



Title	抗寄生虫薬生産菌における新規放線菌ホルモンの発見とホルモンリセプターによる二次代謝制御機構の解析
Author(s)	宮本, 聖子
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/26861
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

抗寄生虫薬生産菌における新規放線菌ホルモンの発見と ホルモンリセプターによる二次代謝制御機構の解析

2011 年

大阪大学大学院 工学研究科

生命先端工学専攻 分子微生物学領域

宮本 聖子

博士論文

抗寄生虫薬生産菌における新規放線菌ホルモンの発見と
ホルモンリセプターによる二次代謝制御機構の解析

2011年

大阪大学大学院 工学研究科

生命先端工学専攻 分子微生物学領域

宮本 聖子

目次

第1章 緒言

緒言

1-1 放線菌	8
1-2 放線菌の二次代謝制御	9
1-3 オートレギュレーター制御系	12
1-3-1 オートレギュレーター	12
1-3-2 オートレギュレーターによる二次代謝制御メカニズム	13
1-3-3 オートレギュレーターリセプター	14
1-4 <i>Streptomyces avermitilis</i>	
1-4-1 エバーメクチン生産菌	16
1-4-2 エバーメクチン生合成経路	17
1-4-3 <i>S. avermitilis</i> の生産する二次代謝産物	18
1-4-3 オートレギュレーターリセプター遺伝子	21

第2章 エバーメクチン生産を誘導する新規放線菌ホルモンAvenolideの同定

2-1 緒言	23
2-2 実験材料および機器	
2-2-1 プラスミド	25
2-2-2 菌株	25
2-2-3 試薬	25
2-2-3 合成ヌクレオチド	25
2-2-3 機器	26

2-3 実験方法

2-3-1 <i>aco</i> 破壊株の作製	27
2-3-2 <i>aco</i> 相補株の作製	27
2-3-3 液体培養およびAVM生産の定量	28
2-3-4 <i>aco</i> 破壊株への酢酸エチル抽出物および γ -ブチロラクトン型 オートレギュレーターの添加	29
2-3-5 70 ml培養液におけるAvaR1-ligand活性測定のための 酢酸エチル抽出物の調製	29
2-3-6 rAvaR1タンパク質の調製	30
2-3-7 ゲルシフトアッセイによるAvaR1-ligand活性の検出	31
2-3-8 AvaR1-ligandの抽出および精製	33

2-4 実験結果

2-4-1 <i>aco</i> 破壊株におけるAVM生産量の解析	35
2-4-2 <i>aco</i> 破壊株におけるAvaR1-ligand生産量の解析	37
2-4-3 培養液からのAvaR1-ligandの抽出	39
2-4-4 AvaR1-ligandの構造決定	40
2-4-5 化学合成品4 <i>S</i> ,10 <i>R</i> -1のAvaR1-ligand活性	41
2-4-6 化学合成品4 <i>S</i> ,10 <i>R</i> -1によるAVM生産誘導	43

2-5 考察

2-5-1 新規オートレギュレーターavenolideの同定	45
2-5-2 Avenolide生合成経路の推定	45
2-5-3 ブテノライド型オートレギュレーターの放線菌における分布	47

第3章 *AvaR3*による抗生物質生産および菌糸形態の制御

3-1 緒言	48
3-2 実験材料および機器	
3-2-1 プラスミド	50
3-2-2 菌株	50
3-2-3 試薬	50
3-2-3 合成ヌクレオチド	50
3-2-3 機器	51
3-3 実験方法	
3-3-1 <i>avaR3</i> 破壊株の作製	52
3-3-2 <i>avaR3</i> 相補株の作製	52
3-3-3 液体培養	53
3-3-4 液体培地からの抗生物質抽出	53
3-3-5 固体培地からの抗生物質抽出	53
3-3-6 抗生物質の定量	54
3-3-7 HPLCによる二次代謝産物の解析	55
3-3-8 乾燥菌体重量の測定	56
3-3-9 形態分化観察および胞子形成量の測定	56
3-3-10 顕微鏡によるペレットの観察	59
3-3-11 RNA抽出	59
3-3-12 DNase I処理	59
3-3-13 RT-PCR解析	60
3-3-14 5'-RACE (Rapid amplification of 5' cDNA ends)解析	61
3-3-15 qRT-PCR解析	63

3-4 実験結果

3-4-1 <i>avaR3</i> 破壊株における液体培養条件下での抗生物質生産量の解析	66
3-4-2 <i>avaR3</i> 破壊株における抗生物質生合成遺伝子群の転写解析	67
3-4-3 <i>avaR3</i> 破壊株における固体培養条件下での抗生物質生産量の解析	69
3-4-4 <i>AvaR3</i> によって制御される二次代謝産物の探索	71
3-4-5 <i>avaR3</i> 破壊株における形態分化観察	73
3-4-6 <i>avaR3</i> 破壊株における液体培養条件下でのペレット形成の観察	76
3-4-7 <i>avaR</i> 遺伝子の転写開始点の同定	79
3-4-8 <i>avaR3</i> 破壊株における <i>avaR</i> 遺伝子の転写解析	83

3-5 考察

3-5-1 <i>AvaR3</i> によるグローバルな制御	84
3-5-2 <i>AvaR3</i> による抗生物質生産制御	85
3-5-3 <i>AvaR3</i> による菌糸形態の制御	89
3-5-4 <i>AvaR3</i> タンパク質構造の特異性	89
3-5-5 二次代謝産物生合成遺伝子から離れて位置する オートレギュレーターリセプター遺伝子	90

第4章 *AvaL1*による二次代謝産物生合成遺伝子群の転写制御

4-1 緒言	91
4-2 実験材料および機器	
4-2-1 プラスミド	93
4-2-2 菌株	93
4-2-3 試薬	93
4-2-3 合成ヌクレオチド	93

4-2-3 機器	94
4-3 実験方法	
4-3-1 破壊株の作製	95
4-3-2 <i>avaL1</i> 相補株の作製	96
4-3-3 表現型解析	97
4-3-4 転写解析	97
4-3-5 Hisタグ融合型rAvaL1タンパク質の発現	97
4-3-6 ゲルシフトアッセイ	98
4-3-7 AvaL1-ligandの抽出および粗精製	99
4-3-8 AvaL1-ligand活性およびavenolide活性の検出	99
4-4 実験結果	
4-4-1 <i>avaL1</i> 破壊株における抗生物質生産量の解析	101
4-4-2 AvaL1制御下にある二次代謝関連遺伝子の探索	103
4-4-3 AvaL1-regulonの同定	105
4-4-4 <i>vmlI</i> 破壊株における <i>pks3-vml</i> クラスターと <i>pks4</i> クラスターの転写解析	111
4-4-5 <i>vmlI</i> プロモーター領域へのAvaL1の結合	113
4-4-6 AvaL1による <i>avaL2</i> の転写制御およびAvaL2の機能解析	115
4-4-7 AvaL1/L2とAvaR1/R2/R3の関係	117
4-4-8 AvaL1-ligand活性	119
4-5 考察	
4-5-1 AvaL1による二次代謝制御機構	121
4-5-2 <i>pks3-vml</i> クラスターと <i>pks4</i> クラスターの関係	122
4-5-3 <i>S. avermitilis</i> における2つのオートレギュレーター制御系	124

第 5 章 総括	126
本報に関する論文	130
参考文献	131
謝辞	137
Appendix	138

第1章 緒論

緒言

1-1 放線菌

放線菌はグラム陽性細菌群に分類され、その主な生息域は土壌である。肥沃な土壌1 g には100万個あるいはそれ以上という膨大な数の放線菌が生息されている¹。分離される土壌放線菌の約95%が *Streptomyce* 属放線菌であり、*Nocardia* 属が約2%、*Micromonospora* 属が約1.5%と続く。また放線菌は、土壌のみならず昆虫や植物、海洋、河川などに広く分布している。*Actionomycetes* (放線菌)は、その名が”ray fungus (放射状に生育するカビ)”という意味でつけられた通り²、その特徴の一つはカビに類似した複雑な生活環を持つことにある (Fig. 1-1)³。その様式は属に固有であるが、*Streptomyces* 属放線菌の場合、胞子の発芽に始まり、栄養菌糸 (または基底菌糸)の伸長・分岐を経て、空中に向かって伸長する気中菌糸が形成される。次いで、らせん状を呈した気中菌糸の先端部分に隔壁が形成され、個々のコンパートメントが成熟して胞子となる。このような高度な形態分化能を持つのは原核生物の中でも珍しく、放線菌は古くから原核生物における形態分化研究のモデル微生物のひとつとなってきた。

放線菌のもう一つの特徴は、多種多様な生理活性物質の生産能にある。1944年、Waksmanらによる抗結核作用を示すストレプトマイシンの発見以来⁴、放線菌は新規生理活性物質のスクリーニング源として注目を浴びてきた。Bérdyらによると、これまでに微生物より単離された生理活性物質22,500種のうち、およそ45%が放線菌に由来するという⁵。また、放線菌より単離された生理活性物質は数の多さだけでなく、その構造が多岐に渡ることでも知られており、β-ラクタム系抗生物質、ペプチド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、ポリエン系抗真菌抗生物質、ヌクレオシド系抗生物質、アンスラサイクリン系抗生物質、アンサマイシン系抗生物質、ブレオマイシン系抗生物質、ポリエーテル系抗生物質が挙げ

られる⁶。これらの中には、医薬、農薬、動物薬などとして実用化されたものが多数含まれ、放線菌は微生物産業上きわめて重要な位置を占める。

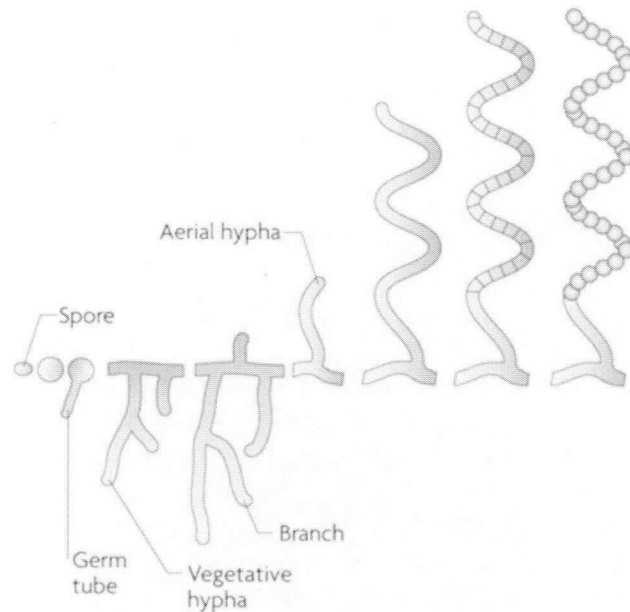


Fig. 1-1 Morphological differentiation in *Streptomyces*. The figure is adapted from reference 3.

1-2 放線菌の二次代謝制御

放線菌が生産する生理活性物質は、必ずしも生産菌自身の生育には必要でないことから、菌の生育や菌体維持に必要な一次代謝産物とは区別して、二次代謝産物とよばれている。この二次代謝産物の生産は、液体培養条件下において対数増殖期から定常期への移行期に開始される傾向にあり、また固体培地上では、気中菌糸の形成に伴って開始されることが多い^{7,8,9}。このことは、二次代謝と形態分化を協調的に調節する機構が存在することを示している。これまでに二次代謝に影響を与える因子として知られているのは、炭素・窒素・リンなどの栄養源、cyclic AMP・GTP・ppGppといった生理学的因子、菌

体密度や信号伝達物質（オートレギュレーターやPI factor）などの環境因子である⁸。従って、それぞれの因子に応答する機構が二次代謝を制御すると考えられ、その複雑さがうかがえる。

このような複雑な放線菌の二次代謝制御には、多数の制御因子の関与が知られており、制御するレベルによって以下の3つに分類される^{9,10}。ある特定の二次代謝産物の生産に関与する遺伝子は、通常、染色体上でクラスターを形成しており、そのサイズは数kbから100 kbにも及ぶ¹¹。このクラスターには生合成酵素をコードする構造遺伝子、自己耐性遺伝子、生産化合物の輸送を担うトランスポーター遺伝子が含まれる。これら多数の遺伝子の協調的な転写を可能にしているのが、クラスター内の制御遺伝子によってコードされる”pathway-specific regulator（経路特異的制御因子）”である^{8,12,13}。経路特異的制御因子はクラスター内遺伝子のプロモーター領域に結合し下流遺伝子の転写を活性化する。このタイプの制御因子には、ピクロマイシンの生産制御因子PikDに代表されるLALファミリー（large ATP-binding regulators of the LuxR family）タンパク質¹⁴、クラブラン酸の生産制御因子ClaRに代表されるLysRファミリータンパク質¹⁵、青色色素の生産制御因子RedZに代表されるレスポンスレギュレーター様タンパク質などが含まれるが¹⁶、最も報告例が多く、制御メカニズムが解析されているのがSARP（*Streptomyces* antibiotic regulatory protein）ファミリータンパク質である¹⁷。一般的なSARPファミリータンパク質は、N末端側にOmpRのDNA結合ドメインに類似したwinged helix-turn-helixモチーフを、C末端側にBTAD（bacterial transcriptional activation domain）ドメインを持つ300アミノ酸程度のタンパク質である。標的遺伝子のプロモーター領域に存在するダイレクトリピート配列に結合し、RNAポリメラーゼとの協調的な複合体形成により下流遺伝子の転写を活性化する。ダウノルビシン生合成クラスターのDnrI¹³、アクチノロージン生合成クラスターのActII-ORF4¹⁷がSARPファミリータンパク質の代表として挙げられる。

これらSARPファミリータンパク質を含めた経路特異的制御因子の上位で機能するの

が”pleiotropic regulator (多面型制御因子)”である^{9,18}。このタイプの制御因子は、2つ以上の二次代謝産物の生産を同時に制御する。*Streptomyces coelicolor*の二成分制御系を構成している多面型制御因子AbsA1/AbsA2は、AbsA1によりリン酸化され活性型となった転写制御因子AbsA2が、青色色素、赤色色素、カルシウム依存性抗生物質の各生合成遺伝子クラスターに存在する経路特異的制御遺伝子の上流に結合し、それらの転写を抑制することにより、3つの化合物の生産を制御している¹⁹。同じく*S. coelicolor*のゲノムにコードされる多面型制御因子AfsK/AfsRの場合は、セリン/スレオニンキナーゼAfsKにより転写因子AfsRがリン酸化され活性型となると、標的遺伝子*afsS*の転写が活性化される²⁰。AfsS以降の分子メカニズムは未だ不明であるが、最終的に経路特異的遺伝子の転写が活性化され、青色と赤色色素の生産が誘導される。このように多面型制御因子は経路特異的制御因子の発現を調節して、複数の二次代謝産物の生産を制御している場合が多い。

多面型制御因子の中でも、二次代謝と形態分化の両方を制御する因子は”global regulator (グローバル制御因子)”とよばれる。その代表例が*S. griseus*のAdpAである²¹。AdpAはAraC/XylSファミリーに属す転写制御因子で、抗生物質ストレプトマイシンの生合成遺伝子クラスターに含まれる経路特異的制御遺伝子*strR*の転写を活性化することにより、ストレプトマイシンの生産を誘導する。また同様に、経路特異的制御遺伝子*griR*の転写活性化を介して、黄色色素グリキサゾンの生産誘導も行う。さらに、AdpAは気中菌糸形成に必須なRNAポリメラーゼシグマ因子をコードする*adsA*、気中菌糸形成に必須な転写因子をコードする*amfR*、気中菌糸での隔壁形成に関与する*ssgA*、気中菌糸形成に関与する分泌型金属プロテアーゼをコードする*sgmR*などの転写も直接的に活性化するため、形態分化の誘導も担っている。グローバル制御因子には、転写制御因子以外にも含まれる。TTAコドンに対するtRNA^{Leu}をコードする*bldA*がそのひとつである²²。TTAコドンはGC含量が70%を超える放線菌では出現頻度が低く、一次代謝関連遺伝子には見いだされていない一方、形態分化関連遺伝子や二次代謝に関わる遺伝子、特に経路特異的制

御遺伝子に分布する。従って、*bldA*はTTAコドンを含む遺伝子の発現を翻訳レベルで調節することにより、形態分化と二次代謝の両方を制御する。以上のように、機能するレベルの異なる制御因子が階層的に組み合わさって、放線菌の二次代謝は厳密に制御されている。

1-3 オートレギュレーター制御系

放線菌の中でも二次代謝産物の生産能が特に優れている*Streptomyces*属放線菌では、オートレギュレーターと称される信号伝達物質を介した二次代謝の制御が広く保存されている^{8,23}。オートレギュレーターは特異的リセプタータンパク質との相互作用を初発段階とし、二次代謝関連遺伝子の転写を調節する。

1-3-1 オートレギュレーター

オートレギュレーターは分子量190–240程度の低分子化合物である。脂溶性が高いことから細胞内外を自由に拡散し、自身および周囲にある細胞の二次代謝および形態分化を数nMという極めて低濃度で誘導する。また、オートレギュレーターは高等動物のホルモンと酷似し、特異的リセプターを介した信号伝達を行っていることから、放線菌ホルモンとみなされている。最も古くから知られているオートレギュレーターは、*Strptomyces griseus*のA-factor (Fig. 1-2)であり、1960年代に旧ソビエトのKhokhlovらによって発見された²⁴。Khokhlovらはストレプトマイシン非生産かつ孢子着生欠損の*S. griseus*変異株に、野生型株由来の低分子化合物を加えることによって両形質が回復する現象を発見し、この化合物をautoregulatory factor (A-factor)と命名した。その後、A-factorも含め7種の*Streptomyces*属放線菌から14種類のオートレギュレーターが同定されている²⁵。そのいずれもが γ -ブチロラクトン骨格を有していたことから、 γ -ブチロラ

クトンオートレギュレーターという言葉が定着し、広く用いられるに至っている。

ところが2008年、Correらによって γ -ブチロラクトン環ではなくフラン環を有するオートレギュレーターmethylenomycin furan (MMF)が同定された²⁶。MMFは*S. coelicolor* A3(2)のSCP1プラスミドにコードされ、同じくプラスミド上にコードされるメチレノマイシンの生産を誘導する。ただしMMFが γ -ブチロラクトンオートレギュレーターと同様、極小濃度で抗生物質生産を誘導するかどうかは未解析である。本論文では γ -ブチロラクトン型とフラン型の2つを総じてオートレギュレーターとよぶことにする。

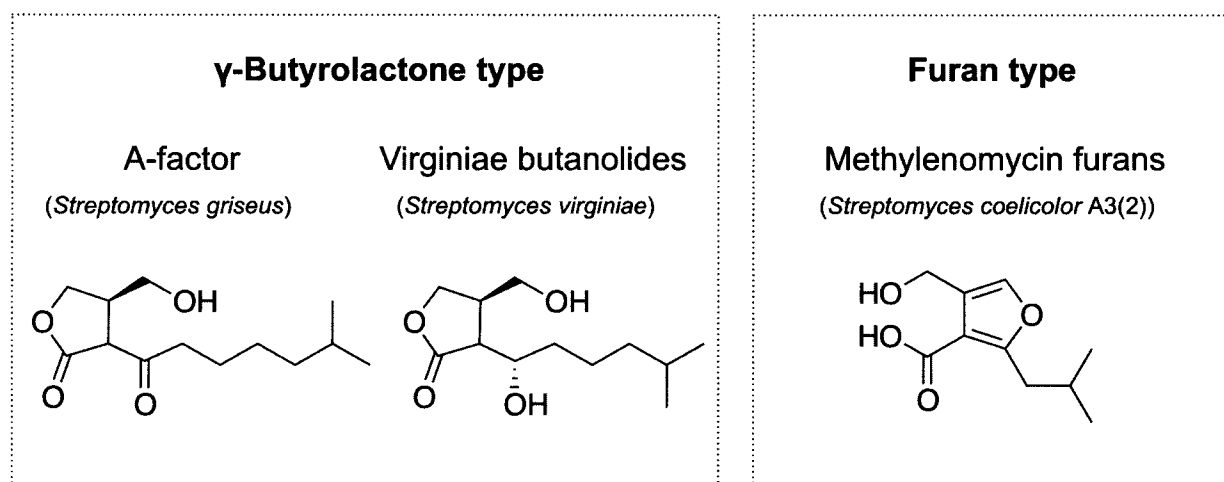


Fig. 1-2 Structures of γ -butyrolactone-type and furan-type autoregulators

1-3-2 オートレギュレーターによる二次代謝制御メカニズム

オートレギュレーターによる二次代謝制御メカニズムをFig. 1-3に示した。本制御系にはオートレギュレーターの特異的リセプタータンパク質が関与する。このリセプタータンパク質はDNA結合性の転写調節因子としての機能を持ち、autoregulatory element (ARE)といわれる逆位反復配列を含む26塩基程度のDNA領域に結合する²⁷。従って、AREをプロモーター領域に持つ遺伝子は、リセプタータンパク質による転写抑制を受ける。

生育の適切な時期に達しオートレギュレーターが生産されると、リセプタータンパク質はオートレギュレーターとの複合体を形成し、DNA結合能を失う。その結果、標的遺伝子の転写抑制は解除され、以降、数段階の信号伝達を経て、二次代謝関連遺伝子の転写が調節される。制御系によっては、形態分化に関与する遺伝子が信号伝達経路に含まれる場合もある^{27,28,29,30}。

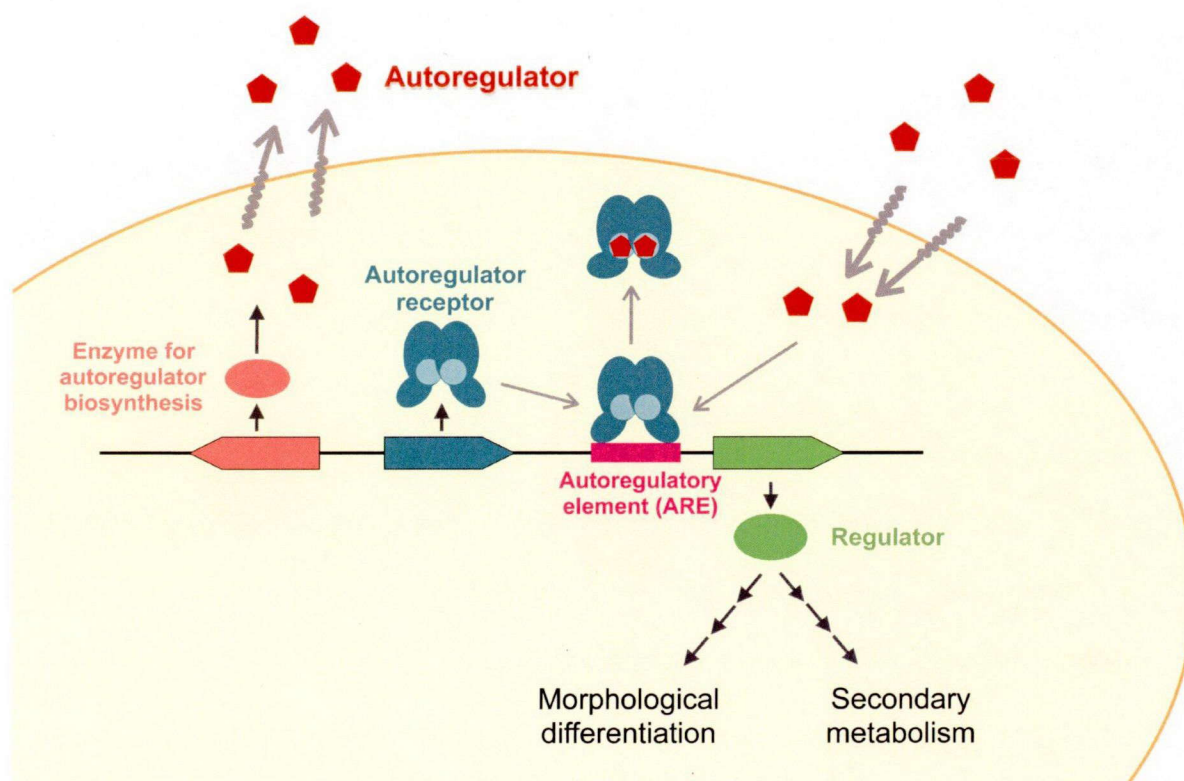


Fig. 1-3 Molecular mechanism of autoregulator-signaling cascade

1-3-3 オートレギュレーターリセプター

オートレギュレーターリセプターは200-230アミノ酸からなるTetRファミリーに属する転写制御因子である³¹。N末端側のヘリックスターンヘリックスモチーフを含むDNA結合ドメインと、C末端側のオートレギュレーターの認識に関与する制御ドメインを持ち、

オートレギュレーターとの結合状態によってDNA結合能が変化する。二次代謝制御に関わる制御因子は、機能するレベルに応じて経路特異的制御因子、多面型制御因子、グローバル制御因子の3つに分けられることを前述したが、オートレギュレーターリセプターにも類似の分類が当てはまる。

まず一つ目は、二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターにコードされ、クラスターに対応する化合物の生産を制御するタイプのリセプタータンパク質である。*Streptomyces virginiae*のバージニアマイシン生合成遺伝子クラスターにコードされるBarAがその代表例である³²。BarAはγ-ブチロラクトンオートレギュレーターVBのシグナルを受け取ると、SARPファミリータンパク質やレスポンスレギュレーター様タンパク質の転写抑制を解除し、バージニアマイシン生産を誘導する³³。このタイプのリセプターは、一つの抗生物質の生産に特異的に働くという点で、経路特異的制御因子の一種であるといえる。

二つ目は、二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターの中にコードされ、対応する化合物の生産を制御しながらも、離れた位置にある生合成クラスターによって生産される化合物の生産も同時に制御するタイプである。その代表例として、*S. coelicolor* A3(2)のScbRが挙げられる。ScbRは推定ポリケタイド生合成クラスター (*cpk*: SCO6269-6288) に隣接した位置にコードされ (*scbR*遺伝子: SCO6265)、SARPファミリータンパク質の発現を抑制しているが、オートレギュレーターSCB1の産生に伴いその抑制が解除されると、*cpk*クラスターの転写が活性化される³⁴。また、*scbR*遺伝子と赤色色素の生合成遺伝子 (SCO5877-5888)は離れて位置するが、ScbRは赤色色素の生産も制御する³⁵ (ただしメカニズムは未解明)。ScbRは2つ以上の二次代謝産物生産を制御することから、多面型制御因子といえる。

三つ目は二次代謝だけでなく形態分化も制御するグローバル制御因子タイプのリセプタータンパク質であり、*S. griseus*のA-factorリセプターArpAが該当する²⁹。ArpAは、二次代謝と形態分化に関わる多くの遺伝子の転写活性化因子であるAdpA (1-2項参照)を直接のターゲットとすることにより、二次代謝と形態分化という異なる2つの現象の同調

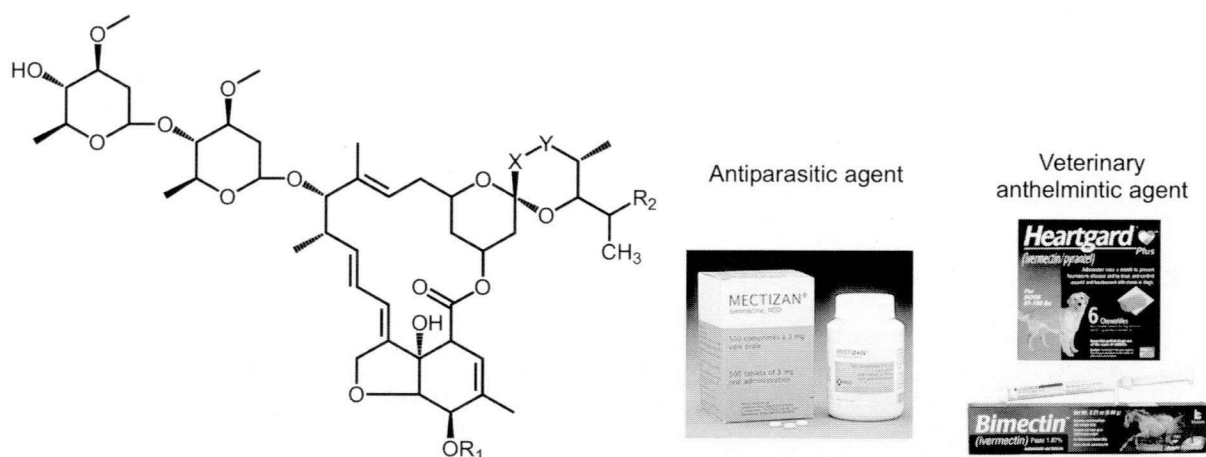
を可能にする。ただし、これまでに詳細な解析がされてきたオートレギュレーターリセプターは、抗生物質生合成遺伝子クラスター内にコードされている場合が多く、ArpAのようなグローバル制御因子の報告例は最も少ない。

1-4 *Streptomyces avermitilis*

1-4-1 エバーメクチン生産菌

*S. avermitilis*は、1970年代に大村らによる抗寄生虫活性物質の探索研究の過程で、静岡県伊東市川奈の土壌より分離された菌株である。1979年には、*S. avermitilis*の培養物から寄生虫および抗昆虫活性を有する抗生物質エバーメクチン (avermectin; AVM, Fig 1-4)が単離された³⁶。その後、北里研究所と米国メルク社との共同開発により実用化され、“顧みられない熱帯病 (Neglected tropical diseases)”のひとつで患者数3000-4000万人とされているヒト・オンコセルカ症の第一選択薬として、また沖縄県地方を含めた熱帯・亜熱帯地域で問題となっている糞線虫症の予防及び治療薬として、全世界で使用されている³⁷。さらに抗ダニ活性の農薬や家畜駆虫薬としても使用されており、その年商は8.5億USドルにも及ぶ。AVMは、線虫の神経細胞や筋細胞に存在する細胞膜貫通型のグルタミン酸作動性クロライドチャンネルに特異的に結合し、クロライドイオンの膜透過性増加による過分極を生じさせ、死に至らしめると言われている^{37,38}。

AVMは低級脂肪酸が縮合したポリケタイドからなる多員環ラクトンに、デオキシ糖が配糖した化合物である。*S. avermitilis*は構造が類似した8種のAVM成分を生産しており (Fig. 1-4)、それらは主成分であるA1a、A2a、B1a、B2aと副成分であるA1b、A2b、B1b、B2bに分けられる。中でも最も強い抗寄生虫および抗昆虫活性を有するのがB1a成分である。現在医薬及び動物薬として使用されているイベルメクチンは、このB1a成分を含む、AVM B1混合体 (B1aとB1b)の22,23-ジヒドロ体である。



Component	R ₁	R ₂	X-Y
A1a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=CH
A1b	CH ₃	CH ₃	CH=CH
A2a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
A2b	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)
B1a	H	C ₂ H ₅	CH=CH
B1b	H	CH ₃	CH=CH
B2a	H	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
B2b	H	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)

Fig. 1-4 Structures of avermectins

1-4-2 エバーメクチン生合成経路

AVMの生合成経路は、池田らによって精力的に研究が進められた。1) 同位体標識した基質の取り込み実験、2) 生合成変異株における蓄積化合物（中間体）の同定、3) 変異株および野生型株による推定中間体の変換能の解析、4) *in vitro*における酵素反応の解析により、生合成経路の全容がほぼ明らかとなり（Fig. 1-5）、アグリコンの生成、アグリコンの修飾、配糖体化の3段階で構成されることがわかった^{39,40}。1999年には、85 kbにおよぶAVM生合成遺伝子クラスターの取得と、その全塩基配列が決定された。このクラス

ターにはI型ポリケタイド合成酵素、アグリコンの環化・還元・メチル化酵素、オレアンドロースの生合成および配糖体化に関与する酵素などがコードされ、計18個の遺伝子(ave)がAVM生合成に関与することがわかった^{41,42}。さらに近年、仁平らと池田らは、aveクラスターにコードされる制御因子AveRが、ポリケタイド合成酵素群やアグリコン修飾酵素群の発現に必要な経路特異的制御因子であることを明らかにした⁴³。

1-4-3 *S. avermitilis*の生産する二次代謝産物

*S. avermitilis*は産業上の有用性から、2003年、池田らによって全ゲノム配列が解読された⁴⁴。本菌の染色体は9 Mbと原核生物の中でも極めて大きく（大腸菌: 4.6 Mb、枯草菌: 4.2 Mb）、7,500個以上の遺伝子をコードしている。そのうちの271遺伝子が二次代謝産物の生合成に関与すると推定され、32種の生合成遺伝子クラスターが見いだされている（Fig. 1-6）。これは、ゲノム解析以前に生産が確認されていた二次代謝産物の数を遥かに上回っており（AVM、オリゴマイシン、チロシナーゼによって合成されるメラニン、胞子色素、ホモゲンチジン酸由来の可溶性色素の合計5種）、本菌が多くの二次代謝産物を生産する能力を持つことを示すものである。また、この32種の生合成遺伝子クラスターには、AVMを含めた11種のポリケタイド化合物の生合成遺伝子クラスター、8種の非リボソーム型ペプチドの生合成遺伝子クラスター、6種のテルペン化合物生合成遺伝子クラスター、さらに色素やシデロフォアなどの生合成に関与する6種の遺伝子クラスターが含まれることから、生産化合物の多様性が示唆される。さらに池田らは、ポストゲノム解析として遺伝子情報から予想される二次代謝産物の化学構造に基づき、培地成分などの培養条件を検討した結果、多くの化合物の化学構造を明らかにしている⁴⁵。その一例が、フィリピンである（Fig. 1-7）⁴⁶。5つのI型ポリケタイド合成酵素遺伝子を含む、全長80 kbのpte遺伝子クラスターは、コードされているタンパク質のアミノ酸配列の相同性検索や機能検索により、抗真菌活性を有する28員環ポリエンマクロライド、フィリピンの生合

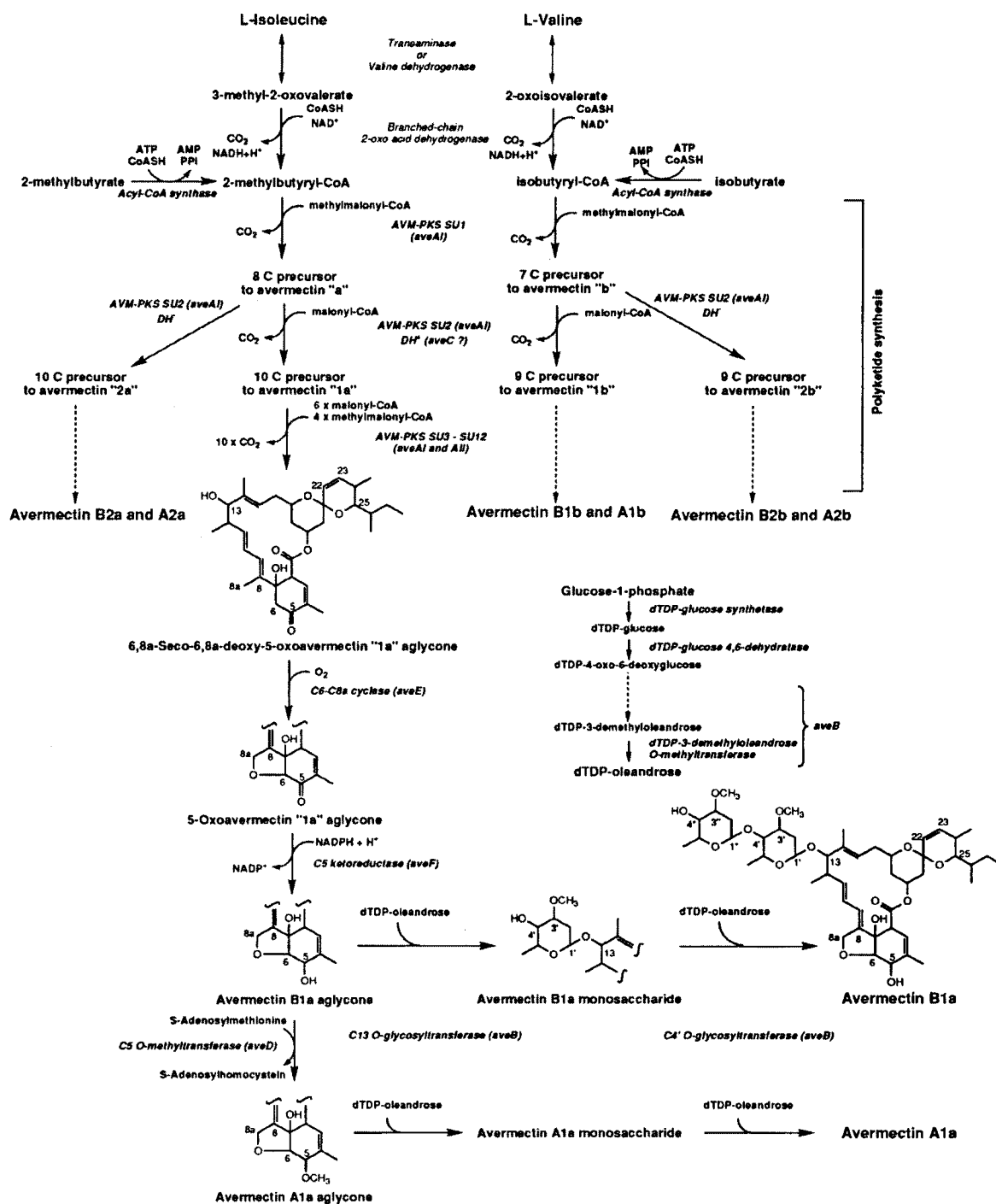


Fig. 1-5 Proposed biosynthetic pathways for avermectins. The figure is adapted from reference 40.

成を担うと推察された。ゲノム解析以前に抗真菌活性を有するポリエン化合物の生産は確認されていなかったことから、培地条件を検討し、スターチおよび大豆粉を主成分とする培地での培養により、抗真菌活性を有する化合物が生産されることを見出した。 *pteA2* 遺伝子の変異株を作製し、上記の培養条件で培養したところ、抗真菌活性を有する化合物の生産は認められなかったことから、*pte*遺伝子群がこの抗真菌活性を有する化合物の生成に関与していることを確認できた。最終的に、この抗真菌活性を有する化合物を大量に分離精製し、26員環ポリエンマクロライド、フィリピンIIIであることが決定された。

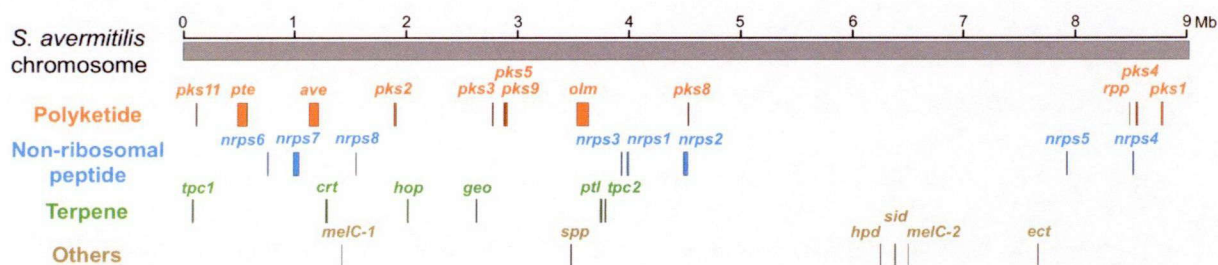


Fig. 1-6 Biosynthetic gene clusters for secondary metabolism in *S. avermitilis*

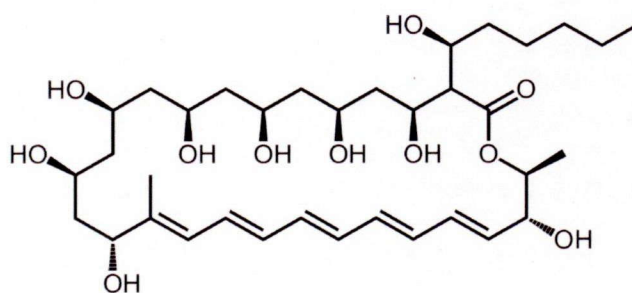


Fig. 1-7 Structure of filipin III

1-4-4 オートレギュレーターリセプター遺伝子

ゲノム解析により、本菌はAVM以外にも多くの二次代謝産物を生産する能力を持つことがわかった。しかしながら、これらの二次代謝産物がどのような制御機構によって調節されているのか、その知見はほとんどない。そこで、*Streptomyces*属放線菌では二次代謝を制御するオートレギュレーター制御系が広く保存されている点に着目した。

本菌のゲノムより、既知オートレギュレーターリセプターのアミノ酸配列をもとにホモロジー検索をしたところ、5つのリセプターホモログが見いだされた (Fig. 1-8)。γ-ブチロラクトン型オートレギュレーターリセプターと最も高い相同性を示したのは *sav3705* がコードするタンパク質であり、*Streptomyces pristinaespiralis* のプリスチナマイシン生産を制御するリセプタータンパク質 SpbR と 73% の相同性を示した²⁷。そこで、この *sav3705* を *avaR1* (*S. avermitilis* autoregulator receptor gene 1) と命名した。興味深いことに、*avaR1* の隣接遺伝子 *sav3706* (*aco*) は、*Streptomyces fradiae* でオートレギュレーター様物質の生産に関与すると推定されている遺伝子のホモログであった⁴⁶。さらに *avaR1* の遺伝子座周辺には、リセプターホモログをコードする *sav3702* と *sav3703* の2つの遺伝子があり、これらの遺伝子をそれぞれ *avaR2* と *avaR3* と命名した。5つのリセプターホモログ遺伝子のうち、*sav2268* と *sav2270* は互いに隣接して位置していたが、*avaR* 遺伝子からは離れて存在した。*sav2270* はフラン型オートレギュレーターリセプター MmfR と 45% の相同性を示しており⁴⁷、*avaL1* (*S. avermitilis* autoregulator receptor gene on left side 1) と命名し、*sav2268* を *avaL2* とした。以上より、*S. avermitilis* にはオートレギュレーターおよびそのリセプターによる二次代謝を制御する機構があると推定した。そこで本研究では、*S. avermitilis* におけるオートレギュレーターを同定するとともに、リセプターホモログの機能を解析し、放線菌の二次代謝制御に関する新たな知見を得ることを目的とした。

以降、第2章では、AVM生産を誘導するオートレギュレーターの単離同定を行った。第3章ではオートレギュレーターリセプターホモログAvaR3の機能を、第4章では同じ

くリセプターホモログAvaL1、AvaL2の機能を解析し、二次代謝制御への関与を明らかにした。

		Identities/Similarities				
		AvaL2 (SAV_2268)	AvaL1 (SAV_2270)	AvaR2 (SAV_3702)	AvaR3 (SAV_3703)	AvaR1 (SAV_3705)
		197 a.a.	218 a.a.	218 a.a.	287 a.a.	234 a.a.
ArpA	276 a.a.	34/58	32/64	31/62	28/51	39/72
BarA	232 a.a.	30/58	30/65	33/63	25/46	43/78
ScbR	216 a.a.	36/58	32/62	34/65	27/48	48/78

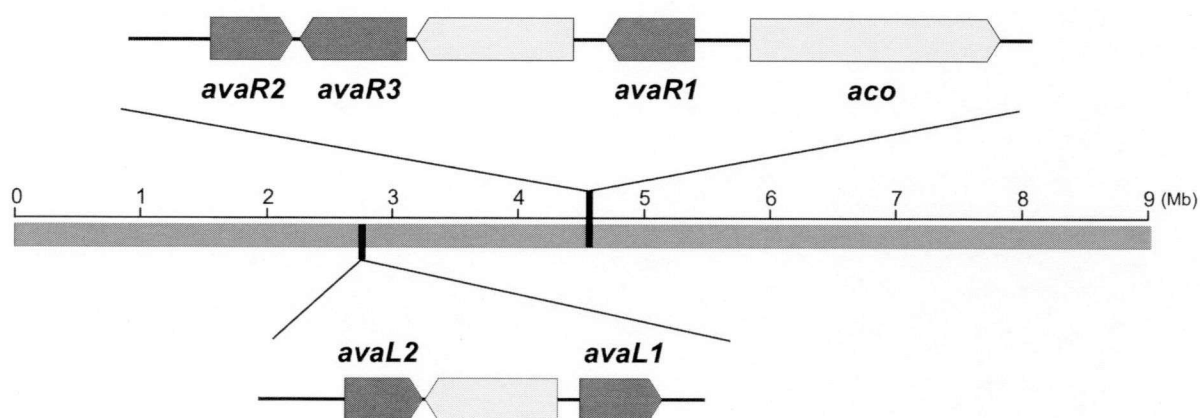


Fig. 1-8 Autoregulator receptor homologues in *S. avermitilis*

第2章 エバーメクチン生産を誘導する新規放線菌ホルモンAvenolideの同定

2-1 緒言

*S. avermitilis*より見出した5つのオートレギュレーターリセプターホモログ遺伝子のうち、既知リセプター遺伝子と最も高い相同性を示したのが*avaR1*である。*avaR1*遺伝子の周辺領域にはリセプターホモログ遺伝子*avaR2*と*avaR3*に加え、acyl-CoA oxidase相同遺伝子*aco*とcytochrome P450 hydroxylase遺伝子*cyp17*が存在しており、そのシンテニーは*Streptomyces fradiae*のオートレギュレーターリセプター遺伝子*tylP*の周辺領域と類似していた (Fig.2-1)。TylPは抗生物質タイロシンの生産を抑制することが報告されている⁴⁸。*tylP*遺伝子に隣接するacyl-CoA oxidase相同遺伝子である*orf18**遺伝子を欠損させた場合、TylPに作用するオートレギュレーター様物質の生産量が減少すると同時に、タイロシンの生産も減少することが、Cundliffeらのグループと共同研究を進めていく過程で明らかとなった^{46,49}。即ち、*orf18**遺伝子はTylPによって認識されるオートレギュレーターの生産に関与し、生産されたオートレギュレーターはタイロシン生産に必要であると推測されるが、このオートレギュレーター様物質は未だ単離同定されていない。そこで、*S. avermitilis*にも*S. fradiae*に類似した抗生物質生産制御システムがあるのではないかと考え、*aco*遺伝子がAVM生産、並びにAvaR1に作用するオートレギュレーターの生産に関与するかを*aco*遺伝子の機能を破壊することにより検証した。また、AvaR1のDNA結合能に影響を及ぼすオートレギュレーターの単離同定を行うことにした。

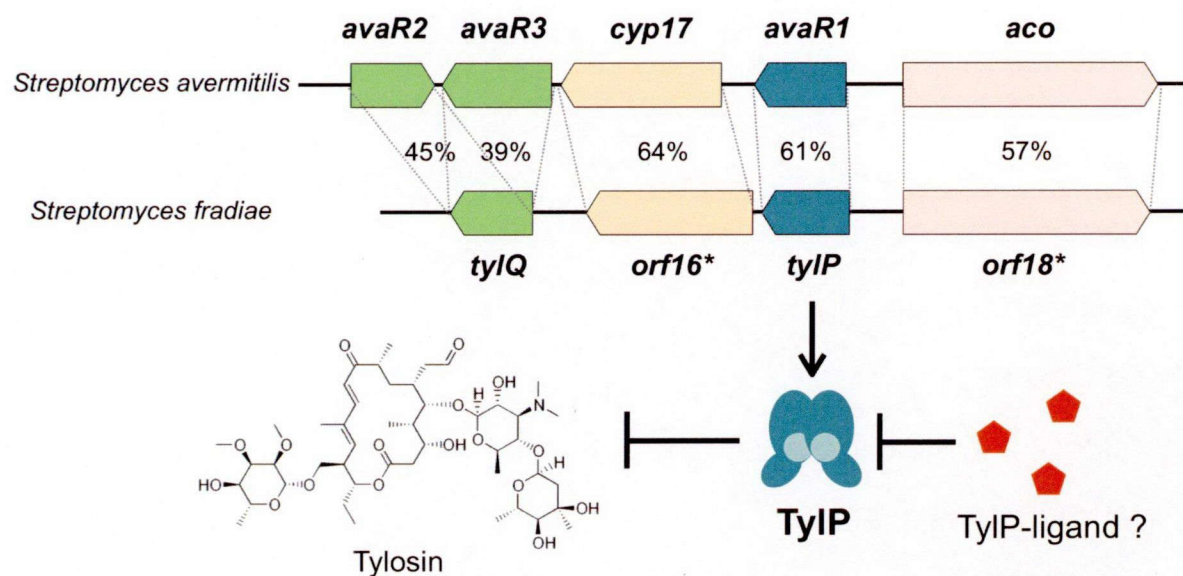


Fig. 2-1 Comparison of the organizations of the *S. avermitilis* *avaR* cluster and a *tyl* regulatory gene cluster of *S. fradiae*. Genes are color-coded by the predicted function of their products: *avaR1* homologues (green), autoregulator receptor homologue genes (light green), *aco* homologues (pink), and *cyp17* homologues (yellow). The numbers between the dotted lines are the percentages of amino acid identity toward the corresponding homologues of *S. fradiae*.

2-2 実験材料および機器

2-2-1 プラスミド

pUC19

pKU450 (Appendix 1)

pKU474 (Appendix 1)

pKU250 (Appendix 1)

pSET152⁵⁰

pENTR (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)

pET-3d (Merck, Germany)

2-2-2 菌株

Escherichia coli DH5a

E. coli F⁻ dcm Δ (*srl-recA*)306::Tn10 pUB307-*aph*::Tn7⁵¹

E. coli BL21(DE3) pLysS

Streptomyces avermitilis KA320 野生型株

2-2-3 試薬

特に記載のない限り、和光純薬工業（大阪）、ナカライテスク（京都）のものを使用した。

2-2-4 合成オリゴヌクレオチド

使用した合成オリゴヌクレオチドの配列はAppendix 3に記載した。

2-2-5 機器

液体クロマトグラフィー	LaChrom L-7100, 7200, 7300, 7400, HITACHI L-6000, L-4000, HITACHI
遠心分離機	KUBOTA5420 Himac CR 21F, HITACHI
超音波処理機	Yamato 5210, BRANSON
蛍光アナライザー	FMBIO II, HITACHI Typhoon 9210 Variable Mode Imager, GE healthcare

2-3 実験方法

2-3-1 *aco*破壊株の作製

*S. avermitilis*の染色体DNAを鋳型とし、プライマーセットaco-up-Fw/aco-up-Reとaco-dw-Fw/aco-dw-Reを用いてaco上流断片 (nt 4584009-4586052)と下流断片 (nt 4586980-4589079)をPCRによりそれぞれ増幅した。続いてpKU474を鋳型とし、プライマーセットloxP_resist_loxP_HindIII-Fw/Reを用いたPCRにより、*Hind*III認識部位が付加された1.7 kbのカナマイシン耐性遺伝子カセット (aph)を取得した。上流および下流断片を*Hind*IIIと*Eco*RIで消化した後、*Eco*RI処理したpKU450と連結した。得られたプラスミドとaph断片を*Hind*IIIで処理し、連結反応によりpLT115を作製した。pLT115より切り出した5.8 kbの*Eco*RI断片をpKU250の*Eco*RI認識部位に挿入し、pLT116を得てaco遺伝子破壊用ベクターとした。pLT116による*E. coli* F⁻ dcm Δ(*srl-recA*)306::Tn10 pUB307-aph::Tn7の形質転換体と、*S. avermitilis* KA320の胞子を用いて接合伝達を行った。*S. avermitilis*の形質転換体をチオストレプトン耐性により選択し、セカンドクロスオーバーの誘導を行った。チオストレプトン感受性かつカナマイシン耐性であるクローンを選択し、PCRによって目的のaco破壊株であることを確認した。

2-3-2 *aco*相補株の作製

S. avermitilis の 染 色 体 DNA を 鋳 型 と し 、 プ ラ イ マ ー セ ャ ッ ト aco-comp-Fw/aco-comp-Reを用いたPCRによりacoとその上流を含むDNA断片 (nt 4585252-4587837)を取得した。この断片をpENTR (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)にクローン化しエントリークローンを作製した。続いて、pSET152の*Eco*RV認識部位にGateway Reading Frame Cassette C.1 (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)をクローン化し、destination vectorとしてpLT113を作製した。pLT113とエントリークローンをを用いたLR反応 (LR Clonase Enzyme Mix, Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)により、aco相補用ベクターpLT117を得た。接合伝達によりpLT117をaco破壊株に導入

し、染色体上の*attB*φC31部位に挿入されたことをPCRで確認した。

2-3-3 液体培養およびAVM生産の定量

*S. avermitilis*の孢子を 10^5 c.f.u./mlとなるよう70 ml-APM培地/500 ml容バッフルフラスコに植菌し、28°C、160 rpmで浸漬培養した (BR-300LF, TAITEC) (培養時間は各実験ごとに記載)。培養液500 µlを等量のMeOHと混合し、10分間浸漬後、4°C、14,000 rpmで10分間遠心分離を行った (KUBOTA 3700)。得られた上清を抗生物質抽出液として、HPLCに供した。HPLC解析条件は以下に示す。標品としてMeOHに溶解したAvermectin B (Calbiochem, Germany)を用い、AVM 8成分のうち主要成分でありシングルピークが得られるA1a、A2a、B1a、B2a成分のみを定量した。

●APM (Antibiotics production medium)培地

Glucose	45 g
Peptonized milk (OXOID, UK)	24 g
Yeast extract (Becton Dickinson, USA)	2.5 g
(pH 7.5)	/ 1 L

●AVM検出用HPLC条件

HPLC	HITACHI LaChrom L-7100, 7200, 7300, 7400
Column	Mightysil RP-18GP (4.6 mmφ, 250 mm, 粒径5 µm)
Buffer	MeOH: H ₂ O: CH ₃ CN= 18:20:62
Wavelength	246 nm
Flow rate	2.0 ml/min
Temperature	40°C
Injection volume	50 µl

2-3-4 *aco*破壊株への酢酸エチル抽出物および γ -ブチロラクトン型オートレギュレーター

2-3-3項に記載した条件で、*S. avermitilis* KA320 野生型株および*aco*破壊株を48時間、液体培養した。50 mlの各液体培養液に酢酸を加え、pH 5以下になるよう調整した。酢酸エチル (各100 ml)で3回抽出を行い、抽出液を濃縮乾固後、2.5 mlのH₂Oに再溶解した。これを121°Cで20分間オートクレーブしたものを酢酸エチル抽出物とした。尚、同オートクレーブ条件でリガンド活性が低下しないことは、野生型株抽出液を用いて確認した。ネガティブコントロールとして、APM培地に由来する酢酸エチル抽出物を用いた。続いて*S. avermitilis* KA320 *aco*破壊株を液体培養し、48時間が経過したところで、調製した酢酸エチル抽出物の4分の1量 (オートクレーブにより蒸発した量を考慮の上)を添加した。合成品A-factor、SCB1、VB-C、IM-2-C₅は250-300 nM (60 ng/ml)となるよう添加し、144時間目まで培養を継続した。

2-3-5 70 ml培養液におけるAvaR1-ligand活性測定のための酢酸エチル抽出物の調製

48時間培養した70 mlの液体培養液より5 mlを50 ml容コニカルチューブに回収し、酢酸を加え (約20 μ l) pH 5以下になるよう調整した。酢酸エチル (各10 ml)で3回抽出した後、3,500 rpmで5分間遠心分離し (KUBOTA5420)、酢酸エチル層を回収した。約30 mlの酢酸エチル抽出液を濃縮乾固した後、1 mlの20% EtOHを加え、超音波処理 (Yamato 5210, BRANSON)により再溶解した。綿濾過により得られたろ液を酢酸エチル抽出物 (5倍濃縮) とし、AvaR1-ligand活性の測定に使用した。

2-3-6 rAvaR1タンパク質の調製

*avaR1*遺伝子を含むDNA断片を、プライマーセットrAvaR1-Fw/rAvaR1-Reを用いたPCRにより取得した。この断片を*Nco*Iと*Bam*HIで消化後、pET-3d (Merck)の*Nco*I-*Bam*HI認識部位にクローン化し、rAvaR1発現用プラスミドpLT118を構築した。pLT118による*E. coli* BL21(DE3) pLysSの形質転換体を20 ml LB培地/100 ml容三角フラスコ（アンピシリン50 µg/ml、クロラムフェニコール25 µg/ml）に植菌し、37°Cで一晩、前培養した。200 ml LB培地/500 ml容坂口フラスコ（アンピシリン50 µg/ml、クロラムフェニコール25 µg/ml）に前培養菌を2 ml植菌し、120 spm、37°CでOD₆₀₀=0.4になるまで培養した。IPTGを最終濃度が0.5 mMとなるよう添加し、さらに4時間培養を継続した。4°C、8,000 rpmで20分間遠心分離をして（Himac CR 21F, HITACHI）菌体を回収し、0.9% NaCl溶液で洗浄した後、菌体濃度が100 mg/mlとなるようbuffer Aに再懸濁した。菌体を超音波破碎（1分 x 5回、氷冷）（Yamato 5210, BRANSON）した後、遠心分離（上記と同一条件）により上清を回収し、これを粗タンパク質溶液とした。Buffer Aで平衡化したDEAE-Sephacel陰イオン交換カラム（Phadia, Uppsala, Sweden）に粗タンパク質溶液をアプライし、1,250 ml（5ベッド相当）のbuffer Aで溶出した。次いで750 ml（3ベッド相当）のbuffer Bで溶出し、10 mlを1画分とし回収した。280 nmにおける吸光度が増加し始めた21番目の画分以降を10画分ずつまとめ、限外ろ過により濃縮した。タンパク質の定量にはBradford法（Protein Assay Kit, BIO-RAD）を用い、BSAによって検量線を作成した。SCB1結合活性値が最も高かった61-70番目の画分をrAvaR1タンパク質溶液とした。rAvaR1の精製度合はSDS-PAGEによって確認した。

●Buffer A

20 mM	Triethanolamine-HCl (pH 7.0)
50 mM	KCl
20% v/v	Glycerol
1 mM	1,4-Dithiothreitol
0.1 mM	(<i>p</i> -Amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride

●Buffer B

20 mM	Triethanolamine-HCl (pH 7.0)
150 mM	KCl
20% v/v	Glycerol
1 mM	1,4-Dithiothreitol
0.1 mM	(<i>p</i> -Amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride

2-3-7 ゲルシフトアッセイによるAvaR1-ligand活性の検出

井口らによりrAvaR1タンパク質は*aco*遺伝子上流にある*aco*-AREに結合することを明らかにしていることから⁵²、*aco*-AREを含むDNA断片をプライマーセット *aco*-gel-Fw/*aco*-gel-Reを用いたPCRにより取得した。この断片を*Bam*HI処理後、pUC19の*Bam*HI認識部位に導入し、*aco*-AREプローブ作製用プラスミドpLT119とした。pLT119を鋳型とし、FITC標識されたプライマーセットM13-47/RVを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をゲルシフトアッセイのDNAプローブとして使用した。

作製したプローブと、2-3-6項で調製したrAvaR1タンパク質溶液を用いて、以下の反応液を調製した。ネガティブコントロールとしてrAvaR1の代わりにbuffer Bを用いた。

DNAプローブ	46 fmol
2x binding buffer	6.75 μ l
Poly(dI-dC)・Poly(dI-dC) (SIGMA-ALDRICH JAPAN, Tokyo)	1.75 μ g
rAvaR1	8.1 pmol
Up to 14.0 μ l	

25°Cで10分間反応させた後、AvaR1-ligand抽出液 (2-3-4項で調製)を加え、25°Cでさらに5分間反応させた。コントロールには抽出物の代わりにMeOHまたはEtOHを用いた。TGE bufferを用い、5%ポリアクリルアミドゲルを100 V (一定電圧)であらかじめ20分間泳動した後、ウェルに反応液を全量注入した。移動距離を知るために、反応液を入れなかったレーンに6x BPB液を10 µl注入した。100 V (一定電圧)でBPBがゲルの末端に移動するまで電気泳動した。蛍光アナライザー (FMBIO II, HITACHI)またはTyphoon 9210 Variable Mode Imager (GE healthcare)によりプローブの蛍光を検出した。

●2x binding buffer

50 mM Triethanolamine-HCl (pH 7.0)
 300 mM KCl
 20% v/v Glycerol

●TGE buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.5)
 380 mM Glycine
 2 mM EDTA

●5%ポリアクリルアミドゲル

5x TGE buffer	10 ml
Glycerol	1.35 ml (final 2.7% v/v)
30% Acrylamide (29:1)	8.33 ml (final 5% v/v)
10% Ammonium persulfate	500 µl
TEMED	50 µl
Up to 50 ml (5-6 sheets)	

2-3-8 AvaR1-ligandの抽出および精製

AvaR1-ligand活性を指標に精製を進めた。100 ml種培地/500 ml容三角フラスコ2本に *S. avermitilis* KA320の胞子を植菌し、30°C、200 rpmで48時間、前々培養を行った。前々培養液200 mlを20 L種培地/30 L容ジャーファーマンターに植菌し、30°C、200 rpm、通気量20 L/minで40時間、前培養した。20 Lの前培養液の全量を2トンの半合成培地に植菌し、28°C、100 rpm、通気量1,000 L/minで24時間、本培養した。尚、前培養と本培養のファーマンターは日本マイクロバイオファーマ株式会社（旧メルシャン、東京）の所有物である。培養液を200 Lの合成吸着剤Diaion HP-20（三菱化学、東京）と混合し、吸着剤を2倍量のH₂Oで洗浄後、2倍量のMeOHで溶出した。溶出液を濃縮乾固した後、半分量を用いてCHCl₃により抽出した（200 ml x 5）。CHCl₃抽出液を減圧濃縮し、得られた抽出物2.2 gをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した（70~230 mesh, 30 mm x 150 mm）。*n*-Hexane/CHCl₃/MeOHの混合液により溶出を行ったところ、CHCl₃/MeOH（99:1）画分が最も高い活性を示した。該当画分を濃縮し、濃縮物108 mgをHPLC（条件1）で分離し、溶出時間45-60分の画分を回収した。濃縮乾固後、得られた4.7 mgをさらにHPLC（条件2）で分離し、73分のピークを分取、濃縮乾固して1.2 mgを取得した。

●種培地

Glucose	5 g
Soy flour	15 g
Yeast extract	5 g
(pH 7.2)	/ 1 L-tap water

●半合成培地

Glucose	60 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Yeast extract	2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.05 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
CaCO ₃	5 g
(pH 7.2)	/ 1 L-tap water

●HPLC条件1

HPLC	HITACHI L-6000, L-4000
Column	PEGASIL ODS (20 mm x 250 mm, 粒径5 μm)
Buffer	20% CH ₃ CN
Wavelength	210 nm
Flow rate	9.0 ml/min

●HPLC条件2

HPLC	HITACHI L-6000, L-4000
Column	PEGASIL ODS (10 mm x 250 mm, 粒径5 μm)
Buffer	15% CH ₃ CN
Wavelength	210 nm
Flow rate	4.0 ml/min

2-4 実験結果

2-4-1 *aco*破壊株におけるAVM生産量の解析

AVM生産における*aco*遺伝子の関与を調べるため、*aco*破壊株を作製しAVM生産プロファイルを解析した結果、*aco*破壊株ではAVM生産量が顕著に減少し、培養138時間目では野生型株の6%の生産量しか検出されなかった (Fig.2-2A)。*aco*破壊株に*aco*遺伝子を導入した相補株では、AVMの生産量は野生型株と同程度にまで回復したことから、*aco*遺伝子はAVM生産に必要な因子であることが明らかとなった。

*aco*の遺伝子機能はAVM生合成機構には関与しないため (1-4-2項参照)、*aco*破壊株におけるAVM生産量の減少は、AVM生産誘導に関わるシグナル分子の欠失に起因するのではないかと予想した。そこで、野生型株の培養液から調製した酢酸エチル抽出物を*aco*破壊株に添加したところ、AVM生産が回復した (Fig.2-2B)。一方、*aco*破壊株の培養液から調製した酢酸エチル抽出物では、*aco*破壊株のAVM生産は回復しなかったことから、野生型株に存在するAVM生産誘導シグナルは、*aco*破壊により消失したと推定される。このAVM生産を誘導するシグナル分子が γ -ブチロラクトン型オートレギュレーターであるか調べるため、過剰量の合成品A-factor、SCB1、VB-C、IM-2-C₅を*aco*破壊株の培養液に添加し、そのAVM生産誘導能力を検証した。その結果、*aco*破壊株におけるAVM生産は回復しなかったため、 γ -ブチロラクトン型オートレギュレーターとは異なる低分子化合物がAVMの生産誘導に関与している可能性が示唆された。

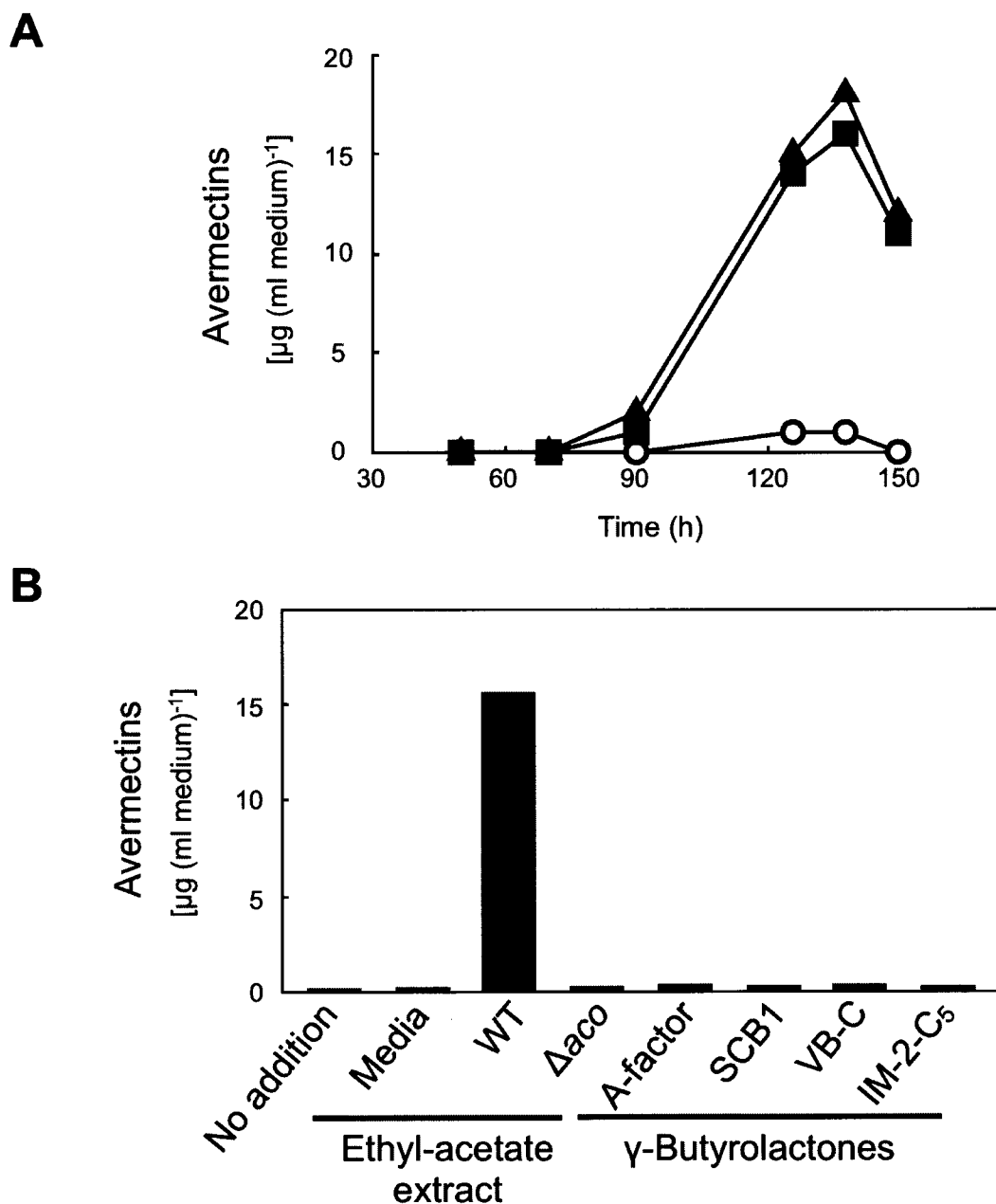


Fig. 2-2 Avermectin production in the *aco* mutant. (A) Production profiles of avermectin in the wild-type strain (filled squares), *aco* mutant (open circles) and *aco*-complemented *aco* mutant (filled triangles), respectively. (B) Restoration of avermectin production in the *aco* mutant with the AcOEt-extracts from *S. avermitilis* strains and γ -butyrolactone autoregulators. NA, no addition; M, the AcOEt-extract from APM medium. The AcOEt-extract or synthetic γ -butyrolactone autoregulator (250-300 nM) were added into the culture of the *aco* mutant at 48-h of cultivation, and the amounts of avermectin were measured in the culture broth after 144-h of cultivation.

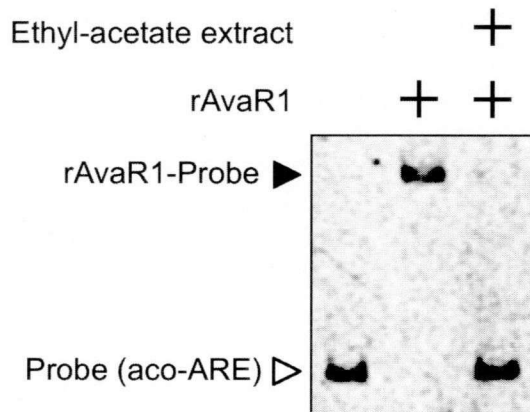
2-4-2 *aco*破壊株におけるAvaR1-ligand生産量の解析

*aco*遺伝子に隣接する*avaR1*遺伝子は、オートレギュレーターリセプターホモログをコードする。井口らにより、大腸菌より調製したrAvaR1タンパク質が*aco*の上流域にある*aco*-ARE (30 bp)に結合することを、ゲルシフトアッセイおよびDNase I フットプリンティング法によって明らかにしている (Fig.2-3A)⁵²。リセプタータンパク質はオートレギュレーターによりそのDNA結合能が変化するため、AvaR1のDNA結合能を変化させる物質 (AvaR1-ligandと呼ぶ)が野生型株の培養液中に存在するかどうか検証した。2-3-5項に従い、野生型株の培養液から調製した酢酸エチル抽出物を、rAvaR1とDNAプローブ (*aco*-AREを含む)との複合体に添加したところ、rAvaR1-DNA複合体の解離が検出された (Fig.2-3B)。従って、野生型株はAvaR1-ligandを産生することがわかった。このAvaR1-ligandの生産量を定量するために、AvaR1をDNAプローブから解離させる活性をAvaR1-ligand活性とし、rAvaR1-DNA複合体の半分量を解離させるAvaR1-ligand量を1 unitと定義したところ、野生型株の培養液には560 unit/mlのAvaR1-ligandが存在することがわかった (Fig.2-3C)。次に、AvaR1-ligandの生産に*aco*遺伝子が関与するかを調べるため、*aco*破壊株の培養液を解析したところ、AvaR1-ligand活性は野生型株の4%に満たないことがわかった。また*aco*破壊株への*aco*遺伝子の導入により、AvaR1-ligand活性値は野生型株のレベルにまで回復した。以上の結果を2-4-1項の結果と合わせて考えると、acyl-CoA oxidaseをコードする*aco*はAvaR1-ligandの生合成に必須であると考えられ、このAvaR1-ligandがAVM生産を誘導するシグナル分子として働くのではないかと予想した。

A

ARE consensus TNANAWACNNACYNNNCGGTTTKTTT
aco-ARE AAGACAAACCGTCTAGTACGTATCTTTGA

B



C

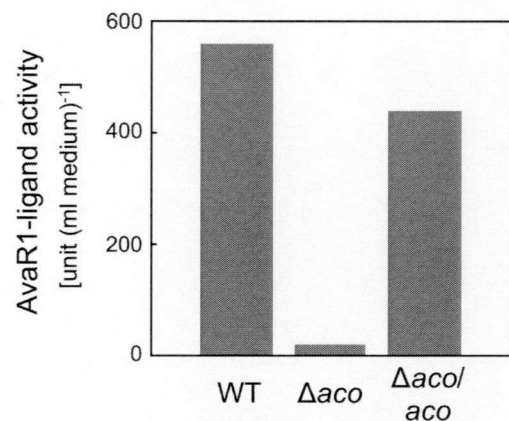


Fig. 2-3 Influence of AcOEt-extract on DNA-binding activity of rAvaR1. (A) Comparison of the AvaR1-binding sequence, *aco*-ARE, with the ARE consensus sequence defined in Folcher *et al.*²⁷ (B) Effect of *S. avermitilis* extract on DNA-binding activity of rAvaR1. The AcOEt-extract prepared from the wild-type culture broth after 70-h of cultivation was used in the gel-shift assay. (C) AvaR1-ligand activity in the *aco* mutant. AvaR1-ligand activity at 48-h of cultivation was detected by using the gel-shift assay.

2-4-3 培養液からのAvaR1-ligandの抽出

AVM生産誘導因子として推定されたAvaR1-ligandの単離を試みた。低分子信号伝達物質は極低濃度で有効であるために、実質の生産量が少なく、構造決定に必要なmgオーダーの精製品を確保するにはトン単位の培養が必須であると考えた。そこで、AvaR1-ligandの単離には野生型株の2トン培養液を用意した（培養条件の詳細は2-3-8項参照）。精製は、AvaR1-ligand活性を指標として進めていった（Table 2-1）。培養液にDiaion HP-20を加え活性物質をメタノールで溶出した。この溶出液を濃縮乾固して得られた抽出物の比活性は 1.6×10^3 unit/mgであった。この抽出物の半量（11.3 g）を用いてCHCl₃抽出した。減圧濃縮後、残渣2.2 gをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。*n*-Hexane/CHCl₃/MeOHの混合液により溶出を行ったところ、CHCl₃/MeOH (99:1)画分が 1.3×10^5 unit/mgと最も高い比活性を示すことがわかった。そこでこの濃縮物108 mgを逆相HPLCで分離し、溶出時間45-60分の画分を回収した。濃縮乾固後得られた4.7 mgをさらに逆相HPLCで分離し、73分に現れたピークを分取、濃縮乾固して1.2 mgを取得した。この精製物の比活性は 1.0×10^7 unit/mgを示したことから、比活性基準で6,300倍、重量基準で9,400倍精製したことになり、回収率は67%であった。

Table 2-1 Purification of AvaR1-ligand

Step	Yield	Activity (x10 ⁷ units)	Specific activity (unit/mg)	Purification (-fold)
1,000 L culture				
HP-20 adsorption	11.3 g	1.8	1,600	1
CHCl ₃ extract	2.2 g	1.8	8,200	5
Silica gel chromatography	108 mg	1.4	130,000	81
1st HPLC (ODS)	4.7 mg	1.2	2,600,000	1,600
2nd HPLC (ODS)	1.2 mg	1.2	10,000,000	6,300

2-4-4 AvaR1-ligandの構造決定

2-4-3項で精製したAvaR1-ligandは、北里大学の池田らによってその平面構造が解析され、4,10-dihydroxy-10-methyl-9-oxo-dodec-2-en-1,4-olide (**1**)と決定された (Fig. 2-4, Appendix 2)。本平面構造についての従来報告はない。化合物**1**は2つの不斉炭素を含むため、池田らによりCDスペクトルとキラルクロマトグラフィーを用いた立体配置の解析がされた結果、AvaR1-ligandの絶対構造は(4*S*,10*R*)-4,10-dihydroxy-10-methyl-9-oxo-dodec-2-en-1,4-olideと決定された (Fig. 2-4, Appendix 2)。

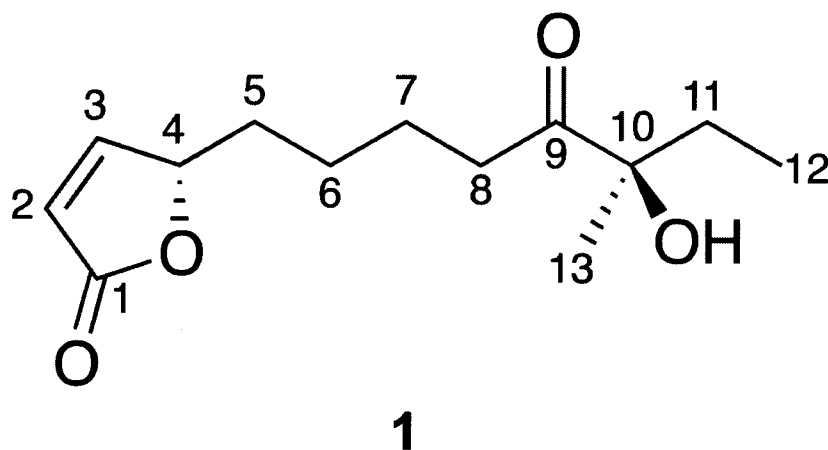
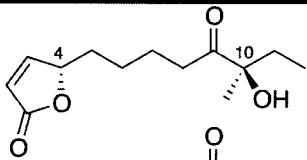
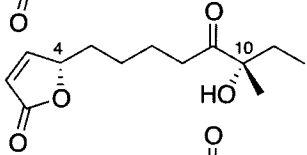
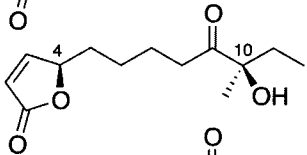
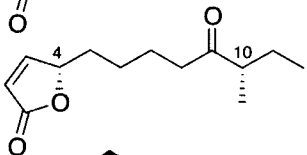
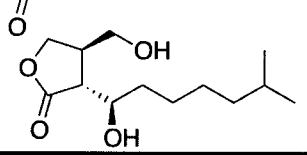


Fig. 2-4 Chemical structure of natural avenolide (1).

2-4-5 化学合成品4*S*,10*R*-1のAvaR1-ligand活性

AvaR1-ligand (4*S*,10*R*-1)の骨格構造及び立体構造の違いが、AvaR1とのアフィニティーに影響を与えるかを検証した。2-3-7項に記載した反応系で、北里大学の長光らのグループにより化学合成された4*S*,10*R*-1のAvaR1-ligand活性を測定したところ⁵³、3.1 pmolの4*S*,10*R*-1によりrAvaR1-DNA複合体の半分量が解離したことから、4*S*,10*R*-1の3.1 pmolが1 Uに相当することがわかった。γ-ブチロラクトン型オートレギュレーターの中でAvaR1が最も高い結合活性を示すSCB1では、rAvaR1-DNA複合体の半分量の解離に8.2 nmol必要であったことから、4*S*,10*R*-1はSCB1の26,000倍ものAvaR1-ligand活性を示すことがわかった (Table 2-2)。次いで、4位と10位の立体配置及び10位の水酸基がAvaR1-ligand活性に重要であるかを検証するため、立体異性体4*R*,10*R*-1と4*S*,10*S*-1の合成品及び、10位の水酸基が欠失した(4*S*)-10-dehydroxy-1の合成品を用いて⁵³、AvaR1-ligand活性を測定した。4*S*,10*S*-1では活性値が半分となり、4*R*,10*R*-1と(4*S*)-10-dehydroxy-1では活性値の顕著な減少が確認されたことから、4位の立体配置及び10位水酸基の存在がAvaR1によって認識されるために重要であることが示唆された。

Table 2-2 Comparison of dissociation activity against the rAvaR1-DNA complex among avenolide and synthetic avenolide analogues.

Compound		Relative activity
(4 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1		100
(4 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-1		50
(4 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-1		4.2
(4 <i>S</i>)-10-dehydroxy-1		1.2
SCB1		0.0038

2-4-6 化学合成品4*S*,10*R*-1によるAVM生産誘導

4*S*,10*R*-1がAVM生産を誘導する因子であることを確かめるため、合成品4*S*,10*R*-1を2-3-4項で記述した方法と同様の方法により*aco*破壊株の培養液に添加した。4*S*,10*R*-1の添加により、*aco*破壊株のAVM生産が野生型株のレベルにまで回復した (Fig. 2-5A)。従って、4*S*,10*R*-1がAVMの生産を誘導する因子であると結論し、avenolide (*S. avermitilis* butenolide) と名付けた。γ-ブチロラクトン型オートレギュレーターは、液体培養条件下では数nMという極低濃度で抗生物質の生産を誘導する。そこで、*aco*破壊株のAVM生産を誘導するavenolideの最小有効濃度を解析したところ、4 nMであることがわかった (Fig. 2-5B)。従って、avenolideはnMレベルでAVM生産を誘導するシグナル分子であると結論した。また、avenolideの添加量を増加すると、添加量依存的なAVM生産量の増加が観察され、50 nMのavenolide添加時には野生型株の1.8倍量のAVMを生産することがわかった。(ただし50 nM以上添加しても、AVM生産量の更なる増加は見られなかった。) 従って、avenolideによりAVMの生産性を向上できる可能性を示すことができた。

(Fig. 2-5) Synthetic (4*S*,10*R*)-1 was added into the culture of the *aco* mutant at 48-h of cultivation and the amounts of avermectin were measured in the culture broth after 136-h of cultivation. (A) HPLC chromatogram of avermectin production in the *aco* mutant by addition of synthetic (4*S*,10*R*)-1. Synthetic (4*S*,10*R*)-1 was added at a final concentration of 15 nM. Peaks eluted at 4.5, 5.2, 6.2, 8.7, 9.5, and 12.3 min are avermectin components, B2a, A2b, A2a, B1a, A1b, and A1a, respectively. A peak eluted at 7.1 min is oligomycin A. (B) Avermectin production with increasing concentrations of synthetic (4*S*,10*R*)-1. Error bars represent standard deviations from triplicate experiments.

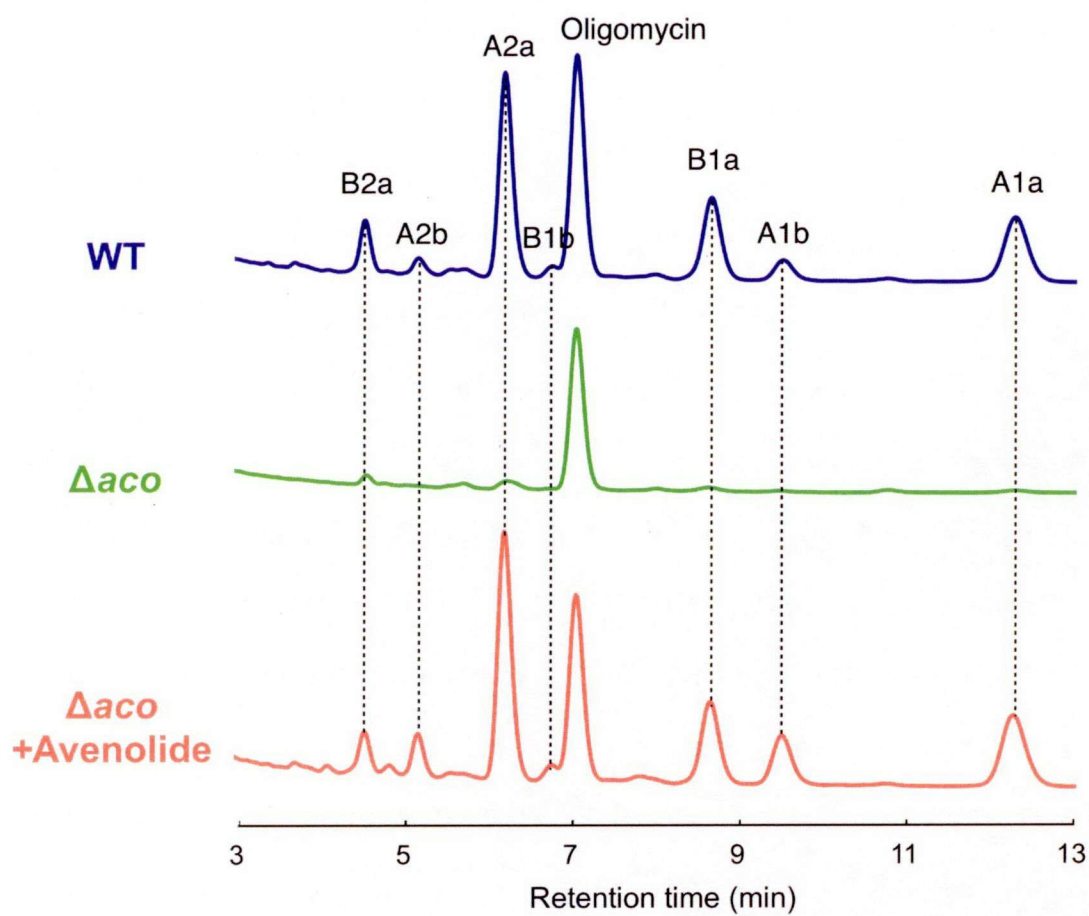
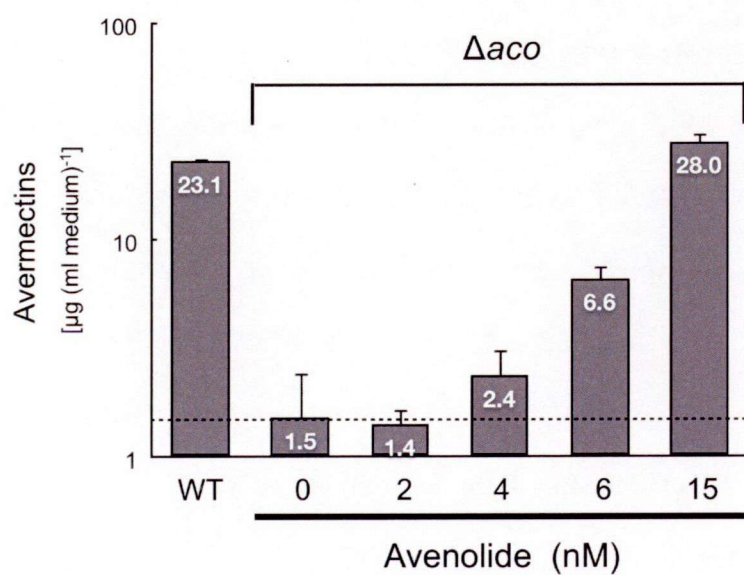
A**B**

Fig. 2-5 Effect of avenolide on avermectin production.

2-5 考察

2-5-1 新規オートレギュレーターavenolideの同定

本章では、*S. avermitilis*より、リセプタータンパク質AvaR1によって認識されるオートレギュレーターとしてavenolideを同定した (Fig. 2-4)。Avenolideはこれまで *Streptomyces*属放線菌で報告されている γ -ブチロラクトン型、もしくはフラン型のオートレギュレーターとは異なるブテノライド骨格を有し、その側鎖構造も大きく異なった。またavenolideは4 nMという最小有効濃度でAVMの生産を誘導することが明らかとなった (Fig. 2-5)。*S. virginiae*の γ -ブチロラクトン型オートレギュレーターVB-Aが液体培養中のバージニアマイシン生産を誘導する最小有効濃度は2.6 nMであること⁵⁴、また *Streptomyces lavendulae* FRI-5のオートレギュレーターIM-2は最小濃度3.2 nMで青色色素生産を誘導することを考慮すると⁵⁵、avenolideのAVM生産を誘導する最小有効濃度は γ -ブチロラクトン型オートレギュレーターが二次代謝産物の生産を誘導する最小有効濃度に匹敵する。以上より、avenolideは極微量でAVM生産を誘導する新規のオートレギュレーターであると結論した。

2-5-2 Avenolide生合成経路の推定

本研究により、*avaR1*遺伝子に隣接する*aco*遺伝子がavenolideの生合成に必須であることが明らかとなった (Fig. 2-2)。*aco*遺伝子がコードするacyl-CoA oxidase (Aco)は、Fig. 2-6に示したavenolideの推定生合成経路において、C-2位とC-3位の二重結合の導入に関与するのではないかと推測している。また、*avaR1*遺伝子のもう一つの隣接遺伝子*cyp17*もavenolide生産に関与することが明らかになっている (Elisaらによる未発表データ⁵⁶)。*cyp17*遺伝子はcytochrome P450 hydroxylase (Cyp17)をコードすることから、Cyp17がC-10位の水酸基の導入を担う可能性が高い。一方、 γ -ブチロラクトン型およびフラン型オートレギュレーターの生合成には、グリセロール誘導体と脂肪酸誘導体の縮合反応を担うAfsAファミリータンパク質が関与すると報告されているが^{57,26}、*S. avermitilis*の

AfsAホモログをコードする *avaA* 遺伝子は、破壊株の解析から avenolide 生産には関与しないことが Elisa らにより確かめられた (未発表データ⁵⁶)。従って、化学構造だけでなく生合成経路もこれまで同定されているオートレギュレーターとは異なるという点で、avenolide は新しいタイプのオートレギュレーターであると考えられる。

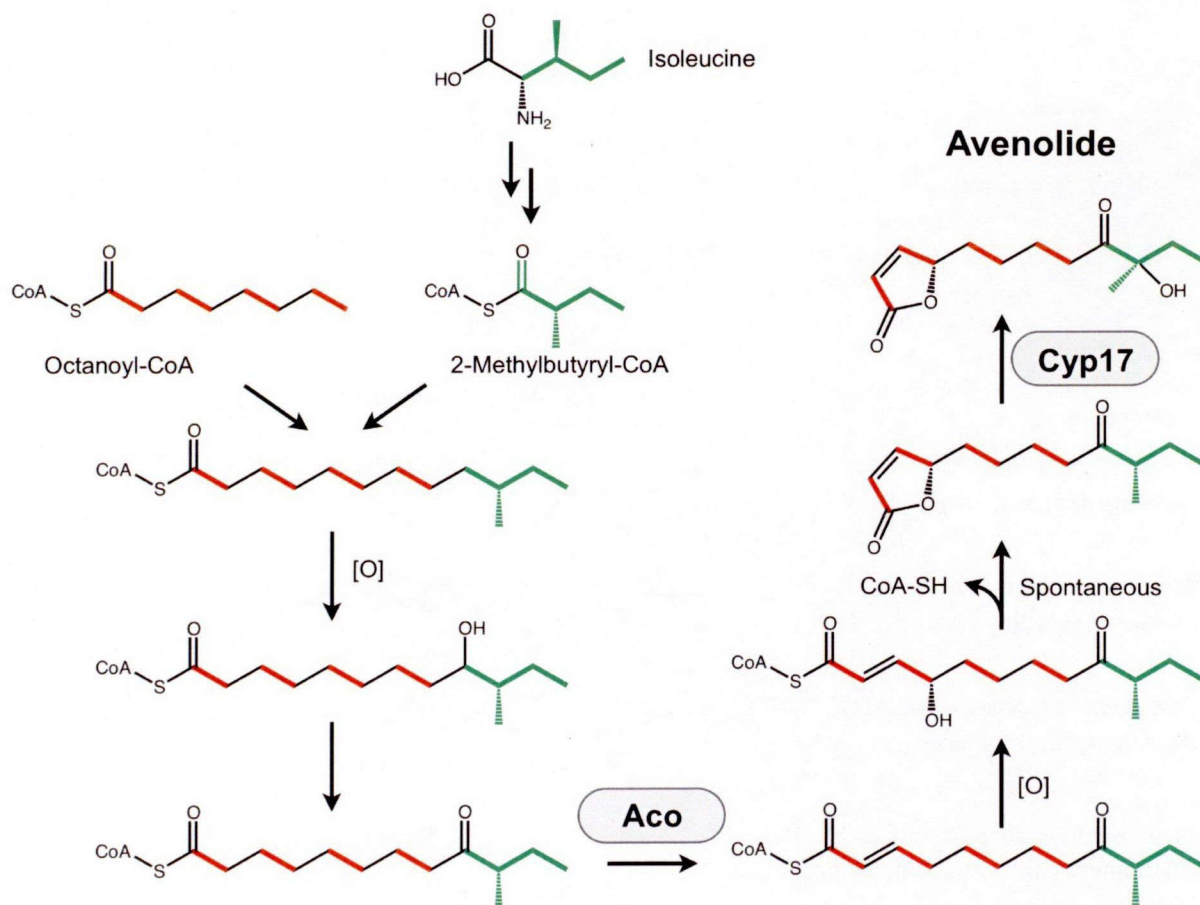


Fig. 2-6 Hypothetical biosynthetic pathway of avenolide.

2-5-3 ブテノライド型オートレギュレーターの放線菌における分布

Avenolide生合成遺伝子とavenolideリセプター遺伝子のシンテニーは、タイロシン生産菌の*S. fradiae*に加えて、さらに2つの生理活性物質生産菌の染色体ゲノム上に見られる (Fig. 2-7)。したがってブテノライド型オートレギュレーターが*Streptomyces*属放線菌に広く保存されている可能性が考えられる。よってavenolideによる抗生物質生産誘導のメカニズムが明らかになれば、AVMの生産性向上につながるだけでなく、その知見を広く放線菌の分子育種にも役立てることができると考えられる。さらには、avenolideを*Streptomyces*属の様々な菌に投与することによって、休眠状態にある二次代謝産物の生産を活性化させることもできると期待される。

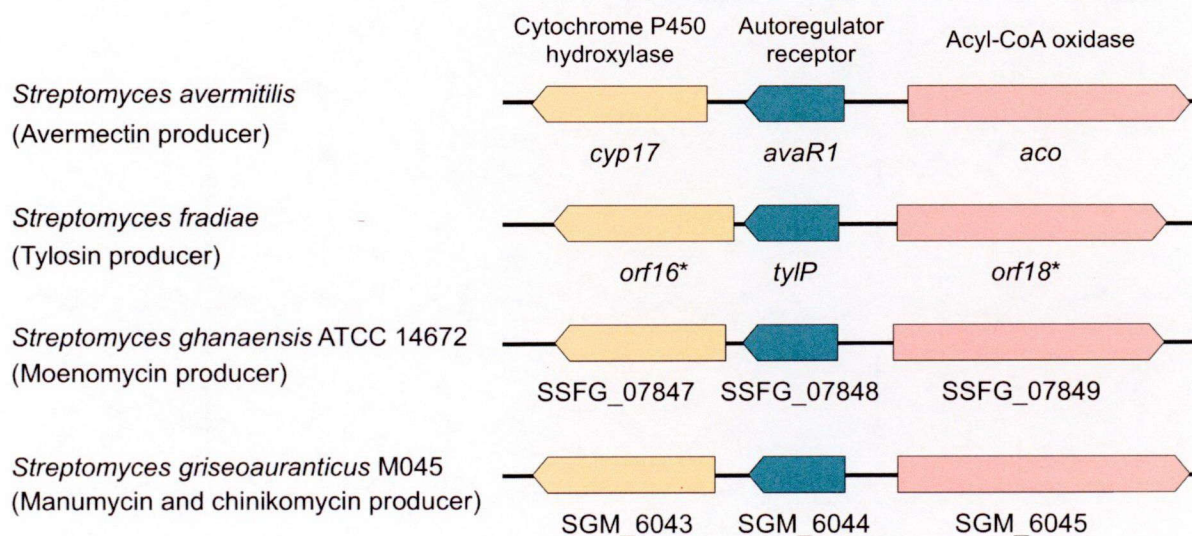


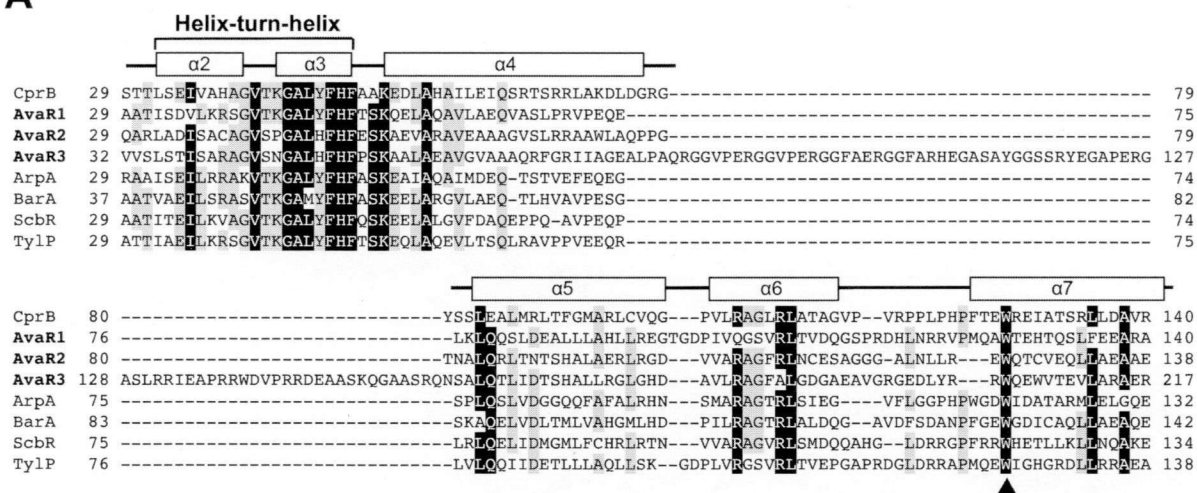
Fig. 2-7 The biosynthetic gene clusters of the avenolide family of autoregulators. Genes are color-coded by the predicted function of their products: *avaR1* homologues (green), *aco* homologues (pink), and *cyp17* homologues (yellow).

第3章 AvaR3による抗生物質生産および菌糸形態の制御

3-1 緒言

AvaR3は、*Streptomyces ambofaciens*のAlpW (43.1%相同性)⁵⁸、*S. fradiae*のTylQ (39.2%)⁵⁹、*Streptomyces aureofaciens*のAur1R (37.1%)⁶⁰などのオートレギュレーターリセプターホモログと高い相同性を示す。アミノ酸配列のアライメント解析により、AvaR3はオートレギュレーターリセプターに特徴的な1) DNA結合ドメインと、2) オートレギュレーターの結合に重要であるとされるトリプトファン (Trp)残基⁶¹が保存されていることがわかった (Fig. 3-1A)。ところが、AvaR3のDNA結合ドメインとTrp残基の間には、他のリセプタータンパク質には全く見られない75アミノ酸からなる領域が存在する。Hydropathy plotの結果より (Fig. 3-1B)、この領域は親水性が高くタンパク質表面に露出している可能性が示唆された。また、AvaR3をコードする全てのコドン解析すると、3番目の塩基がGまたはCである確率は87%であり、*Streptomyces*属遺伝子の平均値92%よりも下回っていた⁶²。ところが、AvaR3を75アミノ酸から成る親水性ストレッチ部分とそれ以外の部分に分けてみると、前者は先のGC含量が73%であるのに対し後者は92%となったことから、*avaR3*は元々の遺伝子からフレームシフトまたは挿入変異の結果生じた遺伝子ではないかと予想した。そこで、この75アミノ酸に対応する遺伝子領域をBLASTNおよびBLASTXで解析したが、相同性を持つDNA領域やタンパク質は見つからず、機能の推定には至らなかった。また、従来のオートレギュレーターリセプター遺伝子は、抗生物質の生合成遺伝子クラスター内またはそれに隣接して存在し、その抗生物質の生産を制御している例が多く報告されている (1-3-3項参照)^{63,49}。ところが、*avaR3*遺伝子の周辺に抗生物質の生合成遺伝子クラスターはなく、最も近い二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターでも約50 kbも離れていることから、*avaR3*が二次代謝制御に関与するのか疑問が持たれた。そこで本章では、*S. avermitilis*の二次代謝制御における*avaR3*の機能を同定することを試みた。

A



B

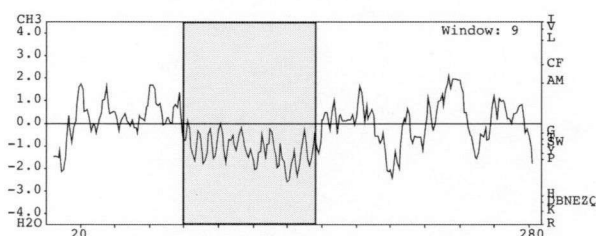


Fig. 3-1 Properties of AvaR3 protein. (A) Sequence alignment of the N-terminal regions of AvaR proteins with those of γ -butyrolactone-autoregulator receptors. The amino acid sequence alignment was created using CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>). The numbers indicate the amino acid positions within each sequence. The secondary structure elements of CprB are shown above its sequence. The filled triangle indicates an important residue for conformational changes of the autoregulator receptor upon binding of the γ -butyrolactone autoregulator as proposed by Natsume *et al*⁶¹. Black boxes and gray boxes in the alignment indicate positions at which the same amino acid is found in at least seven and five of the eight sequences, respectively. CprB (BAA28748) and ScbR (CAA07628) from *S. coelicolor* A3(2), AvaR1 (BAC71417), AvaR2 (BAC71414), and AvaR3 (BAC71415) from *S. avermitilis*, ArpA (BAA36282) from *S. griseus*, BarA (BAA06981) from *S. virginiae*, and TylP (AAD40801) from *S. fradiae*. (B) Hydropathy plot of AvaR3 protein represented in Kyte-Doolittle scale. The position of the extra stretch of 75 a.a. residues is enclosed by grey box.

3-2 実験材料および機器

3-2-1 プラスミド

pKU451 (Appendix 1)

pKU474 (Appendix 1)

pKU250 (Appendix 1)

pENTR (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)

pLT113 (2-3-2項参照)

pCR4-TOPO (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)

3-2-2 菌株

Escherichia coli DH5a

E. coli F⁻ *dcm* Δ (*srl-recA*)306::Tn10 pUB307-*aph*::Tn7

One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)

Streptomyces avermitilis KA320N 野生型株

3-2-3 試薬

特に記載のない限り、和光純薬工業（大阪）、ナカライテスク（京都）のものを使用した。

3-2-4 合成オリゴヌクレオチド

使用した合成オリゴヌクレオチドの配列はAppendix 3に記載した。

3-2-5 機器

液体クロマトグラフィー	LaChrom L-7100, 7200, 7300, 7400, HITACHI
遠心分離機	KUBOTA5420
	KUBOTA3700
	MiniSpin plus, Eppendorf
顕微鏡およびカメラ	OLYMPUS BX50
	OLYMPUS DP70
	UNIBLITZ VMM-D1
Real-time PCR	Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System

3-3 実験方法

3-3-1 *avaR3*破壊株の作製

S. avermitilis の染色体 DNA を鋳型とし、プライマーセット *avaR3*-up-Fw/*avaR3*-up-Re と *avaR3*-dw-Fw/*avaR3*-dw-Re を用いて *avaR3* 上流断片 (nt 4582958-4584926) と下流断片 (nt 4580176-4582218) を PCR によりそれぞれ増幅した。得られた2断片を *Hind*III と *Spe*I で消化し、*Hind*III 処理した pKU451 との連結により pLT341 を作製した。続いて pKU474 を鋳型とし、プライマーセット loxP_resist_loxP_*Spe*I-Fw/Re を用いた PCR により、*Spe*I 認識部位が付加された 1.7 kb の aph 断片 (2-3-1 参照) を取得した。*Spe*I 処理した aph 断片を pLT341 の *Spe*I 認識部位に挿入し、pLT342 を構築した。pLT342 より切り出した 5.7 kb の *Eco*RI 断片を pKU250 の *Eco*RI 認識部位に挿入し、得られた *avaR3* 遺伝子破壊用ベクターを pLT343 とした。pLT343 による *E. coli* F⁻ *dcm* Δ(*srl-recA*)306::Tn10 pUB307-*aph*::Tn7 の形質転換体と *S. avermitilis* KA320 の胞子を用いて接合伝達を行った。*S. avermitilis* 形質転換体をチオストレプトン耐性により選択し、セカンドクロスオーバーを誘導した。チオストレプトン感受性かつカナマイシン耐性であるクローンを選択し、PCR によって目的の *avaR3* 破壊株の構築を確認した。

3-3-2 *avaR3*相補株の作製

S. avermitilis の染色体 DNA を鋳型とし、プライマーセット *avaR3*-comp-Fw/*avaR3*-comp-Re を用いた PCR により *avaR3* 遺伝子とその上流領域を含む DNA 断片 (nt 4581968-4583157) を取得した。この断片を pENTR (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo) にクローン化し、エントリークローンを作製した。pLT113 (2-3-2 項参照) と構築したエントリークローンとの LR 反応 (LR Clonase Enzyme Mix, Life Technologies Japan Ltd., Tokyo) により、*avaR3* 相補用ベクター pLT362 を得た。接合伝達により pLT362 を *avaR3* 破壊株に導入し、染色体上の *attB* φC31 部位に挿入されたこと

をPCRで確認した。またコントロール株としてpSET152を導入した*avaR3*破壊株を作製した。

3-3-3 液体培養

S. avermitilis KA320Nの胞子を 10^7 c.f.u./mlとなるよう70 ml-APM培地/500 ml容バツフルフラスコに植菌し、28°C、160 rpmで48時間浸盪培養した。培養液を50 ml容ファルコンチューブに適量移し、遠心により菌体を回収した (KUBOTA 5420)。等量のAPM培地を用いて菌体を懸濁、洗浄する操作を、2回繰り返した。再び等量のAPM培地に菌体を懸濁し、懸濁液を1.2 mlずつ1.5 ml容チューブに分注した。液体窒素で凍結したものを前培養菌体として-80°Cで保存した。

本培養は前培養菌体をOD₆₀₀=0.3となるよう70 ml-APM培地/500 mlバツフルフラスコに植菌し (n=3)、28°C、160 rpmで浸盪培養した。サンプリングは、先端を切除したP5000用白チップ2本をピペットマンに連結して行い、培養24時間目は2.5 ml、48時間目は3.0 ml、以降24時間おきに144時間目まで3.5 mlずつ取ることにした。

3-3-4 液体培地からの抗生物質抽出

3-3-3項にならい、本培養を行った。サンプリングした培養液のうち500 µlを用いて2-3-3項に記載した方法により抗生物質抽出液を調製した。

3-3-5 固体培地からの抗生物質抽出

12穴プレート (12 Well Cell Culture Cluster, costar)の各ウェルに2.5 mlのYMS-MC培地またはAPM固体培地を入れ、 10^5 c.f.u./wellとなるよう胞子を植菌し、28°Cで静置培養した (YMS-MC培地は8日間、APM培地は10日間培養)。生育した菌体が付着したまま培地を四分割し、5 mlのメタノールを入れた15 ml容コンカルチューブに移した。室温で遮光しながら、30分間120 spmで浸盪抽出した。遠心分離 (KUBOTA 5420)によって回

収した5 ml抽出液のうち1 mlを1.5 ml容チューブに移し、胞子を取り除くため、4°C、14,000 rpmで5分間遠心を行った (KUBOTA 3700)。得られた上清を固体培地からの抗生物質抽出液とした。

●YMS-MC培地

Yeast extract (Becton Dickinson, USA)	4 g
Malt extract (Becton Dickinson, USA)	10 g
Soluble starch	4 g
Agar	20 g
(pH 7.5) /1 L	

オートクレーブ後、フィルター滅菌した2 M MgCl₂, 2 M CaCl₂溶液を最終濃度が10 mMとなるよう添加した。

●APM固体培地

Glucose	45.0 g
Peptonized milk (OXOID, UK)	24.0 g
Yeast extract (Becton Dickinson, USA)	2.5 g
Agar	15.0 g
(pH 7.5) /1 L	

3-3-6 抗生物質の定量

3-3-4項、3-3-5項で調製した抗生物質抽出液を用いてHPLC解析により抗生物質の定量を行った。AVMの解析条件は2-3-3項に記載した通りである。抗生物質オリゴマイシンの定量にはAVMと同じ条件を用いた。抗生物質フィリピン (Fig. 1-7)の定量は以下に示す HPLC 解析条件を用いた。標品には Oligomycin from *Streptomyces diastatochromogenes* (SIGMA-ALDRICH JAPAN, Tokyo)およびFilipin complex from *Streptomyces filipinensis* (SIGMA-ALDRICH JAPAN, Tokyo)を用いた。

●Filipin検出用HPLC条件

HPLC	HITACHI LaChrom L-7100, 7200, 7300, 7400
Column	Mightysil RP-18GP (4.6 mmφ, 250 mm, 5 μm)
Buffer	MeOH: H ₂ O: CH ₃ CN= 20:50:30
Wavelength	336 nm
Flow rate	1.2 ml/min
Temperature	40°C
Injection volume	50 μl

3-3-7 HPLCによる二次代謝産物の解析

25 mlのYMS-MC培地に 10^8 c.f.u./plateとなるよう胞子を植菌し、28°Cで静置培養をした。7日間培養後、培地を約1 cm角に切り、25 mlのMeOHを入れた50 ml容コニカルチューブに移した。室温で遮光しながら、30分間120 spmで浸漚抽出した。遠心分離(KUBOTA 5420)によって回収した25 ml抽出液のうち1 mlを1.5 ml容チューブに移し、胞子を取り除くため、4°C、14,000 rpmで5分間遠心分離を行った (KUBOTA 3700)。得られた上清を固体培地からのメタノール抽出液とした。液体培養液からの二次代謝産物の抽出は3-3-4項と同様に行った。それぞれの抽出液を以下の条件でHPLCにより解析した。

●二次代謝産物解析用HPLC条件

HPLC	HITACHI LaChrom L-7000, 7100, 7200, 7300, 7455
Column	CAPCELL PAK C18 (UG80, 粒径5 μ m, 4.6 mm I.D. x 250 mm)
Buffer A	MeOH + 0.01%TFA
Buffer B	H ₂ O + 0.075%TFA

Time (min)	%-MeOH
0	10
5	10
10	20
20	40
30	60
40	80
50	100
60	100
70	100
80	10
90	10

Flow rate	1.0 ml/min
Wavelength	200-500 nm (フォトダイオードアレイ検出器)
Column oven	35°C
Injection volume	100 μ l

3-3-8 乾燥菌体重量の測定

先端を切除した青チップで1.5 mlの培養液（750 μ l x2）を取り、あらかじめ乾燥させ重量を測定しておいたろ紙（ADVANTEC, No. 2, 55 mm）にのせた。ブフナーろうとと脱気ビンを用いて吸引濾過し、蒸留水で洗浄した後（3 ml x 4回）、75°Cの乾燥機で重量が一定になるまで乾燥させた。

3-3-9 形態分化観察および孢子形成量の測定

以下の7種類の培地を25 ml/plateとなるよう作製した。10⁷-10⁸ c.f.u./ml程度に希釈した孢子懸濁液を綿棒で植菌した後、28°Cで静置培養した。孢子形成量の比較解析には、25 mlのAPM固体培地に孢子を10⁷ c.f.u.塗り広げ、28°Cで10日間培養した。つまようじでプレート全面から菌糸と孢子をかき取り、50 ml容コニカルチューブ内の滅菌水に懸

濁した。懸濁液を綿濾過した後、3,500 rpmで8分間、遠心分離した (KUBOTA 5420)。回収した胞子を1 mlの20%グリセロール溶液に懸濁し、この懸濁液を希釈してYMS-MC培地に広げ、胞子数を計測した。

●ISP4培地

ISP Medium 4 (Becton Dickinson, USA)	37 g
	/1 L

●MM (+0.5% mannitol)培地

L-asparagine	0.50 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
Agar	10.00 g
	(pH 7.0) /1 L

オートクレーブ後、培地100 mlに対し以下の試薬を添加した。

20% Mannitol	2.5 ml
--------------	--------

●オートミール培地

Oatmeal (The Quaker Oats Company, Chicago)	20 g
Agar	15 g
	(pH 7.0) /1 L

最終培地容量の半分量の蒸留水とオートミールをビーカーに入れ、火にかけた。沸騰後、弱火で15分間加熱した。火を止め粗熱が取れたところで、3枚に重ねたガーゼで濾過した。ビーカー内の残留物は蒸留水で洗い、同様に濾過した。pHを調整した後、メスアップした。

●R5培地

Sucrose	103.00 g
Glucose	10.00 g
Yeast extract (Becton Dickinson, USA)	5.00 g
Casamino acid (Becton Dickinson, USA)	0.10 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.12 g
10 x Trace element solution	0.20 ml
TES buffer	5.73 g
Agar	22.00 g
/1 L	

オートクレーブ後、培地100 mlに対し以下の溶液を添加した。

0.5% KH ₂ PO ₄	1.0 ml
5 M CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.4 ml
20% L-proline	1.5 ml
1N NaOH (オートクレーブ不要)	0.7 ml

〈10 x Trace element solution〉

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10 mg
/100 mL	

●SFM培地

Soya flower (Rainbow wholefoods, UK)	20 g
D(-)-Mannitol	20 g
Agar	20 g
/1 L	

オートクレーブは2回行った。

3-3-10 顕微鏡によるペレットの観察

水で約200倍に希釈した液体培養液をスライドガラスに適量取り、カバーガラスをかけずに顕微鏡 (OLYMPUS BX50, 村中研究室所有)で観察した (接眼レンズ10倍、対物レンズ10または20倍)。カメラ (OLYMPUS DP70)とシャッタードライバー (UNIBLITZ VMM-D1)を用いて、ペレットの写真撮影を行った。ペレットの長軸と短軸の平均値を直径とし、フラスコ1本につき10個のペレットの直径を測定した。

3-3-11 RNA抽出

3-3-3項にならって本培養を行い、培養24、48、72時間目の菌糸を吸引ろ過により回収した。菌糸を乳鉢に移し、液体窒素で冷却しながらパウダー状になるまですりつぶした。以降、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, USA) のプロトコールにしたがってRNAを精製した。カラム1本につき50 μ lのRNase-free waterを2回アプライし、RNAを溶出した。得られたtotal RNA溶液は-80°Cで保存した。

3-3-12 DNase I処理

3-3-11項で調製したRNAを用いて、以下のように反応液を調製し、37°Cで30分間反応させた。

Total RNA	20 μ g
10x DNase I buffer	20 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l) (TAKARA Bio, Shiga)	2 μ l
DNase I (RNase-free) (TAKARA Bio, Shiga)	8 μ l
	200 μ l

酸性フェノール:クロロホルム (1:1) 溶液を200 μ l加え攪拌した後、遠心分離 (MiniSpin plus, Eppendorf)により水層を回収した。エタノール沈殿の後、20 μ lのRNase-free waterに溶解し、-80°Cで保存した。

3-3-13 RT-PCR解析

1) 3-3-12項で調製したDNase I処理済みのRNAを用いて、PCRチューブに以下の反応液を調製した。

Total RNA (DNase I treated)	1 µg
Random Primer (100 ng/µl) (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)	1 µl
dNTP (2.5 mM each) (TAKARA Bio, Shiga)	4 µl
RNase free H ₂ O	6 µl
	13 µl

2) サーマルサイクラーを用いて65°Cで5分間変性処理した後、急冷した。

3) 上記の反応液を以下のように調製した。25°C 5分、50°C 60分、70°C 15分で逆転写反応を行った。

反応液	13 µl
5x First Strand buffer	4 µl
0.1 M DTT	1 µl
Recombinant RNase Inhibitor (40 U/µl) (TAKARA Bio, Shiga)	1 µl
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µl) (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)	1 µl
	20 µl

4) 逆転写反応産物19 µlと133 µlのH₂Oを混合し、8倍希釈液を作製した。分注して-20°Cで保存した。

5) 以下のように反応液を調製し、PCR反応を行った。また、染色体DNAの混入がないことを確かめるため、逆転写産物の代わりに6.25 ng/µl total RNA溶液2 µlを用いた。

cDNA溶液 (8倍希釈液)	2.0 μl		
Primer Fw (10 μM)	0.5 μl	97°C	3分
Primer Re (10 μM)	0.5 μl	97°C	30秒
DMSO	0.7 μl	58°C	30秒
GoTaq Green Master Mix 2x (Promega KK)	5 μl	72°C	1分
H ₂ O	1.3 μl	4°C	∞
	10 μl		

6) PCR産物5 µlを2%アガロースゲルで電気泳動した。

3-3-14 5'-RACE (Rapid amplification of 5' cDNA ends)解析

GeneRacer Kit (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)を用いて以下の手順で行った。
尚、原核生物のmRNAの5'末端にはキャップ構造が無いことを考慮して、キットのプロトコールに記載されているCIP処理は行わず、TAP処理から始めた。

1) 3-3-12項で調製したDNase I処理済みのRNAを用いて以下の反応液を調製し、37°Cで1時間反応させた。

Total RNA (DNase I treated)	2 µg
10x TAP Buffer	1 µl
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl
TAP (0.5 U/µl)	1 µl
DEPC H ₂ O	Up to 10 µl

2) プロトコール通りにフェノールクロロホルム処理およびエタノール沈殿を行った。

3) 得られたペレットを7 µlのDEPC H₂Oに溶解した。

4) 3)のRNA溶液によってRNA Oligo (0.25 µg)を溶解した。

5) 65°Cで5分間熱処理をした後、氷中で急冷した。

6) 以下の反応液を5)のRNA溶液に加え、37°Cで1時間ライゲーションを行った。

反応液	±7 µl
10x Ligase Buffer	1 µl
10 mM ATP	1 µl
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl
T4 RNA ligase (5 U/µl)	1 µl
	10 µl

7) フェノールクロロホルム処理およびエタノール沈殿の後、11 µlのDEPC H₂Oに再溶解した。

8) 以下の反応液を調製した。

Ligated RNA	11 μ l
Random primers (100 ng/ μ l) (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)	1 μ l
dNTP Mix (10 mM each) (TAKARA Bio, Shiga)	1 μ l
	13 μ l

9) 65°Cで5分間熱処理をした後、氷中で急冷した。

10) 上記の反応液を用いて以下のように調製した。25°C 5分、50°C 60分、70°C 15分で逆転写反応を行った。

反応液	13 μ l
5x First Strand buffer	4 μ l
0.1 M DTT	1 μ l
RNaseOut (40 U/ μ l)	1 μ l
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1 μ l
	20 μ l

11) 逆転写反応液にRNase H (2 U/ μ l)を1 μ l加え、37°Cで20分間反応させた。

12) 反応産物を4倍希釈した後、以下の反応液を調製し、1st PCRを行った。

逆転写産物 (4倍希釈液)	1.0 μ l	97°C 3分		} 25 cycles
GeneRacer 5' Primer (10 mM)	0.5 μ l	97°C	30秒	
Gene specific primer 1 (10 mM)	0.5 μ l	60°C	30秒	
DMSO	0.7 μ l	72°C	1分	
GoTaq Green Master Mix 2x	5.0 μ l	4°C	∞	
(Promega KK, Tokyo)				
H ₂ O	2.3 μ l			
	10 μ l			

13) 12)のPCR産物を用いて2nd PCRを行った。

1st PCR product	2.0 μ l	97°C	3分	} 30 cycles
GeneRacer 5' Nested Primer (10 μ M)	2.5 μ l	97°C	30秒	
Gene specific primer 2 (10 μ M)	2.5 μ l	60°C	30秒	
DMSO	3.5 μ l	72°C	1分	
GoTaq Green Master Mix 2x	25.0 μ l	4°C	∞	
(Promega KK, Tokyo)				
H ₂ O	15.5 μ l			
	50 μ l			

14) 50 µlのPCR産物を3%アガロースゲルで電気泳動し、検出された断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA)により抽出した。

15) TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)を用いて抽出したDNA断片をクローン化した。以下の反応液を調製し、37°Cで10-30分間、連結反応を行った。

DNA断片	0.5-4.5 µl
Salt Solution	1.0 µl
pCR4-TOPO	0.5 µl
Up to 6.0 µl	

16) キットのプロトコールに従い、連結反応産物によるOne Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)の形質転換体を取得した。形質転換体より抽出したプラスミドの塩基配列を解析し、転写開始点を決定した。

3-3-15 qRT-PCR解析

1) プライマー作成用ソフトウェア Primer3 (BROAD INSTITUTE <http://www.broadinstitute.org/cmap/>)を用いて *avaR1*、*avaR2*、*rpoD*のORF内にqRT-PCR用プライマーを設計した。以下に特に留意したプライマー設計条件を示す。

Primer size: 20-22 nt

Primer Tm: Opt 69°C (Max Tm difference: 3°C)

Product length: 90-130 bp

Product Tm: Max 90°C

*avaR3*遺伝子解析用のプライマーは、*avaR3*の転写開始点から破壊株作製時に残した5'末端領域までが増幅できるような位置に設計した。尚、染色体DNAを鋳型にPCRを行い、

得られた増幅断片の塩基配列を読むことによって、設計通りのDNA断片が増幅できることを確認した。

- 2) 野生型株、*avaR3*破壊株、*avaR3*相補株から抽出した培養24、48、72時間目のtotal RNA (DNase I処理済み)を用いてcDNAを合成した。Total RNA量を2 μ g使用したこと以外は、3-3-11項の1)-3)に記載した条件と同じである。
- 3) 逆転写反応産物19 μ lをFig. 3-2のように希釈し、-20°Cで保存した。尚、cDNAの合成効率は何のサンプルでも同じであると考え、合成後の定量は行わなかった。そこでcDNAの量は、合成に用いたRNAの量で表記することにした。

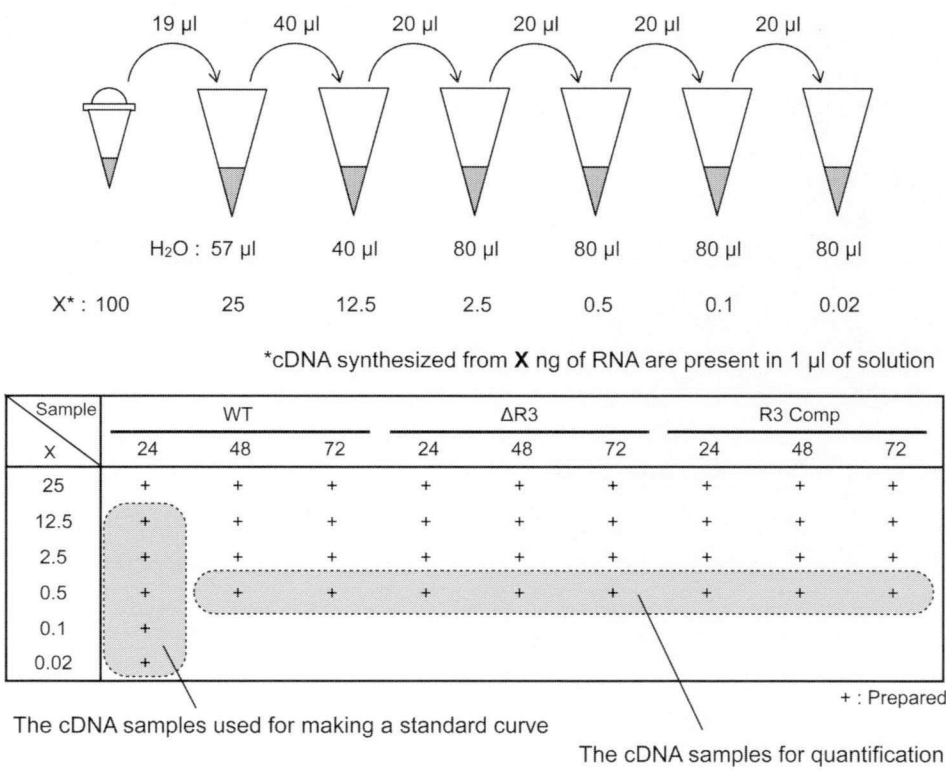


Fig. 3-2 Dilution of cDNA samples

- 4) RNA溶液に染色体DNAが混入していないこと、もしくは無視できる程少量であることを確かめるため、cDNAの代わりにRNAサンプルをPCRの鋳型として用いる必要がある。

通常の定量用サンプルの場合、1反応あたり1 ngのRNAから合成されたcDNAを使用することから、0.5 ng/μlのRNA溶液を調製し、これを1反応あたり2 μl使用することとした。

5) 手袋を着用し、1反応あたり以下の反応液組成になるようpremixを作製した。

Primer Fw (10 μM)	0.4 μl
Primer Re (10 μM)	0.4 μl
SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)	10 μl
H ₂ O	7.2 μl
	20 μl

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)にプレミックスを18 μlずつ分注した後、鋳型を2 μlずつ加えた。鋳型には3)で調製した検量線作成用のcDNAサンプルと、定量に用いるcDNAサンプルを使用し、1つのサンプルに対し反応液を3つ用意した。ネガティブコントロールとしては4)で調製したRNAサンプルまたはH₂Oを使用した。

7) MicroAmp Optical Adhesive Film (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)と専用のCompression padを用いて、96穴プレートをしールした。プレートを室温で1,800 rpm、5分間遠心し（原島研究室所有）、反応液に気泡がないことを確認した。Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (原島研究室所有)を用いて以下の条件でPCRを行った。

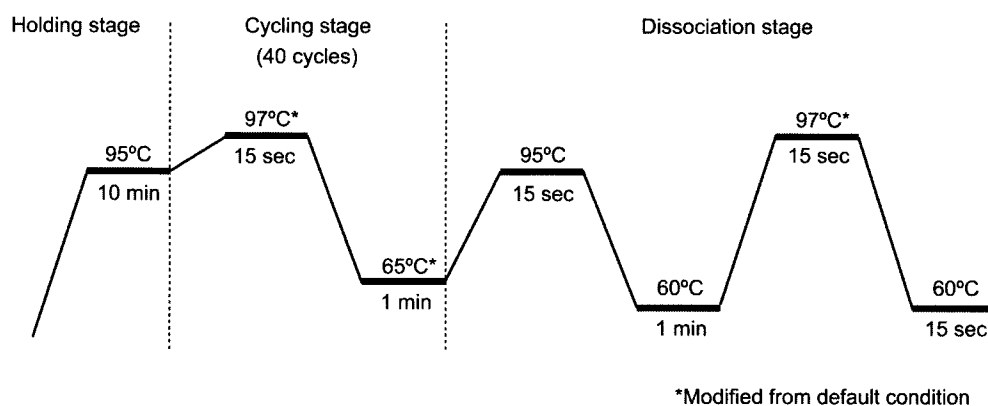


Fig. 3-3 Condition of real-time PCR

3-4 実験結果

3-4-1 *avaR3*破壊株における液体培養条件下での抗生物質生産量の解析

*S. avermitilis*は主要二次代謝産物として3種の抗生物質AVM、オリゴマイシン (OLM)、フィリピン (FLP)を生産する。*AvaR3*が抗生物質生産制御に関与するかどうかを調べるため、野生型株と*avaR3*破壊株における抗生物質生産プロファイルを液体培養条件下で比較した (Fig. 3-4)。野生型株におけるAVM生産は培養72時間目から検出され、120時間目まで増加したのに対し、*avaR3*破壊株では野生型株の1%にも満たない量のAVMしか生産されなかった。一方FLPは、野生型株では120時間目に最大生産量に達したが、*avaR3*破壊株では72時間目に野生型株の6倍量を生産した。OLM生産については、野生型株と破壊株の間に変化は見られなかった。AVMおよびFLP生産量の変化が*avaR3*遺伝子の破壊に起因するかどうかを確かめるため、*avaR3*破壊株に*avaR3*遺伝子を導入し2つの抗生物質の生産量を解析したところ、野生型株と同じ生産プロファイルとなった。以上より、*AvaR3*はAVM生産を正に、FLP生産を負に制御することがわかった。

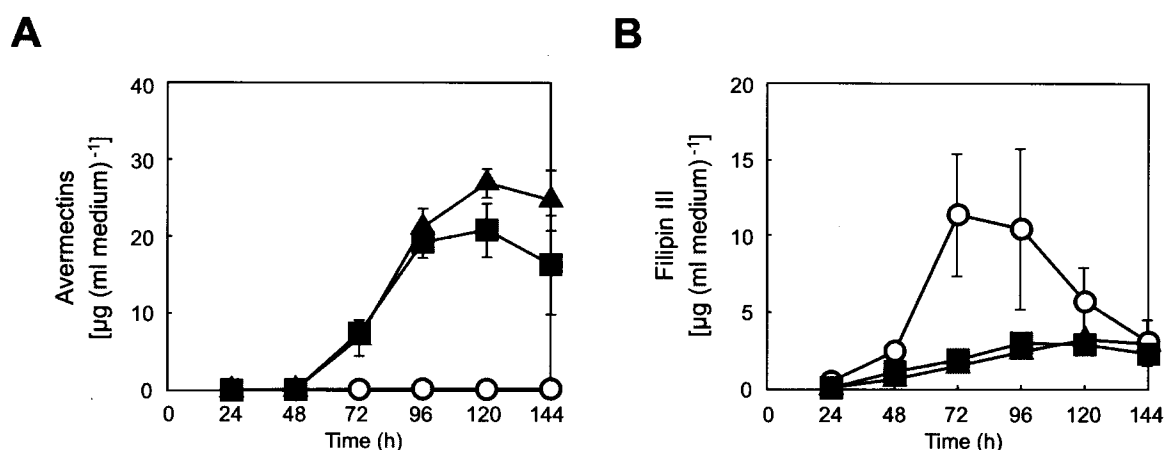


Fig. 3-4 Production profiles of avermectin (A) and filipin (B) in the wild-type strain (filled squares), ΔavaR3 mutant (open circles), and *avaR3*-complemented exoconjugant (filled triangles) in liquid culture. Error bars indicate the standard deviations from triplicate cultures.

3-4-2 *avaR3*破壊株における抗生物質生合成遺伝子群の転写解析

AvaR3はAVMとFLPの生産を制御することから、AvaR3がそれら2つの抗生物質の生合成遺伝子の転写を制御している可能性が考えられる。そこで、RT-PCRにより、*avaR3*破壊株におけるAVMとFLPの生合成遺伝子群の転写を解析した。18個のAVM生合成遺伝子 (*ave*)のうち、転写単位が異なると推定される9遺伝子についてその転写を解析したところ、野生型株では培養48時間目に全ての遺伝子の転写が検出されたのに対し (Fig. 3-5A)、*avaR3*破壊株では5つの構造遺伝子 (*aveA1*, *aveA4*, *aveBI*, *aveBIII*, *aveBVIII*)の転写レベルが、48時間目で顕著に低くなっていた。*avaR3*破壊株に*avaR3*遺伝子を導入して作製した相補株では、野生型株と同程度の転写量が検出されたことから、AvaR3は一部のAVM生合成遺伝子の転写活性化に必要であると言える。さらに*ave*遺伝子群の転写活性化因子をコードする*aveR*の転写量は、*avaR3*破壊株では48時間目で野生型株に比べて顕著に減少していた。しかし72時間目ではその転写が明瞭に検出できたことから、AvaR3は*aveR*を適切なタイミングで転写活性化するために必要であることがわかった。よって*avaR3*破壊株におけるAVM生産量の減少は、AveRの制御下にある*ave*遺伝子群の転写が減少および遅延したことに起因すると推測した。

続いて、*avaR3*破壊株において早期過剰生産が見られたFLPの生合成遺伝子クラスターの転写パターンを調べたところ、解析したどの遺伝子においてもAvaR3依存的な転写パターンは見られなかった (Fig. 3-5B)。従って、*avaR3*破壊株におけるFLP生産量の変化は、生合成遺伝子の転写調節によるものではないことがわかった。以上より、AvaR3はAVM生合成遺伝子の転写を活性化することによりAVM生産を正に制御し、生合成遺伝子の転写調節とは別のプロセスに作用してFLPの生産を負に制御することがわかった。

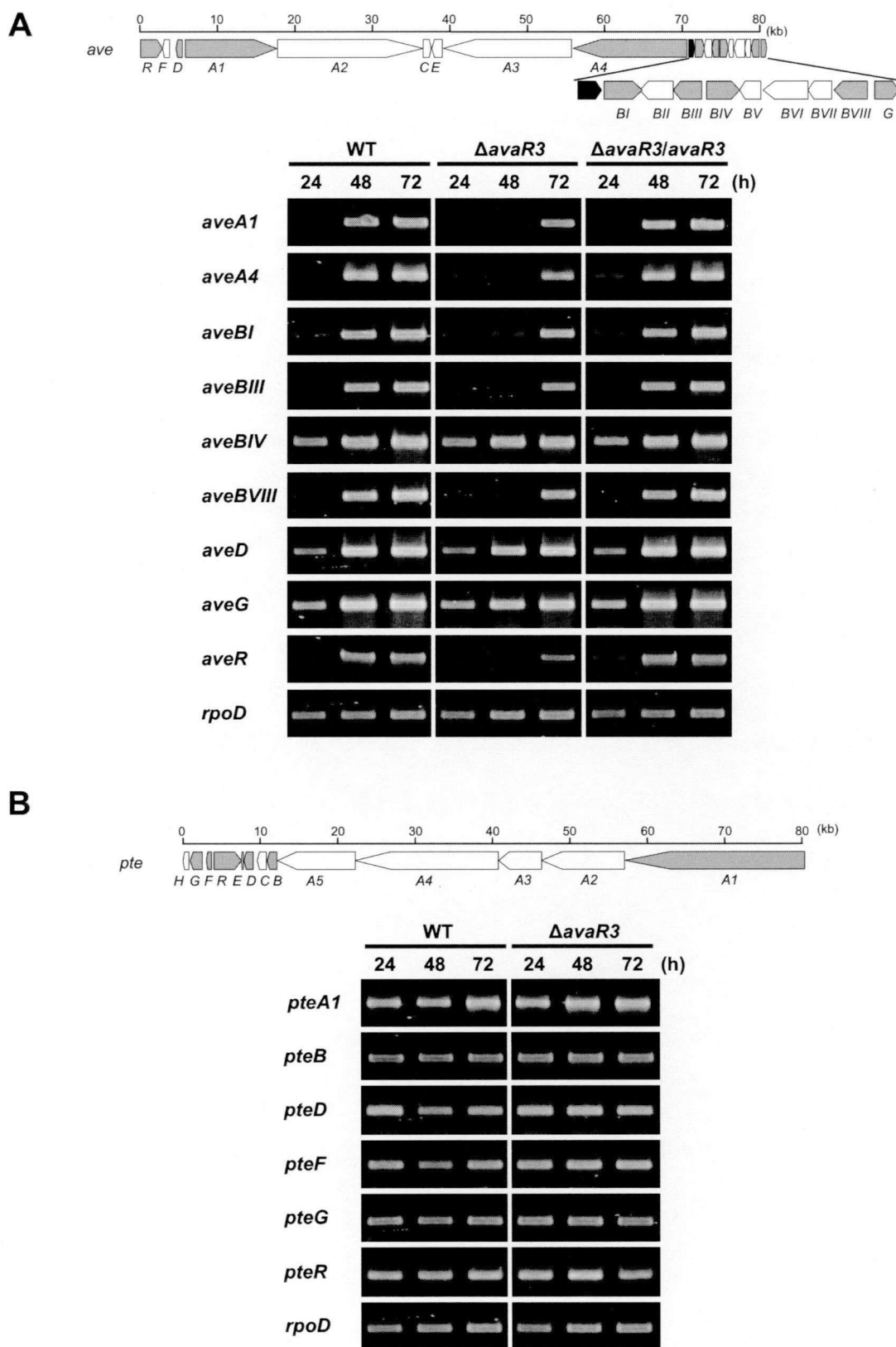


Fig. 3-5 Gene expression analysis of biosynthetic genes for avermectin (A) and filipin (B) by RT-PCR.

(Fig. 3-5) WT, the wild-type strain; Δ *avaR3*, Δ *avaR3* mutant; Δ *avaR3/avaR3*, *avaR3*-complemented exconjugant. Total RNA was isolated from mycelia harvested at 24, 48, and 72-h of cultivation. (A) The avermectin biosynthetic genes investigated in the present analysis are indicated by dark grey. *sav944* that is not involved in avermectin biosynthesis is represented by black. Avermectin production started between 48-h and 72-h of cultivation. In the PCR, the following numbers of amplification cycles were used: 27 cycles for the *aveR* and *aveBVIII* transcripts, 25 cycles for the *rpoD* transcript, and 30 cycles for the transcripts of the other genes. (B) The filipin biosynthetic genes investigated in the present analysis are indicated by dark grey. Filipin III production in the Δ *avaR3* mutant was 2- and 6-fold higher compared to that in the wild-type strain at 48-h and 72-h of cultivation, respectively. In the PCR, the following numbers of amplification cycles were used: 23 cycles for the transcripts of *pteB*, *pteD*, and *pteF*, 25 cycles for the *rpoD* transcript, and 26 cycles for the transcripts of the other genes.

3-4-3 *avaR3*破壊株における固体培養条件下での抗生物質生産量の解析

*Streptomyces*属放線菌は、液体培養条件下では菌糸を伸長して生育するのに対し (submerged sporeと呼ばれる胞子を形成する菌種もある)、固体培地上では形態分化を伴った生育をすることから明らかであるように、両培養条件下では生理的に異なるイベントが起こっている⁶⁴。従って、生産される二次代謝産物も異なれば、それを制御する機構も異なる⁶⁵。そこで、液体培養において抗生物質生産を制御することが明らかとなったAvaR3が、固体培養条件下においても抗生物質生産制御に重要な役割を果たすのかどうかを調べることにした。3-3-6項の方法によりAPM固体培地とYMS-MC培地における*avaR3*破壊株の抗生物質生産量を検証した。APM固体培地においては、*avaR3*破壊株のAVM生産は79%減少し、FLP生産は3.3倍に増加したが (Fig. 3-6A)、OLM生産に変化は見られなかった。*avaR3*破壊株に*avaR3*遺伝子を導入して作製した相補株ではAVM、FLPの生産ともに部分的ではあるが回復することがわかった。同様にYMS-MC培地においても、*avaR3*の破壊に

よりAVM生産量は69%減少し、FLP生産量は1.7倍に増加したが、OLM生産に変化は見られなかった (Fig. 3-6B)。 *avaR3*破壊株への*avaR3*遺伝子の導入によってAVMとFLPの生産は野生型株と同程度にまで回復した。よって、固体培養時においても液体培養時と同様、AvaR3はAVM生産を正に、またFLP生産を負に制御することがわかった。ただし、破壊株でのAVM生産量が野生型株の約1%にまで低下した液体培養時と比べると、固体培養では約7-8割程度の減少に留まった。よって固体培養時にはAvaR3以外にも別の因子がAVM生産に関与していると推測される。

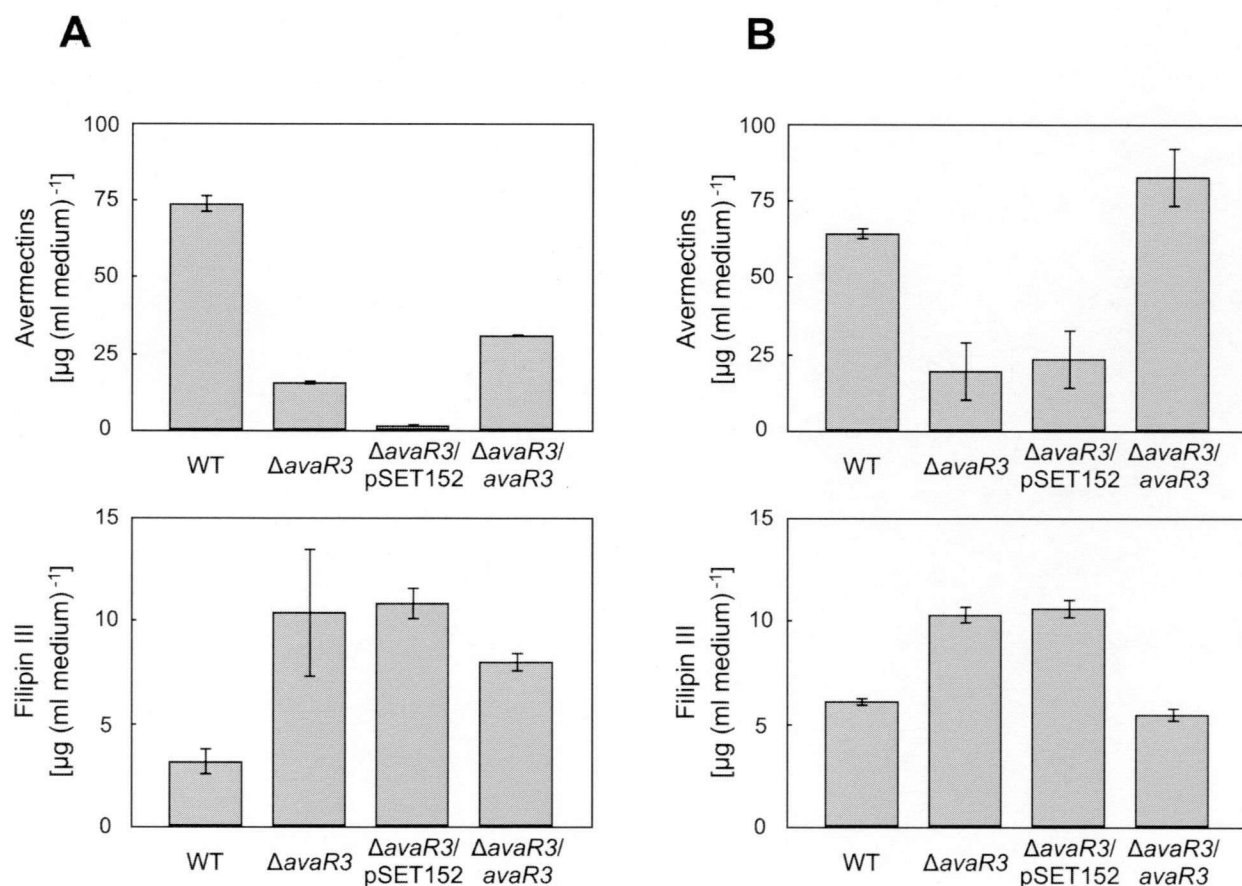


Fig. 3-6 Antibiotic production in the ΔavaR3 mutant on solid media. WT, the wild-type strain; ΔavaR3 , ΔavaR3 mutant; $\Delta\text{avaR3/pSET152}$, ΔavaR3 carrying pSET152; $\Delta\text{avaR3/avaR3}$, *avaR3*-complemented exconjugant. Error bars indicate the standard deviations from triplicate cultures.

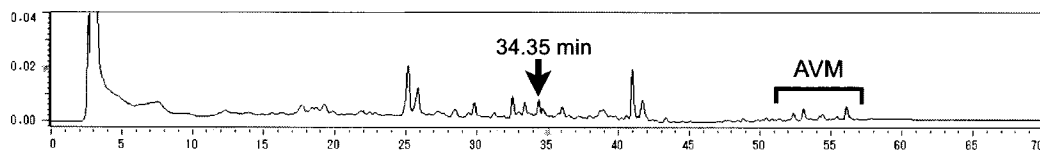
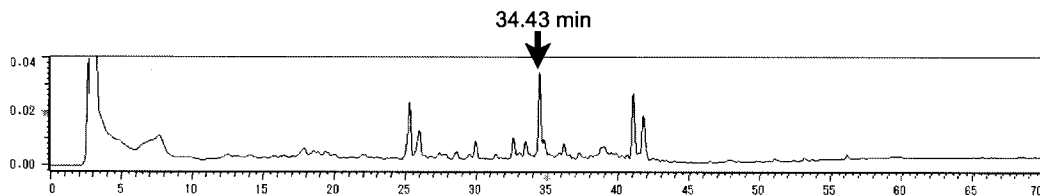
3-4-4 AvaR3によって制御される二次代謝産物の探索

AvaR3がAVMとFLPに加えて他の二次代謝産物の生産も制御するかどうかを解析することにした。3-3-7項の方法で液体培養144時間目のメタノール抽出液と、7日間培養後のYMS-MC固体培地からのメタノール抽出液を調製し、フォトダイオードアレイ検出器付きのHPLCで解析した。その結果、液体培地からの抽出液では、野生型株と破壊株の間にピークプロファイルの変化は見られなかった。一方、固体培地からの抽出物では、破壊株の34.4分のピークが野生型株よりも増加していた (Fig. 3-7A)。avaR3破壊株にavaR3遺伝子を導入した相補株では、野生型株のレベルにまで生産量が戻ったことから、AvaR3がこの化合物の生産を抑制することが考えられる。

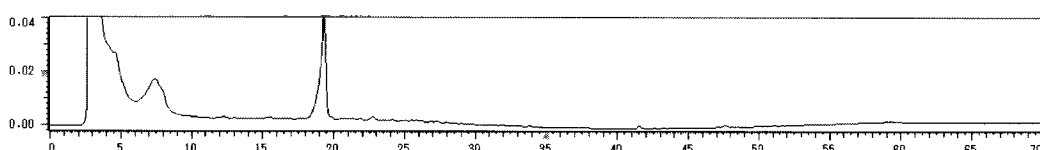
このピークの最大吸収波長は276 nmであり (Fig. 3-7B)、FLP III (溶出時間:41.7分) よりも極性が高い。avaR3破壊株ではFLP生産量が増加していたが、このピークにはポリエン化合物特有のUV吸収が見られないこと、FLP生産量との相関が観察されないことから、このピークに対応する化合物はFLP関連物質ではないと推察した。また、生産量の減少しているAVMの関連物質が蓄積したものとも考えられるが、液体培養時にはこのピークは検出されないことからその可能性は低い。以上より、AvaR3が抗生物質以外の二次代謝産物の生産を制御していることが明らかとなった。今後このピークに対応する化合物を同定することによって、AvaR3による二次代謝制御機構がさらに理解できると期待される。

A

WT

 Δ *avaR3*

YMS-MC



Retention time (min)

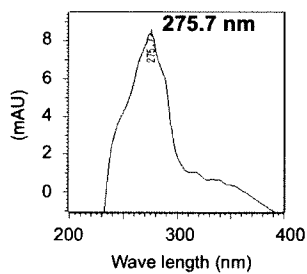
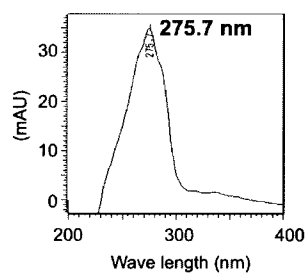
BWT
(34.35 min) Δ *avaR3*
(34.43 min)

Fig. 3-7 Secondary metabolite production in the Δ *avaR3* mutant on solid media. (A) HPLC chromatogram at 275 nm of MeOH extract from solid culture of the wild-type strain (WT) and Δ *avaR3* mutant (Δ *avaR3*), and solid media (YMS-MC). (B) UV spectra of the peak eluted at 34.35 min in the wild-type sample and eluted at 34.43 min in the sample Δ *avaR3* mutant.

3-4-5 *avaR3*破壊株における形態分化観察

オートレギュレーターリセプターが形態分化の制御に関与することが報告されている(1-3-2項参照)。そこでAvaR3が形態分化を制御するかどうか確かめるため、野生型株と*avaR3*破壊株を7種の培地 (APM培地、ISP4培地、MM培地、オートミール培地、R5培地、SFM培地、YMS-MC培地)に画線培養し、形態分化を観察した。その結果、APM固体培地を除く合計6種の培地では、野生型株と*avaR3*破壊株の間に生育速度の差や孢子形成能の差は見られなかった。

APM固体培地では、*avaR3*破壊株は正常に基底菌糸を形成したが (Fig. 3-8A, 4日間培養後)、気中菌糸形成に異常が現れることがわかった。8日間培養後の写真が示すように、野生型株では基底菌糸表面全体が厚い気中菌糸層により覆われているのに対し、*avaR3*破壊株では基底菌糸表面の一部のみが気中菌糸で覆われ、形成された気中菌糸の層は野生型株よりも薄いように感じられた。8日目以降も*avaR3*破壊株における気中菌糸の形成量は野生型株のレベルにまで達することはなく、孢子形成に移行していった。以上より、AvaR3は培地特異的に気中菌糸の形成を促進する因子であることが示唆された。*avaR3*破壊によって気中菌糸形成が乏しくなったことは、孢子形成にも影響を及ぼすのではないかと考え、野生型株と*avaR3*破壊株においてAPM固体培地上で形成される孢子の量を比較した (Fig. 3-8B)。その結果、野生型株では 8.6×10^6 c.f.u./cm²の孢子が形成されたのに対し、破壊株では野生型株の約6分の1量しか形成されなかった。

破壊株で観察された形態分化の変化が*avaR3*の破壊に起因するかどうかを確認するため、*avaR3*破壊株に*avaR3*遺伝子を導入し、形態分化を解析したところ、気中菌糸形成および孢子形成量の部分的な回復が観察された (Fig. 3-8)。破壊株とコントロール株における気中菌糸形成および孢子形成量が異なったことから、*attB* ϕ C31部位への遺伝子相補用ベクターpSET152の導入が形態分化に負の影響を与えたため、*avaR3*遺伝子を相補しても完全に回復しなかったと推察される。類似する現象は、3-4-3項での抗生物質生産解析時にも観察された。

3-4-3項の結果とあわせると、AvaR3はAPM固体培地での培養時には、抗生物質生産と形態分化の両方を制御することがわかった。一方YMS-MC培地では、抗生物質生産のみを制御する。抗生物質生産と形態分化のうち、いずれかへの制御が他方への影響を引き起こしたのであれば、異なる培養条件においても両方への影響が見られるはずである。よって、AvaR3は抗生物質生産と形態分化を別々の経路で制御すると推察される。

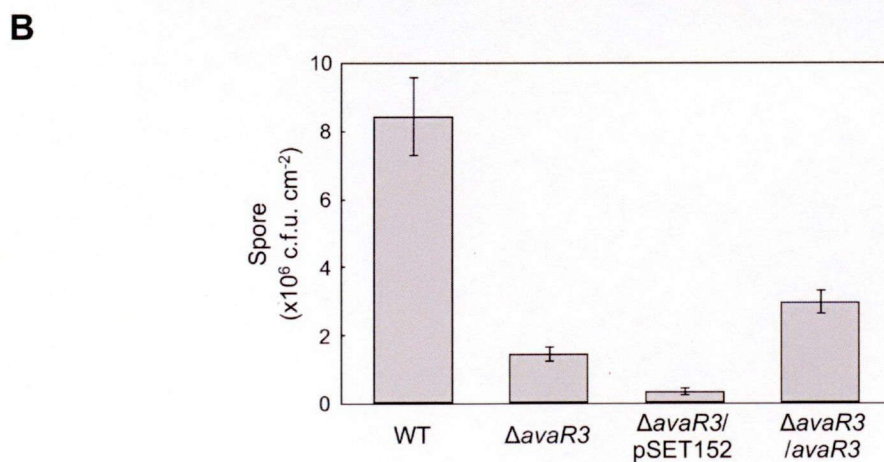
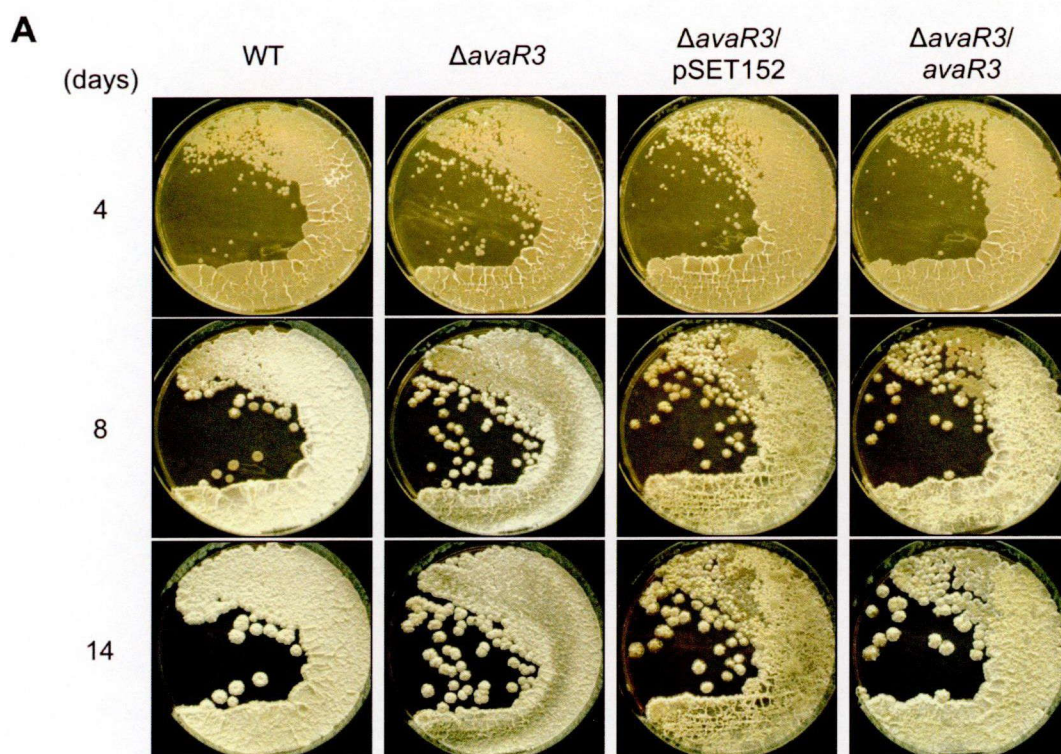


Fig. 3-8 Effect of *avaR3* deletion on cell morphology on agar medium. All experiments were conducted at least twice, and the results were highly reproducible. WT, the wild-type strain; Δ *avaR3*, Δ *avaR3* mutant; Δ *avaR3*/pSET152, Δ *avaR3* carrying pSET152; Δ *avaR3*/*avaR3*, the *avaR3*-complemented exoconjugant. (A) Morphological differentiation on the APM agar medium. Each strain was incubated for 14 days at 28°C, and photographed from the top of the plates. (B) The number of spores on agar medium. The spores (1.0×10^7 c.f.u.) of each strain were plated on 25 ml of APM agar medium, followed by incubation for 10 days at 28°C. Error bars indicate the standard deviations from triplicate cultures.

3-4-6 *avaR3*破壊株における液体培養条件下でのペレット形成の観察

野生型株と *avaR3*破壊株の液体培養時に、濁度法を用いて生育曲線を作成したところ、*avaR3*破壊株におけるOD₆₀₀値が野生型株のそれよりも48時間目で1.7倍、72時間目で1.9倍高くなることがわかった (Fig. 3-9A)。しかしながら、乾燥菌体重量法による測定では72時間目まで両菌株ともほぼ同じような生育曲線を示したことから (Fig. 3-9A)、AvaR3が一次代謝に影響を与えているとは考えにくい。培養液中の菌糸を顕微鏡で観察してみると、野生型株では直径 $154 \pm 14 \mu\text{m}$ のペレットが観察されたのに対し、破壊株では半分程度 ($73 \pm 6 \mu\text{m}$)の大きさのペレットしか形成されていなかった (Fig. 3-9B)。よって、2菌株間のOD₆₀₀値の違いは、ペレットサイズの違いを反映していると考えられる。また *avaR3*破壊株に*avaR3*遺伝子を導入すると、野生型株と同程度のペレット形成 ($152 \pm 16 \mu\text{m}$)が観察されたことから、AvaR3は液体培養中の菌糸の凝集を制御することがわかった。

AvaR3がどのようなメカニズムで菌糸の凝集を制御するのか調べるため、菌糸凝集に関与する以下の3つの因子に着目した。まず一つ目は、孢子形成特異的に働く細胞分裂の促進因子であるSsgA (Sporulation of *S. griseus*)である⁶⁶。SsgAは固体・液体両方の培養条件下で機能し、過剰発現させると液体培養中のペレットが小さくなることが報告されている^{67,68}。二つ目はSsgCと呼ばれるSsgA様タンパク質であり、孢子形成時の細胞分裂においてDNAの凝縮または分配に関与すると考えられている⁶⁶。液体培養条件下での機能は不明であるが、固体培養時にはSsgCがSsgAのアンタゴニストとして働くと考えられている。三つ目は菌糸先端に局在するcellulose synthase様タンパク質、CslAである⁶⁹。CslAは細胞外に向かってセルロース繊維を合成し、その繊維に疎水性タンパク質chaplinが重合すると細胞外マトリックスが形成される。この細胞外マトリックスは疎水性表面への接着に必要であり、バイオフィルムの形成やフラスコ内にできるwall-growthの形成に関与していると考えられている。また*S. coelicolor*では*cslA*の欠失により、ペレット形成が抑えられることがわかっている⁷⁰。

ssgA、*ssgC*、*cslA*のオーソログ遺伝子が*S. avermitilis*ゲノムには存在することから(それぞれ*sav4267*, *sav6810*, *sav5219*)、これらの遺伝子がAvaR3の制御下にあるかどうかをRT-PCRによって解析した。その結果、3遺伝子ともに*avaR3*欠損による転写パターンの変化は見られなかった (Fig. 3-10)。よって、AvaR3による液体培養時の菌糸凝集の促進は、*SsgA*、*SsgC*、*CslA*以外の別の因子を介して行われていると考えられる。

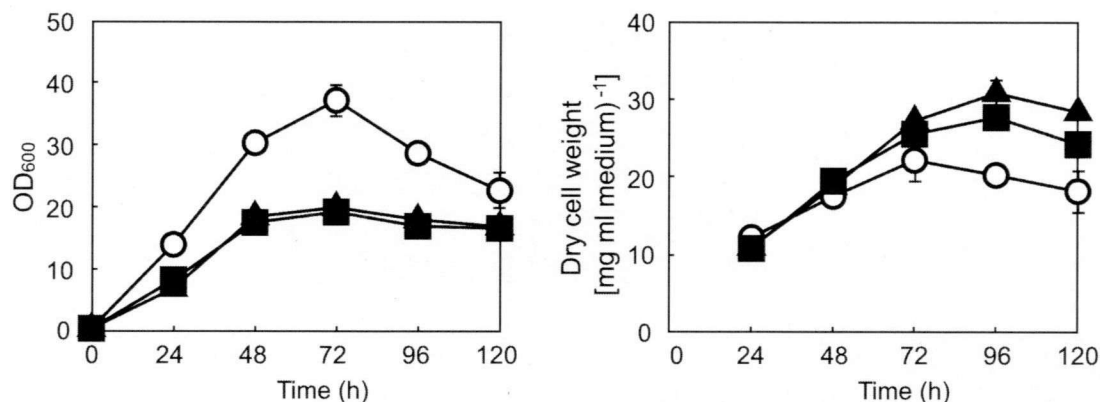
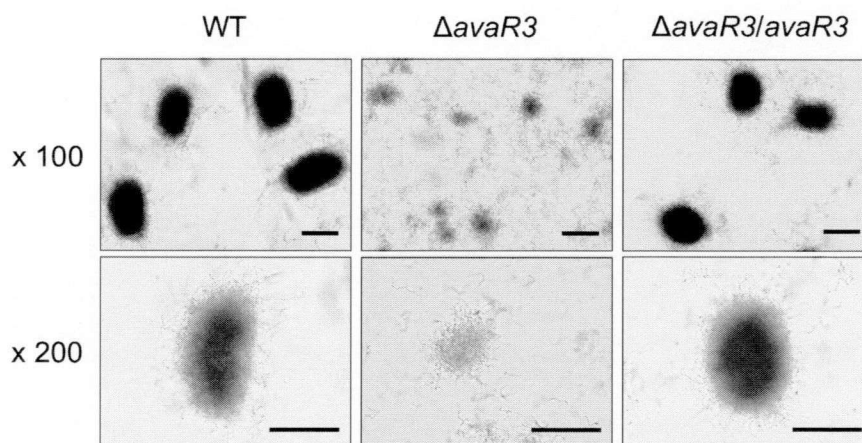
A**B**

Fig. 3-9 Effect of *avaR3* deletion on cell morphology in liquid medium. (A) The growth curves in liquid culture measured by optical density at 600 nm (OD₆₀₀, the left panel) and dry-cell weight (the right panel): the wild-type strain (filled squares), Δ *avaR3* mutant (open circles), and Δ *avaR3*-complemented exoconjugant (filled triangles). Error bars indicate the standard deviations from triplicate cultures. (B) Phase-contrast micrographs of the mycelia in liquid medium. WT, the wild-type strain; Δ *avaR3*, Δ *avaR3* mutant; Δ *avaR3*/avaR3, the *avaR3*-complemented exoconjugant. Cultures were grown in APM medium for 72-h of cultivation. The micrographs were taken with an OLYMPUS BX50 microscope and an OLYMPUS DP70 digital camera. Bar=100 μ m. The diameter was measured from 30 independent pellets, and calculated with the mean and standard deviation.

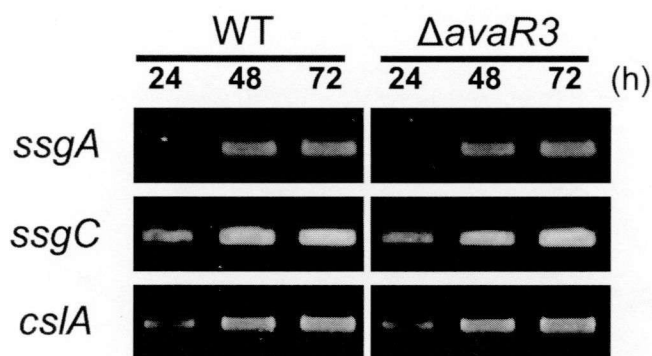


Fig. 3-10 Gene expression analysis of *ssgA*, *ssgC* and *csIA* by RT-PCR in the wild-type strain (WT) and Δ *avaR3* mutant (Δ *avaR3*). Total RNA was isolated from mycelia harvested at 24, 48, and 72-h of cultivation. In the PCR, the following numbers of amplification cycles were used: 25 cycles for the *ssgC* transcript, and 27 cycles for the transcripts of *ssgA* and *csIA*.

3-4-7 *avaR*遺伝子の転写開始点の同定

オートレギュレーターリセプター遺伝子のプロモーター領域には、リセプタータンパク質の結合配列AREが存在することが数多く報告されており、このような場合、リセプタータンパク質が自身をコードする遺伝子及び他のリセプター遺伝子の転写を調節している (1-3-2項参照)。そこでAvaR3の制御下にある遺伝子を探索するため、まずは*avaR3* および*avaR1*, *avaR2*のプロモーター領域を解析した。

5'-RACE法により*avaR3*の転写開始点を決定したところ、翻訳開始点から25塩基上流にあるAであることが判明した (Fig. 3-11A)。転写開始点の上流にはHrdBタイプのシグマ因子が認識するプロモーターの-10領域と類似した配列が見つかったが^{71,72}、-35領域様の配列は見当たらなかった。さらに*avaR3*の転写開始点の上流36塩基から11塩基にあたる領域に、AREコンセンサス配列と相同性を示す配列を見出した (Fig. 3-11D)。この領域を*avaR3*-AREと命名した。

*avaR1*および*avaR2*についても同様の解析を行ったところ、*avaR1*は翻訳開始点から

102塩基上流のGが、*avaR2*は43塩基上流のTがそれぞれの転写開始点であることがわかった (Fig. 3-11B, C)。*avaR1*の転写開始点上流には、HrdBタイプのシグマ因子が認識するプロモーターの-10領域様配列が存在し^{71,72}、*avaR1*転写開始点の上流93塩基から68塩基にあたる領域にARE様配列*avaR1*-AREを見出した (Fig. 3-11D)。また*avaR2*の転写開始点上流には、HrdDタイプのシグマ因子が認識するプロモーターの-10領域と-35領域に類似した配列が存在し⁷¹、転写開始点と重なる位置にARE様配列*avaR2*-AREを見出した (Fig. 3-11D)。

*avaR3*遺伝子は*avaR1*およびcytochrome P450 hydroxylaseをコードする*cyp17*と同一方向に配置されている。*avaR1*、*cyp17*、*avaR3*の遺伝子間領域にはターミネーター様の配列が見当たらないことから、3遺伝子はオペロンを組んでいるのではないかと推測した。RT-PCR解析の結果、*cyp17-avaR3*の遺伝子間領域、*avaR1-cyp17*の遺伝子間領域ともに転写されており、さらに*avaR1-cyp17-avaR3*のトリシストロニックmRNAも検出された (Fig. 3-12)。また5'-RACE法により*cyp17*の転写開始点を同定しようとしたが、適当なDNA断片を得られなかったことから、*avaR3*は自身のプロモーターから転写が開始されるモノシストロニックmRNAと*avaR1*プロモーターからのトリシストロニックmRNAとして転写されることが示唆された。

以上より、3つの*avaR*遺伝子のプロモーター領域およびその上流には全てARE様配列が存在した。よって、それらのARE様配列への結合を介してAvaR3が自身をコードする遺伝子及び*avaR1*と*avaR2*の転写を制御している可能性が示唆された。

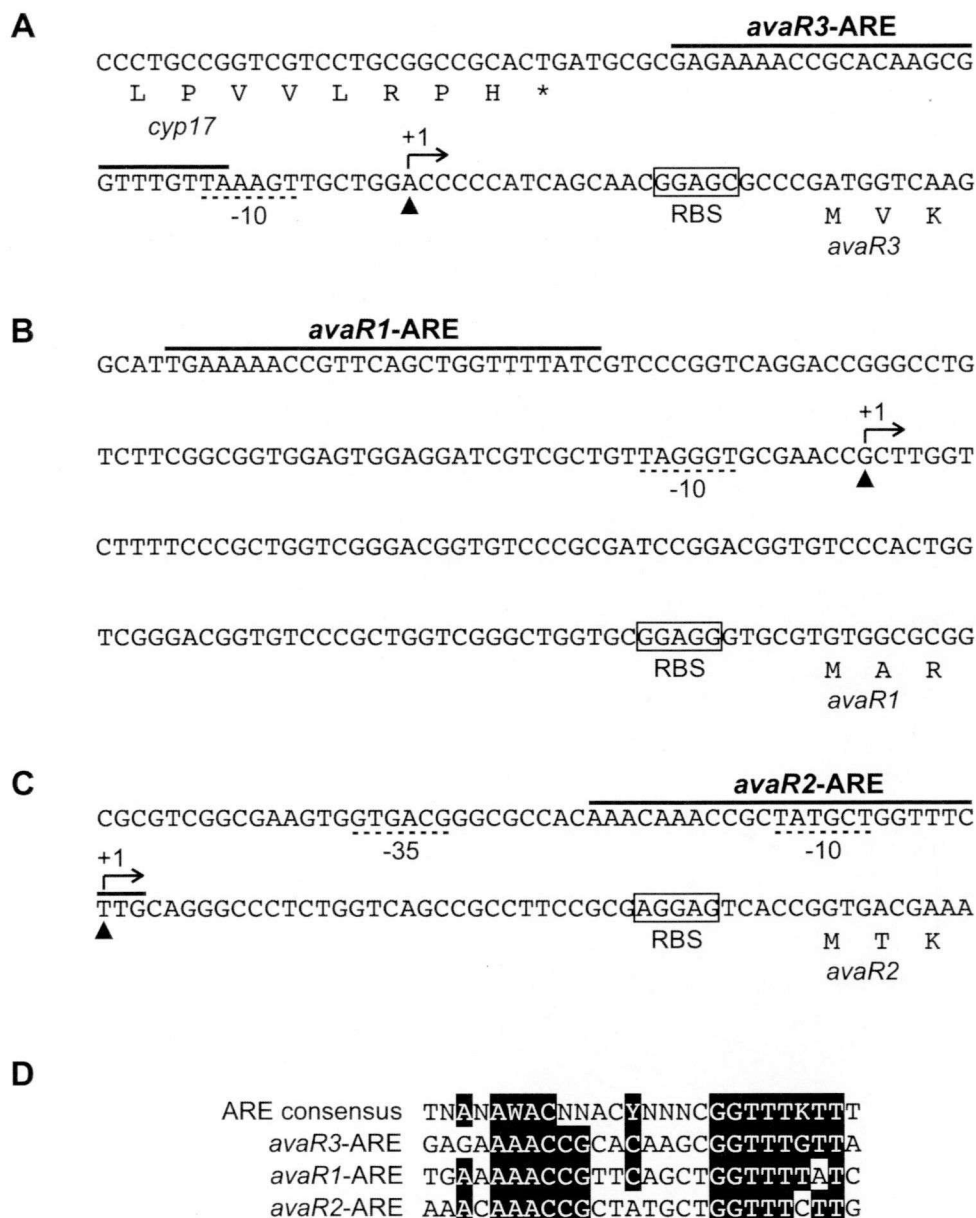


Fig. 3-11 Characterization of the upstream regions of the *avaR* genes. Nucleotide sequence of the upstream regions of *avaR3* (A), *avaR1* (B), and *avaR2* (C) were shown. Filled triangles indicate the transcriptional start points. The probable -35 and -10 regions are shown with broken underlining, and the putative ribosome-binding sites (RBSs) are shown in boxes. The putative AvaR3-binding sequences are indicated with a solid line. (D) Comparison of the putative AvaR3-binding sequences with the ARE consensus sequence defined in Folcher *et al*²⁷. Identical residues are highlighted in black. The letters W, Y, and K stand for A or T, C or T, and G or T, respectively.

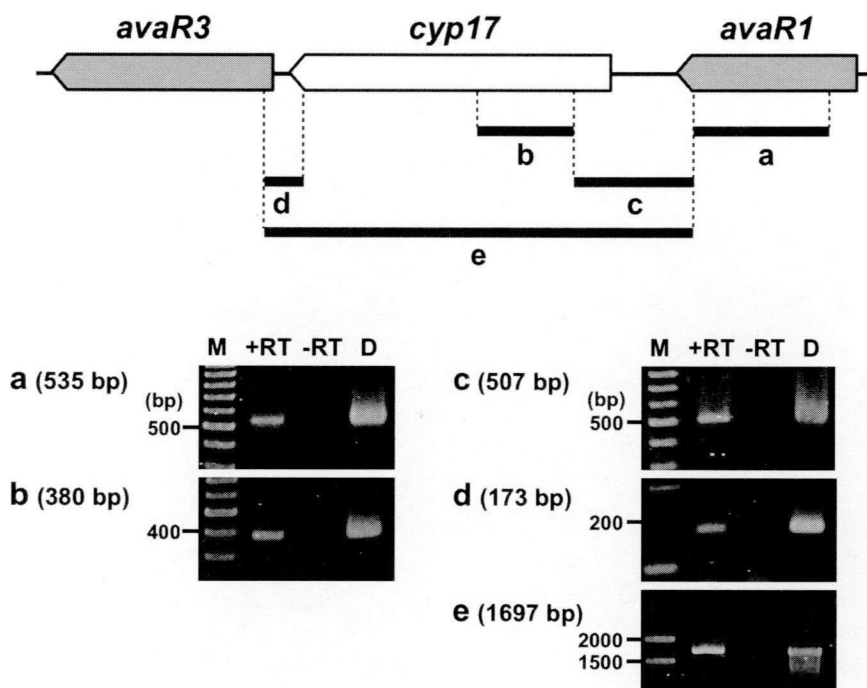


Fig. 3-12 Transcriptional analysis of the *avaR1-cyp17-avaR3* operon by RT-PCR. Total RNA was prepared from mycelia harvested at 48-h of cultivation. -RT: RT-PCR without reverse transcriptase to confirm the absence of chromosomal DNA. D: chromosomal DNA as a template of RT-PCR.

3-4-8 *avaR3*破壊株における*avaR*遺伝子の転写解析

3-4-7項よりAvaR3が自身及び他の*avaR*遺伝子の転写を調節している可能性が考えられたため、野生型株と破壊株、*avaR3*破壊株に*avaR3*遺伝子を導入して作製した相補株において、qRT-PCRによる転写解析を行った。RNAポリメラーゼのシグマ因子をコードする*rpoD*の転写レベルを内部標準に用いた。*avaR*遺伝子の転写レベルは、各遺伝子の野生型株における培養24時間目の転写レベルを1として、相対値で表した (Fig. 3-13)。まず*avaR3*破壊株における*avaR3*遺伝子の転写量は、野生型株よりも高いレベルを示したことから、AvaR3は自己抑制機構を持つことが考えられる。次に*avaR1*遺伝子ではサンプリング時間全てにおいて、また*avaR2*遺伝子では培養24、48時間目において、*avaR3*破壊による転写レベルの有意な増加が観察された。したがって、AvaR3は*avaR1*と*avaR2*の転写を抑制すると考えられる。以上より、AvaR3は全ての*avaR*遺伝子の転写を負に制御していることが示唆された。

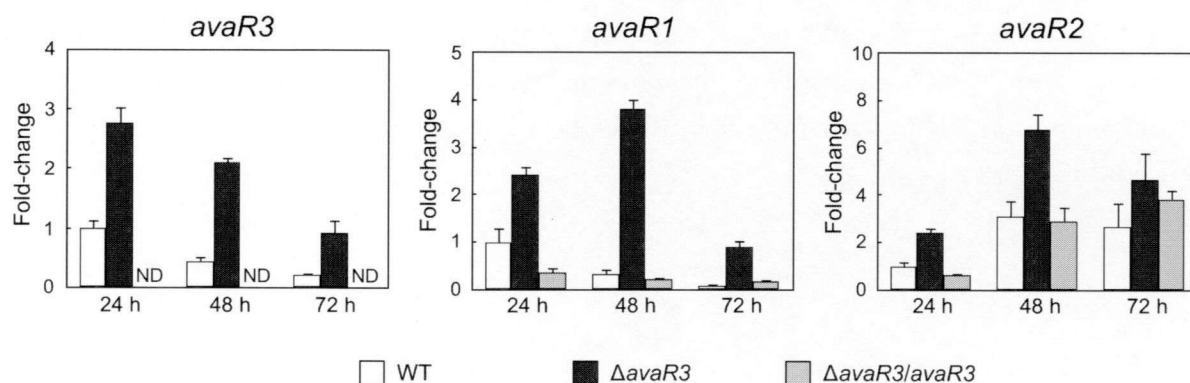


Fig. 3-13 Gene expression analysis of the *avaR3*, *avaR1*, and *avaR2* genes by qRT-PCR. WT, the wild-type strain; Δ *avaR3*, Δ *avaR3* mutant; Δ *avaR3/avaR3*, the *avaR3*-complemented exoconjugant. Total RNA was extracted from mycelia harvested at the indicated cultivation time. Fold-change is relative to the expression of each gene in the wild-type strain at 24-h of cultivation. The *avaR3* transcript corresponding to +1 to +58 nt from the transcriptional start point of *avaR3* was quantified. ND, mRNA level of *avaR3* was not determined in the *avaR3*-complemented strain, because the amplified regions upstream of *avaR3* are present at two loci. Error bars indicate the standard deviations from triplicate experiments.

3-5 考察

3-5-1 AvaR3によるグローバルな制御

本研究により、オートレギュレーターリセプターホモログAvaR3は、液体と固体両培養条件下においてAVMとFLPの2つの抗生物質の生産を制御すると同時に (Fig. 3-4, Fig. 3-6)、菌糸形態を制御することがわかった (Fig. 3-8, Fig. 3-9)。よってAvaR3はグローバルレギュレーターであると結論した。これまで、二次代謝と形態分化の両方を制御するオートレギュレーターリセプターとして最も研究が進められてきたのが、*S. griseus*のArpAである。ArpAは、二次代謝および形態分化関連遺伝子の転写活性化を担うAdpAを直接のターゲットとし、A-factorの生産に応じて*adpA*の転写のオンオフを切り替えている (1-2項、1-3-3項参照)。*S. avermitilis*ゲノムには*adpA*オーソログ、*bdpA* (*sav5261*)が存在するが、転写解析によってAvaR3の制御下にはないことがわかった (Fig. 3-14)。よってAvaR3は、A-factorカスケードとは異なるメカニズムによって二次代謝と菌糸形態に対するグローバルな制御を行うと考えられる。またAvaR3は、AVM生産誘導因子であるavenolideのリセプターAvaR1と、リセプターホモログAvaR2の発現を抑制する。したがって、AvaR3によるグローバルな制御のメカニズムを理解するためには、AvaR1とAvaR2の機能をさらに明らかにすることが必要であると思われる。

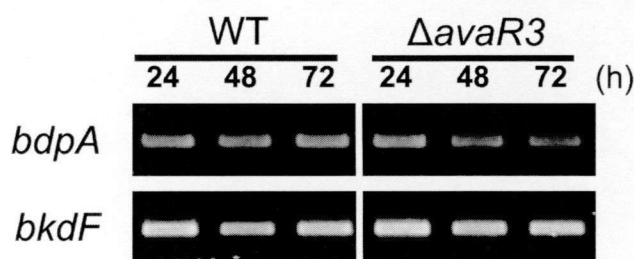


Fig. 3-14 Gene expression analysis of *bdpA* and *bkdF* by RT-PCR in the wild-type strain (WT) and Δ *avaR3* mutant (Δ *avaR3*). Total RNA was isolated from mycelia harvested at 24, 48, and 72-h of cultivation. In the PCR, the following numbers of amplification cycles were used: 22 cycles for the *bdpA* transcript, and 26 cycles for the *bkdF* transcript.

3-5-2 AvaR3による抗生物質生産制御

AvaR3によるAVM生合成遺伝子の転写活性化の影響は、培養48時間目に顕著に見られたが、培養72時間目では解析に用いた全ての*ave*遺伝子の転写が*avaR3*破壊株においても確認できた (Fig. 3-5)。それにもかかわらず、破壊株では培養後半でのAVM生産量の増加は見られなかった。そこで、AVM生産に重要ではあるが、*ave*クラスターには含まれない遺伝子がAvaR3の制御下にあるのではないかと考えて、*bkdFGH*遺伝子群 (*sav4376-4378*)に着目した。BkdF、BkdG、BkdHはbranched-chain α -keto acid dehydrogenase複合体として、AVM生合成経路の出発基質である2-methylbutyryl-CoAをisobutyryl-CoAから合成する (Fig. 3-15)⁷³。しかしながら転写解析の結果、*bkd*遺伝子はAvaR3による制御を受けていないことがわかった (Fig. 3-14)。

AVMはFLPと同様ポリケタイド化合物であり、両者の骨格形成にはmalonyl-CoAとmethylmalonyl-CoAが共通の基質として必要である (Fig. 3-15)。*avaR3*破壊株でAVM生産量が極少であったのは、*ave*遺伝子の転写が遅延した結果、AVMの生合成に使われるはずであった基質がFLP生合成に使用されたためだと推測される。事実、*avaR3*破壊株ではFLP生合成遺伝子の転写量は変化しないにもかかわらず、FLP生産量が過剰となった。では、malonyl-CoAとmethylmalonyl-CoAを同じく基質として使うOLMの生合成には、なぜ*avaR3*破壊の影響が見られなかったのであろうか。これは、AVM生産開始前である培養48時間目に既にOLM生産は停止しており、*avaR3*破壊株においてAVM生産用の基質が余ってもOLM生産に使用されなかったためであると推測される (Fig. 3-16)。以上より、AvaR3によるAVMの生産制御には、*aveR*の転写調節以外の要因も含まれると考えられる。

抗生物質生産を生合成遺伝子の転写レベルで制御するオートレギュレーターリセプターは、多くの場合、制御する生合成遺伝子クラスター内または近傍領域にコードされており、クラスター内の経路特異的活性化因子を直接のターゲットとしている。しかし、AVM生産を制御するAvaR3は、1) AVM生合成遺伝子クラスターから3.4 Mbも離れた位

置にコードされていること、2) 経路特異的活性化遺伝子*aveR*の転写を調節するものの、*aveR*遺伝子の上流域にはARE様配列が見当たらず、AvaR3が他の因子を介して*aveR*の制御を行っているとは推察されることから、他のリセプタータンパク質とは異なる制御形態により、抗生物質生産を制御することが示唆された。

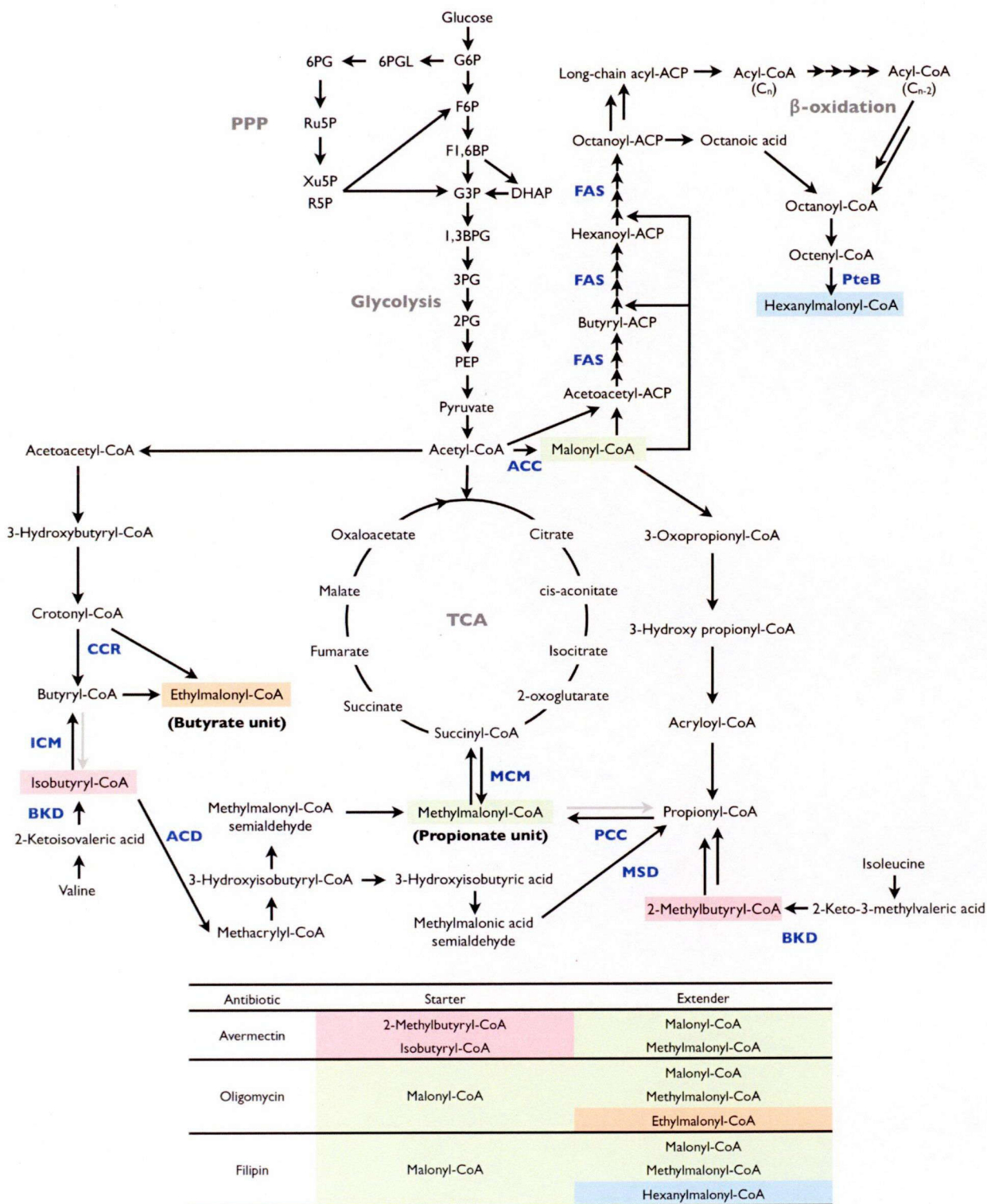


Fig. 3-15 Precursors for antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*

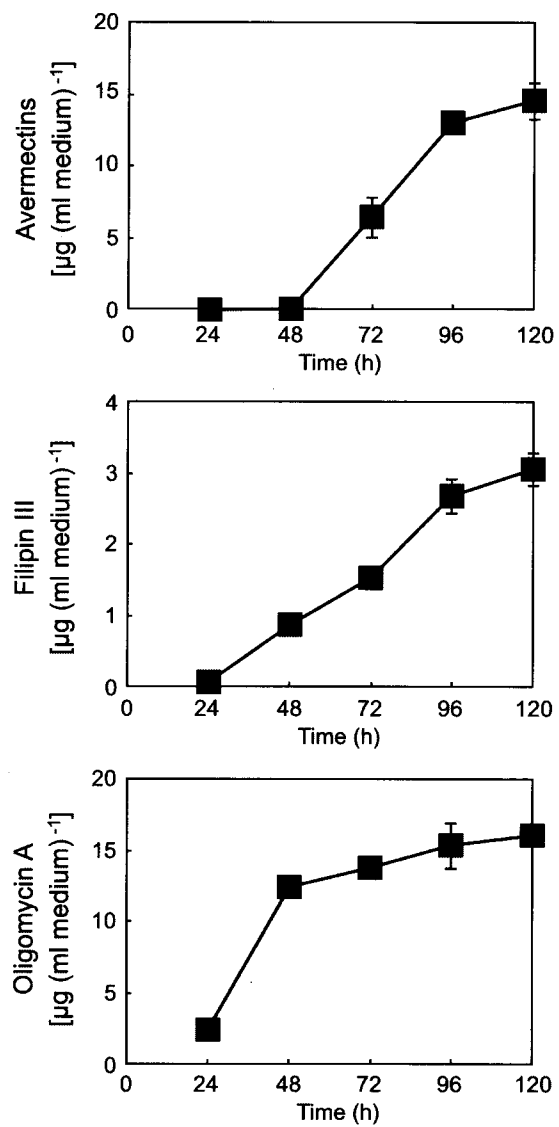


Fig. 3-16 Production profile of avermectin, filipin and oligomycin in the wild-type strain. Error bars indicate the standard deviations from triplicate cultures.

3-5-3 AvaR3による菌糸形態の制御

オートレギュレーターリセプターが固体培養における形態分化をコントロールする例は複数報告されているが (1-3-2項参照)、液体培養中の菌糸の凝集を制御する例は今回が初めてである。近年、“Morphological engineering”⁶⁸と言われる、液体培養中の菌糸形態を改変することにより、二次代謝産物の生産性を向上させようとする研究分野が注目されつつある一方で、菌糸の形態をコントロールする機構についてはほとんどわかっていない。これまで菌糸の凝集に関与が報告されていたSsgAとCslAは、AvaR3により制御されていなかったことから (Fig. 3-10)、AvaR3による制御の詳細を調べることで、菌糸凝集の新たな制御メカニズムが明らかになると期待できる。

3-5-4 AvaR3タンパク質構造の特異性

AvaR3には他のオートレギュレーターリセプターにはない機能未知の75アミノ酸から成るストレッチが存在した (Fig. 3-1)。二次構造予測とhydropathy plotの結果から、このストレッチにはタンパク質表面に露出した3つの α ヘリックスが含まれると予想される。*S. ambifaciens*の持つリセプターホモログAlpWにも同じような位置にストレッチが見られるが⁵⁸、AvaR3のストレッチとの配列の相同性はなく、24アミノ酸と長さも異なった。リセプタータンパク質の中で既に構造解析されている*S. coelicolor*のCprB⁶¹とアライメント解析を行うと、AvaR3のストレッチはCprBの4番目と5番目の α ヘリックスの間に位置していることがわかった (Fig. 3-1)。CprBの1-3番目の α ヘリックスはDNA結合ドメインを、5-10番目の α ヘリックスはリガンド認識に関わる制御ドメインを形成し、2つのドメインをつなぐ位置に存在する4番目の α ヘリックスは、オートレギュレーターの結合による制御ドメインの構造変化をDNA結合ドメインに伝える働きをする。よってAvaR3の持つストレッチはオートレギュレーターの認識もしくはそれに伴う構造変化に関与する機能を持つと推測される。こうした可能性を明らかにするためには、ストレッ

チを欠失したAvaR3の*in vivo*または*in vitro*での解析が有効であると考えている。

3-5-5 二次代謝産物生合成遺伝子から離れて位置するオートレギュレーターリセプター遺伝子

これまで精力的に研究が進められてきたリセプター遺伝子は、抗生物質の生合成遺伝子クラスター内に存在し、生合成遺伝子の転写調節を介して最終産物の生産を制御する例がほとんどであった (1-3-3項参照)^{63,49}。近年、複数の*Streptomyces*属放線菌において全ゲノム配列が解読された結果、生合成遺伝子クラスターに属すリセプター遺伝子とほぼ同じぐらいの割合で、生合成遺伝子クラスターから離れて位置するリセプター遺伝子も存在することが明らかとなってきた。例えば*S. coelicolor* A3(2)では、染色体ゲノムに存在する5つのリセプターホモログ遺伝子のうち、*scbR* (SCO6265)と*scbR2* (SCO6286)は隣接する生合成遺伝子クラスター*cpk* (SCO6269-SCO6288)の転写調節に関与しており^{34,74}、*cprB* (SCO6071)については、ゲオスミン生合成遺伝子*geoA* (SCO6073)の近傍領域に位置している (ただし*cprB*が*geoA*を制御しているかは不明)。ところが、リセプター遺伝子*cprA*とSCO6323は、二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターには属していない。*S. griseus*ゲノムの場合には、5つ存在するリセプターホモログ遺伝子のうち、3つが生合成遺伝子クラスターの近傍に、残り2つ (*arpA*を含む)がクラスターから離れた位置に存在している⁷⁵。AvaR3の機能を明らかにした本研究により、二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターから離れた位置にあるリセプター遺伝子であっても、二次代謝を制御することを示すことができた。従って、他の放線菌においても同様なリセプタータンパク質の研究を進めることにより、既知有用化合物の生産性向上や新規二次代謝産物の生産活性化につながる新たな知見が得られることが期待できる。

第4章 AvaL1による二次代謝産物生合成遺伝子群の転写制御

4-1 緒言

*avaL1*と*avaL2*両遺伝子は、*avaR*遺伝子群から1.8 Mb離れて位置するオートレギュレーターリセプター遺伝子である。ホモロジー検索の結果、AvaL1は、*S. coelicolor* A3(2)のSCP1プラスミドにコードされ、オートレギュレーターMMFのリセプターとして機能するMmfRと高い相同性 (45%)を示した。AvaL2は同じくSCP1プラスミドにコードされるリセプターホモログMmyRと高い相同性 (39%)を示すことがわかった。MmfRとMmyRは抗生物質メチレノマイシンの生産を抑制する機能を持つ²⁶。AvaL1とAvaL2の両タンパク質はともにオートレギュレーターリセプターに特徴的なDNA結合ドメインを持つものの、 γ -ブチロラクトン型オートレギュレーター²⁷の結合に重要であると考えられているトリプトファン残基は保存されていなかった (AvaL1の153番目のアミノ酸およびAvaL2の127番目のアミノ酸に相当し、どちらもスレオニンである)。また系統樹解析によって、AvaL1とAvaL2は既知オートレギュレーターリセプターとは独立したグループに分類されることから (Fig. 4-1)、それぞれの機能に興味を持たれた。そこで本章では、*avaL1*, *avaL2*の二次代謝制御への関与およびその制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

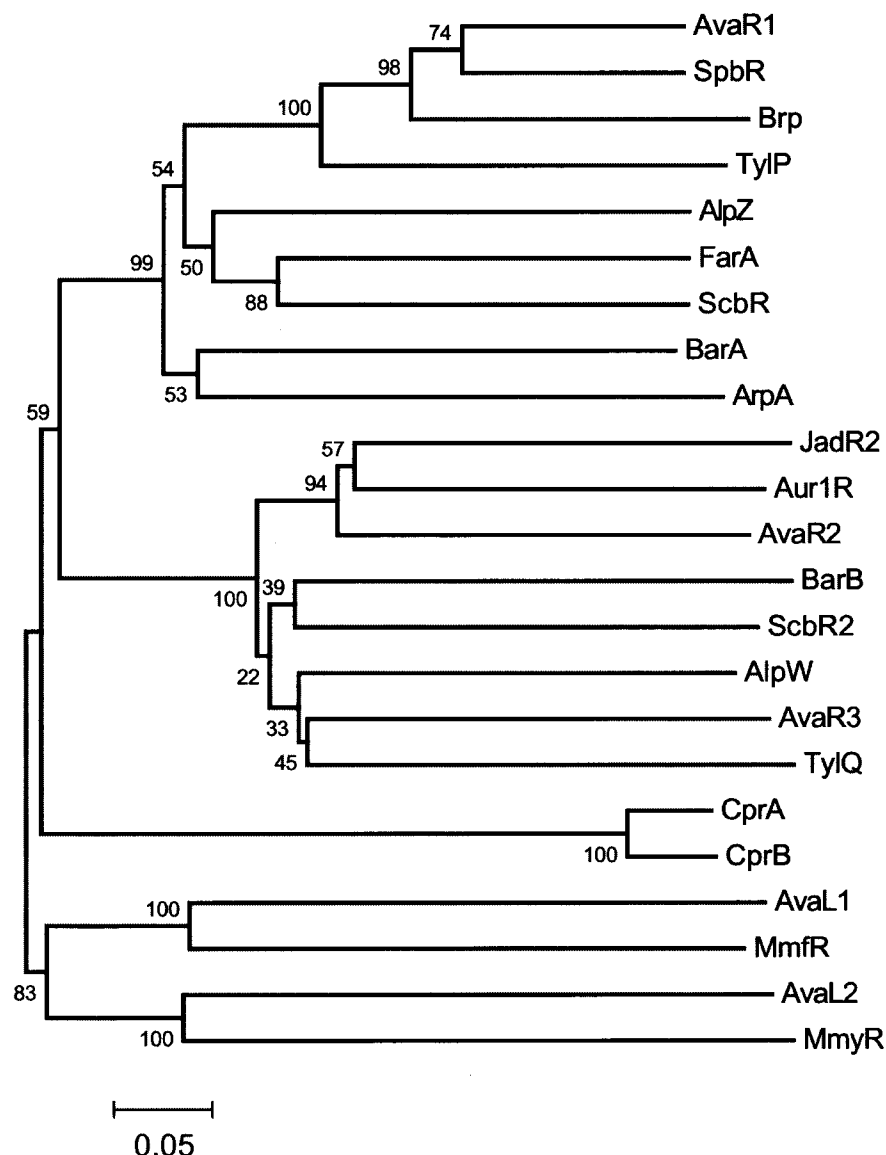


Fig. 4-1 Phylogenetic tree of autoregulator-receptor homologs from streptomycetes. The protein sequences were aligned using CLUSTALW and the tree was constructed using the neighbor-joining method with MEGA 5⁷⁶. The significance of branches is indicated by bootstrap values calculated on 100 replicates. The accession numbers for the sequences used are as follows: AlpW (CAJ87891), AlpZ (CAJ87894), ArpA (YP_001825243), Aur1R (AAX57186), AvaR1 (BAC71417), AvaR2 (BAC71414), AvaR3 (BAC71415), AvaL1 (BAC69981), AvaL2 (BAC69979), BarA (BAA06981), BarB (BAA23612), Brp (ZP_06776073), CprA (BAA28747), CprB (BAA28748), FarA (BAG74716), JadR2 (AAB36583), MmfR (NP_639852), MmyR (NP_639856), ScbR (NP_630365), ScbR2 (NP_630384), SpbR (CBW45769), TylP (AAD40801), and TylQ (AAD40803).

4-2 実験材料および機器

4-2-1 プラスミド

pKU451 (Appendix 1)

pKU474 (Appendix 1)

pKU480 (Appendix 1)

pKU250 (Appendix 1)

pENTR (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)

pLT113 (2-3-2項参照)

pET-21b (Merck, Germany)

pCR-Blunt II-TOPO (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)

4-2-2 菌株

Escherichia coli DH5a

E. coli F⁻ *dcm* Δ (*srl-recA*)306::Tn10 pUB307-*aph*::Tn7

E. coli BL21(DE3) pLysS

S. avermitilis KA320 野生型株

S. avermitilis KA320 *avaR3*破壊株

4-2-3 試薬

特に記載のない限り、和光純薬工業（大阪）、ナカライテスク（京都）のものを使用した。

4-2-4 合成オリゴヌクレオチド

使用した合成オリゴヌクレオチドの配列はAppendix 3に記載した。

4-2-5 機器

液体クロマトグラフィー	LaChrom L-7100, 7200, 7300, 7400, HITACHI
遠心分離機	KUBOTA5420
	KUBOTA3700
	MiniSpin plus, Eppendorf
蛍光アナライザー	Typhoon 9210 Variable Mode Imager, GEヘルスケア

4-3 実験方法

4-3-1 破壊株の作製

(i) *avaL1*破壊用プラスミド

プライマーセット *avaL1*-up-Fw/*avaL1*-up-Re と *avaL1*-dw-Fw/*avaL1*-dw-Re を用いて *avaL1* 上流断片 (nt 2766223-2768242) と下流断片 (nt 2768772-2770789) を PCR によりそれぞれ増幅した。得られた2つの断片を *Hind*III と *Spe*I で消化し、*Hind*III 処理した pKU451 との連結により pLT320 を作製した。*Spe*I 処理した 1.7 kb の aph 断片 (3-3-1 項参照) を pLT320 の *Spe*I 認識部位に挿入し、pLT321 を構築した。pLT321 から切り出した 5.7 kb の *Hind*III 断片を pKU250 の *Hind*III 認識部位に挿入し、得られた *avaL1* 遺伝子破壊用ベクターを pLT331 とした。

(ii) *vmII*破壊用プラスミド

プライマーセット *vmII*-up-Fw/*vmII*-up-Re と *vmII*-dw-Fw/*vmII*-dw-Re を用いて *vmII* 上流断片 (nt 2801968-2803999) と下流断片 (nt 2804685-2806761) を PCR によりそれぞれ増幅した。得られた2つの断片を *Hind*III と *Spe*I で消化し、*Hind*III 処理した pKU451 との連結により pLT347 を作製した。続いて pKU480 を鋳型とし、プライマーセット m1loxP_resist_m1loxP_*Spe*I-Fw/Re を用いた PCR により、2.1 kb のハイグロマイシン耐性遺伝子カセット (hph) を取得した。*Spe*I 処理した hph 断片を pLT347 の *Spe*I 認識部位に挿入し、pLT349 を構築した。pLT349 から切り出した 6.2 kb の *Hind*III 断片を pKU250 の *Hind*III 認識部位に挿入し、得られた *vmII* 遺伝子破壊用ベクターを pLT351 とした。

(iii) *avaL2*破壊用プラスミド

プライマーセット *avaL2*-up-Fw/*avaL2*-up-Re と *avaL2*-dw-Fw/*avaL2*-dw-Re を用いて *avaL2* 上流断片 (nt 2764460-2766386) と下流断片 (nt 2766889-2768837) を PCR によ

りそれぞれ増幅した。得られた2断片を *Hind*IIIと *Spe*Iで消化し、*Hind*III処理した pKU451との連結により pLT322を作製した。*Spe*I処理した *aph*断片 (3-3-1項参照)を pLT322の *Spe*I認識部位に挿入し、pLT323を構築した。pLT323から切り出した *Hind*III断片を pKU250の *Hind*III認識部位に挿入し、得られた *avaL2*遺伝子破壊用ベクターを pLT333とした。

(iv) 破壊株の取得

2-3-1にならい pLT331または pLT333による *S. avermitilis*の形質転換、およびセカンドクロスオーバー株の選択を行い、*avaL1*破壊株と *avaL2*破壊株をそれぞれ取得した。続いて、*avaL1*破壊株の胞子と pLT351による *E. coli* F⁻ *dcm* Δ(*srl-recA*)306::Tn10 pUB307-*aph*::Tn7の形質転換体との接合伝達を行った。チオストレプトン耐性により *S. avermitilis*の形質転換体を選択し、セカンドクロスオーバーを誘導した。チオストレプトン感受性かつハイグロマイシン耐性であるクローンを選択し、PCRによって目的の *avaL1 vmlI*二重破壊株であることを確認した。

4-3-2 *avaL1*相補株の作製

S. avermitilis の染色体 DNA を鋳型とし、プライマーセット *avaL1-comp-Fw/avaL1-comp-Re*を用いたPCRにより *avaL1*とその上流を含むDNA断片 (nt 2767923-2769097)を取得した。この断片を pENTR (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)にクローン化し、エントリークローンを作製した。pLT113 (2-3-2項参照)とエントリークローンとのLR反応 (LR Clonase Enzyme Mix, Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)により、*avaL1*相補用ベクター pLT326を作製した。接合伝達により pLT326を *avaL1*破壊株に導入し、染色体上の *attB* φC31部位に挿入されたことをPCRで確認した。

4-3-3 表現型解析

液体培養法は3-3-3項に、抗生物質生産の解析法は3-3-6項に記載した通りである。

4-3-4 転写解析

RT-PCRを用いた転写解析は3-3-13項に記載した方法に従い、5'-RACE法による転写開始点の同定は3-3-14項に従った。ただし、*vmII*の転写開始点決定には*avaL1*破壊株の培養48時間目のRNAを用いた。

4-3-5 Hisタグ融合型rAvaL1タンパク質の発現

*avaL1*遺伝子を含むDNA断片を、プライマーセットrAvaL1-Fw/rAvaL1-Reを用いたPCRにより取得した。この断片を*NcoI*と*XhoI*で消化後、pET-21b (Merck, Germany)の*NcoI*-*XhoI*認識部位にクローン化し、rAvaL1発現用プラスミドpLT375を構築した。pLT375により形質転換された*E. coli* BL21(DE3) pLysSを2-3-6項に記載した方法で培養し、IPTGによるHisタグ融合型rAvaL1の発現誘導を行った。室温で3,500 rpm、5分間遠心して (KUBOTA 5420)菌体を回収し、protease inhibitor cocktail (complete™, Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics K.K., Tokyo) 入りのbuffer Cに再懸濁した。超音波破碎 (30秒 x 4回、氷冷) (Yamato 5210, BRANSON)を行った後、4°C、20,000 gで20分間遠心分離をした (Himac CR 21F, HITACHI)。上清を回収し、これを粗タンパク質溶液とした。Buffer Cで平衡化しておいたNiカラム (1 ml-Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, GEヘルスケア、カラム:Disposable 10 ml Polypropylene Columns, Thermo) に粗タンパク質溶液をアプライした。Buffer Cに含まれるイミダゾール濃度を増加させながら5 ml (5ベッド相当)ずつ溶出し、イミダゾール400 mMを含むbuffer Cにより溶出した画分を回収した。透析チューブ (ダイアラ

イシスメンブラン 25)にタンパク質溶出液を入れ、buffer Cに浸し一晚透析を行った後、得られた溶液をrAvaL1タンパク質溶液とした。タンパク質の定量にはBradford法 (Protein Assay Kit, BIO-RAD) を用い、BSAによって検量線を作成した。SDS-PAGE およびanti-His₆-antibody (Anti His-probe: Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA)を用いたウエスタンブロッティングにより、Hisタグ融合型rAvaL1タンパク質の精製度合を確認した。

●Buffer C

50 mM Triethanolamine-HCl (pH 7.0)
300 mM KCl
20% v/v Glycerol

4-3-6 ゲルシフトアッセイ

40塩基の相補的な合成オリゴヌクレオチドのセット vmlIARE1/vmlIARE2, avaL2ARE1/avaL2ARE2をそれぞれ1 nmolずつ混合し、以下の条件でアニーリングさせた。

97°C	5分
95°C	30秒
95°C-50°C	0.1°C/秒
50°C	30秒
4°C	∞

得られたDNA断片をpCR-Blunt II-TOPO (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)にクローン化し、vmlI-AREプローブ作製用プラスミドpLT377とavaL2-AREプローブ作製用プラスミドpLT378を構築した。これらのプラスミドを鋳型としてFITC標識されたプライマーセットM13-47/RVを用いてPCRを行い、増副産物をDNAプローブとして使用した。作製したプローブと4-3-5項で調製したrAvaL1を用いて、以下の反応液を調製し、25°Cで10分間反応させた。ネガティブコントロールとしてrAvaL1の代わりにbuffer Cを

用いた。

DNAプローブ	86 fmol
2x binding buffer	7.5-x μ l
Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC) (SIGMA-ALDRICH, Tokyo)	1.75 μ g
rAvaL1	x μ l (8.5 pmol)
up to 15 μ l	

2-3-6項と同様にポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、Typhoon 9210 Variable Mode Imager (GEヘルスケア)でプローブの検出を行った。

4-3-7 AvaL1-ligandの抽出および粗精製

3-3-3項にしたがって調製した前培養菌体をOD₆₀₀=0.3となるよう70 ml-f培地/500 ml容バッフルフラスコに植菌し、28°C、160 rpmで48時間浸漬培養した。吸引濾過により回収した培養上清50 mlに、塩酸を加えpH 5以下になるよう調整した。酢酸エチル50 mlを加え攪拌し、3,500 rpmで5分間遠心分離し (KUBOTA5420)、酢酸エチル層を回収した。これを合計3回繰り返した。約150 mlの酢酸エチル抽出液を濃縮乾固した後、1 mlのEtOHを加え、超音波処理 (Yamato 5210, BRANSON)により完全に溶解し、酢酸エチル抽出物 (50倍濃縮)を得た。ガラス注射筒 (TOP) にSep-Pakカラム (Sep-Pak Plus C18, Waters)を取り付け、20%EtOHでカラムを平衡化した。酢酸エチル抽出物を200 μ lカラムにアプライし、5 ml (5 bed相当)の20%, 50%, 100%EtOH, 100%CH₃CNで順に溶出した。各画分を濃縮乾固後、100%EtOH 200 μ lに溶解し (50倍濃縮)、酢酸エチル抽出物の粗精製物を得た。

4-3-8 AvaL1-ligand活性およびavenolide活性の検出

以下の反応液を調製し、25°Cで10分間反応させた。AvaL1-ligand活性の検出には *vmIf*-AREを含むプローブと4-3-5項で調製したrAvaL1タンパク質を、avenolide活性の

検出には2-3-7項で作製した *aco*-AREを含むプローブと2-3-6項で調製したrAvaR1タンパク質を使用した。

DNAプローブ	86 fmol
2x binding buffer	適量
Poly(dI-dC)・Poly(dI-dC) (SIGMA-ALDRICH, Tokyo)	1.75 µg
Recombinant protein	8.5 pmol
up to 14 µl	

4-3-7項で調製した酢酸エチル抽出物またはその粗精製物1 µl、または1 µlの合成品 *avenolide* (156 pmol/ µl・MeOH)を反応液に加え、25°Cで5分間反応させた。2-3-7項と同様にポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、Typhoon 9210 Variable Mode Imager (GE healthcare)によりプローブを検出した。

4-4 実験結果

4-4-1 *avaL1*破壊株における抗生物質生産量の解析

AvaL1が抗生物質生産制御に関与するかどうかを調べるため、野生型株と*avaL1*破壊株における液体培養条件下での抗生物質生産プロファイルを比較した (Fig. 4-2)。その結果、*avaL1*破壊株ではAVMの生産量が野生型株の1.5倍に増加し、FLPの生産は50%に減少することがわかった。また、*avaL1*破壊株への*avaL1*遺伝子の導入によりAVMとFLPの生産量は回復したことから、AvaL1はAVM生産を負に、またFLP生産を正に制御することがわかった。

次に、AvaL1が両抗生物質の生合成遺伝子の転写を制御するか否かを調べるため、RT-PCRによる転写解析を行った。しかしながら野生型株と*avaL1*破壊株の間で生合成遺伝子の転写パターンに変化は見られなかった。従って、AvaL1は生合成遺伝子の転写調節とは異なるプロセスに作用して、AVMとFLPの生産を制御すると考えられる。尚、*avaL1*遺伝子の破壊による液体培養時の生育や菌糸の凝集への影響、また固体培地上での形態分化への影響はともに観察されなかったことから、AvaL1は一次代謝には関与せず、菌糸形態の制御も行わないことがわかった。

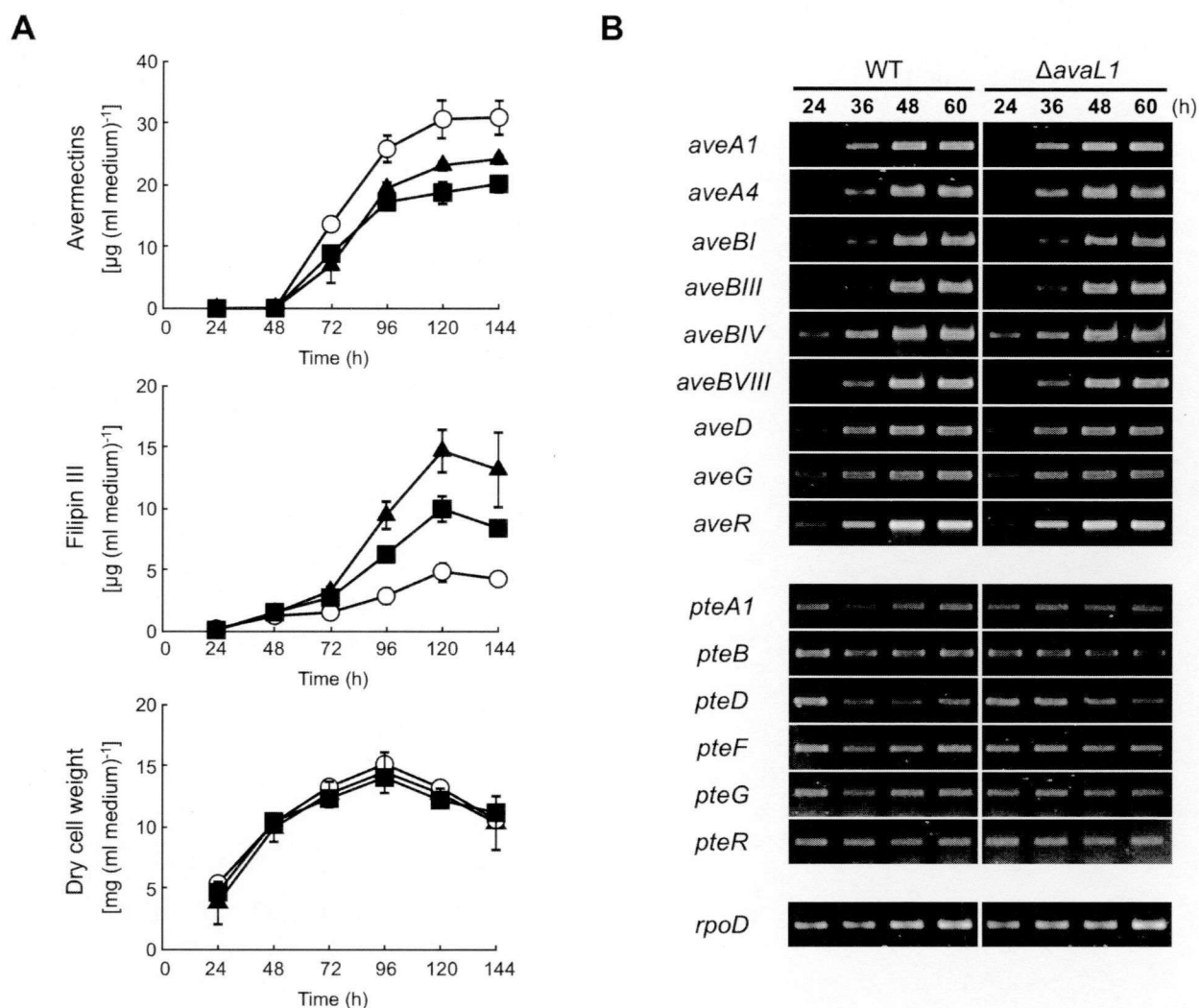


Fig. 4-2 Effect of *avaL1* deletion on antibiotic production. (A) The culture broth of the wild-type strain (filled squares), Δ *avaL1* mutant (open circles), and Δ *avaL1*-complemented exconjugant (filled triangles) was withdrawn at the indicated times. The amount of avermectins (top) and filipin III (middle), and the dry-cell weight (bottom) were measured. Error bars indicate the standard deviations from triplicate cultures. (B) Expression analysis of biosynthetic genes for avermectin (top) and filipin (middle) by RT-PCR. WT, the wild-type strain; Δ *avaL1*, Δ *avaL1* mutant. Total RNA was isolated from mycelia harvested at 24, 48, and 72-h of cultivation. In the PCR, the following numbers of amplification cycles were used: 24 cycles for the *pteB*, *pteD*, and *pteF* transcripts, 25 cycles for the *rpoD* transcript, 26 cycles for the *pteA1*, *pteG*, and *pteR* transcripts, 27 cycles for the *aveR* and *aveBVIII* transcripts, and 30 cycles for the transcripts of the other genes.

4-4-2 AvaL1制御下にある二次代謝関連遺伝子の探索

AvaL1が抗生物質以外の二次代謝産物の生産を制御するかどうかを調べるため、3-3-7項に述べた方法で野生型株と *avaL1*破壊株の液体培養液および固体培地からのメタノール抽出液を調製し、HPLCによるクロマトグラムを比較解析した。しかしながら、両菌株間で検出されるピークプロファイルに大きな差異は見られなかった。この原因として、二次代謝産物の中には最適な培養条件でないと生産されないものがあること、また今回用いた抽出および検出の方法が目的の化合物には適していなかったことなどが考えられる。したがって、転写解析を行うことにより、AvaL1制御下にある二次代謝関連遺伝子を探索することにした。

*S. avermitilis*ゲノムには少なくとも32個の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターがコードされている (Fig. 1-6)。そこで4-4-1項で解析した *ave*と *pte*クラスターを除く30の各クラスターから、二次代謝産物の基本骨格形成に関与すると予想される遺伝子1つを選び、野生型株と *avaL1*破壊株の間で転写パターンを比較した。I型ポリケタイド合成酵素をコードする *pks3-1*遺伝子 (*sav2280*)と *pks4*遺伝子 (*sav7184*)の転写が、野生型株ではほとんど検出されないのに対し、*avaL1*破壊株では培養24時間目から60時間目まで顕著に検出された (Fig. 4-3)。さらに、*avaL1*破壊株に *avaL1*遺伝子を導入すると、*pks3-1*遺伝子、*pks4*遺伝子の転写パターンともに野生型株のレベルに戻ったことから (Fig. 4-4B, C)、AvaL1は *pks3-1*遺伝子と *pks4*遺伝子の転写を抑制することが明らかとなった。



Fig. 4-3 Expression analysis of 30 biosynthetic gene clusters for secondary metabolites by using RT-PCR. Total RNA was isolated from the wild-type strain (WT) and Δ *avaL1* mutant (Δ *avaL1*) at indicated cultivation times. A structural gene in each cluster was selected for RT-PCR analysis. In the PCR, the following numbers of amplification cycles were used: 25 cycles for the *rpoD* transcript, 26 cycles for the transcripts of *nrps8*, *hopA*, *geoA*, *ptlA*, and *pks4*, and 28 cycles for the transcripts of the other genes.

4-4-3 AvaL1-regulonの同定

AvaL1が転写制御をすることが明らかとなった*pks3-1*遺伝子は、*avaL1*遺伝子の近傍に位置する*pks3*クラスター (*sav2276-2282*)に属している。一方、同じくAvaL1の制御下にあることがわかった*pks4*遺伝子は、*avaL1*遺伝子から5.8 Mb離れて位置する*pks4*クラスター (*sav7184-7186*)に属す (Fig. 4-4A)。AvaL1が*pks3-1*と*pks4*遺伝子以外に、それぞれのクラスターに含まれる他の遺伝子の転写も調節していることが推察されることから、*pks3*と*pks4*クラスター内遺伝子の転写を詳細に解析した (Fig. 4-4)。*pks3*クラスターは、同一方向に配置された7遺伝子から構成されており、*sav2277*から*pks3-3*までの遺伝子間距離は短いことからオペロンを形成していると推測した。一方*fabH7* (*sav2276*) と *sav2277* の 遺 伝 子 間 領 域 にはターミネーター様の配列 (CCGGCCGCCCCGTCCGTGCACGGGCGGCCGG; 下線は逆位反復配列)が見つかったことから、*fabH7*は他の遺伝子とは転写単位が異なると予想した。そこで、*fabH7*の転写を確認したところ、*pks3-1*と同様に*avaL1*欠損により転写量が増加することがわかった。したがって、AvaL1は*pks3*クラスター内遺伝子の転写を抑制していると考えられる。さらに*pks3*クラスターの周辺遺伝子についても、転写単位が異なると推定される遺伝子を選択し転写解析を進めた結果、*pks3*クラスターを含めた*avaC* (*sav2266*)から*sav2304*までの合計37個の遺伝子 (約48 kb, *avaL1*を除く)が、AvaL1依存的な転写パターンを示すことがわかった。従って、これらの37遺伝子はAvaL1-regulonであると言える。

*pks4*クラスターについても同様に解析した。*pks4*遺伝子とは転写単位が異なると予想されるクラスター内遺伝子*cyp26*に加え、*pks4*クラスター隣接遺伝子である*sav7183*と*sav7187*においても、AvaL1依存的な転写パターンが検出された。よって*sav7183*から*sav7187*までの5遺伝子 (約11 kb)がAvaL1-regulonであると結論した。

以上より、合計42個の遺伝子 (Table 4-1)がAvaL1の制御下にあることがわかった。AvaL1-regulonにはオートレギュレーターリセプターホモログをコードする*avaL2*遺伝

子が含まれることから、AvaL2がAvaL1による二次代謝制御機構に関与する可能性が示唆された。γ-ブチロラクトン型またはフラン型オートレギュレーターの生合成に関与すると報告されている *afsA* 相同遺伝子 *avaA* (2-5-2項参照)、oxidoreductase 相同遺伝子 *avaB*、phosphatase 相同遺伝子 *avaC* も AvaL1-regulon に含まれており⁴⁷、AvaL1がオートレギュレーターの生合成を制御している可能性も考えられる。*avaL1* 遺伝子の下流領域にある AvaL1-regulon を見てみると、*pks3* クラスター (*sav2276-sav2282*) に加え、脂肪酸合成に関与すると推定される遺伝子 (*sav2286*, *sav2290-2292*, *sav2295*, *sav2298*, *sav2303*)、推定トランスポーター遺伝子 (*sav2275*, *sav2297*)、*Streptomyces viridifaciens* のバラニマイシン生合成酵素遺伝子のホモログが存在した。バラニマイシンはバリンとセリンを出発物質として合成されるアゾキシ化合物で、14の生合成遺伝子 (*vlm*) が同定されている⁷⁷。AvaL1-regulon には10個の *vlm* 遺伝子ホモログが含まれることがわかり、これらを *vml* 遺伝子 (*vlm*-like 遺伝子) と命名した。また、二次代謝産物の生合成関連遺伝子を多く含む *sav2272* から *sav2304* までの33個の AvaL1-regulon を、*pks3-vml* クラスターと命名した。一方 *pks4* 遺伝子周辺の AvaL1-regulon には、*pks4* クラスターに属す遺伝子 (*sav7184-7186*) とそれに隣接する推定トランスポーター遺伝子 (*sav7187*)、機能未知遺伝子 (*sav7183*) が含まれた。これら5つの遺伝子群を改めて *pks4* クラスターと命名した。

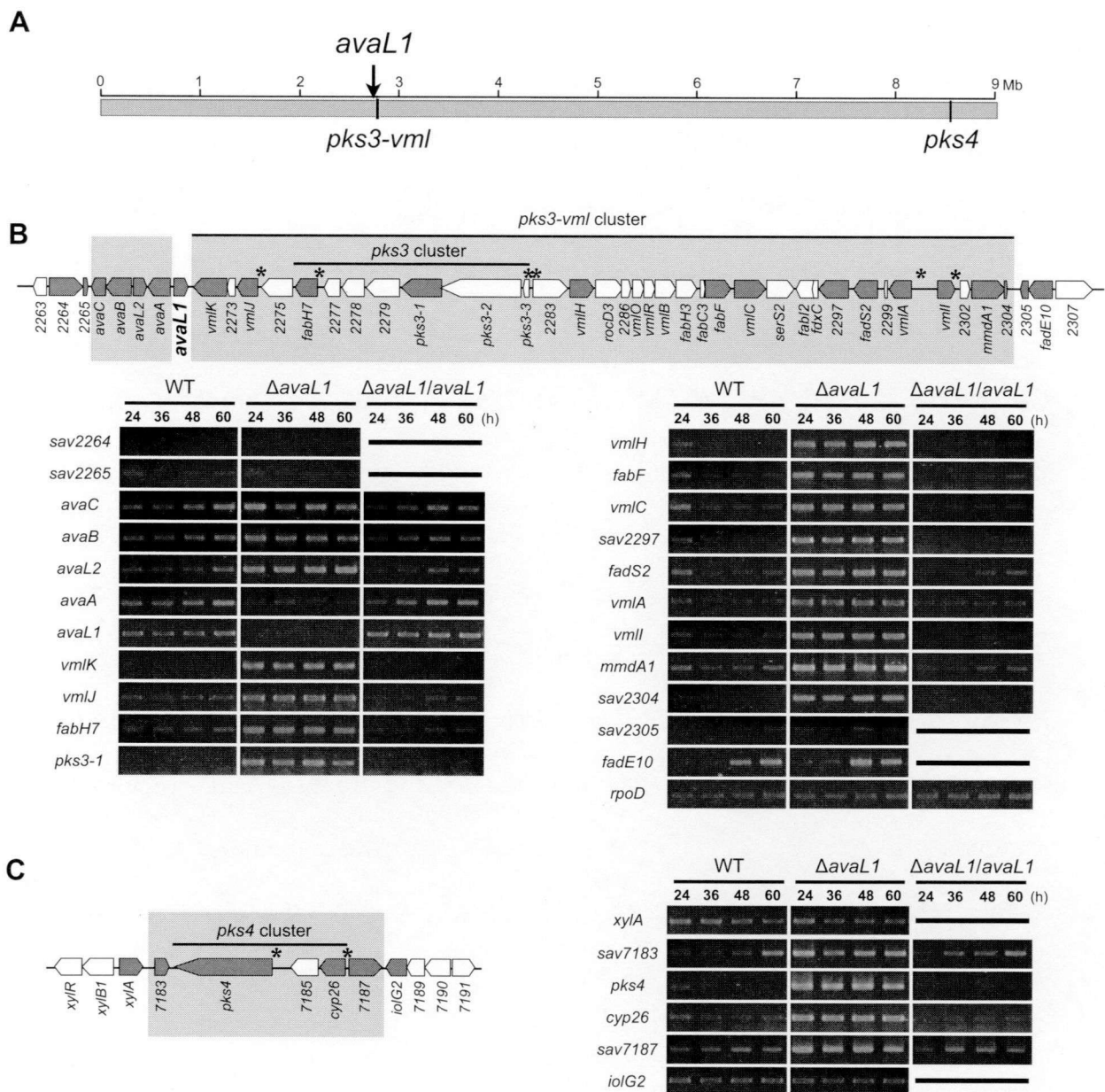


Fig. 4-4 The location of *pks3-vml* and *pks4* clusters (A), and transcriptional profiles of genes in *pks3-vml* cluster and its flanking region (B) and transcriptional profiles of genes in *pks4* cluster and its flanking region (C). (A) the location of *pks3-vml* and *pks4* clusters on *S. avermitilis* chromosome are shown by black boxes. (B, C) WT, the wild-type strain; Δ avaL1, Δ avaL1 mutant; Δ avaL1/avaL1, *avaL1*-complemented exconjugant. Total RNA was isolated from mycelia harvested at 24, 36, 48, and 60 h of cultivation. The genes investigated in the present analysis are indicated by dark grey, and *AvaL1* regulon are enclosed by light grey boxes. Asterisks indicate locations of putative VmlI-binding sites. In the PCR, the following numbers of amplification

cycles were used: 25 cycles for the *rpoD* transcript, 26 cycles for the transcripts of *avaL1*, *vmlK*, *vmlJ*, *vmlH*, *fabF*, *vmlA*, *mmdA1*, *sav2301*, *pks4* and *sav7187*, 27 cycles for the transcripts of *avaC*, *avaB*, *avaL2*, and *vmlI*, 30 cycles for the *sav2305* transcript, and 28 cycles for the transcripts of the other genes. The *rpoD* gene was used as a control.

Table 4-1. *avaL1* gene and AvaL1 regulon with their proposed functions

Gene	SAV ^a	Size (a.a.)	Proposed function	ID/SM ^b	Protein homologue, Species	Accession number
<i>avaC</i>	2266	229	Phosphatase	39/54	MmfP, <i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_639855
<i>avaB</i>	2267	407	Oxidoreductase	47/59	AlnT, <i>Streptomyces</i> sp. CM020	ACI88867
<i>avaL2</i>	2268	197	Autoregulator receptor	40/56	MmyR, <i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_639856
<i>avaA</i>	2269	345	Autoregulator biosynthesis protein	42/54	BarX, <i>S. virginiae</i>	BAA23611
<i>avaL1</i>	2270	218	Autoregulator receptor	47/64	MmfR, <i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_639852
<i>vmIK</i>	2272	519	Hypothetical protein	55/70	VlmK, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10248
	2273	122	Isomerase	61/78	SSFG_07824, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582128
<i>vmIJ</i>	2274	320	Secreted protein	44/59	VlmJ, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10247
	2275	486	Transmembrane efflux protein	49/63	SSFG_07825, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582129
<i>fabH7</i>	2276	339	3-Oxoacyl-ACP synthase III	41/57	SGR_6779, <i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350	YP_001828291
	2277	255	Thioesterase	72/83	SSFG_07830, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582134
	2278	367	F420-dependent dehydrogenase	74/85	SSFG_07829, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582133
	2279	534	Acyl-CoA synthetase	68/78	SSFG_07828, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582132
<i>pks3-1</i>	2280	633	Modular polyketide synthase	50/63	SSFG_07827, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582131
<i>pks3-2</i>	2281	1253	Modular polyketide synthase	58/70	SSFG_07827, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582131
<i>pks3-3</i>	2282	112	Acyl carrier protein	61/74	SSFG_07826, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582130
	2283	543	Aldehyde dehydrogenase	76/89	SSFG_07815, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582119
<i>vmIH</i>	2284	379	Isobutylamine N-hydroxylase	56/74	VlmH, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10237
<i>rocD3</i>	2285	427	Ornithine aminotransferase	88/92	SSFG_07817, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582121
	2286	160	Cyclase/dehydrase	71/81	Franean1_5760, <i>Frankia</i> sp. EAN1pec	YP_001510016
<i>vmIO</i>	2287	178	Integral membrane protein	63/71	VlmO, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10238
<i>vmIR</i>	2288	184	FAD reductase	39/55	VlmR, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10239

<i>vmIB</i>	2289	327	Hypothetical protein	60/77	VlmB, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10240
<i>fabH3</i>	2290	335	3-Oxoacyl-ACP synthase III	73/84	Franean1_5756, <i>Frankia</i> sp. EAN1pec	YP_001510012
<i>fabC3</i>	2291	76	Acyl carrier protein	58/78	Franean1_5755, <i>Frankia</i> sp. EAN1pec	YP_001510011
<i>fabF</i>	2292	406	3-Oxoacyl-ACP synthase II	73/83	Franean1_5754, <i>Frankia</i> sp. EAN1pec	YP_001510010
<i>vmIC</i>	2293	506	Amino acid permease	54/71	VlmC, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10241
<i>serS2</i>	2294	427	Seryl-tRNA synthetase	58/70	VlmL, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10249
<i>fabI2</i>	2295	260	Enoyl-ACP reductase	78/89	SSCG_05216, <i>S. clavurigerus</i> ATCC27064	ZP_05007923
<i>fdxC</i>	2296	108	Ferredoxin	69/83	SSCG_01304, <i>S. clavurigerus</i> ATCC27064	ZP_05004117
	2297	469	Sugar transporter	71/82	SSFG_07808, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582112
<i>fadS2</i>	2298	365	Fatty acid desaturase	73/84	SSFG_07809, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582113
	2299	66	Hypothetical protein	57/75	SSFG_07810, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582114
<i>vmIA</i>	2300	331	Hypothetical protein	56/68	VlmA, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10236
<i>vmII</i>	2301	265	SARP-family regulator	46/61	VlmI, <i>S. viridifaciens</i>	AAN10246
	2302	143	Membrane protein	55/65	Francci3_0102, <i>Frankia</i> sp. CcI3	YP_479225
<i>mmdA1</i>	2303	514	Methylmalonyl-CoA decarboxylase α subunit	88/93	SSHG_04648, <i>S. albus</i> J1074	ZP_06593745
	2304	61	Hypothetical protein	47/56	Sim12, <i>S. antibioticus</i>	AAL15590
	7183	202	Hypothetical protein	46/55	SCAB_79871, <i>S. scabiei</i> 87.22	YP_003493477
<i>pks4</i>	7184	1517	Modular polyketide synthase	64/76	Franean1_5756, <i>Frankia</i> sp. EAN1pec	YP_001510033
	7185	427	UDP-glucose:sterol glucosyltransferase	46/64	Caci_2696, <i>Catenulispora acidiphila</i> DSM44928	YP_003113452
<i>cyp26</i>	7186	397	Cytochrome P450 hydroxylase	45/61	SSFG_07800, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582104
	7187	521	Transmembrane efflux protein	49/64	SSFG_07825, <i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	ZP_06582129

^a Numbers according to <http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>.

^b Identity/similarity (%) to the homologues using BlastP.

4-4-4 *vmlI*破壊株における *pks3-vml* クラスターと *pks4* クラスターの転写解析

pks3-vml クラスターには推定制御遺伝子として *vmlI* が含まれる。*VmlI* タンパク質は *VlmI* (46%)⁷⁸, *TylIT* (43%)⁷⁹, *VmsS* (41%)³³ などの SARP ファミリータンパク質と高い相同性を示し、同タンパク質群に特徴的な DNA 結合ドメインを N 末端側に、また bacterial transcriptional activator ドメインを C 末端側に持つ。これまでに、抗生物質の生合成遺伝子クラスターにコードされた SARP ファミリータンパク質が、クラスター内の生合成遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を活性化することによって抗生物質の生産を誘導する機構が知られている (1-2 項参照)。SARP ファミリータンパク質の認識配列は 7-9 塩基の反復配列で、反復配列と次の反復配列までのスペーサー部分を合わせると 11 塩基になることがわかっている^{13,17,80}。そこで、*VmlI* が結合するような配列を *pks3-vml* クラスターの遺伝子間領域より探索したところ、6 カ所より反復配列を見出した (Fig. 4-4, 4-5A)。さらに興味深いことに、*pks4* クラスターの遺伝子間領域 2 カ所にも、先に見つかった反復配列と相同性の高い配列を見出した (Fig. 4-4, 4-5A)。そこでこれらの 11 塩基を 1 単位として、22 単位の反復配列を比較したところ、9 塩基の反復配列の中でも 1 番目から 5 番目までの塩基配列が特に保存されていることがわかった (Fig. 4-5B)。

以上、*VmlI* の推定結合配列が *pks3-vml* クラスターおよび *pks4* クラスターから見つかったことから、*AvaL1* が *VmlI* を制御することによって両クラスターの転写を調節しているのではないかと考えられる。そこで *avaL1 vmlI* 二重破壊株を作製し、2 つのクラスターの転写を RT-PCR により解析した。その結果、*avaL1* 破壊株で検出された *pks3-vml* クラスターと *pks4* クラスターの転写量増加は、*vmlI* 遺伝子の破壊によって抑圧されることがわかった (Fig. 4-5C)。したがって、*avaL1* 破壊による 2 つのクラスターの転写活性化は、*vmlI* の転写量が増加したことに起因し、*AvaL1* は *VmlI* の発現調節を介して 2 つのクラスターの転写を制御していることが明らかとなった。

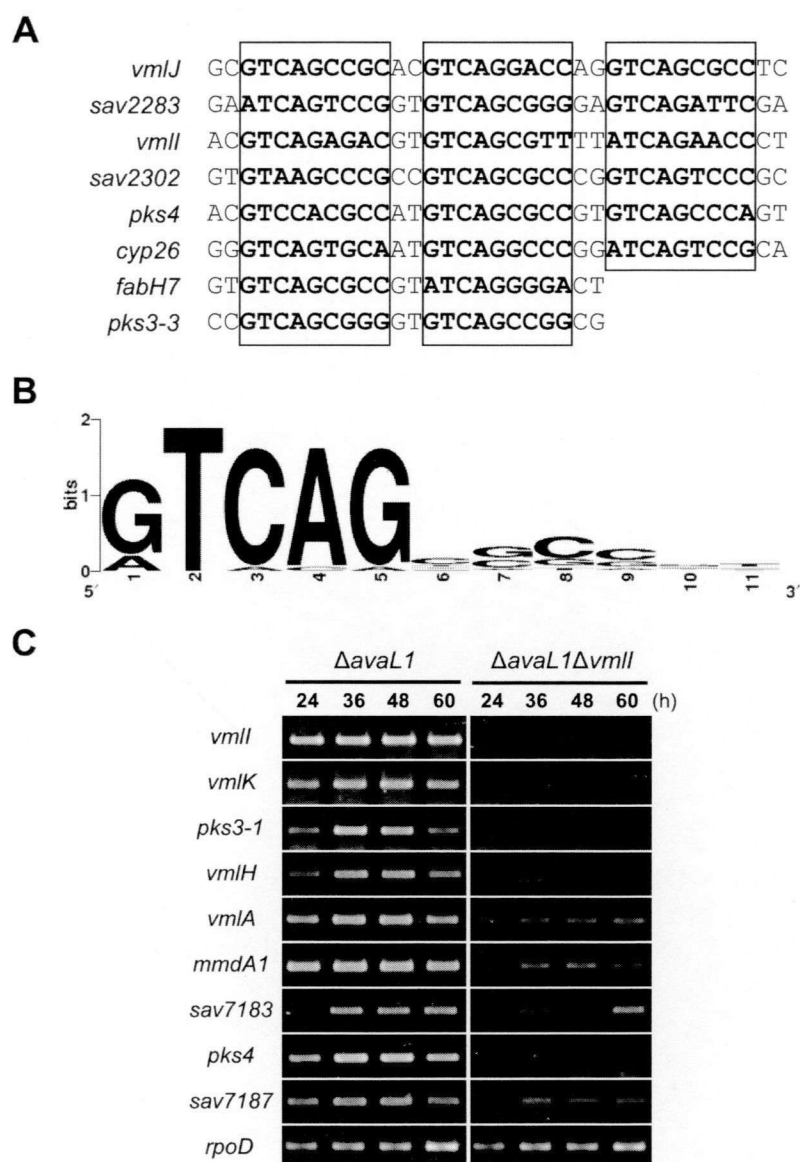


Fig. 4-5 Comparison of nucleotide sequences upstream of putative target genes of VmlI (A), sequence logo representation of putative VmlI-binding sites (B), and transcriptional analysis of the *pks3-vmI* and *pks4* genes in the Δ *avaL1* Δ *vmII* double mutant (C). (A) The 9 nt direct repeats in the upstream region of putative target genes of VmlI are shown in boxes. (B) The 11 nt sequences composed of the direct repeat with spacer of 2 nt were aligned, and submitted for analysis by WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>). The relative sizes of the letters indicate their likelihood at the particular position given. (C) Total RNA was extracted from mycelia of the Δ *avaL1* mutant (Δ *avaL1*) and the Δ *avaL1* Δ *vmII* double mutant (Δ *avaL1* Δ *vmII*) harvested at the indicated cultivation time.

4-4-5 *vmII*プロモーター領域へのAvaL1の結合

*vmII*がどのような転写制御を受けるのか調べるため、*vmII*のプロモーター領域を解析した。まず5'-RACE法により*vmII*の転写開始点を決定した。その結果、翻訳開始点から159塩基上流にあるGであることがわかった (Fig. 4-6A)。転写開始点上流にはHrdBタイプのシグマ因子が認識するプロモーター領域に見られる-10, -35領域と相同性の高い配列が存在した^{71,72}。また、推定-35領域と重なる位置には、ARE様配列*vmII*-ARE (26 bp)があることもわかった (Fig. 4-6B)。そこでAvaL1が*vmII*-AREに結合するかをゲルシフトアッセイにより検証した。大腸菌より調製したHisタグ融合型rAvaL1タンパク質と、*vmII*-AREを含むDNAプローブを混合したところ、AvaL1とDNAプローブの複合体が検出された (Fig. 4-6C)。さらにこの複合体に10倍量の非標識特異的DNA断片を添加すると、AvaL1の標識プローブへの結合が阻害されたのに対し、10倍量の非特異的DNA断片を添加した時には、AvaL1の標識プローブへの結合に影響は見られなかった。したがってAvaL1は特異的に*vmII*-AREに結合していると考えられる。*avaL1*破壊株で*vmII*の転写量が増加したことを考慮すると (Fig. 4-4)、AvaL1は*vmII*のプロモーター領域にある*vmII*-AREに結合することによって、*vmII*の転写を抑制していると推測される。

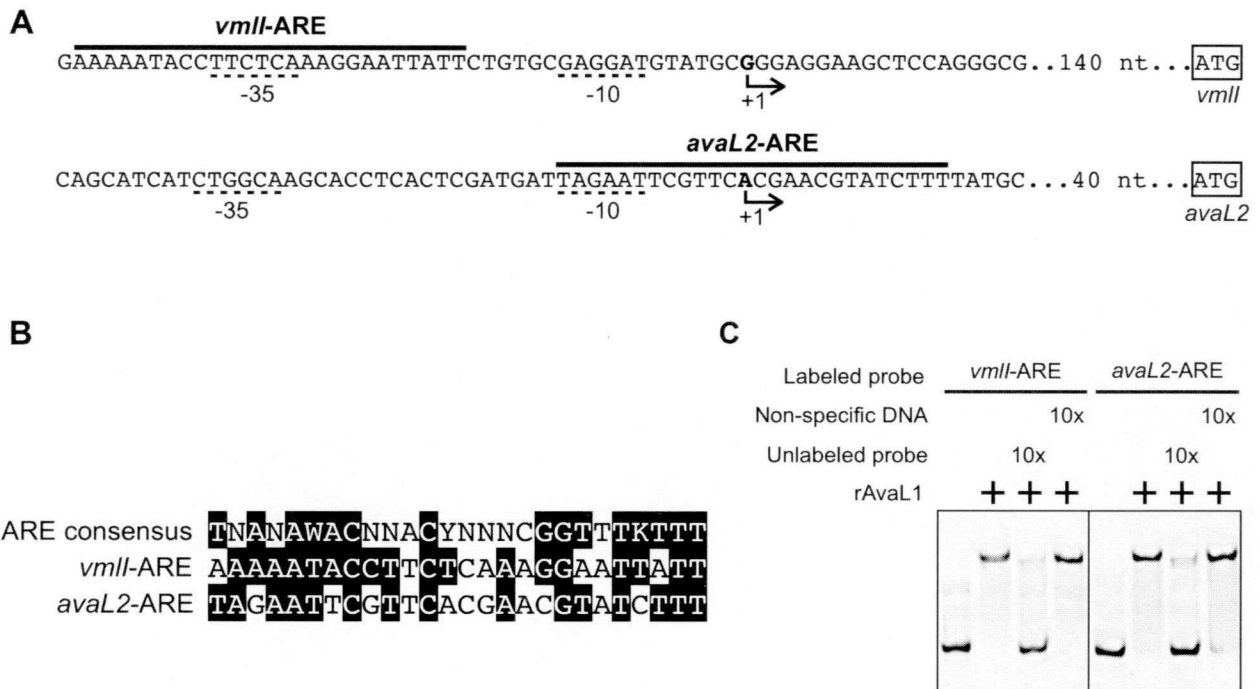


Fig. 4-6 Binding of rAvaL1 protein to the promoter regions of *vmII* and *avaL2*. (A) Nucleotide sequences upstream of *vmII* and *avaL2*. The transcriptional start points are indicated as +1. The probable -35 and -10 regions are shown with dotted lines, and the initiation codons are shown in boxes. The putative AvaL1-binding sequences are indicated by solid lines. (B) Comparison of the putative AvaL1-binding sequences with the ARE consensus sequence defined in Folcher *et al*²⁷. Identical residues are highlighted in black. The letters W, Y, and K stand for A or T, C or T, and G or T, respectively. (C) Gel-shift assay for the binding of AvaL1 to fragments containing plausible AvaL1-binding sites. Each reaction mixture contained 86 fmol of labeled probes as well as 8.5 pmol of purified rAvaL1 protein. AvaL1-binding specificity was tested using 860 fmol of specific (unlabeled probe) and nonspecific competitor DNA (*avaL1* coding sequence).

4-4-6 AvaL1による *avaL2* の転写制御およびAvaL2の機能解析

4-4-3項より、オートレギュレーターリセプターホモログをコードする *avaL2* は AvaL1-regulonの一員であることがわかった。*avaL2* のプロモーター領域を解析したところ、転写開始点は翻訳開始点から59塩基上流のAであり、その上流にはHrdBタイプのシグマ因子が認識するプロモーター領域に見られる-10, -35領域と相同性の高い配列が存在した (Fig. 4-6A)^{71,72}。また、*avaL2* の転写開始点および推定-10領域と重なる位置にARE様配列*avaL2*-ARE (26 bp)を見いだした (Fig. 4-6B)。そこで、*avaL2*-AREを含むDNAプローブとHisタグ融合型rAvaL1タンパク質を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、AvaL1の*avaL2*-AREプローブへの特異的結合が確認された (Fig. 4-6C)。以上より、AvaL1は*avaL2* のプロモーター領域に結合することにより、その転写を直接抑制していることが強く示唆された。

AvaL1による二次代謝の制御においてAvaL2が果たす役割を調べるため、*avaL2* 破壊株を作製し表現型解析及び転写解析を行った。しかしながら、*avaL2* 破壊によるAVM生産およびFLP生産への影響は見られず、*pks3-1*と*pks4*の転写パターンも野生型株とほぼ同一であった (Fig. 4-7)。したがって、AvaL2はAvaL1による抗生物質生産制御および*pks3-vml*クラスターと*pks4*クラスターの転写制御には関与しないことがわかった。

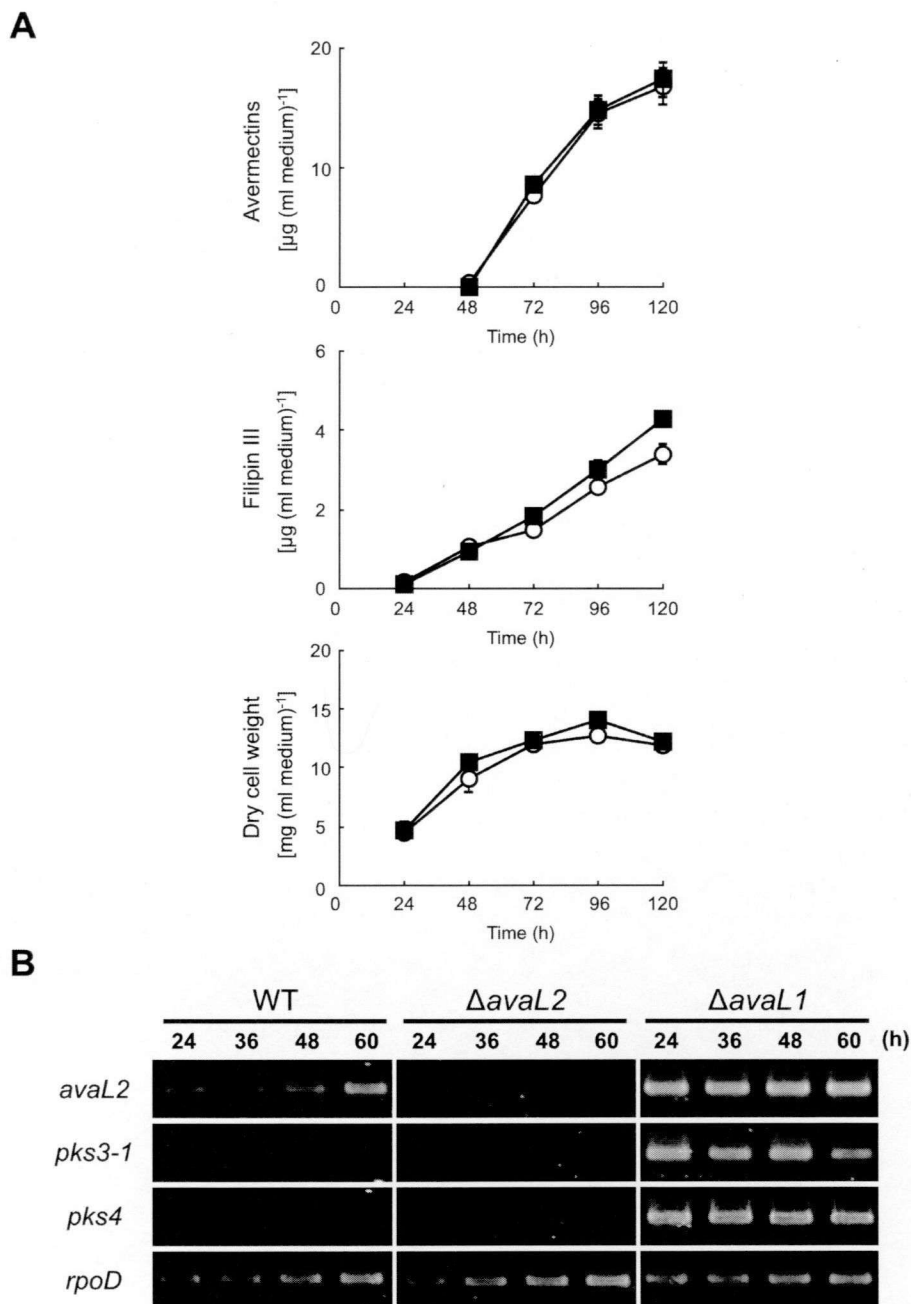


Fig. 4-7 Effect of *avaL2* deletion on secondary metabolism. (A) Profiles of antibiotic production and growth of the wild-type strain (solid squares) and Δ *avaL2* mutant (open circles). Error bars indicate the standard deviations from triplicate cultures. Time courses of avermectin production (top) and filipin production (middle), and growth curves measured by dry-cell weight (bottom). (B) RT-PCR analysis of *pks3-1* and *pks4* in the wild-type strain (WT), the Δ *avaL2* mutant (Δ *avaL2*), and the Δ *avaL1* mutant (Δ *avaL1*). Total RNA was isolated from mycelia harvested at the indicated cultivation times. The numbers of amplification cycles in the PCR were 25 cycles for *rpoD*, 26 cycles for *pks4*, 27 cycles for *avaL2*, and 28 cycles for *pks3-1*.

4-4-7 AvaL1/L2とAvaR1/R2/R3の関係

ARE配列はオートレギュレーターリセプター遺伝子のプロモーター領域から多く見つかっている²⁷。このような場合、リセプタータンパク質は自身の発現を調節する、またはリセプタータンパク質が別のリセプタータンパク質の発現を調節することがわかっている。4-4-5項で示した通り、AvaL2の発現は*avaL2*-AREへの結合を介してAvaL1により制御されていた。一方AvaL1の場合は、*avaL1*遺伝子上流領域にARE様の配列が存在するものの、*avaL1*破壊株または*avaL2*破壊株の転写解析の結果、オートレギュレーション機構は存在せず (Fig. 4-8A)、またAvaL2は*avaL1*の転写を調節しないことが判明した。3章で解析した*avaR*遺伝子の場合は、*avaR1*、*avaR2*、*avaR3*遺伝子のプロモーター領域にARE様配列が存在し (Fig. 3-11)、これらの配列への結合を介してAvaR3による転写抑制が行われていることが示唆された。

ここで、AvaL1/L2が*avaR*遺伝子上流にあるARE様配列への結合を介して、AvaR1/R2/R3の発現を調節するか否か、また逆にAvaR1/R2/R3がAvaL1/L2の発現調節を行うかどうか疑問が持たれた。そこで、*avaL1*破壊株における*avaR*遺伝子群の転写および*avaR3*破壊株における*avaL*遺伝子群の転写を解析した。しかしながら、いずれの遺伝子においても野生型株と各破壊株の間に転写パターンの違いは見られなかったことから (Fig. 4-8)、AvaLタンパク質とAvaRタンパク質はお互いの発現を調節しないことがわかった。さらに、*avaR3*遺伝子を破壊しても*vmlH*と*pks4*遺伝子の転写パターンに影響は見られなかったことから、AvaRはAvaL1制御下にある*pks3-vml*クラスターと*pks4*クラスターの制御には関与しないことが明らかとなった。

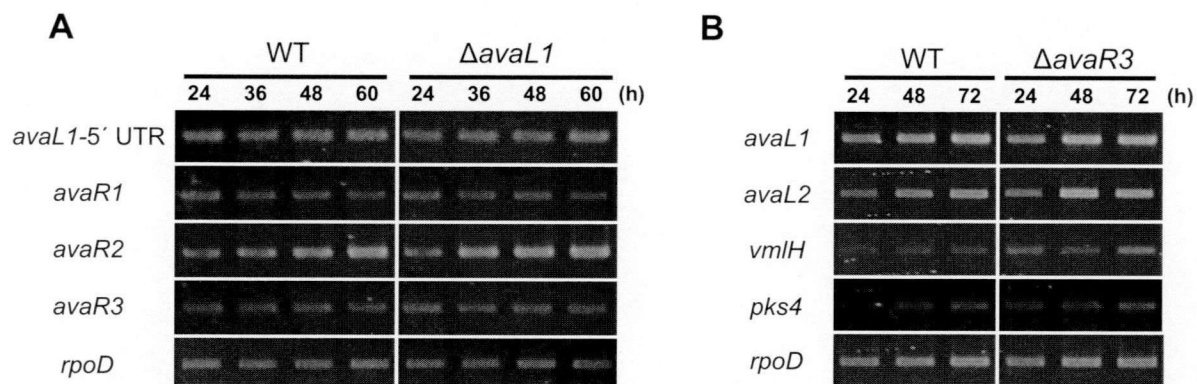


Fig. 4-8 Correlation between *AvaL* proteins and *AvaR* proteins. (A) RT-PCR analysis of *avaL1* and *avaR* genes in the wild-type strain (WT) and the Δ *avaL1* mutant (Δ *avaL1*). The numbers of amplification cycles in the PCR were 25 cycles for *rpoD*, and 26 cycles for the other genes. (B) RT-PCR analysis of *avaL1*, *avaL2*, *vmIH* and *pks4* in the wild-type strain (WT) and the Δ *avaR3* mutant (Δ *avaR3*). The numbers of amplification cycles in the PCR were 25 cycles for *rpoD*, and 26 cycles for *avaL1*, 28 cycles for *vmIH* and *pks4*.

4-4-8 AvaL1-ligand活性

野生型株の48時間目の培養液から酢酸エチル抽出物を調製し (Fig. 4-9A)、AvaL1のDNA結合能に与えるリガンド様物質の有無をゲルシフトアッセイにより調べた。Fig. 4-9Bに示した通り、酢酸エチル抽出物はAvaL1とDNAの結合を阻害する活性を示したことから、AvaL1-ligandの存在が示唆された。この酢酸エチル抽出物にはAvaR1-ligandであるavenolideも含まれると予想されることから、Sep-Pak C₁₈カラムを用いた逆相クロマトグラフィーによりAvaL1-ligand活性とAvaR1-ligand活性を分離した。20%, 50%, 100%EtOHと100%CH₃CNによる溶出画分から粗精製物を調製し、ゲルシフトアッセイを行った結果、AvaL1-ligand活性は100%EtOH溶出画分に検出され、AvaR1-ligand活性は20%と50%EtOH溶出画分に検出された (Fig. 4-9B)。さらに、合成品avenolideはAvaL1-DNA複合体に対する解離活性を示さなかったことから (Fig. 4-9C)、AvaL1のDNA結合能を調節するAvaL1-ligandはavenolideとは異なる物質であることが示唆された。

(Fig. 4-9) (A) Scheme of partial purification of AvaL1-interactive ligand. An ethyl acetate extract from the wild-type culture supernatant was fractionated by reverse-phase column chromatography. (B) Effect of the organic solvent-extracts on the DNA-binding activity of AvaL1 and AvaR1. Lane P, *vmII*-ARE probe DNA (upper panel) and *aco*-ARE probe DNA (lower panel). Lane 1, probe DNA plus rAvaL1 (upper panel) and probe DNA plus rAvaR1 (lower panel). Each reaction mixture contained various extract from the wild-type culture: lane 2, ethyl acetate extract; lane 3, 20% EtOH fraction after reverse-phase column chromatography; lane 4, 50% EtOH fraction; lane 5, 100% EtOH fraction; lane 6, 100% CH₃CN fraction. (C) Effect of avenolide on the DNA-binding activity of AvaL1. Excess amount (156 pmol) of avenolide was added to the reaction mixture.

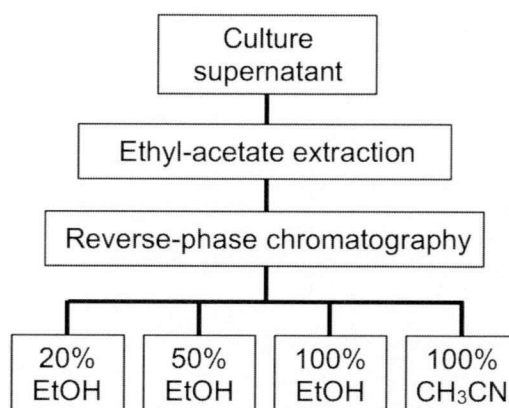
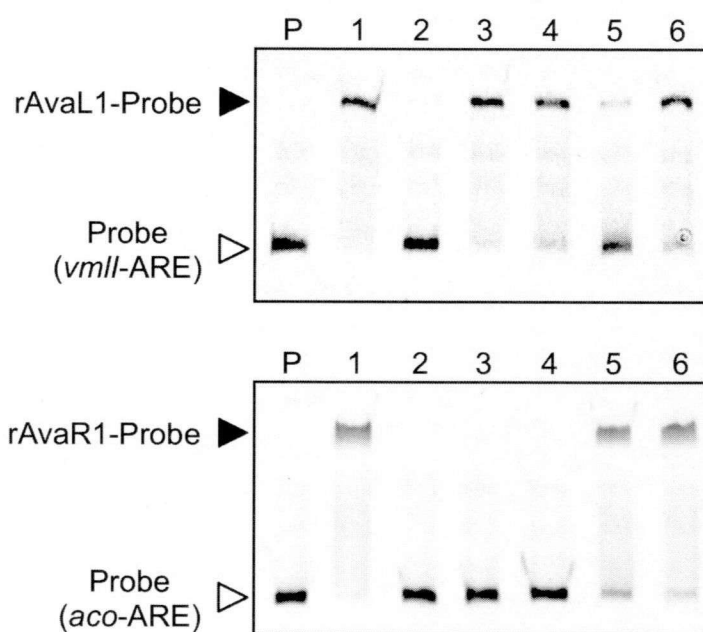
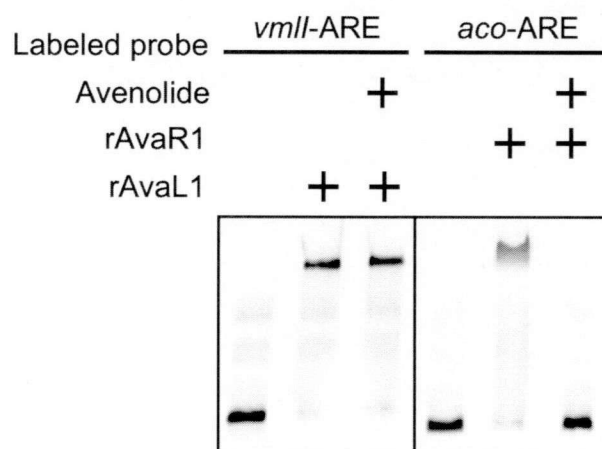
A**B****C**

Fig. 4-9 Detection of AvaL1-interactive ligand.

4-5 考察

4-5-1 AvaL1による二次代謝制御機構

本研究により、オートレギュレーターリセプターホモログAvaL1はSARPファミリータンパク質VmlIの発現を直接抑制することにより、*avaL1*遺伝子に隣接する二次代謝関連遺伝子群*pks3-vml*クラスターと5.8 Mb離れた位置にある*pks4*クラスターの転写を抑制することがわかった (Fig. 4-4, 4-5, 4-6)。また*avaL1*遺伝子の近傍領域にコードされるリセプターホモログAvaL2は、AvaL1により発現を直接制御されるものの、AvaL1による二次代謝の制御機構において働きを持たないことが明らかとなった (Fig. 4-6, 4-7)。また、*S. avermitilis*の培養液からAvaL1-ligand活性が検出されたことから (Fig. 4-9)、AvaL1-ligandの生産に応じてAvaL1による2つのクラスターの転写抑制が解除されるモデルが推定される。

系統樹解析により、AvaL1はブチロラクトン型およびブテノライド型オートレギュレーターのリセプターとは異なるグループに属することがわかったが (Fig. 4-1)、1) AREコンセンサス配列と類似したDNA領域に結合すること、2) 経路特異的制御因子を介して二次代謝遺伝子クラスターの転写を制御すること、3) AvaL1-ligandによって、AvaL1のDNA結合能が調節されることから、他のリセプタータンパク質と同様の制御形態をとることが明らかとなった。ただし、AvaL1-ligandの構造は未解明であり、AvaL1と同じグループに属すMmfRがフラン型のオートレギュレーターを認識することから、このグループに属すリセプターの特異的な性質は認識するリガンドの構造にあるとも考えられる。今後、AvaL1-ligandの構造解析を通して、この点を明らかにしたいと考えている。

4-5-2 *pks3-vml* クラスターと *pks4* クラスターの関係

放線菌における二次代謝産物の生合成遺伝子群は、一般的に制御遺伝子や耐性遺伝子、トランスポーター遺伝子とともにクラスターを構成する。*pks3-vml* クラスターには、ポリケタイドの生合成に関与すると推定される遺伝子の他にバラニマイシン生合成遺伝子ホモログやトランスポーター遺伝子が含まれていた。また、このクラスターに属する遺伝子の転写は *vmlI* 制御遺伝子により同調されていることが明らかとなった (Fig. 4-5)。また、*pks3-vml* クラスターに含まれる遺伝子のホモログを多数含むクラスター (以降 *pks-vml* とよぶ) を他の放線菌 *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672、*Kitasatospora setae*、*Frankia* sp. EAN1pec から見出した (Fig. 4-10)。以上より、*pks3-vml* クラスターは生合成遺伝子クラスターとして、ある特定の二次代謝産物の生合成を担っているのではないかと推測される。

pks3-vml クラスター内の *pks3-2* によってコードされる I 型ポリケタイド合成酵素 Pks3-2 (1,253 a.a.) は Pks4 タンパク質 (1,517 a.a.) の N 末端側と 54% のアミノ酸相同性を示し、Pks3-2 とカップリングして翻訳されると予想される I 型ポリケタイド合成酵素 Pks3-1 (633 a.a.) は、Pks4 の C 末端側と高い相同性を持つことがわかった (Fig. 4-11)。また *pks3-vml* クラスターにコードされた SAV_2275 タンパク質 (transmembrane efflux protein) は、*pks4* クラスターにコードされる SAV_7187 と 53% の相同性を示した。さらに、他の放線菌 3 菌株の *pks-vml* クラスターに高度に保存されている cytochrome P450 hydroxylase 遺伝子は *pks3-vml* クラスターには存在せず、代わりに *pks4* クラスターに存在することがわかった。以上をまとめると、*pks4* クラスターに含まれる 5 遺伝子のうち、3 遺伝子は *pks3-vml* クラスターと重複し、1 遺伝子は他の菌の *pks-vml* クラスターに存在する遺伝子であることがわかった。よって *pks4* クラスターは *pks3-vml* クラスターの一部が重複および転移を起こして生じたクラスターであるか、もしくは水平伝播による *pks-vml* クラスター獲得時に、クラスターの一部が挿入されて生じたクラスターである

と考えられる。どちらの場合にしても、*pks4*クラスター内にVmlIIの結合配列が残されていることから、VmlIIによる制御そのものは保存されていると考えられる。

本研究により、オートレギュレーターリセプターが自身の遺伝子の近傍にある生合成遺伝子群と、離れた位置にある生合成遺伝子群の両方を、制御するメカニズムを明らかにした。またAvaL1の欠損が、通常は休眠状態にある2つの遺伝子クラスター（計38遺伝子）を転写活性化に導いたことから、今後培養条件の検討や*pks3-vml*クラスターから欠落したと考えられるバラニマイシンの生合成遺伝子を導入することによって、2つのクラスターにコードされる化合物を同定することが可能になると考えられる。

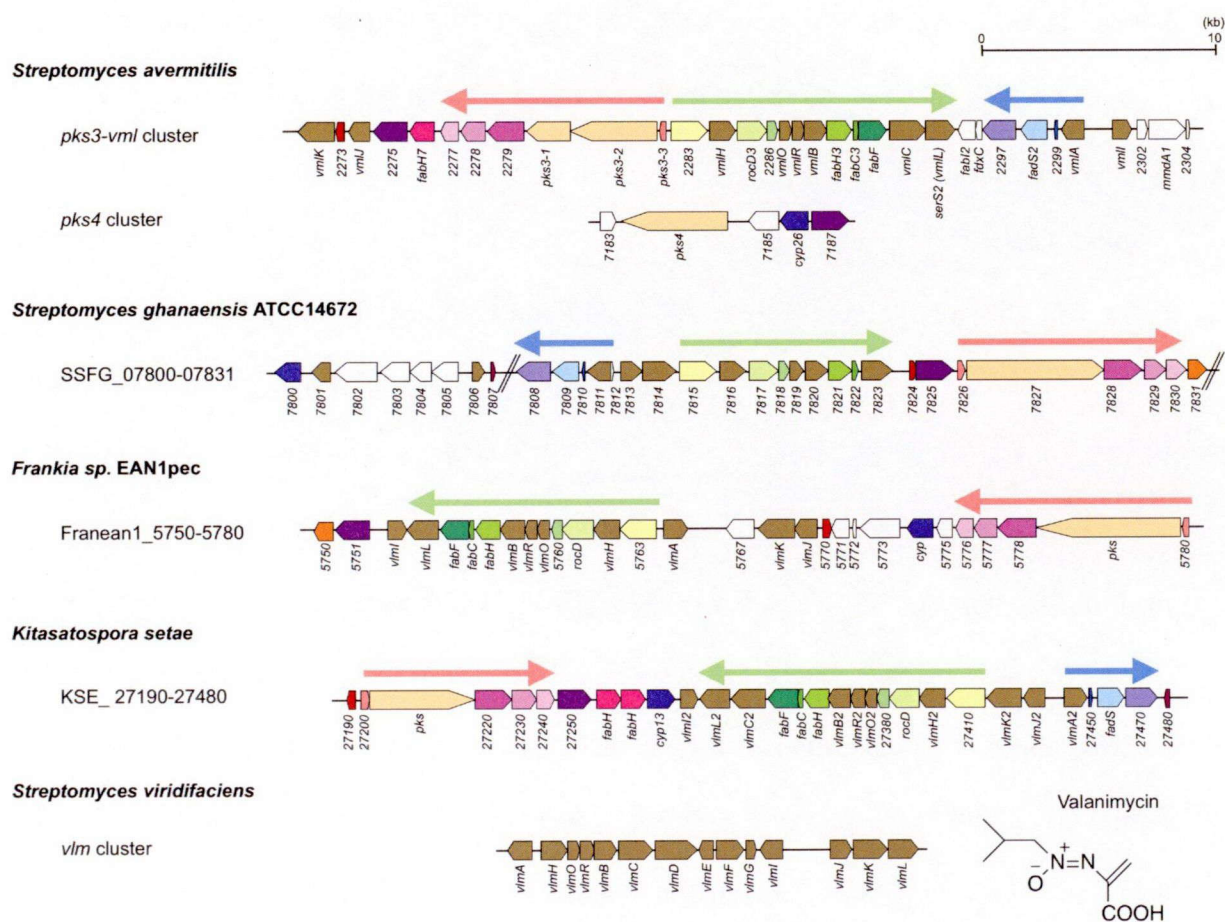


Fig. 4-10 The *pks3-vml* and *pks4* clusters in *S. avermitilis*, syntenic regions of the *pks3-vml* cluster on the other actinomycetes genome, and the valanimycin gene cluster in *S. viridifaciens*. Genes are color-coded by the predicted function of their products (See Table 4-1). Conserved gene organization among 4 clusters is indicated by arrow on genes.

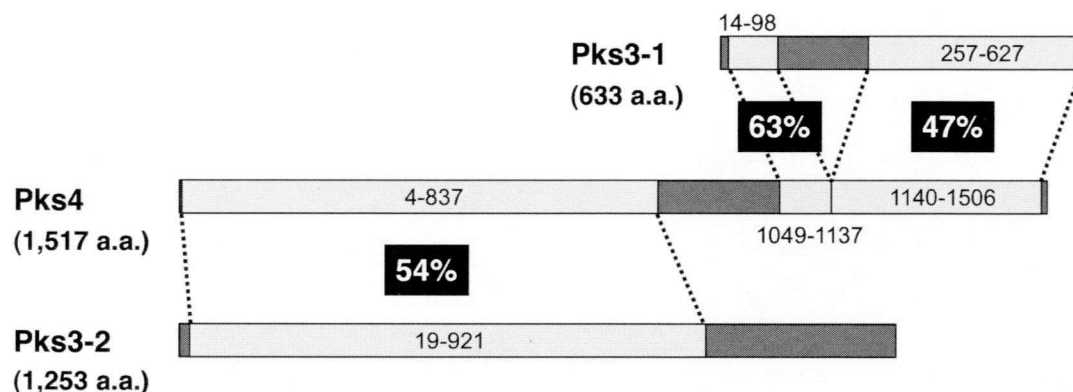


Fig. 4-11 Comparison of amino acid sequences between the deduced proteins encoded by *pks3-1*, *pks3-2*, and *pks4*. The percentage indicates amino acid identities. Numbers indicate the position of amino acid residues in the sequences.

4-5-3 *S. avermitilis*における2つのオートレギュレーター制御系

AvaL1はAVMとFLPの生産を間接的に制御したが、これはAvaR3を介した制御によるものではなかった (Fig. 4-8)。また、AvaL1はAvaR1, AvaR2の発現を調節せず、AvaR3によるAvaL1とAvaL2への発現制御も見られなかった (Fig. 4-8)。さらに、AvaL1のDNA結合能を調節するシグナル分子はavenolideとは異なっていた (Fig. 4-9)。以上より本菌には、AVM生産のためのavenolide、AvaR1、AvaR3の3つの要素が関与するAvaR制御系と、*pks3-vml*クラスターと*pks4*クラスターの転写を調節するAvaL1とAvaL1-ligandをカスケードのトップとしたAvaL制御系の2つが存在すると考えられる。放線菌の染色体ゲノムに2つのオートレギュレーター制御系がコードされ、機能していることを示したのは今回が初めての報告となる。また一方で、AVMの生産はAvaR制御系による直接的な制御とAvaL制御系による間接的な制御の両方を受けていたことから、一つの抗生物質の生産が2つのオートレギュレーター制御系によって調節されることも初めて明らかと

なった。

染色体ゲノムとプラスミドに一つずつオートレギュレーター制御系がコードされていた例を除き、これまで一つの菌体からは一つの制御系しか報告されていない。しかしながら、近年の相次ぐ放線菌ゲノムの解読により、染色体ゲノム上には複数のオートレギュレーターリセプターホモログがコードされていることが明らかとなってきた。したがって、一つの菌体内で複数のオートレギュレーター制御系が機能しているのは普遍的である可能性が高い。今後、*S. avermitilis*における2つのオートレギュレーター制御系の詳細を明らかにすることにより、有用物質の生産性向上だけでなく、二次代謝産物の選択的な生産や、休眠中の生合成遺伝子の活性化による新たな抗生物質の発見などにつながることが期待される。

第5章 総括

産業微生物である放線菌は、抗生物質や抗がん剤など多種多様な生理活性物質を二次代謝産物として生産する。この二次代謝産物生産は、低分子シグナル物質であるオートレギュレーターを起点とした信号伝達機構の制御を受けることが知られている。オートレギュレーターは転写抑制因子でもあるリセプタータンパク質に結合すると、リセプターのDNA結合能を失わせ、二次代謝関連遺伝子の転写を誘導する。しかしながら、リセプターとの結合以降、どのような信号伝達経路を経て生理活性物質の生産が開始されるのか、そのメカニズムの詳細が明らかになっているものはわずかな数の菌株に限られている。

放線菌 *S. avermitilis* は、寄生虫感染症の治療薬および家畜駆虫薬として全世界で使用されるエバーメクチン (AVM) を生産する。本菌のゲノム上には、5つのリセプターホモログ (AvaR1/R2/R3とAvaL1/L2) がコードされていることから、AVM生産を含む二次代謝の制御メカニズムに興味を持たれた。本研究では、*S. avermitilis* におけるオートレギュレーターを単離同定すると同時にリセプターホモログの機能を解析し、放線菌の二次代謝制御に関する新たな知見を得ることを目的とした。

第2章ではエバーメクチン生産を誘導するオートレギュレーターの単離同定を行った。オートレギュレーターリセプター遺伝子 *avaR1/R2/R3* の近傍にあるアシルCoA酸化酵素遺伝子 (*aco*) の機能を喪失させると、AVM生産が顕著に低下するとともに、AvaR1のDNA結合能を変化させる物質の生産も停止していた。γ-ブチロラクトン型オートレギュレーターの添加、あるいは *aco* 破壊株の培養液抽出物を破壊株に添加してもAVM生産は回復しないのに対し、野生型株の培養液抽出物はAVM生産を回復させたことから、AVM生産を誘導するオートレギュレーターは新規構造を有していることが示唆された。2トン培養液より、AvaR1のDNA結合能消失を指標にオートレギュレーターを単離し、avenolideの化学構造を同定し

た。**Avenolide**は、これまで報告されている γ -ブチロラクトン型もしくはフラン型のオートレギュレーターとは異なるブテノライド骨格を有し、その側鎖構造も大きく異なっていた。共同研究者によって有機合成された**avenolide**が、AVM生産を4 nMの最小有効濃度で誘導したことから、**avenolide**は新規のオートレギュレーターであると結論した。

第3章ではオートレギュレーターホモログの一つである**AvaR3**の機能を解析した。**AvaR3**はDNA結合ドメインと制御ドメインの間に、他のオートレギュレーターリセプターにはない機能未知ドメインを持つため、二次代謝における**AvaR3**の役割に注目した。**avaR3**破壊株を構築し、その表現型を解析したところ、AVM生合成遺伝子の転写パターンが変化し、AVMの生産が消失した。また、抗生物質FLPの早期過剰生産が観察されたが、FLP生合成遺伝子の転写プロファイルには変化が見られなかった。このことから、**AvaR3**はAVM生合成遺伝子の転写を活性化し、AVM生産を正に制御するが、FLP生産は間接的に制御することが明らかとなった。また**avaR3**変異は固体培養時には形態分化に、液体培養時にはペレット形成に影響を与えたことから、**AvaR3**は抗生物質の生産に加えて、形態分化および菌糸の凝集を制御するグローバル因子として機能することがわかった。

第4章ではリセプターホモログである**AvaL1**と**AvaL2**の機能を解析した。系統樹解析では、**AvaL1**は**AvaL2**と共に、既知のオートレギュレーターリセプターとは独立したグループに属することがわかった。そこで、**AvaL1**または**AvaL2**の二次代謝制御への関与を知るため、**avaL1**及び**avaL2**破壊株の表現型を解析した。32個の二次代謝生合成遺伝子クラスターの転写パターンを精査した結果、**avaL1**破壊株では、2つの生合成クラスター (**pks3-vml**と**pks4**) の転写量が増加していた。**pks3-vml**遺伝子クラスターには、クラスター遺伝子の転写を制御すると予想される**vmlI**遺伝子が存在する。*in vitro*実験により、**AvaL1**タンパク質が**vmlI**遺伝子プロモーター領域に特異的に結合したことから、**AvaL1**が**vmlI**遺伝子の転

写を直接的に制御することにより、*pks3-vml*遺伝子クラスターの発現を調節すると考えられた。また、2つの生合成クラスターにVmlIタンパク質が認識すると推定されるDNA結合配列を見出したため、VmlIが両クラスターを制御すると予想した。そこで、*avaL1 vmlI*二重破壊株を作製し解析したところ、両クラスターの発現増加は抑圧された。したがって、AvaL1はVmlIの発現調節を通じて、約5.8 Mb離れて存在する2つの生合成クラスターを制御すると考えられる。また、*avaL2*破壊株では、*avaL1*破壊株が示す表現型が観察されなかったこと、AvaL1は*avaR1/R2/R3*の制御に関与しないこと、avenolideとは異なる物質がAvaL1のDNA結合能に影響を与えることから、AvaL1はAvaL2を経ずに2つの生合成クラスターを制御するとともに、avenolide制御系とは独立して二次代謝を制御していると考えた。

本研究により、*S. avermitili*の二次代謝を調節する2つのオートレギュレーター制御系が明らかとなった (Fig. 5)。まず一つ目は、AVM生産を制御するAvaR制御系である。この制御系には、新規オートレギュレーターavenolideとそのリセプタータンパク質AvaR1及びリセプターホモログAvaR3と共に、avenolideの生合成を担うAcyl-CoA oxidase (Aco)とcytochrome P450 hydroxylase (Cyp17)が含まれる。類似の制御機構を持つと推測される生理活性物質生産菌が他に3菌株見いだされていることから、AvaR制御系による抗生物質生産誘導のメカニズムが明らかになれば、AVMの生産性向上につながるだけでなく、その知見を他の放線菌の分子育種にも役立てられると考えている。またavenolideは、 γ -ブチロラクトン型オートレギュレーターに次いで*Streptomyces*属放線菌に広く分布していると推測しており、avenolideを他の放線菌に投与することによって、休眠状態にある二次代謝産物の生産を活性化できると考える。二つ目のオートレギュレーター制御系は、*pks3-vml*クラスターと*pks4*クラスターの転写を調節するAvaL制御系である。AvaL1-ligandとそのリセプタータンパク質AvaL1をカスケードの頂点とするこの制御系では、SARPファミリータンパク質VmlIを介して、離れた2つの生合成クラスターを制御することを明らかにした。

一つの染色体ゲノムに2つのオートレギュレーター制御系がコードされ機能していることを示したのは今回が初めてであるが、近年の相次ぐ放線菌ゲノムの解読により、複数のオートレギュレーター制御系による二次代謝調節は、放線菌に普遍的なものであると考えられる。二次代謝産物には抗菌活性を持つ化合物の他に、金属イオンの取り込みに関与するものや、周囲の微生物に生育の同調を促すもの、UVなどの外部刺激から自身を守るもの、植物に感染または共生するためのものなどが幅広く存在する。土壌という比較的生育条件が変化しやすい環境で、その場に応じた適切な二次代謝産物を生産するために、このような複雑な制御系が発達したのではないかと考えられる。そのメカニズムを我々が理解し利用することによって、二次代謝産物の選択的生産や新規化合物の効率的生産が可能になると考えている。

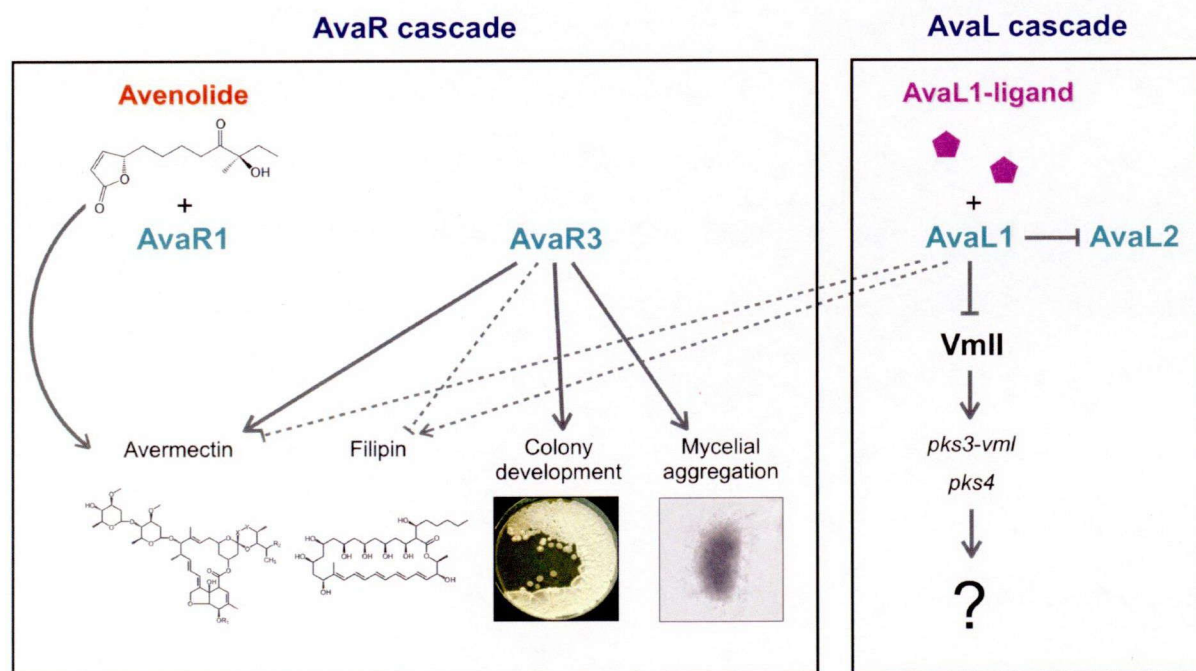


Fig. 5 Autoregulator-signaling cascades in *Streptomyces avermitilis*

本報に関する論文

- 1) **Miyamoto KT**, Kitani S, Komatsu M, Ikeda H & Nihira T. The autoregulator-receptor homologue AvaR3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces avermitilis*. **Microbiology** 157:2266 - 2275. (2011).
- 2) Kitani S, **Miyamoto KT**, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, Nishitomi K, Uchida M, Nagamitsu T, Ikeda H & Nihira T. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** In Press

参考文献

1. *Atlas of Actinomycetes 放線菌図鑑*. (The Society for Actinomycetes Japan: 1997).
2. Hopwood, D.A. *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. (Oxford University Press: 2007).
3. Flärdh, K. & Buttner, M.J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 36-49 (2009).
4. Waksman, S.A. Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. *Science* **118**, 259-66 (1953).
5. Bérdy, J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of antibiotics* **58**, 1-26 (2005).
6. 田中信男, 中村昭四郎. 抗生物質大要 化学と生物活性 [第四版]. (東京大学出版会: 1992).
7. Bibb, M. 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **142**, 1335-1344 (1996).
8. Bibb, M.J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology* **8**, 208-15 (2005).
9. van Wezel, G.P., McKenzie, N.L. & Nodwell, J.R. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics. *Methods in enzymology* **458**, 117-141 (2009).
10. Chen, Y., Wendt-Pienkowski, E. & Shen, B. Identification and utility of FdmR1 as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein activator for fredericamycin production in *Streptomyces griseus* ATCC 49344 and heterologous hosts. *Journal of bacteriology* **190**, 5587-96 (2008).
11. Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B.S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports* **26**, 1362-84 (2009).
12. Martín, J.-F. & Liras, P. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Current opinion in microbiology* **13**, 263-273 (2010).
13. Tang, L., Grimm, a, Zhang, Y.X. & Hutchinson, C.R. Purification and characterization of the DNA-binding protein DnrI, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Molecular microbiology* **22**, 801-13 (1996).
14. Wilson, D.J., Xue, Y., Reynolds, K.A. & Sherman, D.H. Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Bacteriology* **183**, 3468-3475 (2001).
15. Liras, P., Gomez-Escribano, J.P. & Santamarta, I. Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **35**, 667-76 (2008).
16. Guthrie, E.P. *et al.* A response-regulator-like activator of antibiotic synthesis from *Streptomyces*

- coelicolor* A3(2) with an amino-terminal domain that lacks a phosphorylation pocket. *Microbiology* **144**, 727-38 (1998).
17. Wietzorrek, A. & Bibb, M. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Molecular Microbiology* **25**, 1177-1184 (1997).
 18. Adamidis, T., Riggle, P. & Champness, W. Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *Journal of bacteriology* **172**, 2962-9 (1990).
 19. McKenzie, N.L. & Nodwell, J.R. Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *Journal of bacteriology* **189**, 5284-5292 (2007).
 20. Horinouchi, S. AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **30**, 462-7 (2003).
 21. Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J.-Y., Tomono, A. & Horinouchi, S. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **69**, 431-9 (2005).
 22. Chater, K.F. & Chandra, G. The use of the rare UUA codon to define “expression space” for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*. *The Journal of Microbiology* **46**, 1-11 (2008).
 23. Takano, E. γ -butyrolactones: Streptomyces signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current opinion in microbiology* **9**, 287-94 (2006).
 24. Khokhlov, A.S. *et al.* The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. *Doklady Akademii nauk SSSR* **177**, 232-5 (1967).
 25. Hsiao, N.-H. *et al.* Analysis of two additional signaling molecules in *Streptomyces coelicolor* and the development of a butyrolactone-specific reporter system. *Chemistry & biology* **16**, 951-60 (2009).
 26. Corre, C., Song, L., Rourke, S.O., Chater, K.F. & Challis, G.L. 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17510-17515 (2008).
 27. Folcher, M. *et al.* Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry* **276**, 44297-306 (2001).
 28. Arakawa, K., Mochizuki, S., Yamada, K., Noma, T. & Kinashi, H. γ -Butyrolactone autoregulator-receptor system involved in lankacidin and lankamycin production and

- morphological differentiation in *Streptomyces rochei*. *Microbiology* **153**, 1817-27 (2007).
29. Horinouchi, S. Mining and Polishing of the Treasure Trove in the Bacterial Genus *Streptomyces*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 283-299 (2007).
 30. Healy, F.G. *et al.* Characterization of γ -butyrolactone autoregulatory signaling gene homologs in the angucyclinone polyketide WS5995B producer *Streptomyces acidiscabies*. *Journal of bacteriology* **191**, 4786-97 (2009).
 31. Ramos, J.L. *et al.* The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**, 326-356 (2005).
 32. Kinoshita, H. *et al.* Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *Journal of bacteriology* **179**, 6986-93 (1997).
 33. Pulsawat, N., Kitani, S., Fukushima, E. & Nihira, T. Hierarchical control of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae* by three pathway-specific regulators: VmsS, VmsT and VmsR. *Microbiology* **155**, 1250-9 (2009).
 34. Takano, E. *et al.* A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* **56**, 465-79 (2005).
 35. Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y. & Bibb, M.J. A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular microbiology* **41**, 1015-28 (2001).
 36. Burg, R.W. *et al.* Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **15**, 361-7 (1979).
 37. Omura, S. & Crump, A. The life and times of ivermectin -a success story. *Nature reviews. Microbiology* **2**, 984-9 (2004).
 38. 池田孝則 腸管糞線虫症治療薬イベルメクチン（ストロメクトール）の薬理作用－作用メカニズムと臨床試験成績－. *日本薬理学雑誌* **122**, 527-38 (2003).
 39. Ikeda, H., Kotaki, H. & Omura, S. Genetic studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *Journal of bacteriology* **169**, 5615-21 (1987).
 40. Ikeda, H. & Omura, S. Avermectin Biosynthesis. *Chemical reviews* **97**, 2591-2610 (1997).
 41. Ikeda, H., Nonomiya, T., Usami, M., Ohta, T. & Omura, S. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 9509-14 (1999).
 42. Ikeda, H., Nonomiya, T. & Omura, S. Organization of biosynthetic gene cluster for avermectin in *Streptomyces avermitilis*: analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **27**, 170-6 (2001).
 43. Kitani, S., Ikeda, H., Sakamoto, T., Noguchi, S. & Nihira, T. Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Applied microbiology*

- and biotechnology **82**, 1089-96 (2009).
44. Ikeda, H. *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature biotechnology* **21**, 526-31 (2003).
 45. 池田治生 放線菌 (二次代謝産物生産における遺伝子情報の活用). *ゲノミクス・プロテオミクスの新展開* 962-992 (2004).
 46. Bignell, D.R.D., Bate, N. & Cundliffe, E. Regulation of tylosin production: role of a TylP-interactive ligand. *Molecular microbiology* **63**, 838-47 (2007).
 47. O'Rourke, S. *et al.* Extracellular signalling, translational control, two repressors and an activator all contribute to the regulation of methylenomycin production in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* **71**, 763-78 (2009).
 48. Stratigopoulos, G., Gandecha, A.R. & Cundliffe, E. Regulation of tylosin production and morphological differentiation in *Streptomyces fradiae* by TylP, a deduced γ -butyrolactone receptor. *Molecular microbiology* **45**, 735-44 (2002).
 49. Cundliffe, E. Control of tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *Journal of microbiology and biotechnology* **18**, 1485-1491 (2008).
 50. Bierman, M. *et al.* Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**, 43-9 (1992).
 51. Komatsu, M., Tsuda, M., Omura, S., Oikawa, H. & Ikeda, H. Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7422-7 (2008).
 52. Kitani, S. *et al.* Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1-6 (2011).doi:10.1073/pnas.1113908108
 53. Uchida, M. *et al.* Total Synthesis and Absolute Configuration of Avenolide, extracellular factor in *Streptomyces avermitilis*. *The Journal of antibiotics* In press
 54. Kondo, K., Higashi, Y., Sakuda, S., Nihira, T. & Yamada, Y. New virginiae butenolides from *Streptomyces virginiae*. *The Journal of antibiotics* **42**, 1873-1876 (1989).
 55. Sato, K., Nihira, T., Sakuda, S., Yanagimoto, M. & Yamada, Y. Isolation and Structure of a New Butyrolactone Autoregulator from *Streptomyces* sp. FRI-5. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **68**, 170-173 (1989).
 56. Herawati, E. Avermectin Production : Two Plausible Autoregulator Biosynthetic Genes. (Master thesis, Osaka University: 2008).
 57. Kato, J.-ya, Funa, N., Watanabe, H., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. Biosynthesis of γ -butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2378-83 (2007).
 58. Bunet, R. *et al.* Characterization and manipulation of the pathway-specific late regulator AlpW

- reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of kinamycins. *Journal of bacteriology* **193**, 1142-1153 (2010).
59. Stratigopoulos, G. & Cundliffe, E. Inactivation of a transcriptional repressor during empirical improvement of the tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **28**, 219-24 (2002).
 60. Novakova, R., Kutas, P., Feckova, L. & Kormanec, J. The role of the TetR-family transcriptional regulator Aur1R in negative regulation of the auricin gene cluster in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Microbiology* **156**, 2374-83 (2010).
 61. Natsume, R., Ohnishi, Y., Senda, T. & Horinouchi, S. Crystal Structure of a γ -Butyrolactone Autoregulator Receptor Protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Molecular Biology* **336**, 409-419 (2004).
 62. Ishikawa, J. & Hotta, K. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS microbiology letters* **174**, 251-3 (1999).
 63. Bunet, R. *et al.* Regulation of the synthesis of the angucyclinone antibiotic alpomycin in *Streptomyces ambofaciens* by the autoregulator receptor AlpZ and its specific ligand. *Journal of bacteriology* **190**, 3293-3305 (2008).
 64. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. & Hopwood, D.A. *Practical Streptomyces Genetics*. (The John Innes Foundation: Norwich, 2000).
 65. 原啓文, 大西康夫 & 福田雅夫 ゲノム情報を基盤にした放線菌群の転写制御機構研究. *化学と生物* **49**, 234-242 (2011).
 66. Traag, B. a & van Wezel, G.P. The SsgA-like proteins in actinomycetes: small proteins up to a big task. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**, 85-97 (2008).
 67. Kawamoto, S., Watanabe, H., Hesketh, A., Ensign, J.C. & Ochi, K. Expression analysis of the *ssgA* gene product, associated with sporulation and cell division in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **143** (Pt 4, 1077-86 (1997).
 68. van Wezel, G.P. *et al.* Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Applied and environmental microbiology* **72**, 5283-8 (2006).
 69. de Jong, W., Wösten, H. a B., Dijkhuizen, L. & Claessen, D. Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Molecular microbiology* **73**, 1128-40 (2009).
 70. Xu, H., Chater, K.F., Deng, Z. & Tao, M. A cellulose synthase-like protein involved in hyphal tip growth and morphological differentiation in streptomyces. *Journal of bacteriology* **190**, 4971-8 (2008).
 71. Kang, J.G., Hahn, M.Y., Ishihama, a & Roe, J.H. Identification of sigma factors for growth phase-related promoter selectivity of RNA polymerases from *Streptomyces coelicolor* A3(2).

- Nucleic acids research* **25**, 2566-73 (1997).
72. Strohl, W.R. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic acids research* **20**, 961-74 (1992).
 73. Denoya, C.D. *et al.* A second branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase gene cluster (*bkdFGH*) from *Streptomyces avermitilis*: its relationship to avermectin biosynthesis and the construction of a *bkdF* mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins. *Journal of bacteriology* **177**, 3504-11 (1995).
 74. Gottelt, M., Kol, S., Gomez-Escribano, J.P., Bibb, M. & Takano, E. Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **156**, 2343-53 (2010).
 75. Ohnishi, Y. *et al.* Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of bacteriology* **190**, 4050-60 (2008).
 76. Tamura, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution* (2011).doi:10.1093/molbev/msr121
 77. Garg, R.P., Ma, Y., Hoyt, J.C. & Parry, R.J. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the azoxy antibiotic valanimycin. *Molecular microbiology* **46**, 505-17 (2002).
 78. Garg, R.P. & Parry, R.J. Regulation of valanimycin biosynthesis in *Streptomyces viridifaciens*: characterization of VlmI as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein (SARP). *Microbiology* **156**, 472-83 (2010).
 79. Bate, N., Stratigopoulos, G. & Cundliffe, E. Differential roles of two SARP-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis. *Molecular microbiology* **43**, 449-58 (2002).
 80. Tanaka, A., Takano, Y., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *Journal of molecular biology* **369**, 322-33 (2007).
 81. Gawronski, J.K., Oeveren, A.V., Deen, H.V.D., Leung, C.W. & Feringa, B.L. Simple Circular Dichroic Method for the Determination of Absolute Configuration of 5-Substituted 2(5H)-Furanones. *Notes* **61**, 1513-1515 (1996).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学生物工学国際交流センターの仁平卓也教授に心より感謝申し上げます。また、有益かつ的確な御指導と御助言を賜りました同センターの木谷茂助教、並びに木下浩助教に心より厚く御礼申し上げます。

また副査である大阪大学大学院工学研究科の原島俊教授、並びに福崎英一郎教授には、本報の作成および博士論文公聴会での発表内容について、丁寧な御指導を賜りました。心より感謝致します。

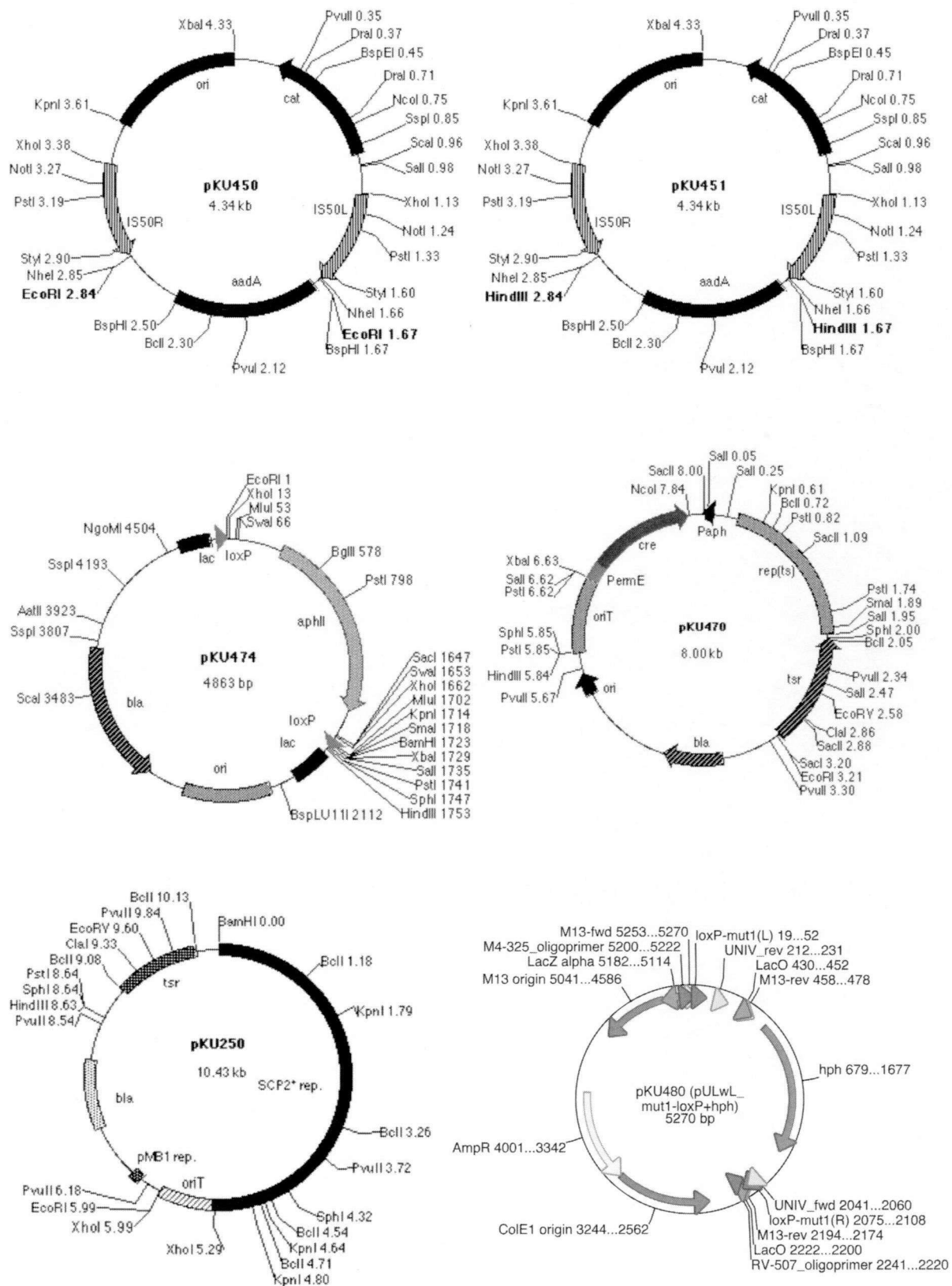
北里大学北里生命科学研究所の池田治生教授には、多大なる御支援並びに温かい御指導、御鞭撻を賜りました。深く感謝の意を表します。北里大学大学院薬学研究科の長光亨教授にはavenolideとそのアナログの合成品を提供して頂きました。心より感謝致します。また実験に際しての細かな御指導や御助言を賜りました、日本大学薬学部の高松智准教授、並びに北里大学北里生命科学研究所の小松護助教に厚く御礼申し上げます。

またavenolide単離のための大量培養は、日本バイオフーマ株式会社（旧メルシャン株式会社）の多大なる御支援と御厚意により実現することができました。厚く御礼申し上げます。

そして、本研究を進めるにあたり、常に温かい御助言と激励をしてくださった分子微生物学研究室の先輩方、共に励ましあい研究生活を送ってきた同研究室の皆様に御礼申し上げます。

最後に、これまで私の精神的、経済的支えとなってくれた家族に、心より感謝いたします。

Appendix 1 The plasmids used in this study



Appendix 2 Avenolideの構造決定

Appendix 2-1 Avenolideの構造解析方法

^1H 及び ^{13}C NMRスペクトルをJEOL JNM-ECP 500 FT NMR SYSTEM (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz)を用いて測定した。化学シフトは δ スケールで記載し、内部標準にはテトラメチルシランを用いた。質量分析にはJEOL JMS-700 Mstation spectrometerを、CDスペクトルの測定にはJASCO J-720を、旋光度測定には JASCO DIP-1000 polarimeterをそれぞれ使用した。Avenolideの光学異性を決定するためのキラルクロマトグラフィーには、精製avenolide (**1**)と合成品 (*4S,10R*)-**1**および (*4S,10S*)-**1**をMeOHに溶解し、各250 ng相当量をHPLCに供した (条件3)。

●HPLC条件3

HPLC	HITACHI D-7000, L-7100, L-7610, L-7450
Column	DAICEL CHIRALPAK® IA-3 (4.6 mm x 250 mm)
Buffer	100% EtOH
Wavelength	200 nm
Flow rate	0.3 ml/min

Appendix 2-2 Avenolideの構造決定

Avenolideの絶対構造は、北里大学の池田らによって決定された。以下にその詳細をまとめた。2-4-3項で精製したavenolideの理化学的性状をTable 6-1に記載した。高分解能FAB-MSスペクトルの解析により、avenolideの分子式を $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_4$ と推定した (m/z 263.1261 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$)。続いて、 ^1H 及び ^{13}C NMRスペクトルとHMQCスペクトルを解析した (Fig. 6-1, 6-2, 6-3, Table 6-2)。1) オレフィンプロトンのシグナル (δ 7.45, δ 6.12)と、カルボニル炭素のシグナル (δ 173.0)が検出され、HMBC解析 (Fig. 6-4)でオレフィンプロトン (δ 6.12)とこのカルボニル炭素 (δ 173.0)が隣接したこと、2) メチン炭素 (δ 83.0)

の ^1H ケミカルシフト (δ 5.05)が、海洋放線菌から単離されたブテノライド化合物のメチン水素のシグナル (δ 5.01-5.05)とほぼ一致したことより、avenolideは2(*5H*)-furanone構造を有すると考えた。 ^1H - ^1H COSYスペクトルの解析により (Fig. 6-5)、Fig. 6-6に示す2位炭素から8位炭素までの相関と、11位炭素と12位炭素の相関を推定した。以上の解析結果から、Fig. 6-6に示す2種の構造を推定した。HMBCスペクトルの解析により、11位と13位の相関が検出され、8位と水酸基を持つ四級炭素 (δ 79.9)との相関は検出されなかったことから、avenolideの平面構造は推定構造1 (Fig. 6-6)であると考えた。北里大学の長光らのグループにより合成された推定構造1の化合物は⁵³、精製avenolideと合致するTOF-MSスペクトルと ^1H 及び ^{13}C NMRスペクトルを示した。従って、avenolideの平面構造は4,10-dihydroxy-10-methyl-9-oxo-dodec-2-en-1,4-olide (**1**)と決定した。本平面構造についての従来報告はない。

化合物**1**は2つの不斉炭素を含むため、立体配置を解析した。化合物**1**は α,β -不飽和ラクトン環以外にコットン効果に影響する官能基を持たない。そこで、4位の立体構造の決定にはCDスペクトル解析を用いた。化合物**1**のCDスペクトルは $\lambda_{\text{max}} (\Delta\epsilon)$: 208 (+4.4) nmとなり、正の $\pi\text{-}\pi^*$ コットン効果を示した (Fig. 6-7A)。Fig. 6-7Bに示した既知ブテノライドのCDスペクトルとの比較により⁸¹、4位の立体構造は4*S*であると決定した。次に10位炭素の立体配置を明らかにするため、キラルクロマトグラフィーにより合成品4*S*,10*R*-**1**及び4*S*,10*S*-**1**と精製avenolideの溶出時間を分析した (Fig. 6-8)。4*S*,10*R*-**1**が精製avenolideと同じ溶出時間を示したことから、10位炭素の立体配置を10*R*と決定した。以上により avenolide の 絶 対 構 造 を (4*S*,10*R*)-4,10-dihydroxy-10-methyl-9-oxo-dodec-2-en-1,4-olideと決定した。

Table 6-1 Physiochemical properties of avenolide

Appearance	Colourless oil
Molecular formula	C ₁₃ H ₂₀ O ₄
Molecular weight	HRFABMS[M+Na] ⁺ 263.1261 (calcd. 263.1259)
Specific rotation[α] _D ²³	+22.0 (c 0.01, MeOH)
UV absorption (MeOH)	λ _{max} (log ε): 208 (4.13) nm
CD spectrum (MeOH)	λ _{max} (Δε): 208 (+4.4) nm

Fig. 6-1 ^1H NMR spectrum (500 MHz, CDCl_3) of the new compound avenolide (**1**)

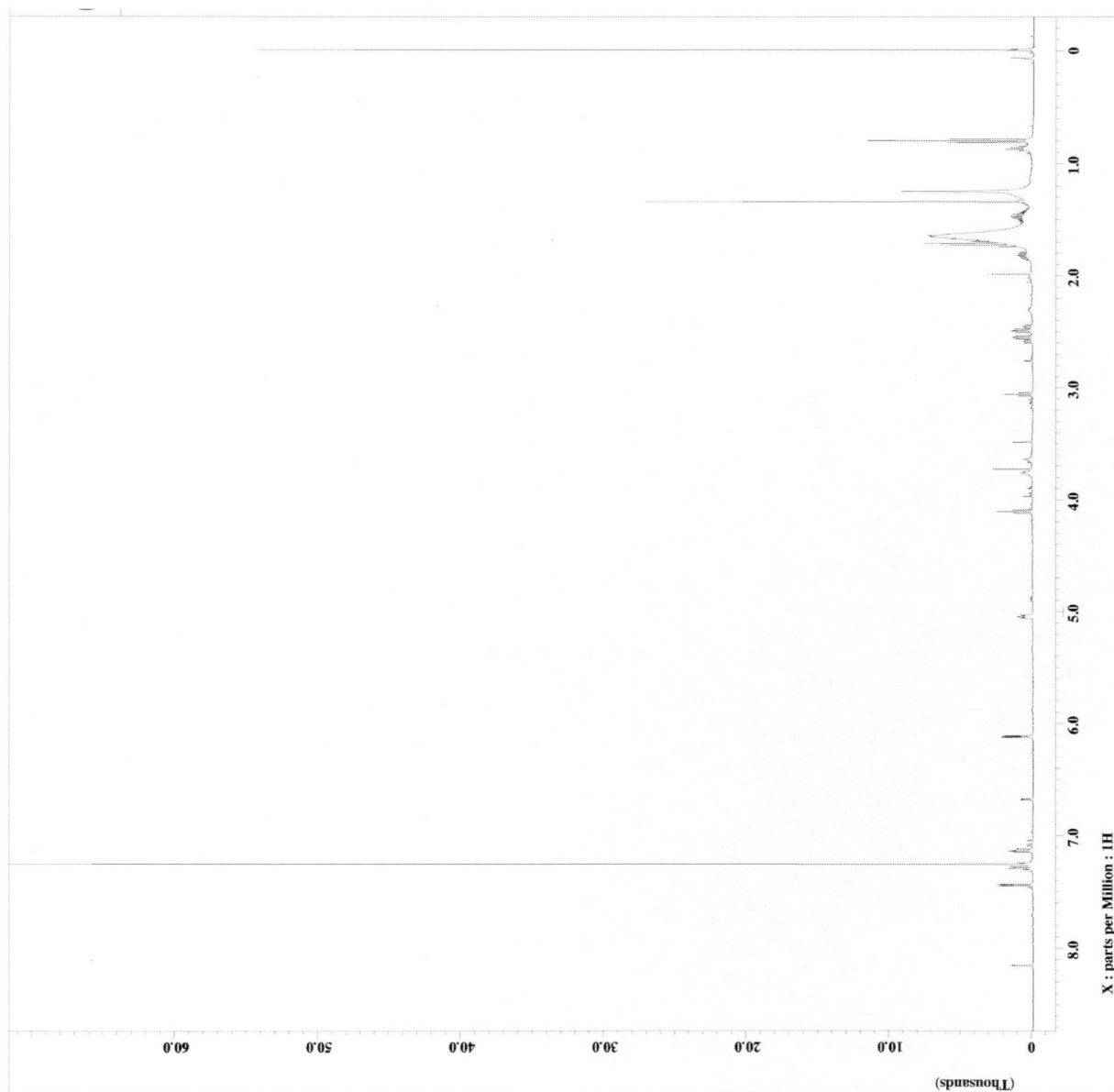


Fig. 6-2 ^{13}C NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3) of the new compound avenolide (1)

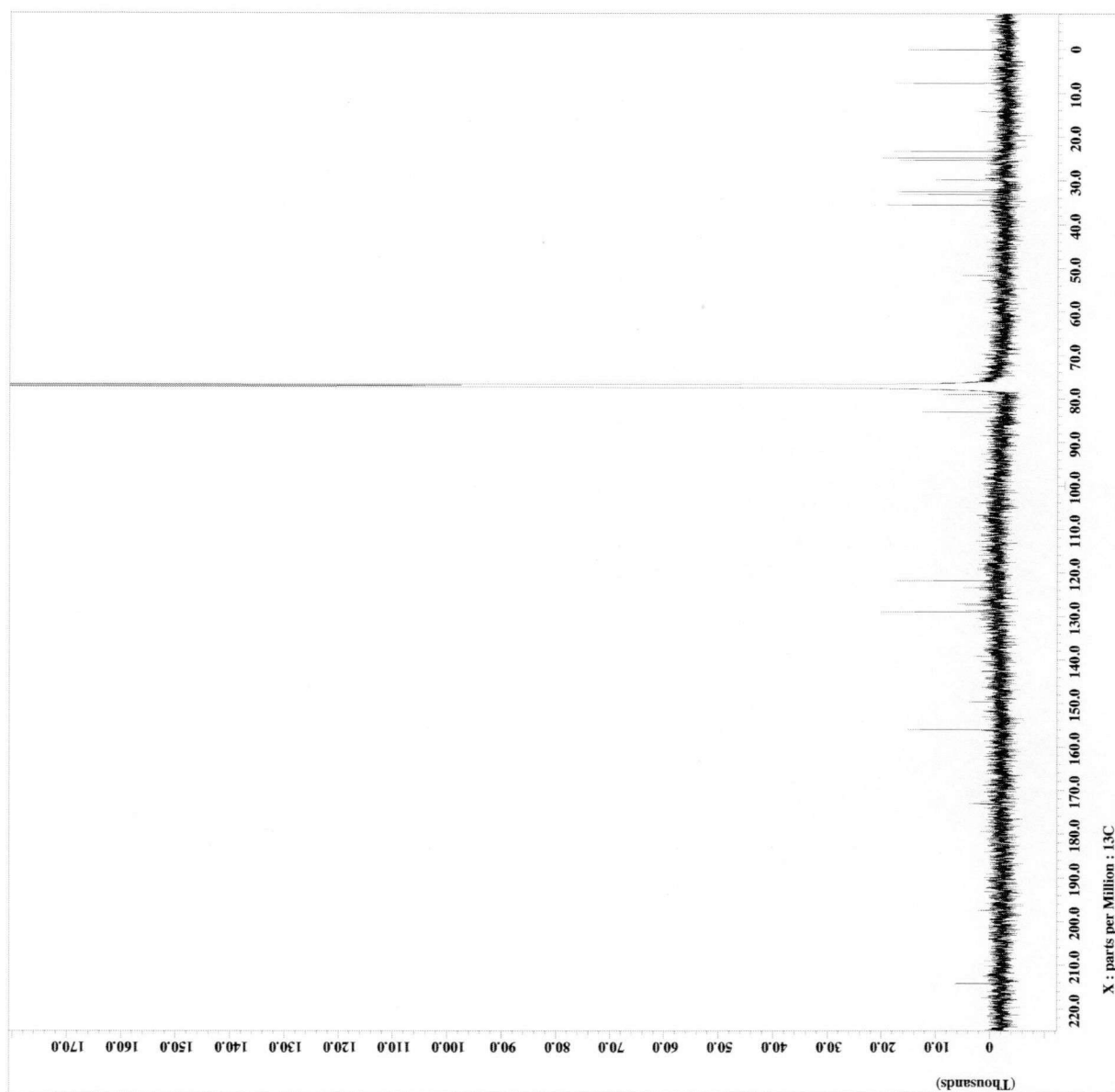


Fig. 6-3 HMQC spectrum (500 MHz, CDCl_3) of the new compound avenolide (1)

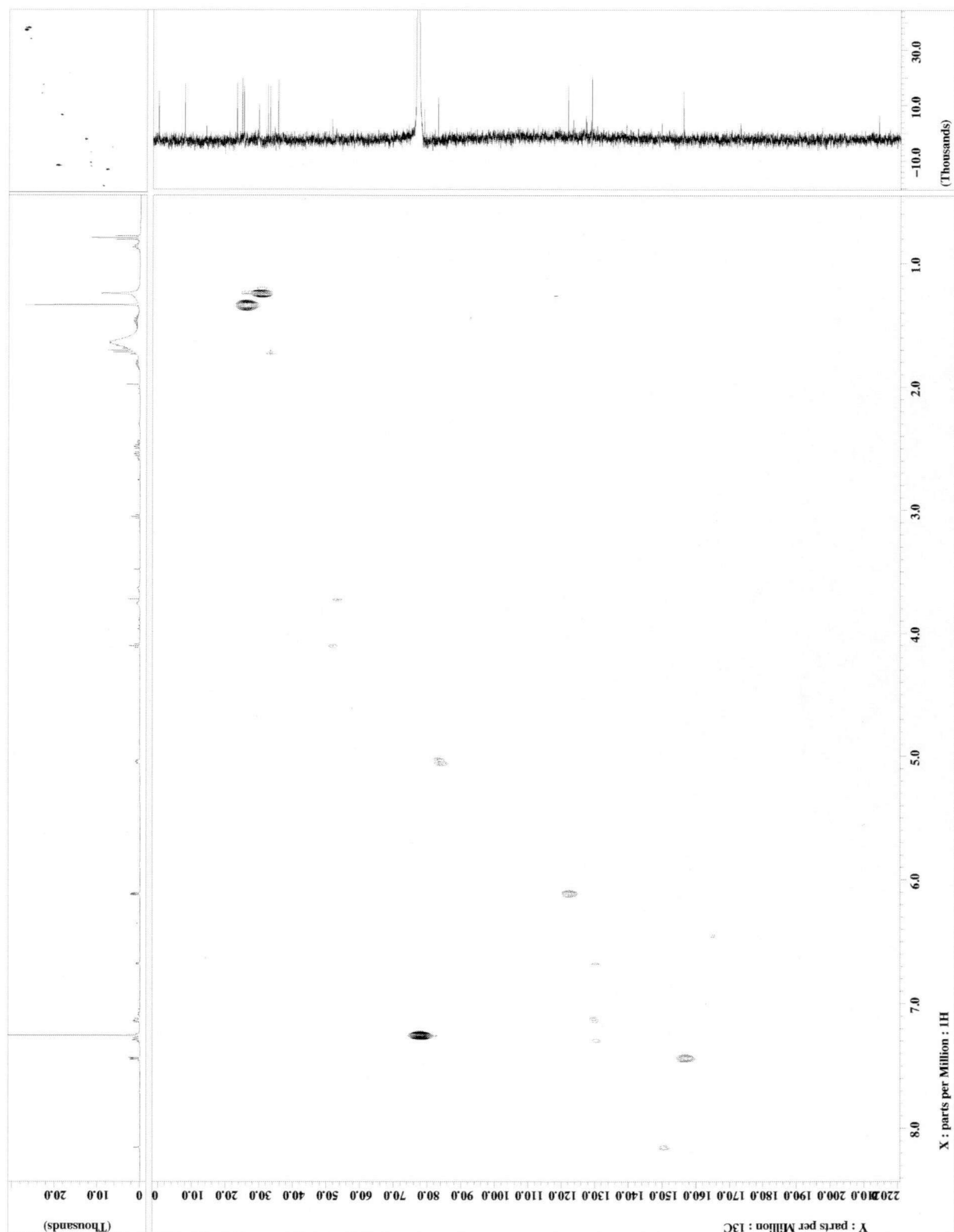


Fig. 6-4 HMBC spectrum (500 MHz, CDCl_3) of the new compound avenolide (1)

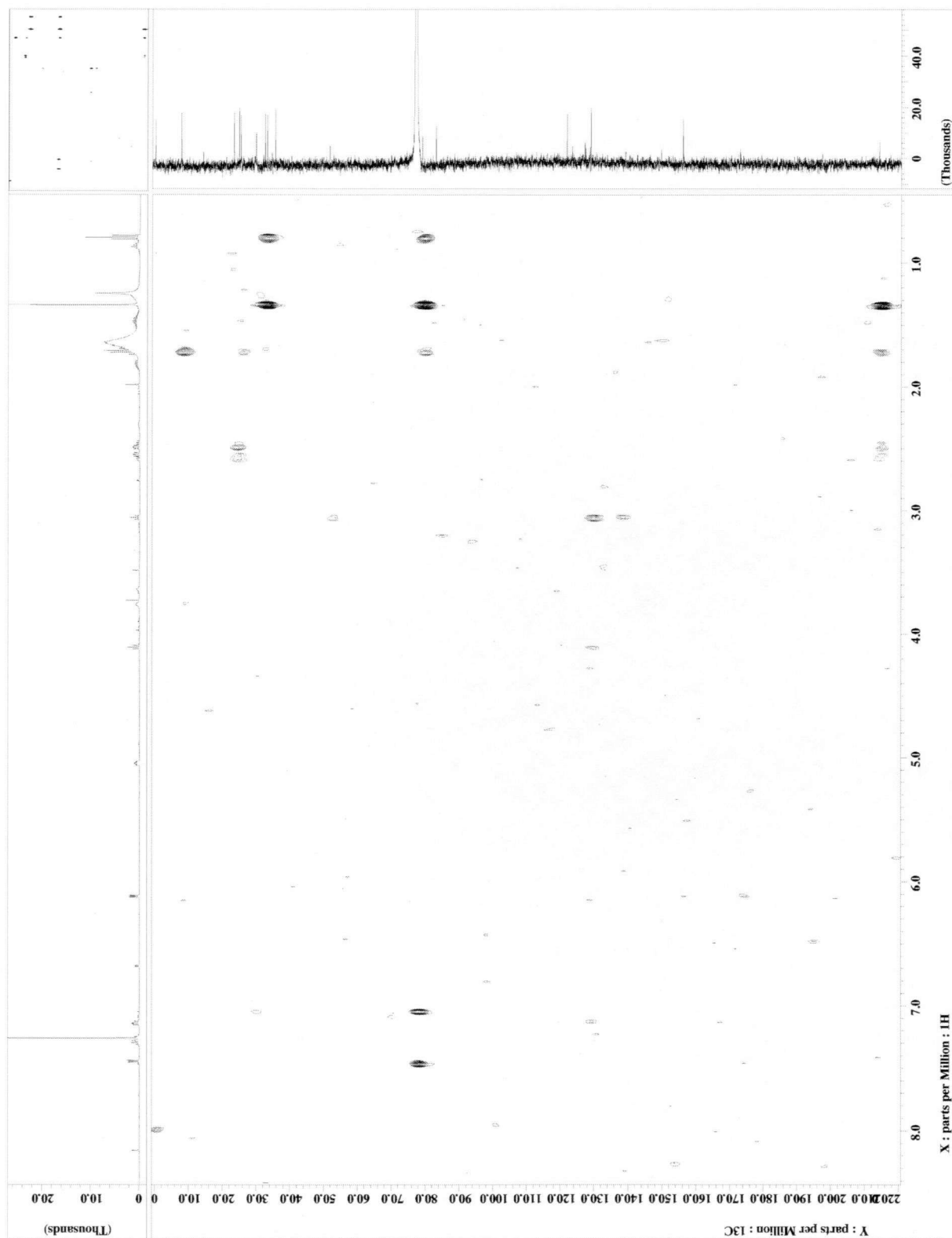


Fig. 6-5 ^1H - ^1H COSY spectrum (500 MHz, CDCl_3) of the new compound avenolide (1)

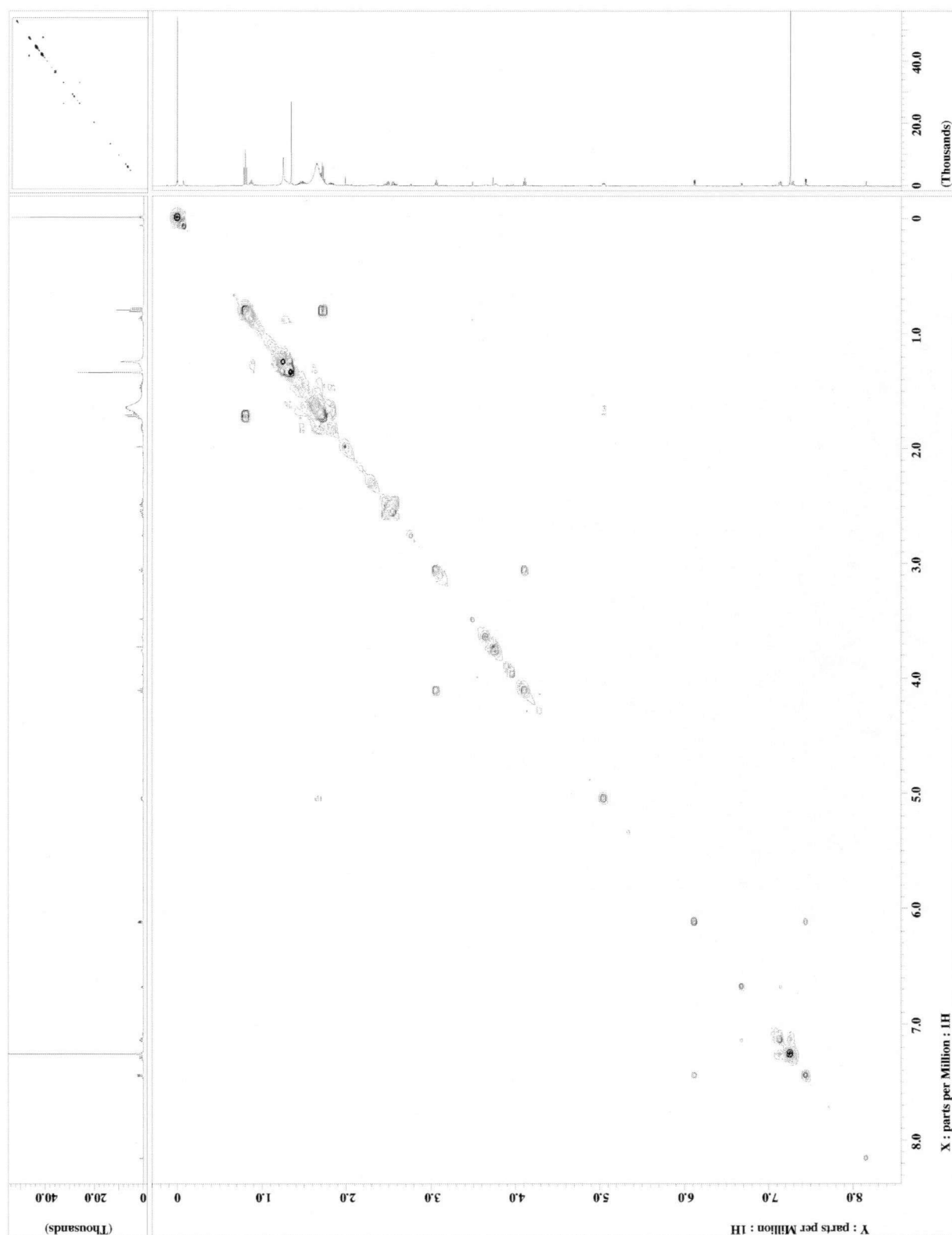


Table 6-2 NMR chemical shifts of avenolide in CDCl₃

Position	δ_{H} (mult, J in Hz)		δ_{C}
1			173.0
2	6.12	(1H, dd, 5.9, 2.1)	121.8
3	7.45	(1H, dd, 5.9, 1.4)	156.1
4	5.05	(1H, m)	83.0
5	1.83	(1H, m)	33.1
	1.72	(1H, m)	
6	1.46	(2H, m)	24.8
7	1.69	(2H, m)	23.3
8	2.57	(1H, dddd, 14.5, 8.2, 6.4, 3.2)	35.5
	2.48	(1H, dddd, 14.5, 7.8, 6.4, 3.7)	
9			212.0
10			79.0
11	1.72	(2H, q, 7.3)	32.5
12	0.80	(3H, t, 7.3)	7.8
13	1.34	(3H, s)	25.3

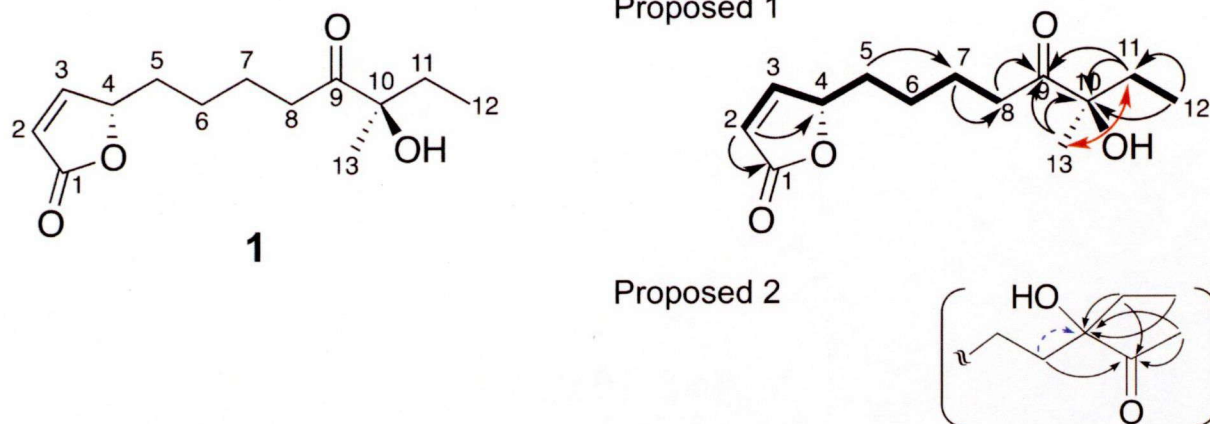


Fig. 6-6 Structures of new (compound 1) *Streptomyces* autoregulator. Left; Chemical structures of natural avenolide (1). Right; The COSY (bold lines) and HMBC (arrows) correlations of avenolide (1). Double arrow indicates cross peak in HMBC of (1). Broken arrow indicates the HMBC correlation that was not observed in the analysis.

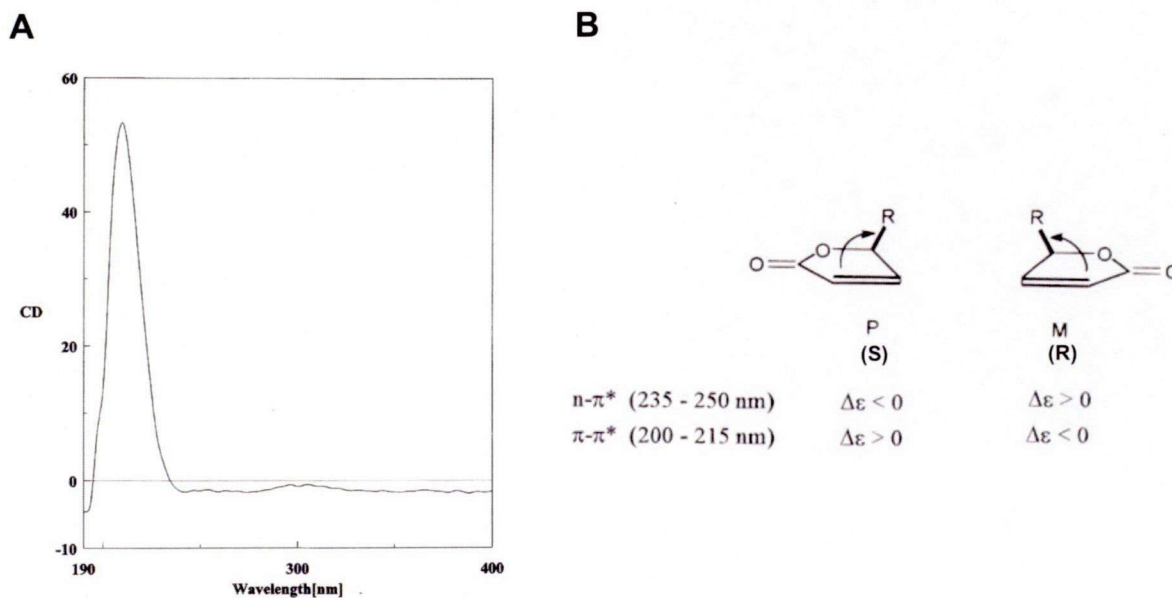


Fig. 6-7 CD spectrum of avenolide (1) (A) and correlation of the butenolide Cotton effects with absolute configuration (B).

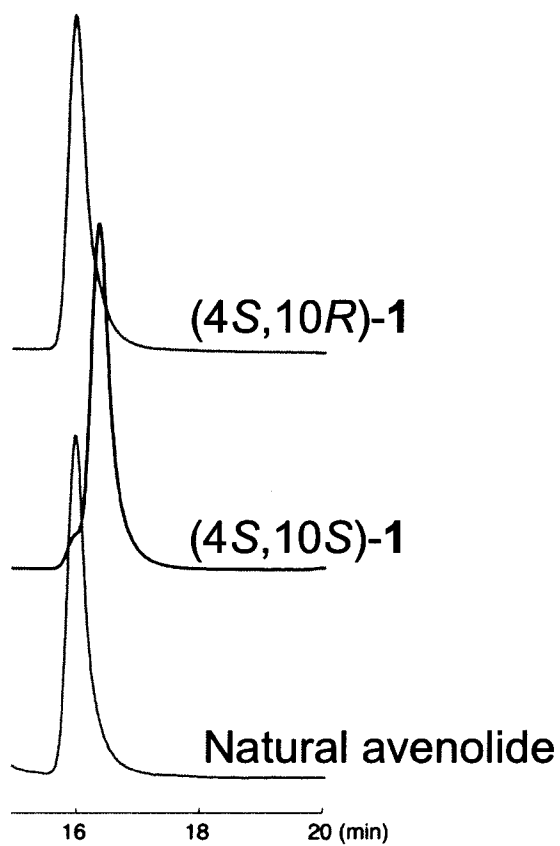


Fig. 6-8 HPLC chromatogram for assignment of the chirality of avenolide. Natural avenolide was eluted at 16.0 min, synthetic 10*R*-1 was eluted at 16.0 min, and 10*S*-1 was eluted at 16.3 min.

Appendix 3 Oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence (5'-3') ^a
For construction of mutants	
aco-up-Fw	CTCGAGAATTCTGGGCGAAGAGCATGTTCTCGTT
aco-up-Re	CTCGAGAAGCTTGAACAGGTTGTAGTGGATGCTCG
aco-dw-Fw	CTCGAGAAGCTTAACCTGGTGATCTGGGTGAAGG
aco-dw-Fw	CTCGAGAATTTCGACCACGCCGAGCGACATCTGAA
avaR3-up-Fw	CTCGAGAAGCTTATCTCAACCGCGGGTCCCGAT
avaR3-up-Re	GGACTAGTGATCGCGCGTTCCTGTCTGACC
avaR3-dw-Fw	GGACTAGTCCCGCTTCTGGACGCTGCTGCT
avaR3-dw-Re	CTCGAGAAGCTTCCCGAAAGCAGGGCTGGGCACT
avaL1-up-Fw	CTCGAGAAGCTTCGTCCACAGGATTGTGACGCAG
avaL1-up-Re	GGACTAGTGGAGACGGGTGCTCTGTCCGTT
avaL1-dw-Fw	GGACTAGTCATCTCCTGGGTGCTGAACGAC
avaL1-dw-Re	CTCGAGAAGCTTGCCTCTACGGGTTCCTGGACAA
avaL2-up-Fw	CTCGAGAAGCTTTAGCAGTCGGCGGGGTCGATGT
avaL2-up-Re	GGACTAGTACACGGTCGTAGGTACGCAGGG
avaL2-dw-Fw	GGACTAGTACGATGTGGGAGGCCCTGGCTC
avaL2-dw-Re	CTCGAGAAGCTTAAGGCGTCGATGATCTCCTCCA
vmII-up-Fw	CTCGAGAAGCTTAGGGCGTGAACCCGAAGTGCA
vmII-up-Re	GGACTAGTGATCTGGAGTGCGCCGAGAATC
vmII-dw-Fw	GGACTAGTTGGAGAACGCGATCCTCTCCCA
vmII-dw-Re	CTCGAGAAGCTTTGACGATGTAGGCGCCCCCGTA
loxP_resist_loxP_HindIII-Fw	CTCGAGAAGCTTCAGTGAGTTCGAGCGACTCGAGA
loxP_resist_loxP_HindIII-Re	CTCGAGAAGCTTCTGGTACCGAGCGAACGCGTA
loxP_resist_loxP_SpeI-Fw	CTCGAGACTAGTCAGTGAGTTCGAGCGACTCGAGA
loxP_resist_loxP_SpeI-Re	CTCGAGACTAGTCTGGTACCGAGCGAACGCGTA
m1loxP_resist_m1loxP_SpeI-Fw	CTCGAGACTAGTCAGTGAGTTCGAGCGACTCGAGT
m1loxP_resist_m1loxP_SpeI-Re	CTCGAGACTAGTCTGGTACCGAGCGAACGCGTT
For construction of complemented exconjugant	
aco-comp-Fw	CACCAATGGCTCGCTCCTGCCG

aco-comp-Re	CGAACGGCACGAAGAGTGAGC
avaR3-comp-Fw	CACCCGGACCTGACGTCCGTTTCAG
avaR3-comp-Re	TTCTGGCGGGTACTGCTGCCGC
avaL1-comp-Fw	CACCGGCTGGAGGAAACTGAGCACTT
avaL1-comp-Re	AGAGGCGGCCTTCCTCGACTGA

For RT-PCR analysis

i) Control gene

rpoD-Fw	ACTCGCTGTCACCGTCCTCAC
rpoD-Re	CGCGCCAAGAACCACCTCCT

ii) Avermectin biosynthetic genes

aveA1-Fw	CCGTTACCGCCGAGGCTTCTGTC
aveA1-Re	CGCCTGACAGGCCAGATGCAAAG
aveA4-Fw	CAAGCGCGTTACTGCCGATCTC
aveA4-Re	CGCGTAGTCCTGGGACATGAGG
aveBI-Fw	CGCTTCTCCACGATGCAGTCGG
aveBI-Re	GCGTGCAGTGCCTCCATCACAC
aveBIII-Fw	CGAACGGTACGGAGTCGGAGAG
aveBIII-Re	GCTTCCGCCGCAATACTCATCA
aveBIV-Fw	GAGCATGCTGACGACTGGGATG
aveBIV-Re	CGTTCGGCGTCGAGTTTCTGAC
aveBVIII-Fw	ACAGCAGTGCTCCCCTCCACAC
aveBVIII-Re	CCTGCGTGATGAGCAGGTCCAT
aveD-Fw	ACCGGGTCGTGTTACCCGTGC
aveD-Re	CATAGCCGATGTCCGGCGTCCA
aveG-Fw	CGCCTACTTCCACGGTGTTTCC
aveG-Re	CCGGTTGGTAGCGGTACGTCTC
aveR-Fw	TGCTCGAAGAGCACAGCGAGGC
aveR-Re	CCGGTCAATTCTCCTTCCCGCA

iii) Filipin biosynthetic genes

pteA1-Fw	TTCTCCTCGATGACCGGTGTCT
----------	------------------------

pteA1-Re	GTGTTGAGCCTGTGACGCAGTT
pteB-Fw	TCATCGGGATGCGGCAGCGCCA
pteB-Re	ATCGAAGTCGCGACGGTTGACG
pteD-Fw	CTTGGACGACATGCTGGCGAAA
pteD-Re	CCGCAGCAGTTCTTCCACCACT
pteF-Fw	ATTTGCCCCAAGTTTCCTGACG
pteF-Re	ACACCCTGCCGACTGAGGTAGA
pteG-Fw	TCAAGACGATCCGTCAGCAGAA
pteG-Re	CCTTGTTGATGCGGTCGAAGAG
pteR-Fw	CACAGGGAGGTTGGAACAGGAC
pteR-Re	CCGAGTGAGGCTCAACAACCTCA
iv) <i>avaR</i> and its neighbor genes	
avaR1-Fw	GGCCCTCTACTTCCACTTCAC
avaR1-Re	CGCCGACTCCCGCTGCTTCAT
avaR1-3'-Fw	GGACTAGTAAGCCGCCATGAAGCAGCGGA
cyp17-Fw	CGGCAGAAGTACGTGAAGCAAC
cyp17-Re	GTGCACAGAGGTTACGGTTC
cyp17-5'-Re	CACGTACTTCTGCCGTACGACG
cyp17-3'-Fw	CTCGAGAAGCTTTCCTTCATCGTCAACGGGTACGG
avaR2-Fw	AGGGCTACACACAGGCGAGGCT
avaR2-Re	AGCGACTGGCCGGAGAGCCACT
avaR3-Fw	TTCCATTTCCCCAGCAAGGCCG
avaR3-Re	CCCACTCCTGCCATCTGCGGTA
avaR3-5'-Re	GGACTAGTGATCGCGGTTCTGTCTGACC
v) <i>AvaL1</i> -regulon	
sav2264-Fw	CGACAACACGATCGTCAGCACA
sav2264-Re	ACCACACCAGGGTGACCAGACC
sav2265-Fw	GTGACGGAGCGGACGGAAGCGG
sav2265-Re	TCCAGAGTGATGTCCGGCAGCG
avaC-Fw	GCCCTGAATTCTCCGCCACTA
avaC-Re	CGAGGAGTTCGCGTGCCAGGAC

avaB-Fw	TGGACGAAAGCGTGAACGATAC
avaB-Re	GTGCTGTGCCAGGAGTCACGTA
avaL2-Fw	CCCTGCGTACCTACGACCGTGT
avaL2-Re	CGGTGTCGGTCTCCGTCCAGAA
avaA-Fw	GGGAGAGCAAAATCGTTTCCCC
avaA-Re	GCTTCGAGATCACGGATCCGAC
avaL1-Fw	CAACGGACAGAGCACCCGTCTC
avaL1-Re	CACGATGTCCTCGCGGTTCGTT
avaL1-5'UTR-Fw	ACTCCCCACGGTGGCAGGAAGG
avaL1-5'UTR -Re	ATGGTACCGGAGACGGGTGCTCTGTCCGTT
vmlK-Fw	AGGCGTCCTTGTACACGCTGTT
vmlK-Re	TTCTCCTGGACCATCTCGGAGT
vmlJ-Fw	ACTCGGGCTACAAGATGCTGTG
vmlJ-Re	GTCCGATGCCGTGCTGGTACTC
fabH7-Fw	GACGGAAGGGCTTCGCCCCGTG
fabH7-Re	GCGGAGAGGCTGAATCCCGCT
pks3-1-Fw	ACTCCGGGGACCTCTCGGACCT
pks3-1-Re	GTCCACCCACACCTGCGTGTCC
vmlH-Fw	CGTCTCCATGCACCACTTCACC
vmlH-Re	AGCATCTCGAACCAGACGAACC
fabF-Fw	ATGATCACTCCGCTGGTCATGG
fabF-Re	CAGATGTCCGGTGACTCCCTTC
vmlC-Fw	AGATGGGCGACCTGTTCTTCGT
vmlC-Re	GAGCCGGTGAGCATGTCTGAAGT
sav2297-Fw	CTACTCGGGCTTCTCCCTGCTC
sav2297-Re	CGCAGAAGATCCACAGCATCAC
fadS2-Fw	TCGATCCCCGCTACTACATAGG
fadS2-Re	TGAACACGAGCGTCAGATAGAC
vmlA-Fw	TCATGCAACTGCGCAACAAGAT
vmlA-Re	TGTACGAAAGCTGGGTCTGTGC
vmlI-Fw	GTGAACGAGGGCCAGTCCATCT
vmlI-Re	ATCAGCTGCTCGCAGAAGCGTT
mmdA1-Fw	CTGGGCCACCAACATCATCTGC

mmdA1-Re	CTCCGCCTTGACGCCTTGACC
sav2304-Fw	ACCACCCCTGCATACGCATCG
sav2304-Re	TCACGGTGCCTGCCAGCTGTGC
sav2305-Fw	AGGACCGAGCGCATCAACCCGC
sav2305-Re	GGTAGTCGCGGCCCGCCAACTC
fadE10-Fw	TGACCGCATTCTCGCTCGATCC
fadE10-Re	GATGCGGCGAGAGCATGTGAG
xylA-Fw	ACCTGATCCCCCTTCGGGTCCCTC
xylA-Re	CCATCTGCTCGTGACCCACCTC
sav7183-Fw	ACGGCTCGACCGACAAGAAGTC
sav7183-Re	ACTTGCGGTCCCCACCACCGAC
pks4-Fw	ACGTGTGCTGGTTCTGGCAGTC
pks4-Re	GGGCTGCTCAGGGGAGTCGAAG
cyp26-Fw	GGTCGATTTCCATTTCGGTGTTTC
cyp26-Re	CAACGTTATCCTGGGCTATGGA
sav7187-Fw	CTCCCTCGTCACTCCGCAGGTA
sav7187-Re	GGCGAACAGTCCGACGGAGAAC
iolG2-Fw	ATGCGTATCGGCATCATGGGTC
iolG2-Re	ACCCAGCGGATGATGTCGAAGT

vi) Biosynthetic genes for secondary metabolism

tpc1-Fw	TCTGGGTTTGGTCGGCGACGGA
tpc1-Re	ATGATCCGCAGCTGCGGGCTGT
pks11-2-Fw	CCGGCTCGACACCCAGTCCTAC
pks11-2-Re	GCTATGGGCAGGGCCTCGCTCT
nrps6-Fw	CGTCAACATCATGCCCTTCGAG
nrps6-Re	CCGAAGAGTCGGGCATACGTGA
nrps7-1-Fw	GACGAGGTGTATCCCGCACAGC
nrps7-1-Re	CGAGGTTCGGTCTCCATCAGCTC
crtE-Fw	ACCCGGTCCCAGTTCGTGTGGT
crtE-Re	GGAGTACAGCGCGCTCTTGAGG
melC2-Fw	GTCACGACCCACAACGCCTTCA
melC2-Re	ACGCGGTTGTGCAGGTTACAC

nrps8-Fw	TCTGCGCCTATCTCGGTCAGGT
nrps8-Re	GCAGATCCAGGAACGGGTAGCA
pks2-1-Fw	GACCAGCCGTACCTGTGGTTCT
pks2-1-Re	GATCTGGTCGCGCACATAGCTG
hopA-Fw	ACTGTTTCATCAGGGGCGAGCAG
hopA-Re	AATCCGTCCCAACTCACCATCG
geoA-Fw	CCGACTTCCATATGCCGTTCCA
geoA-Re	CAGCTCTCGGTCATCACGTCCA
pks5-Fw	GCCGCACTCATGAGTCAGGTCC
pks5-Re	TCTGCCGTCTCATCCCCTTCGA
pks9-3-Fw	GAGTAGGGCAGTCCCGGAGAAC
pks9-3-Re	GAACGAGAGATAGGCGCTCACA
sppA-Fw	GCGCACGTGTGTACTGCGAGAT
sppA-Re	ACGGACAACACGTTGCGGAGTT
olmA1-Fw	CCTTCCCATGGACGGGTCTCTAC
olmA1-Re	CGTGACGTCCAGCGGTATCCAG
ptlA-Fw	TACGACTCGGCCGGTCACTACC
ptlA-Re	CCCGTCCATCCGGTACTTCTCC
tpc2-Fw	TTCTTCGGCAAGAAGTGGAACG
tpc2-Re	CGCAATGCATTCTCCACTCGT
nrps3-1-Fw	GACAAGCGGCTGGTGGGCTATG
nrps3-1-Re	TCTTGAAGACCTGGCGGACCTT
nrps1-1-Fw	CCGCACTGGAGCACCAGGACTT
nrps1-1-Re	TTCGGCGTAGGTGAGCCGGAAG
nrps2-1-Fw	GTTCCAGGTCGCGTTCACGATG
nrps2-1-Re	ACGTCAGATCCGTCCCCTCGAA
pks8-1-Fw	CGATGTGCTCGACCTGGATG
pks8-1-Re	GAGCTTGCTCGTCAGCAGTT
hpd-Fw	CTTCCCGGTGAAGGGAATGGAC
hpd-Re	GGAGGTAGGGGCCGTCTAGCC
sidA-Fw	CACTACGTCAAGACGGCTCTGT
sidA-Re	GGTCGTACGCGTAGAAGCTGTG
melC2-2-Fw	AGTTTCGTGCGCATGCACATCAA

melC2-2-Re	CCGGTTGTGGTTGCGCCACGAA
ectA-Fw	ACACGCAGACCTGCAAGCGGAA
ectA-Re	GTGGGAGAGGGGGCCGATGCGG
nrps5-Fw	GTGCCAAGGCCCTTCAGCTTCT
nrps5-Re	CCGACAGATCCACCTCGGACTC
rppA-Fw	GATGGACTTCAGCTCCGACACC
rppA-Re	CCCGCGTGGATGATGTAGAAGT
nrps4-Fw	TGCGGAACGCTGCAGTTCATTA
nrps4-Re	GTGACGTGGCCGGTCTGGATAC
pks1-3-Fw	CTCTCCGACAACGATGCCTTTC
pks1-3-Re	AGGAAACCGTCCTGACCGATCT

For expression of recombinant protein

rAvaR1-Fw	CATGCCATGGCGCGTCAGGAACGAGCCATTTCGG
rAvaR1-Re	CGCGGATCCGGACAGTCACTCCAACGTCCGTGC
avaL1-N	GATTGCACATATGGACGTCATGAGTAGCGAGC
avaL1-C	GCTCGAGGTGCAGTGGCACGAAGGCGTCGAT

For construction of probe for gel-shift assay

aco-gel-Fw	AAGGATCCAGAAGGGCTGAGGAAGGGCT
aco-gel-Re	AAGGATCCCGCCCTCTCACAACCACTC
avaL2ARE1	CGATGATTAGAATTCGTTACGAACGTATCTTTTATGCTT
avaL2ARE2	AAGCATAAAAGATACGTTTCGTGAACGAATTCTAATCATCG
vmIIARE1	TCAACAGAAAAATACCTTCTCAAAGGAATTATTCTGTGCG
vmIIARE2	CGCACAGAATAATTCCTTTGAGAAGGTATTTTCTGTTGA
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
RV	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC

For 5'-RACE

avaR1-GSP1	GTTGCCGCTCGTATCCACCT
avaR1-GSP2	ATGGTACCAATCGTCTGCCGCGTCCGAAT
avaR2-GSP1	GATGTCGGCCAGCCTCGCCTGT
avaR2-GSP2	TAGGATCCCGGCGCGTTTCTGTTTCGTC

avaR3-GSP1	GTCGACAGCGAGACCACTTCGT
avaR3-GSP2	ATGGTACCACTCGATCAAGGCGTTGCGC
avaL2-GSP1	TAGGATCCGCCCCGTAGAGCGCTCCCTTCGT
avaL2-GSP2	TAGGATCCCGTG TAGCCGTATCGGGCGAAC
vmlI-GSP1	GGGTCTGGATCAGGGTCCGCTG
vmlI-GSP2	ATGGTACCGGATCTGGAGTGCGCCGAGAAT

For qRT-PCR

avaR1-Real-Fw	ATCCGATCGTCCAGGGCAGTG
avaR1-Real-Re	TCGAAGAGGGACTGCGTGTGC
avaR2-Real-Fw	GCCTTCGAACGGCAGGGCTAC
avaR2-Real-Re	GCCACCTCTGCCTTGCTCTCG
avaR3-Real-Fw	ACCCCATCAGCAACGGAGCG
avaR3-Real-Re	GATCGCGCGTTCCTGTCTGAC
rpoD-Real-Fw	GCGCGGATCAGACCGAGGTT
rpoD-Real-Re	CGCGCCAAGAACCACCTCCT

^a Restriction sites are underlined.

