

抗生物質生産菌における新規薬剤耐性遺伝子産物の  
機能と酵素学的諸性質の解明

1998

広島大学大学院医学系研究科

松尾 裕彰

抗生物質生産菌における新規薬剤耐性遺伝子産物の  
機能と酵素学的諸性質の解明

1998

広島大学大学院医学系研究科

松尾 裕彰

## 【目次】

序章	1
第一章 Bleomycin 生産菌由来の bleomycin N-acetyltransferase —その大腸菌における大量発現と酵素学的諸性質の解明—	
第一節 緒言	5
第二節 大腸菌における bleomycin N-acetyltransferase (BAT) の 大量発現および精製	6
第三節 fBAT の物理化学的諸性質	9
第四節 fBAT 活性に与える金属イオンおよび阻害剤の影響	9
第五節 fBAT の基質特異性	10
第六節 抗 BAT モノクローナル抗体の作製および精製	11
第七節 放線菌において発現している BAT の N-末端アミノ酸構造	11
第八節 bleomycin (Bm) 生産菌における Bm の生産と 自己耐性遺伝子の発現時期の相関性	12
第九節 考察	13
第二章 Blasticidin S 生産菌の産生する Puromycin 不活化酵素 —その精製および酵素学的諸性質—	
第一節 緒言	16
第二節 <i>Streptomyces morookaensis</i> における puromycin (Pm) 不活化酵素の産生時期	17
第三節 Pm 不活化酵素の機能	18
第四節 Pm 加水分解酵素の精製	20
第五節 Pm 加水分解酵素の諸性質	21
第六節 Pm 加水分解酵素活性に与える金属イオンおよび阻害剤の影響	22
第七節 Pm 加水分解酵素の基質特異性	23
第八節 Pm 加水分解酵素の N-末端アミノ酸シーケンスおよびホモロジー検索	23
第九節 考察	23

### 第三章 D-Cycloserine 生産菌 *Streptomyces garyphalus* からの

#### 自己耐性遺伝子のクローニングと遺伝子解析

第一節 緒言	25
第二節 D-cycloserine (Cs) 生産菌 <i>Streptomyces garyphalus</i>	
染色体 DNA からの自己耐性遺伝子のクローニング	26
第三節 クローニングした 3.5 kb DNA 断片の全塩基配列の決定	26
第四節 クローニングした 3.5 kb DNA 断片の遺伝子解析	27
第五節 Cs 耐性遺伝子の大腸菌における発現とコード領域の決定	31
第六節 Cs 耐性遺伝子産物の機能	31
第七節 考察	33
終章 総括	35
実験の部	
1. 使用菌株	37
2. 一般的操作	37
3. 第一章の実験	47
4. 第二章の実験	52
5. 第三章の実験	55
6. 使用抗生物質	58
参考文献	60
学位論文の基礎となる原著	68
謝辞	69

## 【略号一覧】

aa	amino acid
Abk	arbekacin
AcCoA	acetyl coenzyme A
Ap	ampicillin
APS	ammonium peroxodisulfate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
B.	<i>Bacillus</i>
Ba	bleomycinic acid
BAT	bleomycin N-acetyltransferase
Bm	bleomycin
Bs	blasticidin S
BSA	bovine serum albumin
Cs	D-cycloserine
Cp	chloramphenicol
DIFP	diisopropyl fluorophosphate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Em	erythromycin
fBAT	MBP/BAT 由来の BAT
Gm	gentamicin
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Km	kanamycin
M.	<i>Mycobacterium</i>
MBP	maltose-binding protein
MBP/BAT	MBP-BAT fusion protein
Mc	methicillin
Nb	novobiocin
Nm	neomycin
O-Me-Tyr	O-methyl-L-tyrosine
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBP	penicillin-binding protein
PCMB	p-chloromercuribenzoic acid
PCR	polymerase chain reaction
Pem	peplomycin
Phm	phleomycin
Pm	puromycin
PmAn	puromycin aminonucleoside
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RBS	ribosome binding site
S.	<i>Streptomyces</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sm	streptomycin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
Tet	tetracycline
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Ts	thiostrepton
Vm	vancomycin

## 【序章】

S. A. Waksman によれば、抗生物質とは、『微生物により生産され、微生物の発育を阻止する物質である』と定義される。しかしながら、現在では、その定義は拡大解釈され、抗癌剤や抗ウイルス剤、それに合成抗菌剤もこのカテゴリーに含めることが多い。微生物代謝産物としての抗生物質は、Fleming による penicillin (Pc)、Waksman による streptomycin (Sm) の発見以来、今日までに 9,000 種以上も発見され、それらの一部は医薬品や農薬として使用されている。また、微生物によりつくられた物質をリード化合物として新しい抗癌剤・抗菌剤が化学合成されている。

抗生物質の登場によって、感染症による死亡率は劇的に低下し、感染症は克服されたと見えた。しかしながら、近年、病気でからだの抵抗力が落ちた人に感染する病原菌が大きな社会問題となっている。これは日和見感染と呼ばれ、通常では病原性が弱く健康な人には害を及ぼさない菌が、抵抗力の弱った病人や乳児・老人に感染すると重篤な症状を与えてしまう。それら感染症治療のための有効な薬が抗生物質であるが、それらを長期使用したり、乱用した結果、いわゆる methicillin (Mc) 耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の誘発を招いてしまった。この MRSA が社会的にクローズアップされたのは、単に Mc に対し耐性を獲得したからではない。これまで開発された他の数多くの抗生物質に対しても同時に耐性を獲得してしまったからである。MRSA を始めとする多剤耐性菌が免疫機能の低下した患者や乳児・高齢者に感染すると、使用できる抗生物質が限られているがゆえに、その治療はきわめて困難となる。また、記憶に新しいこととして、1996 年、わが国において病原性大腸菌 O157 株による集団食中毒が発生し、多くの尊い命が失われた。このように、抗生物質が世の中にきわめて多く出回っている現在でも、感染症で命を落とす人々が数多くいるのも事実である。

病原菌に有効な抗生物質が新しく発見・開発されても、病原菌はこれらの抗生物質に対してすぐに耐性を獲得してしまう。では、いったい病原菌はどのような機構で薬剤耐性を獲得するのであろうか。多くの場合、薬剤耐性遺伝子はトランスポゾンや挿入配列を介して染色体遺伝子上に組み込まれるか、プラスミド上に載ってその細胞内に導入される。生化学や分子生物学の進展に伴って、薬剤耐性遺伝子のつくる産物が明らかにされた結果、それらは抗生物質不活化酵素、抗生物質の一次作用点を変化させる酵素、および抗生物質の細胞内濃度を低下させる薬剤排出系酵素などであることが分かった [Davies, 1994]。

MRSA を例として、具体的にその薬剤耐性獲得機構について以下に述べてみる。MRSA が aminoglycoside 系抗生物質に対して耐性を獲得する場合、抗生物質をリン酸化、アセチル化またはアデニル化することで抗生物質を修飾してしまうのである

[Phillips and Shannon, 1984]。修飾された抗生物質は、もはや、抗菌活性を失う。また、chloramphenicol (Cp) に対する耐性は Cp acetyltransferase によるものであり [Sands and Shaw, 1973]、 $\beta$ -lactam 系抗生物質に対する耐性は、それらを加水分解する酵素  $\beta$ -lactamase [Rosdahl, 1973] を産生することに起因する。Mc 感受性の黄色ブドウ球菌、いわゆる MSSA (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*) は、細胞壁合成に関与し、かつ、Mc の標的酵素である Pc 結合蛋白質 (penicillin-binding protein: PBP) を 4 つ保有しているが、MRSA はそれらに加えて *mecA* 遺伝子によりコードされる PBP-2' と呼ばれる、新たな細胞壁合成酵素を産生している。PBP-2' は Mc との結合アフィニティーが弱いため、Mc が存在しても、それにより細胞壁合成が阻害されることはない。すなわち、MRSA は PBP-2' を生産することにより Mc に対する耐性を獲得しているのである [Utsui and Yokota, 1985; Ryffel *et al.*, 1990]。さらに、tetracycline (Tet) に対しては、菌体内に侵入してきた Tet を能動的に排出する役目を持つ蛋白質をつくることによって耐性を獲得している [Fujihira *et al.*, 1996]。このように、MRSA は様々な抗生物質に対する耐性遺伝子を同時に保有することによって多剤耐性化しているのである [Lyon and Skurray, 1987]。

これまで、MRSA 感染症に対する有効な抗生物質として、二種類の抗生物質、すなわち aminoglycoside 系抗生物質である arbekacin (Abk) と糖ペプチド系抗生物質である vancomycin (Vm) が、主に臨床使用されてきた。Abk は MRSA が保有する aminoglycoside 修飾酵素によっては不活化されにくい立体構造をとっているため、かなり有効な抗生物質であるとされてきた [Watanabe *et al.*, 1987]。一方、Vm は細胞壁合成に必要なジペプチド (D-alanine-D-alanine) に結合することで、ペプチドグリカンの生合成を阻害する作用を持っている [Sheldrick *et al.*, 1978]。しかしながら、本抗生物質は Abk に比べて腎毒性が強いという欠点がある。最近、Abk や Vm に耐性の MRSA が臨床分離されるに至り、もはや MRSA に対する有効な抗生物質はないと言っても過言ではない状況下にある。

ところで、細菌の増殖を阻害する抗生物質を生産している微生物は、自ら産生する抗生物質によって死滅することはない。これを自己耐性 (self-resistance) と呼ぶ。aminoglycoside 系抗生物質生産菌は、自己耐性因子としてアセチル化酵素またはリン酸化酵素を持っている [Benveniste and Davies, 1973]。ただし、薬剤耐性細菌で知られているようなアデニル化酵素をもつ aminoglycoside 抗生物質生産菌は現在までのところ知られていない。また、aminonucleoside 系抗生物質の仲間 puromycin (Pm) や blasticidin S (Bs) を生産する放線菌も同様に、これらの自己生産抗生物質をアセチル化することにより、不活化する酵素を保有している [Perez-Gonzalez *et al.*, 1983; Sugiyama *et al.*, 1986]。このような抗生物質修飾酵素は、抗生物質生合成酵素の一つ

として機能していることが多い。すなわち、抗生物質やその生合成における前駆体が生産菌に悪影響を及ぼすのを防ぐために、抗生物質は、先ず、不活化型の前駆体として生合成され、それが細胞外に分泌される際に活性型に変換される場合が多い。例えば、*Streptomyces (S.) griseus* により生産される Sm の最終前駆体は、Sm 6-phosphate であり、これが菌体外に排出される際に、生産菌のペリプラズムに存在するアルカリ性フォスファターゼ (Sm 6-phosphate phosphatase) でリン酸基が除去されることで活性型の Sm に変換され、培地中に蓄積されるのである [Nomi *et al.*, 1970; Sugiyama and Nimi, 1990; Mansouri and Piepersberg, 1991]。ところで、Sm は streptidine、L-streptose および *N*-methyl-L-glucosamine という 3 つの糖から構成されているが、Sm の生合成において、streptidine が L-streptose と連結される際、streptidine は予めリン酸化されていなければならない、そのリン酸化に自己耐性因子としての Sm 6-phosphotransferase が関与している。また、培地中に蓄積した Sm は生産菌の細胞内に取り込まれてしまうが、その Sm は Sm 6-phosphotransferase によりリン酸化された後、再び細胞外へ排出される [Sugiyama and Nimi, 1990]。また、kanamycin (Km) 生産菌 *S. kanamyceticus* は、Km *N*-acetyltransferase と *N*-acetyl Km amidohydrolase を持っており、これらは Sm の phosphotransferase と phosphatase と同様の働きをしていると考えられている [Sato *et al.*, 1975; Sato *et al.*, 1976]。Km *N*-acetyltransferase は Km 生産菌の自己耐性因子としても機能している。一方、Pm を生産する *S. alboniger* は Pm を不活化する Pm *N*-acetyltransferase を持っている [Sugiyama *et al.*, 1985; Vara *et al.*, 1985]。この酵素は Pm のみならず、Pm 生合成の前駆体である *O*-demethyl Pm もアセチル化する [Perez-Gonzalez *et al.*, 1985]。さらに、Pm 生産菌は *N*-acetyl Pm *N*-acetylhydrolase を菌体外に分泌していることが見い出され、その酵素により *N*-acetyl Pm が菌体外で活性型の Pm に変換されることが明らかになった [Lacalle *et al.*, 1993]。このように、抗生物質生産菌がつくる抗生物質修飾酵素は、自己耐性因子としての機能の他に、その生合成にも密接に関与しているのである。

DNA gyrase B を阻害する抗生物質として、novobiocin (Nb) が知られている。これを生産する *S. sphaeroides* は、自己耐性遺伝子として Nb 耐性を有する DNA gyrase B サブユニットをコードする遺伝子を持っているのである [Thiara and Cundliffe, 1988]。他方、erythromycin (Em) や thiostrepton (Ts) は、細菌の 50 S リボソームサブユニットに結合して蛋白質の合成を阻害する。これらの抗生物質生産菌 *S. erythraeus* および *S. azureus* は、50 S リボソームサブユニット中の 23 S リボソーム RNA をメチル化する酵素を保有しており、この RNA がメチル化されると、リボソームの高次構造が変化する結果、Em や Ts がリボソームに結合できなくなる [Bibb *et al.*,

1985; Thompson *et al.* 1982]。すなわち、これら抗生物質生産菌は、抗生物質の一次作用点であるリボソームの構造を変化させることで、自己抗生物質に対する耐性を獲得している。

さらに、Tet 生産菌 *S. rimosus* [Reynes *et al.*, 1988] や methylenomycin A 生産菌 *S. coelicolor* [Neal and Chater, 1987]、ならびに macrolide 系抗生物質である ol-eandomycin 生産菌 *S. antibioticus* [Buche *et al.*, 1997] は、自己生産抗生物質に対する排出蛋白質を保有していることで自己耐性を維持していることが明らかにされた。

このように、抗生物質生産菌は、必ず、自己の生産する抗生物質に対する生体防御の機構を備えているのである。そして、これらの自己耐性機構は、抗生物質の不活化酵素の産生、抗生物質の一次作用点の変化、抗生物質の能動的排出機能のいずれか、または、これらの組み合わせで維持されている [Cundliffe, 1989]。抗生物質生産菌の自己耐性機構の解明が進展した成果として、薬剤耐性細菌の耐性機構と類似している点のあることが分かってきたのである [杉山, 1996]。

筆者は、抗生物質生産菌の自己耐性機構の解明は、多剤耐性病原菌の耐性遺伝子の起源を知る上で重要であるばかりでなく、これまでに耐性菌が見つからない抗生物質に対して、病原菌が今後どのような耐性機構を獲得し得るかを予測する上で重要な知見を与えると考えた。そこで、本研究では、① 抗癌抗生物質のひとつである bleomycin (Bm) をつくる微生物における自己耐性因子の生化学的解明、② aminonucleoside 系抗生物質 Bs 生産菌が産生する Pm 不活化因子の機能解明、③ 結核菌に有効な D-cycloserine (Cs) を生産する微生物の自己耐性機構の究明を目的とした。

本論文の第一章では、Bm 生産菌 *S. verticillus* ATCC15003 の自己耐性遺伝子の一つである Bm N-acetyltransferase (BAT) 遺伝子を大腸菌において大量発現させた後、その酵素学的諸性質を明らかにした成果について述べる。さらに、抗 BAT モノクローナル抗体を作製し、Bm 生産菌における Bm 生産と耐性遺伝子の発現時期の相関性についても調査した。第二章では、Bs 生産菌 *S. morookaensis* JCM4673 が産生する Pm 不活化因子が、Pm を加水分解する酵素であることを明らかにした成果を述べるとともに、本酵素を精製後、その諸性質を調べた結果を報告する。第三章では、Cs 生産菌 *S. garyphalus* の染色体 DNA から自己耐性遺伝子をクローニングし、その遺伝子産物の性質を明らかにした結果について述べる。

## 【第一章】

### Bleomycin 生産菌由来の bleomycin N-acetyltransferase -その大腸菌における大量発現と酵素学的諸性質の解明-

#### 第一節 緒言

bleomycin (Bm) (図 1) は、*S. verticillus* ATCC15003 により生産される。本抗生物質は  $\text{Fe}^{2+}$  と錯体を形成し、その結果、分子状酸素が活性化され、そのエネルギーを利用して DNA を切断する。Bm はこの強力な DNA 切断作用によって癌細胞や細菌の増殖を強く阻害する [Umezawa, 1975; Burger *et al.*, 1982]。Sugiyama らは、*S. verticillus* ATCC 15003 の染色体 DNA から自己耐性遺伝子クラスターをクローニングし、さらに塩基配列を決定した。そのクラスター内には二種類の自己耐性遺伝子が並んで存在していることが明らかにされ、それぞれ *blmA* および *blmB* と命名された [Sugiyama *et al.*, 1994a]。 *blmA* によってコードされる蛋白質は Bm に結合して不活化する蛋白質 (BLMA と命名) であった [Sugiyama *et al.*, 1995]。このような Bm 結合蛋白質は Bm 系抗生物質である tallysomycin 生産菌 *Streptoalloteichus hindustanus* や MRSA に存在することが明らかにされ、それぞれ *Shble* および BLMS と命名された [Gatignol *et al.*, 1988; Bhuiyan *et al.*, 1995]。筆者らの研究グループはすでに、BLMA のモノクローナル抗体を作製し、これを用いて BLMA, *Shble* および BLMS の間には免疫学的相同性のないことを明らかにした [Sugiyama *et al.*, 1995]。さらに、BLMA については大腸菌において大量発現させ精製後、その結晶化を行い X 線結晶構造解析による BLMA の三次元構造を明らかにした [Kumagai *et al.*, 1998]。一方、*blmB* によってコードされる蛋白質は Bm N-acetyltransferase (BAT) であり、acetyl coenzyme A (AcCoA) 共存下で Bm をアセチル化する。アセチル化された Bm はもはや DNA 切断活性および抗菌活性をもたないことが示された。さらに、本酵素による Bm のアセチル化部位は、酸素の活性化に必須であり、 $\text{Fe}^{2+}$  との錯体形成に関与している  $\beta$ -aminoalanine の  $\alpha$ -アミノ基であると決定された [Sugiyama *et al.*, 1994b]。

ところで、Sugiyama らにより既にクローニングされ塩基配列が決定された約 6 kb の Bm 耐性遺伝子クラスターのうち、*blmB* を含む約 3 kb の *Bam*HI-*Bam*HI 断片をサブクローニングしたプラスミド pMSA-4 を保有する放線菌 *S. lividans* は、*S. verticillus* と比べると約 1.5 倍の BAT を生産していた [Sugiyama *et al.*, 1994a]。この *S. lividans* [pMSA-4] より BAT の精製を試みたが、大量に精製することが困難であったことから、大腸菌を宿主として大量発現させることを試行した。しかしながら、発現ベク

ター pKK223-3 [Brosius and Holy, 1984] を用いた直接発現による方法では大量発現に成功しなかった。その理由として、放線菌の遺伝子のプロモーターやコドンの使用頻度が大腸菌のそれらと異なっていることが考えられた。そこで、大腸菌由来の蛋白質をリーダーペプチドとして、それと融合させることで目的遺伝子産物を発現させることを考えた。本研究では、maltose-binding protein (MBP) をリーダーペプチドとして発現させる方法を採用した。次に、融合蛋白質として発現させた BAT からリーダーペプチド部分を除き、得られた BAT の酵素学的諸性質を明らかにした。さらに、放線菌で発現した BAT の N-末端アミノ酸構造と Bm 生産菌における Bm の生産と自己耐性遺伝子の発現時期を調べるために抗 BAT モノクローナル抗体を作製した。次に、抗 BAT モノクローナル抗体を固定したアフィニティーカラムを用いて、放線菌 *S. lividans* [pMSA-4] より BAT の精製に成功した。また、抗 BAT および、Sugiyama らにより以前作製された抗 BLMA モノクローナル抗体を用いて Bm 生産菌 *S. verticillus* における Bm の生産時期と二つの自己耐性遺伝子 (*blmA* および *blmB*) の発現時期の相関性について調べた。

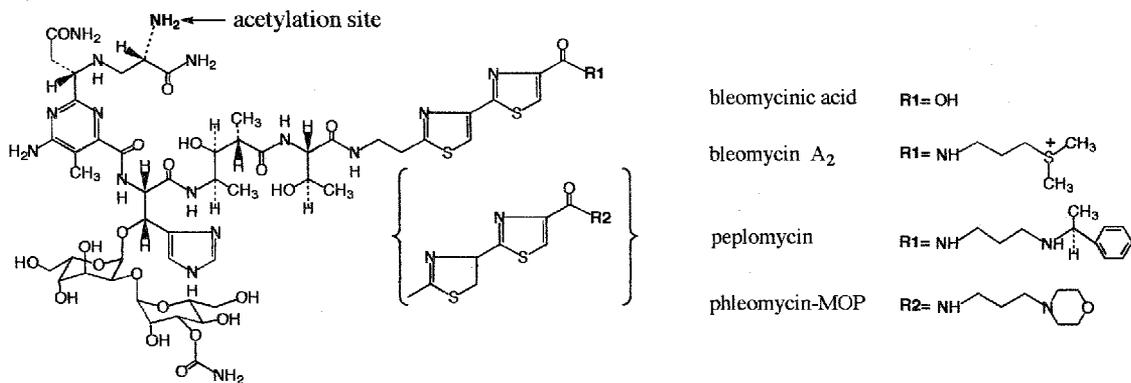


図 1. プレオマイシン系抗生物質の構造

## 第二節 大腸菌における BAT の大量発現および精製

まず、*blmB* の塩基配列 (図 2) に基づいてプライマー A および B を設計後、化学合成した。その際、MBP をコードする *malE* とフレームが合うように *blmB* のスタートコドン (GTG) の直前に *Bam*HI サイト、ストップコドン (TGA) の直後に *Pst*I サイトをプライマーに設けた (図 3-A)。これらのプライマーを用い PCR (polymerase chain reaction) 法にて *blmB* 構造遺伝子部分を増幅させた。増幅した目的遺伝子を MBP 融合蛋白質発現ベクター (pMAL-c2, [Mania *et al.*, 1988]) の *Bam*HI-*Pst*I サイトに挿入することでプラスミド pMAL-B1 を構築した (図 4)。*malE* と *blmB* の間には血液凝固因子である factor Xa プロテアーゼの認識サイトが存在するので、pMAL-B1

より発現した MBP-BAT 融合蛋白質 (MBP/BAT) は factor Xa プロテアーゼにより切断できる。しかし、切断後の BAT の N-末端には Ile-Ser-Glu-Phe-Gly-Ser の 6 アミノ酸残基が当然ながら付加される (図 3-B)。

```

GGACGGGTGGACGGCGGAGGAGCCGGGCGGTTGACCGAACACCCGCGGGCGCACACGGCA 60
      RBS           M T E H P R A H T A
CACCTCCGCACGGCCCCGGCTCGAACTGACCCCGCTGGACCCGGCCGCCGACGCCCGGCAC 120
H L R T A R L E L T P L D P A A D A R H
CTGCACCACGCCTACGGCGACGAGGAGGTGATGCGCTGGTGGACCGCGCCGGCGTGCGCC 180
L H H A Y G D E E V M R W W T R P A C A
GACCCGGCCGAGACCGAGCGCTACCTCACCTCCTGCGCCGCCGCGCCCGGCGCCCGGCTC 240
D P A E T E R Y L T S C A A A P G A R L
TGGACCATCAGGGCCCCCTGACGGCACCGTGCCGGGCATGGCCGGGCTCCTGGGCGGGACC 300
W T I R A P D G T V P G M A G L L G G T
GACGTGCCCGGACTGACCTGGCTGCTCCGCAGGGACAGCTGGGGCCACGGCTACGCCACC 360
D V P G L T W L L R R D S W G H G Y A T
GAGGCCCGCCGACCCGTCGTCGGCCACGCCCTGGAGGACGGCGGCCTCGACCGCGTGCAG 420
E A A A A V V G H A L E D G G L D R V E
GCGTGGATCGAGGCCGGCAACCGCCGCTCCCTCGCCGTGGCGGCCCGCGTCCGGGTGACC 480
A W I E A G N R R S L A V A A R V G L T
GAACGCGCCCGGCTCGCCAGCACTACCCCGCCCGGCGCCGACGAGATGGTTCGTC 540
E R A R L A Q H Y P H R P G P H E M V V
CTGGGAAAGGCCCGCGCCGAGGAACCCCTGACGACCTCGCCGTGATCACGGAACCTGCCG 600
L G K A R A E E P L T T L A V I T E L P
GTACGGGACGTGGCCGCCACCCCTGCGGCTGGTTCGAGGCCGCGCTGGGCGCCCGTACCGCC 660
V R D V A A T L R L V E A A L G A R T A
TTCGCCATCGGTGATCCGCCGAGTTCGCGGAAGCCGCCCTGACGCCGTGGAGCGCCGGC 720
F A I G D P P E F A E A A L T P W S A G
CCCCGGTTCGGCTCGCGGCCGCTGCCCGGCCCGGGCCGGTGGAGCCCGTCCGTCTCCAC 780
P R F R L A A V P G P G P V E P V R L H
CTCGACGCCGCCGGCACC CGGACTCCCTCCACCGCAGGGCCGTCGACCGGGGTGCGCGG 840
L D A A G T A D S L H R R A V D A G A R
GTCGACGGGCCCGGTGCGGCCGCCCTGGGGACGGTCCGAATTCGTGATCACGCTGCCG 900
V D G P P V R R P W G R S E F V I T L P
GAAGGCCATGAACTGACCGTGTCCGCTCCTGTCTGACCGAGCGCCCCCGCCCGATCAAG 960
E G H E L T V S A P V ***

```

図 2. *blmB* 遺伝子の塩基配列および推定されるアミノ酸配列

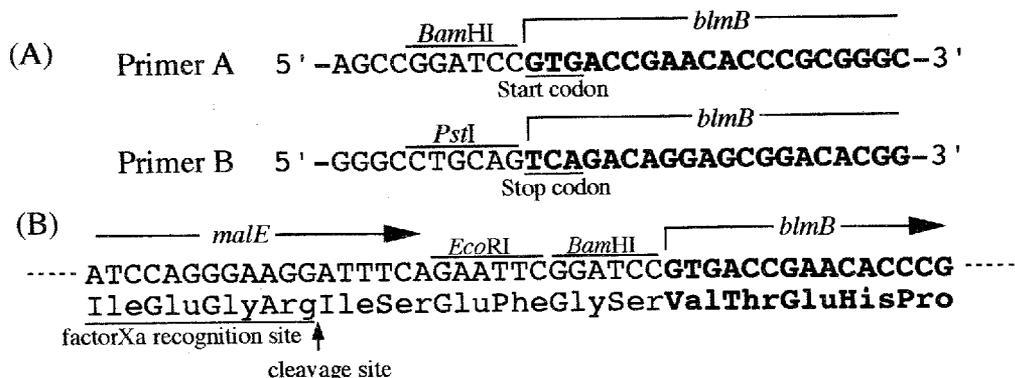
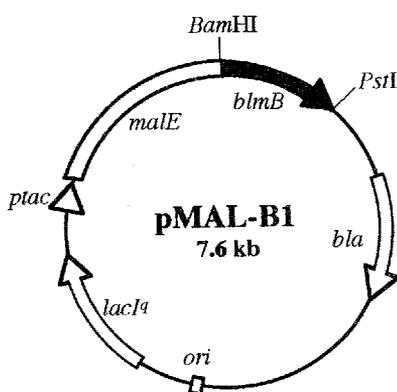


図 3. (A) *blmB* 構造遺伝子の増幅のための PCR プライマー  
(B) *malE* と *blmB* の連結部の塩基配列およびそのアミノ酸配列

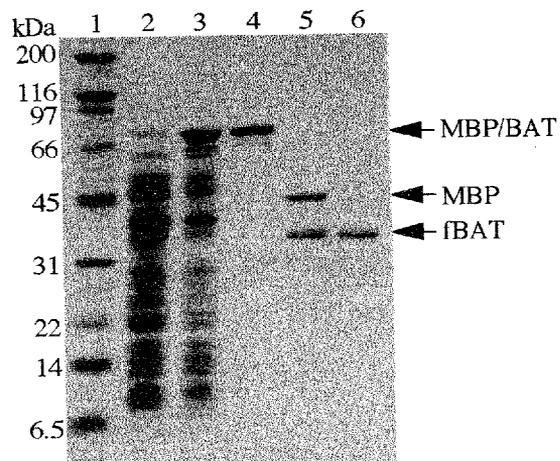
pMAL-B1 を持つ大腸菌 TB1 [pMAL-B1] を isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 存在下で培養すると、約 80 kDa の MBP/BAT が大量に発現した (図 5, lane 3)。また、大腸菌 TB1 [pMAL-B1] を Bm 1,000  $\mu$ g/ml を含む LB 培地で培養しても旺盛な増殖が認められたことから、融合蛋白質として発現した BAT には Bm 不活化能が維持されていることが分かった。さらに、Bm に対するアセチル化活性を調べたところ、確かに MBP/BAT は Bm をアセチル化していた。

MBP/BAT の精製は amylose をリガンドとしたアフィニティーカラムを用いて行った。無細胞抽出液中の MBP/BAT を amylose カラム ( $\phi$  1.0  $\times$  10 cm, New England BioLabs) に吸着後、10 mM の maltose を含む column buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA  $\cdot$  2Na and 10 mM 2-mercaptoethanol] で融合蛋白質を溶出した。得られた融合蛋白質を factor Xa プロテアーゼで MBP と BAT に切断した。切断された MBP と BAT の混合物からの BAT の精製は、Resource Q イオン交換カラム ( $\phi$  0.64  $\times$  3 cm, Pharmacia) を用いて行った。この方法で、BAT を単一蛋白質として精製することに成功した (図 5, lane 6)。精製した BAT の N-末端アミノ酸シーケンスを行ったところ、N-末端から 10 アミノ酸は Ile-Ser-Glu-Phe-Gly-Ser-Val-Thr-Glu-His であった。付加された 6 残基を除いては *blmB* の塩基配列から予想されるものと一致した。この融合蛋白質より精製した BAT を fusion 蛋白質由来の BAT という意味で fBAT と命名した。また、fBAT の Bm アセチル化活性を測定したところ、N-末端に 6 アミノ酸残基が付加されているにもかかわらず、Bm アセチル化活性を有することが分かった。



ori ; replication origin  
*bla* ;  $\beta$ -lactamase gene  
*ptac* ; *tac* promoter  
*lacIq* ; Lac repressor gene

図 4. プラスミド pMAL-B1 の構造



lanes,

- 1; M.W. size maker
- 2; the cell-free extract from *E. coli* [pMAL-B1] (IPTG-)
- 3; the cell-free extract from *E. coli* [pMAL-B1] (IPTG+)
- 4; active fractions from amylose column
- 5; MBP/BAT cleaved with factor Xa protease
- 6; purified fBAT

図 5. 各精製段階における蛋白質の SDS-PAGE による解析

### 第三節 fBAT の物理化学的諸性質

第二節で、得られた fBAT の分子量は Tricine-SDS-PAGE [Schägger and Jagow, 1987] より 34,500、等電点はゲル等電点電気泳動 [O'Farrell, 1975] により 6.13 と求められた。これらの値は塩基配列から予想される fBAT の分子量 32,814 および等電点 6.17 とほぼ一致した。次に、10 mM sodium phosphate buffer 中における fBAT の Bm に対するアセチル化活性の pH 依存性を調べた結果、至適 pH は 6.0 であった (図 6)。また、fBAT の温度安定性を 10 mM Tris-HCl (pH 7.65) 中、各 10~50 °C で 10 分間インキュベート後の残存活性を調べることによって検討した。その結果、20 °C 以下では fBAT 活性は 100 % 残っていたが、40 °C ではその活性はほとんど失われた (図 7)。

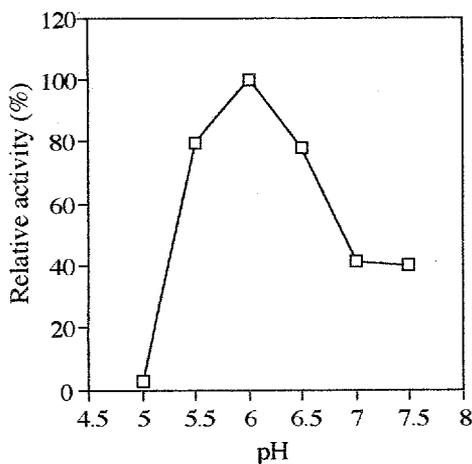


図 6. fBAT 活性に与える pH の影響  
10 mM sodium phosphate buffer  
を用いて測定した。

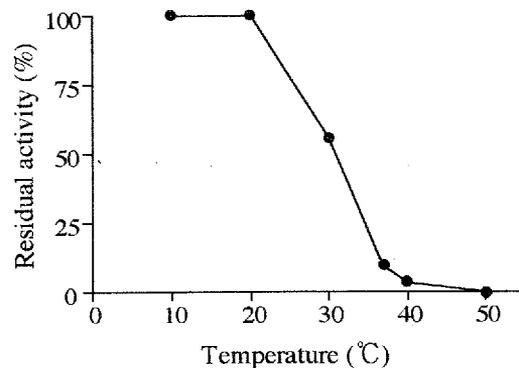


図 7. fBAT の温度安定性  
10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.65) 中各温度  
にて 10 分間放置後の残存活性を測定した。

### 第四節 fBAT 活性に与える金属イオンおよび阻害剤の影響

反応液に 1 mM の各金属イオンを加え、Bm アセチル化活性を測定することにより、fBAT 活性に与える金属イオンの影響を調べた。その結果、1 mM  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  および  $Ba^{2+}$  の添加は活性に影響しなかったが、 $Zn^{2+}$  の添加により fBAT 活性は完全に阻害された。次に、同様に阻害剤の添加によるアセチル化活性の影響を調べたところ、1 mM の *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) および 2-mercaptoethanol の添加は活性にほとんど影響を与えなかった (表 1)。

表 1. fBAT 活性に与える阻害剤および金属イオンの影響

Inhibitors or Metal ions	Concentration (mM)	Residual activity (%)
none	0	100
ethylenediaminetetraacetic acid	1.0	109
phenylmethylsulfonyl fluoride	1.0	94
<i>p</i> -chloromercuribenzoic acid	1.0	89
2-mercaptoethanol	1.0	94
Mg-acetate	1.0	98
MgCl <sub>2</sub>	1.0	106
MnCl <sub>2</sub>	1.0	107
CaCl <sub>2</sub>	1.0	99
BaCl <sub>2</sub>	1.0	99
ZnSO <sub>4</sub>	1.0	0

### 第五節 fBAT の基質特異性

Bm 系抗生物質の peplomycin (Pem), phleomycin-MOP (Phm-MOP), Phm mixture (SIGMA) および bleomycinic acid (Ba) (図 1, 化学構造) を基質とした際、fBAT によりアセチル化されるか否か調べた。その結果、Pem は Bm 同様にアセチル化されたが、Phm mixture, Phm-MOP および Ba については全くアセチル化されなかった。また、aminoglycoside 系抗生物質であり aminoglycoside acetyltransferase によりアセチル化される gentamicin (Gm) と Km および Abk は、fBAT の基質とはならなかった (表 2)。次に、fBAT の BmA<sub>2</sub> sulfate を基質とした時のミカエリス定数および最大反応速度を Lineweaver-Burk プロットから求めた。それぞれ、 $K_m=13.0 \mu\text{M}$ ,  $V_{\max}=3.4 \text{ nmol/min/ml}$  であった (図 8)。

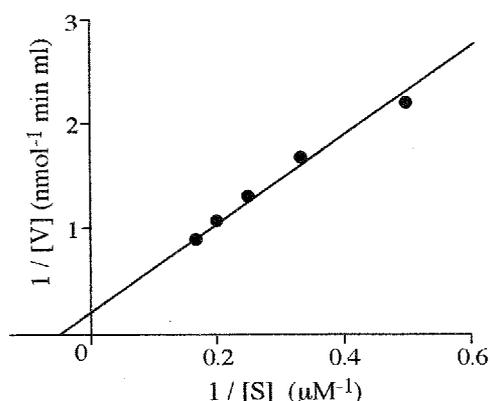


図 8. BmA<sub>2</sub> を基質としたときの Lineweaver-Burk プロット解析

BmA<sub>2</sub> (2, 3, 4, 5, 6  $\mu\text{M}$ ), [<sup>14</sup>C] AcCoA (98  $\mu\text{M}$ ) およ  
び fBAT (0.84  $\mu\text{g}$ ) を 10 mM Tris-HCl (pH 7.65) 中 37°C  
にて 10 分間反応後、放射活性を測定した。

表 2. fBAT の基質特異性

substrate	acetylation
bleomycin A <sub>2</sub>	+
peplomycin	+
bleomycinic acid	—
phleomycin-MOP	—
phleomycin (mixture)	—
kanamycin	—
gentamicin	—
arbakacin	—

+ ; アセチル化される  
— ; アセチル化されない

## 第六節 抗BATモノクローナル抗体の作製および精製

精製したMBP/BATにてマウスに免疫し、得られた抗体の中からfBATを特異的に認識する抗体を選択する方法を用いた。MBP/BATをBALB/cマウスに免疫した。39日目にそのマウスより脾細胞を摘出しマウスミエローマ細胞P3/X63-Ag-8.U1株と融合させた。抗体を生産するハイブリドーマの中からMBP/BAT, fBATおよびMBPを用いたenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法により、fBATを特異的に認識する抗体を生産している細胞をスクリーニングした。このクローンの一つが産生する抗体を923-2と命名し、培養上清からammonium sulfate分別沈殿、Protein A-セルロファイナカラムにより精製した。精製した抗体の抗原特異性を調べるためにELISAおよびウエスタン解析を行った結果、本抗体は、MBP/BATおよびfBATには結合するがMBPには全く反応しなかった(図9)。

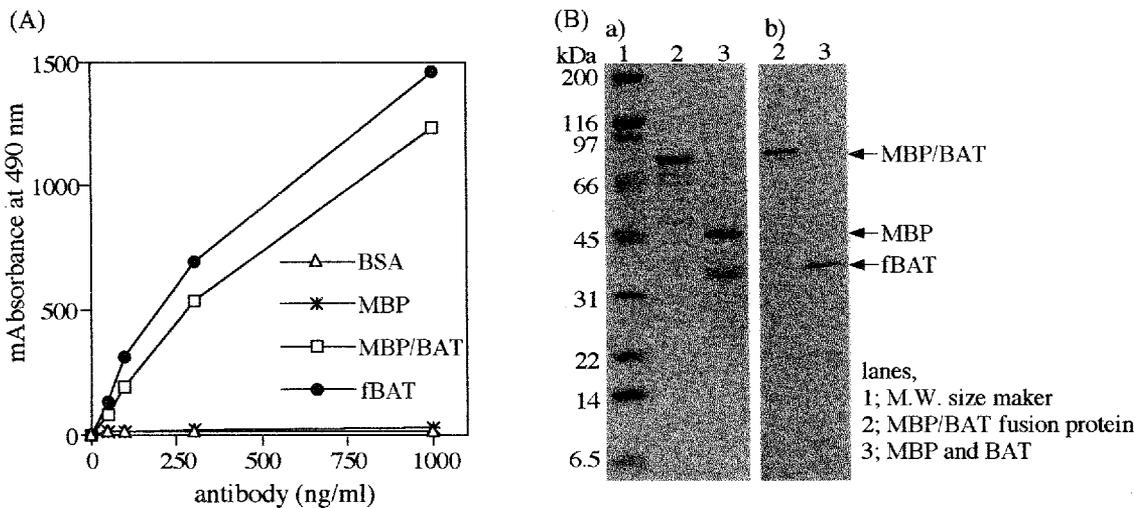


図9. 抗BATモノクローナル抗体923-2の抗原特異性  
 (A) ELISA法による解析  
 (B) ウエスタン法による解析  
 a) SDS-PAGE b) ウエスタン解析

## 第七節 放線菌において発現しているBATのN-末端アミノ酸構造

*blmB*を保有する放線菌*S. lividans* [pMSA-4]の無細胞抽出液よりBATの精製を試みた。*S. lividans* [pMSA-4]の無細胞抽出液からのBATの精製は、第六節で作製した923-2抗体を固定したアフィニティーカラムを用いて行った。抗BAT抗体カラムは、Schneiderらの方法 [Schneider *et al.*, 1982]によって抗BAT抗体923-2をProtein A Sepharose ビーズ (Pharmacia)に固定し、作製した。*S. lividans* [pMSA-4]の無細胞抽出液から

胞抽出液を ammonium sulfate 80 % 飽和で沈殿させることで濃縮した。これを DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia) カラムにかけ、0 ~ 1 M NaCl のグラジエントで溶出させた。活性のあるフラクションを抗体カラムに通し BAT を結合させた。最初、100 mM Tris-glycine buffer (pH 2.5) にて溶出させようと試みたが、結合力が強く溶出されなかった。そこで、溶出液として 1 % SDS を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用い溶出した。この方法で、BAT を単一蛋白質として得ることに成功した (図 10-A)。得られた BAT の N-末端アミノ酸配列を解析した結果、N-末端から 10 アミノ酸残基の配列は、Thr-Glu-His-Pro-Arg-Ala-His-Thr-Ala-His であった。これは、塩基配列から予想されるアミノ酸配列の N-末端の Met を除いたものと完全に一致した (図 10-B)。すなわち、放線菌では N-末端の Met は翻訳後切除されることが明らかとなった。

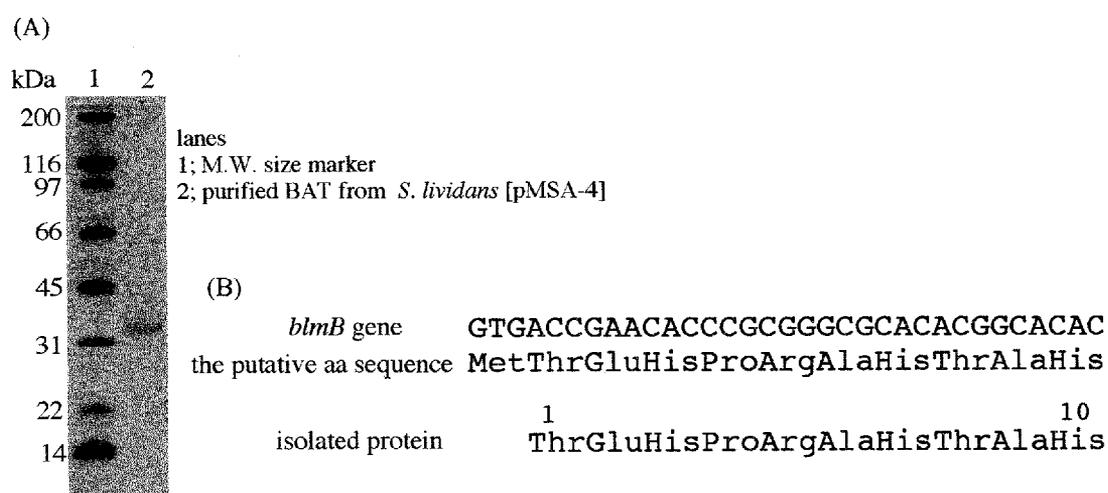


図 10. 放線菌 *S. lividans* [pMSA-4] より単離精製された BAT  
(A) SDS-PAGE 解析 (B) N-末端アミノ酸シーケンス

#### 第八節 Bm 生産菌における Bm の生産と自己耐性遺伝子の発現時期の相関性

Bm 生産菌 *S. verticillus* における Bm の生産と二種類の自己耐性遺伝子、*blmA* および *blmB* の発現時期を調べた。Bm の生産は *Bacillus (B.) subtilis* を被検菌としたバイオアッセイ法で求め、自己耐性遺伝子の発現は第六節において作製した抗 BAT モノクローナル抗体および既に取得した抗 BLMA モノクローナル抗体を用いたウエスタン解析法により検出した。その結果、*blmA* および *blmB* 両耐性遺伝子は、培養開始 36 時間後の対数増殖期後期に Bm の生産が開始されると同時に発現していることが分かった (図 11)。

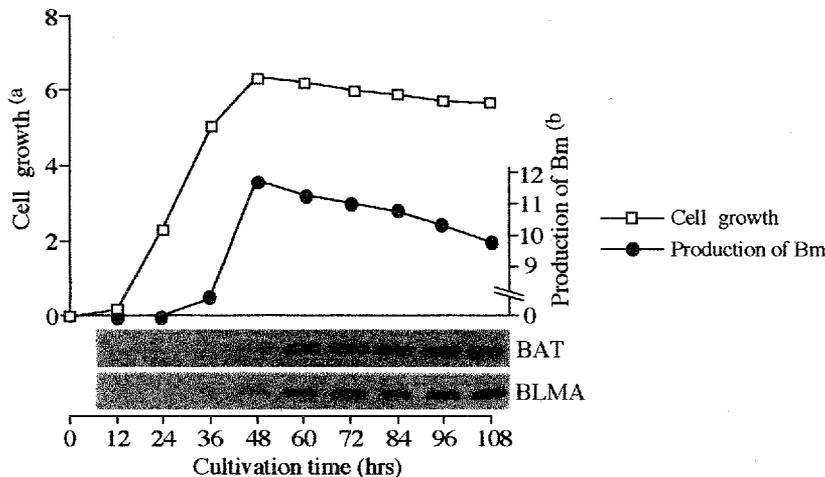


図 11. Bm 生産菌 *S. verticillus* における抗生物質生産と自己耐性遺伝子の発現  
 Bm の生産量は培養上清を *B. subtilis* 孢子寒天プレート上においたカップに 200  $\mu$ l 注入し、37  $^{\circ}$ C にて培養後、阻止円の直径を測定することにより求めた。BLMA および BAT の発現は、モノクローナル抗体を用いたウエスタン解析により検出した。  
 a) Packed cell volume (%), b) Inhibition zone diameter (mm)

## 第九節 考察

本研究では、Bm 生産菌 *S. verticillus* ATCC15003 が産生する BAT を MBP との融合蛋白質として大腸菌にて大量発現させることに成功した。大量発現させた MBP/BAT より単一蛋白質として精製した fBAT は N-末端に 6 個のアミノ酸が付加されているにもかかわらず、Bm アセチル化能を有していた。fBAT の活性は、チオール酵素阻害物質である PCMB、セリン酵素阻害剤である PMSF、金属イオンキレート剤 EDTA および 2-mercaptoethanol の添加によりほとんど影響を受けなかった (表 1)。これらの結果から、fBAT の触媒部位にはセリンおよびシステイン残基は存在せず、活性には金属イオンを必要としないことが示唆された。また、 $Zn^{2+}$  により酵素活性が完全に阻害されたことは、 $Zn^{2+}$  が fBAT に結合することにより、fBAT の立体構造が変化したためであると推測される。本酵素は、10 mM Tris-HCl (pH 7.65) 中 37  $^{\circ}$ C にて 10 分間放置することにより 80% 以上の活性が失われたので、かなり熱に対して不安定であると考えられる (図 7)。しかし、本酵素を大腸菌において生産させたときの培養温度は 37  $^{\circ}$ C であり、その状態では活性は保たれている。今回の温度安定性の実験は、基質が存在しない状態での温度安定性である。実際、基質である AcCoA を共存させて 37  $^{\circ}$ C にて 10 分放置した場合、本酵素活性は確かに保たれていた (data not shown)。これと同様に、AcCoA 存在下では蛋白質が安定に保たれるという現象がヒトの Histone acetyltransferase において報告されている [Herrera et al., 1997]。fBAT は Pem を基

質とするが、Bm の bithiazole 環の一つが還元型になっている Phm および Bm の N-末端アミン側鎖をもたない Ba を基質としなかった (表 2)。この結果より、BAT の Bm に対する基質特異性は高く ( $K_m = 13 \mu\text{M}$ )、基質の認識または結合に N-末端アミン側鎖部分が関与していると示唆された。

MBP/BAT をマウスに免疫して作製した抗 BAT モノクローナル抗体 923-2 は、BAT に対する認識特異性が高いことが分かった (図 9)。この抗体を用いて Bm 生産菌 *S. verticillus* ATCC15003 において、*blmA* および *blmB* 両耐性遺伝子は対数増殖期後期に Bm の生産が開始されるのと同時に発現していることを明らかにした (図 11)。一般的に抗生物質の生合成と自己耐性に関わる遺伝子はクラスターを形成しておりその発現は同時に調節されている [Motamedi and Hutchinson, 1987; Chater and Bruton, 1985]。すなわち、自己生産抗生物質の生産が始まるのと同時に、それによるダメージを受けないために耐性遺伝子が発現する。Bm 生産菌において Bm の生産と自己耐性遺伝子の発現が同時期に始まることから、Bm 生合成遺伝子と自己耐性遺伝子がクラスターを形成し、同時に発現調節を受けているものと示唆された。

Bm 生産菌は BLMA と BAT の二つの耐性因子を持っているが、BLMA は Bm と 1 : 1 のモル比で結合し Bm を不活化するため Bm の不活化効率是非常に悪い。また、BLMA 存在下でも BAT は Bm をアセチル化できるという結果も得られている (data not shown)。これらのことから、Bm 生産菌における Bm に対する自己耐性には BAT が優位に働いていると考えられる。では、なぜ Bm 生産菌が BLMA を産生しているのだろうか？ *blmA* を導入した大腸菌において Bm が  $\beta$ -lactamase 遺伝子の発現を誘導する現象が報告されている [Yuasa *et al.*, 1995] ことから、BLMA は自己耐性因子としての機能以外の機能、例えば遺伝子の発現調節などを備えていると考えられている。また、筆者は Bm 生産菌である *S. verticillus* の菌体と不活化型の N-acetyl Bm とをインキュベートすると Bm の抗菌活性が回復するという現象も見出している (data not shown)。この現象は、*S. verticillus* が N-acetyl Bm deacetylase を産生していることを示唆する。Bm 生合成においても序章で述べたように、アセチル化された不活化型の前駆体として生合成され菌体外に分泌される際、アセチル基が加水分解されて活性型 Bm に変換される生合成経路をとっている可能性が十分考えられる。

抗生物質生産菌が自己耐性因子として持っているアセチル化酵素遺伝子のほとんどがアミノ基をアセチル化する酵素であり、Km 生産菌 *S. kanamyceticus* [Nakano *et al.*, 1984]、neomycin 生産菌 *S. fradiae* [Salauze *et al.*, 1991]、Pm 生産菌 *S. alboniger* [Lacalle *et al.*, 1989]、Bs 生産菌 *Streptoverticillum* sp. [Perez-Gonzalez *et al.*, 1990]、nourseothricin 生産菌 *S. noursei* [Krügel *et al.*, 1993]、phosphinothricin 生産菌 *S. viridochromogenes* [Wohlleben *et al.*, 1988] などからクローニングされ遺

伝子レベルで解析されているが、蛋白質レベルでの解析はあまり進んでいない。それに対して、大腸菌のプラスミドからクローニングされた Cp の水酸基をアセチル化する酵素、Cp acetyltransferase (CAT)、の研究はかなり進んでいる。CAT はすでに結晶化が行われ、その立体構造およびアセチル化の分子機構が明らかにされている [Leslie, 1990]。本研究で BAT を大腸菌において大量に発現させ取得する系を確立したので、今後、BAT を結晶化し X 線結晶構造解析によりその立体構造を明らかにすることにより、Bm アセチル化の分子機構の解明が期待される。

## 【第二章】

### Blasticidin S 生産菌の産生する Puromycin 不活化酵素 —その精製および酵素学的諸性質—

#### 第一節 緒言

puromycin (Pm) (図 12) は、*S. alboniger* により生産される aminonucleoside 系抗生物質であり、微生物や真核細胞の蛋白質合成を阻害しその増殖を抑制する [Porter *et al.*, 1952; Jardetzky, 1963]。その作用メカニズムは、Pm の構造が蛋白質合成の中間体である aminoacyl-tRNA のアミノ酸末端に類似しているため、リボソームにおいて aminoacyl-tRNA の代わりに Pm が合成途中のペプチド鎖と結合することに起因する。つまり、Pm が結合したペプチド鎖は、もはやリボソームに結合できなくなる結果、蛋白質の合成が阻害されるのである [Cerna *et al.*, 1969; Harris *et al.*, 1971]。Pm 生産菌 *S. alboniger* は自己耐性因子として Pm アセチル化酵素を持っている [Paik *et al.*, 1985]。本酵素は AcCoA 存在下で Pm の O-methyl-L-tyrosine 残基のアミノ基をアセチル化する [Vara *et al.*, 1985]。

Pm と同じ aminonucleoside 系抗生物質である blasticidin S (Bs) (図 12) は、*S. morookaensis* によって生産され、微生物や真核細胞の増殖を阻害する [Yamaguchi *et al.*, 1965]。Bs は Pm と同様に蛋白質合成過程のペプチド伸長反応を阻害するが、その作用メカニズムは Pm と少し異なっており、Bs はペプチド転移酵素を阻害する [Yamaguchi and Tanaka, 1966; Sikorski *et al.*, 1977]。Sugiyama らは、Bs 生産菌 *S. morookaensis* JCM4673 が菌体内に自己耐性因子として Bs アセチル化酵素を持っており、AcCoA 存在下で Bs をアセチル化して不活化することを明らかにした。さらに興味深いことに、Pm 生産菌 *S. alboniger* の無細胞抽出液と Pm をインキュベートしたとき、AcCoA 存在下でのみ Pm を不活化できるのに対して、*S. morookaensis* の無細胞抽出液は AcCoA 非存在下でも Pm を不活化できることを見出した。すなわち、Bs 生産菌は自己耐性因子として Bs アセチル化酵素を保有しているが、それとは異なった機構で Pm を不活化する酵素を産生しているのである。実際に、精製した Bs アセチル化酵素は Pm を基質としないことが明らかにされた [Sugiyama *et al.*, 1986]。

本研究では、Bs 生産菌 *S. morookaensis* が産生する Pm 不活化酵素の機能を、Pm の不活化産物の化学構造を決定することにより明らかにした。さらに、*S. morookaensis* より本不活化酵素を精製し、その酵素学的諸性質を調べた。

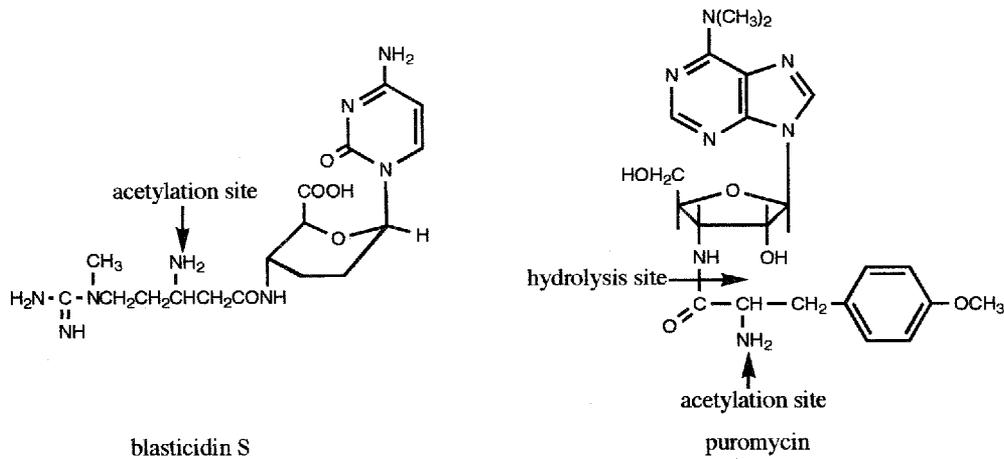


図 12. プラスティシジン S およびピューロマイシンの構造

## 第二節 *S. morookaensis* における Pm 不活化酵素の産生時期

まず、*S. morookaensis* の Pm 不活化酵素の産生時期を調べた。*S. morookaensis* を YEME 培地で 30℃ にて培養し 24 時間おきに菌体を集め、その無細胞抽出液の Pm 不活化酵素活性を *B. cereus* を被検菌としたバイオアッセイ法により測定した。この結果、Pm 不活化酵素の発現は培養開始 24 時間後の対数増殖期後期から始まり、96 時間で最大となりその後徐々に減少していくことが分かった (図 13)。

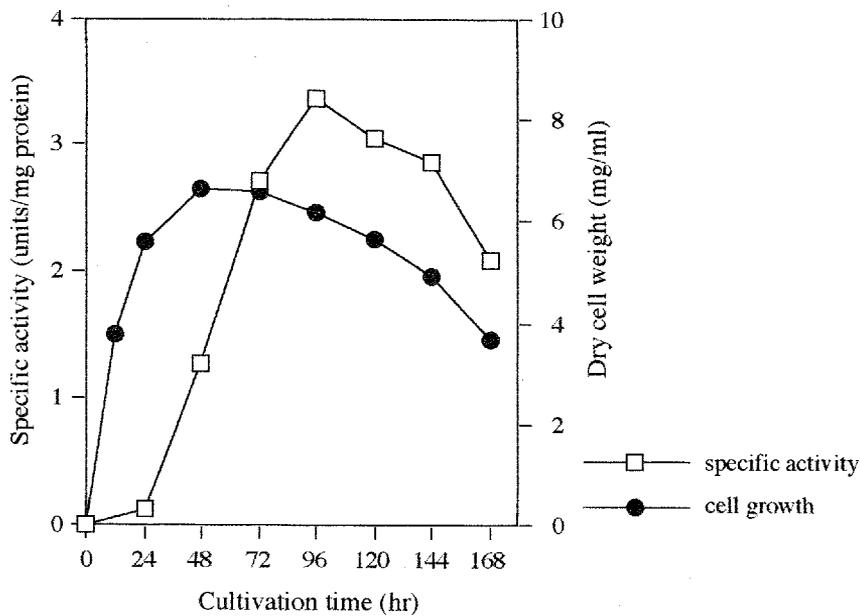


図 13. *S. morookaensis* における Pm 不活化酵素の産生時期

### 第三節 Pm 不活化酵素の機能

Pm を *S. morookaensis* の無細胞抽出液とインキュベートした後、Pm の不活化産物を TLC により分析すると、Rf 値 0.41 と 0.27 の位置に 2 つのスポットが得られることから Pm が加水分解されていると考えた。Pm 分子内に存在する puromycin aminonucleoside (PmAn) と *O*-methyl-L-tyrosine (*O*-Me-Tyr) (図 14) との間のペプチド結合が最も加水分解される可能性が高いと予想されたので、それぞれの標品を SIGMA 社より購入しそれらと共に TLC を行った。その結果、Pm 不活化産物の Rf 値はそれらの標品と一致した (図 15)。

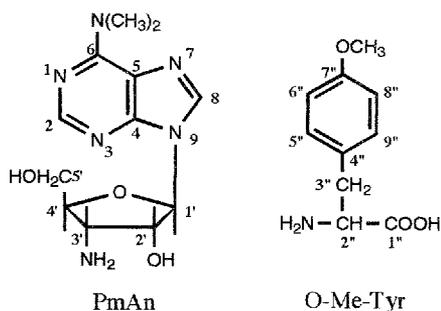


図 14. PmAn および O-Me-Tyr の構造

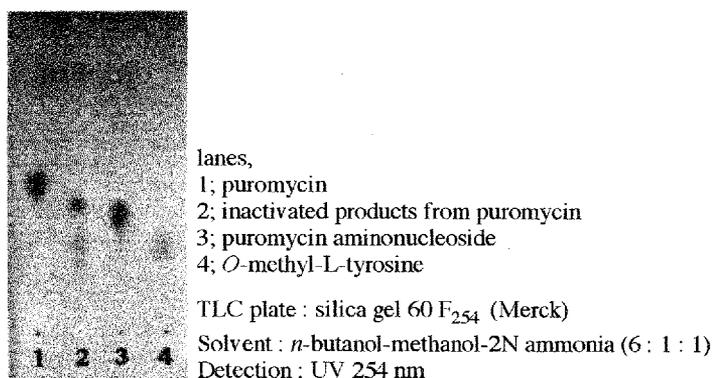


図 15. Pm 不活化産物の TLC による解析

さらに、Pm の不活化産物および標品を逆相 ODS カラム (Wakosil 5C18-200T, Wako Pure Chemical) を用いた HPLC により分析した (図 16)。Pm の 2 個の不活化産物 (ピーク A および C) の保持時間は、それぞれ標品の PmAn (ピーク A) および *O*-Me-Tyr (ピーク C) 保持時間と一致した。なお、ピーク B は、未反応の Pm である。これらの結果から、Pm 不活化産物 A は PmAn、C は *O*-Me-Tyr であると示唆された。さらに、HPLC によりこれらの不活化産物のピークを分取し精製した。ピーク A およびピーク C から精製した化合物をそれぞれ、不活化産物 A および不活化産物 C と命名した。

次に、精製した不活化産物 A および不活化産物 C の構造をそれぞれ PmAn および *O*-Me-Tyr と比較することによる同定を試みた。まず、fast atom bombardment イオン化法によるマススペクトル (FAB-MS) を測定した結果、不活化産物 A および不活化産物 C の分子イオンピーク ( $[M+H]^+$ ) はそれぞれ  $m/z$  295 および 196 であった。それらは、PmAn および *O*-Me-Tyr の分子イオンピークと一致した。また、フラグメンテーションパターンもそれぞれの標品と一致した (data not shown)。次に、不活化産物 A および不活化産物 C とそれぞれの標品の  $^1\text{H-NMR}$  を重水中 pD 3.0 において測定し

た。その結果、ケミカルシフトおよびカップリング定数はそれぞれの標品の値と一致した (表 3)。さらに、不活化産物 A および不活化産物 C の比旋光度、UV 吸収スペクトルもそれぞれ PmAn および O-Me-Tyr と一致した (data not shown)。これらの結果から、不活化産物 A は PmAn、不活化産物 C は O-Me-Tyr であると同定した。すなわち、*S. morookaensis* が産生している Pm 不活化酵素は Pm 分子の PmAn と O-Me-Tyr 間のアミド結合を加水分解する酵素であることが分かった。

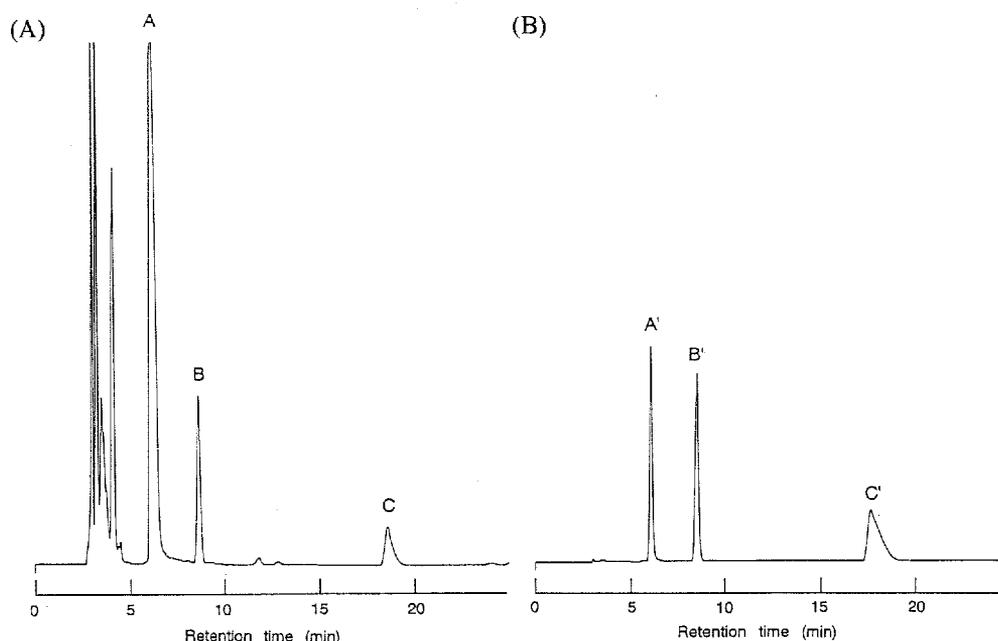


図 16. Pm 不活化産物の HPLC による解析

(A) Pm 不活化産物

(B) Pm, PmAn および O-Me-Tyr の標品, ピーク A'; PmAn, B'; Pm, C'; O-Me-Tyr

条件: Column; Wakosil 5C-18-200T ( $\phi$  4.6×250 mm, Wako Pure Chemical),

Flow rate; 1.0 ml/min, Mobile phase; acetonitril : 0.1 % trifluoroacetic acid (6 : 94)

Column temperature; 45°C, Detection; UV260 nm

表 3. Pm 不活化産物 (A, C) と標品 (PmAn, O-Me-Tyr) の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルの比較

Position	Substance A	PmAn	Substance C	O-Me-Tyr
2	8.20 s *	8.31 s		
8	8.32 s	8.42 s		
1'	6.16 d (4.6)	6.21 d (3.9)		
2'	5.05 dd (4.6, 6.8)	5.04 dd (3.9, 6.6)		
3'	4.22 dd (6.1, 6.8)	4.23 dd (6.3, 6.6)		
4'	4.55 ddd (2.9, 3.7, 6.1)	4.51 ddd (2.9, 3.7, 6.3)		
5'	4.01 dd (2.9, 12.9)	3.97 dd (2.9, 12.9)		
	3.89 dd (3.7, 12.9)	3.85 dd (3.7, 12.9)		
6-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3.45 br s	3.56 br s		
2''			3.97 dd (5.1, 7.8)	4.08 dd (5.4, 7.6)
3''			3.22 dd (5.1, 14.6)	3.25 dd (5.4, 14.6)
			3.07 dd (7.8, 14.6)	3.11 dd (7.6, 14.6)
5'', 9''			7.24 d (8.8)	7.26 d (8.8)
6'', 8''			6.99 d (8.8)	7.01 d (8.8)
7''-OCH <sub>3</sub>			3.82 s	3.83 s

\*  $\delta_{\text{H}}$ , multiplicity, coupling constants (Hz)

#### 第四節 Pm 加水分解酵素の精製

*S. morookaensis* を YEME 培地 12 L で 30 °C にて 4 日間培養し、無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液に最終濃度 0.9 M となるよう固形の ammonium sulfate を加え 30 分間攪拌した。30,000×*g* にて 30 分間の遠心により得られた上清を Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia) 疎水性クロマトグラフィーカラムにかけ、0.9~0 M ammonium sulfate のリニアグラジエントにて溶出した。次に、活性画分を DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia) イオン交換カラムにかけ、0~1.0 M NaCl のリニアグラジエントで溶出した。得られた活性画分を Ether-Toyopearl 650 (TOSOH) 疎水性クロマトグラフィーカラムにかけ、1.4~1.2 M ammonium sulfate のリニアグラジエントで溶出させた。次に、活性画分を濃縮後、Fractogel EMD DEAE-650 (Merck) イオン交換カラムにかけ、0.15~0.35 M NaCl のリニアグラジエントで溶出した。活性画分を濃縮し、最後に、Toyopearl HW-55 (TOSOH) ゲル濾過カラムにかけた。これらのカラムの中で、疎水性クロマトグラフィーの Ether-Toyopearl 650 カラムが精製にかなり有効であることが分かった。これらの結果、Pm 加水分解酵素は無細胞抽出液より 28 % の回収率で 307 倍に精製され、単一蛋白質として得ることに成功した (表 4, 図 17)。

表 4. Pm 加水分解酵素の精製

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Activity yield (%)
Cell-free extract	6394	172	0.03	1.0	100
Phenyl-Sepharose CL-4B	528	146	0.28	9.3	85
DEAE-Sepharose CL-6B	169	125	0.74	24.7	73
Ether-Toyopearl 650	24.9	94.3	3.79	126	55
Fractogel EMD DEAE-650	14.4	80.1	5.56	185	47
Toyopearl HW-55	5.2	47.9	9.21	307	28

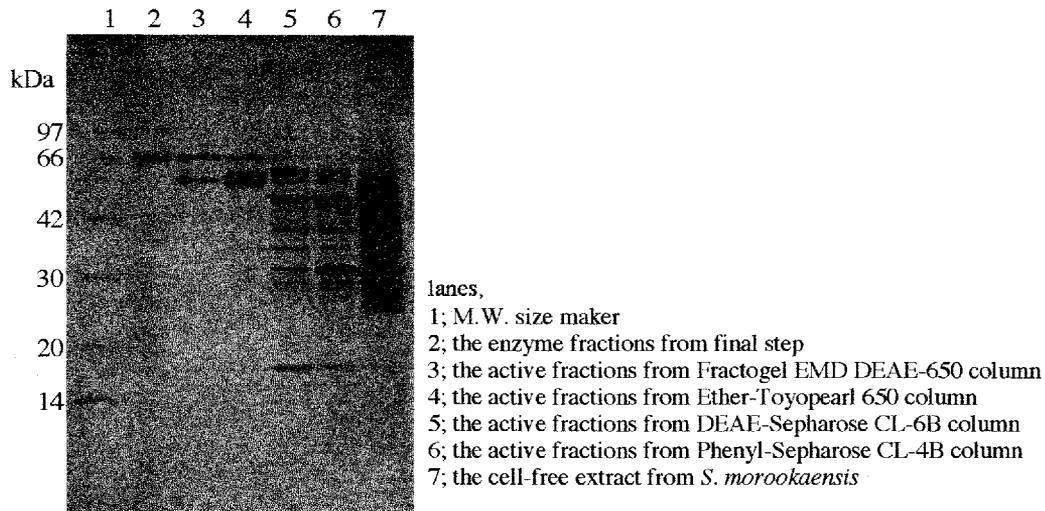


図 17. 各精製段階におけるタンパク質の SDS-PAGE による解析

### 第五節 Pm 加水分解酵素の諸性質

得られた Pm 加水分解酵素の分子量は SDS-PAGE より 68 kDa、Toyopearl HW-55 カラムによるゲル濾過より 66 kDa と求められた。ゲル等電点電気泳動から等電点は 6.4 と求められた。本酵素の pH 依存性を sodium phosphate buffer、Tris-HCl buffer および sodium carbonate buffer を用いて調べた結果、至適 pH は 8.0 であった (図 18)。次に、本酵素反応の至適温度を調べた結果、至適温度は 45 °C であった (図 19)。また、温度安定性を 50 mM Tris-HCl (pH 7.65) 中、15~60 °C にて 15 分間インキュベート後の残存活性を調べることによって検討した。その結果、45 °C 以下では 80 % 以上の活性が残っていたが、55 °C ではその活性は完全に失われた (図 20)。

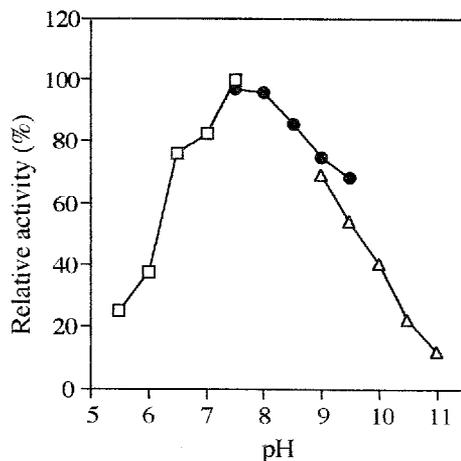


図 18. Pm 加水分解酵素活性に与える pH の影響  
 20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5~7.5)  
 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5~9.5)  
 20 mM sodium carbonate buffer (pH 9.0~11)

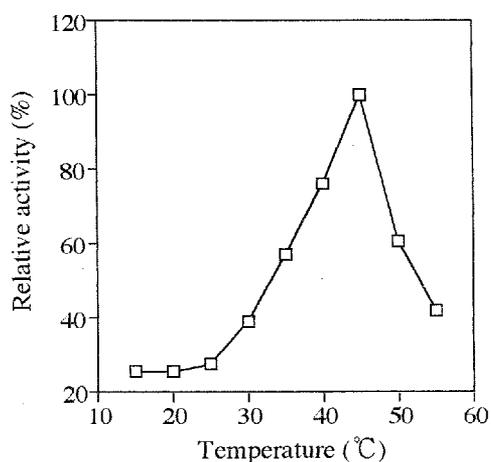


図 19. Pm 加水分解酵素活性に対する温度の影響

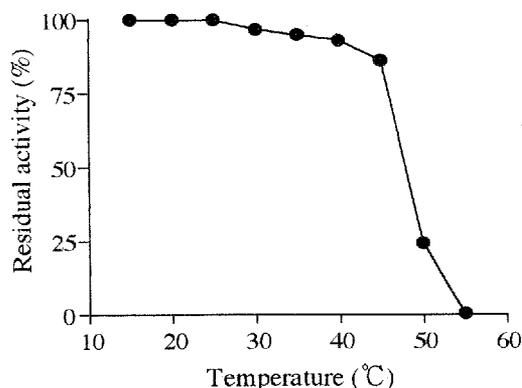


図 20. Pm 加水分解酵素の温度安定性  
50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.65) 中各温度にて 15 分間放置後の残存活性を測定した。

#### 第六節 Pm 加水分解酵素活性に与える金属イオンおよび阻害剤の影響

Pm 加水分解酵素の活性測定反応液に各 1 mM の金属イオンを加えて酵素活性を測定した。その結果、 $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  および  $Hg^{2+}$  の添加によって酵素活性はほぼ完全に阻害され、また、 $Co^{2+}$  の添加により 85% ほど阻害された (表 5)。次に、1 mM の各阻害剤と Pm 加水分解酵素を 37 °C にて 10 分間インキュベート後、活性測定を行った。その結果、*N*-bromosuccinimide および *N*-ethylmaleimide の添加によって完全に阻害され、iodoacetic acid、PCMB、PMSF および diisopropyl fluorophosphate (DIFP) の添加によりわずかに阻害された。EDTA および *o*-phenanthroline の添加は酵素活性にほとんど影響しなかった。また、dithiothreitol (DTT) の添加により酵素活性が 38% ほど上昇した (表 6)。

表 5. Pm 加水分解酵素活性に与える金属イオンの影響

Metal ions	Concentration (mM)	Residual activity (%)
None	0	100
MnCl <sub>2</sub>	1.0	104
CaCl <sub>2</sub>	1.0	103
BaCl <sub>2</sub>	1.0	98
MgCl <sub>2</sub>	1.0	97
CoCl <sub>2</sub>	1.0	15
HgCl <sub>2</sub>	1.0	6
CuCl <sub>2</sub>	1.0	5
FeCl <sub>2</sub>	1.0	3
ZnCl <sub>2</sub>	1.0	0

表 6. Pm 加水分解酵素活性に与える阻害剤の影響

Inhibitors	Concentration (mM)	Residual activity (%)
none	0	100
ethylenediaminetetraacetic acid	1.0	100
	10.0	93
<i>O</i> -phenanthroline	1.0	95
dithiothreitol	1.0	138
iodoacetic acid	1.0	86
<i>p</i> -chloromercuribenzoic acid	1.0	66
phenylmethylsulfonyl fluoride	1.0	57
diisopropyl fluorophosphate	1.0	41
<i>N</i> -ethylmaleimide	1.0	21
<i>N</i> -bromosuccinimide	1.0	0

### 第七節 Pm 加水分解酵素の基質特異性

本酵素は加水分解酵素であることが明らかとなったので、蛋白質および分子内にアミド結合を持つ抗生物質を加水分解するか否か調べた。その結果、本酵素は casein, gelatin, bovine serum albumin, hemoglobin および ovalbumin などの蛋白質に対する加水分解活性は示さなかった。また、Bs, ampicillin, amoxicillin, Cp および viomycin を本酵素と 37 °C にてインキュベートした結果、その抗菌活性は失われなかった。

### 第八節 Pm 加水分解酵素の N-末端アミノ酸シーケンスおよびホモロジー検索

精製した Pm 加水分解酵素の N-末端アミノ酸配列を解析したところ、Val-Ser-Thr-Ala-Pro-Tyr-Gly-Ala-Trp-Gln-Ser-Pro-Ile-Asp までの 14 アミノ酸配列を決定することができた。この配列を Fasta program [Pearson and Lipman, 1988] を用いて蛋白質データベース (PIR, SWISS-PROT) との間でホモロジー検索を行った結果、Epstein-Barr virus の転写活性化因子である BZLF 1 蛋白質 [Schepers *et al.*, 1993] の一部と 57.1 % の相同性が認められた。しかし、他の加水分解酵素との相同性は認められなかった。

### 第九節 考察

本研究において Bs 生産菌 *S. morookaensis* が菌体内に、Pm を不活化する酵素を生産していること明らかにした。さらにその酵素により不活化された産物を精製し構造

を決定した。その結果、本酵素は Pm 分子内の PmAn と O-Me-Tyr 間のアミド結合を加水分解することにより Pm を不活化すること明らかにした。S. morookaensis の無細胞抽出液より Pm 加水分解酵素を単一蛋白質として精製することに成功した (図 17)。本酵素の分子量は SDS-PAGE より 68 kDa、ゲル濾過より 66 kDa と求められことから、本酵素は単量体であると示唆された。本酵素は、DTT 存在下では安定であり、チオール基阻害剤である N-ethylmaleimide, PCMB, iodoacetic acid および重金属により阻害されたことから活性中心にシステイン残基が関与していると示唆された。また、トリプトファンの特異的修飾試薬である N-bromosuccinimide やセリン酵素阻害剤である PMSF および DIFP にも阻害されたことからトリプトファンやセリン残基が触媒部位に存在している可能性が高い。EDTA および o-phenanthroline の添加により本酵素活性は阻害されなかったことは、本酵素の活性には金属イオンは必要としないことを示唆する (表 5, 6)。本酵素の至適温度は 45 °C と求められたが、50 °C になると活性がおよそ 50 % まで減少している。これは本酵素は 45 °C までは安定であるが 50 °C になると急速に失活するためであると思われる (図 19, 20)。

抗生物質加水分解酵素は、ヒトを含む動物細胞が持ち、Bm のカルボキシアミド結合を加水分解する Bm hydrolase [Takeda *et al.*, 1996; Brömme *et al.*, 1996]、細菌が持ち β-ラクタム剤の β-ラクタム環を加水分解する β-lactamase [Rosdahl, 1973]、Cp 生産菌 S. venezuelae が自己耐性因子として産生する Cp 加水分解酵素 [Mosher *et al.*, 1990]、大腸菌が産生する Em esterase [Barthelemy *et al.*, 1984] などが報告されている。Bm hydrolase についての研究は盛んに行われており、本酵素は aminopeptidase が基質とする aminoacyl β-naphthylamide や aminoacyl p-nitroanilide を基質として認識し、チオール阻害剤により顕著に阻害されることから、活性中心がシステイン残基の aminopeptidase であることが明らかになっている [Nishimura *et al.*, 1989]。すなわち、本来 aminopeptidase として働いている酵素が Bm を基質として認識するのである。本研究で用いた Bs 生産菌が Pm 不活化酵素を産生する必然性は考えにくい。Bs 生産菌が持つ Pm 加水分解酵素も Bm hydrolase と同様に、aminopeptidase がたまたま Pm を基質として認識しているのかも知れない。Pm 加水分解酵素の N-末端 14 残基のアミノ酸配列は、Epstein-Barr virus の転写活性化因子である BZLF 1 蛋白質と相同性が認められたが、他の加水分解酵素との相同性は認められなかった。14 アミノ酸配列のみでは情報が少ないために相同性を検討するのは無理がある。今後、アミノ酸配列をさらに詳しく比較するためには本酵素をコードする DNA 塩基配列が必要であるため、現在 S. morookaensis の染色体 DNA より本酵素をコードする遺伝子のクローニングを試みている。

## 【第三章】

### D-Cycloserine 生産菌 *Streptomyces garyphalus* からの 自己耐性遺伝子のクローニングと遺伝子解析

#### 第一節 緒言

細菌の細胞壁の基本構造をなすペプチドグリカンには D-alanine (D-Ala) や D-glutamic acid などの D-アミノ酸が含まれており、これらの D-アミノ酸は細菌が増殖するために必須である。D-Ala はペプチドグリカン生合成の最初のステップとして、細胞質に存在する D-Ala racemase [Jurius *et al.*, 1970] によって L-Ala から合成される。次に、2 分子の D-Ala は D-Ala-D-Ala ligase によって D-Ala-D-Ala へと変換され、このジペプチドがペプチドグリカンの生合成に利用される [Neuhaus, 1962]。D-cycloserine (Cs) (図 21) は、その化学構造が D-Ala の構造と類似しているため、D-Ala racemase および D-Ala-D-Ala ligase 活性を競合的に阻害する結果、細菌の細胞壁合成を阻害し、死滅させる [Neuhaus and Lynch, 1964; Lambert and Neuhaus, 1972]。本抗生物質は、*S. garyphalus* により生産される抗生物質であり、臨床では結核菌感染症の治療に用いられている。Cs は新しい抗生物質をデザインする上で興味深い物質と言える。なぜなら、哺乳動物の細胞にはペプチドグリカンは存在せず、また、Ala racemase の存在も知られていないことから、Cs の細菌に対する選択毒性が高いうえに、Cs 耐性菌に関する問題はほとんどないからである。このように、Cs は感染症治療薬としては明らかに有効であるが、時に副作用として精神障害や神経障害などを引き起こす危険性があるために使用には注意が必要である。副作用の原因としては、Cs が脳神経の伝達に関与している N-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターに結合することで、その機能を亢進したり [Thompson *et al.*, 1992]、神経伝達物質である  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) の代謝・合成酵素を阻害したりすることに起因すると考えられている [Wood *et al.*, 1978]。

本研究においては、Cs 生産菌 *S. garyphalus* がいかなるメカニズムで自己の産生する Cs の致死的作用から生体防御しているかを解明することを目的とした。それに関して、*S. garyphalus* に Cs 耐性の Ala racemase の存在が示唆されている [Svensson and Gatenbeck, 1981]。しかしながら、それについての明瞭な結果は得られていないことから、まず、*S. garyphalus* 染色体 DNA からショットガンクロ

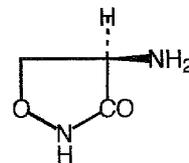


図 21. D-サイクロセリンの構造

ーニング法により Cs に対する自己耐性遺伝子のクローニングを行った。さらに、得られた Cs 耐性遺伝子の全塩基配列を決定後、その遺伝子産物の機能および諸性質について調べた。

## 第二節 Cs 生産菌 *S. garyphalus* 染色体 DNA からの自己耐性遺伝子のクローニング

まず、Cs 生産菌 *S. garyphalus* の染色体 DNA を *Bam*HI, *Bgl*II および *Sac*I を用い、それぞれ単独で消化した。それぞれの断片を放線菌用クローニングベクター pIJ702 を *Bgl*II または *Sac*I で消化したものに挿入し、宿主としての *S. lividans* 66 のプロトプラストに導入した。このプロトプラスト溶液を R5 再生培地にまき、31 °C にて 18 時間培養後、thiostrepton (Ts) 溶液 (100 µg/ml) を 1 ml 重層した。さらに 2 日間培養し、出現してきたコロニーを Cs 1,000 µg/ml を含む NB 寒天培地に移し、31 °C にて 96 時間培養した。ここで増殖したコロニーを Cs 耐性の形質転換体とした。その結果、*S. garyphalus* の染色体 DNA を *Bam*HI で消化し、*Bgl*II で消化した pIJ702 に挿入したものに Cs 耐性を示す形質転換体を得られた。この形質転換体よりプラスミド DNA を分離後、解析したところ、3.5 kb の DNA 断片が挿入されていることが分かった。このプラスミドを pKM3 と命名した。図 22 にはその制限酵素地図を示した。

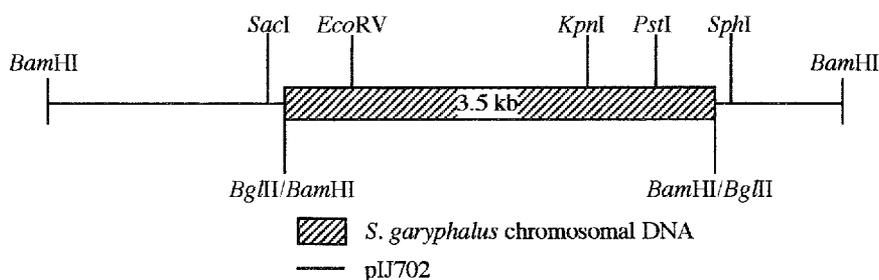


図 22. プラスミド pKM3 の制限酵素地図

## 第三節 クローニングした 3.5 kb DNA 断片の全塩基配列の決定

プラスミド pKM3 を *Sph*I および *Sac*I で二重消化することで、約 3.8 kb DNA 断片を切り出した。この DNA 断片の末端を T4 DNA polymerase で平滑化後、大腸菌のベクター pUC118 の *Sma*I サイトに挿入し、大腸菌 JM109 株に導入した。このとき、DNA 断片が逆方向に挿入された 2 種類のプラスミドが得られ、それらを p118CSR および p118CSRR と命名した。次に、これらのプラスミドを *Sph*I および *Bam*HI で二重消化し、Exonuclease III および Mung bean nuclease を作用させてプラスミドをデレーションした。デレーションプラスミドを大腸菌 JM109 株に導入後、約 200 bp ず

つ削れたデレーションプラスミドミュータントを取得した。得られたデレーションミュータントにヘルパーファージ M13KO7 を感染させて一本鎖 DNA を調製後、ジデオキシ法 [Sanger *et al.*, 1977] により、ALF II DNA 自動シーケンサー (Pharmacia) を用いて、全塩基配列 3,472 bp を決定した (図 23)。

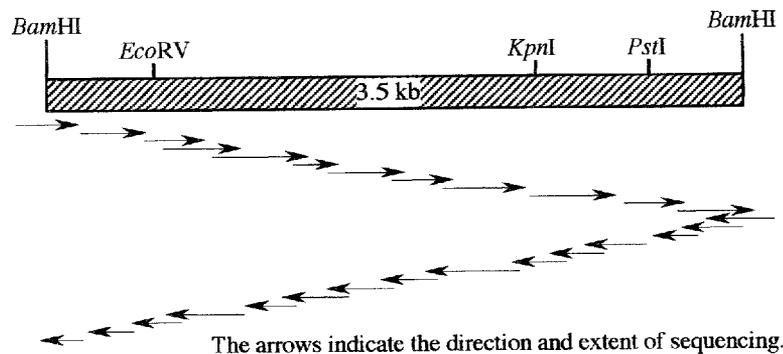


図 23. 3.5 kb BamHI-BamHI 断片の塩基配列決定法

#### 第四節 クローニングした 3.5 kb DNA 断片の遺伝子解析

一般的に、放線菌の染色体 DNA の GC 含量は約 70~75% と高く、その GC 含量に反映してアミノ酸を決定するコドンの第三番目の塩基の GC 含有率は 90% 以上となっている。この特徴を利用した Frame analysis program [Bibb *et al.*, 1984] を用いて Open reading frame (ORF) を予測した結果、4つの完全な ORF (B, C, D, E) に加えて、5' および 3' 末端にそれぞれ ORF の一部 (A, F) の存在が示唆された (図 24, 25)。Fasta program を用いて、それぞれの ORF および不完全 ORF の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を蛋白質データベース (PIR, SWISS-PROT) との間でホモロジー検索を行った。

ORFA をコードする *orfA* は、3' 末端側 246 bp がクローニングされており、その塩基配列から予想される 81 アミノ酸から成る蛋白質は、大腸菌の D-Ala-D-Ala ligase (DdlB) [Zawadzke *et al.*, 1991] の C-末端領域と 34.9% の相同性 [71 aa (アミノ酸) overlap] が認められた。一方、ORFB をコードする 903 bp の *orfB* は、*orfA* の終止コドンから 33 bp 下流に存在し、開始コドン ATG の上流には Ribosome binding site (RBS) と考えられる配列 (GGA) が存在していた。*orfB* の塩基配列から予想される 300 アミノ酸から成る蛋白質は、アミノ酸配列から予想される分子量が 31 kDa、等電点が 11.1 であった。本蛋白質は、ホモロジー検索の結果、大腸菌の fosmidomycin (Fm) 耐性遺伝子 (32.8%, identity, 134 aa overlap) [Fujisaki *et al.*, 1996]、*Erwinia chrysanthemi* の pecM protein (22.7%, identity, 278 aa overlap) [Reverchon *et al.*,

1994] との相同性が認められた。さらに、*orfC* および *orfD* は、他の遺伝子とは異なり逆方向に転写されている可能性が極めて高い。*orfC* は開始コドン GTG で始まり終止コドン TGA で終わる 357 bp の遺伝子であり、開始コドンの 11 bp 上流には RBS と考えられる配列 (GGAGG) が存在する。塩基配列より予想される 118 アミノ酸から成る蛋白質の予想分子量は 12 kDa、また、等電点は 5.8 であった。ORFC と高い相同性が認められる蛋白質は PIR および SWISS-PROT データベース中には存在しなかった。*orfD* は開始コドン ATG で始まり終止コドン TGA で終わる 606 bp の遺伝子であり、開始コドンの 12 bp 上流には RBS と考えられる配列 (GAG) が存在する。塩基配列より予想される 201 アミノ酸から成る蛋白質の推定分子量は 22 kDa、等電点は 6.6 であった。ホモロジー検索の結果、*Rhodobacter sphaeroides* の phosphatidylethanolamine methyltransferase (30.3 %, identity, 188 aa overlap) [Arondel *et al.*, 1993] および大腸菌の biotin biosynthetic enzyme (*bioC*) (26.7 %, identity, 176 aa overlap) [Otsuka *et al.*, 1988] との間で相同性が認められた。*orfE* は開始コドン ATG で始まり終止コドン TGA で終わる 267 bp の遺伝子であり、塩基配列より予想される 88 アミノ酸から成る蛋白質の推定分子量は 9.4 kDa、また、等電点は 3.8 であった。ホモロジー検索の結果、*Salmonella typhimurium* の ethanolamine utilization protein (ETUJ) (33.3 %, identity, 87 aa overlap) [Stojiljkovic *et al.*, 1995] のアミノ酸配列の一部と相同性が認められた。*orfF* は開始コドン GTG で始まる遺伝子であり、5' 末端側の 490 bp がクローニングされていると考えられる。開始コドンの 8 bp 上流には RBS と考えられる配列 (GGA) が存在する。塩基配列より予想される蛋白質の N-末端 163 アミノ酸配列のホモロジー検索の結果、データベース中の蛋白質と高い相同性をもつものはなかった。

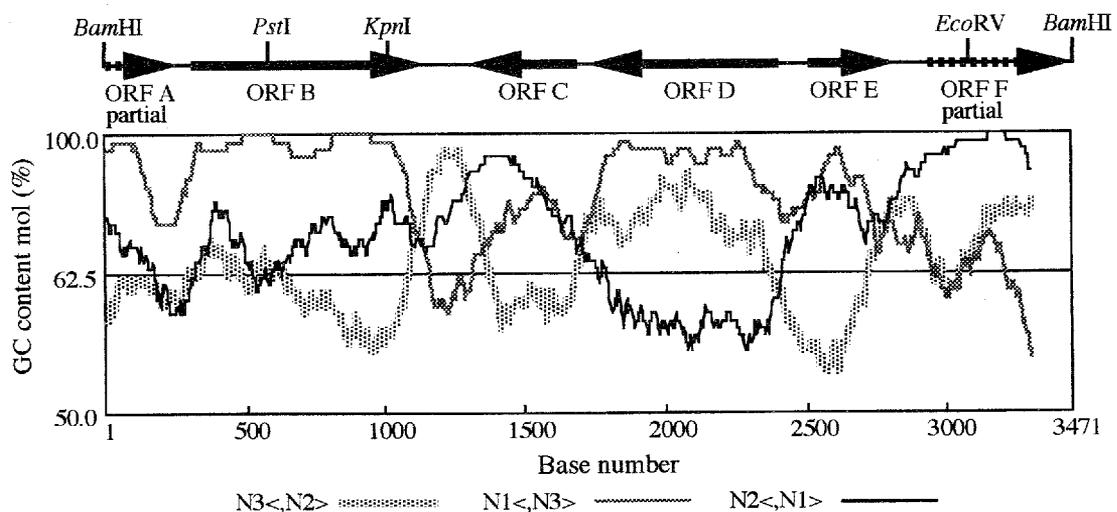


図 24. GC プロット (Frame analysis) による 3.5 kb 塩基配列の解析

*orfA*

I P E E F A S R L Q Q L A L R A H E A L G F G P H T Y S R A  
GGATCCCGAGGAGTTCGCCTCCCGTCTCCAGCAGCTCGCCCTGGCGCGCACAGGCCCTGGGCTTCGGCCCGCACACCTACTCGCGCG 90  
CCTAGGGCTCTCAAGCGGAGGGCAGAGTTCGTCGAGCGGGACCGCGCGTGTCTCCGGGACCCGAAGCCGGGCGTGTGGATGAGCGCGC

D F R C D A A G E P M C L E V N A L P G L T A T S L L P L G  
CCGACTTCCGCTGTGACCGCGCGGCGAGCCCATGTGCCCTGGAGTCAACGCCCTCCCGGCTGACCGCCACCAGCCTGCTGCCGCTCG 180  
GGCTGAAGCGGACACTGCGCCGCCGCTCGGTACACGGACCTCCAGTTGCGGGAGGGGCCGACTGGCGGTGGTCCGACGACGGCGAGC

A S G A G W T Y A D L A E R I V S L A T R \*\*\*  
GGGCTCCGCGCGGGCTGACCTACGCCACCTGGCCGAGCGCATCGTGTCCCTGCCACCCGCTGACCCACCGATCCGCTCTCAACCG 270  
CCCGGAGGCCGCGCCGACCTGGATGCGGCTGGACCGGCTCGCGTAGCACAGGAGCGGTGGGCGACTGGTGGCTAGGCGAGAGTTGGC

*orfB*

RBS M D A Q H S T L T L T R I S P L S N G T F L A A L G V  
ATGTGGGAATCAGTGCACAGCAGCAGCGCTCACACTGACACGAATATCGCCGTTATCGAACGGGACGTTCTCGCCGCGCTCGCGG 360  
TACACCCCTTAGTACCTACGTGTGTCGTGCGAGTGTGACTGTGCTTATAGCGGCAATAGCTTGCCTGCAAGGAGCGGGCGGAGCCGC

A T F S F S F P G T V W A L D G F G P W S A A G V R G V L A  
TCGCGACGTTCTCCTTCAGCTTCCCGGGCACGGTGTGGGCGCTCGACGGTTCGGCCCGTGGAGCGCCGCGGGAGTCCGCGGGGCTCTGG 450  
AGCGCTGCAAGAGGAAGTGAAGGGCCCGTGCACACCCCGAGCTGCCAAGCCGGGACCTCGCGGCGCCCTCAGCGGCCCCAGGACC

A L I A A A A L L W T R A P A P A R A D W P A L L V V A A G  
CCGCCCTGATCGCGCGCGGGCCCTGTTGTGACCCGGGACCGGCGCCGGCGCGCGGACTGGCCCGGCTGCTGGTCTGCGCCGCG 540  
GGCGGACTAGCGCCGCGCGGGACAACACCTGGGCGGCTGGCCGGGCGCGCGCGGCTGACCGGGCGGACGACCAGCAGCGGGCGGC

C 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 P M  
GGTGGGCATCGGGTTCGCGCTCACCACCCCTCGCCCTGCAGACGTCGTCACGGCCCACTCGCGCGCTGATCGGCCTGCTGCGCA 630  
CCACGCCCTAGCCCAAGGGGACGAGTGGTGGGAGCGGGACGCTCGCAGCAGGTGCCGGGTGAGCCGGCAGCACTAGCCGGGACGACGGCT

A T A T I S A L R T R R S P S A V F W A A A G T G A L A V I  
TGGCCACGGCGACGATCTCCGCCCTGCGCACCCCGCGCTCCCCCTCGGCCGTGTTCTGGGGCGCGGGCCGGGACCGCGCCCTCGCCGTA 720  
ACCGGTGCCGCTGCTAGAGCGGGACCGTGGGCGCGAGGGGAGCCGGCACAAGACCCGCGCGCCCTGGCCCGGGAGCGGCACT

V F T L S Q N R G R P T V A D L Y L F A A L L I C A A G Y A  
TCGTCTTACCCTGTCACAGAACCGGGGCGTCCCACGGTTCGCGGACCTTACCTTTCGCGCCCTCCTGATCTGCGCCCGCGGCTATG 810  
AGCAGAAGTGGGACAGGCTTGGCCCCGAGGGTGCAGCGCTGGAGATGGAGAAGCGCGGGGAGGACTAGACGCGGGCGGCGGATAC

E G G R V S A H M P G W R V I A W G V V L A A P V N L A V S  
CCGAAGGGGGCGGGTCTCCGCGCACATGCCGGGCTGGCGCGTGTGCGCTGGGGGGTGGTCTCGCCGCCCGGTAACCTGGCGGTGT 900  
GGCTTCCCCCGCCAGAGGCGGTGTACGGCCGACCGCGCACTAGCGGACCCCCACCACGAGCGGGGGGCACTGGACCGCCACA

A W A L P H E P V H L T A K A V V G M A Y I A A V S Q F G S  
CCGCGTGGGCGCTCCCGCACGAGCCCGTGCACCTCACGGGAAGCCGCTGGTGGGATGGCGTACATCGCCCGGCTCTCGCAGTTCGGCT 990  
GGCGACCCCGGAGGCGTCTCGGGCACGTGGAGTGCCTTCCGGCACCCCTACCCGATGTAGCGGCGCCAGAGCGTCAAGCCGA

F V L W Y Q G M G R I G V P R A S Q L Q L A Q P L L T L V W  
CGTTCGCTCTGTTACCAGGGCATGGGCGCATCGGGTGCCTCCCGGGCGAGCCAGCTCCAGCTGGCGCAGCCGCTCTGACGCTCGTCT 1080  
GCAAGCAGGAGACCATGGTCCCGTACCCGGCGTAGCCCCAGGGGCGCGCTCGGTGAGGTGACCGGCTCGGCGACGACTGCGGAGACA

A V L L L G E H L T P A A P V T A V V V L A C I V V T Q R A  
GGGCGTCTCCTGCTCGGCGAACACCTCACGCCGCGCGCGGCTGACGCGCGTGTGCTCGCTCGCTGATCGTGGTACGCGAGCGGG 1170  
CCCGCAGGAGGACGAGCGCTTGTGGAGTTCGGCGCGCGCGGCACTGCCGCGAGCAGCAGGAGCGGACGTTAGCACAGTGCCTCGCC

R S S \*\*\*

CGCGTCTGTCGTGACGGACTACGCGGGTGGTGCGCCGACCGGTGCGTCCCCGCCCCAGACGATCTCGAAGTACCTGACCGCTCGTCTCG 1260  
GCGCCAGCAGCACTGCCTGATGCGCCACCACGCGGCTGGCCACGAGGGGCGGGGCTGCTAGAGCTTCAATGGACTGCGCGAGCAGGAC

TCCGGCCGGCCGATACCGCGGCGCTCATGACCGGTTGGGACCGGAGGTTGTCGTTGGTTCGGCGTCCGCCCGGACCGGGGTTGGCCCGTG 1350  
AGGCCGCGCGCGTATGGCCGCGGCACTACTGCGCCACCTGCGCTCCAACAGCAGCCAGCCGAGCGGGGCTCGGCCACCGCGGAC

\*\*\* S A T P R S T T T P T A G S A P P A T

CGCGCGGGCGAAGCGCAGCAGTGCAGCGAGGGCCTCGGAGGCGTAGCGCTGCCGCGGGCCGAGGGGACGAGGCGTAGCCGATGGTGACG 1440  
GCGCGCCCGCTTCGCGTTCGTCAGCGCGTCCCGGAGCCTCCGATCGCGAGCGGCGCCCGGCTCCCTGCTCGGCGATCGGCTACCACTGC  
R A P S A C C H A C P R P P T A S G R A S P V L G Y G I T V

CAGCCGTTCTCGTCCCGGCTCCGTTGAAGCCCGCGCCGATCGCGCGGCGTCTCGCGCAGGCGGATCTCGAAGTCCGCGAACGGG 1530  
GTCGGCAAGAGCAGGCGGAGGACCTTCCGGCGCGGCGGCTAGCGCGCCGAGGAGCGGCTCCGCTAGAGCTTACGCGGCTTGCCC  
C G N E D A A G H F G A G G I A R G D E R L R I E F D G F P

TGGGGTACCGGTTATCCGCGCAGACGTCACGAGTCCGCGCGGGCGGCGAGCACGTCGCCGTCGGTGGGATACCCGAGCCCAACCGTCA 1620  
ACCCCAAGTGGCCATAGGCGGCTGTCAGGTCATCGCGGCGCGGCTCGTGCAGGGGACGACCCTATGGGCTGCGGGTGGCCAGT  
H P D G T D A C V D L Y R R A A L V D G D T P Y G S A W R D

GCGCGCCCGGACACCCGCCAGCAGCGCTTCGGCTCCCGGGCGGTCAGCGGGTGCAGTACGAGCCGTGCGGTCACGAGATCCCCATG 1710  
CGCCCGGGCGGCTGTGGCGGTTGTCGCGAAGCCGGAGGCGCCCGGAGTCCGCCACGTCATGCTCGGACCGCAGTGTCTAGGGGTTAC  
A A G P V G A V

*orfC* RBS

ACAGGGAGGACTATCACCGCTGCGGACCGGCCACGGAAATATGGGGTTCAGCCTCACAGGGGATGATCGCCGGTAGGCCGTCCCGTCC 1800  
TGTCCTCCTGATAGTGCACGCTGGCCGGCGTGCCTTTATACCCCAAGTCCGAGTGTCCCTACTAGCGCCATCCGGCAGGGCAGG  
\*\*\* L P H D G T P R G T

GGGACCGCGGGGGCCAGCAGGTGAGCGTGCAGGAAGCCGCGTGCAGGGCCGGGTTCGTGGAGCAGGGCGGAACGGGGTGGAGCCGG 1890  
CCCTGGCCCGCCCGGTTCCTACTCGCAGCTCCTTCGGCGCACGCTCCGGCCACGACCTCGTCCGCCGCTTGGCCACTCCGGCC  
R S R R R A L L H A D L F G R A S A P D H L L R A F P T L G

CCGCGTGCAGTTCGGCGTAGCGGTCCGGCGCCAGCTGTAGGGGGCGTACCTTGTGGTTCGAAGCGGACCGGGTCCGGCCCGTCCG 1980  
GGCGGCACTCGTCAAGCCGCATGCCAGGCCCGGTTCGACATCCGCCCGCAGTGGAAACACAGCTTCGCCTGGCCAGGCCCGGACCC  
A A T L L E A Y R D P P W S Y A P T V K H D F R V P D P G D

TCCCGAAGAACCACAGGAGCAGGCCCGGGGGCCAGGACGCGGGCCTGTTCGGCGAGGAGCGGGCAGTTCGCCGGGGGGGGTGT 2070  
AGGGCTTCTGTGTGCTCGTCCGGGGGGCCCGGTTCGCGCCGGACAAGCCGCTCCTCGCGCCGCTCAAGGGGGCCGCCACA  
T G F F S V L L L G G P A L V R A Q E A L L A P L E G P P T

GGATGGTGCAGTAGTGGCCAGCACCCCGCGAGCGCCCGTGCAGGGGCGAGCTCCTCCATCCGGCCCTCGTGAACCGCAGTTCGG 2160  
CCTACCAGCTCATCACCGGTTCGTGGGGGGCTCGCGGGGAGCGGCTCCCGTGCAGGAGGTAGGCCCGGAGCAGCTTGGCTCAAGGC  
H I T S Y H A L V G G L A G D G L P L E E M R A E D F R L E

GATGGGCCCGCGGGCGTGGCGACCATGCCCGGGAGAGTGCAGCCGAAGGCGTCCAGGCCAGGTTCGTGCAGCATGGCCGTGAGAT 2250  
CTACCCGGGGCCCGCACCCGCTGTACGGGCCCTTCCAGCTCGGGCTTCGCGAGGTCCGGTCCAGCACGTTCGTACCGCAGCTTA  
P H A R R A H A V M G P S L D L G F A D L G L D H L M A T L

GCCCGGGCCCGCAACCGCAGTTCGGCCACCCGGGTGTTCGCCCGCGCGCACAGCTCGGCGAAGGTTCGGATCATGTTCCGCGGAAG 2340  
CGGGCCCGGGCGTTCGCTGCAGCCGTGGGCCACAGGGGCGCGCGTGGTTCGAGCCGCTCCACGCCTAGTACAAGGGCGGCTTCC  
H G P G C G V D A V R T N G A A R V L E A F T R I M N R A F

GCTGCGCTCCAGCCCGCATCGGCAACATCGACGCTACAGCTCGACGACCCCGTTCGTAGGCGCGCCGGTTCGTCTGTGTGTTCCC 2430  
CGACCGGAGGTTCGGCGGTAGCCGCTTGTAGCTGCGCATTCGAGCTGCTGGGGCAGCATCCGCCCGGCCAGAGCAGGACCACAAGGG  
P Q A E L R R D A F M *orfD* RBS

CCACGGGGAGGAAGCTAGCAGCCACCCACAAGACACGGCGCGGCAACCATGTTTCGGGGGGGGTGGTTCAGTCTTGTACATGGCTG 2520  
GGTGCCCTCCTTCGATCGTGGTGGTGTCTGTGCCCGCCGCTTGGTACCAAGCCCGCCCAAGATCGAAGACATGTACCGAC

M F E H A P Q V W T A A R L R E A L A E L P D E T P I H V G  
ACATGTTTCGAGCACCCCCAGGTATGGACCGCCGCGGCTGCGTGAAGCTCTCGCGAACTGCCCGACGAGACACCGATCCACGTCG 2610  
TGTACAAGCTCGTGGGGGGTCCATACCTGGCGGGCGCCGACGCACTTCGAGAGCCCTTGACGGGCTGCTCTGTGGCTAGGTGCAGC

V A D G P G D F D G Y G E Y V L V D A E P V E V D T D A D G  
GGTTCGCTGACGGGGCGGGTACTTCGACGGGTACGGGGAGTACGCTCCTGTTGGACGCCAGCCCGTTCGAGGTGGATACCGACCGGACG 2700  
CCCAGGACTGCCCCGGCCACTGAAGCTGCCATGCCCTCATGCAGGACCACCTGCGGCTCGGGCAGCTCCACCTATGGTTCGGGCTGC

V D G P P H V Q F T L F A D A R A G A Y H L D V D \*\*\*  
GCGTGCAGGGCCCGCCACGTTCCAGTTCACGCTGTTCGCGGACGCGCGGGCCGGCGCTACCACCTCGACGTCGACTGACGACGCGGG 2790  
CGCAGCTGCCCGGGGGTGCAGGTCAAGTGCACAAAGCGCTGCGGGCCCGGGCCGGATGGTGGAGCTGCAGCTGACTGCTGCGGGCC

CACCGTGACAGTCTGTGACGGGAAGTGTGGCGTGCGCCACGGCCCGGTCCCGACGCCCTTGATGGGGTGGGCCATGCGTCCACCCAG 2870  
GTGGCACTGTGCAGACACTGCCCTTGACACCGCACGCGGTGCCGGGCCAGGGCTGCGGGAAGTACCCACCCGGGTACGCAAGTGGGGTC

CGCCTCCTGCGGCCCTCACGCTCCTCCTGCTCGCGGGATGCGGTGCCCGGGCGTCCGCACCCCGCCCGCCCGCCGCGGCGGTC 2960  
GCGGAGGACGGCCGGAGTGGCAGGAGGAGACGAGCGCCCTACGCCACGGGGCCGAGGCGTGGGCGGCGCGGGGGCGGCTGCCCCAG

RBS *orfF* V T V P S G S G G P G G H A D P L P A G D S G I S A  
CGGATCACCTCGGTGACCGTCCCTCCCGCTCCGGCGGACCGGGCGCCACGCCGATCCGCTCCCGCCGGCGACTCCGGGATATCGGCC 3050  
GCCTAGTGGAGCCACTGGCAGGGGAGGCCGAGGCCCTGCGCCCGGCTGCGGCTAGGCGAGGGGGCGGCCGCTGAGGCCCTATAGCCGG

A Y E V T N G G S G A L A Y T I L F D F T T D A G E V M G N  
GCCTACGAGGTACCAACGGCGGACGGGGCGTGGCGTACAGTATCCTGTTTCGACTTCACCACCGACGCGCGGAGGTGATGGGCAAC 3140  
CGGATGCTCCAGTGGTTCGCCCGCTGCCCGCCGAACCGCATGTGCTAGGACAAGCTGAAGTGGTGGCTGCGGCCGCTCCACTACCCGTTG

T T A T V R A V G P G A T V R G T V R L G A P G P G S S R V  
ACCACCGGACCGTACCGCGGTTCGCCCGCGCCACGTTGCGCGCACGCTCCGCTGGGGGCGCCCGGCCGGGGTTCGTGCGGGGTG 3230  
TGGTGGCGTGGCATGCGCGCCAGCCGGGGCGGTTGCCACGCGCGTGCAGGCCGACCCCGGGGGCGGGCCAGCAGCGCCAC

F R V K V S R V T K V P A A E A P P E A G A C P P S G V R V  
ACCCGCTCAAGTTCGCCGGGTGACCAAGGTGCCCGCGCGGAGCGCGCCGAGGCGGGCGGTCGCCCGCTCCCGCGTCCCGCTC 3320  
TGGCGCAGTTCAGAGGGCCACTGGTTCACGGGCGGGCTCCCGGGCGGCTCCGCCCGCGCACGGGCGGGAGGCCGAGCGCAG

T A D D G D A A M G L R V V G L R L E N C G K T D Y A L D G  
ACCCCGACGACGGCGACCGCGATGGGGTTCGCGTGGTGGGGTCCGTTGGAGAAGTGGGGAAGACGACTAGCCCTTCGACGGC 3410  
TGGCGGCTGCTGCCGCTGCGGCGTACCCCGACCGCACCCCGGAGGACAGCTTCTGACGCCCTTCTGGCTGATGCGGGAGCTGCCG

Y P Q L E L L D G D L S P V Q G I  
TACCCGACGCTGGAATCCTGGACGGCAGCTGTACCCGTTACAAGGGATCC 3472  
ATGGCGTGCACCTTGGAGACTGCCGCTGGACAGTGGGCATGTTCCCTAGG

図 25. 3.5 kb DNA 断片の全塩基配列と推定される ORF のアミノ酸配列  
RBS ; 推定リボソーム結合部位, *orfB* 内の下線は推定 transmembrane 領域を示す。

## 第五節 Cs 耐性遺伝子の大腸菌における発現とコード領域の決定

3.5 kb の DNA 断片の塩基配列の解析により推測された完全な 4 つの ORF (B, C, D, E) のうちどの ORF が Cs 耐性遺伝子をコードしているのかを決定した。p118CSRR を *EcoRI* および *HindIII* で二重消化し、*S. garyphalus* 由来の 3.5 kb DNA を含む断片を *EcoRI* および *HindIII* で二重消化した pUC18 および pUC19 にサブクローニングした。得られたそれぞれのプラスミドを p18CSR および p19CSR と命名した。それらのプラスミドを持つ大腸菌 JM109 株を Cs 100 µg/ml を含む LB 培地で培養したところ、p18CSR を持つ大腸菌 JM109 [p18CSR] のみが増殖した (図 26)。この結果から、Cs 耐性遺伝子は大腸菌において発現可能であるが、その転写は *lac* プロモーターからの read through によるものであると示唆された。また、その転写の方向から判断すると Cs 耐性遺伝子は *orfB* あるいは *orfE* であると考えられた。そこで、制限酵素サイトによりサブクローニングを行い、プラスミド pIM-2, 3, 6 および 8 を構築した。それぞれのプラスミドをもつ大腸菌 JM109 株を Cs 100 µg/ml を含む LB 培地で培養したところ、pIM-3 を持つ大腸菌 JM109 [pIM-3] のみが耐性を示した (図 26)。この結果から、Cs 耐性遺伝子は *orfB* であると考えられたので、さらに、先に決定済みの塩基配列に基づいて PCR プライマーを設計し、*orfB* 近傍の DNA 断片を増幅した。この増幅産物を *lac* プロモーター支配下につないだプラスミド (pCSPC6, pCSPC9, pCSPC10 および pCSPC12) を構築し、それぞれ大腸菌 JM109 株に導入し Cs 耐性を調べた。その結果、pCSPC6, pCSPC9 および pCSPC12 をもつ大腸菌 JM109 が Cs 耐性を示した (図 26)。これらの結果から判断して、*orfB* が Cs 耐性遺伝子であることが明らかとなった。また、プラスミド p18CSR あるいは pCSPC12 を持つ大腸菌 JM109 株の Cs に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。大腸菌 JM109 [p18CSR] および大腸菌 JM109 [pCSPC12] の MIC はそれぞれ 50 µg/ml および 200 µg/ml であった。ちなみに、ホストとして使用した大腸菌 JM109 株の Cs に対する MIC は 12.5 µg/ml である。

## 第六節 Cs 耐性遺伝子産物の機能

第四節において、*orfB* 遺伝子産物 (= Cs 耐性遺伝子産物) と相同性が認められた大腸菌の Fm 耐性遺伝子産物は、アンチポーター型薬剤排出機能を持つ膜蛋白質であると推測されている。ちなみに、アンチポーター型薬剤排出蛋白質とは、 $H^+$  の濃度勾配を駆動力として薬剤を排出する蛋白質である。そこで、Cs 耐性遺伝子産物の疎水性プロット解析を von-Heijin の方法 [von-Heijin, 1992] により行ったところ、10 個の

transmembrane 領域の存在が示唆された (図 27)。

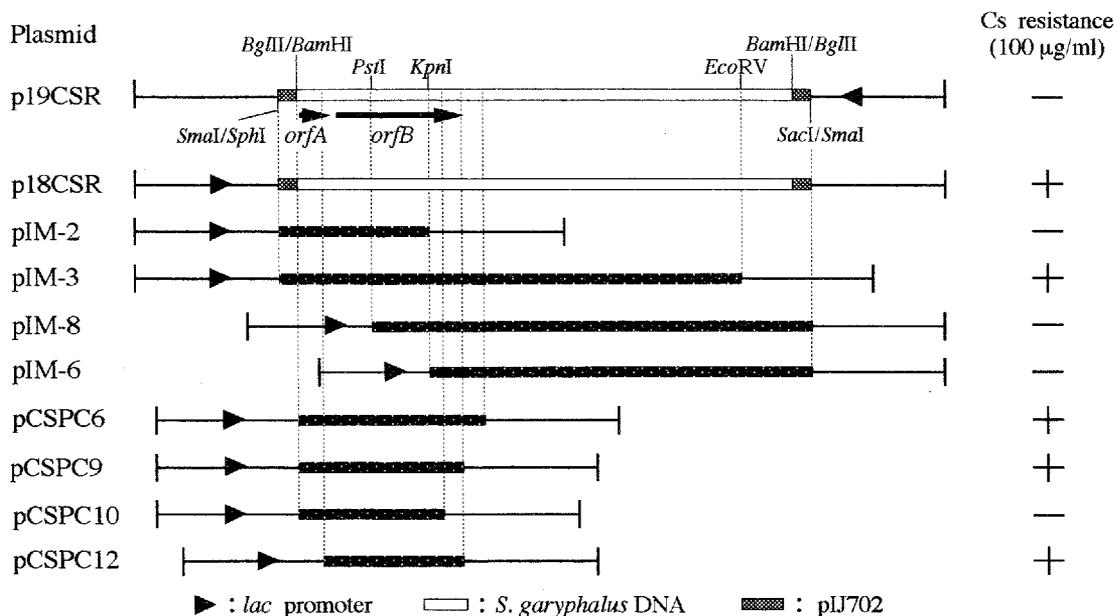


図 26. 大腸菌における Cs 耐性遺伝子のサブクローニング

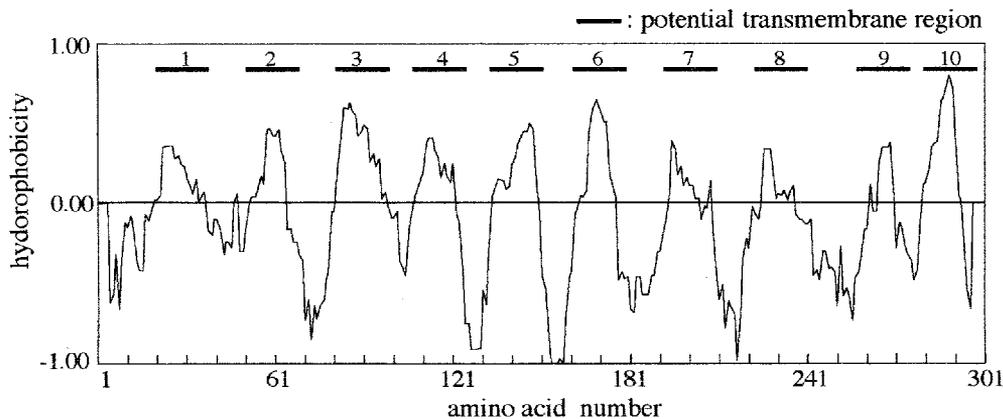


図 27. Cs 耐性遺伝子産物の疎水性プロット解析

一方、プラスミド pCSPC12 を持つ大腸菌 JM109 [pCSPC12] に関して Km, Abk, Cp, Tet, Bm, Vm, Em, ofloxacin および fosfomycin に対する MIC を測定したところ、いずれの抗生物質に対する MIC もホスト大腸菌 JM109 株の MIC と何の変化も認められなかった。したがって、pCSPC12 上には Cs 耐性に特異的に働く遺伝子が存在すると言える。

次に、今回クローニングした Cs 耐性遺伝子が Cs を生産する他の放線菌にも保存されているかどうかを調べるために *orfB* をプローブとして、Cs 生産菌 *S. lavendulae*

ATCC11924 および ATCC25223 株の染色体 DNA を *Bam*HI で消化後、サザン解析を行った。その際、Cs 非生産菌である *S. lividans* 66 をコントロールとした。その結果、Cs 生産菌 *S. lavendulae* ATCC11924 は 2.8 kb の染色体断片に、また、*S. lavendulae* ATCC25223 は 8.6 kb に、*S. lividans* には認められない Cs 生産菌に特異的なシグナルが観察された (図 28)。

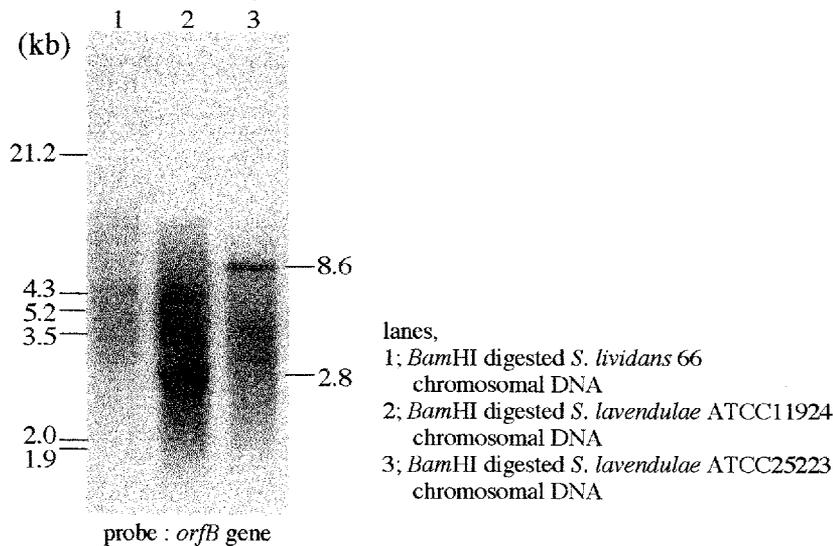


図 28. Cs 生産菌の染色体 DNA のサザン解析

## 第七節 考察

本研究において、Cs 生産菌 *S. garyphalus* の染色体遺伝子から、Cs 耐性遺伝子を含む 3,472 bp の *Bam*HI-*Bam*HI 断片のクローニングに成功し、全塩基配列を決定した。その遺伝子解析の結果、4つの完全な ORF (B, C, D, E) と 5' および 3' 末端に 2つの ORF の一部 (A, F) の存在が示唆された (図 24)。さらに、大腸菌においてサブクローニング後、Cs 耐性を調べた結果、*orfB* が Cs 耐性遺伝子であることを明らかにした (図 26)。また、Cs 耐性遺伝子を導入した大腸菌 JM109 [pCSPC12] の Km, Abk, Cp, Tet, Bm, Vm, Em, ofloxacin および fosfomycin に対する耐性度の変化は認められなかった。この結果から、Cs 耐性遺伝子産物は Cs 耐性に特異的に働く蛋白質であることが示唆された。さらに、Cs 耐性遺伝子をプローブとして、Cs を生産する他の放線菌 *S. lavendulae* ATCC11924 および ATCC25223 株の染色体 DNA のサザン解析を行った結果、特異的にハイブリダイズするバンドが認められた (図 28)。この結果から、*S. garyphalus* の保有する Cs 耐性遺伝子は Cs 生産菌に共通に存在する自己耐性遺伝子であることが考えられる。

Cs 耐性遺伝子から予想されるアミノ酸配列の疎水性プロット解析を行った結果、10 個の transmembrane 領域の存在が示唆された (図 27)。この結果から、Cs 耐性遺伝子は膜蛋白質であると示唆された。抗生物質耐性因子で膜蛋白質と言え、 $H^+$  の濃度勾配を駆動力として薬剤を排出するアンチポーター型薬剤排出蛋白質や ATP の加水分解と共役した ABC (ATP-binding cassette) 型排出蛋白質が知られている。Cs 耐性遺伝子から予想されるアミノ酸配列と 32.8% 相同性が認められた大腸菌の Fm 耐性遺伝子産物は、アンチポーター型薬剤排出蛋白質である Tet [Allard and Bertrand, 1992; Sloan *et al.*, 1994] や Cp [Dittrich *et al.*, 1991] 耐性遺伝子産物などと同じく、12 個の transmembrane 領域が存在し、かつ、膜貫通ヘリックス 2 と 3 をつなぐグループ 2-3 には保存性の配列 Ser-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Arg もしくはそれに相当する配列が存在することから、これらと同様のアンチポーター型薬剤排出蛋白質であると推測されている [Fujisaki *et al.*, 1996]。このアンチポーター型薬剤排出蛋白質は Tet 生産菌 *S. rimosus* [Reynes *et al.*, 1988] や methylenomycin A 生産菌 *S. coelicolor* [Neal and Chater, 1987]、それに lincomycin 生産菌 *S. lincolnensis* [Zhang *et al.*, 1992] から自己耐性遺伝子としてクローニングされている。本研究における Cs 耐性遺伝子産物も Fm 耐性遺伝子産物と相同性が認められたことから、同様にアンチポーター型薬剤排出蛋白質と考えられるが、Cs 耐性遺伝子産物の transmembrane 領域は 10 個しか無く、保存性の配列 Ser-Asp-Arg-X-Gly-Arg-Arg も認められないことが特徴である。一方、ABC 型排出蛋白質をコードする遺伝子は、doxorubicin と daunorubicin を生産する *S. peucetius* [Kaur, 1997]、oleandomycin 生産菌 *S. antibioticus* [Buche *et al.*, 1997] および aminonucleoside antibiotic A201A 生産菌 *S. capreolus* [Barrasa *et al.*, 1995] などからクローニングされている。ABC 型薬剤排出蛋白質には ATP-binding cassette 領域に保存された配列が存在するが、Cs 耐性遺伝子産物にはその保存されている配列は認められなかった。また、ホモロジー検索の結果 22.7% 相同性が認められた、*Erwinia chrysanthemi* 由来の pecM protein は、10 個の transmembrane 領域を持つ膜蛋白質であり、その点では Cs 耐性遺伝子産物と同じである。*Erwinia chrysanthemi* における pecM 遺伝子破壊株は、pectinase や cellulase の生産が上昇することから、pecM protein はそれらの遺伝子発現を負に調節する因子であると考えられているが、その詳細な機構についてはまだよく解っていない [Reverchon *et al.*, 1994]。このように、*S. garyphalus* 由来の Cs 耐性遺伝子産物はこれまでに見つかっている薬剤排出蛋白質であるアンチポーター型や ABC 型などの薬剤排出蛋白質とは異なった新しい薬剤耐性膜蛋白質であると思われる。

## 【終章】

### 総括

医学や薬学が進歩した現在でも、依然として病原菌の抗生物質に対する耐性化が進んでいる。その対策として、医薬品業界は、それらの病原菌に有効な抗生物質を新規微生物からスクリーニングしたり、化学的に合成することで新規抗生物質の開発に力を注いでいる。しかしながら、新規抗生物質を登場させても、病原菌は直ちにそれら薬剤に対する耐性を獲得してしまう。いわゆる、新規抗生物質と薬剤耐性病原菌の間でいたちごっこが続いているのである。そのような背景から、薬剤耐性菌の薬剤耐性機構の研究は積極的に行われ、それは今も継続中である。

筆者は、抗生物質生産菌が薬剤耐性菌の耐性機構と同様に、抗生物質に対する耐性機構を備えていることに着目し、その機構を解明することが今後の薬剤耐性機構の研究において重要な知見を与えるであろうと考えた。本研究では、第一章に示したように、Bm 生産菌の自己耐性因子のひとつである BAT を大腸菌において大量発現させることにより、その酵素学的諸性質を明らかにした。また、第二章では、Bs 生産菌が保有する Pm 不活化因子の機能を調べるために、本因子による Pm 不活化産物の化学構造を決定した。その成果として、この不活化因子が Pm 加水分解酵素であることを証明した。さらに、第三章では、Cs 生産菌が持つ Cs 自己耐性因子の機能を調べるために、Cs 生産菌から自己耐性遺伝子をクローニングした後、その遺伝子構造を調べた。このように、本研究では、抗生物質耐性因子の機能を解析するために異なった手段を用いた。本研究を通じて明らかにされたこれら放線菌の耐性機構は全て新規のものであり、今後、これと同一または類似の耐性機構を持つ病原菌の出現する可能性は充分考えられよう。そして、その可能性を考えて新規の抗生物質を開発することが不可避となろう。

Bm はその強力な DNA 切断機能で癌細胞の増殖を阻害することから、現在、精巣癌や皮膚癌などの治療に用いられている。しかしながら、副作用として、肺線維症を引き起こしやすいのも事実であり、その使用には当然ながら制限が付きまとっている。この副作用が肺で起こりやすいのは、Bm を加水分解し、不活化する酵素 Bm hydrolase [Brömme et al., 1996] 活性が、肺組織中で低いためと考えられている。このように、動物細胞における Bm 耐性は Bm 加水分解酵素によるが、Bm 生産菌では、BAT や BLMA といった動物細胞とは別の Bm 耐性因子に起因する。本研究で、BAT は Bm に対して基質特異性がきわめて高いことを明らかにし、かつ、大腸菌における大量発現系を確立できたことから、今後は、肺線維症の回避を目的とした Bm の血中濃度を測定するための臨床診断薬として、BAT を応用したいと考えている。

Bs 生産菌が産生する Pm 加水分解酵素は、Bs 生産菌の細胞内で Pm を不活化するためのみにつくられているとは思われない。本研究で示したように、Pm 加水分解酵素を精製できたことから、今後は、その蛋白質のアミノ酸配列を決定した上で、プローブ

を合成し、それを用いてその遺伝子のクローニングを行う予定である。筆者は、その遺伝子が取得できれば、蛋白質の全一次構造を明らかとすることができ、ひいては、Bs 生産菌が保有する Pm 不活化酵素の真の機能を明らかにできるのではないかと期待している。

最近、結核菌の仲間 *Mycobacterium smegmatis* が獲得した Cs 耐性は、Cs の作用標的である Ala racemase 遺伝子のプロモーターの変異に起因する、Ala racemase の過剰発現によるものであることが示唆された。1997 年、牛に結核を引き起こす *M. bovis* BCG に Ala racemase 遺伝子を導入し過剰発現させると、その菌は Cs 耐性を獲得することが示された [Caceres *et al.*, 1997]。しかしながら、本研究においてクローニングした Cs 生産菌由来の自己耐性遺伝子産物は *M. smegmatis* が獲得した Cs 耐性因子と明らかに異なっている。このように、薬剤耐性菌と抗生物質生産菌の間で、耐性機構に相違のある、Cs 生産菌型 Cs 耐性遺伝子を結核の病原体である *M. tuberculosis* が獲得する可能性も充分予想されるため、Cs 耐性遺伝子産物の機能を早急に明らかにすることが望まれる。

Cs の生合成はわずかに 4 つのステップにより行われると考えられている [Svensson and Gatenbeck, 1982]。第一章で述べたように抗生物質の生合成と自己耐性遺伝子はクラスターを形成していることが多いことから、本研究でクローニングした自己耐性遺伝子をプローブとして、Cs 生合成遺伝子クラスターのクローニングが可能である。それらの遺伝子を大腸菌において発現させることができれば、増殖の旺盛な大腸菌を利用した Cs の大量生産系の確立も充分期待できる。

すでに、Km 生産菌 *S. kanamyceticus* M1164 株から自己耐性遺伝子としてクローニングされた aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase 遺伝子を多コピーベクター pIJ702 に連結し、Km 生産菌 *S. kanamyceticus* ATCC12853 や neomycin (Nm) 生産菌 *S. fradiae* ATCC10745 に導入し、Km や Nm を Wild type の 5~7 倍程度まで過剰生産させることに成功している [Cramer *et al.*, 1986]。本研究で用いた Bm 耐性遺伝子や、Cs 耐性遺伝子をそれぞれの生産菌の細胞内に導入すれば、Km や Nm 生産菌と同様に自己耐性能のアップに伴って、抗生物質の生産能力を高めることができるかも知れない。

このように、本研究成果は実用抗生物質生産菌の分子育種や、抗生物質生合成メカニズムの研究に充分応用可能であると考えられ、今後は、このような方向性をもって研究を進めることが望まれる。

## 【実験の部】

### 1. 使用菌株

#### 1.1. 大腸菌

菌株	遺伝子型	参考文献
TB1	<i>ara</i> Δ( <i>lac proAB</i> ), <i>rpsL</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> ΔM15), <i>hsdR</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1,</i> $\Delta$ ( <i>lac proAB</i> )/F <sup>+</sup> [ <i>traD36, proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>s</sup> , <i>lacZ</i> ΔM15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

#### 1.2. 放線菌

<i>Streptomyces verticillus</i> ATCC15003	bleomycin 生産菌
<i>Streptomyces morookaensis</i> JCM 4643	blasticidin S 生産菌
<i>Streptomyces garyphalus</i>	D-cycloserine 生産菌
<i>Streptomyces lavendulae</i> ATCC11924	D-cycloserine 生産菌
<i>Streptomyces lavendulae</i> ATCC25223	D-cycloserine 生産菌
<i>Streptomyces lividans</i> 66	放線菌ホスト菌株

#### 1.3. 被検菌

<i>Bacillus cereus</i> IFO 3001
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO12732

### 2. 一般的操作

#### 2.1. 培地

LB	1.0 % polypeptone, 0.5 % yeast extract and 1.0 % NaCl, pH 7.0
preSOB	1.0 % polypeptone, 0.5 % yeast extract, 10 mM NaCl and 2.5 mM KCl, pH7.0

SOB	1/100 容量の 2 M Mg-solution [1 M MgCl <sub>2</sub> and 1M MgSO <sub>4</sub> ] を preSOB 培地に加える。
SOC	1/100 容量の 2 M glucose を SOB 培地に加える。
GMPS	1.0 % glucose, 0.2 % meat extract, 0.4 % polypeptone, 0.2 % yeast extract, 0.5 % NaCl, 34 % sucrose and 0.025 % MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, pH 7.0
GMP	1.0 % glucose, 0.2 % meat extract, 0.4 % polypeptone, 0.2 % yeast extract, 0.5 % NaCl and 0.025 % MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, pH 7.0
NB	0.3 % beef extract (Difco) and 0.8 % Bacto peptone (Difco), pH 6.8
YEME	1.0 % glucose, 0.5 % polypeptone, 0.3 % yeast extract, 0.3 % malt extract and 0.04 % MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O, pH 7.0
PMS	1.0 % polypeptone, 0.5 % meat extract and 0.25 % NaCl, pH 7.0
R5	stock agar 100 ml に 0.5 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0 ml, 5 M CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.4 ml, 20 % L-proline 1.5 ml, 1 N NaOH 0.7 ml を加える。 Stock agar : sucrose 103 g, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.25 g, MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 10.12 g, glucose 10 g, casaminoacids (Difco) 0.1 g, trace element solution 2 ml, yeast extract (Difco) 5 g, TES buffer 5.73 g, 2.2 % agar and distilled water to 1,000 ml Trace element solution : ZnCl <sub>2</sub> 40 mg/L, FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O 200 mg/L, CuCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O 10 mg/L, MnCl <sub>3</sub> · 4H <sub>2</sub> O 10mg/L, Na <sub>3</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O 10 mg/L and (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O 10 mg/L
2×TY	1.6 % Bacto tryptone (Difco), 1.0 % Bacto yeast extract (Difco) and 0.5 % NaCl, pH 7.0

## 2.2. プラスミド調製法

### 2.2.1. 大腸菌プラスミド大量調製法

プラスミドを持つ大腸菌を抗生物質を含む LB 培地で 37 °C にて、8~12 時間振盪培養した。培養液 200 ml を 5,000×g, 4 °C にて 15 分間遠心し菌体を集め、50 ml の Solution I [50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 25 mM EDTA·3Na] に再懸濁させ菌体を洗浄し 5,000×g, 4 °C にて 10 分間遠心した。得られた菌体に 10 mg の lysozyme を含む Solution I 10 ml を加えよく混和した。その溶液に Solution II [0.2 M NaOH and 1.0 % SDS] 20 ml を加え穏やかに攪拌し、室温で 10 分間放置した。さら

に Solution III [60 % (v/v) 5 M potassium acetate and 11.5 % (v/v) glacial acetic acid] 15 ml を加え攪拌し、氷中に 10 分間放置した。8,000×g, 4℃ にて 10 分間遠心し、得られた上清に 0.6 容量の isopropanol を加え、室温で 10 分間放置した。次いで、8,000×g にて 10 分間遠心し沈澱を得た。沈澱を冷 70 % ethanol で洗浄後、減圧乾燥した。さらに、得られたプラスミド DNA は、CsCl 密度勾配遠心により精製した。

### 2.2.2. 大腸菌プラスミド少量調製法

プラスミドを持つ大腸菌を、抗生物質を含む LB 培地で 37℃ にて 8~12 時間振盪培養した。培養液 1.5 ml を 2,000×g にて 10 分間遠心して菌体を集め、100 µl の Solution I に再懸濁した。次に、200 µl の Solution II を加え穏やかに攪拌し、氷中で 5 分間放置した。さらに 150 µl の Solution III を加え、よく混和した後、氷中で 5 分間放置した。8,000×g にて 10 分間遠心して得られた上清に等量の TE 溶液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA·3Na] 飽和 phenol/chloroform (1:1) 溶液を加え、攪拌後 8,000×g にて 2 分間遠心し、水層を新しいチューブに移した。その水層に 45 µl の 3M sodium acetate 溶液と 900 µl の冷 ethanol を加え攪拌し、-20℃ にて 20 分間放置した。8,000×g にて 10 分間遠心して、得られた沈澱を冷 70 % ethanol で洗浄後、減圧乾燥した。得られたプラスミド DNA は適当量の TE 溶液に溶解し使用した。

### 2.2.3. 放線菌プラスミド調製法

プラスミドを持つ放線菌を、抗生物質を含む GMPS 培地で 28℃ にて 48~72 時間振盪培養した。培養液を 5,000×g にて 10 分間遠心して菌体を集め、0.8 g の湿菌体あたり全量 5 ml になるように lysozyme 溶液 [0.3 M sucrose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA·3Na, 0.02 % bromocresol green, 50 µg/ml RNase and 2.0 mg/ml lysozyme] に懸濁した。次に、この懸濁液を 37℃ にて 30~60 分間振盪して溶菌させ、2.5 ml のアルカリ SDS 溶液 [0.3 M NaOH and 2.0 % SDS] を加えて攪拌した。90℃ にて 5 分間加温し、室温まで冷却した。1.6 ml の酸性 phenol/chloroform (1:1) 溶液を加え 1 分間 vortex で完全に混和した。20,000×g にて 10 分間遠心して得られた上層に 1/10 容量の 3M sodium acetate と等量の isopropanol を加え攪拌後、5 分間室温に放置した。20,000×g にて 10 分間遠心して上清を除いた後、沈澱を 500 µl の TE 溶液に溶解した。この溶液に 1/10 容量の 3M sodium acetate と 500 µl の TE 飽和 phenol/chloroform (1:1) 溶液を加え、vortex で完全に混和した。20,000×g にて 5 分間遠心し、水層を新しいチューブに移した。その水層に等量の isopropanol

を加え攪拌後、5 分間室温に放置した。20,000×gにて 10 分間遠心して上清を除いた後、得られた沈澱を冷 70 % ethanol で洗浄後減圧乾燥した。得られたプラスミド DNA は適当量の TE 溶液に溶解し使用した。

#### 2.2.4. CsCl 密度勾配遠心によるプラスミドの精製

DNA 試料を 4.85 ml の TE 溶液に溶解し、CsCl 5.0 g と ethidium bromide (10 mg/ml) 150  $\mu$ l を加え、3 ml 容の超遠心チューブ 2 本に移し 200,000×g, 15 °C にて 16 時間遠心した。遠心後 UV 360 nm 下でプラスミド DNA のバンドをシリンジで採取した。得られたプラスミド DNA 溶液に等容量の 5 M NaCl 飽和 isopropanol を加えよく攪拌し静置後、isopropanol 層を捨てた。この操作を 5~6 回行い ethidium bromide を完全に除いた。水層に 2 容量の滅菌水と 6 容量の冷 ethanol を加え攪拌し、-80 °C にて 20 分間放置した。5,000×g, 4 °C にて 10 分間遠心し、得られた沈澱を冷 70 % ethanol で洗浄後減圧乾燥した。得られたプラスミド DNA は適当量の TE 溶液に溶解し使用した。

#### 2.3. 放線菌の染色体 DNA の調製

放線菌を GMP 培地で 28 °C にて 48~72 時間振盪培養した。培養液を 5,500×g にて 10 分間遠心して菌体を集め、1.0 g の湿菌体あたり 20 ml の saline-EDTA [0.15 M NaCl and 0.1 M EDTA·2Na, pH 8.0] にて洗浄後、5,500×g にて 10 分間遠心した。11 ml の saline-EDTA に懸濁後、lysozyme および achromopeptidase を最終濃度 1.0 mg/ml になるようにそれぞれ加え、37 °C にて 60 分間振盪した。2 ml の 10 % SDS 溶液を加えて穏やかに攪拌し、次いで、3.5 ml の 5 M sodium perchlorate を加え混和した。その溶液に 17 ml の chloroform-isoamylalcohol (24:1) を加え、室温にて穏やかに 30 分間攪拌した。20,000×g にて 10 分間遠心して得られた上清に 2 容量の冷 ethanol を加え、析出した DNA をガラス棒で巻き取った。DNA を 9 ml の 0.1×SSC [10×SSC : 1.5 M NaCl and 0.15 M Na<sub>3</sub>-citrate] に溶解後、1 ml の 10×SSC および 0.2 ml の RNase 溶液 [0.15 M NaCl and 2 mg/ml RNase] を加え 37 °C にて 20 分間静置した。その溶液に 10 ml の chloroform-isoamylalcohol (24:1) を加え、室温にて穏やかに 30 分間攪拌した。20,000×g にて 10 分間遠心して得られた上清に 2 容量の冷 ethanol を加え、析出した DNA をガラス棒で巻き取った。その DNA を冷 70 % ethanol にて 30 分間殺菌し、風乾させた後、適当量の TE 溶液に溶解し使用した。

## 2.4. アガロースゲル電気泳動

agarose (TAKARA LO3) を TAE 溶液 [40 mM Tris-acetate (pH 8.0) and 2 mM EDTA·2Na] に加え、電子レンジで加熱溶解後、60 °C まで冷やし、ethidium bromide を最終濃度 0.5 µg/ml になるように加えた。ゲルメーカー板にアガロース溶液を注ぎ、室温で放冷しゲルを固めた。コームを抜き、サブマリン型泳動槽にセットした。DNA 試料溶液に 1/6 容量の色素液 [50 % sucrose and 0.5 % bromophenol blue] を加え混和後、マイクロピペットでゲルに注入した。100 V の定電圧で泳動後、UV 360 nm の照射により DNA を検出した。

## 2.5. アガロースゲルから DNA 断片の回収

アガロース電気泳動後、目的の DNA 断片が存在する部分のゲルを切り出し、Se-phaglas BandPrep Kit (Pharmacia) を用いて、プロトコールに従って DNA 断片を回収した。

## 2.6. DNA の連結、末端の脱リン酸化および平滑化

DNA Ligation Kit ver.1 (TAKARA)、Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (TAKARA) および DNA Blunting Kit (TAKARA) を用いて、それぞれのプロトコールに従って DNA の連結、末端の脱リン酸化および平滑化を行った。

## 2.7. 大腸菌のコンペテントセルの調整および形質転換

### 2.7.1. コンペテントセルの調整

大腸菌のグリセロールストックより 100 µl を 50 ml の SOB 培地の入った枝付き 300 ml 容三角フラスコに植菌し、37 °C にて O.D. 600 nm = 0.6 になるまで培養した。培養液を氷上に 10 分間放置後、4,000×g, 4 °C にて 10 分間遠心して菌体を集めた。菌体を氷上で冷却した 16 ml の TFB [10 mM MES (pH 6.3), 100 mM KCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 3 mM hexamine cobalt chloride] に懸濁させ氷上に 10 分間放置し、4,000×g, 4 °C にて 10 分間遠心して菌体を集めた。菌体を 3.8 ml の氷冷 TFB に再懸濁し、それに 133 µl の dimethylsulfoxide を加え、穏やかに攪拌後、氷上に 15 分間放置し、さらに 133 µl の dimethylsulfoxide を加え、氷上に 5

分間放置後 100  $\mu$ l ずつエッペンドルフチューブに分注した。使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

## 2.7.2. 大腸菌の形質転換

コンペテントセル溶液 100  $\mu$ l を氷上で溶解し、10~20  $\mu$ l の DNA 溶液を加え、穏やかに混和し氷中に 30 分間放置した。次に、 $42^{\circ}\text{C}$  にて 30 秒間ヒートショックを与えた後すぐに 1 分間氷冷した。その試料に 900  $\mu$ l の SOC 培地を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  にて 1 時間インキュベート後、抗生物質を含む LB 寒天プレートに塗布した。

## 2.8. 放線菌のプロトプラストの調製および形質転換

### 2.8.1. 放線菌のプロトプラストの調製

100 ml GMPS 培地に glycine を最終濃度 0.5 % (w/v) になるように加え、それに放線菌の孢子懸濁液を植菌し、 $28^{\circ}\text{C}$  にて 36~40 時間振盪培養した。培養液 20 ml を  $4,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  にて 10 分間遠心して菌体を集めた。菌体を 15 ml の 10.3 % sucrose にて 2 回洗浄後、lysozyme および achromopeptidase をそれぞれ最終濃度 1 mg/ml を含む 10 ml の P buffer に懸濁させ、 $20^{\circ}\text{C}$  にて 15~60 分間反応させた。次に、脱脂綿で濾過し、プロトプラスト化した菌を得た。 $4,000\times g$  にて 8 分間遠心後、得られたプロトプラストを 1 ml に約  $4\times 10^9$  個プロトプラストになるように P buffer に再懸濁させた。得られたプロトプラスト溶液を 100  $\mu$ l ずつエッペンドルフチューブに分注し、使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

preP buffer    sucrose 10.3 g,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.025 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.202 g,  
trace element solution 0.2 ml and distilled water to  
80 ml

P buffer        0.5 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 ml, 3.68 %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 ml,  
5.73 % TES buffer (pH 7.2) 10 ml and preP buffer  
80 ml

## 2.8.2. 放線菌の形質転換

-80 °C にて保存していたプロトプラスト溶液 100  $\mu$ l を 30 °C の湯浴上で急速に解凍した。これに DNA 溶液 5  $\mu$ l を加え穏やかに混和した。次に、100  $\mu$ l の T(-) buffer を加え混和し、さらに、375  $\mu$ l の T buffer を加えピペティングで混和し、1 分間室温にて静置した。5 ml の P buffer で希釈し、R5 再生培地に 1 ml ずつ塗り広げた。28 °C にて 12~16 時間培養しプロトプラストを少し再生させ、thiostrepton (Ts) 溶液 (100  $\mu$ g/ml) を 1 ml 重層し、さらに 28 °C にて 2~3 日間培養した。

preT(-) buffer	10.3 % sucrose 25 ml, H <sub>2</sub> O 75 ml, 2.5 % K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.2 ml and trace element solution 1 ml
T(-)buffer	5M CaCl <sub>2</sub> 0.2 ml, 1 M Tris-maleic acid buffer 0.5 ml and preT(-) buffer 9.3 ml
T buffer	T(-)buffer 3.0 ml and polyethyleneglycol 1,000 1.0 g

## 2.9. 放線菌からの無細胞抽出液の調製

放線菌の培養液を 5,000 $\times$ g, 4 °C にて 15 分間遠心し、得られた菌体を buffer III [10 mM Tris-HCl (pH 7.65), 1 M KCl, 10 mM Mg-acetate, 6 mM 2-mercaptoethanol and 5 mM Mg-titriplex] で 1 回、続いて、buffer IV [10 mM Tris-HCl (pH 7.65), 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM Mg-acetate, 6 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM Mg-titriplex and 3.45 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] にて 2 回洗浄した。次に、得られた湿菌体の重量と等量の石英砂を加え乳鉢で菌体を破碎した。さらに、等量の buffer IV を加えてそれらを遠沈管に洗い込み 5,000 $\times$ g, 4 °C にて 5 分間遠心した。その上清を更に 30,000 $\times$ g, 4 °C にて 30 分間遠心し、得られた上清を無細胞抽出液とした。

## 2.10. 大腸菌の無細胞抽出液の調製

大腸菌の培養液を 5,000 $\times$ g, 4 °C にて 10 分間遠心し菌体を得た。得られた菌体を buffer III で 1 回、続いて、buffer IV で 2 回洗浄した。菌体を buffer IV に再懸濁させ超音波破碎器 (Bioruptor, Orimpus) により 20 kHz にて 3 分間破碎し、30,000 $\times$ g, 4 °C にて 30 分間遠心し、得られた上清を無細胞抽出液とした。

## 2.11. 蛋白質の定量

蛋白質の定量は、Protein Assay Kit (BIO-RAD)を用いプロトコールに従って行った。標準蛋白質には、bovine serum albumin を使用した。

## 2.12. 蛋白質の N-末端アミノ酸配列決定

ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ゲルを転写 buffer [30 mM Tris, 30 mM borate and 0.02 % SDS] で 5 分間平衡化した。PVDF 膜 (Trans-Blot Transfer Medium, 0.2 micron, BIO-RAD) を methanol に浸し、転写 buffer 中でファイバーパット、3MM ろ紙、ゲル、PVDF 膜、3MM ろ紙、ファイバーパットの順にゲルホルダーカセットではさみ、転写装置にセットした。転写は、定電流 165 mA で 1 時間行った。転写後、PVDF 膜を水洗し、染色液 [0.1 % coomassie brilliant blue R-250, 1.0 % acetic acid and 40 % methanol] に 30 秒間浸しすぐに 50 % methanol で脱色した。よく水洗後、乾燥させ目的の蛋白質のバンドを切り出した。アミノ酸配列は、PSQ-2 オートペプチドシーケンサー (SIMADZ) により決定した。

## 2.13. PCR による放線菌由来 DNA 断片の増幅

放線菌由来 DNA の増幅は Ex Taq polymerase (TAKARA) を用い PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-700 (ASTEK) にて行った。反応溶液 [H<sub>2</sub>O 18.0  $\mu$ l, 10 $\times$  reaction buffer 5.0  $\mu$ l, d-NTP mix 4.0  $\mu$ l, sense primer (10  $\mu$ M) 5.0  $\mu$ l, antisense primer (10  $\mu$ M) 5.0  $\mu$ l, template DNA (10 ng/ml) 10.0  $\mu$ l, Ex Taq DNA polymerase (5 unit/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l and dimethylsulfoxide 2.5  $\mu$ l] を 1 サイクル目は変性が 95  $^{\circ}$ C にて 3 分間、アニーリングは 65  $^{\circ}$ C にて 45 秒間、伸長反応は 72  $^{\circ}$ C にて 90 秒間行った。2~30 サイクルについては変性は 95  $^{\circ}$ C にて 2 分間、アニーリングは 65  $^{\circ}$ C にて 45 秒間、伸長反応は 72  $^{\circ}$ C にて 90 秒間の条件で行った。

## 2.14. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

### 2.14.1. 試料調製

液体試料の場合、試料溶液と 2 倍濃度の sample buffer [4.0 % SDS, 12 % glycerol, 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.0 % 2-mercaptoethanol and 0.02 % bromophe-

nolblue] を1:1で混合して5分間煮沸し、試料溶液とした。大腸菌の全蛋白質の場合、大腸菌ペレット5  $\mu$ l を100  $\mu$ l の sample buffer と混合して5分間煮沸した後、8,000  $\times g$ にて5分間遠心した上清を試料溶液とした。

#### 2.14.2. 電気泳動

スラブゲル用ガラス板を ethanol で洗浄後組み立てた。分離用アクリルアミドゲル溶液 [acrylamide solution (30 % acrylamide and 0.8 % bisacrylamide) 2.67 ml, gel buffer (3.0 M Tris and 0.3 % SDS, pH 8.45) 2.0 ml, 20 % glycerol 3.33 ml, APS 8 mg and TEMED 4.0  $\mu$ l] を注ぎ上部に蒸留水を重層し、室温に放置して重合させた。次に、重層した蒸留水を取り除き、分離ゲルの上から濃縮用アクリルアミドゲル溶液 [acrylamide solution 0.4 ml, gel buffer 0.8 ml, H<sub>2</sub>O 1.8 ml, APS 3 mg and TEMED 1.5  $\mu$ l] を注ぎコームを差し込み、室温で放置し重合させた。重合完了後、コームを取り外しウェルを陰極 buffer [0.1M Tris, 0.1M tricine and 0.1 % SDS] で洗浄後、陰極 buffer および、陽極 buffer [0.2M Tris-HCl (pH8.9)] を注ぎ、泳動装置にセットした。試料溶液をウェルに注入し室温で泳動を行った。色素が濃縮ゲルを通過するまで定電流 20 mA で泳動し、その後定電流 40 mA で泳動した。分子量マーカーには SDS-PAGE standard broad range (BIO-RAD) [myosin (200,000 Da),  $\beta$ -galactosidase (116,250), phosphorylase B (97,400), serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), trypsin inhibitor (21,500), lysozyme (14,400) and aprotinin (6,500)] または SDS-PAGE size marker (Daiichi Pure Chemicals) [phosphorylase B (97,400), bovine serum albumin (66,300), aldolase (42,400), carbonic anhydrase (31,000), trypsin inhibitor (20,100) and lysozyme (14,400)] を使用した。

#### 2.14.3. 蛋白質の染色

泳動後、ゲルを取り出し染色液 [coomassie brilliant blue R-250 2.5 g, ethanol 450 ml, acetic acid 100 ml and H<sub>2</sub>O 450 ml] 中で2~3時間染色した。ついで、脱色液 [ethanol 50 ml, acetic acid 75 ml and H<sub>2</sub>O 875 ml] でバックグラウンドが消えるまで脱色した。

## 2.15. 等電点電気泳動

### 2.15.1. 試料調製

蛋白質溶液を凍結乾燥して得られた残渣を sample buffer [2.0 % ampholite (3~10 : 5~8 = 8 : 2, BIO-RAD), 8.5 M urea, 2.0 % nonidet P-40 and 5.0 % 2-mercaptoethanol] 20  $\mu$ l に溶解し、10  $^{\circ}$ C にて1時間インキュベートした。

### 2.15.2. 電気泳動

先ず、ガラス管 ( $\phi$ 3 mm $\times$ 12 cm) の一端をパラフィルムでシールした。このガラス管をスタンドに垂直に立て、等電点用アクリルアミドゲル溶液 [acrylamide solution (30 % acrylamide and 1.5 % bisacrylamide) 667  $\mu$ l, 0.004 % riboflavin 625  $\mu$ l, 0.45 % TEMED 2.8  $\mu$ l, APS 0.5 mg, 40 % ampholite(3~10 : 5~8 = 8 : 2) 250  $\mu$ l, urea 2.55 g, 20 % nonidet P-40, 500  $\mu$ l and H<sub>2</sub>O to 5.0 ml] を流し込んだ後蒸留水を重層し、照射下で3~5時間重合させた。ゲルが重合したら、泳動装置にセットし試料溶液 20  $\mu$ l を注入した。試料溶液の上に保護液 [2.0 % ampholite (3~10 : 5~8 = 8 : 2), 5.0 M urea and 2.0 % nonidet P-40] 20  $\mu$ l を重層し、さらにガラス管上部まで陽極 buffer [0.02 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>] を注入した。泳動槽に陰極 buffer [0.01 M NaOH] および、陽極 buffer を満たし泳動を開始した。泳動は、4  $^{\circ}$ C で定電圧 200 V にて2時間、300 V にて15時間、500 V にて1時間と順次行った。

### 2.15.3. 等電点測定

sample buffer を試料溶液として同様に電気泳動した。電気泳動後すぐにゲルを取り出し、0.5 cm 間隔で切断し試験管に入れた。それぞれに2 ml の蒸留水を加え30分間振盪後、溶液の pH を測定して検量線を作製した。測定試料は泳動後、実験法 2.14.3. と同様の方法でゲルを染色して、ゲル端から試料までの距離を計り、検量線からその等電点を求めた。

### 3. 第一章の実験

#### 3.1. Bm アセチル化活性測定法

##### 3.1.1. [1-<sup>14</sup>C] AcCoA を用いた Bm アセチル化酵素活性の測定

反応液 [enzyme, 10 mM Tris-HCl (pH 7.65), 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM Mg-acetate, 6 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM BmA<sub>2</sub> sulfate and 0.1mM [1-<sup>14</sup>C] AcCoA (422 MBq/mmol)] を 37 °C にて 15 分間インキュベートした後、ただちに Whatman P81 Phosphocellulose paper (1.5×1.5 cm) にスポットして 1 分間放置後、大量の蒸留水で未反応の AcCoA を洗い流した。paper をライト下で乾燥させ、バイアル瓶に入れ ACSII (Amersham) を 6 ml 加え、液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-3100) にて paper に残存する <sup>14</sup>C の放射活性を測定した。

##### 3.1.2. *Bacillus subtilis* を被検菌とした Bm 不活化活性測定

反応液 [enzyme, 10 mM Tris-HCl (pH 7.65), 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM Mg-acetate, 6 mM 2-mercaptoethanol, 100 µg BmA<sub>2</sub> sulfate and 2 mM AcCoA] を 37 °C にて 2 時間インキュベート後、65 °C にて 3 分間で酵素を失活させ、8,000×g にて 5 分間遠心した。その上清 50 µl をペーパーディスクにしみ込ませ、*B. subtilis* IFO 3134 孢子寒天プレート [上層 : LB (1.5 % agar, *B. subtilis* 孢子懸濁液) 5 ml、下層 : LB (1.5 % agar) 20 ml] 上に置き 37 °C で一晩培養し翌日、阻止円の直径を測定した。

#### 3.2. pMAL-B1 の構築

プラスミド p181B17 を *Spl*I 及び *Nco*I で二重消化し、*blmB* を含む約 2 kb の DNA 断片を精製した。この DNA 断片を鋳型 DNA とし、プライマー A および B (図 3) を用いて PCR 反応を行った。増幅した DNA 断片を *Bam*HI および *Pst*I で二重消化し、同様に *Bam*HI および *Pst*I で二重消化したプラスミド pMAL-c2 へ挿入した。

#### 3.3. 大腸菌における BAT の大量発現と精製

大腸菌 TB1[pMAL-B1] を Ap 100 µg/ml を含む 4 ml LB 培地で 37 °C にて一晩培養した。その培養液 1 ml を Ap 100 µg/ml を含む LB 培地 3 L に植菌し 37 °C にて振

盪培養した。対数増殖期中期 (O.D. 600 nm = 0.5) に最終濃度 0.3 mM となるように IPTG を添加した後、さらに定常期まで盪培養した。大腸菌培養液を 5,000×g, 4℃ にて 10 分間遠心し菌体を得た。得られた菌体を column buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA·2Na and 10 mM 2-mercaptoethanol] で洗浄後、菌体の湿重量と等量の石英砂を加え乳鉢で菌体を破碎した。30,000×g, 4℃ にて 30 分間遠心し、得られた無細胞抽出液を column buffer で平衡化したアミロースカラム ( $\phi$  1.0×10 cm, New England BioLabs) にかき MBP/BAT を吸着させた、100 ml の column buffer で洗浄後、10 mM の maltose を含む column buffer で融合蛋白質を溶出した。得られた融合蛋白質溶液に 1/10 容量の factor Xa reaction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub> and 100 mM sodium azide] を加え、さらに factor Xa プロテアーゼを融合蛋白質 50 mg に対し 1 mg 加え、4℃ にて 20 時間反応させ MBP と BAT に切断した。この反応液を 50 mM Tris-HCl (pH 7.65) に対して透析後、ResourceQ イオン交換カラム ( $\phi$  0.64×3 cm, Pharmacia) に吸着させ、0 ~ 0.5 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.65) のリニアグラジエントで溶出し、MBP と BAT を分離した。この方法で BAT を単一蛋白質として約 5 mg 精製することができた。

#### 3.4. fBAT 活性の pH 依存性、温度安定性、金属イオンおよび阻害剤の影響

pH 依存性は、反応液 [0.55  $\mu$ g fBAT, 10 mM phosphate buffer (pH 5~7.5), 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 88  $\mu$ M BmA<sub>2</sub> sulfate and 98  $\mu$ M [1-<sup>14</sup>C] AcCoA (422 MBq/mmol)] を 37℃ にて 10 分間インキュベート後、実験法 3.1.1. と同様の方法にて <sup>14</sup>C 放射活性を測定した。

温度安定性は、fBAT 0.55  $\mu$ g を 10 mM Tris-HCl (pH 7.65) にて各温度で 10 分間放置した後、反応液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.65), 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 88  $\mu$ M BmA<sub>2</sub> sulfate and 98  $\mu$ M [1-<sup>14</sup>C] AcCoA (422 MBq/mmol)] を 37℃ にて 10 分間インキュベート後、実験法 3.1.1. と同様の方法にて <sup>14</sup>C 放射活性を測定した。

金属イオンおよび阻害剤の影響は、反応液 [fBAT 0.55  $\mu$ g, 1 mM inhibitor, 10 mM Tris-HCl (pH 7.65), 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 88  $\mu$ M BmA<sub>2</sub> sulfate and 98  $\mu$ M [1-<sup>14</sup>C] AcCoA (422 MBq/mmol)] を 37℃ にて 10 分間インキュベート後、実験法 3.1.1. と同様の方法にて <sup>14</sup>C 放射活性を測定した。

### 3.5. fBAT の基質特異性

Pem, Phm (mixture) および Phm-MOP は、3.1.1. の測定方法でアセチル化活性を測定した。また、Ba は Whatman P81 Phosphocellulose paper に結合しないので、アセチル化反応により生じた CoA の SH 基を定量することによりアセチル化活性を測定した。Ba を除いた反応液 [enzyme solution 100  $\mu$ l, 10 mM AcCoA 10  $\mu$ l, 100 mM Tris-HCl (pH 7.65) 100  $\mu$ l, 1.0 mg/ml 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 400  $\mu$ l and H<sub>2</sub>O 380  $\mu$ l] をセルに入れ 28  $^{\circ}$ C にて 2.5 分間インキュベートした。その後 10 mM Ba 10  $\mu$ l を加え 28  $^{\circ}$ C にて 40 分間反応させ、412 nm の吸光度を測定した。なお、基質を加えないものをコントロールとした。

Km, Gm および Abk の不活化活性は以下の方法で測定した。20 mM Tris-HCl (pH 7.65) 中、fBAT と各抗生物質を 37  $^{\circ}$ C にてインキュベートした後、反応液を *B. subtilis* IFO 3134 孢子寒天プレート上に置いたステンレスシリンダー ( $\phi$  6 $\times$ 11 mm) 中に注入し、37  $^{\circ}$ C にて一晩培養後阻止円の直径を測定した。

### 3.6. BmA<sub>2</sub> に対する K<sub>m</sub> 値

BmA<sub>2</sub> の濃度を 2, 3, 4, 5, 6  $\mu$ M と変化させ、反応液 [fBAT 0.84  $\mu$ g, 10 mM Tris-HCl (pH 7.65), 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2~6  $\mu$ M BmA<sub>2</sub> sulfate and 98  $\mu$ M [1-<sup>14</sup>C] AcCoA (2.11 GBq/mmol)] を 37  $^{\circ}$ C にて 10 分間インキュベートした後、実験法 3.1.1 と同様に放射活性を測定した。次に、Lineweaver-Burk プロット解析により K<sub>m</sub> 値を算出した。

### 3.7. 抗BATモノクローナル抗体の作製

精製した MBP/BAT 50  $\mu$ g を生理食塩水 50  $\mu$ l に溶解し、完全 Freund's アジュバント 50  $\mu$ l と混合した。この混合溶液を BALB/c マウスに腹腔内投与し、さらに、7, 14, 29 および 36 日目に MBP/BAT 50  $\mu$ g を投与した。39 日目に脾細胞を分離し、マウスミエローマ細胞 P3/X63-Ag-8.U1 と融合させた。次に、MBP/BAT, MBP および BAT を抗原として用いた ELISA 法により BAT および MBP/BAT に反応する抗体を産生するハイブリドーマ細胞が含まれるウェルをスクリーニングした。さらに、限外希釈法により、抗 BAT モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を単離した。得られた細胞が産生する抗体が BAT および MBP/BAT に反応することを ELISA により確認した。次に、抗体を産生するハイブリドーマを RPMI1640-10 % FSC 培地で 37  $^{\circ}$ C

にて前培養を行った後、無血清培地 RFHM-II (Gibco) に交換し、細胞が増殖し、死滅するまで培養した。この培養液 1 L を濾紙 (東洋濾紙 No. 131) にて濾過した。この濾液を 60 % 飽和 ammonium sulfate で 4 °C にて塩析した。塩析物を Protein A column buffer [ 0.1 M borate and 0.15 M NaCl, pH 8.5 ] にて透析した。次に、同 buffer で平衡化した Protein A-セルロファインカラム ( $\phi$  28×85 mm, 生化学工業) に吸着し、同 buffer にて充分洗浄後、溶出 buffer [ 0.1 M glycine-HCl, pH 3.0 ] にて抗体を溶出した。溶出した抗体は PBS [76 mM phosphate and 0.45 % NaCl, pH 6.4] にて透析した後、蛋白質濃度を測定した。

### 3.8. ELISA 法

96-穴イムノプレート (Maxisorp, Nunc) に PBS にて 1  $\mu$ g/ml に調製した抗原溶液 (MBP/BAT, MBP または BAT) を 100  $\mu$ l 注入し、37 °C にて 1 時間インキュベートすることで抗原を固相化した。次に、イオン交換水でよく洗浄し、PBS に溶解した 0.5 % BSA を注入し、室温で 2 時間放置した。イオン交換水で洗浄後、アッセイ buffer [10 % normal rabbit serum and 0.1 % BSA in PBS] にて調製したモノクローナル抗体液 100  $\mu$ l を注入し、室温で 1 時間反応させた。次に、PBS にてよく洗浄後 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG (Dako-Japan) を 100  $\mu$ l 注入し、室温で 1 時間放置した。次に、PBS にて洗浄後、基質溶液 [0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 5.0), 0.1 % (w/v) o-phenylenediamine and 0.01 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] を注入し、室温で 10 分間反応させた。1 N HCl を 100  $\mu$ l 加え反応を停止させ、490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (東洋測器) により測定した。

### 3.9. ウェスタンブロット法

実験法 2.14.2. の方法にて蛋白質試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ゲルを転写 buffer [ 25 mM Tris, 192 mM glycine and 20 % methanol ] で 5 分間平衡化した。PVDF 膜 (Trans-Blot Transfer Medium, 0.2 micron, BIO-RAD) を methanol に浸し、転写 buffer 中でファイバーパット、3MM ろ紙、ゲル、PVDF 膜、3MM ろ紙、ファイバーパットの順にゲルホルダーカセットではさみ、転写装置にセットした。転写は、定電流 165 mA で 1 時間行った。バンドの検出は Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories, Inc) を用いて行った。転写終了後の PVDF 膜を 20 % skim milk を含む TBS [ Tris-HCl (pH 7.5) and 0.9 % NaCl ] で 2 時間ブロッキングした後、TBS で 3 回、計 15 分間洗浄した。次に、TBS で 1,000 倍希釈した抗 BAT または BLMA モノ

クローナル抗体に浸して 30 分間反応させた後、同様に TBS で洗浄した。引き続き、TBS で 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈したビオチン化抗マウス IgG (Vector Laboratories, Inc) 溶液に浸して 30 分間反応させた後、同様に TBS で洗浄した。更に、ABC 溶液 [reagent A 2 drops, reagent B 2 drops and TBS 10 ml] に浸し 30 分間振盪させ、同様に TBS で洗浄した。基質溶液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 10 ml, 40 mg/ml diaminobenzidine tetrahydrochloride 200  $\mu\text{l}$ , 80 mg/ml  $\text{NiCl}_2$  50  $\mu\text{l}$  and 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  30  $\mu\text{l}$ ] を加え発色後、蒸留水で 2 回洗浄した。PVDF 膜は風乾させて保存した。

### 3.10. *S. lividans* [pMSA-4] からの BAT の精製

#### 3.10.1. 抗体カラムの作製

抗 BAT モノクローナル抗体 2 mg と Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) 0.2 g を 8 ml の PBS 中室温で 2 時間穏やかに攪拌した。次に、800 $\times g$  の遠心により上清を除いた後、8 ml の 0.2 M sodium borate (pH 9.0) で 2 回洗浄した。次に、dimethylpiperimidate 41.6 mg を含む 8 ml の 0.2 M sodium borate (pH 9.0) に樹脂を懸濁させた後、室温にて 30 分間穏やかに攪拌した。8 ml の 0.2 M ethanolamine にて 2 回洗浄後、抗体が固定された Protein A-Sepharose を 0.2 M ethanolamine 中 2 時間インキュベートした。この試料をカラム ( $\phi$  0.5 $\times$ 5 cm) に注ぎ、PBS にて洗浄した。

#### 3.10.2. BAT の精製

*S. lividans* [pMSA-4] を Ts 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と Bm 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む GMP 培地で 28  $^{\circ}\text{C}$  にて 4 日間培養し、無細胞抽出液を調製した。無細胞抽出液に固形 ammonium sulfate を 80 % 飽和になるように加え、4  $^{\circ}\text{C}$  にて 1 時間攪拌した。30,000 $\times g$  の遠心で得られた沈殿を 3 ml の buffer IV に溶解し、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に透析した。この蛋白質溶液を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム ( $\phi$  1 $\times$ 50 cm, Pharmacia) にアプライした。溶出は 0 $\sim$ 1.0 M の NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) のリニアグラジエントにより行った。活性画分を限外濾過器 (CENTRICUT 10, クラボウ) を用いて濃縮後、抗 BAT 抗体カラムに吸着させ、1.0 % SDS を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で溶出させた。

### 3.11. *S. verticillus* における Bm 生産と自己耐性遺伝子の発現時期

所定時間培養した *S. verticillus* の培養上清 200  $\mu$ l を、*B. subtilis* IFO3134 孢子寒天プレート上に置いたステンレスシリンダー ( $\phi$  6 $\times$ 11 mm) 中に注入し、37  $^{\circ}$ C にて一晩培養し翌日阻止円の直径を測定することで Bm 生産量を算出した。*blmA* および *blmB* の発現は無細胞抽出液の蛋白質 20  $\mu$ g を Tricine-SDS-PAGE で電気泳動後、抗 BAT または抗 BLMA モノクローナル抗体を用いたウエスタン解析 (実験法 3.9.) により検出した。

## 4. 第二章の実験

### 4.1. Pm 不活化酵素活性測定法

#### 4.1.1. *Bacillus cereus* IFO 3001 を被検菌とした Pm 不活化酵素活性測定

酵素溶液 150  $\mu$ l に酵素反応溶液 [80 mM Tris-HCl (pH 7.65), 10 mM Mg-acetate, 6 mM 2-mercaptoethanol and 200  $\mu$ g Pm dihydrochloride] を 50  $\mu$ l 加え 37  $^{\circ}$ C にて 20 分インキュベートした。70  $^{\circ}$ C にて 10 分間加温し酵素を失活させた後、4,700 $\times$ g にて 5 分間遠心した。その上清 100  $\mu$ l を *B. cereus* IFO 3001 孢子寒天プレート (PMS 培地) 上に置いたステンレスシリンダー ( $\phi$  6 $\times$ 11 mm) 中に注入し、37  $^{\circ}$ C にて一晩培養し翌日阻止円の直径を測定した。Pm 不活化酵素活性は残存している Pm の抗菌活性より算出した。

#### 4.1.2. HPLC による Pm 不活化酵素活性測定

4.1.1. の酵素反応液 20  $\mu$ l を以下の条件で HPLC に導入し、残存 Pm 量を定量した。HPLC 条件 [Column ; Wakosil 5C-18-200T ( $\phi$  4.6 $\times$ 250 mm, Wako Pure Chemical), Flow rate ; 1.0 ml/min, Mobile phase ; acetonitril : 0.1 % trifluoroacetic acid (6 : 94), Column temperature ; 45  $^{\circ}$ C , Detection : UV260 nm ]。標品のピーク面積の検量線より Pm 濃度を算出した。

### 4.2. TLC による Pm 不活化産物の分析

酵素反応液の一部を TLC シート (silica gel 60 F<sub>254</sub>-precoated TLC, Merck) にス

ポットし、展開溶媒 [*n*-butanol : methanol : 2N ammonia = 6 : 1 : 1] により展開した。スポットの検出は、UV 254 nm を用いた。

#### 4.3. Pm 不活化産物の精製および構造解析

実験法 4.1.2. と同じ HPLC 条件で不活化産物のピークを分取し、凍結乾燥した。<sup>1</sup>H-NMR 測定は、試料を D<sub>2</sub>O (99.9 atom % D, Aldrich) に溶解後、DCl (Merck) および NaOD (Merck) にて pD 3.0 に調製し、JEOL JMN α400 (400 MHz) にて測定した。測定温度は 35 °C で行い、内部標準として、3-(trimethylsilyl)propionic 2,2,3,3,-d<sub>4</sub> acid を測定試料に添加した。

マスマスペクトル測定は、FAB (fast atom bombardment) イオン化法により行った。測定装置は、JMS-SX102 マスマスペクトロメーター (JEOL) を使い、JMA-DA6000 データシステム (JEOL) で解析した。なお、測定するときの試料マトリックスは glycerol を使用した。

UV 吸収スペクトルおよび比旋光度の測定は、試料を methanol に溶解し、それぞれ 124 スペクトロメーター (HITACHI) および PM-101 (UNION GIKEN) を用いて測定した。

#### 4.4. Pm 加水分解酵素の精製

*S. morookaensis* を YEME 培地 12 L にて 30 °C にて 4 日間培養し、無細胞抽出液を調製した。以下の操作は全て 6 °C にて行った。得られた無細胞抽出液に最終濃度 0.9 M となるように固形の ammonium sulfate を加え 30 分間攪拌した。30,000×*g* の遠心により得られた上清を 0.9 M ammonium sulfate を含む buffer A [20 mM Tris-HCl (pH 7.65), 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT] で平衡化した Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia) にかき、0.9~0 M ammonium sulfate を含む buffer A のリニアグラジエントにて溶出した。得られた活性画分 (12 ml) を polyethylene glycol 6,000 と混合し、10 % glycerol を含む buffer A に透析した。透析した酵素溶液を 10 % glycerol を含む buffer A で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia) にかき、同 buffer にてカラムを洗浄後、0~1.0 M NaCl を含む buffer A のリニアグラジエントで溶出した。得られた活性画分 (7 ml) を 1.4 M ammonium sulfate を含む buffer A に透析した。この酵素溶液を 1.4 M ammonium sulfate を含む buffer A で平衡化した Ether-Toyopearl 650 (TOSOH) にかき、同 buffer にて洗浄後、1.4 ~1.2 M ammonium sulfate を含む buffer A のリニアグラジエントで溶出させた。得られた活性画分 (4

ml) を USY-5 (ADVANTEC) にて限外濾過して濃縮後、10 % glycerol を含む buffer A に透析した。次に、透析した試料を 10 % glycerol を含む buffer A で平衡化した Fractogel EMD DEAE-650 (Merck) にかき、0.15 M の NaCl を含む buffer A にて洗浄後、0.15~0.35 M の NaCl を含む buffer A のリニアグラジエントで溶出した。得られた活性画分 (3 ml) を USY-5 にて濃縮後、0.1 M NaCl を含む buffer A で平衡化した Toyopearl HW-55 (TOSOH) にかき、同 buffer にて溶出した。精製された Pm 加水分解酵素は 20 % glycerol 中 -20 °C にて保存した。

#### 4.5. ゲル濾過法による分子量測定

ゲル濾過による分子量測定は Toyopearl HW-55 (TOSOH) カラムにて、溶出は 0.1 M NaCl を含む buffer A で行った。分子量マーカー蛋白質は、BSA (68 kDa), ovalbumin (43.0 kDa),  $\alpha$ -chymotrypsinogen (25.7 kDa) および lysozyme (14.4 kDa) を用いた。

#### 4.6. Pm 加水分解酵素活性の pH と温度依存性、温度安定性および阻害剤の影響

全て、実験法 4.1.1. の活性測定方法を用いた。pH 依存性の測定 buffer は、pH 5.5~8.0 は sodium phosphate buffer、pH 7.5~9.5 は Tris-HCl buffer、pH 9.0~11.0 は sodium carbonate buffer を用いた。温度依存性は各温度にて反応時間は 20 分で行った。温度安定性は Pm 加水分解酵素を 50 mM Tris-HCl (pH 7.65) にて各温度で 15 分間放置した後、Pm の残存抗菌活性を測定した。

阻害剤の影響は、酵素 1.3  $\mu$ g と各阻害剤 1 mM を 37 °C にて 10 分間インキュベートした後、実験法 4.1.2. の活性測定方法を用いて酵素活性を測定し、その値から阻害率を算出した。

#### 4.7. Pm 加水分解酵素の基質特異性

蛋白質加水分解活性の測定は、基質として hammarsten casein, gelatin, BSA, hemoglobin および ovalbumin を使用した。1 ml の Pm 加水分解酵素 (25  $\mu$ g/ml) と 1 ml の基質溶液 [1.0 % (w/v) each proteins and 50 mM Tris-HCl (pH 7.65)] を混合し、37 °C にて 30 分間インキュベートした後、最終濃度 0.2 M となるように trichloroacetic acid を加え反応を止めた。この溶液を 30,000 $\times$ g の遠心にかき、上清の trichloroacetic acid 可溶ペプチド量を Lowry 法 [Lowry *et al.*, 1951] により求めた。

抗生物質の不活化活性は以下の方法で測定した。20 mM Tris-HCl (pH 7.65) 中 78  $\mu\text{g}$  の Pm 加水分解酵素と各抗生物質を 37  $^{\circ}\text{C}$  にてインキュベートした後、反応液を Ap, amoxicillin および Cp は *Staphylococcus aureus* IFO 12732 を重層した PMS 寒天プレート、viomycin および Bs は *B. cereus* IFO 3001 胞子寒天プレート上に置いたステンレスシリンダー ( $\phi$  6 $\times$ 11 mm) 中に注入し、37  $^{\circ}\text{C}$  にて一晚培養し阻止円の直径を測定した。

## 5. 第三章の実験

### 5.1. デレーションミュータントの作製

プラスミド p118CSR および p118CSRR を *SphI* および *BamHI* で二重消化し、Kiro-Sequence 用 Deletion Kit (TAKARA) を用いてプロトコールに従ってデレーションした。Exonuclease III によるデレーション反応は 25  $^{\circ}\text{C}$  で行った。デレーションしたプラスミドを大腸菌 JM109 株に導入し、約 200 bp ずつ削れたプラスミドをもつデレーションミュータントを選択した。

### 5.2. DNA 塩基配列決定

#### 5.2.1. 一本鎖鋳型 DNA の調製

シーケンスする断片が挿入されたプラスミドを持つ大腸菌 JM109 株を Ap 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む LB 培地 4 ml で 37  $^{\circ}\text{C}$  にて一晚培養した。その培養液 3  $\mu\text{l}$  を Ap 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む 2 $\times$ TY 培地 3 ml に植菌し、37  $^{\circ}\text{C}$  にて O.D. 600 nm が 0.1 ~ 0.3 になるまで培養し、ヘルパーファージ M13KO7 (moi=2~10) を 15  $\mu\text{l}$  添加した。さらに、37  $^{\circ}\text{C}$  にて 1 時間培養した後、Km (42 mg/ml) を 5  $\mu\text{l}$  加え、続けて一晚培養した。培養液 1.3 ml をエッペンドルフチューブにとり 10,000 $\times g$  にて 5 分間遠心した。その上清 1 ml を慎重にとり、200  $\mu\text{l}$  の PEG/NaCl 溶液 [20% polyethylene glycol 6,000 and 2.5 M NaCl] を加え、よく攪拌した。室温に 30 分間放置後、8,000 $\times g$  にて 5 分間遠心した。得られた沈殿を 100  $\mu\text{l}$  の TE 溶液に溶解後、TE 溶液飽和 phenol 100  $\mu\text{l}$  を加え vortex にて攪拌した。8,000 $\times g$  にて 5 分間遠心した上清に、TE 溶液飽和 phenol/chloroform (1:1) 溶液 100  $\mu\text{l}$  を加え再度 vortex した。8,000 $\times g$  にて 5 分間遠心し、得られた水層を新しいチューブに移した。その水層に 10  $\mu\text{l}$  の 3 M sodium acetate と 250  $\mu\text{l}$  の冷 ethanol を加え攪拌し、-80  $^{\circ}\text{C}$  にて 30 分間放置した。8,000 $\times g$  にて 10 分間遠心して、得られた沈澱を冷 70% ethanol で洗浄後減圧乾燥した。得ら

れた一本鎖 DNA は滅菌水に溶解しシーケンス反応に用いた。

### 5.2.2. シーケンス DNA サンプルの調製

AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia)を用いて行った。アニーリング反応液 [ single strand DNA (1~2  $\mu\text{g}$ ) 13  $\mu\text{l}$ , fluorescent primer (1~2 pmol) and annealing buffer 2  $\mu\text{l}$ ] を 60  $^{\circ}\text{C}$  にて 10 分間インキュベート後、20  $^{\circ}\text{C}$  にて 10 分間以上放置した。その溶液に Extension buffer 1  $\mu\text{l}$  と T7 DNA Polymerase (1.5 unit/ $\mu\text{l}$ ) 2  $\mu\text{l}$  を加え混和した。これを各 d/dd NTP Mix 2.5  $\mu\text{l}$  の入ったチューブに 4.5  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、37  $^{\circ}\text{C}$  にて 5 分間伸長反応を行い、Stop solution 5  $\mu\text{l}$  を加え反応を停止した。

### 5.2.3. 電気泳および塩基配列の決定

シーケンスゲル電気泳動は、ALF II DNA auto sequencer (Pharmacia) を用いて行った。0.5 mm 厚のゲル [6 % acrylamide (Long Ranger gel solution), 6 M urea, 100 mM Tris, 83 mM borate and 1 mM EDTA  $\cdot$  2Na] を作製し、実験法 5.2.2. で調製したサンプルを 95  $^{\circ}\text{C}$  にて 3 分間熱変性後、急冷させたもの 5  $\mu\text{l}$  をアプライした。TBE [ 100 mM Tris, 83 mM borate and 1 mM EDTA  $\cdot$  2Na] を泳動 buffer として用い、700 V, 34 mA, 37 W, ゲル温度 47  $^{\circ}\text{C}$ , サンプリングタイムインターバル 1.75 秒にて 10 時間泳動した。DNA 塩基配列の読みとりは、ALF Manager (Pharmacia) により行った。

### 5.3. Cs 耐性遺伝子領域の決定

p118CSRR を *EcoRI* および *HindIII* で二重消化し、得られた 3.8 kb DNA 断片を pUC18 および pUC19 の *EcoRI/HindIII* サイトにサブクローニングし、p18CSR および p19CSR を構築した。次に、p18CSR を *KpnI/HindIII* または *PstI/EcoRI* で二重消化して得られるそれぞれ約 1.2 kb または 3.2 kb の DNA 断片を同じ制限酵素の組み合わせにより消化した pUC19 にサブクローニングし、プラスミド pIM-2 および pIM-8 を構築した。また、p18CSR を *EcoRV/EcoRI* または *KpnI/EcoRI* で二重消化して得られる断片を *SmaI/EcoRI* または *KpnI/EcoRI* で二重消化した pUC18 にサブクローニングし、プラスミド pIM-3 および pIM-6 を構築した。

次に、決定した塩基配列に基づいてプライマーを設計・合成し (pCSPC5 ; 5'-GACGGAATTCCCGAGGAGTTCGCCT-3', 5'-ACGAGGATCCTCACCGGCGCGGCCGCGTG-3' ,

pCSPC6 ; 5'-GACGGAATTCCCGAGGAGTTCGCCT-3', 5'-TCCCGGATCCTCATGACGGCCGCG-  
CG-3', pCSPC9 ; 5'-GACGGAATTCCCGAGGAGTTCGCCT-3', 5'-GCGTGCATGCTCACGAC-  
GACCGCGC-3', pCSPC12 ; 5'-GCCCCAAITTCCTACTCGCGCGCCGACTTCC-3', 5'-GCGTGC-  
ATGCTCACGACGACCGCGC-3') PCR 法により各 DNA 断片を増幅させ pUC18 の *EcoRI*/  
*SphI* サイトに挿入しプラスミドを構築した。それぞれのプラスミドを持つ大腸菌  
JM109 株を Cs 100 µg/ml を含む LB 培地で 37 °C にて培養し、増殖した株を Cs 耐性  
の形質転換体とした。

#### 5.4. MIC 測定法

抗生物質をそれぞれ 800, 400, 200, 100, 50, …… 0.39, 0.20, 0.10 µg/ml を含む  
LB 寒天培地を作製した。大腸菌は予め LB 培地にて一晩培養した。その培養液 5 µl を  
寒天プレート上にスポットし、37 °C にて 18 時間培養後その増殖を検定した。

#### 5.5. サザンブロット解析

##### 5.5.1. DNA のアルカリトランスファー

放線菌から調製した染色体 DNA 10 µg を *Bam*HI にて完全消化後、中型サブマリ  
ンゲルで通常のアガロースゲル電気泳動を行った。その後、0.4 M NaOH にて、ナイロ  
ンメンブレン (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) にトランスファーした。その後、2×SSPE  
[ 20×SSPE; 3.6 M NaCl, 0.2 M sodium acetate and 0.02 M EDTA · 2Na , pH 7.7 ] で  
洗浄し、風乾した。

##### 5.5.2. DNAプローブの標識

プラスミド pCSPC9 を *EcoRI* および *Hind*III にて二重消化し、*orfA* と *orfB* 遺伝  
子を含む約 1.2 kb の DNA 断片をアガロース電気泳動により精製したものをプローブ  
とした。その DNA 断片を Nick Translation Kit (TAKARA) を用いてラベリングした。  
反応液 [H<sub>2</sub>O 24 µl, DNA (0.5 µg) 5 µl, dNTP/10×buffer 4 µl, Enzyme solution (4  
unit) 1 µl and [α-<sup>32</sup>P] dATP (10 mCi, 12.5 nmol/ml) 5 µl ] をエッペンドルフチューブ  
に調製し、15 °C にて 2 時間インキュベートした。直ちに 5 µl の反応停止液を加え、  
70 °C にて 10 分間加温し酵素を失活させた。次に、TE 溶液 300 µl を加え、遠心濾過チュ  
ーブ (SURPEC<sup>TM</sup>-02, TAKARA) に移し、2,000×g にて 8 分間遠心し、フィルタ

一下に落ちた液を除いた。この操作を4回繰り返す、未反応の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ を除いた。フィルター上に残っている液を別のチューブに移し、TE溶液で100  $\mu\text{l}$ にした。その内5  $\mu\text{l}$ を用いて放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、ラベリング効率を調べた。

### 5.5.3. ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションバッグ (コスモ・バイオ) にプレハイブリダイゼーション溶液 [20 $\times$  SSPE 5.0 ml, 50 $\times$  Denhardt's solution (1.0% BSA, 1.0% Ficoll type 400 and 1.0% polyvinylpyrrolidone) 2.0 ml, 10% SDS 1.0 ml, denaturated salmon sperm DNA (1 mg/ml) 0.4 ml and H<sub>2</sub>O 11.6 ml] および実験法 5.5.1. で調製したメンブレンを入れシールした。65  $^{\circ}\text{C}$  にて1時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、標識したDNAプローブを100  $^{\circ}\text{C}$  にて5分間の加熱により変性させたものを加え、65  $^{\circ}\text{C}$  にて12時間ハイブリダイゼーションした。次に、メンブレンを0.1% SDSを含む2 $\times$ SSPE、0.1% SDSを含む1 $\times$ SSPE、0.1% SDSを含む0.5 $\times$ SSPEにて65  $^{\circ}\text{C}$  にて10分間ずつ順次洗浄した後風乾させた。

### 5.5.4. オートラジオグラフィ

メンブレンをラップで包み、暗室でHyperfilm-MP (Amersham) に貼り付けた。これを、カセットに入れ、-70  $^{\circ}\text{C}$  にて2時間露光した。次に暗室でフィルムを取り出し、RENDOL (FUJIFILM) に5分間、3.0% 酢酸に1分間、RENFIX (FUJIFILM) に5分間浸した後、フィルムを流水でよく洗浄した。

## 6. 使用抗生物質

arbakacin sulfate	明治製菓 (株)
amoxicillin	和光純薬工業 (株)
ampicillin sodium	和光純薬工業 (株)
blastidicin S	科研製薬 (株)
bleomycinic acid copper complex	日本化薬 (株)
bleomycin A <sub>2</sub> sulfate	日本化薬 (株)
chloramphenicol	和光純薬工業 (株)
D-cycloserine	明治製菓 (株)

erythromycin	SIGMA
fosfomicin sodium	明治製菓 (株)
kanamycin disulfate	MERCK
O-methyl-L-tyrosine	SIGMA
ofloxacin	第一製薬 (株)
peplomycin	日本化薬 (株)
phleomycin (mixture)	SIGMA
phleomycin-MOP copper complex	日本化薬 (株)
puromycin aminonucleoside	SIGMA
puromycin dihydrochloride	SIGMA
tetracycline hydrochloride	和光純薬工業 (株)
thiostrepton	SIGMA
vancomycin hydrochloride	塩野義製薬 (株)
viomycin	SIGMA

## 【参考文献】

- Allard, J. D. and Bertrand, K. P. (1992) Membrane topology of the pBR322 tetracycline resistance protein. *TetA-PhoA* gene fusions and implications for the mechanism of TetA membrane insertion. *J. Biol. Chem.* **267**: 17809-17819.
- Arondel, V., Benning, C. and Somerville, C. R. (1993) Isolation and functional expression in *Escherichia coli* of a gene encoding phosphatidylethanolamine methyltransferase (EC 2.1.1.17) from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* **268**: 16002-16008.
- Barrasa, M. I., Tercero, J. A., Lacalle, R. A. and Jimenez, A. (1995) The *ardl* gene from *Streptomyces capreolus* encodes a polypeptide of the ABC-transporters superfamily which confers resistance to the aminonucleoside antibiotic A201A. *Eur. J. Biochem.* **228**: 562-569.
- Barthelemy, P., Autissier, D., Gerbaud, G. and Courvalin, P. (1984) Enzymic hydrolysis of erythromycin by a strain of *Escherichia coli*. A new mechanism of resistance. *J. Antibiot.* **37**: 1692-1696.
- Benveniste, R. and Davies, J. (1973) Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**: 2276-2280.
- Bhuiyan, M. Z. A., Ueda, K., Inoue, Y. and Sugiyama, M. (1995) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of bleomycin-resistance gene from a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its association with IS431 *mec*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 65-69.
- 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.
- Bibb, M. J., Janssen, G. R. and Ward, J. M. (1985) Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* **38**: 215-226.
- Brömme, D., Rossi, A. B., Smeeckens, S. P., Anderson, D. C. and Payan, D. G. (1996) Human bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, functional expression, and enzymatic characterization. *Biochemistry* **35**: 6706-6714.
- Brosius, J. and Holy, A. (1984) Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic *lac* operator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**: 6929-6933.

- Buche, A., Mendez, C. and Salas, J. A. (1997) Interaction between ATP, oleandomycin and the OleB ATP-binding cassette transporter of *Streptomyces antibioticus* involved in oleandomycin secretion. *Biochem. J.* **321**: 139-144.
- Burger, R. M., Peisach, J. and Horwitz, S. B. (1982) Effects of O<sub>2</sub> on the reactions of activated bleomycin. *J. Biol. Chem.* **257**: 3372-3375.
- 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.
- Calcutt, M.J. and Schmidt, F.J. (1994) Gene organization in the bleomycin-resistance region of the producer organism *Streptomyces verticillus*. *Gene* **151**: 17-21.
- Cerna, J., Rychlik, I. and Pulkrabek, P. (1969) The effect of antibiotics on the coded binding of peptidyl-tRNA to the ribosome and on the transfer of the peptidyl residue to puromycin. *Eur. J. Biochem.* **9**: 27-35.
- Chater, K.F. and Bruton, C. J. (1985) Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. *EMBO J.* **4**: 1893-1897.
- Cramer, R. and Davies, J. E. (1986) Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes. *J. Antibiot.* **39**: 128-135.
- Cundliffe, E. (1989) How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 207-233.
- Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**: 375-382.
- Dittrich, W., Betzler, M. and Schrempf, H. (1991) An amplifiable and deletable chloramphenicol-resistance determinant of *Streptomyces lividans* 1326 encodes a putative transmembrane protein. *Mol. Microbiol.* **5**: 2789-2797.
- Fujihira, E., Kimura, T., Shiina, Y. and Yamaguchi, A. (1996) Transmembrane glutamic acid residues play essential roles in the metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* **391**: 243-246.
- Fujisaki, S., Ohnuma, S., Horiuchi, T., Takahashi, I., Tsukui, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Kitabatake, M. and Inokuchi, H. (1996) Cloning of a gene from *Escherichia coli* that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. *Gene* **175**: 83-87.
- Gatignol, A., Durand, H. and Tiraby, G. (1988) Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett.* **230**: 171-175.

- Harris, R. J., Hanlon, J. E. and Symons, R. H. (1971) Peptide bond formation on the ribosome. Structural requirements for inhibition of protein synthesis and of release of peptides from peptidyl-tRNA on bacterial and mammalian ribosomes by aminoacyl and nucleotidyl analogues of puromycin. *Biochim. Biophys. Acta* **240**: 244-262.
- Herrera, J. E., Bergel, M., Yang, X. J., Nakatani, Y. and Bustin, M. (1997) The histone acetyltransferase activity of human GCN5 and PCAF is stabilized by coenzymes. *J. Biol. Chem.* **272**: 27253-27258.
- Jardetzky, O. (1963) Proton magnetic resonance of purine and pyrimidine derivatives. X. The conformation of puromycin. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 1823-1825.
- Jurius, M., Free, C. A. and Barry, G. T. (1970) Alanine racemase (*Pseudomonas*). *Methods Enzymol.* **XVIIA**: 171-176.
- Kaur, P. (1997) Expression and characterization of DrrA and DrrB proteins of *Streptomyces peucetius* in *Escherichia coli*: DrrA is an ATP binding protein. *J. Bacteriol.* **179**: 569-575.
- Kumagai, T., Muta, K., Matoba, Y., Kawano, Y., Kamiya, N. and Sugiyama, M. (1998) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of bleomycin-binding protein from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus*. *Acta crystallographica*, in press.
- Krügel, H., Fiedler, G., Smith, C. and Baumberg, S. (1993) Sequence and transcriptional analysis of the nourseothricin acetyltransferase-encoding gene *nat1* from *Streptomyces noursei*. *Gene* **127**: 127-131.
- Lacalle, R. A., Pulido, D., Vara, J., Zalacain, M. and Jimenez, A. (1989) Molecular analysis of the *pac* gene encoding a puromycin *N*-acetyltransferase from *Streptomyces alboniger*. *Gene* **79**: 375-380.
- Lacalle, R.A., Tercero, J.A., Vara, J. and Jiménez, A. (1993) Identification of the gene encoding an *N*-acetylpuromycin *N*-acetylhydrolase in the puromycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces alboniger*. *J. Bacteriol.* **175**: 7474-7478.
- Lambert, M. P. and Neuhaus, F. C. (1972) Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from *Escherichia coli* W. *J. Bacteriol.* **110**: 978-987.
- Leslie, A. G. W. (1990) Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **213**: 167-186.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lyon, B. R. and Skurray, R. (1987) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol. Rev.* **51**: 88-134.

- Mania, C.V., Riggs, P.D., Grandea III, A.G., Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., McReynolds, L.A. and Guan, C.D. (1988) An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**: 365-373.
- Mansouri, K. and Piepersberg, W. (1991) Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of five genes, *strFGHIK*, including a phosphatase gene. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 459-469.
- Mosher, R. H., Ranade, N. P., Schrempf, H. and Vining, L. C. (1990) Chloramphenicol resistance in *Streptomyces*: cloning and characterization of a chloramphenicol hydrolase gene from *Streptomyces venezuelae*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 293-301.
- Motamedi, H. and Hutchinson, C.R. (1987) Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 4445-4449.
- Nakano, M. M., Mashiko, H. and Ogawara, H. (1984) Cloning of the kanamycin resistance gene from a kanamycin-producing *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* **157**: 79-83.
- Neal, R. J. and Chater, K. F. (1987) Nucleotide sequence analysis reveals similarities between proteins determining methylenomycin A resistance in *Streptomyces* and tetracycline resistance in eubacteria. *Gene* **58**: 229-241.
- 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.
- Neuhaus, F. C. and Lynch, J. L. (1964) The enzymatic synthesis of D-alanyl-D-alanine. III. On the inhibition of D-alanyl-D-alanine synthetase by the antibiotic D-cycloserine. *Biochemistry* **3**: 471-480.
- Nishimura, C., Suzuki, H., Tanaka, N. and Yamaguchi, H. (1989) Bleomycin hydrolase is a unique thiol aminopeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**: 788-796.
- Nomi, O., Kiyohara, H., Mizoguchi, T., Ohata, Y. and Nomi, R. (1970) Biosynthesis of streptomycin Part VII. A specific enzyme responsible for dephosphorylation of phosphorylated streptomycin. *Agr. Biol. Chem.* **34**: 1150-1156.
- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Otsuka, A. J., Buoncristiani, M. R., Howard, P. K., Flamm, J., Johnson, C., Yamamoto, R., Uchida, K., Cook, C., Ruppert, J. and Matsuzaki, J. (1988) The *Escherichia coli* biotin biosynthetic enzyme sequences predicted from the nucleotide sequence of the *bio* operon. *J. Biol. Chem.* **263**: 19577-19585.

- Paik, S. Y., Sugiyama, M and Nomi, R. (1985) Isolation and properties of a puromycin acetyltransferase from puromycin-producing *Streptomyces alboniger*. *J. Antibiot.* **38**: 1761-1766.
- Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 2444-2448.
- Perez-Gonzalez, J. A., Vara, J. and Jimenez, A. (1983) Acetylation of puromycin by *Streptomyces alboniger* the producing organism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**: 772-777.
- Perez-Gonzalez, J.A., Vara, J. and Jimenez, A. (1985) The mechanism of resistance to puromycin and to the puromycin-precursor *O*-demethyl-puromycin in *Streptomyces alboniger*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2877-2883.
- Perez-Gonzalez, J. A., Ruiz, D., Esteban, J. A. and Jimenez, A. (1990) Cloning and characterization of the gene encoding a blasticidin S acetyltransferase from *Streptoverticillum* sp. *Gene* **86**: 129-134.
- Phillips, I. and Shannon, K. (1984) Aminoglycoside resistance. *Br. Med. Bull.* **40**: 28-35.
- Porter, J. N., Hewitt, R. I., Hesseltine, C. W., Krupka, G., Lowery, J. A., Wallace, W. S., Bohonos, N. and Williams, J. H. (1952) Achromycin: A new antibiotic having trypanocidal properties. *Antibiot. Chemother.* **2**: 409-415.
- Reverchon, S., Nasser, W. and Robert-Baudouy, J. (1994) pecS: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **11**: 1127-1139.
- Reynes, J. P., Calmels, T., Drocourt, D. and Tiraby, G. (1988) Cloning, expression in *Escherichia coli* and nucleotide sequence of a tetracycline-resistance gene from *Streptomyces rimosus*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 585-598.
- Rosdahl, V. T. (1973) Naturally occurring constitutive  $\beta$ -lactamase of novel serotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 229-231.
- Ryffel, C., Tesch, W., Birch-Machin, I., Reynolds, P. E., Barberis-Maino, L., Kayser, F. H. and Berger-Bachi, B. (1990) Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* **94**: 137-138.
- Salauze, D., Perez-Gonzalez, J. A., Piepersberg, W. and Davies, J. (1991) Characterisation of aminoglycoside acetyltransferase-encoding genes of neomycin-producing *Micromonospora chalcea* and *Streptomyces fradiae*. *Gene* **101**: 143-148.

- Sands, L. C. and Shaw, W. V. (1973) Mechanism of chloramphenicol resistance in staphylococci: characterization and hybridization of variants of chloramphenicol acetyltransferase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **3**: 299-305.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 5463-5467.
- Satoh, A., Ogawa, H. and Satomura, Y. (1975) Role and regulation of kanamycin acetyltransferase in kanamycin biosynthesis. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 2331-2336.
- Satoh, A., Ogawa, H. and Satomura, Y. (1976) Regulation of *N*-acetylkanamycin amidohydrolase in the idiophase in kanamycin fermentation. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 191-196.
- Schägger, H. and Jagow, G. von. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Schepers, A., Pich, D. and Hammerschmidt, W. (1993) A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **12**: 3921-3929.
- Schneider, C., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Asser, U. and Greaves, M.F. (1982) A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J. Biol. Chem.* **257**: 10766-10769.
- Sheldrick, G. M., Jones, P. G., Kennard, O., Williams, D. H. and Smith, G. A. (1978) Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature* **271**: 223-225.
- Sikorski, M. M., Cerna, J., Rychlik, I. and Legocki, A. B. (1977) Peptidyl transferase activity in wheat germ ribosomes. Effect of some antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* **475**: 123-130.
- Sloan, J., McMurry, L. M., Lyras, D., Levy, S. B. and Rood, J. I. (1994) The *Clostridium perfringens* Tet P determinant comprises two overlapping genes: tetA(P), which mediates active tetracycline efflux, and tetB(P), which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants. *Mol. Microbiol.* **11**: 403-415.
- Stojiljkovic, I., Baumler, A. J. and Heffron, F. (1995) Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*: nucleotide sequence, protein expression, and mutational analysis of the *cchA cchB eutE eutJ eutG eutH* gene cluster. *J. Bacteriol.* **177**: 1357-1366.
- Sugiyama, M., Paik, S.Y. and Nomi, R. (1985) Mechanism of self-protection in a puromycin-producing micro-organism. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1999-2005.
- Sugiyama, M., Takeda, A., Paik, S.Y., Nimi, O. and Nomi, R. (1986) Acetylation of blasticidin S by its producing actinomycetes. *J. Antibiot.* **39**: 827-832

- Sugiyama, M. and Nimi, O. (1990) Streptomycin biosynthesis and self-resistance mechanism in streptomycin-producing *Streptomyces griseus*. *Actinomycetol.* **4**: 15-22.
- Sugiyama, M., Thompson, C.J., Kumagai, T., Suzuki, K., Deblaere, R., Villarroel, R. and Davies, J.E. (1994a) Characterisation by molecular cloning of two genes from *Streptomyces verticillus* encoding resistance to bleomycin. *Gene* **151**: 11-16.
- Sugiyama, M., Kumagai, T., Shionoya, M., Kimura, E. and Davies, J.E. (1994b) Inactivation of bleomycin by an *N*-acetyltransferase in the bleomycin-producing strain *Streptomyces verticillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 81-86.
- Sugiyama, M., Kumagai, T., Matsuo, H., Bhuiyan, M.Z.A., Ueda, K., Mochizuki, H., Nakamura, N. and Davies, J.E. (1995) Overproduction of the bleomycin-binding proteins from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus* and a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* and their immunological characterisation. *FEBS Lett.* **362**: 80-84.
- Svensson, M. L. and Gatenbeck, S. (1981) The presence of two serine racemases in *Streptomyces garyphalus*, a D-cycloserine producer. *Arch. Microbiol.* **129**: 213-215.
- Svensson, M. L. and Gatenbeck, S. (1982) The pathway of D-cycloserine biosynthesis in *Streptomyces garyphalus*. *Arch. Microbiol.* **131**: 129-131.
- Takeda, A., Higuchi, D., Yamamoto, T., Nakamura, Y., Masuda, Y., Hirabayashi, T. and Nakaya, K. (1996) Purification and characterization of bleomycin hydrolase, which represents a new family of cysteine proteases, from rat skin. *J. Biochem.* **119**: 29-36.
- Thiara, A. S. and Cundliffe, E. (1988) Cloning and characterization of a DNA gyrase B gene from *Streptomyces sphaeroides* that confers resistance to novobiocin. *EMBO J.* **7**: 2255-2259.
- Thompson, J., Schmidt, F. and Cundliffe, E. (1982) Site of action of a ribosomal RNA methylase conferring resistance to thiostrepton. *J. Biol. Chem.* **257**: 7915-7917.
- Thompson, L. T., Moskal, J. R. and Disterhoft, J. F. (1992) Hippocampus-dependent learning facilitated by a monoclonal antibody or D-cycloserine. *Nature* **359**: 638-641.
- Umezawa, H.: Bleomycin. In: Corcoran, J.W. and Hahn, F.E. (Eds.) (1975) Antibiotics, vol. III. Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 21-33.
- Utsui, Y. and Yokota, T. (1985) Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **28**: 397-403.
- Vara, J., Perez-Gonzalez, J. A. and Jimenez, A. (1985) Biosynthesis of puromycin by *Streptomyces alboniger*: characterization of puromycin *N*-acetyltransferase. *Biochemistry* **24**: 8074-8081.

- von-Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225**: 487-494.
- Watanabe, T., Goi, H., Hara, T., Sugano, T., Tanaka, Y., Kazuno, Y., Matsushashi, Y., Yamamoto, H. and Yokota, T. (1987) Antibacterial activities of arbekacin, a new aminoglycoside antibiotic, against methicillin-cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Jpn. J. Antibiot.* **40**: 349-356.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Pühler, A. (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* **70**: 25-37.
- Wood, J. D., Peesker, S. J., Gorecki, D. K. and Tsui, D. (1978) Effect of L-cycloserine on brain GABA metabolism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **56**: 62-68.
- Yamaguchi, H., Yamamoto, C. and Tanaka, N. (1965) Inhibition of protein synthesis by blasticidin S. I. Studies with cell-free systems from bacterial and mammalian cells. *J. Biochem.* **57**: 667-677.
- Yamaguchi, H. and Tanaka, N. (1966) Inhibition of protein synthesis by blasticidin S. II. Studies on the site of action in *E. coli* polypeptide synthesizing systems. *J. Biochem.* **60**: 632-642.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yuasa, K. and Sugiyama, M. (1995) Bleomycin-induced  $\beta$ -lactamase overexpression in *Escherichia coli* carrying a bleomycin-resistance gene from *Streptomyces verticillus* and its application to screen bleomycin analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 61-66.
- Zawadzke, L. E., Bugg, T. D. 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.
- Zhang, H. Z., Schmidt, H. and Piepersberg, W. (1992) Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* **6**: 2147-2157.
- 杉山 政則 「微生物その光と陰 -抗生物質と病原菌-」 共立出版 (1996)

## 【学位論文の基礎となる原著】

- 1) Matsuo, H., Mochizuki, H., Davies, J. and Sugiyama, M. : Production of bleomycin *N*-acetyltransferase in *Escherichiacoli* and *Streptomyces verticillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**: 83-88, 1997.
- 2) Nishimura, M., Matsuo, H. and Sugiyama, M. : Blasticidin S-producing *Streptomyces morookaensis* possesses an enzyme activity which hydrolyzes puromycin. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 95-100, 1995.
- 3) Nishimura, M., Matsuo, H., Nakamura, A. and Sugiyama, M. : Purification and characterization of a puromycin-hydrolyzing enzyme from blasticidin S-producing *Streptomyces morookaensis*. *J. Biochem.*, in press, 1998.
- 4) Matsuo, H., Ietaka, H., Mori, K. and Sugiyama, M. : Molecular cloning and characterization of D-cycloserine resistance gene from D-cycloserine-producing *Streptomyces garyphalus*. *J. Biol. Chem.*, 投稿予定.

## 【謝辞】

本研究に対し、終始、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り、さらに本論文の御校閲を賜りました広島大学医学部総合薬学科 杉山 政則 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、有益な御指導と御助言を賜りました広島大学医学部総合薬学科 井出 利憲 教授、太田 茂 教授、ならびに、金田 幸 助教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、多大な御協力を頂きました国立宇部工業高等専門学校 西村 基弘 助教授、中村 明子 氏、持田製薬株式会社バイオサイエンス研究所 望月 博 博士、明治製菓株式会社薬品技術研究所主席研究員 村上 健 博士、および、同社岐阜工場技術課 森 克彦 博士、数々の Bm 系抗生物質を御供与下さいました日本化薬株式会社医薬事業本部の 宮崎 俊範 氏に心より御礼申し上げます。

さらに、本研究を遂行するにあたり、終始、暖かいご支援とご協力を頂きました広島大学医学部総合薬学科 井上 義雄 助教授（現 東邦大学薬学部教授）、熊谷 孝則 助手、升味 紀子 教務員、湯浅 勝敏 博士、木下 英司 博士、加藤 洋司 修士、李 東根 修士、家高 弘史 修士、Cathal J. McELGUNN 修士、宮武 志野 学士、小林 みほ 学士、ならびに、広島大学医学部総合薬学科薬品資源学講座 杉山研究室の皆様にも厚くお礼申し上げます。

最後に、学生生活を精神的、かつ、経済的に支えてくれた両親に謹んで感謝の意を表します。