

# カスガマイシン生合成の経路特異的調節遺伝子 *kasT* の *rpoZ* 依存性転写活性化遺伝子のクローニング

春日 和

(秋田県立大学生物資源科学部 応用生物科学科)

## 研究の目的

我々は、抗稲イモチ病用農薬カスガマイシン (KSM) を生産する放線菌 *Streptomyces kasugaensis* において、*rpoZ* の遺伝子産物である サブユニットを含むRNAポリメラーゼ (RNAP) による KSM 生合成遺伝子の転写制御・調節機構を研究している。既に *rpoZ* を破壊した *S. kasugaensis* R6D4 は KSM を生産せず、また形態分化の初期段階の気菌糸を形成しなくなることを明らかにした<sup>1)</sup>。また、KSM 非生産の原因は、KSM 生合成酵素遺伝子群の経路特異的転写調節因子遺伝子 *kasT* の転写抑制にあり、R6D4 にて *kasT* を強制発現させると KSM 生産が復帰することを明らかにしている。KasT は、ストレプトマイシン (SM) 生産菌 *Streptomyces griseus* の SM 生合成の特異的転写活性化因子 StrR と 50% の identity を示した<sup>2)</sup>。 *strR* の転写には *strR* プロモーター上流域に結合する転写活性化因子 AdpA が必要であることが知られていることから<sup>3)</sup>、我々は *kasT* においてもプロモーター上流域 (P*kasT*) に特異的に結合して *kasT* 転写を活性化する KasZ が存在し、さらに *kasZ* の発現に *rpoZ* が関与していると考えた (Fig.1)。

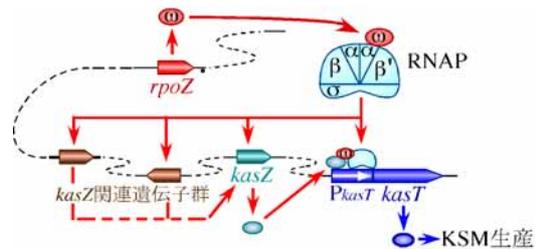


Fig.1. *kasZ* および *kasZ* 関連遺伝子群

本研究は、*rpoZ* の存在を必須とする KSM 生合成の制御・調節機構の解明のために、*kasZ* さらには *kasZ* や *kasT* の発現を活性化する調節遺伝子群をクローニングすることを目的とした。

## 方法と結果

### (1) *kasZ* クローニングベクター pAK557 の構築とゲノムライブラリーの作製

*kasZ* および *kasZ* や *kasT* の転写・発現を活性化する調節遺伝子群をクローニングする目的で *kasT* プロモーター領域 (P*kasT*) からの転写開始が検出できる pAK557 を構築した (Fig.2)。すなわち、P*kasT* の下流に *Terrabacter* 属細菌 DBF63 株由来のメタ開裂酵素遺伝子 *dbfB*<sup>4)</sup> の構造遺伝子部分を連結し、*S. kasugaensis* 用ベクター pSK2162 に導入した。pAK557 ではクローニング用に *Bam*HI が使用可能で、活性化遺伝子がクローニングされれば活性化因子により P*kasT* からの転写が始まり *dbfB* が発現して、その結果、DbfB が無色の 2,3-dihydroxybiphenyl (DHB) を黄色物質に分解させる (Fig.3)。すなわち、この発色を指標として P*kasT* の転写活性を誘導する遺伝子のクローニングが可能となる。さらに、*Bam*HI のごく近傍には強

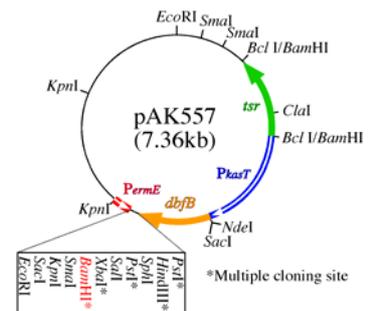


Fig.2. Cloning vector pAK557

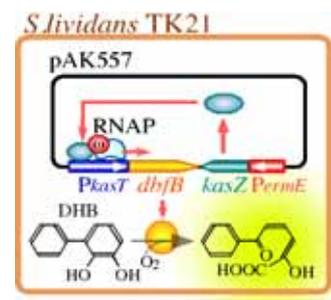


Fig.3. *kasZ* クローニングの原理

力なプロモーター *PermE* が存在するため、クローン化遺伝子の転写増強が期待できる。

Table 1 に示すように *S. kasugaensis* の野生株 A1R6 の pAK557 形質転換株は DHB 分解活性を示すが、*rpoZ* 破壊株 R6D4 および *rpoZ* をもち KSM を生産しない *Streptomyces lividans* TK21 の形質転換株のいずれも分解活性を示さなかった。これは、*kasZ* や *kasT* の転写活性化遺伝子や *kasZ* が *S. kasugaensis* に特異的に存在して、それらの転写に *rpoZ* が必要であることを示唆している。

そこで、*S. lividans* を宿主として、pAK557 の *Bam*HI 部位に、R6D4 株のゲノム DNA の *Sau*3AI 部分分解物 (平均 4kb) を導入しショットガンクローニングを行った。32,000 の *S. lividans* の形質転換株について DHB 溶液を噴霧することにより、明らかに黄色に変化した 37 の陽性クローンを得ることができた。

### (2) メタ開裂酵素遺伝子 *bphC* のクローン化

陽性クローンの中で DHB 分解活性が特に強かった KW6 および KW13 では挿入 DNA 断片が 3.5kb にわたって重複していた (Fig.4)。この重複領域の塩基配列を決定して遺伝子機能を推定したところ 3 つの完全長の open reading frame (ORF; *orf1* ~ *orf3*) と 1 つの不完全 ORF (*orf4*) が見出された (Table 2)。*orf3* は *bphC* のホモログ遺伝子でレポーター遺伝子として用いた *dbfB* と同様に遺伝子産物が DHB のメタ開裂活性を示す。そこで *orf3* を *bphC* とした。欠失解析から、*bphC* は *orf2* の上流域のプロモーターにより転写されていた。したがって、KW6 および KW13 では *dbfB* とは関係なく *bphC* によって DHB 分解反応を行ったことが明らかとなった。*S. kasugaensis* 単独では DHB 分解活性を示さないことから、*bphC* はクローン化による遺伝子増幅効果によって発現に至ったのではないかと推定している。

さらに、*bphC* に特異的なプライマーを用いた PCR により、残りの 35 陽性クローン中の 11 クローンが *bphC* を含むことがわかった。したがって、以後これらのクローンを除外して研究を進めた。

### (3) サブクローン化と塩基配列の決定

陽性クローンの中の挿入 DNA 断片を high fidelity の PCR により増幅して pUC18/19 にサブクローン化した。挿入 DNA 断片の両末端の塩基配列を決定し、すでに全塩基配列が決定している *Streptomyces coelicolor* A3(2) および *Streptomyces avermitilis* のゲノム情報と比較することによりクローン化遺伝子を推定した。なお、一部のクローンについては既に全塩基配列を決定している (Table 3)。

Table 1. pAK557 形質転換体の *rpoZ*, KSM 生産, DHB 分解

	<i>rpoZ</i>	KSM 生産	DHB 分解
<i>S. kasugaensis</i> A1R6/pAK557	+	+	+
<i>S. kasugaensis</i> R6D4/pAK557	-	-	-
<i>S. lividans</i> TK21/pAK557	+	-	-

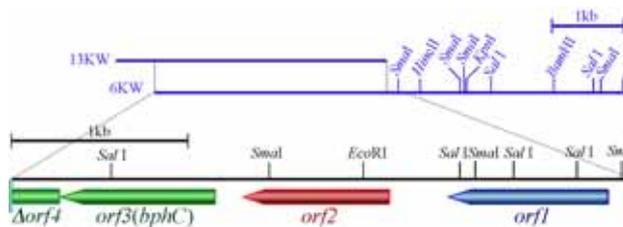


Fig.4. KW6 と KW13 の解析

Table 2. KW6 と KW13 の解析

遺伝子	推定機能
<i>orf1</i>	ヌクレオチド二リン酸-糖エピメラーゼ
<i>orf2</i>	HpcE ホモログ (デカルボキシラーゼ/イソメラーゼ)
<i>orf3 (bphC)</i>	BphC ホモログ (メタ開裂酵素)
<i>orf4</i>	HppA ホモログ (フェノールヒドロキシラーゼ)

Table3. *kasZ* 遺伝子スクリーニングの概要

Group	Clone	DHB assay		KSM 生産 (R6D4)	挿入断片 (kb)	塩基配列決定	推定された遺伝子機能
		<i>S. lividans</i> TK21	<i>S. kasugaensis</i> R6D4				
A	A23	++++	-	-	4.5		二成分制御系 (sensor kinase, response regulator)
	A17	+++	+	-	4.5		transposase
	KW22	+++	+	-	5.2		
	K8	++++	+	-	4.3	*	<i>bldA</i> (tRNA <sup>UUA</sup> -Leu)
	K9	++++	+	-	3.7	*	
	K33	++++	+	-	3.6		不明
	KW19	+++	+	-	4.2		acyl-CoA synthetase
	KW24	++++	+	-	4.5		機能不明
	KW36	+++	+	-	5.4		asparagine synthetase, methyltransferase
B	AS6	+++	+	-	5.0		機能不明
	A12	++	++	-	3.7		1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
	M7	++++	+++	-	5.0		LacI-family 転写制御因子
	K13	++++	+++	-	5.2		グリコーゲン脱分枝酵素, トリプシン様プロテアーゼ
	K14	+++	++	-	5.0		制御タンパク質
	K17	+	+	-	4.5		enolase, cytochrome P-450
	K23	+++	++	-	3.7		<i>rnmF</i> (16SrRNA, 5SrRNA, 23SrRNA)
	KW37	+++	+++	-	4.0		トランスロカーゼ SecA サブユニット
C	KW40	+++	++	-	3.4		ABC transporter
	A18	++	-	-	3.6		zinc protease
	A22	++	-	-	4.5	*	ABC transporter
	A24	++	+	-	5.0		機能不明
	A26	+	-	-	3.0		DNA polymerase III サブユニット
	KW16	++	+	-	3.3		機能不明
	KW17	++	+	-	4.5	*	leucyl-tRNA synthetase

, 完了; \*, 進行中

各クローンは, *rpoZ* 破壊株 *S. kasugaensis* R6D4 にも導入し, *S. lividans* 形質転換体とともに DHB 分解活性を 5 段階で評価した。この活性評価にしたがってクローンを 3 グループ (A, B, C) に分類した。A グループのクローンは, *rpoZ* をもつ *S. lividans* では活性が強いが (+++ ~ +++++), *rpoZ* 破壊株での分解活性は弱く, クローン化遺伝子の発現が *rpoZ* に強く依存している可能性が高い。一方, B グループクローンは, 両菌株による DHB 分解活性がほぼ同じであり, したがってクローン化遺伝子の発現に *rpoZ* は関係していないと考えられる。また, C グループはクローン化遺伝子の発現が *rpoZ* に依存しているが, *PkasT* 活性化が A グループほど顕著でないと考えられる。以下, 各グループのクローン化遺伝子の特徴について述べる。

#### (i) A グループクローン

クローン A23 は *rpoZ* 依存性が強く, サブユニットの存在がその発現に大きく影響している。本クローンは二成分制御系 (sensor kinase および response regulator) 遺伝子<sup>5)</sup> の全長を含んでいたため, このシグナル伝達系が *kasT* を介して直接あるいは間接的に *kas* 生合成遺伝子群の発現に関与していることが考えられる。

塩基配列決定中の K8 および K9 はクローン化 DNA 領域が約 0.7kb が重複しており, そこには *bldA* が含まれていた。*bldA* は放線菌では出現頻度が極めて低い UUA コドンに対する tRNA<sup>Leu</sup> の遺伝子で UUA コドンを含む二次代謝関連の調節遺伝子の発現を翻訳レベルで調節していることが知られている<sup>6)</sup>。したがって *S. kasugaensis* においても *bldA* が *kasT* を介して KSM 生合成に翻訳レベルで関与している可能性がある。

#### (ii) B グループクローン

B グループのクローン化遺伝子はその発現が *rpoZ* には強く依存していない。おそらく, これらのク

ローン化遺伝子は直接的に *PkasT* の転写活性を向上させたのではなく、細胞内で何らかの代謝系の活性を向上させてその結果、間接的に *dbfB* 発現を誘導したものと推察される。

例えば、クローン M7 および K13 では *Lacl*-family 転写制御因子およびグリコーゲン脱分枝酵素・トリプシン様プロテアーゼが発現して何らかの代謝系の活性向上に寄与し、またクローン K23 では *rrnF* 遺伝子群が発現することによって細胞内の翻訳活性全体が上昇し、その結果、DHB 分解活性を上昇させたものと考えられる。

### (iii) Cグループクローン

CグループクローンはAグループクローンに比べて *PkasT* の転写活性化作用が小さいと考えられる。これらのなかでクローン KW17 は leucyl-tRNA synthetase を含んでおり *bldA* との関連で興味深い。

## 結論

KSM 生合成特異的活性化遺伝子 *kasT* のプロモーター領域 *PkasT* に作用して KSM 生合成遺伝子群の発現を導く *kasZ* および *PkasT* の発現向上をもたらす遺伝子群のクローニング系を構築して 24 のクローンを得た。このなかで我々は二成分制御系の遺伝子と *bldA* および leucyl-tRNA synthetase 遺伝子に注目している。これら遺伝子の発現や機能に関しては、遺伝子発現とその *rpoZ* 依存性および KSM 生合成遺伝子群の発現との関連について検討していく。

*S. kasugaensis* の *kasZ* は *S. griseus* の *adpA* のホモログ遺伝子の可能性が高い。しかし、今回のクローニング系では *adpA* ホモログは得られていない。*adpA* ホモログの発現にさらに何らかの制御系が働いているならば、今回の系ではクローン化されない可能性もある。*S. kasugaensis* の *adpA* ホモログのクローン化、その遺伝子発現と *rpoZ* との関連、さらに KSM 生合成遺伝子群との発現の関連についても今後検討して行く予定である。

## 文献

- 1) Kojima, I., Kasuga, K., Kobayashi, M., Fukasawa, A., Mizuno, S., Arisawa, A. and Akagawa, H. 2002. The *rpoZ* gene, encoding the RNA polymerase omega subunit, is required for antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces kasugaensis*. J. Bacteriol. **184**:6417-23.
- 2) Ikeno, S., Aoki, D., Sato, K., Hamada, M., Hori, M., and Tsuchiya, K.S. 2002. *kasT* gene of *Streptomyces kasugaensis* M338-M1 encodes a DNA-binding protein which binds to intergenic region of *kasU-kasJ* in the kasugamycin biosynthesis gene cluster. J. Antibiot. **55**:1053-62.
- 3) Ohnishi, Y., Kameyama, H., Onaka, H. and Horinouchi, S. 1999. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. Mol. Microbiol. **34**:102-111.
- 4) Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., Kodama, T. and Omori, T. 1997. Cloning and characterization of the gene involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF63. J. Ferment. Bioeng. **84**:387-399.
- 5) Champness, W. 1999. Cloning and analysis of regulatory genes involved in *Streptomyces*

secondary metabolite biosynthesis. In Demain, A.L. and Davis, J.E. (ed.), *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, second edition, ASM Press, Washington, D.C., p725-739.

6) Fernández-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A. and Malpartida, F. 1991. The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* **66**:769-780.