニズムによれば、cycloserine はアミノ基転移反応から不可逆的な互変異性反応を経由することで ALR を阻害する。DCS および LCS と結合した *Bacillus* ALR の結晶構造解析結果は、両 cycloserine に由来する PMP 誘導体は全く同一のものであることを示している。また AlrS とは対照的に、DCS および LCS との反応に由来する最終不活化体のコンフォメーションも同じものである。さらに、ALR 二量体中の二箇所の活性部位に存在する誘導体も似たような構造を取っており、このことから *Bacillus* ALR においては、途中のアルジミン中間体構造のラセミ化反応よりも、ケチミン形成の方が優先して起こっていると考えられる。

前章において、AlrS の DCS による time-dependent inactivation の速度は、他の DCS 感受性 ALR と比べて緩やかであることを明らかにした。AlrS で観察されたこの結果は、非競合的に酵素活性を阻害する DCS の最終不活化体への変換速度が明らかに遅く、結果として AlrS が DCS 耐性を獲得していることを示している。DCS 結合型 AlrS の結晶構造における DCS 最終不活化体の C α 原子は、Site-A では Tyr^{270'}の水酸基の近く、Site-B では Lys³⁸のアミノ基の近くにそれぞれ位置している。Site-A および Site-B におけるこの位置関係は、PLP-L-Ala および PLP-D-Ala 結合型の

Bacillus ALR において観察された位置関係と同じ様な関係を持つ。更に、LCS 結合型 AlrS の結晶構造においても似たような結果が観察されている。

以上の現象を総合的に考えると、活性部位に結合した DCS および LCS のうち、およそ半分がそのまま最終不活化体へ反応し、残りの半分は、以下に続くイミン転移反応、互変異性化反応に移行する前にラセミ化を受け、他方の立体配置に変化するものと思われる (Fig. 35)。Fig. 35 に示すように、緩やかに進行するケチミン形成反応よりもアルジミン中間体のラセミ化反応が優先して起こるとするこの仮定としてのメカニズムは、*Bacillus* ALR において得られた結果と相反する。アルジミン中間体の寿命が延長されることで、本来の基質との反応による阻害剤の解離と、それに伴う本来の反応を生じるチャンスが増える。この考え方に基つけば、ラセミ化反応を阻害する DCS-PLP 最終不活化体への反応速度の遅延が、AlrS における DCS 耐性の本体であると結論することができる。

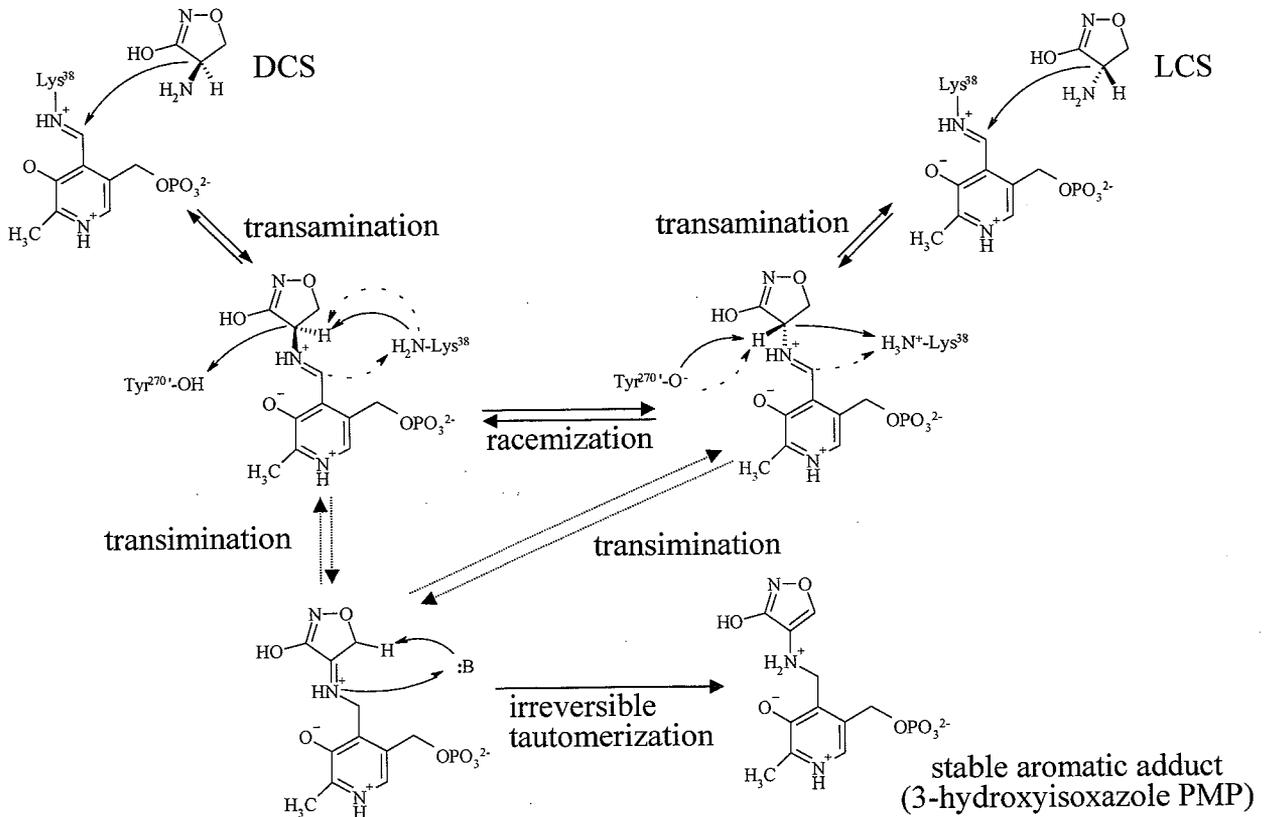


Fig. 35. DCS および LCS による ALR 不活化メカニズムの仮説モデル

図中の残基は AlrS における残基番号を例として表記している。

AlrS において、DCS が最終不活化体に変換されてしまう手前で、ラセミ化反応を受けること

ができる理由は、その活性部位周辺の構造によるものであると思われる。第三節でも述べたように、AlrS はそのサブユニットの形状により、*Bacillus* ALR と比較して二量体形成時のサブユニット間の相互作用が弱いと考えられる。二量体接触表面の相補性の低下は、サブユニット同士の結合によって形成される活性部位空間の拡張を引き起こす。このことは、Arg¹³⁶ のグアニジウム部分と PLP 分子のフェノール性酸素との間の水素結合が、AlrS においては消失していることからわかる (Fig. 32)。AlrS における活性部位空間の拡張が、DCS 誘導体のラセミ化を可能にしているように思われる。

第七節 総括

本章では、まず DCS 生産菌 *S. lavendulae* ATCC25233 由来 AlrS の結晶化を行い、その X 線結晶構造を明らかにした。続いて DCS および LCS 結合型 AlrS の結晶構造も同様に解析し、*B. stearothermophilus* ALR のそれぞれの構造と比較することで、前章で論じた AlrS の DCS に対する自己耐性への寄与を、構造生物学的に証明した。AlrS の活性部位は広い空間を維持しており、その特徴によって、DCS 反応中間体のラセミ化が促進され、また最終不活化体形成速度が減少している。これが AlrS の DCS に対する耐性メカニズムの本体であると結論づけられる。

前節で述べた以外に、DCS 耐性に関与していると思われるもうひとつの理由として、DCS による活性部位の安定化の違いが挙げられる。非結合型 AlrS と DCS 結合型 AlrS における、Tyr²⁷⁰ を含んだ turn 領域の平均温度因子の値は、それぞれ 33.6, 24.1 Å² であった。これらの値は、それぞれの構造において算出したタンパク質全体の温度因子の値と似通っており、DCS の結合による安定化効果を見出すのは困難であった。一方、*Bacillus* ALR での DCS 非結合型および結合型の構造において、一致する領域の平均温度因子の値はそれぞれ 41.1 および 27.4 Å² であった。非結合型におけるこの値は、タンパク質全体での値 (29.7 Å²) と比べてかなり大きく、この領域がフレキシブルであることがわかる。しかしながら、DCS と結合した場合には、全体での平均温度因子の値 (25.7 Å²) と比べ、その差が著しく小さくなっている。*Bacillus* ALR で観察されたこの現象は、タンパク質への DCS の結合による安定化効果がかかなり大きいことを示している。

コンビナトリアルケミストリーに代表されるように、近年の新薬開発技術は目覚ましい発展を遂げた。それでも加工ベースとなる化合物の構造を決定する際には、天然資源からのスクリーニングに長らく頼っていたが、最近ではコンピュータの発達に伴い、タンパク質の立体構造をもとにして、活性に必要な部位を特異的に阻害するような化合物を、かなり精密なレベルで予測できるようになった [72, 73]。わずかに種類ではあるが、薬剤耐性菌においてその抗生物質耐性に寄与している酵素の構造を明らかにしたことで、新たな抗菌薬をデザインする際に用いるデータベースに対し、貴重な情報を提供できたと考える。本研究の成果が、新薬開発の際に役立つこと、ひいてはその薬剤が臨床の場で活躍することを期待する。

【実験の部】

1. 使用菌株

(1) 大腸菌

TG1	<i>supE</i> , <i>hsd</i> Δ 5, <i>thi</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lac I</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15]
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$), <i>e14^-</i> (<i>mcrA^-</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lac I</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15]
XL1-Blue MRA (P2)	<i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> /F' [<i>proAB</i> ⁺ , <i>lac I</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15:: <i>Tn10</i> (<i>tet</i> ^r)]
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> (λ CI 857), <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7gene1</i>), <i>dcm</i> (DE3) (B株由来)
K12 W3110	F ⁻ , λ^- , IN (<i>rrnD-rrnE</i>)

(2) 放線菌

Streptomyces coelicolor A3(2) M145

Streptomyces lavendulae ATCC25233

2. 使用プラスミド

Lambda DASH II Vector

pUC18

pUC19

pET-21a(+)

3. 使用培地

[LB 培地]

polypeptone	1.0 (w/v) %
yeast extract	0.5 (w/v) %
NaCl	1.0 (w/v) %

蒸留水に溶解後、NaOHにて pH 7.0 に調整し、オートクレーブして用いた。

寒天培地として使用する際は agar を final 1.5 (w/v) % となるように加えた。

[GMP 培地]

glucose	1.0 (w/v) %
meat extract	0.2 (w/v) %
polypeptone	0.4 (w/v) %
yeast extract	0.2 (w/v) %
NaCl	0.5 (w/v) %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.025 (w/v) %

蒸留水に溶解後、NaOH で pH 7.0 に調整し、オートクレーブした。

[YEME 培地]

glucose	1.0 (w/v) %
polypeptone	0.5 (w/v) %
yeast extract	0.3 (w/v) %
meat extract	0.3 (w/v) %
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.04 (w/v) %

蒸留水に溶解後、NaOH で pH 7.0 に調整し、オートクレーブした。

[FB 培地]

fructose	1.0 (w/v) %
polypeptone	0.2 (w/v) %
yeast extract	0.1 (w/v) %
meat extract	0.1 (w/v) %
微量金属溶液	1.0 (v/v) %

蒸留水に溶解後、NaOH で pH7.0 に調整し、オートクレーブした。

寒天培地として使用する際には agar を最終濃度 2.0 (w/v) % となるよう加えた。

[微量金属溶液] (100 mL 中の含量)

FeSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	50 mg
H ₃ BO ₃	5 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10 mg
[(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄]·4H ₂ O	0.2 mg
conc. H ₂ SO ₄	1 drop

蒸留水に溶解後、フィルター滅菌した。

[NZYM 培地]

NZ amine	1.0 (w/v) %
NaCl	0.5 (w/v) %
yeast extract	0.5 (w/v) %
MgSO ₂ ·7H ₂ O	0.2 (w/v) %

蒸留水に溶解後、NaOH で pH7.0 に調整し、オートクレーブした。

[preSOB 培地]

polypeptone	2.0 (w/v) %
yeast extract	0.5 (w/v) %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM

蒸留水に溶解後、KOH で pH7.0 に調整し、オートクレーブした。

[SOC 培地] (1 mL)

preSOB 培地	980 μL
2M Mg ²⁺ Soln.	10 μL
2M glucose Soln.	10 μL

使用する直前に、無菌的に混合した。

[2M Mg²⁺ Soln.]

MgCl ₂	1M
MgSO ₂	1M

蒸留水に溶解後、フィルター滅菌した。

[2M glucose Soln.]

glucose	2M
---------	----

蒸留水に溶解後、フィルター滅菌した。

[M9 培地] (1 L)

M9 培地 A 液	980 mL
M9 培地 B 液	20 mL

使用する直前に無菌的に混合した。

[M9 培地 A 液] (980 mL)

Na ₂ HPO ₂	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g

蒸留水に溶解後、オートクレーブした。

[M9 培地 B 液] (20 mL)

NH ₄ Cl	1 g
glucose	2 g
thiamine	10 mg
MgSO ₂ ·7H ₂ O	246 mg
CaCl ₂	14.7 mg

蒸留水に溶解後、フィルター滅菌した。

4. 一般的操作

(1) 放線菌からの染色体 DNA 抽出

YEME 培地 50 mL にて 28°C, 48 h 振盪培養した放線菌の培養液から、3,000 × g, 4°C, 20 min の遠心により菌体を回収した。菌体を適量の glucose-EDTA Soln. に懸濁させ、再び 3,000 × g, 4°C, 20 min の遠心により菌体洗浄を行なった。その菌体を 9 mL の glucose-EDTA Soln. に懸濁後、20 mg の lysozyme を添加し、37°C で 30 min インキュベートした。続いて 1 mL の 10 (w/v) % SDS Soln. を加え、穏やかに攪拌した。溶菌後、2.5 mL の 5M sodium perchlorate Soln. を加え、穏やかに混和した。12.5 mL の chloroform-isoamylalcohol (24:1) Soln. を加えて室温にて 20 min 穏やかに攪拌した後、20,000 × g, 15°C, 20 min の遠心を行い、上清を回収した。その上清に 2 倍量の 100% cold EtOH を加え、ガラス棒で穏やかに攪拌することで、析出した DNA を巻き取った。70 (v/v) % cold EtOH で DNA をリンスした後、風乾し、適量の TE Soln. に溶解後、4°C にて保存した。

[glucose-EDTA Soln.]

glucose	50 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM
EDTA·Na ₂	10 mM

蒸留水に溶解後、オートクレーブし、RNase (Roche, Germany) を最終濃度 100 µg/mL と
なるよう加えた。

[TE Soln.]

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA·Na ₂	1 mM

蒸留水に溶解後、オートクレーブした。

(2) 大腸菌からの染色体 DNA 抽出

LB 培地 150 mL にて 37°C, 16 h 振盪培養した大腸菌の培養液から、3,000 × g, 4°C, 20 min の遠心により菌体を回収した。菌体を適量の cell resuspension Soln. に懸濁し、再び 3,000 × g, 4°C, 20 min の遠心によって菌体を洗浄した。その菌体を 9 mL の cell resuspension Soln. に懸濁後、1 mL の 10 (w/v) % SDS Soln. を加え、穏やかに攪拌した。溶菌後、2.5 mL の 5M sodium perchlorate Soln. を加え、穏やかに混和した。続いて、12.5 mL の chloroform-isoamylalcohol (24:1) Soln. を加えて室温で 20 min 攪拌した後、20,000 × g, 15°C, 20 min の遠心を行い、上清を回収した。その上清に 2.5 倍量の 100% cold EtOH、および 1/10 倍量の 3M AcONa Soln. を加えて攪拌した後、-80°C で 30 min 静置した。20,000 × g, 4°C, 20 min の遠心により回収した DNA の沈澱を適量の 70 (v/v) % cold EtOH でリンス後、減圧乾燥し、適量の TE Soln. に溶解後、4°C にて保存した。

[cell resuspension Soln.]

Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM
EDTA·Na ₂	10 mM

蒸留水に溶解後、オートクレーブし、RNase を最終濃度 100 µg/mL となるよう加えた。

(3) 大腸菌からのプラスミド DNA 大量調製

プラスミド DNA を保有する大腸菌を、適当な抗生物質を含む 150 mL の LB 培地で 37°C, 8 h 振盪培養した。培養液を 3,000 × g, 4°C, 20 min の遠心により菌体を回収した後、10 mL の glucose-EDTA Soln. に懸濁し、再度 3,000 × g, 4°C, 20 min で遠心することによって菌体を洗浄した。その菌体を 5 mL の glucose-EDTA Soln. に再懸濁させた後、5 mg の lysozyme を加えて穏やかに攪拌した。続いて 10 mL の cell lysis Soln. を加えて穏やかに混和し、氷上で 10 min 静置した。7.5 mL の neutralization Soln. を加えて軽く攪拌し、15,000 × g, 4°C, 10 min の遠心により上清を回収した。上清に対し 0.6 倍量の isopropanol を加えてよく攪拌し、室温で 10 min 静置した。5,000 × g, 15°C, 20 min の遠心により得られた沈殿物を、適量の 70 (v/v) % cold EtOH でリンスした後、減圧乾燥し、その乾燥物を 8 mL の TE Soln. に溶解した。この溶液に 8 g の CsCl、800 mL の EtBr Soln. (10 mg/mL) を順次加え

て、よく混和した後、超遠心用のチューブに移し、200,000 × g, 15°C, 24 h 遠心した。遠心終了後、EtBr 染色されたプラスミド DNA のバンドを注射器により回収した。回収した溶液と等量の 5M NaCl 飽和 isopropanol を加えてよく混和し、EtBr の移行した上層 (isopropanol 層) を取り除いた。水層が透明になるまでこの操作を繰り返した後、得られたプラスミド DNA 溶液に 2 倍量の TE Soln. を加えて混和した。全容量の 2.5 倍量の 100% cold EtOH を加えてよく混和した後、-80°C で 1 h 静置した。5,000 × g, 4°C, 20 min の遠心により得られた DNA を適量の 70 (v/v) % cold EtOH でリンスし、減圧乾燥後、適量の TE Soln. に溶解して 4°C にて保存した。

[cell lysis Soln.]

NaOH	0.2 M
SDS	1 (w/v) %

蒸留水に溶解後、オートクレーブして用いた。

[neutralization Soln.]

AcOK	1.32 M
------	--------

蒸留水に溶解後、CH₃COOH にて pH 4.8 に調整し、オートクレーブした。

[5 M NaCl 飽和 isopropanol] (50 mL)

5M NaCl Soln.	25 mL
isopropanol	25 mL

よく混和して静置し、上層を用いた。

[5 M NaCl Soln.]

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
NaCl	5 M
EDTA·Na ₂	1 mM

蒸留水に溶解して調製した。

(4) 大腸菌からのプラスミド DNA の少量調製法

Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA) を用いて行った。プラスミド DNA を保有する大腸菌を、適当な抗生物質を含む 4 mL の LB 培地で 37°C, 16 h 振盪培養した。培養液を 13,000 × g, 4°C, 30 sec の遠心によって菌体を回収した後、200 μL の cell resuspension Soln. に懸濁させ、再度 13,000 × g, 4°C, 30 sec にて遠心することに

よって菌体を洗浄した。その菌体を 200 μ L の cell resuspension Soln. に再懸濁させた後、200 μ L の cell lysis Soln. を加えて穏やかに混和した。溶菌液に 200 μ L の neutralization Soln. を加えて軽く混和し、13,000 \times g, 4°C, 10 min の遠心を行い、上清を回収した。5 mL 容量のシリンジに移した上清に 1 mL の Wizard Minipreps DNA Purification Resin を加えてよく混和することで、Resin にプラスミド DNA を吸着させた。シリンジの先に Wizard Mini-column をつけ、押し出すことで Resin をカラムに吸着させた後、同様にして 2 mL の column wash Soln. を通過させ、カラムを洗浄した。13,000 \times g, 4°C, 2 min の遠心によってカラムに残った余計な水分を取り除き、残った Resin に適量の TE Soln. を加えて 1 min 静置した後、13,000 \times g, 4°C, 2 min の遠心によってプラスミド DNA 溶液を回収した。

[column wash Soln.]

AcOK	80 mM
Tris-HCl (pH 7.5)	8.3 mM
EDTA·Na ₂	40 μ M

蒸留水に溶解後、オートクレーブし、使用直前に最終濃度 55 (v/v) % EtOH 溶液にして用いた。

(5) PCR 反応

PCR 反応は、KOD polymerase (TOYOBO, Japan) および Blend Taq (TOYOBO) を用いて行った。各反応液を 100 μ L 容チューブに調製し、各サンプルの反応条件に合わせて、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) にて反応を行った。

[KOD polymerase 反応液の組成]

template DNA	100-500 ng
10 \times KOD buffer	5.0 μ L
dNTP mix (2 mM each)	4.0 μ L
MgSO ₄ (25 mM)	2.0 μ L
sense primer (10 μ M)	1.5 μ L
anti-sense primer (10 μ M)	1.5 μ L
DMSO	2.5 μ L
KOD polymerase (1 U/ μ L)	0.5 μ L

dH₂O により、最終容量 50 μ L に調製した。

[Blend Taq 反応液組成]

template DNA	100-500 ng
10 × Blend Taq buffer	5.0 μL
dNTP mix (2 mM each)	4.0 μL
sense primer (10 μM)	1.5 μL
antisense primer (10 μM)	1.5 μL
DMSO	2.5 μL
Blend Taq (2.5 U/μL)	0.5 μL

dH₂O により、最終容量 50 μL に調整した。

(6) アガロースゲル電気泳動法

1 × TAE buffer に最終濃度が 0.8-1.5 (w/v) % となるように agarose (LO3 TaKaRa, Japan) を加え、電子レンジで加熱溶解した後、最終濃度が 0.5 μg/mL なるよう EtBr Soln. (10 mg/mL) を加えた。ゲル作製用プレートに agarose を注ぎ、コームをセットした後、室温で固化するまで静置した。ゲルを泳動槽にセットし、色素溶液 (XC, BPB, OG) を 1/6 倍量加えた DNA 溶液をウェルにアプライした。100 V で電気泳動した後、312 nm の UV 照射により DNA のバンドを検出した。

[50 × TAE buffer]

Tris	2 M
EDTA·Na ₂	0.1 M

蒸留水に溶解後、AcOH で pH 8.0 に調整した。
使用時に蒸留水で 1 × に希釈して用いた。

[色素溶液]

glycerol	40 (v/v) %
xylene cyanole FF (XC)	0.1 (w/v) %
bromophenol blue (BPB)	0.1 (w/v) %
orange G (OG)	0.1 (w/v) %

蒸留水に溶解後、13,000 × g, 4°C, 10 min の遠心操作を行い、その上清を用いた。

[λ/Hind III マーカー]

λ DNA	8 μg
10 × M buffer	20 μL
Hind III	24 U

dH₂O にて最終容量 200 μL に調製し、37°C, 5 h 反応させ、55°C, 10min の加熱処理の後に色素溶液を加えて用いた。

(7) アガロースゲルからの DNA 断片の回収

GENECLEAN II KIT (BIO 101, USA) を用いて行った。泳動後のアガロースゲルから目的の DNA 断片を含む部分を切り出し、チューブに移した。ゲル重量の 3 倍量の NaI を加え、55°C の温浴上でゲルが完全に溶解するまで加温した。5 mL の GLASSMILK を加えた後、時折混和しながら氷上で 15 min 静置した。13,000 × g, 4°C, 15 sec の遠心操作で得られた沈澱に、500 μL の NEW Wash Soln. を加え、よく攪拌した後に 13,000 × g, 4°C, 15 sec で遠心した。この操作を 3 回繰り返した後、得られた GLASSMILK の沈澱を減圧乾燥させた。適量の TE Soln. を加えて懸濁させた後、55°C の温浴上で 2 min 加温し、13,000 × g, 25°C, 5 min の遠心によって得られた上清を回収し、DNA 溶液として保存した。

(8) ベクターの alkaline phosphatase 処理

Bacterial alkaline phosphatase (*E. coli* C53 BAP; TaKaRa) により行った。調製した反応液を 65°C, 30 min 反応させ、等量の Phe/Chl Soln. を加えてボルテックスにより攪拌した後に 13,000 × g, 4°C, 5 min の遠心を行ない、上清を回収した。この操作をもう一度繰り返し、得られた上清に対し等量の chloroform を加えてボルテックスにより攪拌した後、13,000 × g, 4°C, 5 min の遠心を行った。得られた上清に対し、2.5 倍量の 100% cold EtOH および 1/10 倍量の 3M AcOK Soln. を加えて混和した後、-80°C で 30 min 静置した。13,000 × g, 4°C, 15 min の遠心によって得られた沈澱を適量の 70 (v/v) % cold EtOH でリンスした後、減圧乾燥し、適量の TE に溶解させ、4°C で保存した。

[BAP 処理反応液組成]

ベクターDNA	1-2 pmol
10 × BAP buffer	15 μL
BAP	1-2 units

dH₂O により、最終容量 150 μL に調製した。

[Phe/Chl Soln.] (200 mL)

飽和フェノール	100 mL
chloroform	96 mL
isoamylalcohol	4 mL

激しく混合した後、4°C で一晩静置して得られた下層を用いる。

[飽和フェノール] (100 mL)

phenol	50 mL
dH ₂ O	50 mL
1M Tris-HCl (pH 8.0)	4 mL
8-quinolinol	0.1g

激しく混合した後、4°C で一晩静置して得られた下層を用いる。

(9)ライゲーション反応

DNA Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いて行った。ベクターおよび挿入遺伝子断片の溶液を混合し、その全液量と等量の Solution I を加え、16°C の水浴中で反応させた。反応時間は、基本的に、粘着末端の場合 1h、平滑末端の場合は一晩とした。

(10)大腸菌コンピテントセルの調製

大腸菌を 4 mL の LB 培地で 37°C, 8-12 h 培養した。この培養液のうちの 100 μ L と、500 μ L の 2M Mg²⁺ Soln. を 50 mL の preSOB 培地に加え、 $A_{600\text{ nm}} = 0.4$ となるまで 37°C で振盪培養した。続いて、予め冷却しておいた遠心チューブに培養液を移し、氷上で 15 min 静置した。4,000 \times g, 4°C, 5 min の遠心により集めた菌体を 20 mL の TB に穏やかに懸濁させ、氷上で 15 min 静置した。4,000 \times g, 4°C, 5 min の遠心によって再び集菌し、菌体を 2 mL の TB に穏やかに懸濁させた後、140 μ L の DMSO を加えて穏やかに攪拌し、5 min 静置した。その後、1.5 mL 容遠心チューブに 100 μ L ずつ分注し、-80°C で保存した。

[TB]

PIPES	10 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	15 mM
KCl	250 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	55 mM

蒸留水に溶解後、KOH で pH 6.7 に調製し、フィルター滅菌した。

(11) 大腸菌の形質転換

大腸菌コンピテントセルを氷上で融解させた後、ライゲーション反応液、もしくはプラスミド DNA 溶液を適量 (コンピテントセル 100 μL に対し最大 20 μL) 加え、穏やかに混和した後、氷上で 30 min 静置した。42°C, 45 sec の heat shock をかけ、氷上で 2 min 静置した後、予め 37°C に加温しておいた SOC 培地を全量 1 mL となるように加え、37°C, 1 h 振盪培養した。培養液の一部、および 3,000 $\times g$, 5 min の遠心により集めた菌体を少量の SOC 培地に再懸濁したものを、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に塗布し、37°C で一晚静置培養した。

(12) シークエンス解析

シークエンス用 DNA サンプルの調製は Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit ver.2 および ver.3 (Applied Biosystems) を用いて行った。調製した反応液をサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700) によって反応させ、サンプルを SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns (SIGMA, USA) によって精製した。精製サンプルをキャピラリー電気泳動装置 (ABI PRIZM 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems) にかかけ、シークエンスデータの解析を行った。データの処理は GENETYX-Mac software (GENETYX, Japan) を用いて行い、相同性検索は FASTA program によって行った。

[反応液組成]

template DNA	50-350 ng
10 \times Ex taq buffer	1.0 μL
DMSO	2.0 μL
primer (1 mM)	3.2 μL
pre mix.	4.0 μL

dH₂O により、最終容量 20 μL に調製した。

[反応条件] (M13 primer を用いる場合)

1 cycle	2-30 cycles
98°C 5 min	→ 96°C 1 min
69°C 4 min	60°C 4 min

使用する primer の T_m 値に応じ、annealing 温度は適宜変更して行った。

(13)ハイブリダイゼーション反応

Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham Biosciences, UK) を用いて行った。プロットイングしたメンブレン(Hybond-N+; Amersham Biosciences) をハイブリバッグ (Cosmo・Bio, Japan) に入れ、予め加温しておいた 15 mL の Hybridization mix.を加えてシールした後、温浴で 1 h の pre-ハイブリダイゼーション反応を行った。反応後、メンブレンを新たなハイブリバッグに移し、プローブ溶液を加えた 15 mL の新たな Hybridization mix.を加えてシールした後、温浴で 12-16 h のハイブリダイゼーション反応を行った。反応の終了したメンブレンを、予め加温しておいた primary wash buffer を注いだタッパーウェアに移し、ハイブリダイゼーション反応させた時と同じ温度で 15 min ゆっくりと振盪洗浄した。この操作をもう一度繰り返した後、secondary wash buffer で室温にて 5 min 洗浄し、buffer を交換してこの操作をもう二度繰り返した。洗浄後のメンブレンから余計な水分を取り除いた後、ビニールラップの上に DNA 面を上にして置き、CDP-Star detection reagent を 0.05 mL/cm^3 となるように滴下し、ビニールラップで上から覆って室温で 5 min 静置した。反応後、余計な水分を取り除き、メンブレンを新たなビニールラップで覆い直して、暗室で X 線フィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM RX-U; FUJIFILM, Japan) に 1 h 感光させ、現像した。

[Hybridization mix.] (30 mL)

hybridization buffer	30 mL
NaCl	0.5 M
blocking reagent	1.2 g

穏やかに攪拌して調製した。

[primary wash buffer] (500 mL)

urea	60 g
SDS	0.5 g
0.5 M Na-phosphate	50 mL
NaCl	4.35 g
1 M MgCl ₂	5 mL
blocking reagent	1 g

蒸留水に溶解後、最終容量 500 mL に調整して用いた。

[0.5 M Na-phosphate]

NaH ₂ PO ₄	0.5 M
Na ₂ HPO ₄	0.5 M

蒸留水に溶解して両溶液を調製し、pH 7.0 となるように混ぜ合わせた。

[secondary wash buffer] (500 mL)

20 × stock Soln. 25 mL

1M MgCl₂ Soln. 1 mL

蒸留水に溶解後、最終容量 500 mL に調整して用いた。

[20 × stock Soln.]

Tris-HCl (pH 10.0) 1 M

NaCl 2 M

蒸留水に溶解して調製した。

[プローブ調製]

プローブ DNA 溶液 (100 ng/ 10 μL) を沸騰水浴上で 5 min 加温し、氷上で 5 min 静置した。軽く遠心した後に、10 μL の Reaction buffer、2 μL の Labeling reagent、10 μL の Cross linker working Soln. (Cross linker 2 μL + dH₂O 8 μL) を順次、よく混和しながら加え、37°C で 30 min 反応させた。反応後のプローブ溶液は使用時まで氷上で保存し、2 h 以内に用いた。

(14) 大腸菌からの可溶性画分の調製

大腸菌培養液から 4,000 × g, 4°C, 5 min の遠心によって集菌し、菌体に対し、発現させるタンパク質にそれぞれ適した buffer を適量加え、低温に保ちながら菌体を懸濁した。再び 4,000 × g, 4°C, 5 min の遠心によって洗浄菌体を回収した後、菌体湿重量 1 g に対して 10 mL となるように buffer を加えて懸濁させた。菌体懸濁液を、氷上で冷却しながら 30-40 min 程度の超音波破碎器にかけた後、20,000× g, 4°C, 20min の遠心を二回繰り返すことで得られた上清を可溶性画分として保存した。

(15) タンパク質定量

Protein Assay Kit (Bio-Rad, USA) により行った。試料タンパク質を 200-1400 μg になるように希釈し、その溶液 100 μL に対して 5 倍希釈した Dye reagent を 5 mL 加え、よく攪拌して室温で 5 min 静置した。595 nm の吸光度を測定することで、予め標準タンパク質 (BSA) により作成しておいた検量線より、資料タンパク質の濃度を算出した。

(16) SDS-PAGE

可溶性画分、およびカラム精製タンパク質画分に 2 × Sample buffer を等量加えてよく混和した後、沸騰水浴上で 5 min 加熱し、これを泳動サンプルとした。泳動板を組み立て、分離用ゲル溶液を注ぎ、蒸留水を適量上層させて室温で 1 h 静置することによりゲルを固化させた。完全に固化させた後、上層した蒸留水を取り除き、濃縮用ゲル溶液を注いでコームを差し込み、蒸留水を適量上層させて室温で 1 h 静置することでゲルを固化させた。ウェルに泳動サンプルを 20-25 μL アプライし、泳動を開始した。色素のバンドが濃縮ゲル中を進んでいる間は定電流 20 mA、分離ゲル中に移行してからは 40 mA で泳動した。色素のバンドがゲル下端より 0.5-1.0 cm 程度まで進んだら泳動を終え、ゲルを染色液で 2 h 以上染色した後、脱色液でバックグラウンドの染色を取り除いた。より小さな分子量のバンドを見たい時には Tris-tricine SDS-PAGE、それ以外は Tris-glycine SDS-PAGE を行った。

[10 (w/v) % Tris-glycine SDS-PAGE 分離用ゲル溶液] (15 mL; ゲル二枚分相当量)

30 (w/v) % gel stock	5 mL
dH ₂ O	2.3 mL
0.75 M Tris-HCl (pH 8.8)	7.5 mL
10 (w/v) % SDS Soln.	150 μL
TEMED	12 μL
APS	適量

[30 (w/v) % gel stock]

acrylamide	30 (w/v) %
Bis-scrylamide	0.8 (w/v) %

蒸留水に溶解して調製した。

[Tris-glycine SDS-PAGE 濃縮用ゲル溶液] (7.4 mL; ゲル二枚分相当量)

30 (w/v) % gel stock	0.75 mL
dH ₂ O	2.3 mL
0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)	3.75 mL
10 (w/v) % SDS Soln.	75 μL
TEMED	6 μL
APS	適量

[10 (w/v) % Tris-tricine SDS-PAGE 分離用ゲル溶液] (8 mL; ゲルー一枚分相当量)

30 (w/v) % gel stock	2.67 mL
gel buffer	2 mL
20 (v/v) % glycerol	3.33 mL
TEMED	5 μ L
APS	適量

[Tris-tricine SDS-PAGE 濃縮用ゲル溶液] (3 mL; ゲルー一枚分相当量)

30 (w/v) % gel stock	0.4 mL
gel buffer	0.8 mL
dH ₂ O	1.8 mL
TEMED	2 μ L
APS	適量

[2 × Sample buffer]

Tris-HCl (pH 6.8)	50 mM
SDS	4 (w/v) %
glycerol	12 (v/v) %
2-mercaptoethanol	2 (v/v) %
bromophenol blue	0.02 (w/v) %

蒸留水に溶解して調製した。また、蒸留水で1×に希釈したものを1× Sample bufferとして用いた。

[10 × Tris-glycine SDS-PAGE 泳動 buffer]

Tris	250 mM
glycine	1.92 M
SDS	1 (w/v) %

蒸留水に溶解して調製後、使用時に1×に希釈して用いた。

[Tris-tricine SDS-PAGE 泳動 buffer]

Tris-HCl (pH 8.9)	0.2 M
-------------------	-------

蒸留水に溶解して調製した。

[Tris-tricine SDS-PAGE 泳動 buffer]

Tris-HCl (pH 8.25)	0.1 M
tricine	0.1 M
SDS	0.1 (w/v) %

蒸留水に溶解して調製した。

[SDS-PAGE standard マーカー]

Bio-Rad protein standard	10 μ L
1 \times Sample buffer	200 μ L

調製後、沸騰水浴上で 5 min 加熱して用いた。

[染色液] (1 L)

CBB R-250	2.5 g
EtOH	450 mL
AcOH	100 mL
dH ₂ O	450 mL

[脱色液] (3 L)

EtOH	750 mL
AcOH	240 mL
dH ₂ O	2010 mL。

5. 第一章の実験

(1) ファージライブラリーの作製

a) *S. lavendulae* ATCC25233 染色体 DNA の 10-20-kb 断片の精製

染色体 DNA 500 μ g を 6U の BamH I によって 37°C にて 1 h 消化後、EtOH 沈澱によって精製し、500 μ L の TE Soln. に溶解した。超遠心用チューブに 10-40% のショ糖密度勾配を作製し、これに精製 DNA 溶液を乗せて 60,000 \times g, 20°C, 24 h 遠心後、1.5 mL ずつの画分をチューブの底から回収した。各画分を 0.4 (w/v) % アガロースゲル電気泳動にかけ、10-20-kb 付近の DNA 断片を取得した。この画分に 2.5 倍量の TE Soln. と 9 倍量の 100% EtOH を加えて軽く混和した後、-80°C にて 2 h 静置した。続いて、50,000 \times g, 4°C, 2 h の遠心により得られた沈澱に 0.4 mL の TE Soln. を加えて懸濁した。さらに、20 μ L の 3M AcONa Soln. および 1 mL の冷 100% EtOH を加えて軽く混和した後、-20°C で 30 min 静置した。15,000 \times g, 4°C, 10 min の遠心により得られた沈澱を 70 (v/v) % cold EtOH でリンスし

た後に減圧乾燥し、10 μ L の TE Soln. に溶解した。このサンプルを BAP 処理後、最終的に 10 μ L の TE Soln. に溶解した。

b) *In vitro* パッケージング

Lambda DASH II / BamH I Vector Kit (STRATAGENE, USA) を用いて得られた DNA 断片をファージベクターへ挿入する実験を行なった。パッケージングには Gigapack III Gold Packaging Extract (STRATAGENE) を用いた。融解した Gigapack III Gold Packaging Extract に、前述のファージベクター反応液のうち 2 μ L を加えて混合し、室温で 2 h 以上放置した。これに 500 μ L の SM buffer および 20 μ L の chloroform を加え、15,000 \times g, 4°C, 5 min 遠心した後、chloroform を 1 滴加えて使用時まで 4°C にて保存した。

c) ホストセルの調製

E. coli XL1-Blue MRA (P2) を、10 mL の 0.2 (w/v) % maltose および 10 mM MgSO₄ を含む LB 培地で 37°C にて $A_{600\text{ nm}} = 0.3$ 程度まで培養後、さらに 28°C で一晚培養を続けた。4,000 \times g, 4°C, 10 min の遠心により得られた菌体を、10 mM MgSO₄ Soln. に $A_{600\text{ nm}} = 0.5$ となるように懸濁した後、1.5 mL 容チューブに 200 μ L ずつ分注し、使用時まで 4°C で保存した。

d) ファージの増殖

ホストセルに、b) でパッケージングしたファージライブラリーのうち 1 μ L を加え、37°C, 15 min インキュベートした。反応後のホストセルを 1.2 (w/v) % agarose を含む 3 mL の NZYM 培地に加えて、予め作製しておいた NZYM 寒天培地上に重層し、37°C で一晚培養した。

(2) *DdlS* 遺伝子のクローニング

a) プラークブロットイング

プラークが出現したプレートを 4°C で 1 h 静置した後、ナイロンメンブレン (Hybond-N+) を静かにプレート上に乗せ、30 sec 静置した。剥がしたメンブレンのプラーク付着面を上にして Denature Soln. に浸した濾紙の上に乗せ、7 min 静置した。続いて Neutralization Soln. で浸した濾紙の上に移し、3 min 静置した。この中和工程をもう一度繰り返した後、メンブレンを 2 \times SSC Soln. で洗浄し、濾紙上で風乾させた。乾燥させたメンブレンをビニールラップに包み、プラーク側を下にして UV イルミネーター上に置き、5 min UV 照射することでメンブレン上に DNA を固定した。そのメンブレンに対し、pCSPC 由来の 1.2-kb DNA 断片 [24] をプローブとしたサザンハイブリダーゼーション反応を 65°C にて行い、目的のクローンを得た。

[Denature Soln.]

NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M

蒸留水に溶解後、オートクレーブして用いた。

[Neutralization Soln.]

NaCl	1.5 M
Tris-HCl (pH 7.2)	0.5 M
EDTA·Na ₂	1 mM

蒸留水に溶解後、オートクレーブした。

[20 × SSC Soln.]

NaCl	3 M
Na ₃ citrate	0.3 M

蒸留水に溶解後、HCl で pH 7.0 に調整し、オートクレーブして用いた。
必要に応じ適宜蒸留水で希釈して使用した。

b) 塩基配列の決定

14-kb DNA 断片を含むファージ DNA を BamH I で消化し、その消化断片 (およそ 1.2, 2.0, 2.9, 8.0-kb) を pUC18 および pUC19 にサブクローニングした。目的遺伝子を持つキメラプラスミドのシーケンスを行い、14-kb の DNA 断片のうち *ddlS* 遺伝子を含む 2,820 bp について塩基配列を決定した。

(3) *AhrS* 遺伝子のクローニング

a) サザンブロッティング

S. lavendulae ATCC25233 染色体 DNA を BamH I で消化し、0.8 (w/v) % アガロースゲル電気泳動を行った。そのゲルをタッパーウェアに入れ、Denature Soln. に浸して室温で 1 h ゆっくりと振盪させた。Denature Soln. を捨て、蒸留水でゲルを軽く洗浄した後、Neutralization Soln. をゲルが浸るように加え、室温で 20 min ゆっくりと振盪させた。Neutralization Soln. による中和を三回繰り返した後、ゲルを蒸留水で軽く洗浄し、毛細管現象を利用したブロッティング装置を組み立て、室温で 12 h 以上静置することにより DNA をナイロンメンブレン (Hybond-N+) に転写した。ここでは、ブロッティング buffer に 20 × SSC Soln. を用いた。ブロッティング後のメンブレンを、DNA の転写された面を下にして、50 mM NaOH で浸した濾紙の上に乗せて 5 min 静置した。その後、大過剰の 2 × SSC Soln.

でメンブレンを 1 min 洗浄し、濾紙に挟んで 80°C にて 2 h ベーキングした。得られたメンブレンに対し、*S. coelicolor* A3(2)の染色体 DNA より PCR によって増幅させた putative alanine racemase 遺伝子をプローブとして用い、74°C にてサザンハイブリダイゼーション反応を行った。

[putative alanine racemase プローブ用 PCR 条件]

1 cycle		2-25 cycles		
96°C 5 min	→	96°C 1 min	→	72°C 3 min
70°C 3 min		70°C 3 min		

primer の塩基配列は以下の通りである。

sense primer	(5'-ATGAGCGAGACAACACTGCTCGGCGGGACGCG-3')
anti-sense primer	(5'-TCATTCGTTGACGTAGACGCGCGGGACCCGG3')

b) コロニーハイブリダイゼーション

プローブ DNA とハイブリダイズした遺伝子断片を含む約 3.0-kb の BamH I 消化断片をアガロースゲル電気泳動により回収した後、BamH I 消化した pUC19 に挿入し、*E. coli* に形質転換した。コロニーが出現したプレート上にナイロンメンブレン (Hybond-N+) を静かに乗せ、1 min 静置した。剥がしたメンブレンのコロニー付着面を上にして Denature Soln. に浸した濾紙の上に乗せ、7 min 静置した。続いて Neutralization Soln. で浸した濾紙の上に移し、3 min 静置した。この中和工程をさらに二回繰り返した後、メンブレンを 2 × SSC Soln. で 1 min 洗浄し、濾紙上で風乾させた。乾燥させたメンブレンを、コロニー側を上にして 0.4 M NaOH で浸した濾紙の上に乗せて 20 min 静置した後、2 × SSC Soln. で 1 min 洗浄し、濾紙上で風乾させた。作製したメンブレンを濾紙に挟んで 80°C にて 2 h 熱処理することにより DNA をメンブレンに固定した。得られたメンブレンに対し、同様にサザン解析を行うことによって目的のクローンを得た。

c) 塩基配列の決定

得られた DNA 断片を適当な制限酵素サイトで pUC19 にサブクローニングしたのち、2,808 bp の全長塩基配列を決定した。この断片上には *S. coelicolor* のゲノム解析の成果として putative alanine racemase とされる遺伝子と相同性を示す ORF が見出された。しかしながら、その ORF は不完全なものであったことから、2,808 bp の塩基配列をもとに約 200 bp の BamH I / Sal I 断片をプローブとして、chromosomal-walking 法により完全長の ORF のクローニングを試みた。新たにクローニングした約 1-kb の DNA 断片は不完全 ORF の 5' 上流をカバーしており、その塩基配列を部分的に決定し、先に得られていたシークエンス結

果と統合することで、最終的に *alsS* の全長を含む 3,296 bp の塩基配列を決定した。

(4) DdlS 大量発現系・精製系の構築

a) DdlS 大量発現系の構築

Fig. 10 に示すように、1,038 bp の *ddlS* 遺伝子を基に PCR プライマーを設計した。この際、発現ベクター pET-21a(+) への挿入を考慮に入れ、増幅 DNA 断片の 5' 側に Nde I サイト、3' 側に Xho I サイトを持つようにプライマーを設計した。PCR 反応によって増幅された *ddlS* 遺伝子断片をアガロースゲルから回収し、Nde I / Xho I により二重消化した。その消化断片をアガロースゲルから回収し、pET-21a(+) の Nde I / Xho I サイトへ挿入することで、pET-*ddlS* を得た。pET-*ddlS* を *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS へ導入することで、DdlS 大量発現株 *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS [pET-*ddlS*] を得た。

[*ddlS* 構造遺伝子増幅用 PCR 条件]

1 cycle		2-30 cycles		
96°C 5 min		96°C 1 min		
55°C 1 min	→	55°C 1 min	→	72°C 3 min
72°C 2 min		72°C 2 min		

b) DdlS 精製系の構築

pET-*ddlS* を保有する *E. coli* を 6 L の LB 培地にて、ジャーファーマンターを用いて 28°C で $A_{600\text{ nm}} = 0.5$ 程度まで培養した後、最終濃度 1 mM の IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を加え、*ddlS* 遺伝子の発現を誘導させた。引き続き、28°C にて 8 h 培養し、得られた菌体を $4,000 \times g$, 4°C, 10 min の遠心により回収した。以後、DdlS 精製ステップはすべて 4°C にて行った。菌体を Buffer I に懸濁させ、無細胞抽出液から可溶性画分を調製した。可溶性画分に対し 20%飽和となるように乳鉢で予め磨り潰しておいた硫酸アンモニウムを攪拌しながら徐々に加え、 $15,000 \times g$, 4°C, 20 min の遠心にかけて、上清を回収した。上清に対し 50%飽和となるように硫酸アンモニウムを攪拌しながら徐々に加えた。生じた沈殿は、 $15,000 \times g$, 4°C, 20 min の遠心により回収した。沈殿は少量の Buffer I に溶解され、同 buffer に対して透析を行った。透析済みタンパク質溶液を、予め Buffer I で平衡化しておいた DEAE-Sepharose (Amersham Biosciences) column (2.5 \times 10 cm) にアプライし、まず、同 buffer でカラムを洗浄した。目的タンパク質の溶出は同 buffer 中に含まれる 0-500 mM の KCl 直線濃度勾配により行なった。DdlS の活性画分を集め、Buffer II に対して透析し、予め Buffer II で平衡化しておいた Octyl-Sepharose column (1.5 \times 15 cm, Amersham Biosciences) にかけた。この時、DdlS はカラムに吸着しなかったため、素通りし

た画分を回収した。ここで DdIS がカラムを素通りしたのは、Buffer III 中には ATP が存在するため、ATP に対する結合能を持つ本タンパク質の性質 (特に pI 値) が変化し、カラムに吸着しにくくなったことが原因であると考えられる。最後に、この素通り画分を Buffer III に対して透析し、予め Buffer III で平衡化しておいた DEAE-Sepharose column (1 × 15 cm) にかけて。以上のようなステップにより、DdIS を単一タンパク質まで精製後、Amicon Ultra (Millipore, USA) を用いた限外濾過によって濃縮し、使用時まで 4°C で保存した。

[Buffer I]

Na-phosphate (pH 7.5)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	2 mM
EDTA·Na ₂	1 mM

蒸留水に溶解して調製した。

[Buffer II]

Tris-HCl (pH 7.5)	20 mM
KCl	2.5M
ATP	1 mM
MgCl ₂	10 mM
2-mercaptoethanol	1 mM

蒸留水に溶解して調製した。

[Buffer III]

Na-phosphate (pH 7.5)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	2 mM
EDTA·Na ₂	1 mM
ATP·Na ₂	0.2 mM

蒸留水に溶解して調製した。

(5) AlrS 大量発現系・精製系の構築

a) AlrS 大量発現系の構築

Fig. 13 に示すように、決定した 1,134 bp からなる *alrS* 遺伝子を基に PCR プライマーを設計した。この際、pET-21a(+)への挿入を考慮に入れ、増幅断片の 5'側に Nde I サイト、3'

側に Xho I サイトができるようにプライマーを設計した。PCR 増幅した *alrS* 遺伝子断片をアガロースゲルから回収後、Nde I / Xho I により二重消化した。その断片をアガロースゲルから回収後、pET-21a(+)の Nde I / Xho I サイトへ挿入し、pET-*alrS* を得た。構築した pET-*alrS* を *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS へ導入することで、AlrS 大量発現株としての *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS [pET-*alrS*] を取得した。

[*alrS* 構造遺伝子増幅用 PCR 条件]

1 cycle		2-25 cycles		
96°C 5 min	→	96°C 1 min	→	72°C 3 min
70°C 3 min		70°C 3 min		

b) AlrS 精製系の構築

pET-*alrS* を保有する *E. coli* を 3 L の LB 培地を含むジャーファーメンターを用いて 28°C にて $A_{600\text{ nm}} = 0.6$ 程度まで培養した後、IPTG を最終濃度 1 mM となるよう加え、*alrS* 遺伝子の発現を誘導させた。引き続き、28°C で 4.5 h 培養し、 $4,000 \times g$, 4°C, 10 min の遠心により菌体を回収した。以後、AlrS の精製操作はすべて 4°C にて行った。菌体を binding buffer に懸濁し、可溶性画分を調製した。その画分に対し、65%飽和となるように硫酸アンモニウムを攪拌しながら徐々に加え、 $15,000 \times g$, 4°C, 20 min の遠心にかけて沈殿を回収した。沈殿は少量の binding buffer に溶解され、同 buffer に対して透析した。透析後のタンパク質溶液を、予め 5 bed volumes の charge buffer により Ni^{2+} をキレートさせ、binding buffer にて平衡化しておいた Ni(II)-chelated His-bind resin (Novagen, Germany) column (1.0 × 30 cm) に吸着させた後、wash buffer にてカラムを洗浄した。吸着したタンパク質の溶出は同 buffer 中に含まれる 60-350 mM imidazole の直線濃度勾配法により行なった。AlrS を含む画分を Amicon Ultra によって濃縮し、予め 50 mM の NaCl を含む Tris-HCl buffer (pH 8.5) で平衡化させておいた Sephadex G-100 super fine (Amersham Biosciences) column (1.5 × 120 cm) によってゲル濾過クロマトグラフィーを行った。精製 AlrS を含む画分を集め、Amicon Ultra によって濃縮し、使用時まで 4°C で保存した。

[8 × binding buffer]

imidazole	40mM
NaCl	4 M
Tris-HCl (pH7.9)	160 mM

蒸留水に溶解して調製後、使用時に 1 × に希釈した。

His-bind resin column (1.0 × 30 cm) に吸着させた後、wash buffer でカラムを洗浄した。吸着されたタンパク質は 500 mM の imidazole を含む binding buffer で溶出させ、Amicon Ultra により濃縮した。50 mM の NaCl を含む 50 mM ammonium-phosphate buffer (pH 8.2) に対して透析し、同 buffer で予め平衡化させておいた DEAE-Sepharose column (1.0 × 30 cm) にかけた。素通りした K12A1r を含むフラクションを集めて Amicon Ultra により濃縮後、使用時まで 4°C で保存した。

(7) DdlS の酵素反応速度論的解析

a) Continuous ADP release-coupled assay 法

DdlS 活性の測定は、continuous ADP release-coupled assay [44] 法によった。本法は、DDL の反応生成物である ADP を基質として、酵素の共役連鎖により DDL 活性を間接的に測定する方法であり、NADH の持つ 340 nm の吸光度の変化を 37°C にて観察することで行った。

DDL はその結合部位において二分子の D-Ala を結合させることで D-Ala-D-Ala を形成するため、その定常状態に達した場合の反応は、二つの K_m 値 (K_1 , first D-Ala; K_2 , second D-Ala) を導入した Eq. 2 によって表される。Eq. 2 での反応速度式は Eq. 3 のように導かれ、両辺の逆数をとることにより放物線状の Lineweaver-Burk plots の式 (Eq. 4) が得られる。 V_{max} 値は、Eq. 4 の y 切片から求めることができる。Eq. 4 は Eq. 5 のように変形することが可能であり、この式において、 $1/[S]$ に対して $[S](1/v - 1/V_{max})$ をプロットすると直線が得られ、その y 切片は K_2/V_{max} を、傾きは K_1K_2/V_{max} を示し、これをもとに K_1 および K_2 を算出することができる。



$$V = \frac{V_{max}[S]^2}{K_1K_2 + K_2[S] + [S]^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_2}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{K_1K_2}{V_{max}} \frac{1}{[S]^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$[S] \left[\frac{1}{V} - \frac{1}{V_{max}} \right] = \frac{K_2}{V_{max}} + \frac{K_1K_2}{V_{max}} \frac{1}{[S]} \quad (\text{Eq. 5})$$

これらの式において、 K_1 の値は非常に小さいため [18]、基質濃度 $[S]$ が充分大きい場合には無視でき、Eq. 3 および Eq. 4 はそれぞれ Eq. 6 および Eq. 7 と近似できる。この式に基づき、 K_2 値のみを決定した。

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_2 + [S]} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_2}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \quad (\text{Eq. 7})$$

b) 速度論的パラメータの測定

下記のようにそれぞれの反応液を調製し、37°C における 340 nm の吸光度の変化を経時的に観察することで、それぞれのパラメータを算出した。

[反応液組成]

Tris-HCl (pH 7.8)	100 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
PEP	2.5 mM
NADH	0.3 mM
PK	46.8 U/mL
LDH	21.4 U/mL

以上の組成を基本とし、D-Ala に対するパラメータ測定時には 5 mM ATP, 20-0.313 mM D-Ala, 4.18 µg/mL DdIS を、ATP に対するパラメータ測定時には 20 mM D-Ala, 0.4-0.025 mM ATP, 22 µg/mL DdIS を、DCS による阻害パラメータ測定時には 5 mM ATP, 20-0.313 mM D-Ala, 4-0.5 mM DCS, 5.35 µg/mL DdIS を、D-Ala-D-Ala による阻害パラメータ測定時には 5 mM ATP, 20-0.313 mM D-Ala, 80-2.5 µM D-Ala-D-Ala, 5.35 µg/mL DdIS を、それぞれ添加して反応液とした。

c) DdIS の触媒活性に及ぼす pH の影響

DdIS の触媒活性に及ぼす pH の影響を検討するため、100 mM Tris, 100 mM glycine, 100 mM MES の3つの溶液のうち2つを混ぜ合わせることで pH 6.0-10.0 の反応液を調製した。活性測定には 37°C における 340 nm の吸光度の経時変化を観察することで、 V_{\max} 値を算出し、触媒活性を比較した。

[反応液組成]

pH analysis buffer	100 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
PEP	2.5 mM
NADH	0.3 mM
PK	46.8 U/mL
LDH	21.4 U/mL
ATP	5 mM
D-Ala	20 mM
DdIS	4.18 µg/mL

(8) 酵素共役法による AlrS の速度論解析の試み

Enzyme-coupled assay 法 [73] によって行った。本法は、ALR によって一方のエナンチオマーのみが存在する状態で生成される、対となるエナンチオマーを基質とした酵素の共役連鎖反応による、NADH の持つ 340 nm の吸光度の変化を観察することで、ALR 活性を間接的に測定する方法である。反応液を調製し、ALR を添加することによって反応を開始した。37°C, 10 min で反応させた後、沸騰水浴中で 5 min 加温することにより酵素を失活させ、340 nm の吸光度を測定した。また、37°C での反応を行わないサンプルをコントロールとして用いた。

[enzyme-coupled assay 反応液組成; D-Ala → L-Ala 反応]

Tricine-NaOH (pH 9.1)	100 mM
LADH	0.15 U
NAD	10 mM
D-Ala	2-0.1 mM
DCS	3-0 mM
ALR	適量

ALR 濃度は、AlrS では 345 ng/mL、K12Alr では 1,070 ng/mL となるように加えた。

[enzyme-coupled assay 反応液組成; L-Ala → D-Ala 反応]

Tricine-NaOH (pH 9.1)	100 mM
DAAO	1 U
LDH	110 U
NADH	0.12 mM

L-Ala	2-0.25 mM
ALR	適量

ALR 濃度は、AlrS では 34.5 ng/mL、K12Alr では 170 ng/mL となるよう加えた。

(9) CDスペクトルを用いた AlrS の速度論的解析

a) CD スペクトルの速度論解析への適用

種々の濃度の D-Ala, あるいは L-Ala 溶液の CD スペクトルを測定した後 (Fig. 21)、各データの 205-215 nm 間における θ の値を 0.1 nm ごとに全て積算し、その値 ($\Sigma\theta$) を Ala 濃度に対してプロットすることで D-, L-Ala 濃度に対する検量線を作成した (Fig. 22)。この検量線では、 $\Sigma\theta$ と Ala 濃度は Eq. 1 のように比例定数 P を持つ直線的な比例関係を示す。

$$\Sigma\theta = P\{[D-Ala] - [L-Ala]\} \quad (\text{Eq. 1})$$

各サンプルの測定値からの速度論的パラメータの算出は、以下に示すように行った。まず、それぞれのサンプルの CD スペクトルから $\Sigma\theta$ の値を求め、10 min の反応前後での値と比較することにより $\Delta\Sigma\theta$ の値を算出した。Eq. 1 に基づき、 $\Delta\Sigma\theta$ から $\Delta[D-Ala]$ (= $-\Delta [L-Ala]$) を求めた。1 min あたりの $\Delta[D-Ala]$ を、反応速度 v [mM/min] とした場合、その値は Eq. 8 のように表される。

$$v = \Delta[D-Ala]/10 = \Delta\Sigma\theta/20P \quad (\text{Eq. 8})$$

また、ラセミ化反応における反応速度式は、次のようにも表される (Eq. 9)。

$$v = \frac{\frac{V_{\max 1} \cdot [D-Ala]}{K_{m1}} - \frac{V_{\max 2} \cdot [L-Ala]}{K_{m2}}}{1 + \frac{[D-Ala]}{K_{m1}} + \frac{[L-Ala]}{K_{m2}}} \quad (\text{Eq. 9})$$

Eq. 9 において、 $V_{\max 1}$ および K_{m1} は D-Ala \rightarrow L-Ala 反応、 $V_{\max 2}$ および K_{m2} は L-Ala \rightarrow D-Ala 反応におけるパラメータを示している。速度論解析を行うにあたり、0-2 mM 間における様々な濃度の D-, L-Ala を共に含む反応液を調製した (64 通り以上)。測定した $\Delta\Sigma\theta$ に基づいて v の実測値を求め、その値を基に反応中間点での D-, L-Ala の濃度を決定し、Eq. 9 における値とした。最小二乗法を用いた数値解析により、各パラメータの値を算出した。

また、ラセミ化反応において、阻害剤が競合阻害、非競合阻害として振舞う場合の速

度式は、それぞれ Eq. 10, Eq. 11 のように表される。

$$v = \frac{\frac{V_{\max 1} \cdot [\text{D-Ala}]}{K_{m1}(1+[I]/K_{i1})} - \frac{V_{\max 2} \cdot [\text{L-Ala}]}{K_{m2}(1+[I]/K_{i2})}}{1 + \frac{[\text{D-Ala}]}{K_{m1}(1+[I]/K_{i1})} + \frac{[\text{L-Ala}]}{K_{m2}(1+[I]/K_{i2})}} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$v = \frac{\frac{V_{\max 1} \cdot [\text{D-Ala}]}{K_{m1}(1+[I]/K_{i3})} - \frac{V_{\max 2} \cdot [\text{L-Ala}]}{K_{m2}(1+[I]/K_{i4})}}{1 + [\text{D-Ala}]/K_{m1} + [\text{L-Ala}]/K_{m2}} \quad (\text{Eq. 11})$$

Eq. 10 と Eq. 11 において、 K_{i1} および K_{i3} は D-Ala \rightarrow L-Ala 反応での阻害定数、 K_{i2} および K_{i4} は L-Ala \rightarrow D-Ala 反応での阻害定数、 $[I]$ は阻害剤 (DCS) の濃度を示している。DCS の濃度を変えて測定を繰り返し、阻害剤非存在下の時と同様にして、各パラメータの算出を行った。

b) サンプル調製

アッセイに使う酵素ストックは、予め、タンパク質と等濃度の PLP を含む 100 mM ammonium phosphate buffer (pH 8.2) に対して透析をしておいた。下記のように調製した反応液を 4°C で 1 h 静置した後、ALR を添加し 37°C で 10 min 反応させた。沸騰水浴中で 5 min 加熱することによって酵素を失活させた後に、1 mL の 30 mM phosphate を加え、サンプル溶液の CD スペクトル (wavelength 205-215 nm) を JU-720 Spectropolarimeter (JASCO, Japan) によって測定した。また、37°C での反応をさせないサンプルをコントロールとして用いた。

[CD スペクトルアッセイ反応液組成]

NH ₄ -phosphate (pH 8.2)	30 mM
L-Ala	2-0 mM
D-Ala	2-0 mM
DCS	0.5-0 mM
ALR	適量

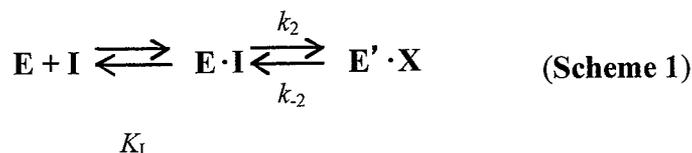
Ala および DCS の濃度を様々に組み合わせてサンプルを調製した。

酵素濃度は、AlrS が 170 ng/mL、K12Alr が 225 ng/mL となるよう加えた。

(10) DCS および LCS による ALR の time-dependent inactivation に基づく阻害

a) Time-dependent inactivation

この阻害メカニズムは、ALR (E) の補酵素である PLP と DCS が反応し、PLP 非結合型の ALR (E') と 3-hydroxyisoxazole pyridoxamine 5'-phosphate 誘導体 (X) を形成するという反応様式に基づいている [21, 22] (Scheme 1)。



DCS と一定時間反応させた AlrS 酵素液を反応液に添加することで反応を開始し、反応液の 205 nm における CD シグナルの変化を経時的に観察した。近似曲線の傾きを反応速度 v とし、一定時間反応させた後の速度 v_t と、コントロールの速度 v_0 との関係は、Eq. 12 のように表される。

$$v_t/v_0 = \exp(-k_{app} \cdot t) \quad (\text{Eq. 12})$$

ここで、 k_{app} は見かけの速度定数である。反応開始直後では、 $[E' \cdot X] \div 0$ とみなせるため、Scheme 1 における逆反応 (k_2) は無視できる。阻害定数を $K_I = [E] \cdot [I] / [E \cdot I] = ([E]_0 - [E \cdot I] - [E' \cdot X]) \cdot [I] / [E \cdot I]$ と定義すると、DCS 誘導体の生成速度は Eq. 13 のように表される。

$$\begin{aligned} d[E' \cdot X]/dt &= k_2 \cdot [E \cdot I] \\ &= \frac{k_2 \cdot [I]}{K_I + [I]} ([E]_0 - [E' \cdot X]) \end{aligned} \quad (\text{Eq. 13})$$

ここで $[E]_0$ は酵素総濃度である。Eq. 13 において、反応初期段階では k_{app} は $k_2 \cdot [I] / (K_I + [I])$ とみなせるため、これらの式を用いた二重逆数プロットより K_I および k_2 の値を算出した。

b) サンプル調製

反応は全て 25°C にて行った。AlrS 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む 30 mM ammonium phosphate buffer (pH 8.2) に対し、様々な濃度の DCS および LCS を加えることで、不活化反応を開始した。このうちの 20 μL を任意の時間で回収し、4 mM D-Ala を含む 3 mL の同 buffer に添加することで ALR 反応を開始した後、205 nm における CD スペクトルの変化を経時的に記録した。

(11) 各発現株における DCS 耐性の *in vivo* アッセイ

a) DdlA および DdlB 大量発現株の構築

Fig. 24 に示すように、*E. coli* K12 W3110 の *ddlA* 遺伝子および *ddlB* の塩基配列を基に PCR 用のプライマーを設計した。この際、発現ベクターである pET-21a(+)への挿入を考慮に入れ、増幅断片の 5'側に Nde I サイト、3'側に Hind III サイトができるようにした。PCR 増幅した両遺伝子断片をアガロースゲルから回収後、Nde I / Hind III により二重消化した。その断片をアガロースゲルから回収後、pET-21a(+)の Nde I / Hind III サイトへ挿入し、それぞれ pET-*ddlA* および pET-*ddlB* を得た(Fig. 25A, B)。構築した両プラスミドを *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS へ導入することで、大量発現株 *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS [pET-*ddlA*] および *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS [pET-*ddlB*] を構築した。

[*ddlA* および *ddlB* 構造遺伝子増幅用 PCR 条件]

1 cycle		2-30 cycles		
96°C 5 min		96°C 1 min		
60°C 1 min	→	60°C 1 min	→	72°C 4 min
72°C 1 min		72°C 1 min		

b) AlrS-DdlS 共発現株の構築

pET-*ddlS* を Bgl II / Xho I によって二重消化し、T₇プロモーター領域を含むように *ddlS* 構造遺伝子部分を切り出した後、断片の両末端を DNA blunting Kit (TaKaRa) によって平滑化した。続いて、pET-*alrS* を Sph I で消化し、同様に末端平滑化、および BAP 処理を行った。両遺伝子断片によるライゲーション反応を行い、AlrS-DdlS 共発現ベクター pET-*alrS-ddlS* を構築した (Fig. 25C)。構築したプラスミドを *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS へ導入することで、大量発現株 *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS [pET-*alrS-ddlS*] を構築した。

[制限酵素消化断片の末端平滑化]

DNA blunting Kit (TaKaRa) によって行った。1-2 pmol の DNA 断片を含む溶液に 1 μL の 10 × buffer および滅菌水を加え、総量 9 μL となるように反応液を調製した。末端アニーリング反応を防止するために一度 70°C 水浴で 5 min 加温し、その後、37°C 水浴へ移した。1 μL の T₄ DNA polymerase (1 U/1 mL) を加えて穏やかに混和した後、37°C で 5 min 反応させた。反応後、DNA 濃度が 1 μg / 50 μL となるように DNA Dilution buffer を加え、激しくボルテックスすることによって酵素を失活させた。この溶液を Phe/Chl 処理した後、EtOH 沈澱により精製し、ライゲーション反応に用いた。

c) K12Alr-DdlA および K12Alr-DdlB 共発現株の構築

pET-*ddlA* および pET-*ddlB* を鋳型として、T₇プロモーター領域を含むように *ddlA* および *ddlB* の構造遺伝子部分を下記の primer を用いて PCR により増幅させた後、各増幅断片を Sph I にて消化した。続いて pET-K12*alr* を Sph I で消化し、末端平滑化および BAP 処理を行った。Sph I 消化した pET-K12*alr* に、それぞれ Sph I 消化した *ddlA* もしくは *ddlB* を含む断片を挿入することで、K12Alr-DdlA および K12Alr-DdlB 共発現ベクター、pET-K12*alr-ddlA* および pET-K12*alr-ddlB* を構築した (Fig. 25C, D)。構築したプラスミドを *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS へ導入することで、大量発現株 *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS [pET-K12*alr-ddlA*] および *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS [pET-K12*alr-ddlB*] を構築した。

[*ddlA* および *ddlB* 部分増幅用 PCR 条件]

1 cycle		2-30 cycles		
96°C 5 min		96°C 1 min		
59°C 1 min	→	59°C 1 min	→	72°C 4 min
72°C 1 min		72°C 1 min		

primer の塩基配列は以下の通りである (下線部は Sph I サイト)。

sense primer	(5'-CAC <u>G</u> CATGCGAAATTAATACGACTCAC-3')
anti-sense primer	(5'-TAT <u>G</u> CATGCCAAAAAACCCTCAAGAC3')

d) DCS 耐性試験

M9 培地 (4 mL) で 37°C, 10 h 培養した際の培養液 400 μL を、55°C に保温した 1 (w/v) % agar を含む M9 寒天培地に加え、軽く攪拌した。予め各ウェルに 20 μL の 100-0 μg/mL の DCS 溶液を入れておいた、96 穴プレートにこの菌体包埋培地 180 μL を加えて軽くピペッティングし、培地の固化後に 37°C で 14 h 静置培養した。培養後、各ウェルの A_{600 nm} を測定することで菌体の濁度を決定し、DCS 非存在下での生存率を 100%として各発現株の生存率を求めた。

6. 第二章の実験

(1) AlrS の結晶化

精製した AlrS を 50 mM NaCl および 0.5 mM PLP を含む 30 mM Tris-HCl buffer (pH8.5) に対して透析した後、Amicon Ultra によって 10 mg/mL の濃度となるまで濃縮した。沈澱剤として 1.5 M ammonium sulfate を含む 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 9.5) を用いた蒸気拡散法 (sitting-drop) により、25°C で一週間静置させることで AlrS の結晶を得た。

(2) DCS および LCS を含む AlrS 結晶の作製

AlrS の結晶を、50 mM の DCS あるいは LCS を含む reservoir Soln. に室温で 12 h 置くことによって調製した。

[reservoir Soln.]

Tris-HCl (pH 9.5)	0.1 M
ammonium sulfate	1.8 M

蒸留水に溶解して調製した。

(3) AlrS 結晶のX線構造解析

X線回折データの収集は、Rigaku FR-E SuperBright および Rigaku R-AXIS VII imaging plate detector を用いて行った。結晶-detector 間の距離を 120 mm、画像一枚あたりの露光時間を回転角度 1° あたり 1 min として、180° までの範囲でデータを収集した。収集データの処理は CrystalClear program [74] によって行った。

構造の決定は CCP4 の Amore program [75] を用い、分子置換法によった。AlrS のアミノ酸配列と *Bacillus* ALR のそれは 34% の相同性しかなかったが、*Bacillus* ALR 二量体構造 (protein Data Bank code 1SFT) [31] のうち片側サブユニットをスタートモデルとした。分子置換法を行うにあたり、両アミノ酸配列で異なっている残基を一度 Ala に置換し、また配列が挿入や欠失によってずれている部分はスタートモデルから取り除いた。

分子置換法によって得られたモデルの精密化は、X-PLOR program [76] の simulated annealing 法 [77] および conventional restrained refinement 法 [78] によって、分子モデリングは Xtalview [79] の Xfit program によってそれぞれ行った。解析にはまず 3.5 Å までの分解能のデータを用い、最終的には 2.0 Å までの分解能データを用いた (protein Data Bank code 1VFH)。

(4) DCS-結合型 AlrS 結晶のX線構造解析

X線回折データの収集は、Rigaku FR-E SuperBright および Rigaku R-AXIS VII imaging plate detector を用いて行った。結晶-detector 間の距離を 120 mm、画像一枚あたりの露光時間を回転角度 1° あたり 1 min として、180° までの範囲でデータを収集した。収集データの処理は CrystalClear program [74] によって行った。

構造決定は、CCP4 の Amore program [75] を用い、先に決定した AlrS の構造から結晶学的対称性に基づいて生成した AlrS 二量体構造をスタートモデルとした分子置換法によって行った。

分子置換法によって得られたモデルの精密化は、X-PLOR program [76] の simulated

annealing 法 [77] および conventional restrained refinement 法 [78] によって、分子モデリングは Xtalview [79] の Xfit program によってそれぞれ行った。解析にはまず 3.0 Å までの分解能のデータを用い、最終的には 1.9 Å までの分解能データを用いた (protein Data Bank code 1VFS)。

(5) LCS-結合型 AlrS 結晶の X 線構造解析

X 線回折データの収集は、Rigaku FR-E SuperBright および Rigaku R-AXIS VII imaging plate detector を用いて行った。結晶-detector 間の距離を 130 mm、画像一枚あたりの露光時間を回転角度 1° あたり 2 min として、180° までの範囲でデータを収集した。収集データの処理は CrystalClear program [74] によって行った。

構造の決定は、CCP4 の Amore program [75] を用い、先に決定した DCS-結合型 AlrS の構造をスタートモデルとした分子置換法によった。

分子置換法によって得られたモデルの精密化は、X-PLOR program [76] の simulated annealing 法 [77] および conventional restrained refinement 法 [78] によって、分子モデリングは Xtalview [79] の Xfit program によってそれぞれ行った。解析にはまず 3.0 Å までの分解能のデータを用い、最終的には 2.3 Å までの分解能データを用いた (protein Data Bank code 1VFT)。

【参考文献】

- [1] **Sepkowitz, K.A., Raffalli, J., Riley, L., Kiehn, T.E., and Armstrong, D.** (1995) Tuberculosis in the AIDS era. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 180-199
- [2] **Sammon, A.M.** (1999) Dietary linoleic acid, immune inhibition and disease. *Postgrad. Med. J.* **75**, 129-132
- [3] **Pablos-Mendez, A., Raviglione, M.C., Laszlo, A., Binkin, N., Rieder, H.L., Bustreo, F., Cohn, D.L., Lambregts-van Weezenbeek, C.S., Kim, S.J., Chaulet, P., and Nunn, P.** (1998) Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1641-1649
- [4] **Snider, Jr., D.E., and Roper, W.L.** (1992) The new tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **326**, 703-705
- [5] **Svensson, M.L., and Gatenbeck, S.** (1982) The pathway of D-cycloserine biosynthesis in *Streptomyces garyphalus*. *Arch. Microbiol.* **131**, 129-131
- [6] **Svensson, M.L., and Gatenbeck, S.** (1981) The presence of two serine racemase in *Streptomyces garyphalus*, a D-cycloserine producer. *Arch. Microbiol.* **129**, 213-215
- [7] **Heifets, L.B., and Iseman, M.D.** (1991) Individualized therapy versus standard regimens in the treatment of *Mycobacterium avium* infections. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, 1-2
- [8] **Andersen, J.M., Lindberg, V., and Myhrer, T.** (2002) Effects of scopolamine and D-cycloserine on non-spatial reference memory in rats. *Behav. Brain. Res.* **129**, 211-216
- [9] **Schneider, J.S., Tinker, J.P., van Velson, M., and Giardinieri, M.** (2000) Effects of the partial glycine agonist D-cycloserine on cognitive functioning in chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Brain Res.* **860**, 190-194
- [10] **Johannesen, T.S., and Myhrer, T.** (2002) Impaired visual memory in rats reared in isolation is reversed by D-cycloserine in the adult rat. *Eur. J. Pharmacol.* **437**, 73-77
- [11] **Walsh, C.T.** (1989) Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J. Biol. Chem.* **264**, 2393-2396
- [12] **Neuhaus, F.C.** (1962) The enzymatic synthesis of D-alanyl-D-alanine. I. Purification and properties of D-alanyl-D-alanine synthetase. *J. Biol. Chem.* **237**, 778-786
- [13] **Neuhaus, F.C., and Hammes, W.P.** (1981) Inhibition of cell wall biosynthesis by analogues and alanine. *Pharmacol. Ther.* **14**, 265-319
- [14] **Wasserman, S.A., Daub, E., Grisafi, P., Botstein, D., and Walsh, C.T.** (1984) Catabolic alanine racemase from *Salmonella typhimurium*: DNA sequence, enzyme purification, and characterization. *Biochemistry* **23**, 5182-5187

- [15] **Esaki, N., and Walsh, C.T.** (1986) Biosynthetic alanine racemase of *Salmonella typhimurium*: purification and characterization of the enzyme encoded by the *alr* gene. *Biochemistry* **25**, 3261-3267
- [16] **Lilley, P.E., Stamford, N.P., Vasudevan, S.G., and Dixon, N.E.** (1993) The 92-min region of the *Escherichia coli* chromosome: location and cloning of the *ubiA* and *alr* genes. *Gene* **129**, 9-16
- [17] **Galakatos, N.G., Daub, E., Botstein, D., and Walsh, C.T.** (1986) Biosynthetic *alr* alanine racemase from *Salmonella typhimurium*: DNA and protein sequence determination. *Biochemistry* **25**, 3255-3260
- [18] **Zawadzke, L.E., Bugg, T.D.H., and Walsh, C.T.** (1991) Existence of two D-alanine:D-alanine ligases in *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *ddlA* gene and purification and characterization of the DdlA and DdlB enzymes. *Biochemistry* **30**, 1673-1682
- [19] **Mengin-Lecreulx, D., Ayala, J., Bouhss, A., van Heijenoort, J., Parquet, C., and Hara, H.** (1998) Contribution of the *P_{mra}* promoter to expression of genes in the *Escherichia coli mra* cluster of cell envelope biosynthesis and cell division genes. *J. Bacteriol.* **180**, 4406-4412
- [20] **Lambert, M.P., and Neuhaus, F.C.** (1972) Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from *Escherichia coli* W. *J. Bacteriol.* **110**, 978-987
- [21] **Fenn, T.D., Stamper, G.F., Morollo, A.A., and Ringe, D.** (2003) A side reaction of alanine racemase: transamination of cycloserine. *Biochemistry* **42**, 5775-5783
- [22] **Peisach, D., Chipman, D.M., van Ophem, P.W., Manning, J.M., and Ringe, D.** (1998) D-Cycloserine inactivation of D-amino acid aminotransferase leads to a stable noncovalent protein complex with an aromatic cycloserine-PLP derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2268-2274
- [23] **Wang, E., and Walsh, C.** (1978) Suicide substrates for the alanine racemase of *Escherichia coli* B. *Biochemistry* **17**, 1313-1321
- [24] **Matsuo, H., Kumagai, T., Mori, K., and Sugiyama, M.** (2003) Molecular cloning of a D-cycloserine resistance gene from D-cycloserine-producing *Streptomyces garyphalus*. *J. Antibiot.* **56**, 762-767
- [25] **Stober, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V.** (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **417**, 141-147

- [26] **Bibb, M.J., Findlay, P.R., and Johnson, M.W.** (1984) The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein coding sequences. *Gene* **30**, 157-166
- [27] **Fan, C., Moews, P.C., Walsh, C.T., and Knox, J.R.** (1994) Vancomycin resistance: structure of D-alanine:D-alanine ligase at 2.3 Å resolution. *Science* **266**, 439-443
- [28] **Evers, S., Casadewall, B., Charles, M., Dutka-Malen, S., Galimand, M., and Courvalin,** (1996) Evolution of structure and substrate specificity in D-alanine:D-alanine ligase and related enzymes. *J. Mol. Evol.* **42**, 706-712
- [29] **Dutka-Malen, S., Molinas, C., Arthur, M., and Courvalin, P.** (1992) Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine:D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene* **112**, 53-58
- [30] **Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Horneby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., and Hopwood, D.A.** (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147
- [31] **Shaw, J.P., Petsko, G.A., and Ringe, D.** (1997) Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **36**, 1329-1342
- [32] **Watanabe, A., Kurokawa, Y., Yoshimura, T., Soda, K., and Esaki, N.** (1999) Role of lysine 39 of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* that binds pyridoxal 5'-phosphate. Chemical rescue studies of Lys³⁹ → Ala mutant. *J. Biol. Chem.* **274**, 4189-4194
- [33] **Watanabe, A., Kurokawa, Y., Yoshimura, T., and Esaki, N.** (1999) Role of tyrosine 265 of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biochem.* **125**, 987-990
- [34] **Hawkins, J.E., and McClean, V.R.** (1966) Comparative studies of cycloserine inhibition of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **93**, 594-602
- [35] **Caceres, N.E., Harris, N.B., Wellehan, J.F., Feng, Z., Kapur, V., and Barletta, R.G.** (1997) Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **179**, 5046-5055
- [36] **Strych, U., Penland, R.L., Jimenez, M., Krause, K.L., and Benedik, M.J.** (2001) Characterization of the alanine racemase from two mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**, 93-98

- [37] **Yokoigawa, K., Okubo, Y., and Soda, K.** (2003), Subunit interaction of monomeric alanine racemases from *shigella* species in catalytic reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**, 263-267
- [38] **Park, I.S., Lin, C.H., and Walsh, C.T.** (1996) Gain of D-alanyl-D-lactate or D-lactyl-D-alanine synthetase activities in three active-site mutants of the *Escherichia coli* D-alanyl-D-alanine ligase B. *Biochemistry* **35**, 10464-10471
- [39] **Park, I.S., Lin, C.H., and Walsh, C.T.** (1997) Bacterial resistance to vancomycin: overproduction, purification, and characterization of VanC2 from *Enterococcus casseliflavus* as a D-Ala-D-Ser ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10040-10044
- [40] **Dutka-Malen, S., Molinas, C., Arthur, M., and Courvalin, P.** (1990) The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 364-372
- [41] **Bugg, T.D.H., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., and Walsh, C.T.** (1991) Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine:D-alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochemistry* **30**, 2017-2021
- [42] **Evers, S., Reynolds, P.E., and Courvalin, P.** (1994) Sequence of the *vanB* and *ddl* genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene* **140**, 97-102
- [43] **Meziane-Cherif, D., Badet-Denisot, M.A., Evers, S., Courvalin, P., and Badet, B.** (1994) Purification and characterization of the VanB ligase associated with type B vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* V583. *FEBS Lett.* **354**, 140-142
- [44] **Daub, E., Zawadzke, L.E., Botstein, D., and Walsh, C.T.** (1988) Isolation, cloning, and sequencing of the *Salmonella typhimurium* *ddlA* gene with purification and characterization of its product, D-alanine:D-alanine ligase (ADP forming). *Biochemistry* **27**, 3701-3708
- [45] **Nuehaus, F.C., Carpenter, C.V., Miller, J.L., Lee, M.N., Gragg, M., and Stichgold, R.A.** (1969) Enzymic synthesis of D-alanyl-D-alanine. IV. Control of D-alanine:D-alanine ligase (ADP). *Biochemistry* **8**, 5119-5124
- [46] **Hoffmann, K., Schneider-scherzer, E., Kleinkauf, H., and Zocher, R.** (1994) Purification and characterization of eukaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 12710-12714
- [47] **Nomura, T., Yamamoto, I., Morishita, F., Furukawa, Y., and Matsushima, O.** (2001) Purification and some properties of alanine racemase from a bivalve mollusc *Carbicula japonica*. *J. Exp. Zool.* **289**, 1-9
- [48] **Inagaki, K., Tanizawa, K., Badat, B., Walsh, C.T., Tanaka, H., and Soda, K.** (1986) Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning of the gene, enzyme purification and characterization. *Biochemistry* **25**, 3268-3274

- [49] **Patrick, W.M., Weisner, J., and Blackburn, J.M.** (2002) Site-directed mutagenesis of Tyr³⁵⁴ in *Geobacillus stearothermophilus* alanine racemase identified a role in controlling substrate specificity and a possible role in the evolution of antibiotic resistance. *ChemBioChem* **8**, 789-792
- [50] **Briggs, G.E., and Haldane, J.B.S.** (1925) A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem. J.* **19**, 338-339
- [51] **Frecking, M.G., and Hoeprich, P.D.** (1966) Effect of cycloserine on D-amino acid oxydase. *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 108-111
- [52] **Fahey, R.C., and Fischer, E.F.** (1974) A nonenzyme-coupled assay for triosephosphate isomerase based upon circular dichroism of glyceraldehyde-3-phosphate. *Anal. Biochem.* **57**, 547-554
- [53] **Sharp, T.R., Hegeman, G.D., and Kenyon, G.L.** (1979) A direct kinetic assay for mandelate racemase using circular dichroic measurements. *Anal. Biochem.* **94**, 329-334
- [54] **Janski, A.M., and Cornell, N.W.** (1981) Inhibition by cycloserine of mitochondrial and cytosolic aspartate aminotransferase in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **194**, 1027-1030
- [55] **Feng, Z., and Barletta, R.G.** (2003) Roles of *Mycobacterium smegmatis* D-alanine:D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **47**, 283-291
- [56] **Watanabe, T., Shibata, K., Kera, Y., and Yamada, R.** (1998) Occurrence of free D-aspartate and aspartate racemase in the blood shell *Scapharca broughtonii*. *Amino Acids* **14**, 353-360
- [57] **Shibata, K., Shirasuna, K., Motegi, K., Kera, Y., Abe, H., and Yamada, R.** (2000) Purification and properties of alanine racemase from crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **126**, 599-608
- [58] **Shibata, K., Watanabe, T., Yoshikawa, H., Abe, K., Takahashi, S., Kera, Y., and Yamada, R.** (2003) Purification and characterization of aspartate racemase from bivalve mollusk *Scapharca broughtonii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **134**, 307-314
- [59] **Yoshikawa, N., Dhomae, N., Takio, K., and Abe, H.** (2002) Purification, properties, and partial amino acid sequences of alanine racemase from the muscle of the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **133**, 445-453
- [60] **Nagata, Y., Akino, T., and Ohno, K.** (1989) The presence of free D-amino acids in mouse tissues. *Experientia* **45**, 330-332
- [61] **Nagata, Y., Horiike, K., and Maeda, T.** (1994) Distribution of free D-serine in vertebrate brains. *Brain Res.* **634**, 291-295
- [62] **Fujii, N.** (2002) D-amino acids in living higher organisms. *Orig. Life Evol. Biosph.* **32**, 103-127

- [63] Wang, L.Z., and Zhu, X.Z. (2003) Spatiotemporal relationships among D-serine, serine racemase, and D-amino acid oxidase during mouse postnatal development. *Acta Pharmacol. Sin.* **24**, 965-974
- [64] Nagata, Y., Masui, R., and Akino, T. (1992) The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma. *Experientia* **48**, 986-988
- [65] Nagata, Y., Borghi, M., Fisher, G.H., and D'Aniello, A. (1985) Free D-serine concentration in normal and Alzheimer human brain. *Brain Res. Bull.* **38**, 181-183
- [66] Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E., Okada, S., Komatsu, N., Okamura, N., Koike, K., Koizumi, H., Kumakiri, C., Imai, K., and Iyo, M. (2004) Possible role of D-serine in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **28**, 385-388
- [67] Stamper, G.F., Morollo, A.A., Ringe, D., and Stamper, C.G. (1998) Reaction of alanine racemase with 1-aminoethylphosphonic acid forms a stable external aldimine. *Biochemistry* **37**, 10438-10445
- [68] Morollo, A.A., Petsko, G.A., and Ringe, D. (1999) Structure of a Michaelis complex analogue: propionate binds in the substrate carboxylate site of alanine racemase. *Biochemistry* **38**, 3293-3301
- [69] Watanabe, A., Yoshimura, T., Mikami, B., Hayashi, H., Kagamiyama, H., and Esaki, N. (2002) Reaction mechanism of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: x-ray crystallographic studies of the enzyme bound with N-(5'-phosphopyridoxyl)alanine. *J. Biol. Chem.* **277**, 19166-19172
- [70] Peisach, D., Chipman, D.M., van Ophem, P.W., Manning, J.M., and Ringe, D. (1998) Crystallographic study of steps along the reaction pathway of D-amino acid aminotransferase. *Biochemistry* **37**, 4958-4967
- [71] Mustata, G.I., Soares, T.A., and Briggs, J.M. (2003) Molecular dynamics studies of alanine racemase: a structural model for drug design. *Biopolymers* **70**, 186-200
- [72] Mustata, G.I., and Briggs, J.M. (2002) A structure-based design approach for the identification of novel inhibitors: application to an alanine racemase. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **16**, 935-953
- [73] Ghuysen, J.-M., Tipper, D.J., and Storminger, J.L. (1975) [118] Enzyme that degrade bacterial cell walls. *Methods Enzymol.* **8**, 685-699
- [74] Rigaku Molecular Structure Corporation (2001) *CrystalClear*, Rigaku Molecular Structure Corp., Orem, Utah
- [75] Collaborative Computational Project Number. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760-763

- [76] **Brünger, A.T.** (1993) *X-PLOR Version 3.1 Manual*, Yale University Press, New Haven, CT
- [77] **Brünger, A.T., Kuriyan, J., and Karplus, M.** (1987) Crystallographic R-factor refinement by molecular dynamics. *Science* **235**, 458-460
- [78] **Konnert, J.H., and Hendrickson, W.A.** (1980) A restrained-parameter thermal-factor refinement procedure. *Acta Crystallogr. Sect. A* **36**, 344-350
- [79] **McRee, D.E.** (1992) Side chains and the connecting turns were built using the program Xfit from the XtalView suit of programs. *J. Mol. Graph.* **10**, 44-46

【学位論文の基礎となる原著】

1. **Noda, M., Kawahara, Y., Ichikawa, A., Matoba, Y., Matsuo, H., Lee, D.-G., Kumagai, T., and Sugiyama, M.** (2004) Self-protection mechanism in D-cycloserine-producing *Streptomyces lavendulae*; gene cloning, characterization, and kinetics of its alanine racemase and D-alanyl-D-alanine ligase, which are target enzymes of D-cycloserine. *J. Biol. Chem.* **279**, 46143-46152
2. **Noda, M., Matoba, Y., Kumagai, T., and Sugiyama, M.** (2004) Structural evidence that alanine racemase from a D-cycloserine-producing microorganism exhibits resistance to its own product. *J. Biol. Chem.* **279**, 46153-46161
3. **Noda, M., Matoba, Y., Kumagai, T., and Sugiyama, M.** (2005) A novel assay method for an amino acid racemase reaction based on circular dichroism. *Biochem. J.* (Revised paper 作製中)

【謝辞】

本研究に対し、終始にわたり、懇篤なるご指導・ご鞭撻を賜りました、広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 杉山 政則 教授に、謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、有益なご指導とご助言を賜りました、広島大学医学部 医歯薬学総合研究科 熊谷 孝則 助教授、的場 康幸 助手、また、副指導教官を務めて頂いた、太田 茂 教授、小池 透 教授、ならびに、本研究成果をまとめるにあたり、貴重なご意見を賜りました、櫛木 修 教授、田原 栄俊 助教授に、深く御礼申し上げます。

そして、本研究を進めるうえで、多大なるご協力を頂きました、理学電機株式会社 X線研究所 山野 昭人 博士、大阪大学大学院 理学研究科 倉光 成紀 教授、ならびに同研究室の皆様、心より御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行中、終始、暖かいご支援・ご協力を頂きました、池田 佳代 技術主任、丸山 昌史 博士、河原 裕美 氏、市川 梓 氏、ならびに同研究科 杉山研究室の皆様、厚く御礼申し上げます。

最後に、長きにわたる学生生活を、経済的・精神的に支え続けてくれた両親に、謹んで感謝します。