T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	アミノ配糖体抗生物質の生合成における2-デオキシ-scyllo-イノソース合成酵素に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	工藤史貴
Author(English)	Fumitaka Kudo
出典(和文)	学位:博士（理学）, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第3970号, 授与年月日:1999年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor of Science, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第3970号, Conferred date:1999/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

アミノ配糖体抗生物質の生合成における 2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素に関する研究

工藤史貴

1999

東京工業大学大学院
理工学研究科化学専攻

目次

略語表 ...iv

第１章　序論 ...1

第２章　2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素反応機構 ...16

２-１　序 ...16
２-２　実験方法 ...16
　２-２.１　使用した菌株 ...17
　２-２.２　培養条件 ...17
　２-２.３　抗菌活性試験 ...18
　２-２.４　標識基質の調製 ...18
　２-２.５　DOI合成酵素活性試験法 ...18
　　２-２.5.1　HPLC法 ...18
　　２-２.5.2　GC-MS法 ...19
　２-２.６　DOI合成酵素の部分精製 ...19
　２-２.７　タンパク質濃度測定および電気泳動 ...20
２-３　実験結果と考察 ...21
　２-３.１　DOI合成酵素活性の検出 ...21
　２-３.２　部分精製酵素の調製 ...26
　２-３.３　クロスオーバー実験 ...30
　２-３.４　デオキシ基質を用いた酵素反応解析 ...35
２-４　結論 ...36

第３章　2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素の精製 ...38

３-１　序 ...38
３-２　実験方法 ...38
　３.２.１　使用した菌株 ...38
　３.２.２　培養条件 ...39
　３.２.３　DOI合成酵素活性試験 ...39
　３.２.４　DOI合成酵素の精製 ...40
　３.２.５　電気泳動 ...41

3.2.6　分子量の見積もり　...41
3.2.7　精製DOI合成酵素のクロマトグラフィー分析　...41
3.2.8　DOI合成酵素の生化学的性質　...41
3-3　実験結果　...43
3-3.1　培養条件検討　...43
3-3.2　DOI合成酵素の精製　...44
3-3.3　DOI合成酵素の生化学的性質　...50
3-4　考察　...53
3-4.1　培養条件について　...53
3-4.2　DOI合成酵素精製について　...53
3-4.3　DOI合成酵素の構造について　...54
3-4.4　DOI合成酵素の生化学的性質について　...55
3-4　結論　...56

第4章　2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素遺伝子の探索　...57

4-1　序　...57
4-2　実験方法　...58
4-2.1　使用した菌株と培養条件　...59
4-2.2　アミノ酸配列　...59
4-2.2.1　N末端アミノ酸配列　...59
4-2.2.2　内部アミノ酸配列　...60
4-2.2.3　Nano-LC/ESI IT-MS/MS分析　...60
4-2.3　DNAの取り扱い　...60
4-2.3.1　*B. circulans*の染色体DNAの調製　...60
4-2.3.2　プラスミドの調製　...61
4-2.3.3　形質転換　...61
4-2.4　DOI合成酵素遺伝子の探索　...62
4-2.4.1　サザンハイブリダイゼーション　...62
4-2.4.2　コロニーハイブリダイゼーション　...63
4-2.5　DNA塩基配列分析　...63
4-2.6　23 kDaサブユニット遺伝子取得の試み　...64
4-2.7　BtrCの大量発現　...65
4-2.8　BtrCのDOI合成酵素活性の確認　...65
4-2.9　DOI合成酵素活性試験　...66

4-2.10 BtrCの精製 ...66
4-2.11 分子量の見積もり ...67
4-2.12 生化学的性質 ...67
4-2.13 BtrCの利用 ...67
4-2.14 塩基配列の登録番号 ...68
4-3 実験結果 ...68
4-3.1 精製酵素のアミノ酸配列 ...68
4-3.2 DOI合成酵素遺伝子の探索 ...69
4-3.3 pDS1の周辺遺伝子の探索 ...72
4-3.4 23 kDaサブユニットタンパク質をコードする遺伝子探索 ...75
4-3.5 *B. circulans*由来DOI合成酵素のnano-LC/ESI IT-MS/MS分析（BtrC推定アミノ酸配列との比較） ...76
4-3.6 BtrCの大量発現 ...78
4-3.7 BtrCの精製 ...79
4-3.8 BtrCの生化学的性質 ...83
4-3.9 BtrCの利用 ...87
4-4 考察 ...89
4-4.1 BtrCの一次構造について ...89
4-4.2 btr遺伝子クラスターについて ...95
4-4.3 BtrCの性質について ...96
4-4.4 BtrCの利用について ...97
4-5 結論 ...98

第5章 結語および今後の展望 ...99

参考文献 ..103

謝辞 ..111

付録：アミノ酸配列およびDNA塩基配列 ..112

略語表

DHAP, 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonate 7-phosphate
DHQ, dehydroquinate
DOI, 2-deoxy-*scyllo*-inososе
DOS, 2-deoxystreptamine
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid
G-6-P, glucose-6-phosphate
HPLC, high performance liquid chromatography
NAD^+, nicotinamide adenine dinucleotide
NB, nutrient broth
NMR, nuclear magnetic resonance
OD, optical density
PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis
PCR, polymerase chain reaction
pTLC, preparative thin layer chromatography
SBM, soy been meal
SDS, sodium dodecyl sulfate
Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane

第１章　序論

微生物や植物が生産する二次代謝産物には、特徴的な生理活性を有するものが多く存在し、各種病原菌や細菌感染症に対する薬剤として使用されているものがある。現在までに多数の生理活性化合物が単離構造決定され、多種多様な構造を有することが明らかにされてきた。また、有用ではあるが微量成分であることや、その構造の複雑さゆえに合成化学的にも興味深いため合成研究も盛んに行われている。一方で、その複雑な構造を有する化合物が生体内でどのように生産されているのかということも大変興味深く、生合成研究も古くから研究されてきた。

生合成研究法には、酢酸、グルコース、アミノ酸などの標識化合物の取り込み実験により、構造のどの部分が何に由来するかという前駆体と生成物の関係を解明することがまず挙げられる。たとえばペニシリンのバリン部分はD型であるが、生合成ではL-バリンが効率良く取り込まれることが知られている（Fig. 1）[1]。

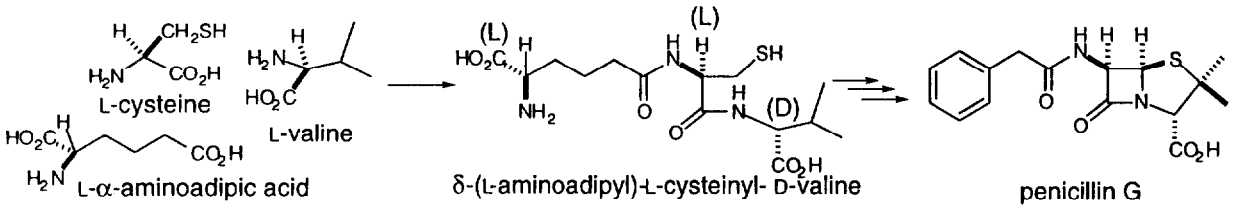


Fig. 1

また、生合成遮断変異株を用いて、遮断された段階の反応解析による生合成逐次過程も研究方法の一つである。たとえば、除草剤として使用されているビアラホスの生合成研究では多くの中間生成物とその中間生成物に対応した変異体が分離され、ホスホエノールピルビン酸から少なくとも13段階の生合成過程があることが示されている（Fig. 2）[2]。

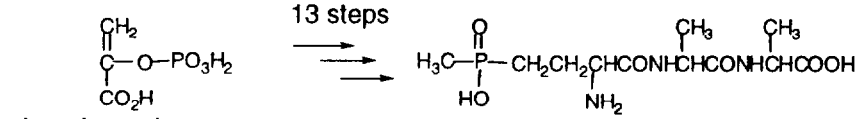


Fig. 2

また、生合成に関与する酵素系の研究は生体反応を単に推理することだけでなく、より実証的に、化学的に理解する上で非常に重要な意義があり、現在ではさかんに行われている。たとえば、毒性のために局所的に適用されるのみであるが、グラム陽性菌に作用するグラミシジンSの生合成については古くから研究がなされており、リボソームが関与しないノンリボソーマルペプチド合成酵素と呼ばれる複合酵素系で行われていることが明らかにされ、酵素も同定されている（Fig. 3）[3]。

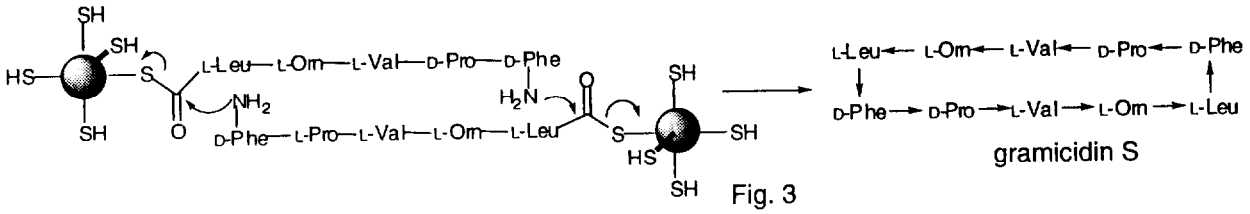
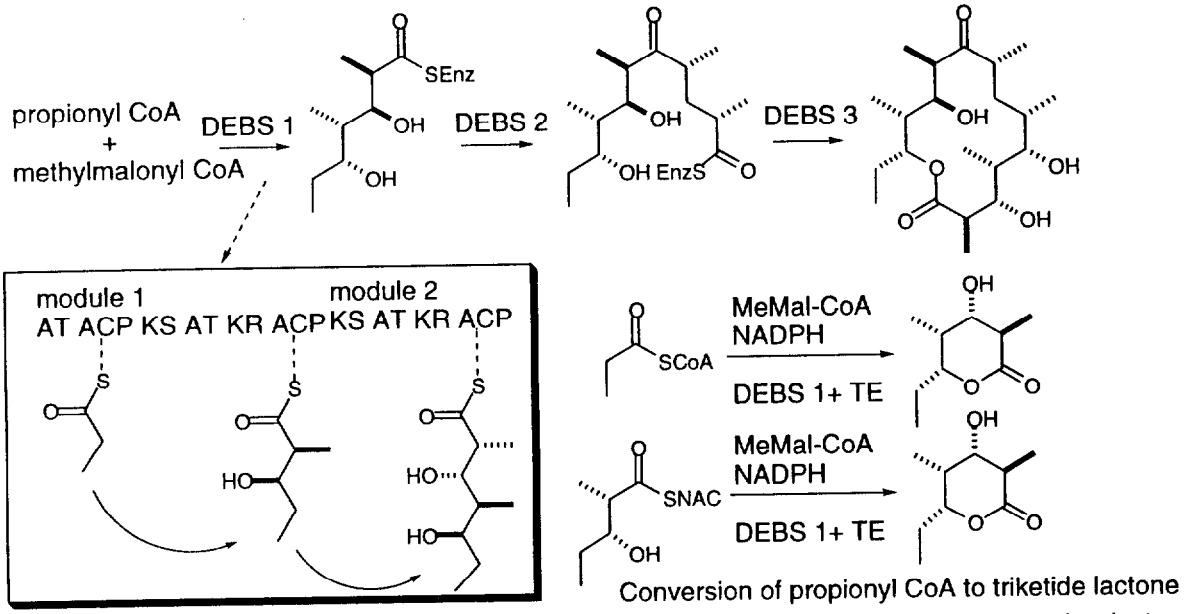


Fig. 3

微生物や植物の二次代謝産物の生合成を触媒する酵素は1）活性が低いものが多い、2）全体のタンパク質に対し微量しか存在しない、3）不安定なものが多いという理由から、それ自体を純粋に得ることが困難であった。しかし最近の遺伝子操作法の進歩により様々な天然物生合成酵素遺伝子のクローニングが可能になり、組み換え酵素を大量に入手できるようになってきた。さらに、その酵素の化学修飾、変異導入やいくつかの酵素の組み合わせにより有用天然物の生産性の向上がはかられ、また新規な非天然化合物まで生産されるようになってきている。現在、環状ペプチド、ポリケチド、イソプレノイド類の生合成研究が、その生合成遺伝子を取得して酵素化学的に盛んに行われている。例えばポリケチド系抗生物質であるエリスロマイシンの生合成研究では、耐性を司る遺伝子の近傍の配列を解析し、炭素骨格である6-デオキシエリスロノリドB合成酵素（DEBSs）の存在が示された。このpolyketide synthase（PKS）はFig. 4に示されるような遺伝子群がモジュールとして連なっている構造を持っており、DEBS1からDEBS3の3つの多機能型酵素をコードしていることが示されている[4]。Khosla、Caneらにより、DEBS 1 + TE（thioesterase）で無細胞系におけるトリケチドラクトンの合成も報告されている[5]。



DEBS: 6-deoxyerythronolide Bsynthase
AT: acyl transferase
ACP: acyl carrier protein
KS: β-ketoacyl carrier protein synthase
KR: β-ketoacyl reductase
DH: dehydratase
ER: enoyl reductase
TE: thioesterase

Fig. 4

酵素反応を化学的に解明するためには、ダイナミクスだけでなく活性部位などの酵素構造情報が重要であるが[6]、β-ラクタム生合成における鍵酵素イソペニシリンN合成酵素[7]、セファロスポリン合成酵素[8]、イソプレノイド生合成におけるいくつかの鎖伸長酵素[9]や環化酵素[10]では、X線結晶構造解析が報告され、酵素と基質、補因子との相互作用が解明されつつある（Fig. 5）。

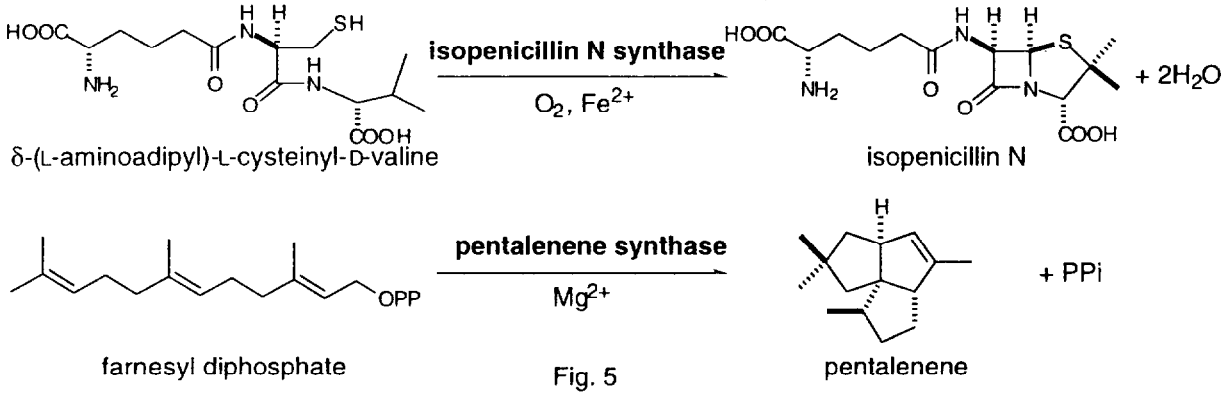


Fig. 5

臨床医学上重要な化合物として知られているアミノグリコシド抗生物質の生合成についても古くから研究が行われてきた。代表的なものとしてFig. 6に示したストレプトマイシンやカナマイシンなどがある。

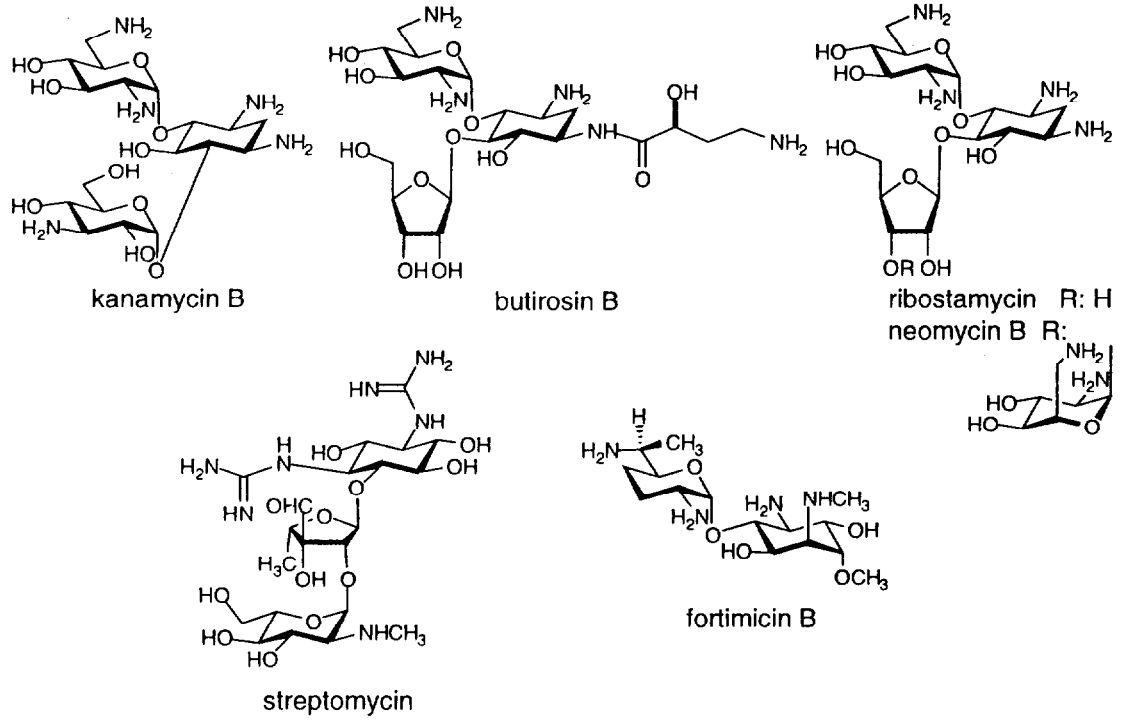


Fig. 6 Aminoglycoside antibiotics

これらはグラム陽性菌及び陰性菌に抗菌活性を示すほかに抗酸菌に活性を示し、結核の治療に長く使われてきた。その多くはリボソームRNAへの特異的な結合によるタンパク質合成阻害を主な作用点としている。耐性菌の制御に化学修

飾の有効性が示され、また緑膿菌に対しても天然物のままおよび化学修飾をほどこすことにより活性を示す抗生物質が得られることからも重要な抗生物質群とされている。すなわち抗生物質としての活性の増強と制御、副作用の軽減や耐性の克服といった生理活性の面からも興味が持たれ、生合成研究が行われてきた[11]。

アミノグリコシド抗生物質は、化学構造を考えれば糖質（D-グルコース）が化学変換されてそれぞれの構造単位が形成されるであろうことは容易に想像され、この特徴的な構造を有する抗生物質の生合成は、糖質変換・糖鎖合成の一モデルとして捉えることができる。生合成酵素を利用した有用物質生産系としても注目すべき題材である。

この抗生物質群は特徴的なアミノサイクリトールに着目すると、大きく二つに分類することができる。炭素環上のすべての炭素にヘテロ原子の置換基が存在するものと、一つの炭素に置換基を有さない2-デオキシストレプタミン（DOS）を含むものである（Fig. 7）。

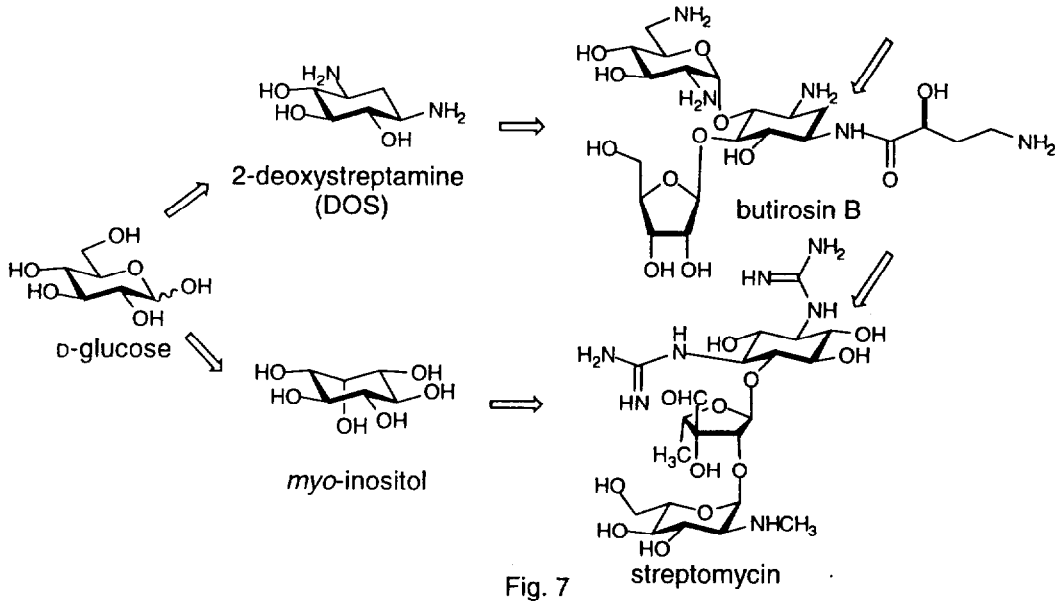


Fig. 7

前者のグループにはよく知られているストレプトマイシンやフォーチミシンなどが挙げられる。注目すべきアグリコンの生合成は[2-^{14}C]-*myo*-イノシトールの取り込み実験や、生合成遮断株を用いた研究により動物、植物、微生物に広範囲にわたって存在する*myo*-イノシトールを中間体として生合成されることが示唆されている（Fig. 8）[12,13]。この場合、炭素環形成を行う段階の酵素は*myo*-イノシトール生合成に関連する酵素であるのは明白である。この酵素はグルコース-6-リン酸を基質とし、*myo*-イノシトール-1-リン酸を与える*myo*-イノシトール-1-リン酸合成酵素（E.C 5.5.1.4）であることがChenらにより明らかにされており[14]、またByunら、Loewusらはキラル標識グルコース-6-リン酸を用いてこの炭素環形成反応が立体特異的に進行することを示した[15,16]。また、この酵素はいくつかの

生物種から酵素精製および酵素遺伝子が報告されている[17]。

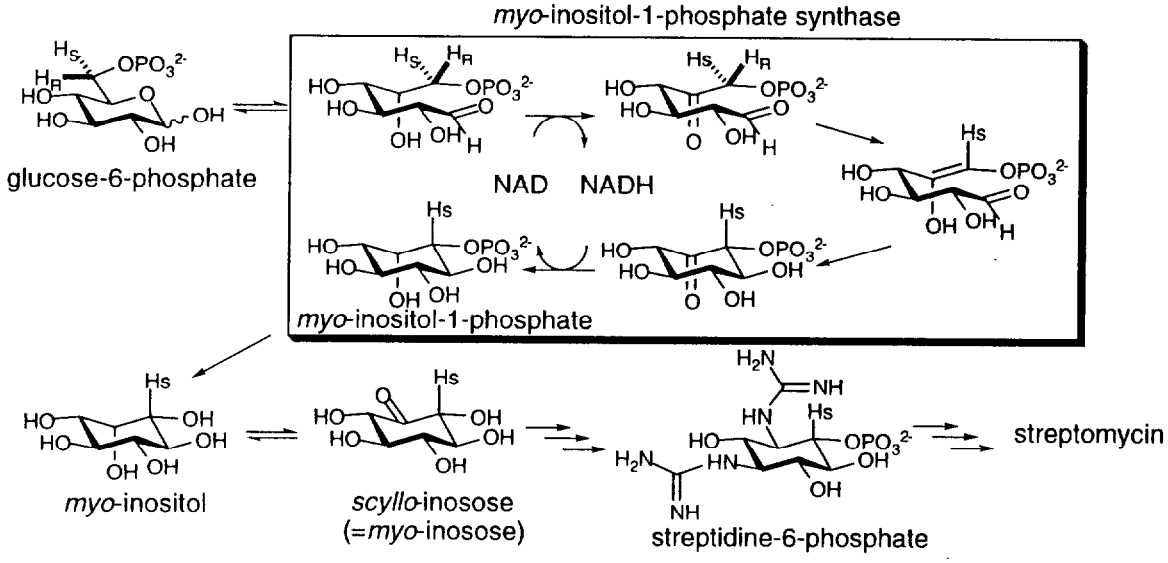


Fig. 8

ストレプトマイシン生合成についてはPiepersbergらが耐性遺伝子の近傍の遺伝子を解析することにより既に生合成遺伝子を報告し、その生合成酵素遺伝子の機能解明も進められている[18]。一方、フォーチミシン生合成についてはHasegawaらが、抗生物質生産菌の染色体DNAを部分消化後、クローニングベクターに組み込み生合成遮断変異株を形質転換し、その形質転換体の抗生物質生産能により判別する方法で遺伝子解析を報告している[19]。

一方、DOSをアグリコンとするグループは、ネオマイシン、カナマイシン、ブチロシンなど、アミノグリコシド抗生物質の大半を占める。

DOSの生合成はRinehartらにより[6-^{13}C]グルコースや[1-^{13}C]グルコサミンといった部位特異的に標識した前駆体をネオマイシン生産菌*Streptomyces fradiae*に投与した実験で、グルコース6位の炭素がDOSの2位の炭素に、グルコース（グルコサミン）1位の炭素がDOSの1位の炭素に変換されることが示され、グルコースの1位と6位の間で直接閉環することが明らかにされた（Fig. 9）[20]。

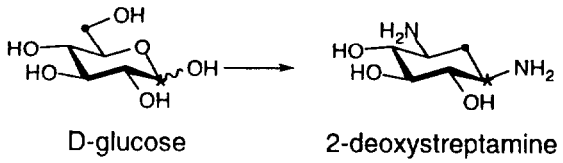


Fig. 9

DOS生合成系における生合成遮断変異株を用いた研究においては、Daumらが、ゲンタミシン生産菌の*Micromonospora purpurea*のDOS要求性遮断変異株に各種シクリトールを投与し生成物の構造を解析するという方法で2-デオキシ-*scyllo*-イノソース（DOI）が中間体となっている可能性を示した(Fig. 10の1))[21]。さらにFurumaiらはブチロシン生産菌*Bacillus circulans*の生合成遮断変異株をcosynthesis法（ある変異株の生育中に培地に拡散する中間体を異なる変異株に与えて抗生物質が生産されるかを判断し、これをもとに変異株を生合成過程の順に位置づける方法）により分類し、DOIが中間体となる段階に相当する変異株が存在することを示した(Fig. 10の2))[22]。Kaseらはサガミシン生産菌*Micromonospora sagamiensis*のDOS要求性遮断変異株のある一種に2-デオキシ-*scyllo*-イノサミンが蓄積すること、DOIが中間体となる段階に相当する遮断変異株に2-デオキシ-*scyllo*-イノサミンを与えるとサガミシンが生産されることを報告している(Fig. 10の3))[23]。Kondoらは同様に、*B. circulans*の遮断変異株の一つより、2-デオキシ-*scyllo*-イノサミンを単離し構造を決定した[24]。これらの研究から2-デオキシ-*scyllo*-イノサミンとDOIがDOS生合成中間体であることが明らかとなった。

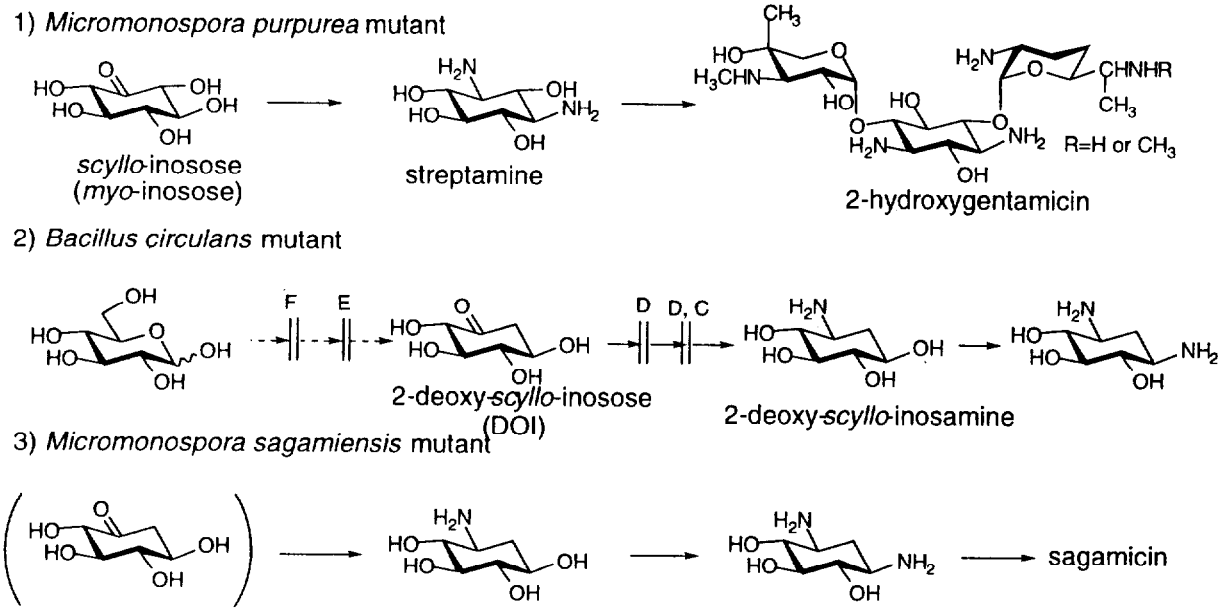


Fig. 10

DOIのアミノ基転移に関する研究は、Suzukakeら、Walkerらにより検討されており、グルタミンをアミノ供与体とするアミノ基転移酵素の存在が示唆されている（Fig.11）[25,26]。

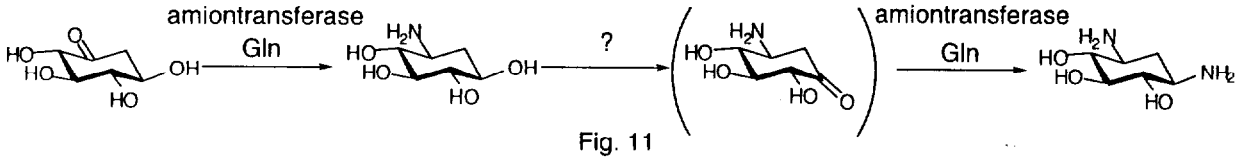


Fig. 11

DOS生合成過程において特徴的な炭素環の生成がグルコースの1位と6位の間で閉環によることが明らかにされた後、Kakinumaらはその炭素環形成の反応様式、立体化学に着目した。そしてリボスタマイシン生産菌*S. ribosidificus*に[6,6-$^2H_2$]グルコース、(6*R*)-[6-$^2H_1$]グルコース、(6*S*)-[6-$^2H_1$]グルコースを投与し、6位の水素が両方とも、かつ立体特異的に生成物に保持されていることを観測した（Fig. 12）[27]。

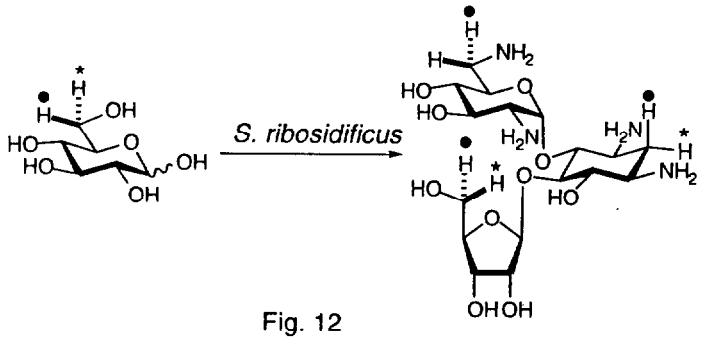


Fig. 12

すなわち、この炭素環形成反応が立体特異的に進行することが示された。また6位の水素が両方とも保持されていることから*myo*-イノシトールもしくは*myo*-イノソース類似の中間体を通る経路でなく、芳香族アミノ酸生合成におけるシキミ酸経路中のデヒドロキナ酸（DHQ）合成酵素反応と類似した機構を提案した（Fig.13）。グルコースまたはグルコース-6-リン酸の4位が酸化され、5位水素を含むかたちで脱水もしくは脱リン酸化反応が進行しエノール（エノラート）中間体を形成して、その後適当な段階で4位の還元とアルドール型反応が起こり炭素環が形成されDOIを与えるというものである。

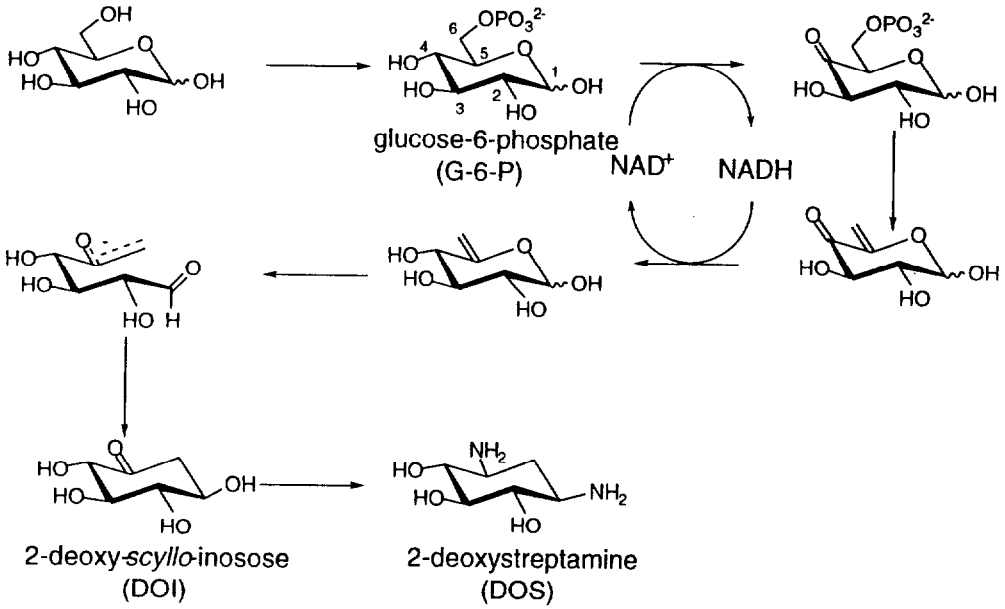
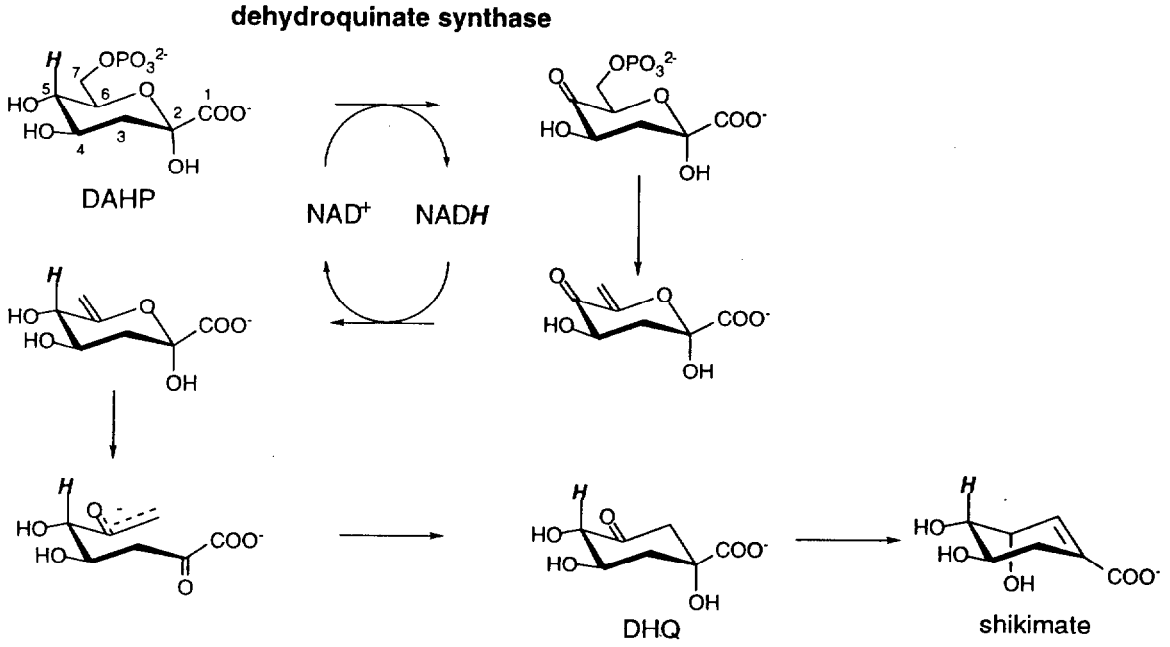


Fig. 13 Proposed mechanism of 2-deoxy-*scyllo*-inosose synthase reaction

炭素環形成の反応様式に関する研究として、Akhtarらはネオマイシン生産菌*S. fradiae*を用いてD-[U-^{14}C, 3,4-^{3}H]およびD-[U-^{14}C, 3-^{3}H]グルコースの取り込み実験を行い、基質4位の水素が失われることを観測している[28]。すなわち、4位で酸化反応が起きていることを示唆しておりFig. 13の機構を一部支持する結果と考えられる。

さらにYamauchiらは、この反応機構における基質グルコース（グルコース-6-リン酸）の4位水素の挙動に着目した。DHQ合成酵素反応は基質3-デオキシ-D-*arabino*-ヘプツロソン酸 7-リン酸（DAHP）の5位がNAD^+により酸化され、脱リン酸化、アルドール型反応が進行し、その間5位はNADHで還元されるというものである（Fig. 14）。この反応機構においては、5位における反応の一次の同位体効果k_H/k_T=1.7および5位の水素がDHQに保持されることが観測されており、5位の酸化還元反応におけるNAD^+分子とNADH分子は同一であることが示されている[29]。



DAHP: 3-deoxy-D-*arabino* -heptulosonate 7-phosphate
DHQ: 3-dehydroquinate

Fig. 14

一方、DOI生合成系においてはAkhtarらの実験結果を考えるとDAHPの5位に相当する4位水素は保持されず、補酵素の挙動が異なると考えられた。そこで、Yamauchiらはこの基質4位水素の挙動の追跡はKakinumaらにより提案されている反応機構を検証する上で重要な問題と考え、4位標識基質を用いて反応を詳細に解析している。まず、ネオマイシン生産菌*S. fradiae*の菌体から調製した無細胞抽出液を用いて反応を検討し、NAD^+を加えたときにグルコース-6-リン酸（G-6-P）からDOIへの変換活性を初めて確認した[30]。さらに部分精製酵素溶液を調製し、基質としてD-[4-^{2}H]G-6-Pおよび、反応に関与しないと考えられる3位に酸素標識を導入した二重標識体D-[4-^{2}H,3-^{18}O]G-6-Pを用いて4位水素の挙動を追跡し、その水素が保存されることを示した[31]。さらに、二重標識体と非標識体の混合物を基質とした反応を行った結果、その4位水素はスクランブリングを起こすことなく同一分子中に保存されていることが示された。また、部分精製酵素中の内在性の非標識G-6-Pのため定量的には問題はあるが、4位における反応の同位体効果k_H/k_D=2.7を観測した。すなわち基質G-6-Pの4位での酸化還元反応が起きていることと、補酵素NAD^+-NADHは酵素から遊離することなく酵素反応が起きていることが明らかにされた。つまり、この炭素環形成反応が単一の酵素"2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素"により行われていることを強く示唆する結果であり、Kakinumaらが提案していた反応機構で進行することを支持した。そしてDHQ合成酵素反応機構との類似性がさらに明らかになった。また、Akhtarらのグルコースの4位水素が保持されないという結果に対してはトリチウムの同位体効果が重

水素のそれよりも大きいこと（$k_H/k_T=(k_H/k_D)^{1.44}$）を考えることによりうまく説明できるとしている。

2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素（DOI合成酵素）とDHQ合成酵素の反応機構の類似性が示されたが、DHQ合成酵素についてはすでに様々な生物種における酵素遺伝子までもが報告されている。また、*E. coli*由来のDHQ合成酵素についてはFrostらによって大量発現系も確立され[32]、この多段階反応を酵素がどのように触媒しているかに着目し基質類縁体・阻害剤を用いた酵素化学的な研究が多数行われている。

環化反応の立体化学はRotenbergら、Turnerらによりラベル化基質を用いて明らかにされている[33,34]。また、その立体化学は脱リン酸化の方向によって決定されると考えられ、Widlanskiらはアノマー位のデオキシ基質アナログを用いて酵素反応を検討し、脱リン酸化は*syn*脱離で進行することを明らかにしている[35]（Fig. 15）。

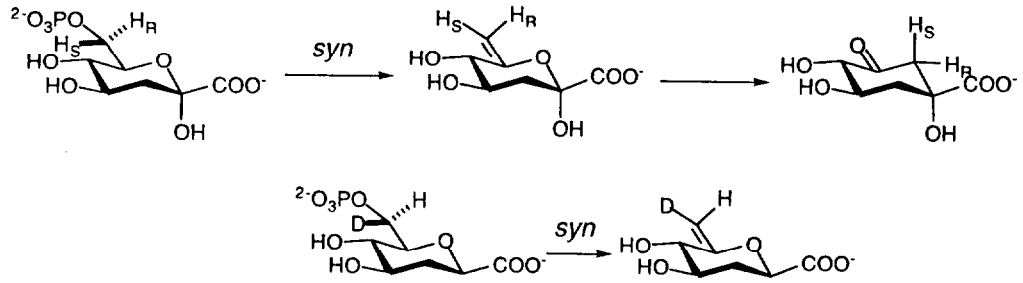


Fig. 15

脱リン酸化反応については、Benderらがカルバサイクリック基質アナログやホスホン酸基質アナログを用いて重水中で酵素反応を行うことにより検討している[36]。カルバサイクリックホモホスホン酸基質アナログ、*cis*-ビニルホモホスホン酸基質アナログを用いたときに、C-5上の重水素交換が観察された。このことは酵素反応では基質リン酸が塩基としてカルボニルのα位の水素を引き抜く可能性があるということを示している（Fig. 16）。

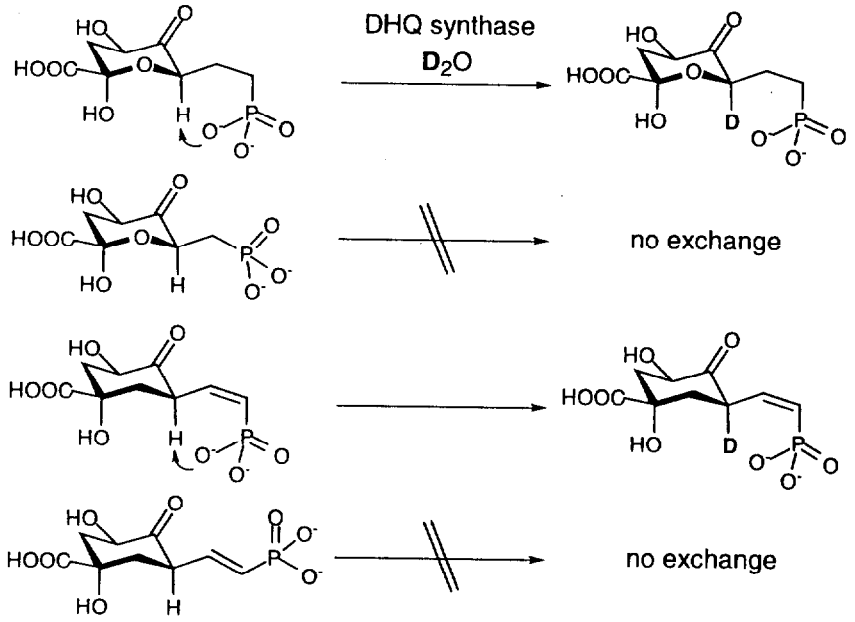


Fig. 16

Knowlesは脱リン酸化が*syn*脱離で進行するということを考え合わせると化学的に合理的な反応機構であると主張している[37]。すなわち、基質のリン酸は脱離すると同時に塩基として水素を引き抜き、いす型六員環遷移状態を経てアルドール型縮合が起きるという機構である（Fig. 17）。

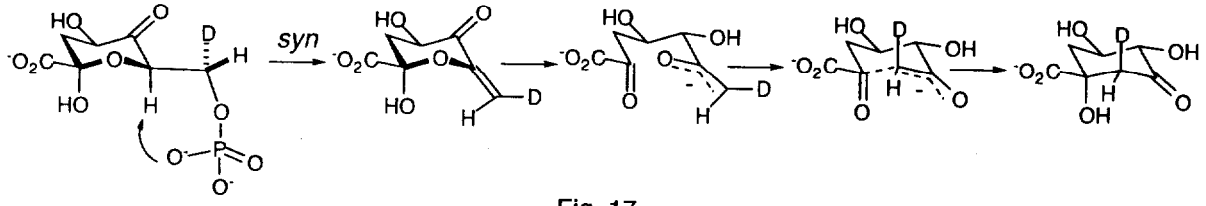


Fig. 17

一方、Bartlettらはアルドール反応が起こる段階の中間体を合成し、自発的反応を観察している[38]。すなわち光化学反応で脱保護できるニトロベンジルアセタール体を光照射により脱保護を行うと自発的に環化反応が進行することを観測した。この環化反応で生成する主生成物は酵素反応と同じであったが、少量（2.5-4.0 %）ながらも酵素反応では生成しない異性体が生成していることがわかった（Fig. 18）。この結果は中間体が酵素の活性部位から解離しないで反応が進行していることを示している。すなわち酵素内で全ての多段階反応が起きていることが明らかとなった。

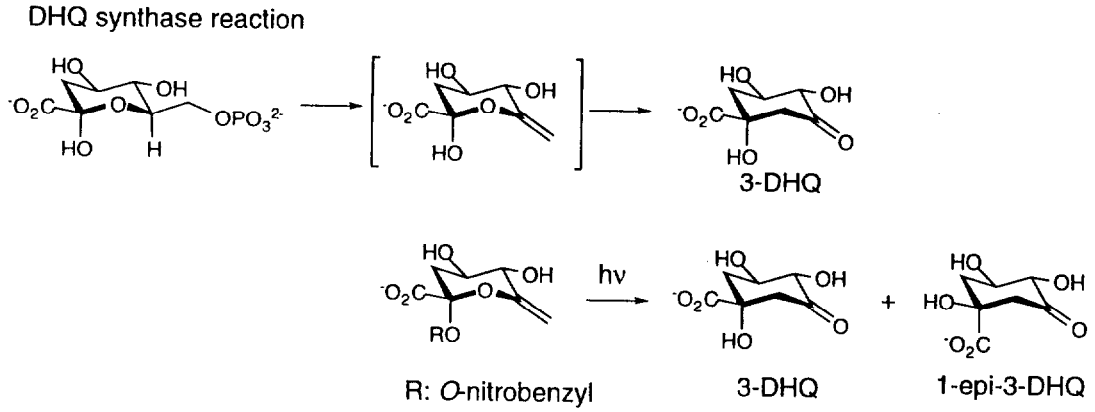


Fig. 18

1998年にはCarpenterらによって*Emericella nidulans*由来のDHQ酵素（pentafunctional AROM ポリペプチドのN末端側の393残基）についてX線結晶構造解析が報告され、酵素と基質、金属、補酵素との相互作用が解明されつつある（Fig. 19）[39]。この構造解析による酵素と基質（阻害剤）との相互作用はこれまでの反応機構の解析とよい一致を示している。

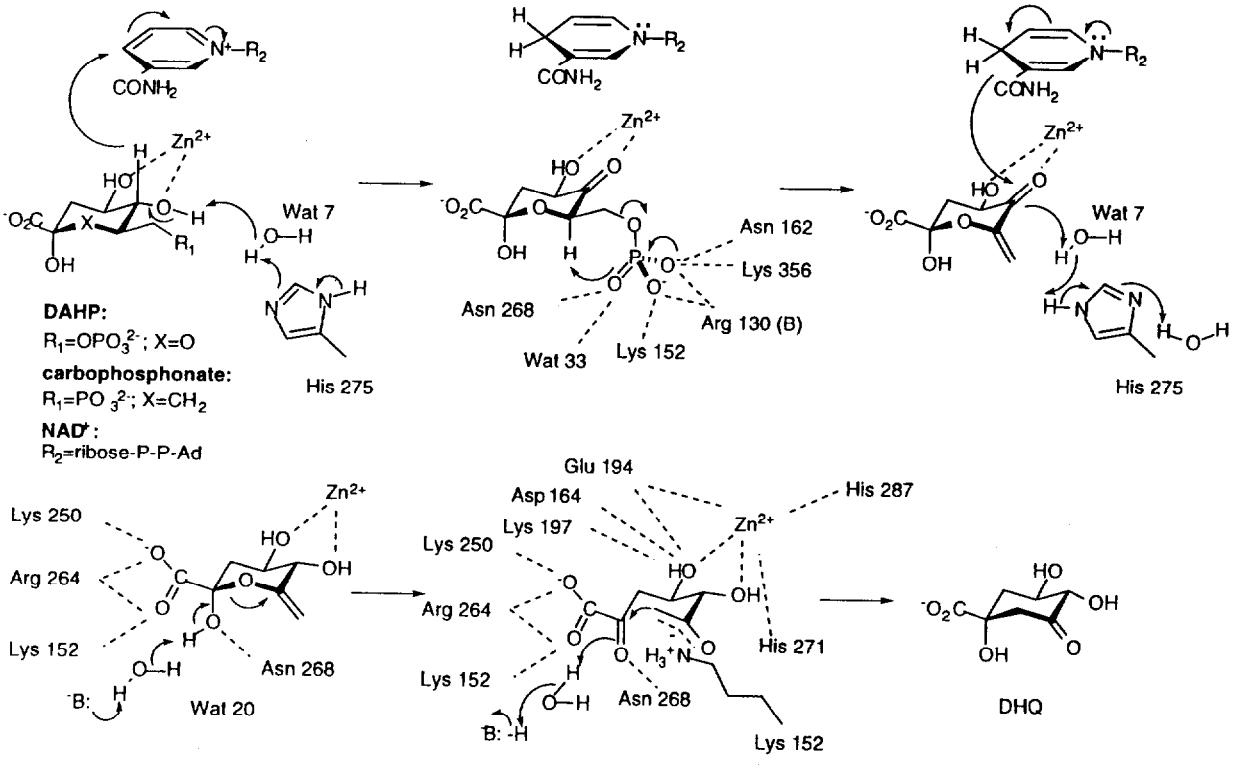


Fig. 19

DOI合成酵素と同様にDHQ合成酵素と似た反応機構で生合成すると思われるものもいくつか存在する。特にC_7Nユニット（炭素六員環化合物で1、3位に炭素および窒素置換基を有する）の生合成研究が盛んに行われている[40]。

リファマイシン生合成中の3-amino-5-hydroxybenzoic acid（AHBA）生合成におけるアミノDHQ合成酵素（RifG）はその名の通りDAHPの4位にアミノ基を有する基質をアミノDHQに変換する酵素である。この酵素反応についての詳細はまだ報告されてないが、Flossらにより酵素遺伝子配列が既に報告されている（Fig. 20）[41]。

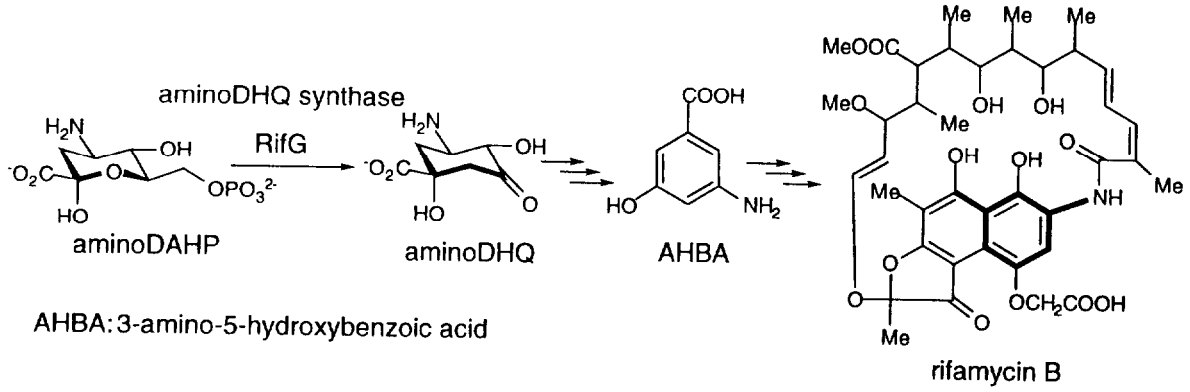


Fig. 20

またAHBAではないC_7Nユニットの生合成がアカボースやバリダマイシンAに含まれると予想されている。すなわちAHBA、3-aminobenzoic acidが取り込まれないことおよびグリセール、グルコースの取り込みパターンから7炭素糖セドヘプツロース7-リン酸の環化反応によって生成するバリオロンが生合成中間体として考えられている（Fig. 21）[40,42,43]。

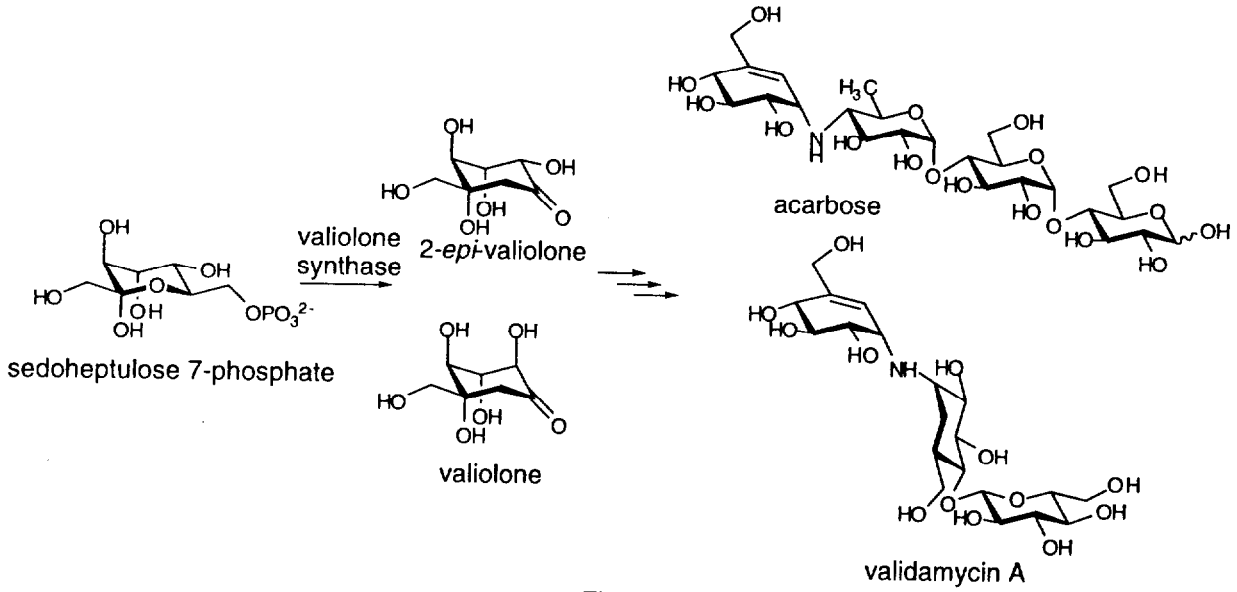


Fig. 21

また、糖質からの炭素環形成反応という点では先に述べた*myo*-イノシトール-1-リン酸合成酵素や、パクタマイシン、アリステロマイシン、アロサミジンに見られる五員環化合物の生合成酵素との比較も興味深い（Fig. 22）。

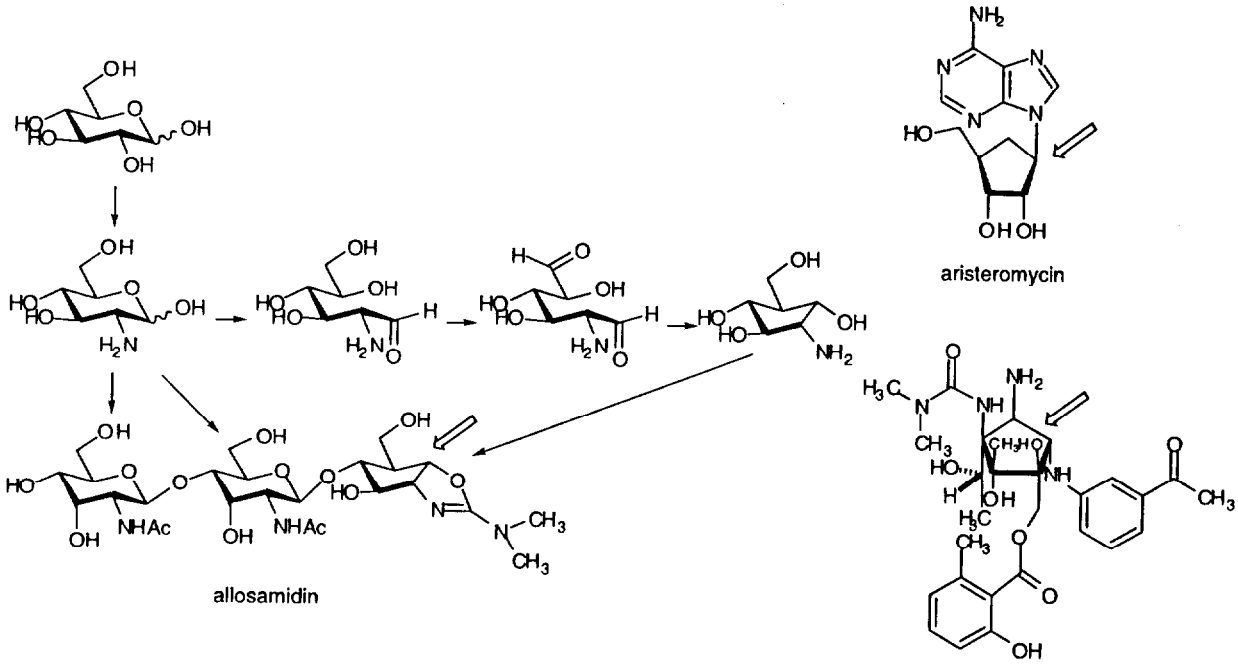


Fig. 22

Rinehartらはパクタマイシン生産菌*Streptomyces pactum*に[6-^{13}C]グルコース、[1-^{13}C]グルコースを投与した実験から、置換シクロペンタン部分が、グルコースから*myo*-イノシトール経由もしくはグルコースの1位と5位の間での直接閉環により生合成される可能性を示した[44]。また、Parryらはアリステロマイシン生産菌*Streptomyces citricolor*に^{3}Hおよび^{14}C標識グルコースを投与した実験から、グルコースないしはフルクトースの2位と6位の間で結合が形成することを示した[45]。またSakudaらはアロサミジン生産菌*Streptomyces* sp. AJ 9463に[3-^{2}H]-、[4-^{2}H]-、[5-^{2}H]-、[6-^{2}H$_2$]-グルコサミンを投与した実験から、グルコサミンより6-アルデヒド体経由の1位と5位の間での結合により生合成されることを明らかにした[46]。これら五員環化合物についてはそれぞれ取り込み実験から反応機構が予測されているが、現在のところ環化酵素や遺伝子についての報告はされていない。

DOI合成酵素に関連する糖質の酸化還元反応を触媒する酵素としては、UDP-ガラクトース4-エピメラーゼや3,6-ジデオキシ糖生合成中のCDP-D-グルコース4,6-デヒドラターゼなどの酵素が存在し、これらとの反応機構および酵素構造の比較も興味深い（Fig. 23）[47,48]。

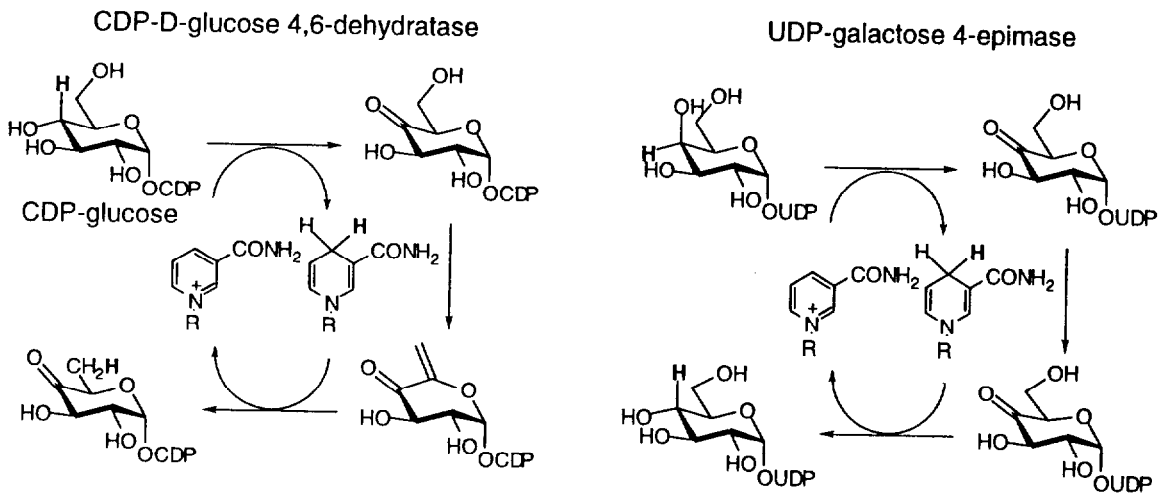


Fig. 23

以上述べてきたとおり、DOI合成酵素はアミノグリコシド抗生物質の生合成酵素としてだけでなく、炭素六員環形成を触媒する酵素として注目すべき題材である。そこで本研究ではDOI合成酵素反応について酵素化学的に解明する基盤として、ブチロシン生産菌*Bacillus circulans*からのDOI合成酵素の精製及び酵素遺伝子の探索を検討した。

まず*B. circulans*におけるDOI合成酵素の存在の確認にはじまりYamauchiらと同様の基質、活性試験法を用いてDOI合成酵素反応機構を解析し、ブチロシン生産菌*B. circulans*とネオマイシン生産菌*Streptomyces fradiae*という生物種による違いはなく同じ機構で進行することを示すことができた。また、最適な培養条件により得られた菌体を用いて精製法を検討しDOI合成酵素の単離同定に成功し、生化学的性質を明らかにすることができた。さらに、精製酵素のN末端アミノ酸配列を決定し、それを基にDNAプローブを作成してDOI酵素遺伝子の探索を行いDOI合成酵素遺伝子*btrC*をクローニングすることができた。その遺伝子を大腸菌*E. coli*で活性酵素として大量発現させることにも成功した。

以下、これら研究の経緯を詳述するが、第２章では、ブチロシン生産菌*Bacillus circulans*培養菌体中のDOI合成酵素活性の確認と部分精製したDOI合成酵素を用いた反応機構の解析について述べた。

第３章ではDOI合成酵素の単離同定に初めて成功した経緯および、その生化学的性質について検討した結果ついて述べた。

第４章ではDOI合成酵素遺伝子を探索し*btrC*遺伝子をクローニングしたこと、およびその発現タンパク質の生化学的性質について検討した結果について述べた。

第５章では本研究をまとめ、今後の展望について述べた。

第２章　2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素反応機構[49,50)]

2-1　序

2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素（DOI合成酵素）反応機構についての研究は、酵素源として培養菌体、無細胞抽出液、部分精製酵素溶液が用いられ行われてきた[20,27,30,31)]。Yamauchiらのネオマイシン生産菌*Streptomyces fradie*の部分精製酵素溶液を用いた実験により、酵素反応がG-6-Pを基質としNAD$^+$を補酵素として進行することが明らかにされた[31)]。そして基質4位の酸化還元と脱リン酸化反応、アルドール型反応を単一酵素として触媒することが示され、酵素反応を化学的に捉える段階になりつつある。しかしながら、酵素反応速度や酵素と基質、補酵素、金属との相互作用などを化学的に論じるためには純粋なDOI合成酵素を用いて研究する必要がある。現時点では、ネオマイシン生産菌*S. fradiae*からは部分精製はなされているものの、酵素の不安定性により単離にいたっていない。そこで、DOI合成酵素の単離を目指し、ブチロシン生産菌*Bacillus circulans*より精製を検討することにした。*B. circulans*は唯一放線菌でないアミノグリコシド抗生物質生産菌で、性質の異なったDOI合成酵素が存在する可能性があり、まず酵素の存在確認とその反応機構について検討した。

2-2　実験方法

可視吸収は島津製作所UV 160可視紫外分光光度計で、プラスチックセルを用いて測定した。

GC-MSスペクトルは日本電子株式会社製JEOL JMS-AX 505 HA 質量分析装置を用い、イオン化電圧70 eVで測定した。

蒸留水はヤマト科学WG-25型オートスチル純粋製造装置を用いて製造した。

振とう培養はトーマス社製振とう培養装置を用いて行った。

細胞の破砕はブランソン社製Sonifier-250超音波破砕機を用いて行った。

酵素活性試験におけるHPLCは、日立製作所製L-4000 UVディテクターとD-2500インテグレーターを接続したL-6000ポンプを用いて行った。

薄層クロマトグラフィーにはMerck Kiesegel 60 F_{254} (0.25 mm)を用いた。

Q Sepharose FAST FLOW、Mono Q HR 5/5、Mono Q HR 10/10、Mono P HR 5/20、HiTrap HIC Test Kit、Superdex 75 HiLoad 26/60、Superdex 200 HiLoad 26/60（ファルマシア）とTSK gel AF bluetoyopearl 650、TSK gel G3000SW（トーソー）と

DEAE cellulofine-A-800（チッソ）をタンパク質精製時におけるクロマトグラフィーに用いた。

酵素活性試験のHPLCにはTSK gel ODS-80TMCTR（4.6 mm x 100 mm）を用いた。

D-グルコース-6-リン酸二カリウム塩(G-6-P)はシグマ社から購入した。

NAD^+はオリエンタル酵母工業株式会社から購入した。

2-2.1　使用した菌株

ブチロシン生産菌*Bacillus circulans* SANK 72073株を酵素源として用いた。*B. circulans*は1%ポリペプトン(Wako)、0.2%酵母抽出物(Oxoid)、0.1%$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1.5%寒天、pH 7.0からなるIFO 802寒天培地でスラントとして28℃、3日間培養後保存した。3ヶ月に一回植え継ぎを行った。

2-2.2　培養条件

1.0%肉エキス、1.0%ペプトン、0.5%NaCl、pH 7.5からなるnutrient broth（NB）培地に対し、1.0%グリセロール、1.0%スターチ、1.0%デキストリンになるようにそれぞれを加えた培地で、28℃、180 rpmで培養条件を検討した。

また、2.0%脱脂大豆粉の抽出液（soy been meal extract（SBM ext.）；水1リットルに対し20 gの脱脂大豆粉を加え120°Cで20分間オートクレーブ後 6,000 x *g* で30分間遠心分離し、その上清を用いた）[22]もしくは2.0%コーンスティープリカーに対し、最終濃度1.0%もしくは2.0%のなるようにグリセロールを加えた培地で、28℃、180 rpmで培養条件を検討した。

検討後の培養条件

*B. circulans*のスラントに0.9% NaClを1 ml入れて白金耳で胞子を懸濁し、100 mlのSBM-1%グリセロール培地（2% SBM ext.、1%グリセロール、pH7.5）に植菌して液体培養を行った。500 mlのくぼみの付いた三角フラスコを10本用いた。振とう培養器で28から29°Cで180 rpmにて3日間振とう培養した。6,000 x *g*で1時間遠心分離することにより集菌した。培養菌体は0.5 M NaClで1回、50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)で2回洗浄した。培養菌体は細胞破砕するまで-75℃で保存した。

2-2.3　抗菌活性試験

*B. circulans*のスラントに0.9% NaClを1 ml入れて白金耳で胞子を懸濁し、100 mlの各条件の培地に入れ、振とう培養器で28から29°Cで180 rpmにて振とう培養した。500 mlのくぼみの付いた三角フラスコを2本ずつ用いた。培養液は毎日5 mlずつ分取した。培養液中の細胞数はOD_{660}の値で見積もった。2,000 x *g*で15分遠心分離した培養液上清を抗菌活性試験に用いた。*Bacillus subtilis* PCI 219株に対する抗菌活性はリボスタマイシンを指標としたディスク検定法で見積もり、各日ごとに3連実験の平均値として求めた。

2-2.4　標識基質の調製

D-[6,6-$^2H_2$]G-6-PはLemieuxおよびLardyの方法に従い合成した[51,52]。D-[3-^{18}O,4-^{2}H]G-6-PはYamauchiの合成したものを用いた[31]。

2-2.5　DOI合成酵素活性試験法

Yamauchiらの方法を参考にして以下に示すように行った[30,31]。

2-2.5.1　HPLC法

250 µlの酵素溶液に対し最終濃度5 mMになるようにG-6-P、NAD^+、$CoCl_2$を加え37°Cで酵素反応を行った。12時間後20 mg/mlグルコースオキシターゼ（ナガセ)を25 µl加えて37°Cで15分間反応させ、過剰のグルコースを処理した。その後メタノールを0.2 ml加えて反応を停止し、内部標準として1 mg/ml 2-デオキシグルコースを10 µl加えた後、遠心分離して変性したタンパク質を除いた。上清に10 mg/ml *O*-(4-ニトロベンジル)ヒドロキシルアミンのピリジン溶液を0.1 ml加え、60°Cで2時間反応させた。反応溶液は蒸発器で空気を吹き付けることにより蒸発乾固した。500 µlのメタノールに再溶解し、不溶物を濾過により除去した。濾液は50 µlまで濃縮し、薄層クロマトグラフィー(Merck Kieselgel F_{254})で精製した。クロロホルム-メタノール(5:1)を溶媒として用いて、Rf値0.25から4.0を集めることによりDOI-および2-デオキシグルコースの*O*-(4-ニトロベンジル)オキシム誘導体を混合物として得た。シリカゲルからはクロロホルム-メタノール(5:1)を1 ml用いて溶出した。その溶液は蒸発乾固し、最終的に250 µlのメタノールに溶解してHPLCサンプルとした。そのサンプルから5 µlをHPLCにて分析した。18%メタノールを展開溶媒として用い、262 nmの吸光度を測定した。

DOIの合成標品はYamauchiの方法によって合成した[53]。100 mgのテトラベンジル-DOIをメタノール-水-酢酸 (5:1:1)に溶解し、22 mgの10% Pd-Cを加え、反応容器を一旦アスピレーターで脱気した後に、水素雰囲気下で12時間激しく攪拌した。

反応終了後、混合溶液を水で薄め、触媒をセライトを用いて濾別し、濾液をエバポレーターで濃縮した。10 mlの水を加えて3回濃縮を繰り返すことにより酢酸とメタノールを除去した。濃縮液はそのままメスフラスコを用いて水で10 mlに希釈し、反応生成物が100%回収されたとして3.2 mg/mlのDOI標準濃度溶液として用いた。この溶液をもとに各種濃度のDOI溶液を調製し、先に述べたようにオキシム誘導体化、pTLC処理、HPLC分析し検量線を作成した。

2-2.5.1　GC-MS法

DOI*O*-(4-ニトロベンジル)オキシム誘導体をHPLCで分取し、溶媒留去後、ピリジン-ヘキサメチルジシラザン-塩化トリメチルシリル（40 µl-10 µ-10 µl）によりTMS化した。そのうち3 µlをGC-MSに導入して分析した。GC-MSの条件はインジェクター温度250°C、イオン源温度280°C、キャリアーガスはHeで流量50 ml/minであり、オーブン温度は120°Cから20°C/minで320°Cにした。カラムはHewlett-Packard HP-5 （25 m）を使用した。DOI*O*-(4-ニトロベンジル)オキシム-TMS誘導体は15.6分に検出された。

2-2.6　DOI合成酵素の部分精製

*B. circulans*の培養菌体を50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)に1 mlあたり0.5 gになるように懸濁し、氷浴上10分間ブランソンsonifier Type 250（outputコントロール4、duty cycle 50）で超音波により細胞を破砕した。その溶液を6,000 x *g*で1時間遠心分離し、上清を無細胞抽出液として用いた。

無細胞抽出液に、乳鉢ですりつぶした固体硫安を45%飽和になるように加え1時間撹拌の後、6,000 x *g*で1時間遠心分離して0-45%飽和硫安沈殿を得た。その上清はさらに70%飽和になるように硫安を加え、同様に操作して45-70%飽和硫安沈殿を得た。硫安沈殿は最小量の50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)に溶解後、同じ緩衝液を外液として12時間透析した。45-70%飽和硫安画分の透析後の溶液を粗酵素溶液として用いた。

次にDEAE-cellulofine A-800担体を充填したカラム（2.5 cm x 15 cm）に流し込んだ。吸着されない画分は緩衝液A (50 mM Tris-HCl、pH 7.5)で除去した。その後、緩衝液A300 mlと緩衝液B（50 mM Tris-HCl、0.4 M NaCl、pH 7.5）300 mlのリニアグラジエント法により塩濃度を増大させタンパク質を溶出した。

DEAE-cellulofine A-800担体を用いたクロマトグラフィー後のDOI合成酵素活性画分をCentriprep-10 (Amicon)を用い、2,000 x *g*で30分間の限外濾過を数回繰り返し、脱塩および約6 mlまで濃縮した。その濃縮液をQ Sepharose Fast Flow担体を充填したカラム（2.5 cm x 8.5 cm）に流し込んだ。吸着されない画分は緩衝液A

で除去した。その後、緩衝液A200 mlと緩衝液B（50 mM Tris-HCl、0.4 M NaCl、pH 7.5）200 mlのリニアグラジエント法により塩濃度を増大させタンパク質を溶出した。

2-2.7　タンパク質濃度測定および電気泳動

ポリアクリルアミドゲルは10 cm x 10 cmもしくは15 cm x 15 cmのゲル作成装置で作成した。SDS-PAGEはLaemmliの方法に従い30 mAで、10もしくは12.5 %のポリアクリルアミドゲルで行った[54]。タンパク質の染色にはクマシーブリリアントブルー染色もしくは銀染色を行った。

タンパク質濃度測定はLowryの方法に従い牛血清アルブミンを標準物質として定量した[55]。

2-3 実験結果と考察

2-3.1 DOI合成酵素活性の検出

*B. circulans*は、標準的な培地（nutrient broth（NB）：1.0% 肉エキス、1.0% ペプトン、0.5% 塩化ナトリウム、pH 7.5）においては生育が悪い。そのため酵素精製するのに十分量の菌体を得ることが困難であると考え、まずはじめに*B. circulans*の培養条件を種々検討した。

炭素源としてグリセロール、スターチ、デキストリンを考え、NB培地にそれぞれ1 %ずつ加え培養し、細胞増殖度は培養液の660 nmの吸収強度を指標にし、抗菌活性はディスクアッセイ法により経時的に測定した。

NBで培養したときの最大生菌数の値を1としたとき、スターチ、デキストリンを用いたときでは2で、グリセロールを用いたときでは2.3であった。一方、最大抗菌活性はスターチを用いたときでは1、デキストリンを用いたときでは2、グリセロールを用いたときでは3.5であった。どの培養液においても抗菌活性を有したが、中でもグリセロールを加えたときが細胞増殖度、抗菌活性ともに良好であった（Fig. 24）。

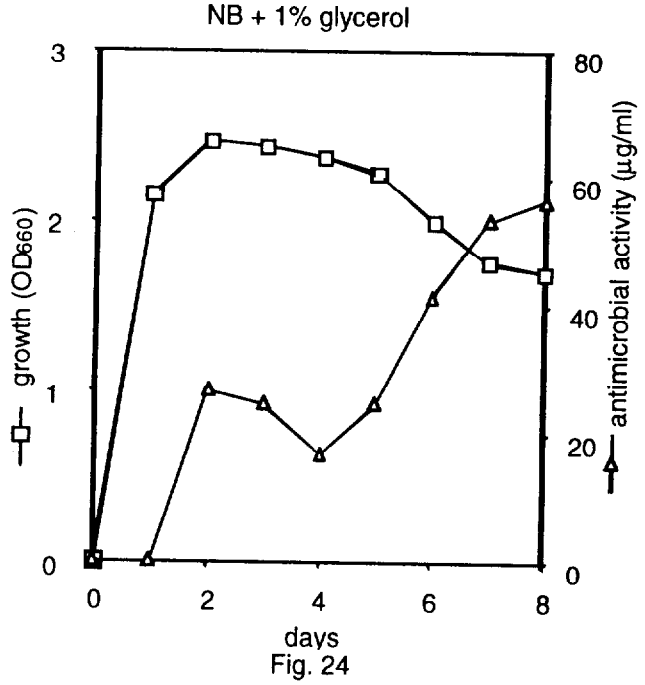


Fig. 24

次に、窒素源を検討するために炭素源をグリセロールに固定し、2 % Soy bean meal extract（SBM ext.、きなこの抽出液）[22]もしくは2 %コーンスティープリカーにグリセロールを1%、2%加え検討した。

SBMを用いたときのほうがコーンスティープリカーを用いたときよりも、細胞増殖度、抗菌活性ともに2倍高かった。SBM ext.を用いたときのグリセロール濃度の違いは細胞増殖度に変化を与えなかったが、2%グリセロールを用いたときに抗菌活性において減少傾向を示した。結果として、2% SBM-1% グリセロール培地（SBM培地）が*B. circulans*の培養条件として抗菌活性、細胞増殖度ともに最適であることが分かった (Fig. 25)。

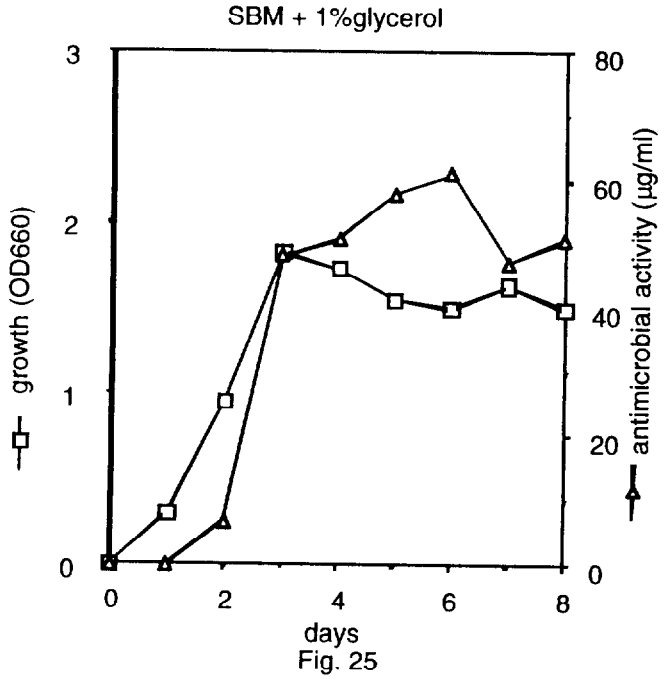


Fig. 25

以上の培養条件検討の結果、酵素精製に使う菌体はSBM培地によって培養されたものを使うことにした。また、培養菌体の集菌時期は、一般に二次代謝産物は生育の後期から定常期に生産されることから、抗菌活性及び、生育の経時変化を考え合わせて3日目に行うこととした。

DOI合成酵素活性検出法はYamauchiらの方法を参考に設定した (Fig. 26) [30]。

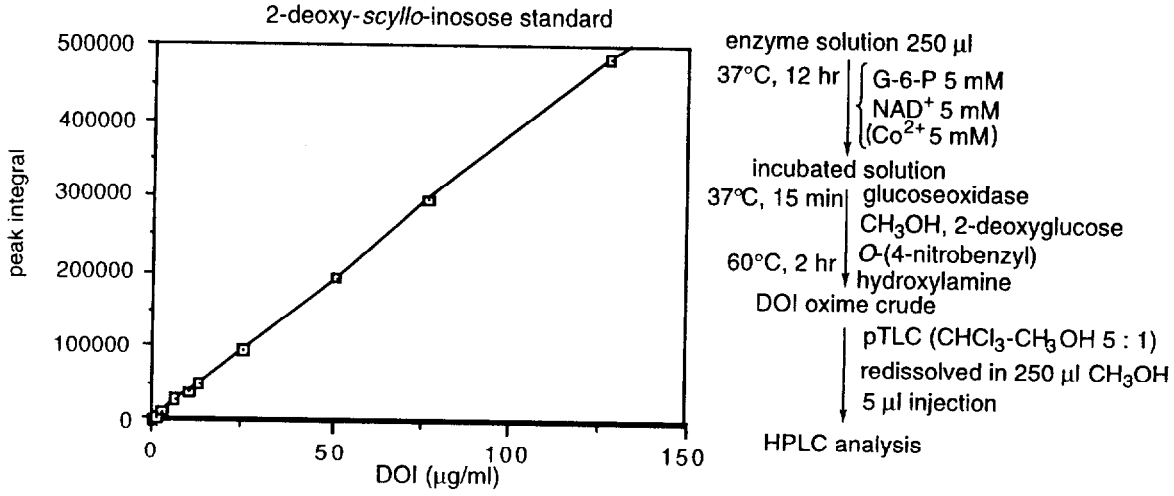


Fig. 26

まず、*B. circulans*においてDOI合成酵素活性が存在することを確認することにした。

先に定めた培養法により1Lの培地に対し約80 gの菌体を得ることができた。その菌体を0.5 g wet cell/mlになるように50 mM Tris-HCl（pH 7.5）緩衝液に懸濁し、ブランソンSonifier-250を用いてoutputコントロール4、duty cycle 50で超音波細胞破砕した。その溶液を遠心分離し上清を無細胞抽出液として用いた。

無細胞抽出液にG-6-PおよびNAD$^+$を最終濃度が5 mMになるように加えて37℃で12時間反応させるとHPLCで無細胞抽出液1 ml あたり約9 μgのDOI誘導体のピークが検出された。

次にその検出しているピークが、加えたG-6-Pから生成したDOIによるものであるのかをYamauchiらの方法[31]に従い、オキシム誘導体をさらにTMS化し、GC-MSにより検証することにした。Kakinumaらの研究により、[6,6 $^2H_2$]-G-6-Pを基質として用いて反応を行えば、[2,2-$^2H_2$]-DOIが生成物として得られることが分かっており[27]、*S. fradiae*の系でもそれが示されている[30,31]。本研究においては[2,2-$^2H_2$]-DOIのOxime-TMS誘導体を検出することで生成物の確認を行うことにした（Fig. 27）。

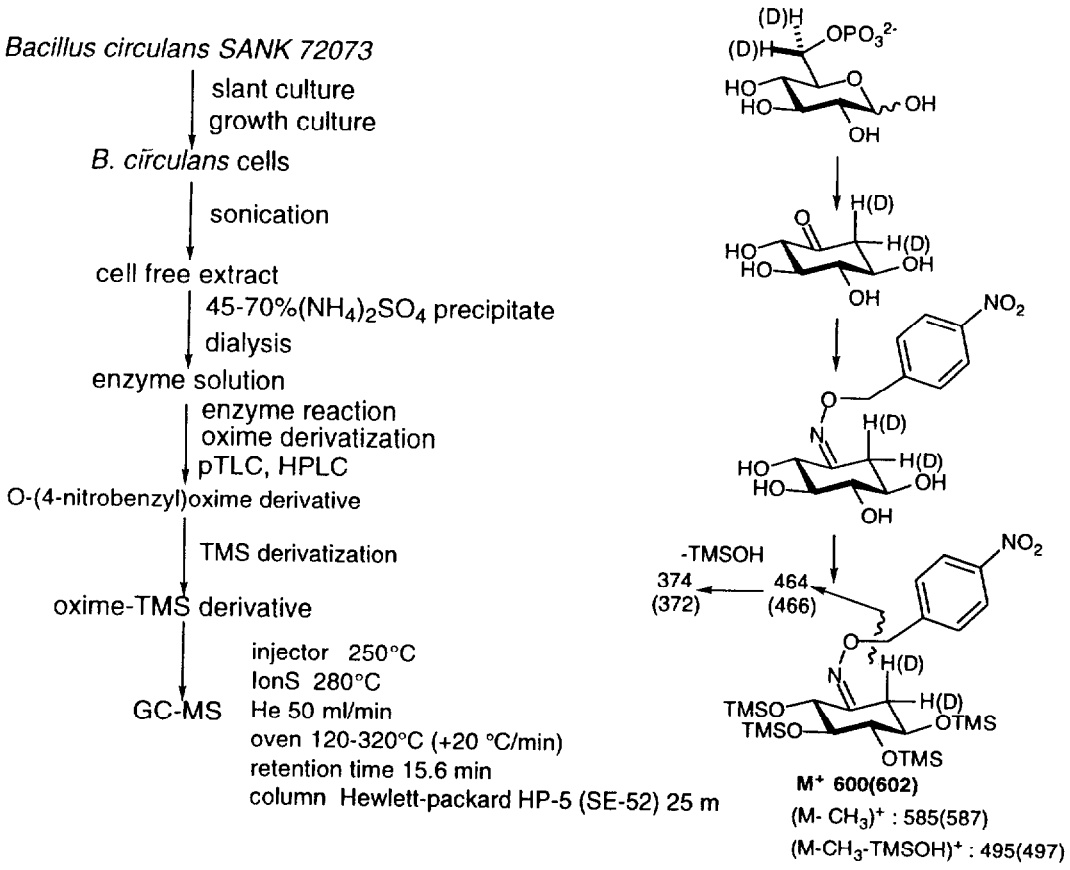
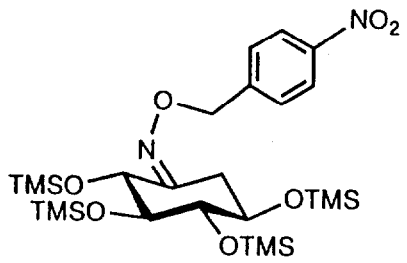


Fig. 27

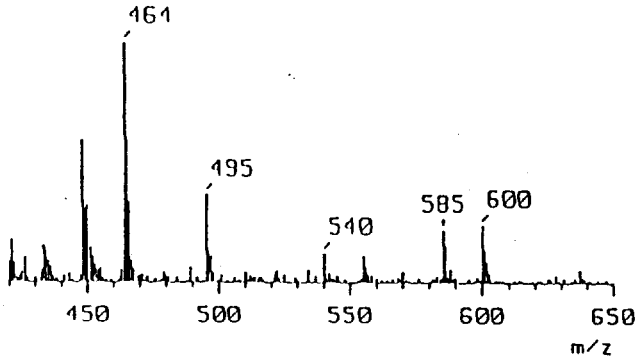
はじめに酵素精製の前段階として無細胞抽出液を硫酸アンモニウム（硫安）分画による精製を検討した。0-45%、45-70%、70％以上飽和硫安画分に分離し、それぞれの画分は透析して硫安を除去後、酵素反応に付しDOI合成酵素活性をHPLCより分析した。その結果45-70%飽和硫安画分に酵素活性が認められた。

そこで、この粗酵素溶液と標識基質として合成した[6,6 $^{2}H_{2}$]G-6-P [51,52]を用いて酵素反応を行い、DOIのオキシム誘導体をさらにTMS化し、GC-MS分析した（Fig. 28）。



TMS-oxime derivative of 2-deoxy-*scyllo*-inosose

a



b

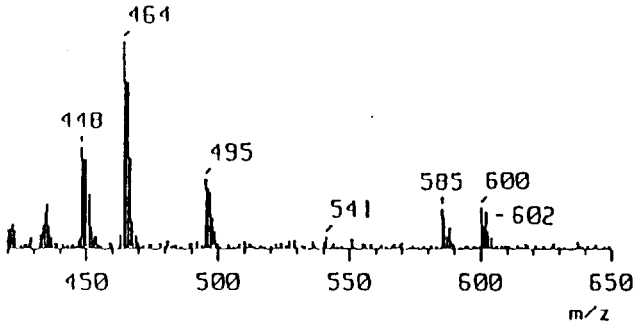


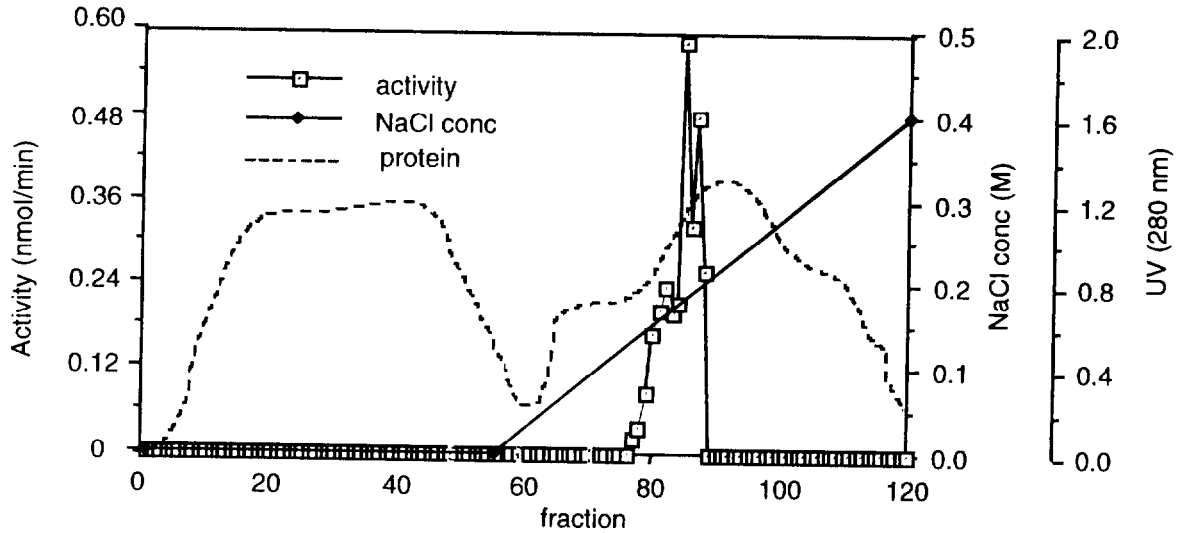
Fig. 28 Mass spectra (molecular ion region) of DOI oxime-TMS derivative obtained from the enzyme reaction of G-6-P
(a) the product from nonlabeled G-6-P
(b) the product from [6,6-$^2H_2$]G-6-P

非標識体を用いたときの酵素反応生成物からは特徴的な分子イオンピーク*m/z* 600が強く観測された（Fig. 28 a）。標識化合物を用いたときの酵素反応生成物からはちょうど2質量単位（amu）大きい*m/z* 602に強いピークを検出した（Fig. 28 b）。この結果より酵素反応によってDOIが生成していることが確認された。すなわち、*B. circulans*の細胞内にDOI合成酵素が存在することを明らかにすることができた。

2-3.2　部分精製酵素の調製

標識基質を用いて酵素反応を行ったときに*m/z* 600のピークが混在した（Fig. 28 b）。つまり、45-70%飽和硫安濃度画分の酵素溶液には*B. circulans*菌体の内在性のG-6-P、DOIが混在していると考えられた。また、Yamauchiらの標識化合物を用いた実験では酵素の精製度が低かったため、GC-MS分析において内在性の化合物由来のピークも同時に検出され、定量的な議論を難しくしていた[31]。つまりマススペクトルのピーク強度で生成物の量を定量するためには少なくとも内在性のDOI、G-6-Pを除去する必要がある。そこで、45-70%硫安濃度画分の溶液を用いて精製を検討することにした。

45-70%飽和硫安画分をDEAE-cellulofine A-800担体で充填したカラム（2.5 x 15 cm)でクロマトグラフィーを検討した。緩衝液A (50 mM Tris-HCl、pH 7.5)で吸着されない画分を分離した後、流速約1.5 ml/minで、緩衝液A300 mlと緩衝液B（50 mM Tris-HCl、0.4 M NaCl、pH 7.5）300 mlのリニアグラジエント法により塩濃度を増大させタンパク質を溶出した（Fig. 29）。

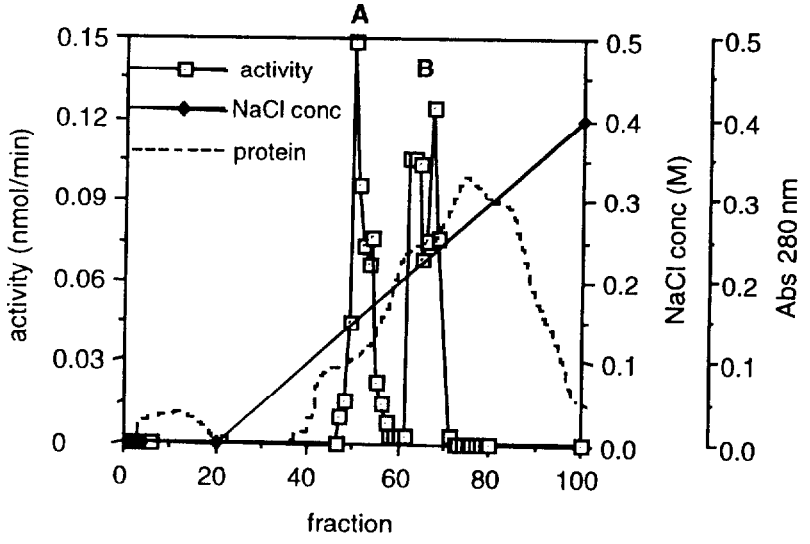


column ;　DEAE- cellulofine A-800 (2.5 x 15 cm)
solution ;　0-55 fraction : 0 M NaCl buffer
56- fraction : 0- 0.4 M NaCl buffer linear gradient
1 fraction ; 7 ml

Fig. 29

このクロマトグラフィーでは吸着する画分と、吸着しない画分とで大きく二つにタンパク質を分離することができ、酵素活性は吸着する画分に認められた。

第二の操作として、DEAEとは異なる4級アンモニウム（$-CH_2N(CH_3)_3^+$）の官能基を持つQ Sepharose Fast Flow担体を充填したカラムでクロマトグラフィーを検討した。DEAE-cellulofine A-800担体を用いたクロマトグラフィーで分離した活性画分を集めCentriprep 10 (amicon)を用い限外濾過により粗酵素溶液を脱塩、6 mlまで濃縮し、クロマトグラフィーを行った。緩衝液Aで吸着されない画分を分離し、緩衝液A 200 mlと緩衝液B 200 mlのリニアグラジエント法により塩濃度を増大させタンパク質を溶出した（Fig. 30）。

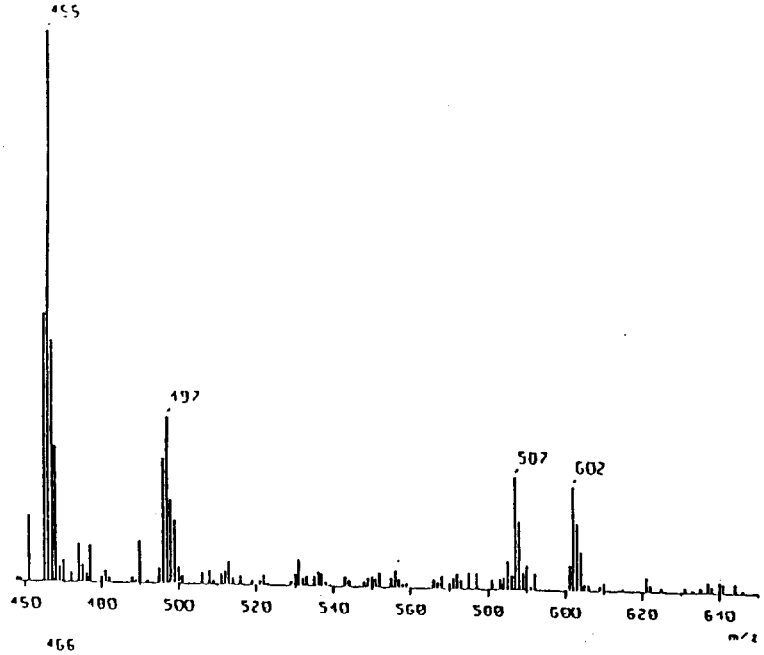


column ; Q Sepharose Fast Flow (3.0 x 8.5 cm)
solution ; 0-20 fraction : 0 M buffer
20-fraction : 0 M-0.4 M NaCl buffer linear gradient
1 fraction ; 3.5 ml

Fig. 30

このクロマトグラフィーでは、ほとんどのタンパク質が吸着した。約0.2 M NaClを含む緩衝液画分にDOI合成酵素活性が検出された。その活性画分は2つ（活性画分AとB）に分離した。そこで、その2つの画分が本当に活性な酵素を含むのかを確認するために、先と同様に[6,6-$^2H_2$]G-6-Pを基質として酵素反応を行い、GC-MS分析した（Fig. 31）。

a



b

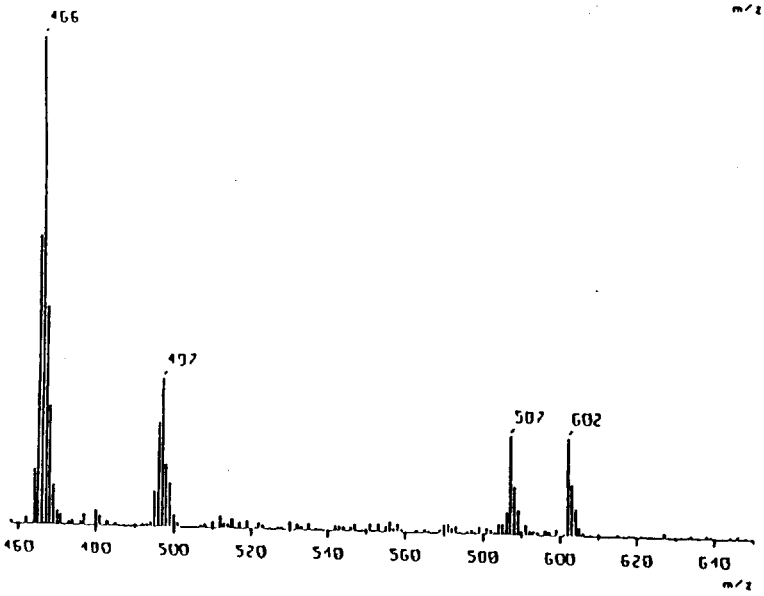


Fig. 31 Mass spectra (molecular ion region) of DOI oxime-TMS derivative obtained from the enzyme reaction of [6,6-$^2H_2$]-G-6-P
(a) former active fraction after Q sepharose
(b) latter active fraction after Q sepharose

活性画分Bを用いた酵素反応生成物において、分子イオンピーク*m/z* 602が強く観測された（Fig. 31 b）。また、活性画分Aを用いた酵素反応生成物においても、不純物が混じっているが*m/z* 602が強く観測された（Fig.31 a）。活性画分A、Bどちらにも DOIを生成させる酵素が存在することを示しており、DOI合成酵素が2つのアイソザイムからなる可能性があることが示唆された。しかし、この分離した各活性画分は、同じ酵素でありながら単量体と多量体の違いや多量体の複合体の度合いによって分離している可能性があり、または部分的に分解した酵素が活性を保って存在しているかもしれないので、今後更なる検討が必要である。

Q Sepharose担体を用いたクロマトグラフィー後の部分精製酵素溶液を用いた酵素反応のGC-MS分析において、[6,6-$^2H_2$]G-6-Pを基質としたときに*m/z* 600はほとんど観測されなかった（Fig. 31）。すなわち、この部分精製酵素を用いたときの酵素反応生成物は全て活性試験時に加えた基質由来のものであることを示している。また、HPLC分析においても峡雑物がほとんどなくなったことがわかった（Fig. 32）。つまり、様々な基質を用いた酵素反応の解析に使用できるまで精製できたと考えられる。

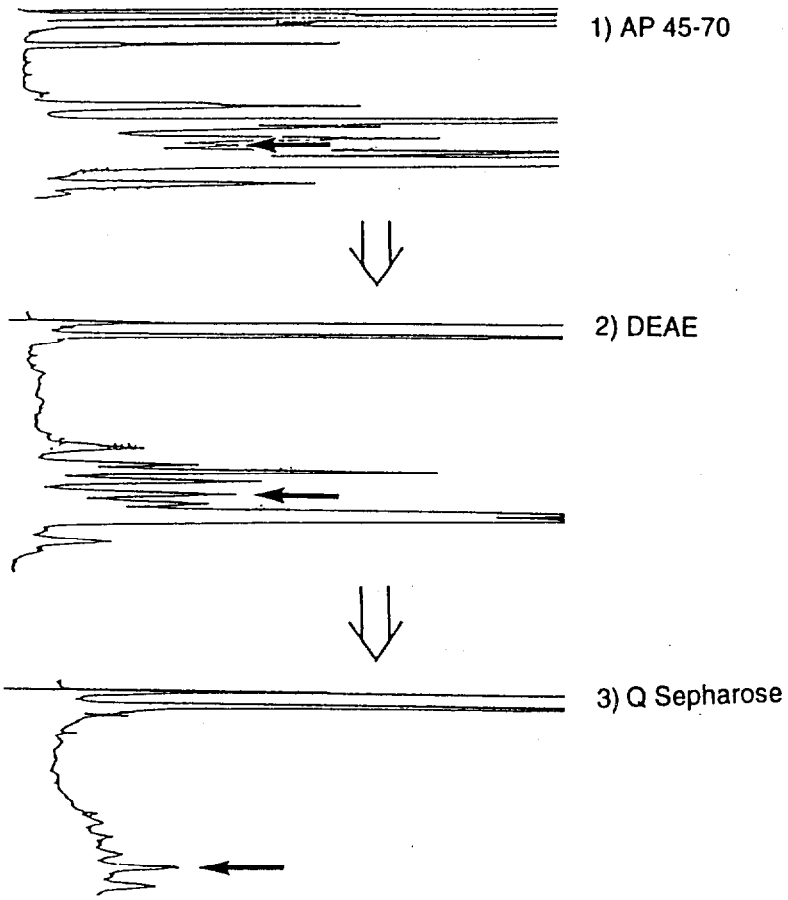


Fig. 32

また、*S. fradiae*の部分精製酵素溶液を用いた酵素反応においてCo^{2+}の存在が反応活性を増大させていることから[30]、本研究においてもCo^{2+}を加えて酵素反応を検討した。Q Sepharose担体を用いたクロマトグラフィー後の部分精製酵素溶液を用いて検討した結果、Co^{2+}を5 mMを加えたときに、約1.5倍の活性の向上が見られた (Fig. 33)。すなわち*B. circulans*由来のDOI合成酵素反応においてもCo^{2+}の存在が反応活性を増大させることがわかった。

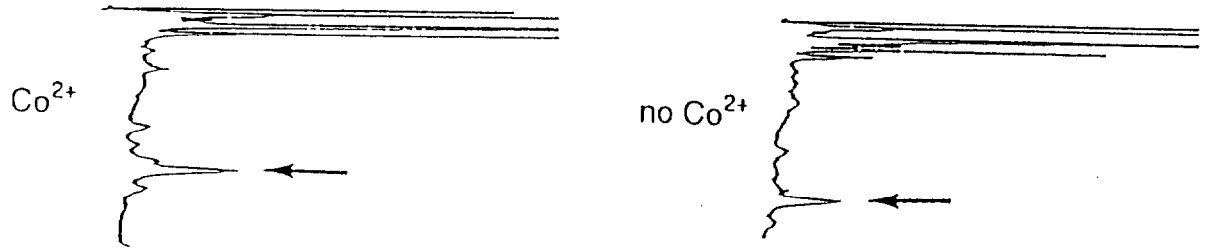


Fig. 33

このQ Sepharose担体を用いたクロマトグラフィー後の部分精製酵素溶液は -75℃で何も加えずに1カ月保存後も活性の減少がほとんど見られなかった。つまりこの段階まではなるべく速やかに（集菌してから3日から4日）操作を行えば、以後は保存できることが明らかになった。今後、精製法を検討する上で重要な知見である。

2-3.3　クロスオーバー実験

Yamauchiらは*S. fradiae*由来の部分精製DOI合成酵素溶液を用いて、基質4位での酸化還元反応時における水素の挙動を知るために、4位水素と同一分子中の反応に関与しないと考えられる部位に標識を持つ二重標識基質D-[4-^{2}H,3-^{18}O]G-6-Pと非標識基質G-6-Pを混在させた上で反応させて生成物を解析している[31]。基質4位水素はスクランブリングを起こすことなく保存されていること、および4位における反応の同位体効果k_H/k_D=2.7を観測した。そして基質G-6-Pの4位で酸化還元反応が起きていることと、補酵素NAD^+-NADHは酵素から遊離することなく酵素反応が起きていることが明らかとなった。

*B. circulans*由来のDOI合成酵素でも同じ生産物を与える反応なので同様の機構で進行すると考えられるが、酵素源となる菌種の違いよって酵素の性質が異なる可能性があり、Yamauchiらによる*S. fradiae*由来の部分精製DOI合成酵素を用いた研究と同様に4位水素の挙動について検討することにした。

基質4位が酸化反応を受けた時、NAD^+に移動した4位の水素は1）元の基質分子に戻るのか、2）スクランブリングが起こり他の基質分子に移動してしまうのかを追跡するクロスオーバー実験では、非標識基質G-6-Pと二重標識基質D-[4-^{2}H,3-^{18}O]G-6-Pを混在させて反応を行うと、1）の場合だと二重標識体と非標識体のピークだけが観測されるはずであり（Fig. 34-1）、2）の場合だと二重標識体から重水素が非標識体に移動したピーク及び酸素同位体だけが残っているピークも同時に観測される（Fig. 34-2）。

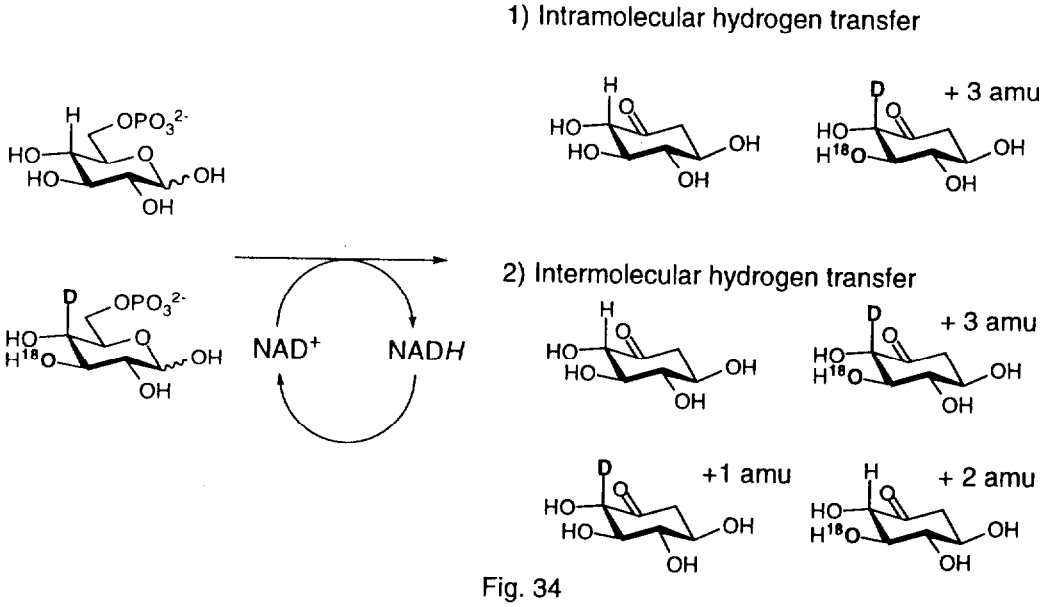


Fig. 34

1)のような場合であっても非標識体がかなり優先的に反応し、*m/z* 600に対し*m/z* 603のピークの相対強度が減少してしまうことが考えられる。1)の場合だと*m/z* 603のピークが強く観測されるか、2)の場合だと*m/z* 601、*m/z* 602のピークが強く観測されるかにかかっているので、非標識体が優先して反応し*m/z* 600のピークが強くなると、それ以上の質量単位ピークは、炭素と誘導体化で用いるケイ素の天然存在比に由来する非標識体の同位体ピークに埋もれてしまう。すると、二重標識体が生成しているのか重水素化体や酸素のみ標識された生成物が存在するのか識別が困難となる（実際のマススペクトルでは、*m/z*600:*m/z* 601:*m/z* 602:*m/z* 603=100:50:26:10）。そこで、4位重水素に関する同位体効果を2-6程度と見積もり二重標識体と非標識体を7:3で混在させて酵素反応の検討がなされている[31]。

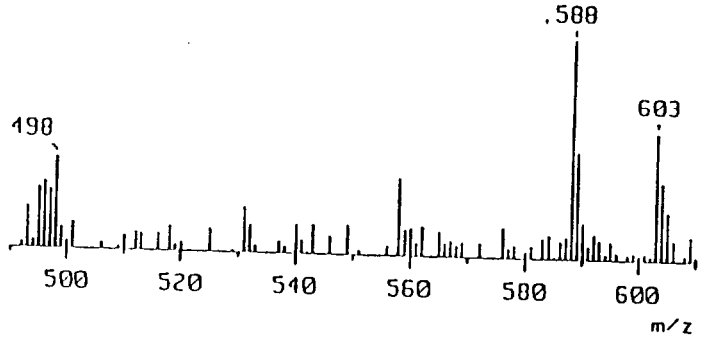
*S. fradiae*由来の部分精製酵素溶液を用いた酵素反応では1)のケースで反応が進行していることがわかり、またこのときの同位体効果は2.7と算出された[31]。この値が、序論でも述べたNAD$^+$を触媒的に利用している酵素、例えば*myo*-イノシトール-1-リン酸合成酵素（k_H/k_T=2.0-4.8）[56]と同等の値であり、DOI合成酵素は単一酵素としてNAD$^+$を要求する酸化還元酵素の一群に属することを示唆している。

本研究では、先に述べたQ Sepharoseクロマトグラフィー後の活性画分Bを部分精製酵素溶液として用いて検討した。二重標識体としてD-[4-^{2}H,3-^{18}O]G-6-Pのみ、非標識体としてG-6-Pのみを基質としたものおよび、二重標識体と非標識体を7:3で混合した基質を酵素反応に付した。各基質を5 mM、NAD$^+$を5 mM、Co^{2+}を5 mMになるように部分精製酵素溶液に加え37℃で12時間反応させた。反応生成物を*O*-(4-ニトロベンジル）オキシム誘導体化後、TMS誘導体化して先と同様の条件でGC-MS分析をした。Table 1に各分子イオンピークの強度比、Fig. 35にGC-MSのスペクトルを示す。

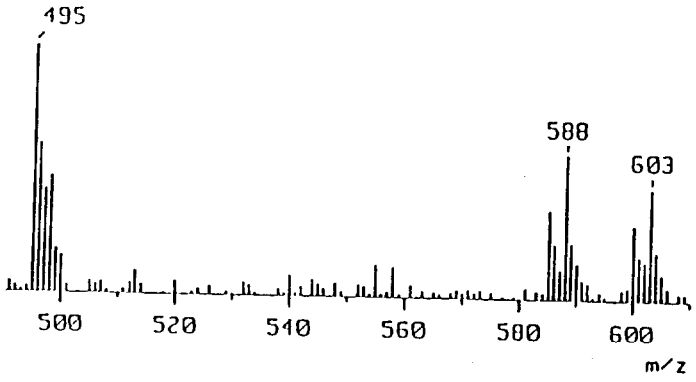
Table 1.

substrate	[4-^{2}H,3-^{18}O]G-6-P	[4-^{2}H,3-^{18}O]G-6-P	nonlabeled G-6-P
m/z		nonlabeled G-6-P (7:3)	
600	7	91	100
601	14	50	54
602	14	47	26
603	100	100	17
604	59	54	8
605	37	28	1
606	13	20	0

a



b



c

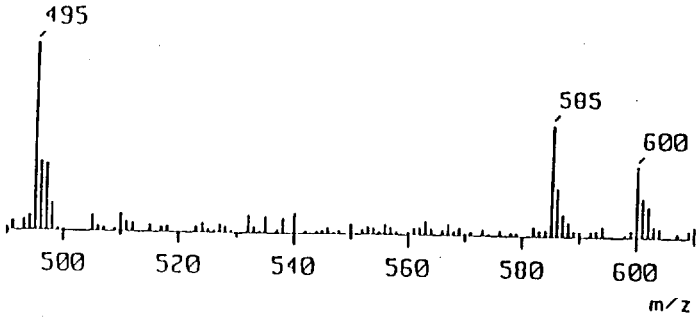


Fig. 35 Mass spectra (molecular ion region) of DOI oxime-TMS derivative obtained from the enzyme reaction of double-labeled substrate:
(a) the product from [4-^{2}H,3-^{18}O]-G-6-P
(b) the product from a 7:3 mixture of [4-^{2}H,3-^{18}O]- and nonlabeled G-6-P
(c) the product from nonlabeled G-6-P
These mass spectra apear one scanning for each case.

非標識体からの生成物のマススペクトルでは分子イオンピーク*m/z* 600と特徴的なフラグメント*m/z* 585、*m/z* 495が観測された（Fig. 35 c）。ついで二重標識体のみを用いたときの生成物のマススペクトルでは*m/z* 603に強いピークを与え、非標識体の分子イオンピークよりちょうど3 amu大きいフラグメント*m/z* 588、*m/z* 498を観測した（Fig. 35 a）。

また、標識体と非標識体を7:3に混合調製して基質として反応させた場合は分子イオンピーク*m/z* 600、*m/z* 603がほぼ1:1で観測された。二重標識基質の方の酵素反応の効率の低さは明らかに同位体効果によるものと考えられ、基質4位での反応が起きていることがわかった。また、*m/z* 601、*m/z* 602の強度は非標識体の同位体ピークと同等の強度であった。このことから生成物は二重標識体と非標識体のみの混合物であることがわかり、酵素反応中に4位の水素はスクランブリングすることなく同一分子に保持されることが示された。すなわち、基質4位において酸化還元反応が起きているが、酵素反応中に補酵素NAD^+-NADHおよび反応中間体が酵素外には遊離していないことが明らかになった。

また、*S. fradiae*由来の酵素で標識基質を用いたときに検出されている非標識基質由来のピークは検出されなかった（Fig. 35 a）。このことは本研究で用いた部分精製酵素溶液の精製度が高いことを示しておりピーク強度を定量的に扱えることがわかった。そこで、a)生成物は分子内反応だけで生じ、かつ、b)生成物の比の変化はすべて同位体効果によると仮定し、その効果を算出した。標識体と非標識体を7:3として行った酵素反応生成物の比より、二重標識基質の標識度を考慮に入れて計算すると、同位体効果を$k_H/k_D \fallingdotseq 2.4$と見積もることができた。この数値は$NAD^+$に転位した水素がもとの分子に戻ってくることと、酸化還元で重水素と炭素の結合が解離、生成する間に同位体効果が現れることを示している。*S. fradiae*由来の酵素を用いた反応における同位体効果2.7と同等と考えられ、DOI合成酵素反応はネオマイシン生産菌*S. fradiae*、ブチロシン生産菌*B. circulans*という菌種による違いはなく同じ反応機構で進行することを示唆している。つまり、*B. circulans*由来のDOI合成酵素反応においても、基質G-6-Pの4位でNAD^+を触媒的に要求する酸化還元反応、脱リン酸化、アルドール型炭素-炭素結合形成反応を含む多段階反応が、DOI合成酵素という単一酵素で行われることが明らかになった（Fig. 36）。

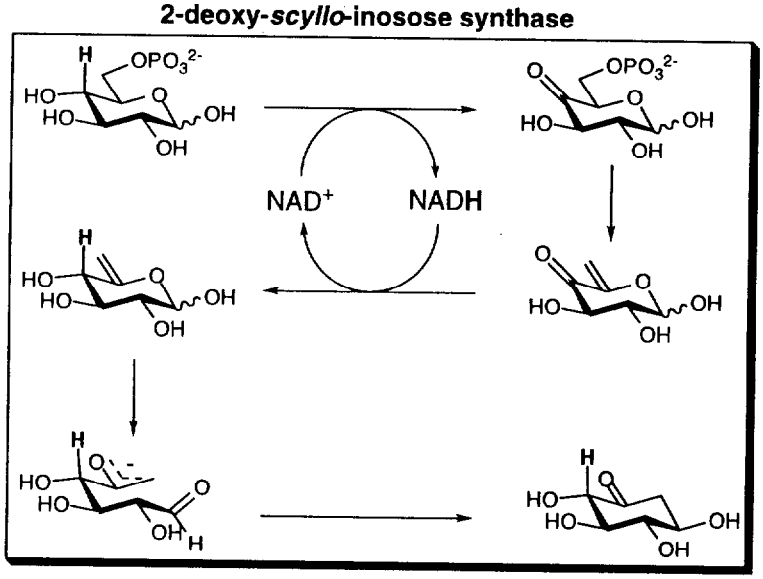


Fig. 36

2-3.4　デオキシ基質を用いた酵素反応解析

同じアミノグリコシド抗生物質であるストレプトマイシンのN-メチル-L-グルコサミン部分はD-グルコースより炭素鎖が切れることなく生合成されることが知られている[57]。この酵素反応では基質3位の水素が失われることが観測され、ケト-エノール平衡によるエピメリ化という反応機構が考えられている（Fig. 37）。

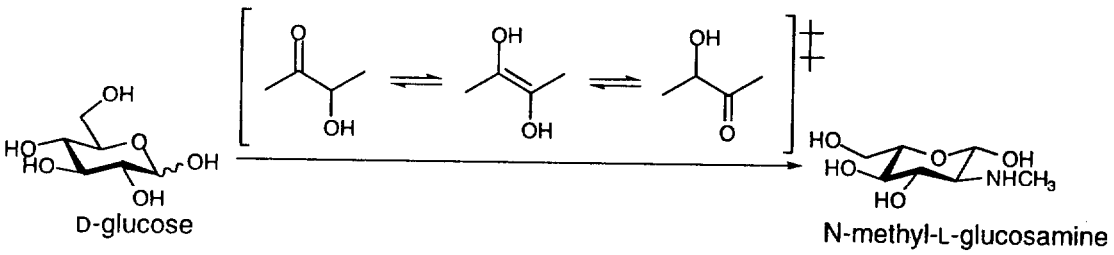


Fig. 37

つまり、DOI合成酵素反応においても、まず2位や3位が酸化されて最終的に5位が活性化される可能性がある。そこで、基質2位または3位の酸化を基点としたケトーエノール平衡を経て反応が進行する可能性を検証するため、各種デオキシG-6-Pを用いた酵素反応の検討を当研究室のIwaseとの共同研究により行った[50]。

先と同様に精製したDOI合成酵素を用いて、2-デオキシ-G-6-P、3-デオキシ-G-6-P、4-デオキシ-G-6-Pを基質として酵素反応に付し、その酵素反応生成物をHPLCおよびGC-MSで分析した。2-デオキシ-G-6-P、3-デオキシ-G-6-Pからは相当する環化体が検出されたのに対し、4-デオキシ-G-6-Pからは環化生成物を検出することができなかった（Fig. 38）[50]。

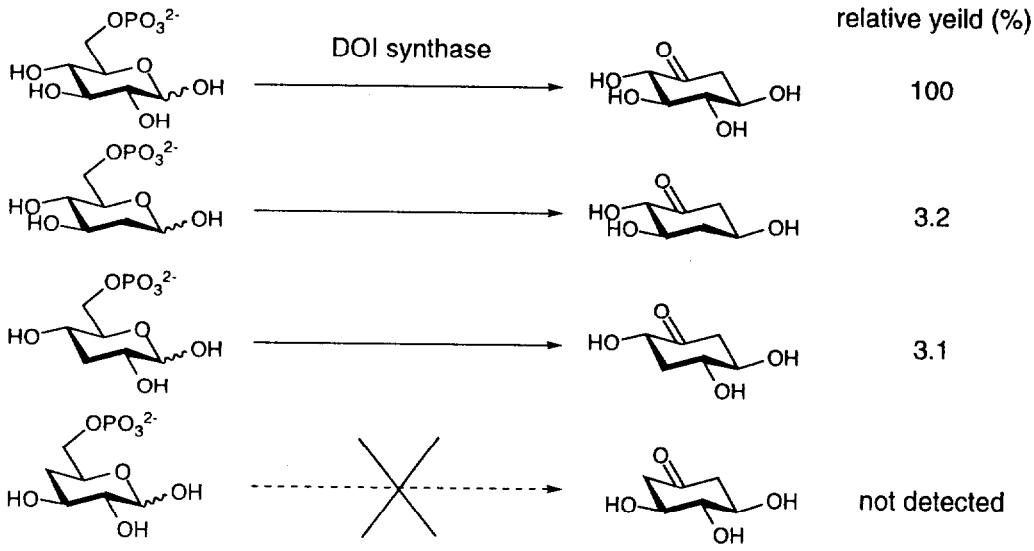


Fig. 38

このことは2位、3位の水酸基は反応機構には直接関与しないことを示しており、4位の酸化を基点として酵素反応が進行することを裏付けるものである。また、2-デオキシ-G-6-P、3-デオキシ-G-6-Pを用いたときの反応はG-6-Pに対し約3%と見積もることができ、反応効率が非常に低いこともわかった。2位、3位の水酸基は基質認識には重要な置換基であることを示唆するものと思われる。

2-4 結論

無細胞抽出液を用いた酵素反応では、微量であったがDOIの生成が観測された。硫安分画により精製し改めて酵素反応を検討したところ、基質として [6,6-$^2H_2$]G-6-Pを用いたときに明らかに標識基質由来の生成物を観測することができた。この結果、*B. circulans*菌体内にDOI合成酵素が存在することを示すことができた。

DOI合成酵素の精製はTable 2に示すように部分精製はできたものの、まだ峡雑タンパク質が多く存在した。安定に取り扱えることがわかったので、Q Sepharose担体を用いたクロマトグラフィー後の活性画分Bに対し、TSK gel AF-Blue-Toyopearl 650ML（NADアフィニティー担体）、TSK gel G3000SW、Superdex 75 HiLoad 26/60、Superdex 200 HiLoad 26/60（ゲル濾過）、各種疎水クロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5など各種担体を用いてクロマトグラフィーを検討したが、活性の総量も少なく精製法の検討が困難であった。DOI合成酵素の精製については次章で詳細に述べる。

Table 2. 1U = nmol/min DOI production

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Recovery (%)
Extract	1024	n.d.	1.32×10^{-3}	n.d.	-
45-70%sat. $(NH_4)_2SO_4$	616	n.d.	2.19×10^{-3}	n.d.	n.d.
DEAE	118	2.82	2.39×10^{-2}	18.1	100
Q	11.6	0.36	3.10×10^{-2}	23.5	13.5

二重標識体としてD-[4-^{2}H,3-^{18}O]G-6-Pのみ、非標識体としてG-6-Pのみを基質としたもの、および、二重標識体と非標識体を7:3で混合した基質として酵素反応を追跡した実験から、基質4位水素はスクランブリングをすることなく元の分子に保持されること、および、その部位における酸化還元反応のときの同位体効果k_H/k_D 2.4が観測された。つまり基質4位において酸化還元反応が起きているが、酵素反応中には補酵素NAD^+-NADHおよび反応中間体が酵素外には遊離していないことが明らかになった。このことは*S. fradiae*由来のDOI合成酵素反応機構との相同性を示している。つまりDOI合成酵素は生物種による違いはなく基質G-6-Pの4位でNAD^+を触媒的に要求する酸化還元反応、脱リン酸化、アルドール型炭素-炭素結合形成反応を含む多段階反応を単一酵素として触媒することが明らかになった（Fig. 36）。また、2-デオキシ-、3-デオキシ-G-6-Pからは環化体が生成するのに対し、4-デオキシ-G-6-Pから環化体が生成されないことから、基質4位の酸化が基点となって酵素反応が進行することが裏付けられた。

第３章　2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素の精製[58)]

3-1　序

第２章で述べたとおり、硫安分画、DEAE cellulofine-A-800担体を用いたクロマトグラフィー、Q Sepharose担体を用いたクロマトグラフィーにより2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素（DOI合成酵素）を部分精製することができた。その部分精製酵素に対し各種クロマトグラフィーにより精製を検討したが、DOI合成酵素を電気泳動的に純粋になるまで精製することはできなかった。これは酵素源として用いている*B. circulans*培養菌体内のDOI合成酵素の絶対量が非常に少ないことに起因していると考えられる。序論にも述べたとおり、一般的に二次代謝の酵素は微量しか含まれていない。DOS含有抗生物質の生合成酵素についてはDOIのアミノ基転移酵素について部分精製が報告されているが[24,25)]、単離同定の報告は現在のところ一つもなく、この抗生物質生合成酵素は生産菌内に微量しか存在しない可能性が高い。そこで培養スケールを大きくして酵素源となる菌体を大量に得ることができれば、酵素を単離できる可能性がある。また、培養条件、特に集菌時期によりDOI合成酵素含有量が異なることが考えらる。そこで、DOI合成酵素を単離同定するためにもう一度培養条件から検討することにした。

3-2　実験方法

用いた機器は基本的に第２章と同じである。

振とう培養はトーマス社製振とう培養装置もしくは高崎科学器械株式会社製振とう培養装置を用いた。

タンパク質精製におけるHPLCはFPLC（ファルマシア）を用いて行った。タンパク質精製にはMono Q HR 10/10、Mono P HR 5/20、Superdex 200 HiLoad 26/60（ファルマシア）とTSK gel AF bluetoyopearl 650、TSK gel G3000SW（トーソー）とDEAE cellulofine-A-800（チッソ）をタンパク質精製時におけるクロマトダラフィーに用いた。

3-2.1　　使用した菌株

第２章と同様に*Bacillus circulans* SANK 72073株を用いた。

3-2.2　　培養条件

第2章で述べたNB-1%グリセロール培地とSBM-1%グリセロール培地を用いて培養し、得られた菌体をDEAEクロマトグラフィー段階まで部分精製しDOI合成酵素活性量を比較した。

集菌時期を検討するためにNB-1%グリセロール培地を28℃、180 rpmで培養し経時的に分取した。細胞濃度および抗菌活性は第2章と同様に測定した。各集菌時間の培養菌体を超音波により細胞破砕し、その遠心上清におけるDOI合成酵素活性を比較した。

検討後の培養条件

*B. circulans*のスラントに0.9% NaClを1 ml入れて白金耳で胞子を懸濁し、200 ml NB-1%グリセロール培地に植菌して28°C、180 rpmでOD_{660} が7.0-9.0になるまで前培養した。同様に準備した200 ml NB-1%グリセロール培地の入った24個のフラスコに前培養液を1 mlずつ加え、OD_{660} が 8.0-9.0に達するまで本培養した。6,000 x *g*で30分遠心分離し集菌した。これにより約80 gの菌体が得られた。培養菌体は50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)で洗浄し、精製に用いるまで-75℃で保存した。

3-2.3　　DOI合成酵素活性試験

第2章のHPLC法を改良して行った。70 µlの酵素溶液に対し、50 mM G-6-Pを10 µl、50 mM NAD^+を10 µl、50 mM $CoCl_2$を10 µl加えて酵素反応溶液とした（50 mM Tris-HCl緩衝液pH 7.7、最終反応液量100 µl、G-6-P、NAD^+、Co^{2+}の最終濃度は5 mMである)。酵素反応は46℃で1時間行った。メタノール100 µlを加えることにより反応を停止し、5 mg/ml *O*-(4-ニトロベンジル)ヒドロキシルアミン（NBHA）のピリジン溶液を20 µl加え、さらに60°Cで1時間反応させた。反応溶液は蒸発器で空気を吹き付けることにより蒸発乾固した。100 µlのメタノールを加え超音波洗浄機を用いて再溶解し、不溶物を遠心分離により除去した。その遠心上清を2 mlのクロロホルムと共にSep-Pak Plus Silica（Waters）に導入した。まず、未反応のNBHAをクロロホルム:メタノール（15:1）5 mlで除去し、次いで、DOIの*O*-(4-ニトロベンジル)オキシム誘導体をクロロホルム:メタノール（5:1）5 mlで溶出した。その溶液は蒸発乾固し、最終的に100 µlのメタノールに溶解してHPLC試料とした。そのうち5 µlをHPLCにて分析した。18%メタノール水溶液を展開溶媒として用い、262 nmの吸光度を経時的に測定した。

この方法で行った活性試験についても第2章と同様に検量線を作成した。

酵素活性の単位1 Uは1分間に1 nmolのDOIを生産できる量として定義した。

3-2.4　　DOI合成酵素の精製

FPLC以外の操作は4℃で行った。

培養菌体80 gを50 μMのフッ化フェニルメタンスルホニル（PMSF）と50 μM EDTAを含む50 mM Tris-HCl緩衝液（pH7.7）240 mlに懸濁させ、氷浴上ブランソンsonifier Type 250（outputコントロール4、duty cycle 50）で10分間の処理を10回（休止時間2分）繰り返すことにより細胞を超音波破砕した。その溶液を6,000 x gで1時間遠心分離し、上清を無細胞抽出液として用いた。

無細胞抽出液に、乳鉢ですりつぶした固体硫安を40%飽和になるように加えて1時間攪拌の後、6,000 x gで1時間遠心分離し、0-40%飽和硫安沈殿を得た。その上清はさらに70%飽和になるように硫安を加え、同様に操作して40-70%飽和硫安沈殿を得た。沈殿を最小量の50 μM PMSFと50 μM EDTAを含む50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)に溶解後、同じ緩衝液5 Lを外液とし、2時間後に一度外液を交換し12時間透析した。40-70%飽和硫安画分の透析後の溶液を酵素精製検討に用いた。

40-70%飽和硫安画分の透析後の溶液をDEAE-cellulofine A-800担体を充填したカラム（2.5 cm x 15 cm）に流し込んだ。吸着されない画分は緩衝液C (50 mM Tris-HCl、pH 7.7)で除去した。その後、緩衝液C300 mlと緩衝液D（50 mM Tris-HCl、0.2 M NaCl、pH 7.7）300 mlのリニアグラジエント法により塩濃度を増大させタンパク質を溶出した。

DEAE-cellulofine A-800担体を用いたクロマトグラフィー後のDOI合成酵素活性画分をCentriprep-10 (Amicon)を用い、2,000 x gで30分間の限外濾過を数回繰り返し、脱塩および約10 mlまで濃縮した。その濃縮液をTSK-gel AF-Blue Toyopearl 650 ML担体を充填したカラム（2.5 cm x 6.0 cm）に流し込んだ。吸着されない画分は緩衝液Cで除去した。その後、緩衝液E（50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl、pH 7.7）でタンパク質を溶出した。

TSK-gel AF-Blue Toyopearl 650 ML担体に吸着した画分を先に述べたと同様に限外濾過により約2 mlまで濃縮した。その濃縮液を緩衝液F（50 mM Tris-HCl、0.1 M NaCl、pH7.7）で平衡化させておいたSuperdex 200 HiLoad 26/60（FPLC）に導入した。流速2 ml/minで緩衝溶液Fを流すことでタンパク質を溶出した。

Superdex 200クロマトグラフィー後のDOI合成酵素活性画分を先に述べたと同様に限外濾過により約2 mlまで濃縮した。その濃縮液を緩衝液Fで平衡化させておいたMono Q HR10/10（FPLC）に導入した。流速2 ml/minで吸着されない画分は緩衝液Fで除去した。その後、緩衝液F中の緩衝液D30%と60%（緩衝液C中のNaCl濃度0.13と0.16 M）のリニアグラジエント法により塩濃度を増大させタンパク質を溶出した。

3-2.5　電気泳動

SDS-PAGEはLaemmliの方法に従い30 mAで、12.5%ポリアクリルアミドゲルでおこなった[54]。バイオ-ラッド社の低分子量マーカーlysozyme (14,400)、trypsin inhibitor (21,500)、carbonic anhydrase (31,000)、ovalbumin (45,000)、serum albumin (66,200)、phosphorylase b (97,400)と比較することにより変性条件下の分子量を見積もった。

Native-PAGEはDavisの方法に従い、ディスクゲル電気泳動によりおこなった[59]。

3-2.6　分子量の見積もり

Superdex 200クロマトグラフィーにおいてBDH Chemicals社のcarbonic anhydrase (30,000)、ovalbumin (45,000)、ovotransferrin (77,000)の溶出時間と比較することにより未変性条件下の分子量を見積もった。

3-2.7　精製DOI合成酵素のクロマトグラフィー分析

未変性の精製DOI合成酵素を緩衝液Fで平衡化したTSK-gel G3000SW Glass（日立L-4000 UVディテクターと日立D-2500インテグレーターと日立L-6320ポンプで構成したイナートHPLCシステムに接続）に導入して、流速0.2 ml/minで緩衝溶液Fを流した。溶出タンパク質はSDS-PAGEにて分析した。

0.1%SDSで変性させたDOI合成酵素は緩衝液G (50 mM Tris-HCl buffer、0.1 M NaCl、0.1 % SDS、pH 7.7)で平衡化した同じカラムに導入し、溶出タンパク質をSDS-PAGEにて分析した。

緩衝液H (25 mM Tris-HCl、pH 7.0)で平衡化した等電点で分離できるクロマトフォーカシングカラムMono P HR 5/20 （FPLC）に精製DOI合成酵素を導入し、ポリバッファー74 (ファルマシア)-HCl (pH 3.7)、流速1 ml/minで吸着したタンパク質を溶出した。溶出曲線およびSDS-PAGEにて分析した。

3-2.8　DOI合成酵素の生化学的性質

精製したDOI合成酵素溶液をpH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5の50 mM Tris-maleate-NaOH 緩衝液でCentricon-10 (Amicon)による限外濾過で緩衝液交換を行い、各pHの酵素溶液を得た。その溶液を用いて酵素活性試験を行い、至適pHを決定した。

金属要求性を検討するために$CoCl_2 \cdot 6H_2O$、$MgCl_2 \cdot 6H_2O$、$MnCl_2 \cdot 4H_2O$、$CuCl_2 \cdot 2H_2O$、$FeCl_2 \cdot 4H_2O$、$CaCl_2$、$ZnCl_2$、$NiCl_2 \cdot 6H_2O$を最終濃度5 mMになるよう

に酵素溶液加えて反応をおこなった。最終濃度1 mMになるようにEDTAを加え、金属のない条件とした。

酵素反応を25、30、37、42、46、50℃で行い、至適温度を検討した。

1 μMのDOI合成酵素を用いて酵素反応を経時的に追跡すると約2時間は直線的に反応が進行した。そこで、1時間後に酵素反応を停止し、1分間あたりのDOI生成量を初速度として定義した。

酵素反応速度論的定数を求めるためにG-6-Pの濃度は125から2000 μMに変化させて行った。得られた初速度の逆数を濃度の逆数に対してプロットするLineweaver-BurkプロットによりK_m、k_{cat}を求めた。また、NAD^+のK_mを求めるために濃度を62.5から1000 μMに変化させてG-6-Pの場合と同様に行った。

3-3 実験結果

3-3.1 培養条件検討

培養スケールを大きくすることを考えた場合、SBM培地の調製はきなこの抽出液を大量に使用するために困難であった。そこで、まず簡単に調製できる培地として第2章で述べたnutrient broth（NB）にグリセロールを加えた培地を用いることとし、SBM培地から得られた菌体からのDOI合成酵素活性と比較することにした。酵素活性が定量可能なDEAE担体を用いたクロマトグラフィーまで部分精製して比較すると、NB-1%グリセロール培地から得られた菌体からの方が高かった（Table 3、4）。

さらにNB-1%グリセロール培地で培養したときの集菌時期による酵素活性の違いを追跡することにした。経時的に集菌して菌体を超音波破砕後、遠心分離し上清を無細胞抽出液とし酵素活性試験を行った。

無細胞抽出液を用いた活性試験のため定量的な議論はできないが、明らかにちょうど定常期に入った時期に高いDOI合成酵素活性が観測された（Fig. 39）。対数増殖時期、定常期も後期になるとほとんど酵素活性が観測されなかった。すなわち、抗生物質は定常期に入る時期から蓄積されるが、DOI合成酵素は一時的に生産され、すぐに分解していくように思われた。

Table 3. NB + 1% glycerol

Step	Total protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/min/mg)
Extract	1596	n.d.	n.d.
45-70%sat. $(NH_4)_2SO_4$	934	n.d	n.d.
DEAE	339	**41.7**	0.123

Table 4. SBM + 1% glycerol

Step	Total protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/min/mg)
Extract	1820	n.d.	n.d.
45-70%sat. $(NH_4)_2SO_4$	506	n.d	n.d.
DEAE	258	**2.7**	0.01

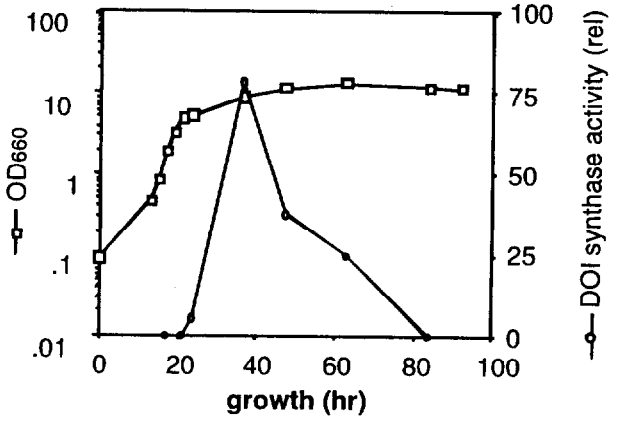


Fig. 39

以上の結果から、細胞増殖度とDOI合成酵素量を対応づけることができた。微妙な集菌時期の違いによりDOI合成酵素量が変化すると考えられ、常に細胞増殖度を測定し、定常期に入る時期で集菌し酵素精製を検討する必要のあることが明らかとなった。

3-3.2　　DOI合成酵素の精製

酵素精製法を検討する前にDOIのオキシム誘導体のpTLC処理をSep-pak(silica)で行うことにより従来の酵素活性試験法を簡略化した（Fig. 40）。

この方法では、回収率は1.4倍向上し、薄層クロマトグラフィーを行わないため短時間で化合物を抽出することができた。またDOI合成酵素反応は50 mM Tris-HCl (pH7.7)緩衝液中、G-6-P、NAD^+、Co^{2+}を最終濃度5 mMになるように加え、46℃で1時間行うこととした。その後*O*-(4ニトロベンジル)オキシム誘導体化するという手順でおこなった。

Co^{2+}イオンについては第2章でも述べたとおり、定量的には議論できていないが活性の向上が見られたため常時加えて酵素反応を行うことにした。また、酵素活性の単位1 Uは、上記の条件下（46℃、pH 7.7）1分間に1 nmolのDOIを合成できる活性と定義した。

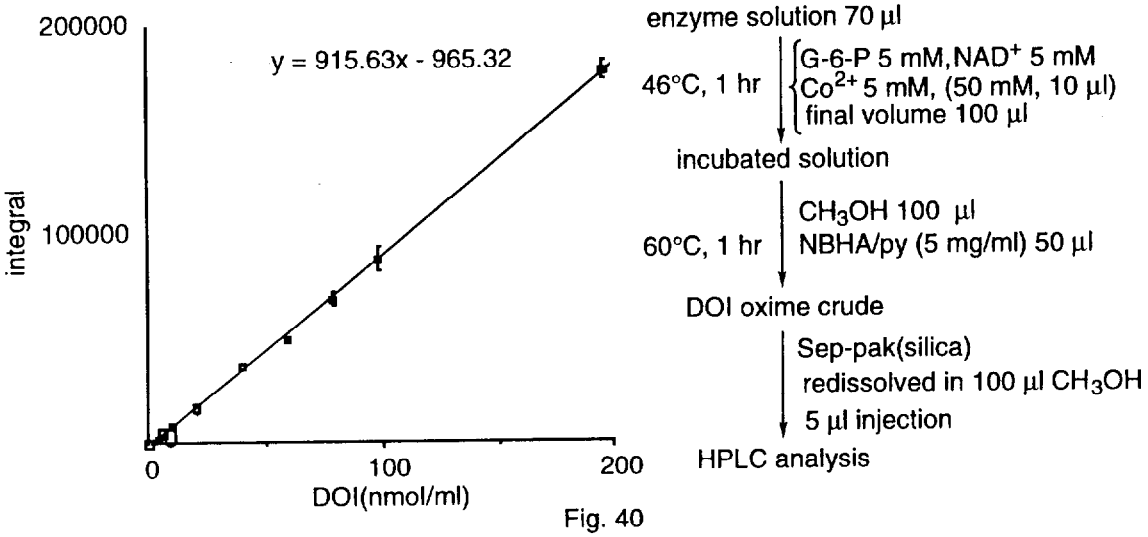


Fig. 40

*B. circulans*は4.8 LのNB-1%グリセロール培地を用いて培養したところ約80 gの菌体を得ることができ、酵素精製検討に用いた。菌体を0.3 g wet cell/mlになるように50 mM Tris-HCl (pH 7.7)緩衝液に懸濁し、ブランソン Sonifier-250を用いて、outputコントロール4、duty cycle 50で10分間の処理を10回繰り返すことにより超音波破砕した。その遠心上清を無細胞抽出液として用いた。

第２章で述べた短時間の超音波処理後の溶液からは遠心後の沈殿量が多く効率よく破砕されなかった。*Bacillus*属は細胞質膜に分岐脂肪酸が多いため長時間超音波処理しなければ多くの細胞が破砕されないと考えられる。

次に酵素精製の前段階として、第２章と同様に無細胞抽出液の硫酸アンモニウム（硫安）分画を検討した。無細胞抽出液を0-40%、40-70%、70%以上飽和硫安画分に分離し、12時間透析後、活性試験をおこなった。

無細胞抽出液、硫安分画後の溶液を用いた活性試験では、内在性の糖質誘導体と考えられる峡雑物が多数存在しHPLC分析で定量的に値を求めることができなかった。しかしながら、40-70%飽和硫安濃度画分の溶液にDOI合成酵素活性の大部分を確認することができたので、この溶液を用いて各種クロマトグラフィーを検討した。

40-70%飽和硫安画分の透析後の溶液を、DEAE-cellulofine A-800担体を充填したカラム（2.5 x 15 cm）に流し込んだ。緩衝液C（50 mM Tris-HCl、pH 7.7)で吸着しない画分を分離し、流速約3 ml/minで緩衝液C300 mlと緩衝液D（50 mM Tris-HCl、0.2 M NaCl、pH 7.7）300 mlのリニアグラジエント法で塩濃度を増大させタンパク質を溶出した（Fig. 41）。

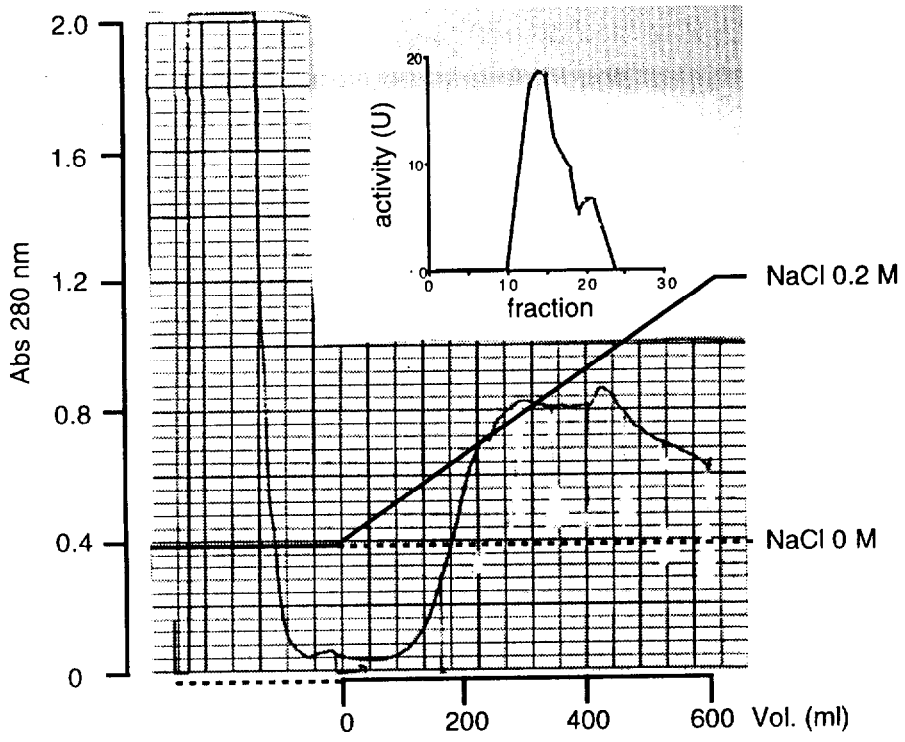


Fig. 41 DEAE cellulofine A-800 chromatography

．このDEAE-cellulofine A-800担体を用いたクロマトグラフィーでは吸着する画分と、吸着しない画分とで大きく二つにタンパク質を分離することができ、酵素活性は吸着する画分に認められた。

次にDOI合成酵素反応はNAD⁺の関与で進行するため、酵素自体はNAD⁺となんらかの相互作用をすると考え、NAD⁺アフィニティーを有するTSK gel AF-Blue-toyopearl 650ML（Blue-toyopearl）担体を充填したカラムでクロマトグラフィーを行った。このBlue-toyopearl担体はFig. 42に示す色素をリガンドとしてNAD⁺依存性タンパク質と相互作用するために、NAD⁺依存性の酸化還元酵素の精製にしばしば用いられ、有効性が示されている。

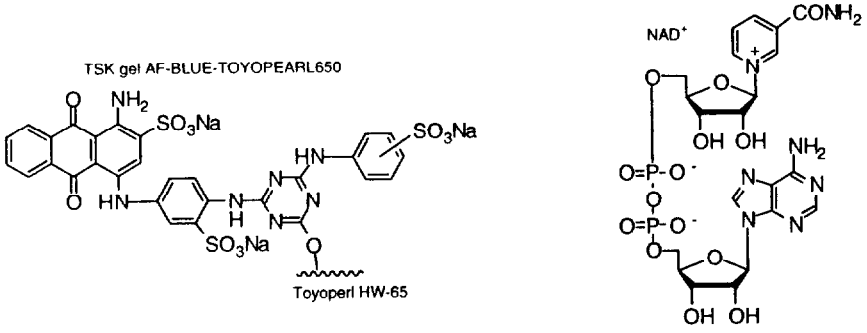


Fig. 42

DEAE-cellulofine A-800担体を用いたクロマトグラフィーで分離した活性画分をCentriprep 10 (amicon)を使用して、限外濾過により約10 mlまで濃縮、脱塩した。その濃縮液をBlue-toyopearl担体で充填したカラムに流し込んだ。緩衝液Cで吸着しない画分を分離後、緩衝液E（50 mM Tris-HCl、1 M NaCl、pH 7.7）で吸着タンパク質を溶出した（Fig. 43）。

吸着するタンパク質と、吸着しないタンパク質と大きく2分割することができ、活性のある画分は吸着した画分に観測された。DOI合成酵素がBlue-toyopearl担体と相互作用したと考えられる。

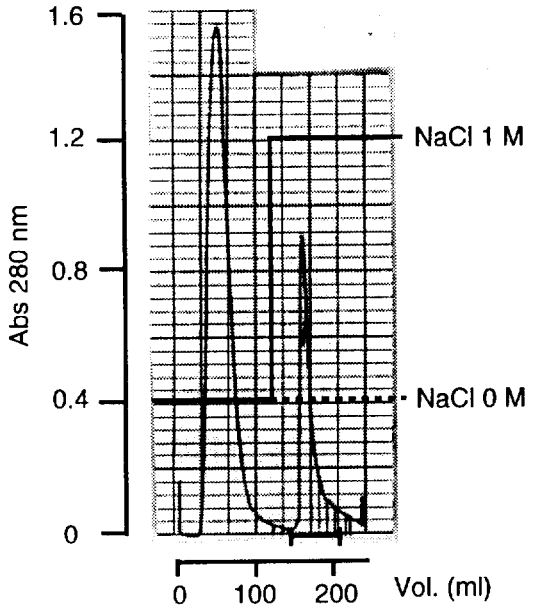


Fig. 43 Blue toyopearl chromatography

Blue-toyopearl担体を用いたクロマトグラフィーで分離した活性画分を先と同様にCentriprep 10で限外濾過することにより2 mlまで濃縮し、FPLCに接続したSuperdex 200 HiLord26/60でゲル濾過クロマトグラフィーを行った(Fig.44)。

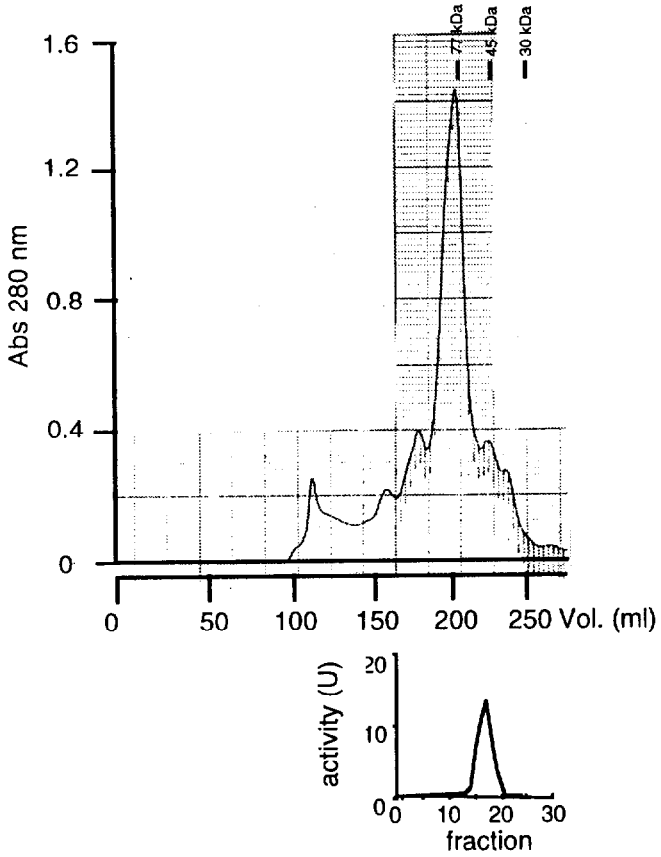


Fig. 44 Superdex 200

その結果DOI合成酵素活性画分は分子量約50 kDa-60 kDaの溶出時間に観測された。

次に精製の最終段階としてFPLCに接続したMono Q HR10/10でイオン交換クロマトグラフィーを検討した。狭い濃度範囲でのNaCl濃度勾配で緩衝液の塩濃度を上げることにより吸着したタンパク質を溶離した（Fig. 45）。

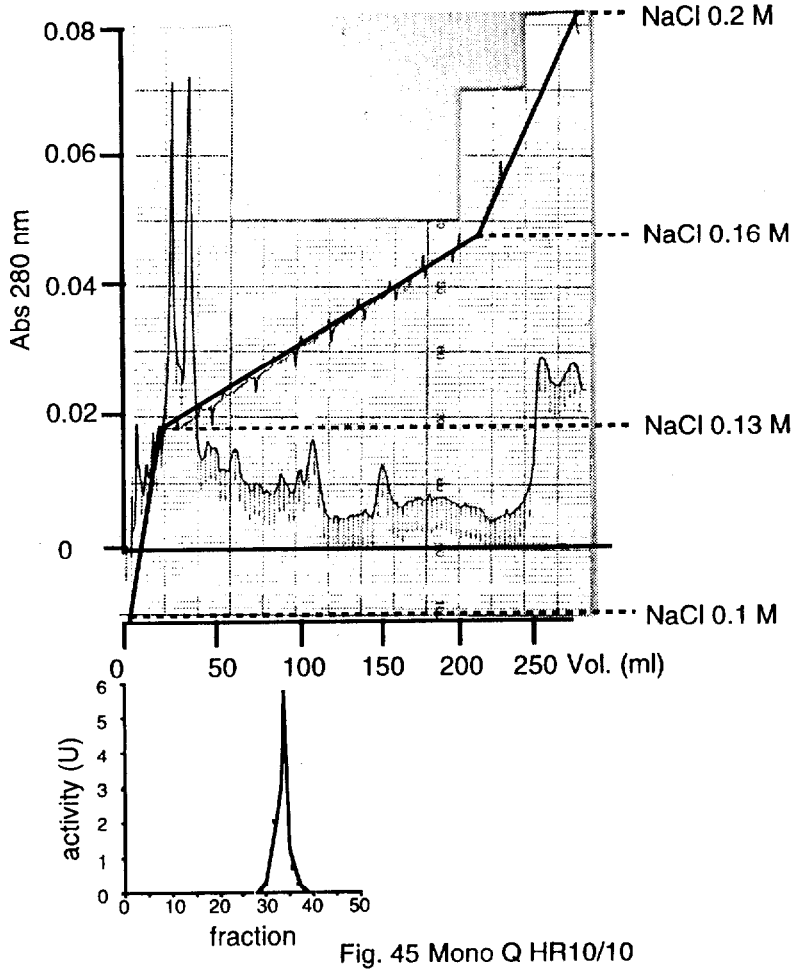


Fig. 45 Mono Q HR10/10

Mono Qを用いたクロマトグラフィー後の酵素活性画分は電気泳動的に純粋なタンパク質として酵素を得ることができた（Fig. 46A, lane 6）。タンパク質はSDS-PAGE上23 kDaと42 kDaの二つのバンドに分離したが、Native-PAGEにおいては単一バンドとして観測された（Fig. 46B）。

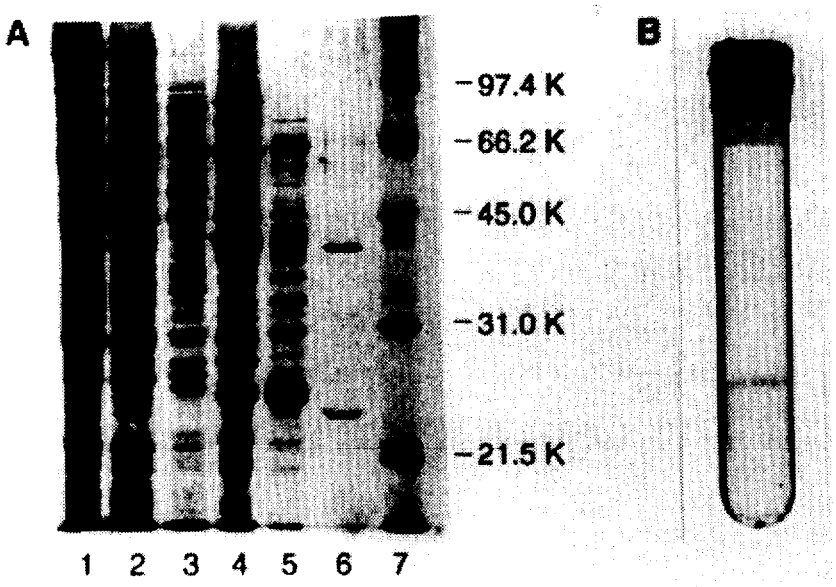


Fig. 46 Electrophoresis of purified DOI synthase
A: SDS-PAGE: lane 1; cell free extract, lane 2; $(NH_4)_2SO_4$ precipitation lane 3 DEAE, lane 4; Blue, lane 5; Superdex 200, lane 6; Mono Q, lane 7, marker
B: Native-PAGE

つづいてMono Qを用いたクロマトグラフィー後の酵素活性画分用いて未変性条件下および変性条件下（0.1%SDS存在下）、TSK-gel G3000SWを用いたゲル濾過クロマトグラフィーで分離様式を分析した。微量の酵素で検討を行ったためHPLCの溶出曲線からはよく分からなかったが、各画分を電気泳動により分析したところ、変性条件下においては23 kDaと42 kDaのサブユニットに分離したのに対し、未変性条件下では分離せず1つの画分に溶出していることがわかった。

また、等電点で分離できるMono Pを用いたクロマトグラフィーにて分離を試みたが、溶出曲線は単一ピークを与え、SDS-PAGEでも分離していないことが観測された（Fig. 47）。

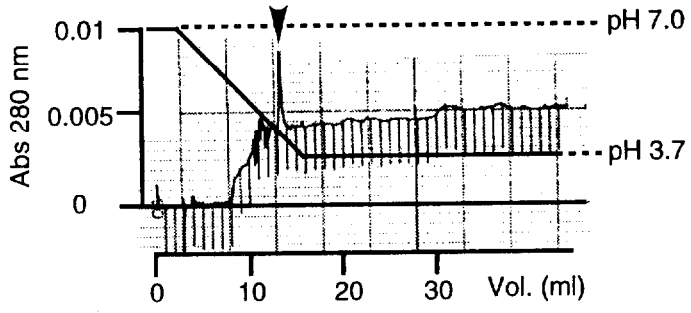


Fig. 47 Mono P

これらの結果、*B. circulans*由来のDOI合成酵素を純粋に精製することができ、本酵素は未変性条件下では23 kDaと42 kDaのサブユニットからなる分子量65 kDaのタンパク質であることが明らかとなった。

3 - 3 . 3　　DOI合成酵素の生化学的性質

*B. circulans*から純粋なDOI合成酵素を得ることができたので、本酵素の生化学的諸性質について決定することにした。まずはじめに、酵素反応の至適pHを検討した。

pH 5.5-8.5の50 mM Tris-maleate-NaOH緩衝液で、Centricon-10 (Amicon)による限外濾過により緩衝液交換を行い、各pH 5.5-8.5の酵素溶液を調製した。その溶液を用いて酵素反応を追跡した（Fig. 48）。

その結果pH 7.5-8.0で最大活性を示すことがわかった。これは、反応機構が類似すると考えているデヒドロキナ酸合成酵素（DHQ）合成酵素の至適pHと一致している[60]。

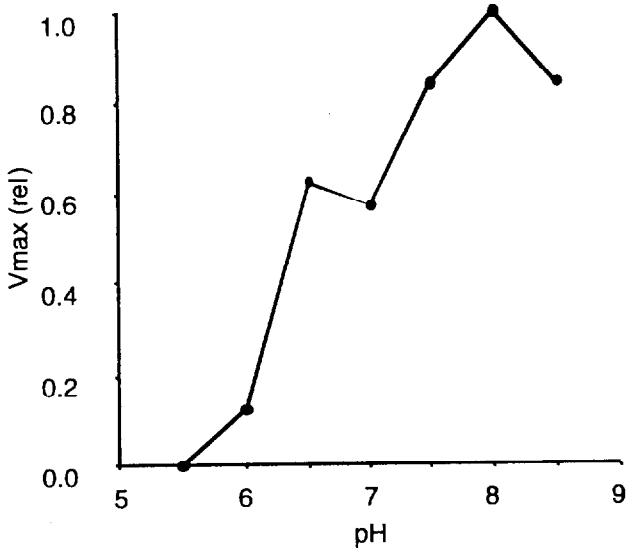


Fig. 48

次に反応温度について検討した。25から50℃まで反応温度を変化させ酵素反応を追跡した（Fig. 49）。

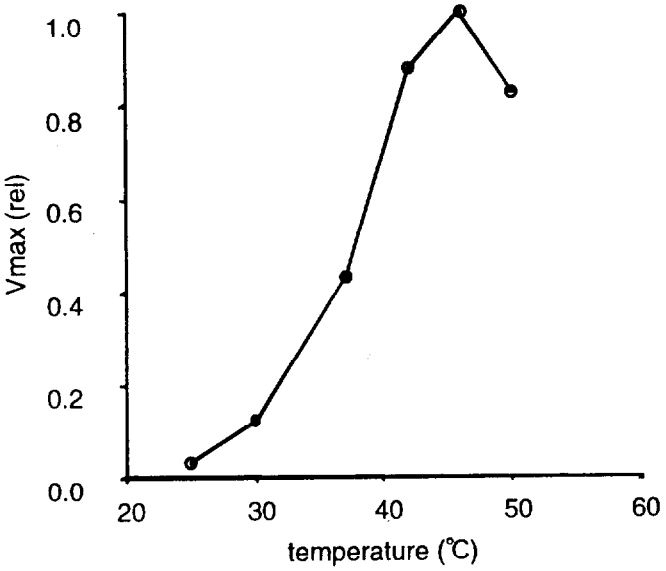


Fig. 49

その結果、比較的高温と思われる46℃で最大活性を示した。このことはDOI合成酵素が比較的安定であることを示しているが、一方高温でないと酵素反応が効率よく進行しないことも示している。

次に各種二価の金属イオンに対する依存性を調べた(Table 5)。

Table 5

additive	relative Vmax	additive	relative Vmax
none	0.353	Co^{2+}	1
Mg^{2+}	0.398	Ni^{2+}	0.163
Ca^{2+}	0.367	Cu^{2+}	0
Mn^{2+}	0.376	Zn^{2+}	0
Fe^{2+}	0.099	EDTA	0

1 mM EDTAを加えた条件下では全く活性を示さなかったのに対し、5 mM Co^{2+}イオン存在下では最大活性を示した。このことは明らかに二価の金属イオンによりDOI合成酵素反応が促進されることを示している。他の二価金属イオンについてはMg^{2+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}の存在は酵素活性に影響を与えなかった。Fe^{2+}、Ni^{2+}は若干の阻害を示しCu^{2+}、Zn^{2+}は完全に酵素活性を阻害した。これらの結果はDOI合成酵素はCo^{2+}イオンだけを特異的に補因子として用いて反応を触媒することを示している。

以上検討してきた最適な酵素反応条件下で経時的に反応を追跡した(Fig. 50)。

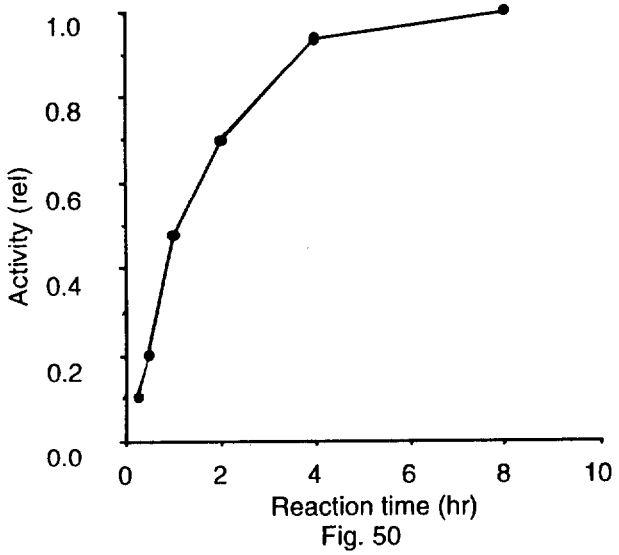


Fig. 50

精製酵素を約1 μM用いた反応条件下では2時間は直線的に酵素反応が進行することが明らかとなった。そこで、最適な酵素反応条件下1時間後に反応を停止し

一分間あたりの生成物量を初速度として、酵素反応速度論的定数を求めることにした。

まずはじめに、最適な酵素反応条件下、G-6-Pの濃度だけを変化させて酵素反応をおこなった。Fig. 51にLineweaver-Burkプロットを示す。

このグラフからK_mは9.0×10^{-4} M、k_{cat}は7.3×10^{-2} s^{-1}、k_{cat}/K_mは82 $M^{-1}S^{-1}$（46℃、pH 7.7）と求まった。

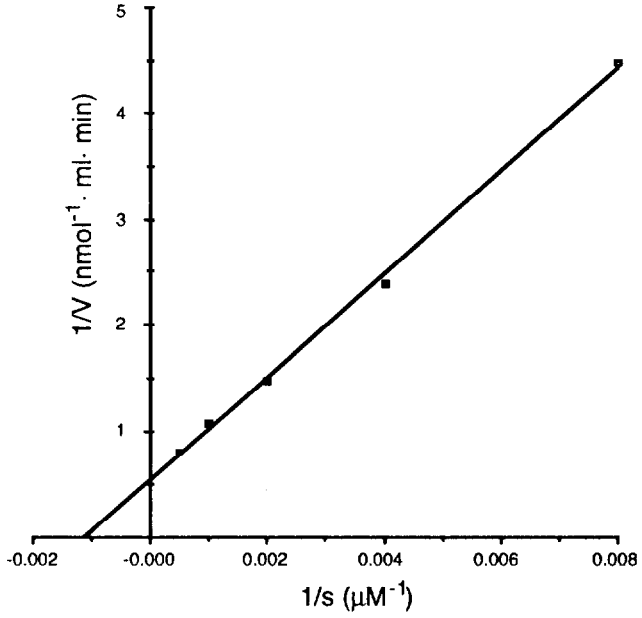


Fig. 51

次に補酵素NAD^+についても同じ条件で、NAD^+の濃度だけを変化させて酵素反応をおこなった。Fig. 52にLineweaver-Burkプロットを示す。

このグラフからNAD^+に対するK_mは1.7×10^{-4} Mと求まった。

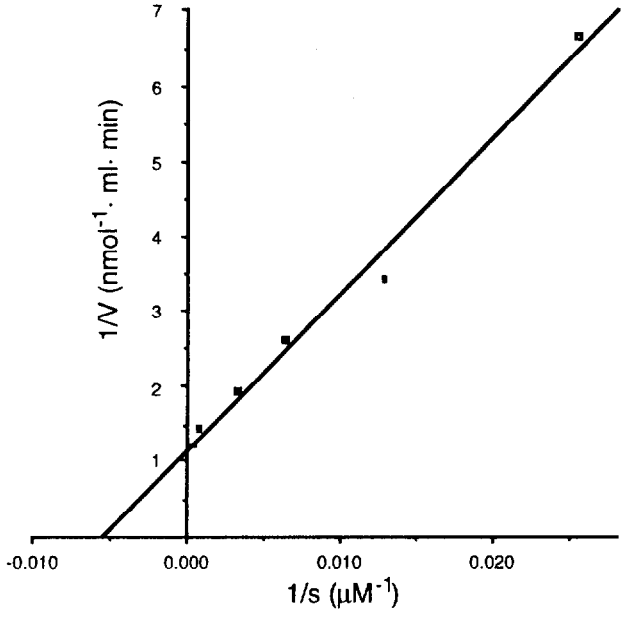


Fig. 52

3-4 考察

3-4.1 培養条件について

培地の違いによる培養菌体からのDOI合成酵素活性を比較し、NB-1%グリセロール培地で培養したときにより多くのDOI合成酵素が存在することが分かった。また、集菌時期を検討し明らかにちょうど定常期に入った時期に高いDOI合成酵素活性を観測した。

すなわち、NB-1%グリセロール培地で培養し、ちょうど定常期に入った時期に集菌することにより、多くのDOI合成酵素が存在する培養菌体を精製検討に供することができた。

抗生物質は定常期に入る時期から蓄積されるが、DOI合成酵素は一時的に生産されすぐに分解していくように思われた。この現象は微生物二次代謝の制御とも関わっている可能性があり興味深いが、現時点では理由はよく分からない。DOI合成酵素および他のブチロシン生合成酵素の抗体によるウエスタンブロティング解析などによる検討が必要であろう。

3-4.2 DOI合成酵素精製について

*B. circulans*の培養菌体（4.8 L培養スケール）からのDOI合成酵素の精製法をTable 6.にまとめる。

Table 6

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Recovery (%)
Extract	5516	n.d.	n.d.[a)]	n.d.[a)]	n.d.[a)]
40-70%sat. $(NH_4)_2SO_4$	2431	n.d.	n.d.[a)]	n.d.[a)]	n.d.[a)]
DEAE	817	99.7	0.122	1	100
Blue	119	42.4	0.356	2.87	42.5
Superdex 200	9.787	60.8	6.23	51.1	61.0
Mono Q	0.778	14.1	18.1	148	14.1

a) not determined

Blue-toyopearl担体を用いたクロマトグラフィー後の活性は塩濃度が高いため活性が低く見積もられていると考えられる。また、無細胞抽出液、硫安分画後の溶液では酵素活性を定量できなかったので、収率、精製度はDEAE-cellulofine A-800担体を用いたクロマトグラフィー後の酵素活性から計算した。最終的に150倍まで酵素精製度を高めることができ、約14%の活性が回収された。タンパク質が一般的に不安定なことを考えると比較的効率のよい精製法である。

この精製法においては第2章のQ Sepharose（Mono Qと同じ官能基を有する）担体を用いたクロマトグラフィー後のように2つの活性画分は観測されなかった。緩衝中の塩濃度を考えると活性画分Bだと推定される。培地成分や、微妙な集菌時期などの培養条件の違いに起因すると思われるが今のところよく分からない。

3-4.3　DOI合成酵素の構造について

DOI合成酵素はSDS-PAGE上23 kDaと42 kDaの二つのバンドに分離したが、Native-PAGEにおいては単一バンドとして観測された。そこで未変性条件下では23 kDaと42 kDaのサブユニットからなるヘテロダイマーとして存在すると予想され、各種クロマトグラフィーにより分離様式を検討した。未変性条件下および変性条件下（0.1%SDS存在下）ゲル濾過クロマトグラフィーを検討した結果、変性条件下においては23 kDaと42 kDaのタンパク質が分離したのに対し、未変性条件下では分離せず1つの画分に溶出していることがわかった。さらにMono Pを用いたクロマトグラフィーでも23 kDaと42 kDaのタンパク質は分離しなかった。これらの結果から*B. circulans*由来のDOI合成酵素は未変性条件下では23 kDaと42 kDaのサブユニットからなる分子量65 kDaのヘテロダイマーであることが明かとなった。

しかしながら、未変性条件下でのゲル濾過クロマトグラフィーの溶出時間から推定される分子量は54 kDaでありSDS-PAGEから見積もられる分子量と異なっていた。すなわち、23 kDaと42 kDaのサブユニットは密に結合していると考えられる。

第1、2章で述べたとおり、DOI合成酵素と芳香族アミノ酸生合成におけるシキミ酸生合成経路中のデヒドロキナ酸（DHQ）合成酵素（AroB）は反応機構の点で類似性があり、酵素構造にもそれが反映されていると考えられる。FrostらやMillarらにより*E. coli*由来のDHQ合成酵素の分子量は39 kDaの単量体酵素として報告されている[32,61]。また*B. subtilis*のDHQ合成酵素（AroB, SWISS-PROT p31102）は遺伝子配列から41 kDa、*E. nidulans*のDHQ合成酵素（Pentafunctional AROM polypeptideのN末端部分、SWISS-PROT、P07547）はHawkinsらにより43 kDaと報告されている[62]。他の生物種から報告されているAroBのサイズも大体40

kDa前後である。分子量の比較だけなので一概には結論できないが、本研究においてB. circulansから同定されたDOI合成酵素はヘテロダイマーであるが、分子量的に42 kDaのサブユニットだけが触媒反応に関与しているとも考えられる。

HasanらによりB. subtilisから精製されたDHQ合成酵素は、コリスミ酸合成酵素とフラビン還元酵素と会合した状態で存在している[63]。また、Frostらが報告しているE. coliから精製されたDHQ合成酵素の電気泳動にも峡雑バンドがいくつか存在している[32]。このことを考慮すると23 kDaのサブユニットはDOI合成酵素反応には直接関与していない可能性が示唆される。

3-4.4 DOI合成酵素の生化学的性質について

このDOI合成酵素活性の至適pHは7.5-8.0でありDHQ合成酵素活性反応における至適pHと一致している。すなわち、DHQ合成酵素反応と同様のイオン化過程が存在すると考えられるが、詳細は今のところわからない。

酵素反応温度については46℃という比較的高温で効率よく進行することが明らかになった。すなわち、DOI合成酵素は46℃では安定に存在し反応を触媒していることを示している。酵素の安定性という点では、-75℃で何も加えずに6カ月保存後も活性の減少がほとんど見られなかったことから、低温でも安定に存在していると考えられる。つまり、B. circulans由来DOI合成酵素は比較的安定な構造をとって反応を触媒していることが予想される。

DOI合成酵素反応はCo^{2+}イオンだけにより活性化された。種々の菌種から同定されたDHQ合成酵素反応もCo^{2+}イオンにより活性化される。しかしながら、E. coli由来のDHQ合成酵素ではZn^{2+}（高濃度だと阻害を示す）[60]、B. subtilis 由来の酵素ではMn^{2+}でさえ活性化される[63]。真核生物のE. nidulansのDHQ合成酵素においてはZn^{2+}や三価の金属イオンEu^{3+}、Sm^{3+}までもが酵素活性を向上させることがMooreらにより報告されている[64]。DOI合成酵素と様々なDHQ合成酵素の間にはCo^{2+}が活性を向上させるという点では基本的に類似の構造を有しているが、他の金属イオンにおける相互作用の違いはこれらの酵素間に明らかな違いが存在すると考えられる。

E. coli由来のDHQ合成酵素の速度定数はk_{cat}/K_mは$2.5 \times 10^{7}\ M^{-1}S^{-1}$、$NAD^+$に対する$K_m$は$8.0 \times 10^{-10}$ M（20℃、pH 7.75）とBenderらによって報告されている[60]。基質が異なるので単純に値を比較することはできないが、本研究で単離されたDOI合成酵素はそれほど効率のよくない酵素であるとわかった。DOI合成酵素は二次代謝の酵素であり、生物にとって基本的には必要のない反応であるためと考えられる。

3-5 結論

*B. circulans*の培養菌体からDOI合成酵素を電気泳動的に純粋になるまで精製することができた。DOI合成酵素の単離同定は2-デオキシストレプタミン（DOS）含有アミノ配糖体抗生物質の生合成酵素の中で初めての報告である。本酵素は23 kDaと42 kDaのサブユニットからなるヘテロダイマーの酵素であることが明らかとなった。また金属要求性をはじめ、基本的な生化学的な性質が明らかになった。そして酵素反応速度論的定数を求め、比較的効率のよくない酵素であることが示唆された。

*B. circulans*からのDOI合成酵素の精製法が確立されたが、今後さらに詳細な酵素反応機構を解析するには精製できる量が少なく困難が予想された。そこでDOI合成酵素遺伝子をクローニングし大量発現させることが重要であると考えられる。このことについては第4章で詳しく述べる。

第４章　2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素遺伝子の探索[65)]

4-1　序

序論でも述べたとおり、ペニシリンやグラミシジンなどのペプチド系抗生物質、エリスロマイシンやダウノルビシンなどのポリケチド系抗生物質、ストレプトマイシンの生合成酵素については既に遺伝子解析まで報告されている。これら生合成遺伝子の取得方法を以下にまとめる。

1　生合成遮断変異株を利用するもので、その変異遺伝子を相補する遺伝子を探索する方法。

2　耐性遺伝子を指標にして探索する方法。抗生物質生産菌は自身の作る抗生物質から身を守るため抗生物質を修飾、排出するなどの機構、すなわち耐性を持っているが、この抗生物質に対する耐性を司る遺伝子が生合成酵素遺伝子と深く関連することがいくつかの抗生物質の生合成系で発見されている。

3　予想される生合成酵素遺伝子の相同性を指標にして探索する方法。ポリケチド系抗生物質生合成においてはその酵素遺伝子（PKS遺伝子）の相同性が高く、その遺伝子を指標にして探索する方法で多くの生合成酵素遺伝子が同定されてきた。

4　生合成酵素を単離、部分的にアミノ酸配列を決定し、その配列をコードするDNAを指標に探索する方法（Reverse Genetics）。

ほとんどのバクテリア、真菌の二次代謝産物の生合成酵素遺伝子は染色体遺伝子上でクラスターを形成していることが明かとなっているため、これらの方法によりある一つの生合成遺伝子が取得できれば、その遺伝子の周辺を解析することにより、全ての生合成遺伝子を発見できる可能性がある。

アミノグリコシド抗生物質においては、ストレプトマイシン生合成酵素遺伝子についてはPiepersbergらにより２の方法で、フォーチミシン生合成酵素遺伝子についてはHasegawaらにより1の方法で同定されている[18,19)]。一方、DOS含有アミノグリコシド抗生物質の生合成においては生合成遮断変異株を用いた遮断された段階の反応解析やcosyntesisによる生合成逐次過程の解析が報告されているが、それを利用した生合成酵素遺伝子についての報告は一つもない。

DOS含有アミノグリコシド抗生物質の耐性機構については多くの研究がなされており、水酸基もしくはアミノ基のアセチル化、リン酸化、アデニル化によることが明らかにされている。さらにその耐性酵素遺伝子はアミノグリコシドのどの部位を修飾する酵素をコードする遺伝子であるかにより分類されている[66]。*B. circulans*におけるブチロシン生合成遺伝子を取得することを目的として、耐性遺伝子であるアミノグリコシドリン酸化酵素遺伝子（*aphA4/butA*）の周辺がJ. Daviesらによって解析された[67]。その結果、*aphA4/butA*の上流の遺伝子は、ブチロシンの輸送に関与するタンパク質遺伝子として同定されたが、ブチロシンの生合成に関する遺伝子はいまだに見つかっていない。この結果はブチロシン生合成遺伝子では耐性遺伝子を指標にした探索が困難である可能性を示している。つまり抗生物質の生合成酵素遺伝子クラスター近傍には耐性遺伝子の存在が知られているが、全ての耐性遺伝子が近傍にあるわけではないということである。

本研究では、第３章で述べたとおりブチロシン生合成酵素の一つであるDOI合成酵素の単離同定に成功している。そこでDOI合成酵素の部分的なアミノ酸配列を決定し、それをもとにDNAプローブを作成し、生合成酵素遺伝子を直接探索する、いわゆるReverse Geneticsにより、DOI合成酵素遺伝子が取得できるはずである。酵素遺伝子が取得できれば、その推定アミノ酸と、反応機構が類似しているDHQ合成酵素との酵素一次構造の比較が重要であると考えられる。また、*B. circulans*のいくつかの遺伝子については*E. coli*においての発現の報告もあり[68]、*B. circulans*の菌体からは微量しか得られないDOI合成酵素を大量に得ることができる可能性がある。本章では、それゆえDOI合成酵素遺伝子の探索を行うことにした。

また、DOI合成酵素遺伝子が取得できれば、他のブチロシン生合成酵素遺伝子も同定できる可能性もあり、DOS含有抗生物質生合成研究における新展開も期待できると考えられた。

4 - 2　実験方法

用いた機器は基本的に第２、３章と同じである。

^{1}H-NMRスペクトルは日本電子株式会社製Lambda-300 (300 MHz)、Lambda-400 (400 MHz)を用いて測定した。CD_3OD (Merck, 99.8 atom%enriched)を溶媒として測定し、δ3.30を内部標準とした。

^{2}H-NMRスペクトルはCH_3OHを溶媒として日本電子株式会社製Lambda-400 (61.4 MHz)を用いて測定した。測定中は重水素ロックを切り、通常の溶媒中の天然に存在する重水素同位体の重水素シグナルを内部標準として測定した。

超純水はミリポア社製ミリ-Qラボ超純水製造装置を用いて製造した。

DNA塩基配列分析はライカー社製モデル4200を用いて行った。

PCRはパーキンエルマー アプライドバイオシステム社製モデル9700サーマルサイクラーを用いて行った。

DEAE-Sepharose FAST FLOW、Superdex 200 HiLoad 26/60（ファルマシア）を酵素精製に用いた。

各種制限酵素とT4 DNA ligaseはタカラ社から購入した。

オリゴヌクレオチドはファルマシア社から購入した。

4-2.1 使用した菌株と培養条件

DOI合成酵素、染色体DNAを得るために第2、3章と同じ*Bacillus circulans* SANK 72073を用いた。NB-1%グリセロールで培養し菌体を得た。

DOI合成酵素遺伝子をクローニングするための宿主として*Escherichia coli* JM 105 (*supE endA sbcB*15 *hsdR*4 *rpsL thi* Δ(*lac-proAB*) F' [*traD*36 *proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ*ΔM15]) を用いた。

DOI合成酵素遺伝子を発現させる宿主として*E. coli* BL 21 (DE3) (*hadS gal* (λcI*ts*857 *ind*1 Sam7 *nin*5 *lac*UV5-T7 gene *1*)を用いた。

大腸菌はLuria-Bertani（LB; 1%トリプトン（DIFCO）、0.5%酵母エキス（DIFCO）、1%NaCl）液体培地もしくはLB寒天（1.5%寒天）培地を用い37℃で培養した。

プラスミドpUC19をクローニングベクターとして用いた。pUC19で形質転換した*E. coli*は50 μg/ml アンピシリンを含むLB培地で培養した。

プラスミドpET30b(+) (Novagen)を発現ベクターとして用いた。pET30で形質転換した*E. coli*は30 μg/ml カナマイシンを含むLB培地で培養した。

4-2.2 アミノ酸配列

4-2.2.1 N末端アミノ酸配列

B. circulans から精製した5 μgのDOI合成酵素を12.5 % Tricine-SDS-PAGEで23 kDaと42 kDaのサブユニットに分離した[69]。アクリルアミドゲルからPVDF膜(Millipore)にエレクトロブロッティングによりペプチド断片を転写し、クマシーブリリアントブルーで染色後、それぞれのバンドを切り出した。それぞれのバンドは島津LC 10AS液体クロマトグラフィー装置および島津SPD-10A UV-VISディテクターと接続した島津アミノ酸配列分析装置PPSQ-21にて分析した。

4-2.2.2　内部アミノ酸配列

B. circulans から精製した1 μgのDOI合成酵素を12.5 % SDS-PAGEで23 kDaと42 kDaのサブユニットに分離した。クマシーブリリアントブルーで染色後、それぞれのバンドを切り出し、200 μlの50 mM Tris-HCl（pH8.5）を加えてゲルを細かく砕いた。リジルエンドペプチダーゼ（ベーリンガーマンハイム）5 ml/vialに水50 μlを加え溶かした後、全量をゲルの入ったチューブに加えて37℃で12時間加水分解した。遠心上清をHPLCで分離しペプチド断片を分取後、遠心エバポレーターにより溶媒をとばしアミノ酸配列分析装置で分析した。

4-2.2.3　Nano-LC/ESI IT-MS/MS分析

B. circulans から精製した1 μgのDOI合成酵素を12.5 % SDS-PAGEで23 kDaと42 kDaのサブユニットに分離した。銅染色後それぞれのバンドを切り出し、トリプシンで加水分解した。加水分解したペプチド断片をLCQ mass-spectrometer (Finnigan)に導入してLC-ESI-MS分析した。

4-2.3　DNAの取り扱い

DNAの取り扱いおよび大腸菌の形質転換法はSambrookらによるMolecular Cloningラボマニュアルを参考にして行った[70]。DNAの電気泳動には0.7 %アガロースゲルを用いた。

4-2.3.1　*B. circulans* の染色体DNAの調製

第3章と同様に培養して得た*B. circulans*の菌体を1x TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)で洗浄した。培養菌体を10 mlのTEに懸濁し、リゾチームを2 mg/mlになるように加えて37℃で保温した。30分後500 μlの10 % SDSと200 μlのプロナーゼ（50 mg/ml TES(50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA)の溶液を37 ℃で1時間前処理した)を加え溶菌させた。37℃で1時間後1.8 mlの5 M NaClと1.5 mlのCTAB/NaCl溶液（4.1 g NaClを80 mlの水に溶解しておき、そこに攪拌しながら10 gのCTAB（*N*-セチル-*N*,*N*,*N*-トリメチルアンモニウムブロミド）をゆっくり加えた。65℃で加温して完全に溶解させ、最終量を100 mlにした)を加えて65℃で20分間保温した。14 mlのクロロホルム-イソアミルアルコール（24:1）混合液を加え水層を抽出した。その水層に対して0.6体積容量のイソプロパノールを加え染色体DNAをガラス棒で巻き取った。80 %冷エタノールで洗浄して、乾燥後2.5 mlのTEに溶解した。その染色体DNA溶液はCsCl平衡密度勾配遠心法により精製した。CsClを1.123倍（2.5 mlに対し2.81 g）、10 mg/mlエチジウムブロミド溶液を100 μl加え、不溶画分を遠心分離で除いた。上清を超遠心チューブに移し100,000 rpm で4時間超遠心分離後、UVランプを照射しながら染色体DNAのバンドを注射器により回収した。

その溶液はCsCl飽和イソプロパノール2 mlで3回洗浄してエチジウムブロミドを除去した。得られた溶液の2倍量1x TEを加え、さらにその2倍量のエタノールを加えてエタノール沈殿した。得られた染色体DNAは適当量の1x TEに溶解し4℃で保存した。

4-2.3.2　プラスミドの調製

大腸菌からのプラスミド調製はアルカリ-SDS法で行った。大腸菌は2 mlのLB培地で10時間培養し集菌した。菌体をsolution I（50 mMグルコース、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA）-リゾチーム（10 mg/ml）100 μlで懸濁後、氷上で10分放置した。次にsolution II（0.2 N NaOH、1 % SDS）を400 μl加え軽く振とうし3-5分間氷上に放置後、7.5 M 酢酸アンモニウム溶液300 μlを加えさらに5分間放置した。4℃、15,000 rpmで10分遠心分離後、上清を別のチューブに移し10 mg/ml RNase（ベーリンガーマンハイム）を5 μl加え37℃で20分間保温した。その後600 μlのフェノール-クロロホルムを加えて37℃で10分間保温した。遠心分離後上清を別のチューブに移し600 μlのイソプロパノールを加えて-20℃で20分間放置した。4℃、15,000 rpmで15分間遠心し上清を除いた。100 μlのTEに溶解後10 μlの3 M酢酸ナトリウム、220 μlの冷エタノールを加え、-20℃で20分間放置した。4℃、15,000 rpmで15分間遠心して上清を除いた。80 %エタノールを200 μl加え4℃、15,000 rpmで3分間遠心して上清を除いた。減圧乾燥後、適当量のTEに溶解した。

4-2.3.3　形質転換

E. coli JM 105についてはまずLB培地10 mlで37℃、12時間前培養した。前培養液を1/100量本培養用LB10 mlに植菌して37℃、1.5時間培養した。滅菌したチューブを用いて、0℃、4,000 x *g*で5分間の遠心分離により集菌した。冷50 mM $CaCl_2$を10 ml加え、懸濁後氷水浴上で20-30分間放置した。0℃、3,000 x *g*で5分間の遠心分離にて$CaCl_2$処理した菌体を集め、600 μl冷50 mM $CaCl_2$を加え懸濁し*E. coli* JM 105のコンピテントセル溶液とした。

ライゲーションしたDNA溶液に5倍量のコンピテントセル溶液を加え、氷水浴上で40分間放置した。42℃で1.5分ヒートショック後、氷水浴上で5分間放置した。その液をLB 1 mlが入った試験管に入れて37℃で45分振とう培養後、50 μg/ml アンピシリンを含むLB寒天培地上に播種し、37℃で12時間培養した。

E. coli BL 21 (DE3)については、まずLB培地5 mlで37℃、12時間前培養した。前培養液をSOB（2% トリプトン、0.5% 酵母エキス、0.05% NaCl）に植えつぎ25℃で振とう培養した。OD_{600}が0.4に達したら4℃、3,000 x *g*で10分間の遠心分離にて集菌した。あらかじめ氷冷しておいたfreeze-thaw緩衝液（FTB、10 mM CH_3COOK、45 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$、10 mM $CaCl_2$、10 mM $[Co(NH_3)_6]Cl_3$、100 mM KCl、10%グリセロール、pH 6.4）330 mlに再懸濁し、氷水浴上で10分間放置し

た。4℃、3,000 x gで10分間の遠心分離にて菌体を集め、冷FTB 50 mlに再懸濁した。最終濃度が7%になるようにDMSOを3.5 ml加え0.4 mlずつマイクロチューブに分注し、速やかにドライアイス-アセトンバスに投入、急速に凍結した。-75℃でコンピテントセルを保存した。

コンピテントセルを氷水浴上で解凍し、DNA溶液を1/5量以下になるように加え、氷水浴上で40分間放置した。42 ℃で1.5分ヒートショック後、氷水浴上で5分間放置した。その液をSOC（2% トリプトン、0.5% 酵母エキス、0.05% NaCl、20 mM グルコース）1 mlが入った試験管に入れて37℃で1時間振とう培養後、30 μg/ml カナマイシンを含むLB寒天培地上に播種し、37℃で12時間培養した。

4-2.4　DOI合成酵素遺伝子の探索

4-2.4.1　サザンハイブリダイゼーション

B. circulans のDOI合成酵素の42 kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列をもとに40 kAと40 kBを、23 kDa対しては20 kAと20 kBを設計した。オリゴヌクレオチドはファルマシア社から購入した。

40 kA; 5'-TTYGCNTTYGGNGARCAYGT-3'

40 kB; 5'-TCNCCRAANGCRAARTTRAA-3'

20 kA; 5'-GGNGCNGTNGCNGARCAYAT-3'

20 kB; 5'-TGYTCNGCNACNGCNCCYTG-3'

オリゴヌクレオチドは3'末端DIG（アルカリ感受性ジゴキシゲニン-11-dUTP）標識キット（ベーリンガーマンハイム）でラベル化した。取得した遺伝子の周辺を探索するために用いた長いDNAはDIG DNA標識キット（ベーリンガーマンハイム）でラベル化した。

*B. circulans*の染色体DNAは各種制限酵素により消化しアガロースゲル電気泳動で分離した。アガロースゲル上のDNA断片をバイオラッド社のブロッティング膜に10-12時間かけ転写し、80℃で30分間加熱することによりDNAを固定化した。ハイブリダイゼーションは標識キットの取扱い説明書通りに行った。オリゴヌクレオチドプローブでのハイブリダイゼーション温度は50℃で行った。長いDNAプローブでのハイブリダイゼーション温度は65℃で行った。洗いの条件はオリゴヌクレオチドに対しては2 x SSC（20 x SSC; 3 M NaCl, 0.3 M クエン酸）、0.1 % SDS、50℃で行った。長いDNAプローブに対しては1 x SSC、0.1 % SDS、65℃で行った。ハイブリダイズしたバンドはDIG発光検出キット（ベーリンガーマンハイム)で検出した。

4-2.4.2　コロニーハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションにより特異的に結合した大きさのDNA断片はアガロースゲルからGENECLEAN III キット（BIO 101）により回収し、pUC19の脱リン酸化した部位にライゲーションした。その溶液を用いて*E. coli* JM 105を形質転換した。形質転換体は 50 μg/mlアンピシリン、200 μg/mlイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）、40 μg/ml 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド（X-gal）を含むLB寒天培地で培養し、pUC19を含む白色形質転換体を別のプレートに再培養してライブラリとした。ライブラリプレートにHybond-N+膜（アマシャム)をのせ、形質転換体を転写した。変性溶液（1.5 M NaCl、0.5 M NaOH）を浸した濾紙の上で溶菌後、中和溶液（1.5 M NaCl、0.5 Mtris-HCl、0.001 M EDTA、pH 7.5）を浸した濾紙の上で中和した。2 x SSCで菌体を除き、濾紙の上で風乾した。さらに0.4 M NaOHで浸した濾紙の上で20分間放置した。5 x SSCで1分間洗浄し、風乾してハイブリダイゼーションに用いた。

サザンハイブリダイゼーションと同じ条件でハイブリダイゼーションを行い、特異的に結合するDNAを探索した。

4-2.5　DNA塩基配列分析

pDS1、pDS5、pDS2とpDS23?はそれぞれ断片化し、pUC19にサブクローニングしてDNA塩基配列分析を行った。pDS5-pDS1-pDS2については以下の表に示した制限酵素部位で切断しサブクローニングして分析した。

なお、かっこ内の数字は付録の塩基配列pDS5-pDS1-pDS2における部位である。

*Eco*RI-*Eco*RI (925-4958, 4034 bp)	*Eco*RI-*Sph*I (925-1758, 861bp)
*Hind*III-*Eco*RI (1673-4958, 3286 bp)	*Hind*II-*Xho*I (1673-3025, 1351 bp)
*Sph*I-*Sac*I (1781-2972, 1192 bp)	*Sph*I-*Bam*HI (1781-3989, 2209 bp)
*Sac*I-*Sac*I (2967-3302, 336 bp)	*Sac*I-*Eco*RI (3297-4958, 1660 bp)
*Pst*I-*Eco*RI (3909-4958, 1048 bp)	*Bam*HI-*Eco*RI (3984-4958, 975 bp)
*Kpn*I-*Sac*I (0-2972, 2972 bp)	*Kpn*I-*Pst*I (0-1004, 1004 bp)
*Kpn*I-*Hind*III (0-460, 460 bp)	*Bam*HI-*Pst*I (3984-7845, 3862 bp)
*Eco*RI-*Pst*I (4953-7845, 2893bp)	*Bam*HI-*Sca*I (3984-6270. 2287 bp)
*Hinc*II-*Sca*I (5168-6270, 5167 bp)	*Sca*I-*Sac*I (6265-7230, 966 bp)
*Sac*I-*Pst*I (7225-7845, 621 bp)	*Sal*I-*Hind*III (7381-7752, 372 bp)
*Bam*HI-*Hind*III (3984-6744, 2761 bp)	*Bam*HI-*Hinc*II (3984-5173, 1190 bp)
*Bam*HI-*Kpn*I (3984-4993, 1010 bp)	

pDS23?については以下の表に示した制限酵素部位で切断しサブクローニングして分析した。

*Pst*I-*Pst*I (6.6 kbp)	*Sph*I-*Pst*I (5.6 kbp)
*Eco*RI-*Kpn*I (4.0 kbp)	*Hin*dIII-*Pst*I (1544 bp)
*Kpn*I-*Pst*I (753 bp)	

プラスミドはアルカリ-SDS法で抽出し、マイクロスピンカラム（ファルマシア)で精製して分析に用いた。プラスミド中のインサートDNAはThermoSequenane cycle sequencingキット(アマシャム)、M13 Forward primerおよびM13 Reverse primer(アマシャム)、ライカー社DNAシークエンサーモデル4200を用いて、ジデオキシヌクレオチド鎖伸長反応停止法により塩基配列を決定した。DNA塩基配列はGENETYX MAC ver.10.0（Software Development）によって解析した。ホモロジー検索はEMBL、Genbank、SWISSPROT データベースに対して BLAST[71]およびFASTA[72] ソフトウエアによりインターネットでおこなった。

4-2.6　　23 kDaサブユニット遺伝子取得の試み

23 kDaサブユニットのN末端配列に対するPCRのプライマーとして20kf1、20kf2を、内部配列に対しては20kr1を設計した。

20kf1; 5'-ATGAARGTNGGNGTNCTNGC-3'

20kf2; 5'-ATGAARGTNGGNGTNTTRGC-3'

20kr1; 5'-GGDATDATNARNGCRTA-3'

*B. circulans*の染色体DNAを鋳型としてTaqポリメラーゼを用いてPCRを検討し増幅されるバンドを探索した。

*B. subtilis*の*yaaE*遺伝子（hypothetical 21.4 kDa タンパク質をコードする遺伝子）の一部分を得るために*Hin*dIII切断部位（下線)を含むBS20-1と*Bam*HI切断部位（下線）を含むBS20-2をPCRのプライマーとして用いた。

BS20-1; 5'-GTACTAAAGCTTCAAGGAGCAGTTAGAGAGCAC-3'

BS20-2; 5'-AAGGAAGGATCCCTGTTTCGCGGCTACAATACG-3'

B. subtilis PCI 219の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。増幅したバンドはサブクローニングし、DNA塩基配列を確認した後DIGラベル化しハイブリダイゼーションに用いた。

4-2.7　　BtrCの大量発現

プライマー40kfおよび40kr(ファルマシア)、pDS2を鋳型としてPCRにより*btrC*遺伝子を含むDNAを増幅した。

40kf; 5′-GGTGGAGGATCCATATGACGACTAA-3′

40kr; 5′-AAAGCAAGCTTATCCTGGTTCATCC-3′

プライマー40kfは*Bam*HI（下線）と*Nde*I切断部位（二重線)を含み、*Nde*I切断部位は発現ベクターpET30b(+)のリボソーム結合部位の下流に*btrC*遺伝子の開始コドンを組み込めるように設計した。プライマー40krは*Hind*III切断部位（下線)を含むよう設計した。PCRはパーキンエルマーアプライドバイオシステム社のモデル9700を用いて行った。はじめに下層溶液として10 x UlTima緩衝液を5 μl、25 μM $MgCl_2$を5 μl、2.5 mM dNTPsを1.6 μl、各60 μMプライマーを2 μl、滅菌水36 μlの混合溶液にAmpliWax PCR Gemを一粒のせ80℃で5分間保温しワックスの層を作った。次に上層溶液として10 x UlTima緩衝液を5 μl、UlTma DNAポリメラーゼ（ロシュ）を0.5 μl (3 U)、100 μg/μl pDS2を0.5 μl、滅菌水44 μlの混合溶液を加え、以下の反応サイクルによってPCRを行った。まず95℃で1分間変性させてから、95℃で30秒、60℃で45秒、72℃で30秒を30反応サイクル行い、最後に72℃で7分という条件である。PCRで増幅した生成物は4-2.4.2と同様にアガロースゲルから回収し、*Bam*HIと*Hind*IIIで消化した後、pUC19にライゲーションしてプラスミドpDS3を得た。pDS3の挿入DNAはDNA塩基配列を確認後、*Nde*Iと*Hind*IIIで消化してpET-30b(+)の*Nde*I-*Hind*III部位にライゲーションし、プラスミドpDS4として*E. coli* BL 21(DE3)を形質転換させ*E. coli* / pDS4を得た。*E. coli* / pDS4は37 ℃、200 rpmでOD_{600}が0.6になるまで前培養した。1/100量の前培養液を本培養用の培地（LB 200 ml）に加え、37℃、200 rpmでOD_{600}が0.6になるまで振とうし、次いで0.1 M IPTGを最終濃度0.4 mMになるように800 μl加え、さらに2-3時間振とう培養した。4,000 x *g*で10分間遠心分離することにより集菌し、培養菌体は0.2 mM $CoCl_2$を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.7)緩衝液で洗浄した。組み換えタンパク質の精製に用いるまで-75℃で保存した。

4-2.8　　BtrCのDOI合成酵素活性の確認

E. coli / pDS4の培養菌体5 gを0.2 mM $CoCl_2$を含む50 mM Tris-HCl （pH 7.7）150 mlで懸濁し、氷浴上ブランソンsonifier Type 250（outputコントロール4、duty cycle 50）で2分間の処理を10回（休止時間1分）繰り返すことにより細胞を超音波破砕した。その溶液を12,000 x *g*で30分間遠心分離し、上清を無細胞抽出液として酵素反応に用いた。5 mlの無細胞抽出液中、G-6-Pもしくは[6,6-$^2H_2$]G-6-Pを

5 mM (8.4 mg)、5 mM NAD^+、5 mM Co^{2+}となるように加え、46℃で2時間酵素反応を行った。酵素反応生成物は5 mlメタノールを加えることにより反応を停止し、5 mg/ml NBHAのピリジン溶液を1 ml加え60℃で1時間反応させた。反応溶液は蒸発器で空気を吹き付けることにより蒸発乾固した。メタノールを加えて再溶解し、第2章の2-2.5.1と同様にpTLCにて精製し、それぞれの基質から3 mgのDOIのO-(4-ニトロベンジル)オキシム誘導体を得ることができた。

G-6-PからのDOIのO-(4-ニトロベンジル)オキシム誘導体の^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 1.90 (dd, J= 10.9, 13.8 Hz, H-2ax), 3.19 (t, J= 8.8 Hz, H-4), 3.51 (dd, J= 4.9, 13.8 Hz, H-2eq), 3.3-3.4 (H-3, H-5), 4.03 (d, 9.0 Hz, H-6), 5.25 (s), 7.58 (d, 8.5 Hz), 8.21 (d, 8.5 Hz)。

[6,6-$^2H_2$]G-6-PからのDOIのO-(4-ニトロベンジル)オキシム誘導体の^{2}H-NMR (100.6 MHz, CH_3OH) δ: 1.82, 3.46。

4-2.9　　DOI合成酵素活性試験

第3章の方法をさらに改良しておこなった。1 μlの酵素溶液に対し50 mM G-6-Pを10 μl、50 mM NAD^+を10 μl、緩衝液を79 μl加えて酵素反応溶液とした（0.2 mM $CoCl_2$を含む50 mM Tris-HCl緩衝液pH 7.7、最終量100 μl、G-6-P、NAD^+の最終濃度は5 mM)。酵素反応は46℃で5分間行った。この後は第3章と同様にHPLC分析を行った。

酵素活性の単位1 Uは1分間に1 μmolのDOIを生産できる量として改めて定義した。

4-2.10　　BtrCの精製

FPLC以外の操作は4℃で行った。

4-2.8で調製した無細胞抽出液をDEAE-Sepharose Fast Flow担体を充填したカラム（2.5 cm x 15 cm）に流し込んだ。吸着されない画分は緩衝液I (50 mM Tris-HCl、0.2 mM $CoCl_2$、pH 7.7)で除去した。その後、緩衝液I 300 mlと緩衝液J（50 mM Tris-HCl、0.2 mM $CoCl_2$、0.4 M NaCl、pH 7.7）300 mlのリニアグラジエント法により塩濃度を増大させタンパク質を溶出した。

DEAE-Sepharose Fast Flow担体を用いたクロマトグラフィー後のDOI合成酵素活性画分をCentriprep-10 (Amicon)を用い、2,000 x gで30分間の遠心分離による限外濾過を数回繰り返すことで約10 mlまで濃縮した。その濃縮液を緩衝液K（50 mM Tris-HCl、0.2 mM $CoCl_2$、0.1 M NaCl、pH7.7）で平衡化させておいたSuperdex 200 HiLoad 26/60 (FPLC)に流し込んだ。流速2 ml/minで緩衝液Kを流すことでタンパク質を溶出した。

4-2.11　分子量の見積もり

TSk gel G3000SWを用いたクロマトグラフィー（日立L-4000 UVディテクターと日立D-2500インテグレーターと日立L-6320ポンプで構成したイナートHPLCシステムに接続）においてBDH Chemicals社のcarbonic anhydrase (30,000)、ovalbumin (45,000)、ovotransferrin (77,000)、lactate dehydrogenase (145,900)の溶出時間と比較することにより未変性条件下の分子量を見積もった。

4-2.12　生化学的性質

精製したBtrC溶液を0.2 mM $CoCl_2$を含むpH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5の50 mM Tris-maleate-NaOH 緩衝液、pH 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5の50 mM MOPS-KOH緩衝液、pH 7.0、7.5、8.0、8.5 、9.0の50 mM Tris-HCl緩衝液、pH 8.5、9.0、9.5、10.0、10.5の50 M グリシン-NaOH緩衝液で100倍に希釈することにより酵素溶液のpHを変化させた。各pHの酵素溶液を用いて酵素活性試験を行い、至適pHを決定した。

金属依存性を検討するために$CoCl_2 \cdot 6H_2O$、$MgCl_2 \cdot 6H_2O$、$MnCl_2 \cdot 4H_2O$、$CuCl_2 \cdot 2H_2O$、$FeCl_2 \cdot 4H_2O$、$CaCl_2$、$ZnCl_2$、$NiCl_2 \cdot 6H_2O$を最終濃度1 mMになるように加えて酵素反応をおこなった。最終濃度1 mMになるようにEDTAを加え、金属のない条件とした。

酵素反応を15、20、25、30、35、40、45、50、55℃で行い、至適温度を検討した。

また、熱安定性の測定は20、25、30、35、40、45、50、55、60℃で5分間保温した後、同様に酵素活性試験を行い検討した。

2 μMのDOI合成酵素を用いて酵素反応を経時的に追跡すると30分間は直線的に反応が進行した。そこで、5分後に酵素反応を停止し、1分間あたりのDOI生成量を初速度として定義した。酵素反応速度論的定数を求めるために、G-6-Pの濃度は62.5から1000 μMに変化させて行った。NAD^+の濃度は15.6から250 μMに変化させて行った。得られた初速度の逆数を濃度の逆数に対してプロットするLineweaver-BurkプロットによりK_m、k_{cat}を求めた。

4-2.13　BtrCの利用

D-グルコース、D-マンノース、D-アロース、D-ガラクトース、2-デオキシグルコース、3-デオキシグルコースを基質としてヘキソキナーゼ (ベーリンガーマンハイム)-BtrC混合酵素反応に用いた。それぞれのヘキソースを10 mM、ATP 10 mM、NAD^+ 5 mM、$MgCl_2$ 5 mM、ヘキソキナーゼ0.2 U、BtrC 28 μMとなるように

0.2 mM $CoCl_2$を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.7)緩衝液中に混合し（最終量100 μl）、37℃で11時間反応を行った。その後は、DOI合成酵素活性試験と同様に*O*-(4-ニトロベンジル)オキシム誘導体へと変換し、HPLCにより分析した。

4-2.14　塩基配列の登録番号

*btrC*の塩基配列（付録参照pDS5-pDS1-pDS2の4857-5963, 1107 bp）はDDBJ/EMBL/GenBank 塩基配列データベースのaccession number AB019237に登録した。

4-3　結果

4-3.1　精製酵素のアミノ酸配列

まずはじめにDOI合成酵素のN末端アミノ酸配列を決定した。*B. circulans*より精製したDOI合成酵素の42 kDaと23 kDaのサブユニットをSDS-PAGEにより分離し、PVDF膜に転写後、それぞれのバンドを切り出し気相アミノ酸配列分析装置により分析した。その結果、42 kDaサブユニットタンパク質に対しては、

M T T K Q I ? F A D R ? F N F A F G E H V L ? S V ? ? Y

23 kDaサブユニットタンパク質に対しては

M K V G V L A L Q G A V A E H I R L I E A V G G ? G V V E K

と決定することができた。?は検出できなかった残基で、システインもしくは単に紫外線吸収強度が不十分で検出できなかった残基である。

それぞれの配列に対してSWISSPROTデータベースに対してBLAST[71]およびFASTA[72]ソフトウエアによりインターネットでホモロジー検索をおこなった。42 kDaサブユニットタンパク質のN末端アミノ酸配列と高いホモロジーのあるタンパク質は存在しなかった。

一方23 kDaサブユニットタンパク質のアミノ酸に対しては*B. subtilis*のhypothetical 21.4 kDa protein（*yaaE*, SWISS PROT P37528）と18/30(60%)、*Saccharomyces cerevisiae*のhypothetical 25.1 kDa protein（*yfg0*, SWISS PROT P43544）と12/18(66%)など、機能が未決定のタンパク質と高い相同性があった。23 kDaサブユニットタンパク質はその分子量を考えてもこれらのタンパク質の種類に属するものと思われる。

次に内部配列に関する情報を得ようと検討した。精製DOI合成酵素をSDS-PAGEで分離し、アクリルアミドゲルをそのまま切り出してLys-Cエンドペプチターゼで消化した。その後、ペプチド断片をHPLCで分離、分取しアミノ酸配列分析装置により分析した。

42 kDaサブユニットタンパク質についてはケラチンタンパク質が混入したため有益な情報が得られなかった。23 kDaサブユニットタンパク質については分取したペプチドの数が少なかったが、ＡＥＱＬＡＱＬＹＡＬＩＩＰという内部配列情報が得られた。この配列についても*B. subtilis*のhypothetical 21.4 kDa proteinと6/13(46%)、*S. cerevisiae*のhypothetical 25.1 kDa proteinと9/13(69%)の相同性が見られ23 kDaサブユニットタンパク質がこの種のタンパク質であることを支持する配列である。

４-３.２　　DOI合成酵素遺伝子の探索

酵素タンパク質の配列が部分的に決定できたのでこれを指標にDOI合成酵素をクローニングすることにした。それぞれのサブユニットのN末端配列を基にDNAプローブを設計し、染色体DNAとのハイブリダイゼーションにより取得する方法を検討した。

ある程度の長さを有し、特異的なプローブになるように縮重による混合塩基の組み合わせが少なくなるようにオリゴヌクレオチドを設計した。それぞれのサブユニットのアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドに対してセンス鎖、アンチセンス鎖を作成し両方のプローブにハイブリダイゼーションするDNAを目的DNAとすることにした。そこで、23 kDAサブユニットタンパク質に対しては20kA、20kBを、42 kDaサブユニットタンパク質には40 kA、40 kBを設計した。

20kA : GAVAEHI, GGNGCNGTNGCNGARCAYAT・・・1024通り、20 mer
20kB : QGAVAEH, TGYTCNGCNACNGCNCCYTG・・・1024通り、20 mer
40kA : FAFGEHV, TTYGCNTTYGGNGARCAYGT・・・256通り、20 mer
40kB : FNFAFGE, TCNCCRAANGCRAARTTRAA・・・256通り、20 mer

N : ATCG mix, R : AG mix, Y : TC mix

それぞれのオリゴヌクレオチドはDIG 3'-末端標識キット (ベーリンガーマンハイム)により3'末端をDIGラベルしてハイブリダイゼーションに用いた。

各種制限酵素により消化した*B. circulans*の染色体DNAとのサザンハイブリダイゼーションは数多くのバンドを与えた（Fig. 53）。

用いたプローブが20塩基という短いオリゴヌクレオチドであること、また混合塩基が多いことなどが原因として上げられる。しかしながらセンス鎖、アンチセンス鎖ともに結合しているDNAバンドを探したところ20kA、20kBに対しては*Pst* Iで消化した6.6 kbpのDNA、40kA、40kBに対しては*Eco*RIで消化した4.4 kbpのDNAが特異的に結合していると観測された。

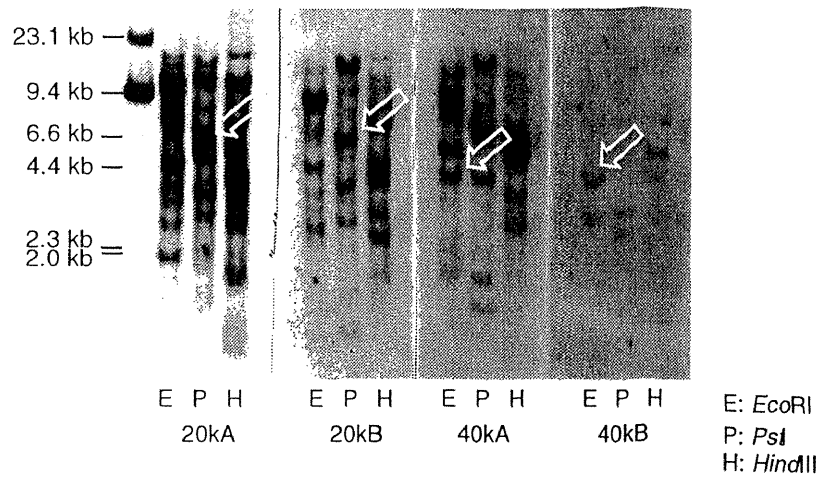


Fig. 53 Southern hybridization with oligonucleotides (20 mer)

サザンハイブリダイゼーションの結果から*Pst*Iで消化した6.6 kbpのDNA、*Eco*RIで消化した4.4 kbpのDNA断片をクローニングベクターpUC19の同じ制限酵素切断部位に、ライゲーションさせ、それぞれの大きさのプラスミドライブラリーとした。そのプラスミドで*E. coli* JM105を形質転換し、それぞれ約400コロニーの変異体を得た。ハイブリダイゼーションによりスクリーニングし、プローブ40kA、40kBについては2クローン、プローブ20kA、20kBについては4クローンに対し強い結合を観測した。

それぞれのクローンについて制限酵素地図を作成したところ、23 kDaサブユニットの方の4クローンは全て異なるDNAを含んでいることがわかった。つまり今回用いたプローブでは非特異的にしか結合しておらず、どのDNAに23 kDaサブユニットに相当する遺伝子が含まれるのか特定することができなかった。その中で最も強く結合したpDS23?についてはDNA塩基配列分析を行っている。現在のところ約5 kbp程解析したが23 kDaサブユニットに相当する遺伝子配列は見つかっていない。そのDNA断片に含まれる遺伝子がコードしているタンパク質は、アセチルCoA合成酵素、ペニシリン結合タンパク質と相同性が認められた(Fig. 54)。

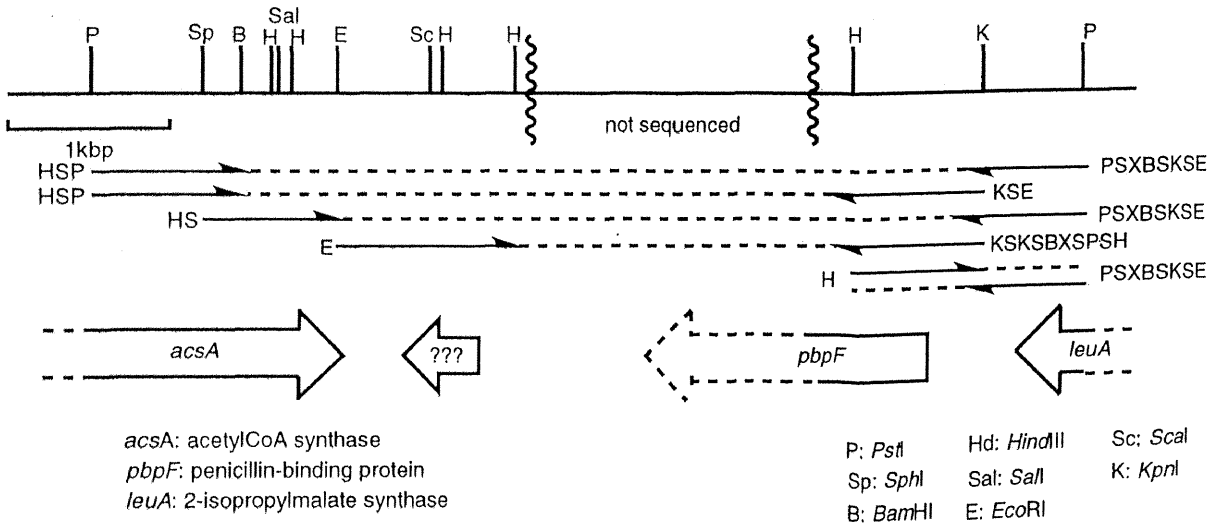


Fig. 54 pDS23?

ブチロシン生合成とは全く異なる代謝の遺伝子が含まれていると考えられるが、ブチロシン生合成遺伝子クラスター内に23 kDaサブユニット遺伝子が存在するとは限らない。つまり現状ではpDS23?断片に23 kDaサブユニット遺伝子が存在するかしないかは不明であり、引き続きDNA塩基配列分析を行う必要がある。しかし、非特異的にしか結合しなかったということは、今回得られた全てのDNAに23 kDaサブユニットに相当する遺伝子が含まれていない可能性も高く、別の方法で検討することが重要と考えられる。

一方、42 kDaサブユニットの方の2クローンは同一のものとわかり（pDS1）、用いたプローブと特異的に結合したと考えられた。このDNA断片（pDS1の挿入DNA）のDNA塩基配列を全て決定したところ、3つの読み枠が含まれていることがわかった（Fig. 55）。

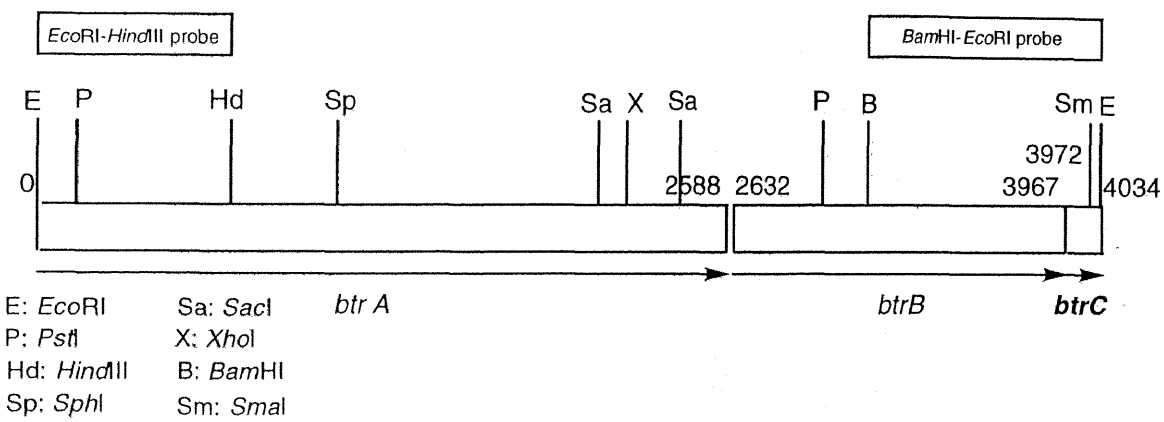


Fig. 55 Physical map of pDS1

そのうちの一つの読み枠*btrC*から推定されたアミノ酸配列が42 kDaのサブユニットのN末端配列と全く同じであった。このことからこの読み枠が42 kDaのサブユニットの遺伝子と考えられたが、残念なことにpDS1には相当するサイズの遺伝子の全長を含まれていなかった。また、ホモロジー検索の結果、*btrA*から推定されたアミノ酸配列（>1329 aa）とは高い相同性のあるタンパク質は存在せず、*btrB*から推定されたアミノ酸配列（432 aa）は*B. subtilis*のGlutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (429 aa, *gsa*B, SWISS PROT P71084)と216残基中77残基（35.6%）の相同性があった。ブチロシン生合成には、いくつかアミノ化の段階が含まれており、*btrB*はブチロシン生合成におけるアミノ化に関与する酵素をコードしていると思われた。序にも述べたとおり、一般的に抗生物質の生合成遺伝子はクラスターを形成しており、得られたDNA断片はブチロシン生合成遺伝子クラスターの一部と考えられた。そこでpDS1の下流側に存在すると考えられる42 kDaのサブユニットの遺伝子だけでなく上流側の遺伝子も探索することにより、全ての生合成遺伝子を取得できると考えた。

4 - 3 .3　　pDS1の周辺遺伝子の探索

上流側に対してはpDS1の*Eco*R1-*Hind*III 0.7 kbpのDNAを、下流側に対しては*Bam*HI-*Eco*RI 1.0 kbpのDNAをプローブとして用いることにした（Fig. 55）。pDS1をそれぞれ制限酵素で消化しDNA断片を得た。このDNAはDIG DNA標識キット (ベーリンガーマンハイム)によりランダム標識法によってラベル化した。先と同様に*B. circulans*の染色体DNAの制限酵素消化物とサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、特異的にバンドを検出することができた（Fig. 56）。DNAも長く、対応する断片とは100%の相同性を持つ配列だからと考えられる。

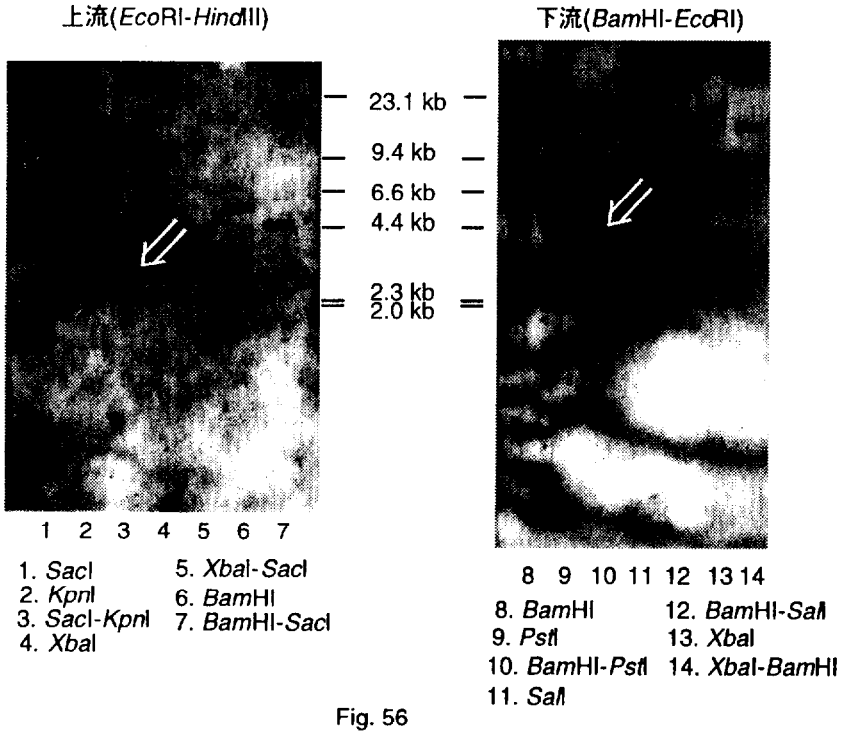


Fig. 56

サブクローニングするサイズを考慮して上流側は*Sac*I-*Kpn*Iで消化した約3.5 kbpのDNAを、下流側は*BamHI*-*Pst*Iで消化した約4.4 kbpのDNAを先と同様にpUC19に組み込み、*E. coli* JM105の形質転換体を得た。コロニーハイブリダイゼーションによりそれぞれ特異的に結合するDNAを持つクローンを取得することができた（Fig. 57上流側pDS5、下流側pDS2）。

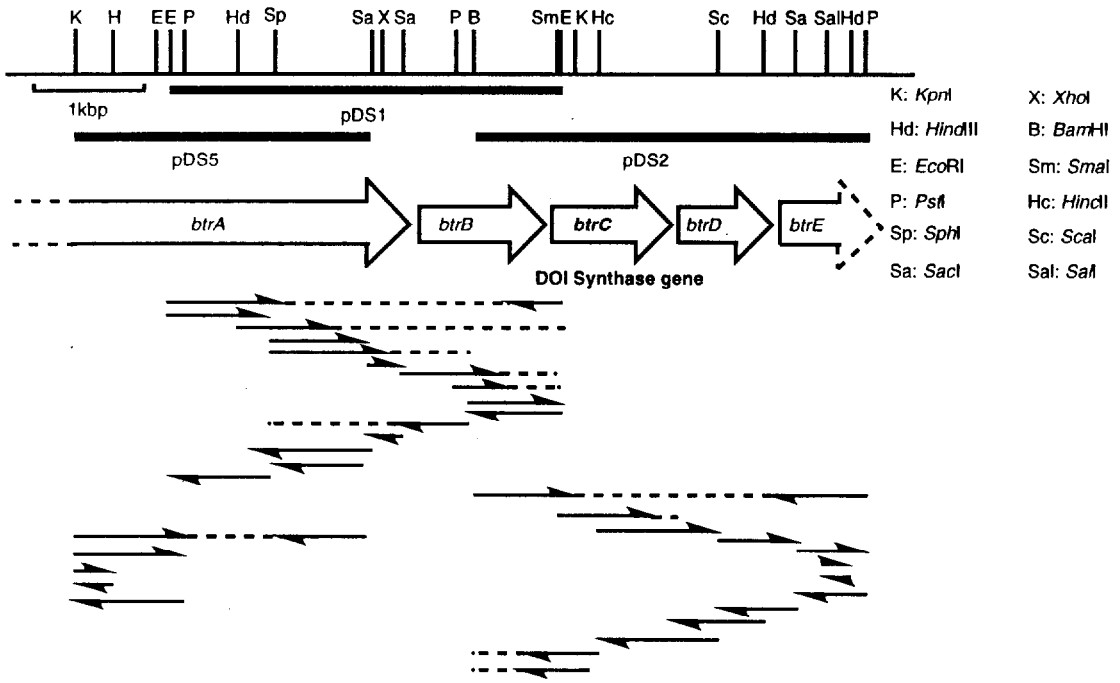


Fig. 57

得られたDNAの全ての領域を含むようにサブクローニングしpDS5-pDS1-pDS2のDNA塩基配列を全て決定した。*btrA*と*btrE*は全長を取得できてはいないが5つの遺伝子が存在することがわかった。これらは一つのオペロン中に存在しており、ブチロシン生合成遺伝子クラスターを形成していると考えられた。ホモロジー検索の結果BtrCのアミノ酸配列は様々な生物種のデヒドロキナ酸(DHQ)合成酵素と相同性を持っていた。例えば、*E.coli*由来のものとは324残基中26.5%、*Emericella nidulans*由来のものとは276残基中26.4%、*B. subtilis*由来のものとは264残基中34.1%の相同性が認められた（Fig. 58）。BtrDは高い相同性のあるものは存在しなかった。BtrE（>343 aa）は*B. subtilis*のsorbitol dehydrogenase（352 aa, *dhs*O, SWISS PROT Q06004）と167残基中35残基の相同性（21.0%）を示した。

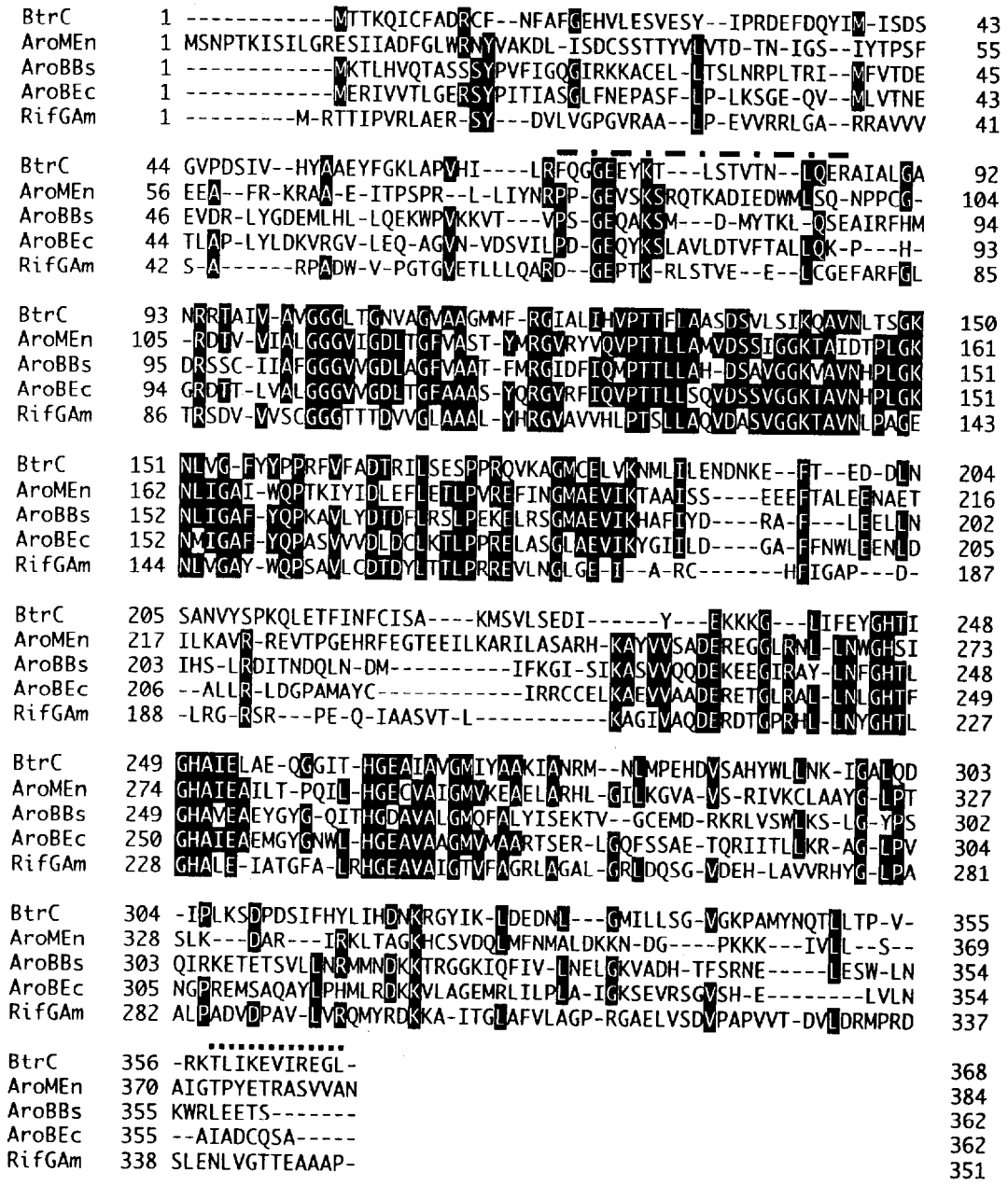

BtrC ; DOI synthase of B. circulans
AroMEn; DHQ synthase of Emericella nidulans
AroBBs; DHQ synthase of Bacillus subtilis
AroBEc; DHQ synthase of Escherichia coli
RifGAm; amino DHQ synthase of Amycolatopsis mediterranei
— • — is sequence of peptide a from LC-MS.
••••••• is sequence of peptide b from LC-MS.

Fig. 58

4-3.4　　23 kDaサブユニットタンパク質をコードする遺伝子探索

20kA、20kBをプローブとした*B. circulans*の染色体DNAからの探索では23 kDaサブユニットタンパク質をコードする遺伝子を特異的に取得することができなかった。そこで他の2つの方法で検討することにした。一つはN末端側の配列から設計したDNAプライマーと内部配列から設計したDNAプライマーで*B. circulans*染色体DNAを鋳型としたPCRにより相当する遺伝子の一部を得る方法、もう一つは相同性の認められた*B. subtilis*のhypothetical 21.4 kDa proteinをコードする遺伝子をプローブとして探索する方法である。

まずPCRによる方法を検討した。N末端側のプライマーは縮重を考慮し2つにわけて設計した（20kf1, 20kf2）。内部配列側は縮重による混合塩基の数が少なくするようにするため17塩基からなる20kr1を設計した。

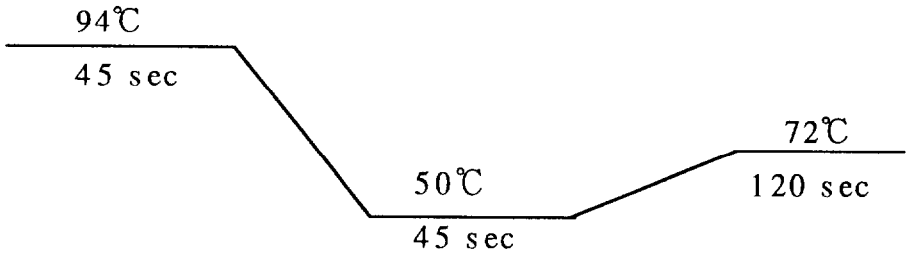
20kf1; MKVGVLA、ATGAARGTNGGNGTNCTNGC・・・512通り、20 mer
20kf2; MKVGVLA、ATGAARGTNGGNGTNTTRGC・・・256通り、20 mer
20kr1; YALIIP、GGDATDATNARNGCRTA・・・・・・576通り、17 mer

以下に示すPCR条件を基本として、プライマー濃度、鋳型（*B.circulans*染色体DNA）の濃度、アニーリング温度、ポリメラーゼ酵素反応時間等色々な組み合わせで検討を行ったが特異的に増幅されるバンドは得られなかった。

反応溶液

PRIMER 1	100 μM	1 μl	10 μM
PRIMER 2	100 μM	1 μl	10 μM
DNTP mix	2.5 mM	1 μl	250 μM
10x PCR buffer		1 μl	
template		1 μl	0.7ng
Taq polymerase 5U/μl		0.1μl	0.5U
滅菌水		5 μl	
total		10 μl	

反応サイクル（30 サイクル）



増幅されるべきサイズのDNAは相同性のあったタンパク質を考えると約150 bpであり、PCRで増幅するには短すぎる部分であることが原因として考えられる。もしくはプライマーの設計が悪く増幅されなかった可能性もある。

次に*B. subtilis*のhypothetical 21.4 kDa proteinをコードする遺伝子をプローブとして探索する方法を検討した。まずはじめに、BS20-1、BS20-2というプライマーで*B. subtillus* PCI 219の染色体DNAを鋳型としたPCRにより相当するDNA断片を得た。

BS20-1; 5′-GTACTAAAGCTTCAAGGAGCAGTTAGAGAGCAC-3′

BS20-2; 5′-AAGGAAGGATCCCTGTTTCGCGGCTACAATACG-3′

そのDNA断片は、一旦サブクローニングしてDNA配列を確認後、その断片を切り出し、先と同様にDIG DNA標識キットでラベル化した。このプローブで*B. circulans*の染色体遺伝子とハイブリダイゼーションを行ったが非特異的なバンドしか与えなかった。また*B. circulans*の染色体遺伝子を鋳型としてBS20-1、BS20-2をプライマーとしてPCRも検討したが、特異的に増幅するバンドは得られなかった。アミノ酸配列が似ているがDNA間にはあまり相同性がないか、もしくはN末端は似ているが内部配列は全く異なる配列を有している可能性が、特異的なDNAを検出できない原因として考えられる。

23 kDaサブユニットタンパク質をコードする遺伝子の探索は今後の課題であるが、もう少し内部配列を決定してPCRによりその一部分の配列を増幅させプローブとする方法が最適と考えている。

4-3.5 *B. circulans*由来DOI合成酵素のnano-LC/ESI IT-MS/MS分析（BtrC推定アミノ酸配列との比較）

BtrCには先に述べたように42 kDaのサブユニットのN末端配列が含まれていることが確認された。その推定アミノ酸は368残基、分子量40,746 kDaのタンパク質であることがわかり、サイズ的にも42 kDaサブユニットに相当する遺伝子と思われた。このことをさらに裏付けるために、*B. circulans*から精製したDOI合成酵素の42 kDaサブユニットのnano-LC/ESI IT-MS/MS分析による内部アミノ酸配列情報と比較することにした。

精製DOI合成酵素をSDS-PAGEで分離し、銅染色後、それぞれのバンドを切り出しトリプシン消化した。そのペプチド断片をLCQ-MSに導入することにより、3つのペプチド由来の親イオンピークが観測された。3つのペプチド断片の娘イオンからのフラグメントを解析した結果、2つの断片のアミノ酸配列が推定アミノ酸配列と一致していた（Fig. 59）。

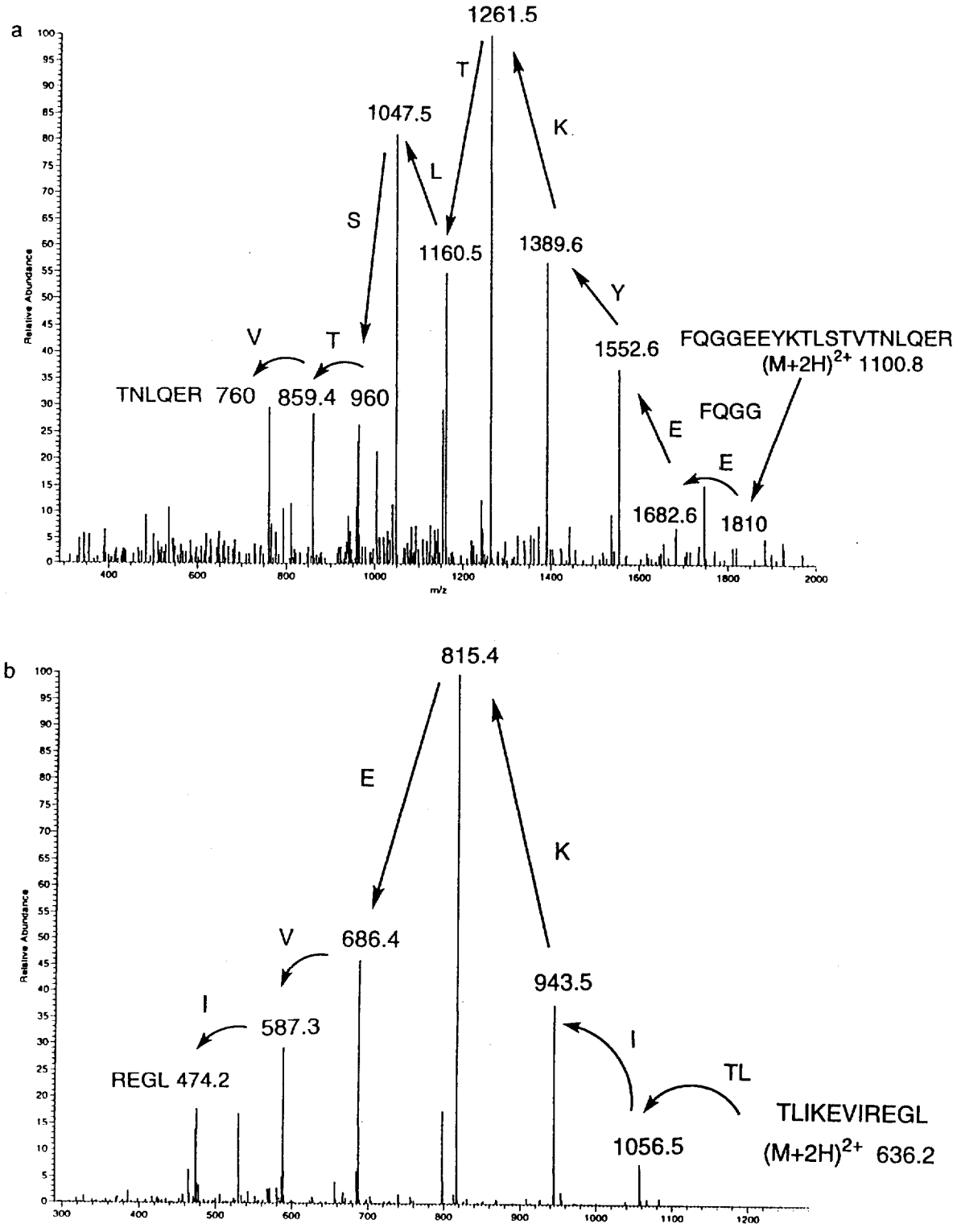


Fig. 59 Nano-LC/ESI IT-MS/MS spectra of fragments from 42 kDa subunit of DOI synthase

a: FQGGEEYKTLSTVTNLQER : $(M+2H)^{2+}$ 1100.8

b: TLIKEVIREGL : $(M+2H)^{2+}$ 636.2

ペプチドaの配列FQGGEEYKTLSTVTNLQER（$(M+2H)^{2+}$ 1100.8）はN末端側から68残基目から86残基目に相当する配列と一致していた（Fig.58ー・）。

ペプチドbの配列TLIKEVIREGL（$(M+2H)^{2+}$ 636.2）は、BtrCのC末端配列に一致していた（Fig. 58……）。この結果から、得られた*btrC*遺伝子が*B. circulans*由来DOI合成酵素の42 kDaのサブユニットをコードする遺伝子であると確認することができた。

4-3.6　　BtrCの大量発現

次に*btrC*遺伝子の大量発現系を構築することにした。*btrC*遺伝子を含むpDS2を鋳型としてPCRにより適当な制限酵素部位を含むフラグメントを調製することにした。プライマーはBtrCのN末端側に相当する部分に対しては*Bam*HIと*Nde*I部位を持つ40kf (5'GGTGGAGGATCCATATGACGACTAA3') C末端側に相当する部分に対しては*Hind*III部位を持つ40kr (5'AAAGCAAGCTTATCCTGGTTCATCC3')を設計した。PCRによる増幅バンドを一度pUC19の*Bam*HI-*Hind*III部位に組み込みpDS3を得た。pDS3はDNA塩基配列分析により完全に*btr*C遺伝子を含むことを確認した後、発現ベクターのpET30b(+)の*Nde*I-*Hind*III部位に組み込みpDS4とし、*E. coli* BL21(DE3)を形質転換し*E. coli* / pDS4を得た。このpDS4にも*btr*C遺伝子を含むことを確認した。

E. coli / pDS4はOD_{600}が約0.6になるまで37℃、200rpmで前培養した。本培養用の培地に対し1/100量の前培養菌体を加えOD_{600}が約0.6になるまで同様に培養し、IPTG（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド）を最終濃度0.4 mMになるように加えてBtrCの発現を誘導した。誘導後2-3時間振とう培養し集菌した。

この菌体を超音波により細胞破砕し遠心上清をとり無細胞抽出液（CFE）とした。*E. coli* / pET30のIPTG誘導の有無、*E. coli* / pDS4のIPTG誘導の有無で得られた培養菌体のCFEのSDS-PAGEをFig. 60に示す。

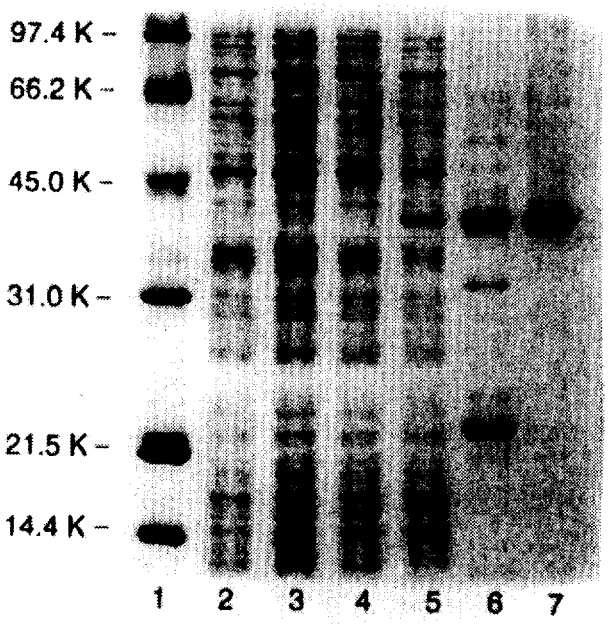


Fig. 60 Expression of BtrC
lane 1; marker, lane 2; pET30, lane 3 pET30 + IPTG,
lane 4; pDS4, 5; pDS4 + IPTG,
lane 6; DOI synthase from *B. circulans*, lane 7 purified BtrC

一目瞭然で42 kDaのサブユニットと同じサイズのタンパク質BtrCが可溶性タンパク質として発現していることがわかった（Fig. 60 lane 6）。

BtrCがDOI合成酵素活性を持つかどうかを確認するために、CFEを用いて酵素反応を行った。*B. circulans*のDOI合成酵素の活性試験と同様の酵素反応条件になるようにCFE 5 mlを用い、NAD^+、Co^{2+}、G-6-Pを最終濃度5 mMになるように加え46℃で2時間酵素反応を行った。*O*-4(ニトロベンジル)オキシム誘導体化後、HPLC分析した。Fig. 61に示すように明らかにDOIに相当するピークが存在した。また、8.4 mgのG-6-P、[6,6-$^2H_2$]G-6-Pから約3 mgの生成物を得ることができたのでさらに^{1}H-NMR、^{2}H-NMRにより構造を確認した。この結果*B. circulans*から精製したDOI合成酵素の42 kDaサブユニットに相当するBtrCは、23 kDaサブユニットがなくてもDOI合成活性を有することが明らかになった。

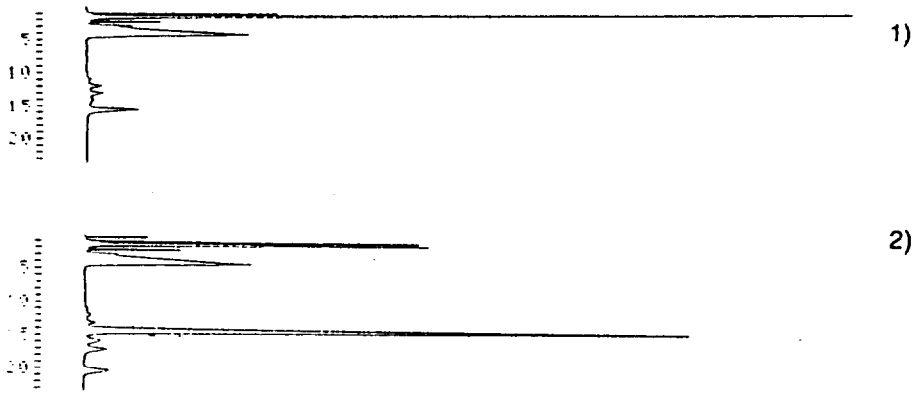


Fig. 61 Expression of BtrC
1) E. coli (pET30) + IPTG
2) E. coli (pDS4) + IPTG

4 - 3 . 7　　BtrCの精製

次にこの組み換えDOI合成酵素BtrCを精製し、*B. circulans*由来のDOI合成酵素やDHQ合成酵素との生化学的性質を比較することにした。

BtrCはCo^{2+}を含まない緩衝液や硫安分画条件、透析条件下ではすぐに変性してしまい活性が激減した。そこで0.2 mM Co^{2+}を含む50 mM Tris-HCl (pH7.7)を緩衝液Iとして用いて酵素精製を行うこととした。

先述の通り調製したCFEを、DEAE-Sepharose Fast Flow担体を充填したカラムに流し込んだ。吸着されない画分は緩衝液Iで除去した後、緩衝液I 300 mlと緩衝液J（50 mM Tris-HCl、0.2 mM $CoCl_2$、0.4 M NaCl、pH 7.7）300 mlのリニアグラジエント法により塩濃度を増大させタンパク質を溶出した（Fig. 62）。

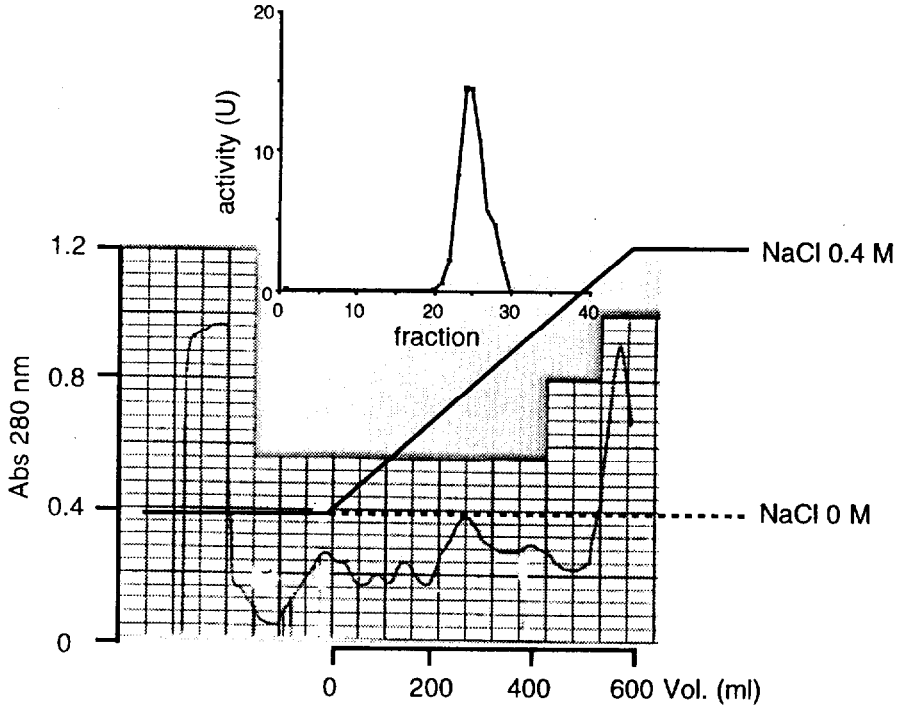


Fig.62 DEAE Sepharose chromatography

DEAE-Sepharose Fast Flow担体を用いたクロマトグラフィー後のDOI合成酵素活性画分をCentriprep-10 (Amicon)を用い、2,000 x *g*で30分間の遠心分離による限外濾過を数回繰り返すことで約10 mlまで濃縮した。その濃縮液を緩衝液K（50 mM Tris-HCl、0.2 mM $CoCl_2$、0.1 M NaCl、pH7.7）で平衡化させておいたSuperdex 200 HiLoad 26/60に流し込んだ。流速2 ml/minで緩衝液Kを流すことでタンパク質を溶出した(Fig. 63)。

DOI合成酵素活性画分は*B. circulans*から精製したDOI合成酵素と同様の保持時間に観測された。

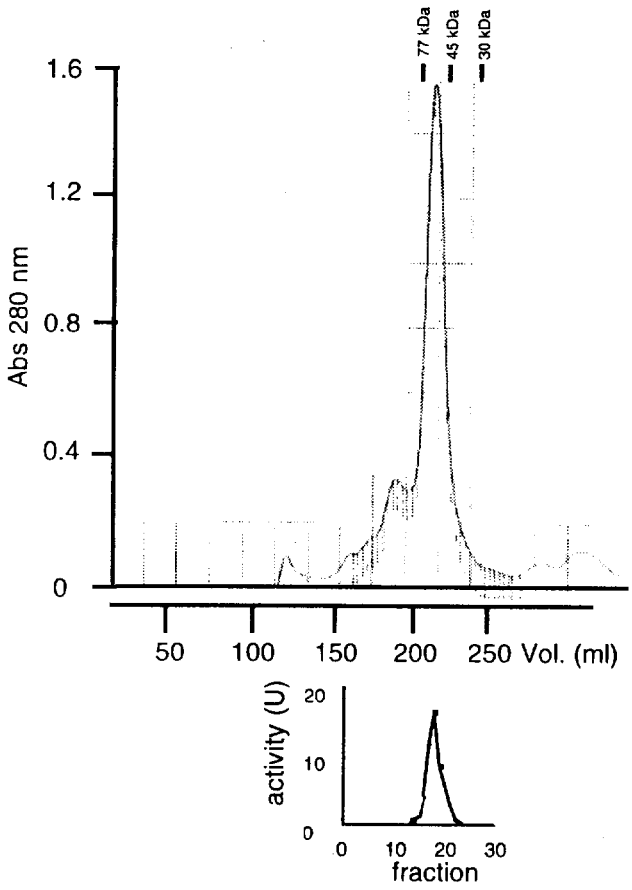


Fig.63 Superdex 200

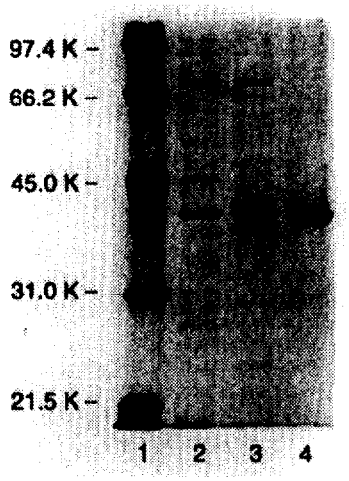


Fig. 64 Purification of BtrC
lane 1; marker,
lane 2; cell free extract,
lane 3; DEAE,
lane 4; Superdex 200

Superdex 200 HiLoad 26/60を用いたクロマトグラフィーによりBtrCは電気泳動的に純粋にすることができた（Fig. 64）。

BtrCの精製法をTable 7にまとめた。DEAE-Sepharose Fast Flow担体を用いたクロマトグラフィーおよびSuperdex 200 HiLoad 26/60を用いたクロマトグラフィーにより76％の回収率で効率よく精製できることがわかった。

Table 7. 1U = μmol/min

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Recovery (%)
Extract	364	65.0	0.179	1	100
DEAE	84.7	57.4	0.678	3.8	88.3
Superdex 200	45.9	49.1	1.07	6.0	75.5

BtrCの未変性条件下の分子量を推定するためにTSK gel G3000SWを用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより検討した。標準タンパク質の分子量と比較することにより、分子量約80 kDaと見積もることができ、ホモダイマーとして存在しているとが明かとなった（Fig. 65）。また、*B.circulans*由来のDOI合成酵素と混合しクロマトグラフィーを行ったところ明らかに異なった時間に溶出された。

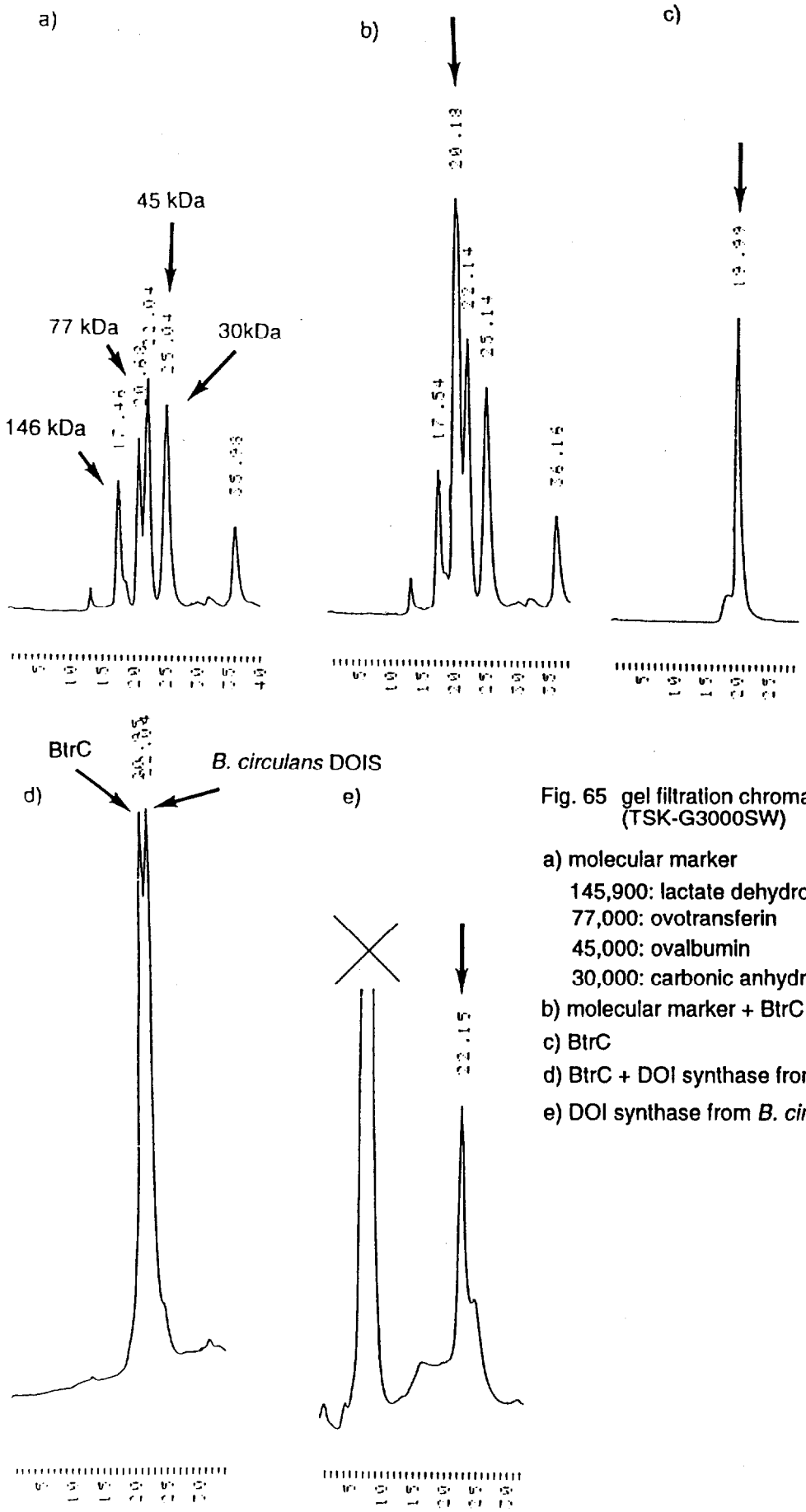


Fig. 65 gel filtration chromatography (TSK-G3000SW)

a) molecular marker
   145,900: lactate dehydrogenase
   77,000: ovotransferin
   45,000: ovalbumin
   30,000: carbonic anhydrase
b) molecular marker + BtrC
c) BtrC
d) BtrC + DOI synthase from *B. circulans*
e) DOI synthase from *B. circulans*

4-3.8　　BtrCの生化学的性質

BtrCの生化学的性質を検討することにした。

まず至適pHについて検討した。BtrC溶液を0.2 mM Co^{2+}イオンを含む50 mM Tris-maleate-NaOH (pH5.5-8.5)、50 mM Tris-HCl (pH7.0-9.0)、50 mM MOPS-KOH (pH6.5-8.0)、50 mM グリシン-NaOH (pH8.5-10.5)緩衝液で100倍に希釈することにより酵素溶液のpHを変化させた。各pHの酵素溶液を用いて酵素活性試験を行い至適pHを決定した (Fig. 66)。その結果*B. circulans*由来酵素と同じでpH 7.5-8.0で最大活性を示した。

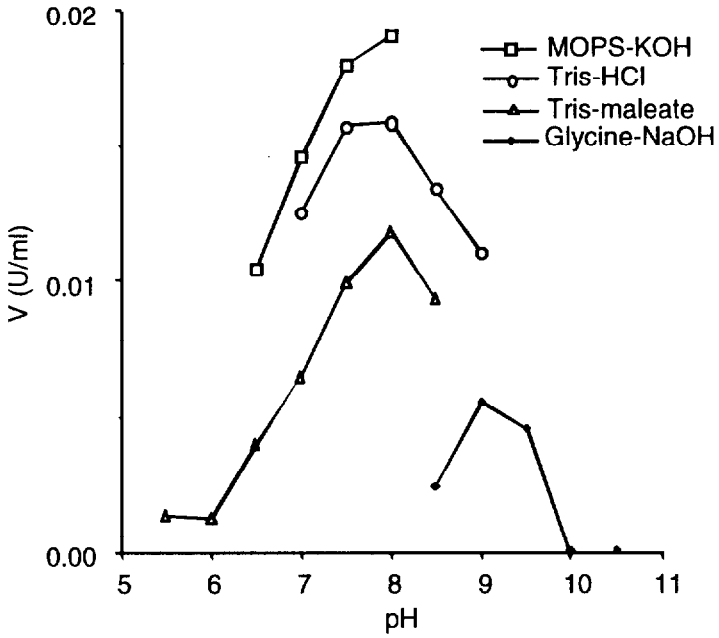


Fig. 66

次に反応温度について検討した。4-55℃まで反応温度を変化させ酵素反応を追跡した結果、55℃以上で最大活性を示した (Fig. 67)。

次にBtrCの熱安定性を検討した。4-65℃で5分間熱処理し、その後46℃で酵素反応を追跡したところ50℃以上でタンパク質が変性し失活が観測された（Fig. 67）。このことは組み換えDOI合成酵素は高温でないと反応が効率よく進行しないが、50℃以上では変性も伴っているということである。そこで反応効率がよく、酵素の失活を伴わない46℃を反応温度に設定した。

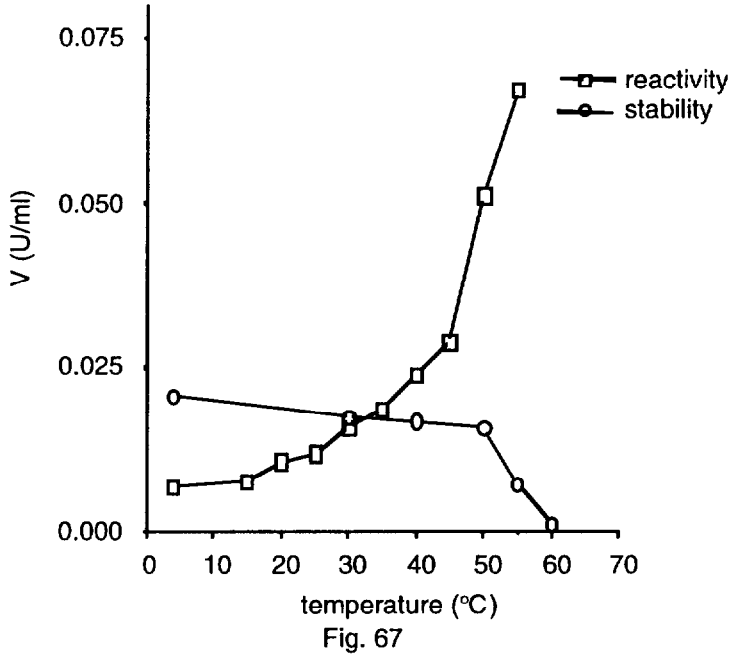


Fig. 67

次に各種二価の金属イオンに対する依存性を調べた。1 mM EDTAを加えた条件下では全く活性を示さなかった。また、EDTA処理により金属イオンを除去した酵素溶液にCo^{2+}イオンをはじめとする2価の金属イオンを加えたが、いずれにおいても酵素活性は再構築できなかった。そこで、酵素溶液には常に0.2 mM Co^{2+}イオンの存在下、二価の金属イオンの効果について検討をおこなった（Table 8）。

Table 8.

additive	relative Vmax	additive	relative Vmax
none	1.00	Co^{2+}	1
Mg^{2+}	1.06	Ni^{2+}	0.79
Ca^{2+}	0.87	Cu^{2+}	0.43
Mn^{2+}	0.93	Zn^{2+}	0.05
Fe^{2+}	0.93	EDTA	0

1 mM Co^{2+}イオン存在下の活性を基準として相対的な活性を比較した。Mg^{2+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{2+}、Ni^{2+}イオンは酵素反応に影響を与えなかった。Cu^{2+}イオンは半分、Zn^{2+}イオンは完全に酵素活性を阻害した。これらの傾向は*B. circulans*由来のDOI合成酵素と同じであり、Co^{2+}イオンだけを特異的に補因子として用いて反応を触媒することを示している。

以上検討してきた最適な酵素反応条件下で経時的に酵素反応を追跡した（Fig. 68）。

BtrCを約2 μM用いた反応条件下では30分間は直線的に酵素反応が進行することが明らかとなった。そこで最適な酵素反応条件下5分後に反応をとめて、一分間あたりの生成物量を初速度として、酵素反応速度論的定数を求めることにした。

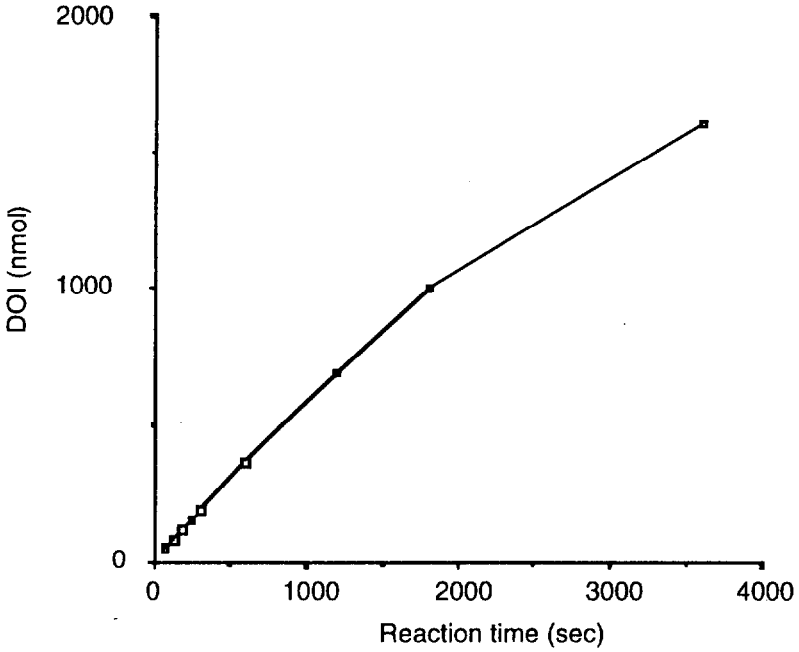


Fig. 68

まず、先に述べた反応条件下、基質であるG-6-Pの濃度だけを変化させて反応をおこなった。

Fig. 69にLineweaver-Burk プロットを示す。

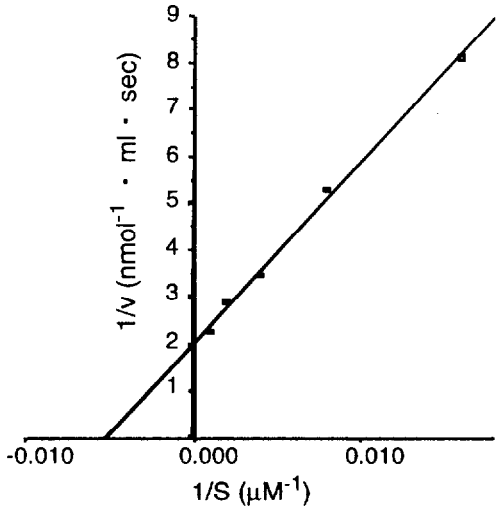


Fig. 69 G-6-P

このグラフからK_mは2.1x10^{-4} M、k_{cat}は1.0 s^{-1}、k_{cat}/K_mは4.8 x10^3 M^{-1}S^{-1}（46℃、pH 7.7）と求まった。

また、補酵素NAD$^+$についても濃度を変化させて酵素反応を行いLineweaver-Burk プロットを作成した(Fig. 70) 。

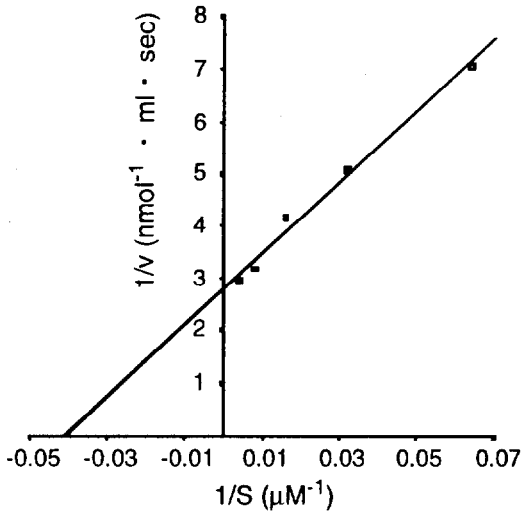


Fig. 70 NAD$^+$

このグラフからNAD$^+$に対するK_mは2.3 x10^{-5} Mと求まった

精製した組み換えDOI合成酵素は*B. circulans*由来のDOI合成酵素と比較して非常に不安定で、4℃、-75℃どちらにおいても10日後には半分以下の活性しか保持していなかった（Fig. 71）。

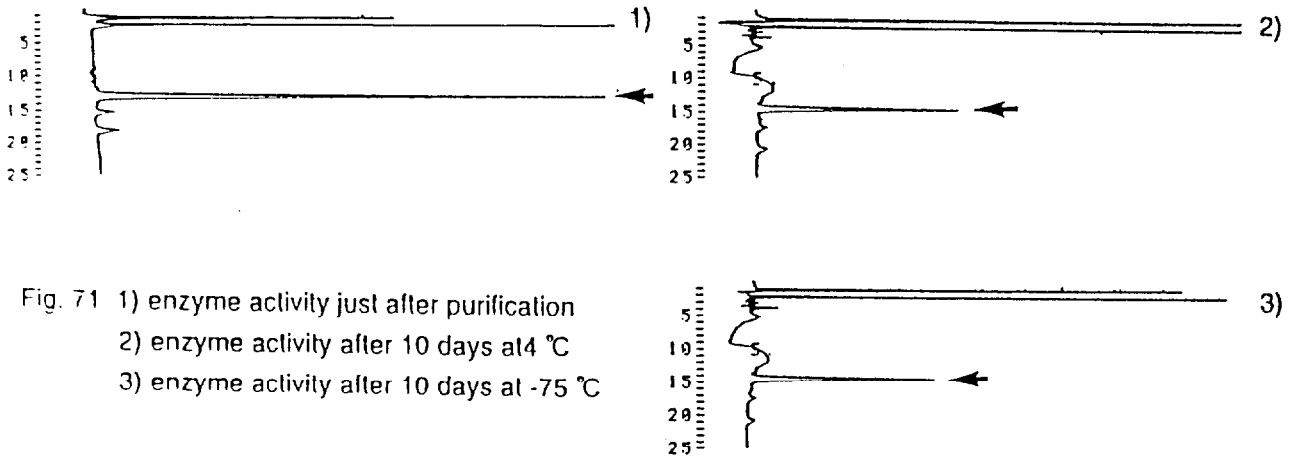


Fig. 71 1) enzyme activity just after purification
2) enzyme activity after 10 days at4 ℃
3) enzyme activity after 10 days at -75 ℃

DOIのオキシム誘導体に対し約4%のピークが2つHPLC分析で観測されており、これらのピークはDOI誘導体化反応時の副生成物と考えられるが構造は現在のところ未同定である。

4-2.9　　BtrCの利用

2-デオキシ-*scyllo*-イノソースが生産される炭素-炭素結合生成過程は安価なグルコースから数多くの天然物の部分構造であるキラルな多官能基を含むシクロヘキサン環を合成するものであり、この化合物を合成する酵素はグルコースをより付加価値の高い化合物へ変換する系を導く可能性を秘めている。加えて、近年Frostらはデヒドロキナ酸合成酵素を鍵としたシキミ酸経路の幾つかの酵素を同時に大量発現させ、その酵素系を用いてグルコースから芳香族化合物を合成する系を構築できることを示した。そして、これが化石資源を用いないクリーンな芳香族化合物合成系として将来性のあるものであるという主張をしている[73]（Fig. 72）。

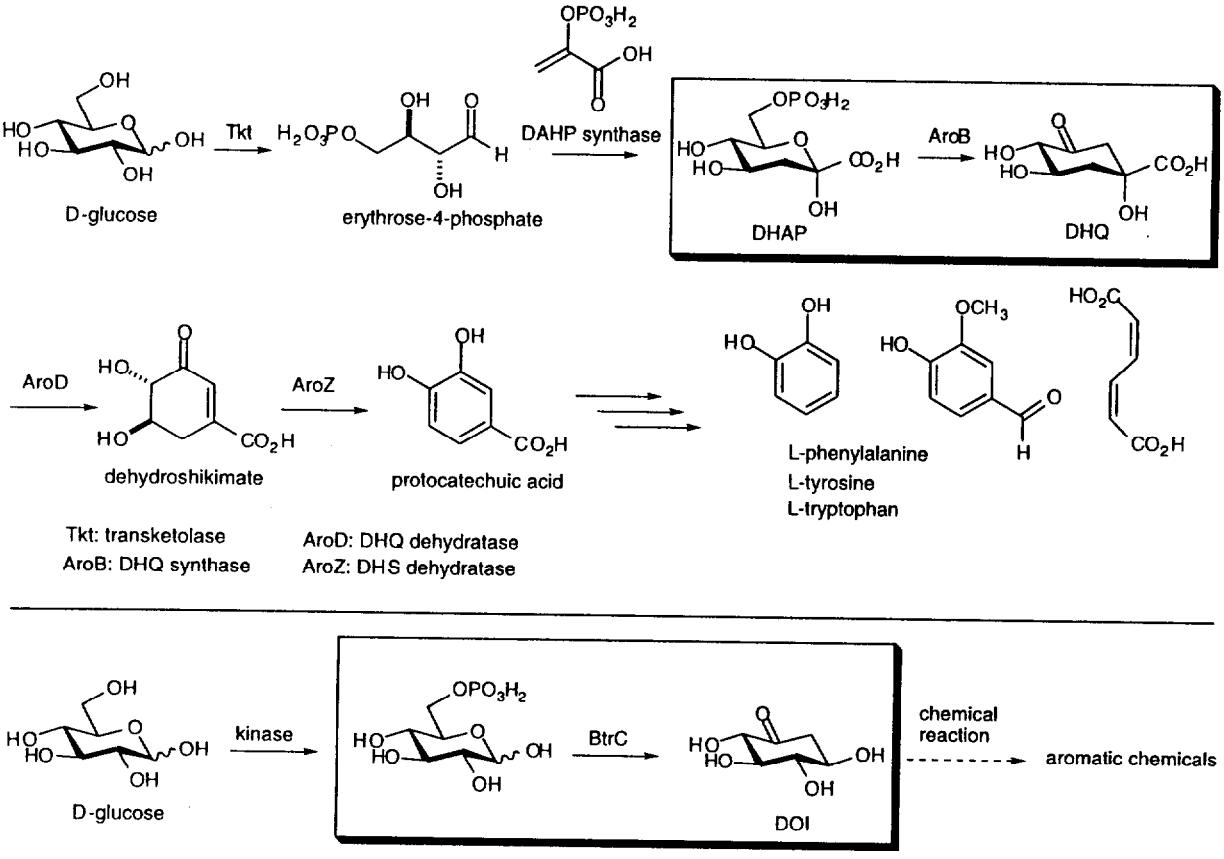


Fig.72

この合成経路における鍵反応はグルコースからシクロヘキサノンへの変換である。本研究におけるDOI合成酵素はG-6-PからDHQと同等のシクロヘキサノンであるDOIへ変換することができることを考慮すると、ヘキソキナーゼと本酵素を組み合わせて酵素反応が行われれば、シキミ酸経路を利用したものより効率よくグルコースから芳香族化合物へ変換できる可能性がある。そこで、DOI合成酵素遺伝子である*btrC*を利用して、グルコースからDOIの生産を検討した。

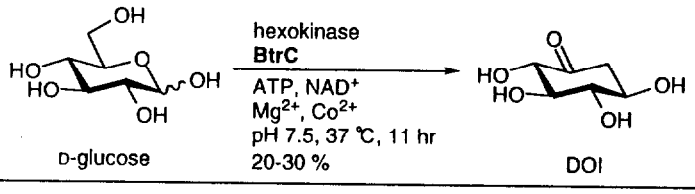
まず、*E.coli* / pDS4を培養し、培養液中のDOI生成量を検討した。

LB培地を用いた普通の培養条件ではIPTG誘導後2時間後の培養液に10 mg/100 mlの濃度でDOIが検出された。培養を続けることにより、さらに変換反応が進行すると考えられたがそれ以上の生産はみられなかった。

大量のG-6-Pを供することができるようにLB培地にグルコースやスターチを1%加えて同様に培養したが、単なるLBよりも生産が少なかった。原因はよく分からないが、IPTGで誘導する時期が悪かったと考えている。

また最小培地M9（1L: Na_2HPO_4 12.8 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1.0 g、グルコース4.0 g）に0.2 mM IPTG、30 μg/mlカナマイシンを加えた培地で培養を行えば、グルコースだけから効率よくDOIが変換されると考え検討した。しかしながら生育が悪く、DOIの生産は全く観測されなかった。

次にヘキソキナーゼとBtrCの混合酵素系を用いて、グルコースからDOIの変換を検討した（Fig. 73）。



substrate	recover (%)	cyclization (%)	substrate	recover (%)	cyclization (%)
D-glucose	12	30	D-galactose	>99	not detected
D-mannose	16	0.2	2-deoxyglucose	38	not detected
D-allose	>99	not detected	3-deoxyglucose	63	not detected

Fig. 73

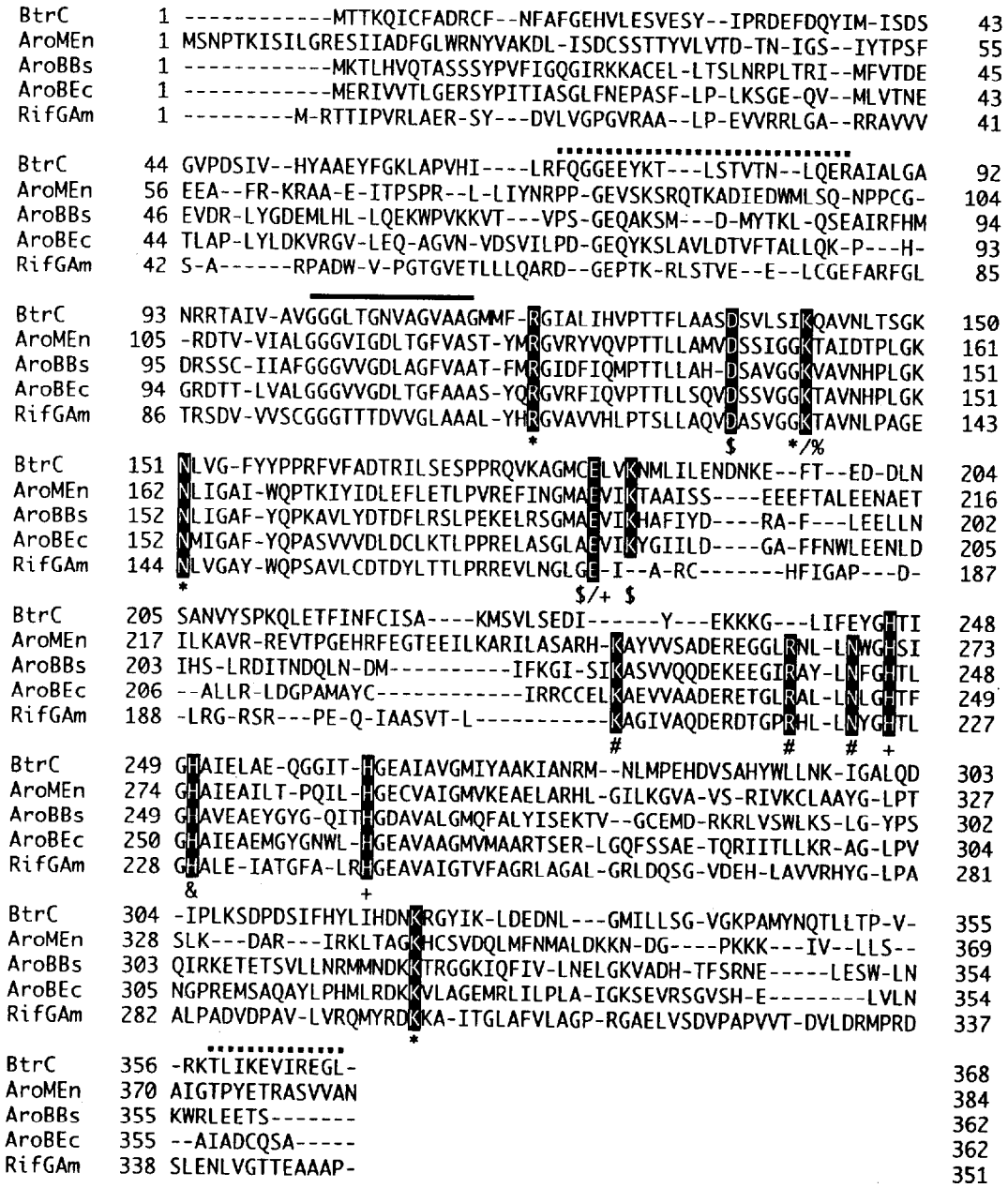
Fig. 73に示す条件で検討したところ11時間で20-30%のD-グルコースをDOIに変換することができた。他のヘキソースについても検討してみたが、D-マンノースを用いたときに環化体と思われるピークが約0.2%検出された。ヘキソースキナーゼの基質特異性を考えるとD-グルコース、D-マンノース以外はよい基質でないことが原因として挙げられる[74]。

4-4 考察

4-4.1 BtrCの一次構造について

*B.circulans*から精製したDOI合成酵素のN末端アミノ酸配列を基にDNAプローブを作成し、染色体DNAとのハイブリダイゼーションによりDOI合成酵素遺伝子のスクリーニングを行った結果、42 kDaサブユニットをコードする*btr*Cを取得することができた。BtrCの推定アミノ酸配列は、*B.circulans*から精製したDOI合成酵素のN末端アミノ酸配列およびnano-LC/ESI IT-MS/MS分析による内部アミノ酸配列（Fig. 74の……）が一致したことから、42 kDaサブユニットをコードする遺伝子であることを確認した。質量分析からは分子量が同じアミノ酸は見分けがつかないなど、直接配列を決定することが困難であるが、遺伝子取得後の推定アミノ酸配列との比較において重要なデータとなった。

BtrCのアミノ酸配列は様々な生物種のデヒドロキナ酸(DHQ)合成酵素と相同性を持っていた。*E.coli*由来のものとは324残基中26.5%、*Emericella nidulans*由来のものとは276残基中26.4%、*B. subtilis*由来のものとは264残基中34.1%の相同性が認められた（Fig. 74）。



BtrC ; DOI synthase of *B. circulans*
AroMEn; DHQ synthase of *Emericella nidulans*
AroBBs; DHQ synthase of *Bacillus subtilis*
AroBEc; DHQ synthase of *Escherichia coli*
RifGAm; amino DHQ synthase of *Amycolatopsis mediterranei*

A functional attribution of the aa residues given reverce face, based on the analysis of the three-dimensional structure of the DHQS domain of *Emericella nidulans* is given below the alignment by the following code: +=Co^{2+}binding (in the fungal protein it is Zn^{2+} instead!); *=phosphate binding; $=3-OH (in the DAHP it is 4-OH) binding; %=1-OH (in the DAHP it is 2-OH) binding; &=4-OH(in the DAHP it is 5-OH) binding; # is not conserved in only the DOI synthase.
——— is Rossman fold motif.
..... is sequence from LC-MS.

Fig. 74

またBtrCと様々な生物種DHQ合成酵素のアミノ酸配列をGENETYX MACソフトにあるUPGMA法で系統樹を作成した（Fig. 75）。この系統樹を見ると、BtrCとDHQ合成酵素は起源が同じであるが、原核生物と真核生物が分岐するより前に分岐したと思われる。DOI合成酵素を生物の進化、生物の生育には必ずしも必要のない二次代謝酵素と考えることができる。

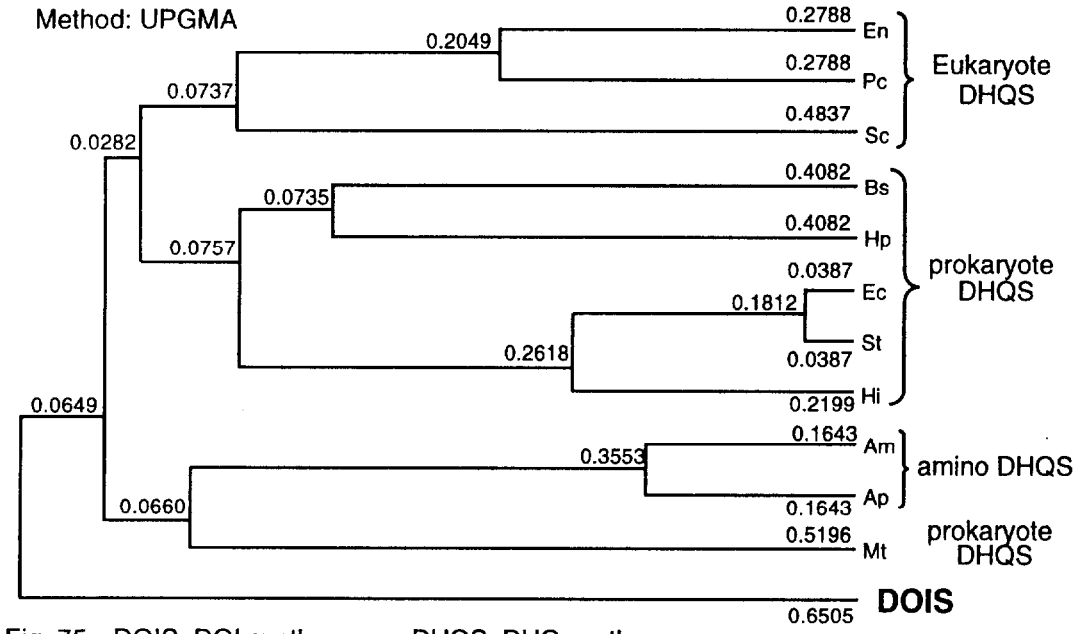


Fig. 75　DOIS; DOI synthase　　DHQS; DHQ synthase

En: AROM, *Emericella nidulans*, [26.4% / 276 aa]
Pc: AROM, *Pneumocystis carinii*, [28.6% / 276 aa]
Sc: AROM, *Saccharomyces cerevisiae*, [28.3% / 184 aa]
Bs: AroB, *Bacillus subtilis*, [34.1% / 264 aa]
Hp: AroB, *Helicobacter pylori*, [28.9% / 325 aa]
Ec: AroB, *Escherichia coli*, [26.5% / 324 aa]
St: AroB, *Salmonella typhimurium*, [26.9% / 324 aa]
Hi: AroB, *Haemophilus influenzae*, [30.3% / 356 aa]
Am: RifG(amino DHQS), *Amycolatopsis mediterranei*, [28.8% / 302 aa]
Ap: ORF10(amino DHQS), *Actinosynnema pretiosum auranticum*, [30.7% / 261 aa]
Mt: AroB, *Mycobacterium tuberculosis*, [28.0% / 336 aa]
DOIS: BtrC, *Bacillus circulans*

*E. nidulans*由来のDHQ合成酵素のX線結晶構造解析が最近報告された[39]。そこで示唆されている13個の触媒残基と比較すると10個のアミノ酸が保存されていることがわかった（Fig. 74, 76）。基質1、2位の構造はDHQ合成酵素の基質3-デオキシ-D-*arabino*-ヘプツロソン酸-7-リン酸（DAHP）とDOI合成酵素の基質G-6-Pとは全く異なっており、その周辺を認識しているアミノ酸残基を見てみると、*E. nidulans*のDHQ合成酵素のK152は保存されているが他の残基は全く異なっていた。構造解析から触媒残基として考えられているアミノ酸のうちDOI合成酵素で保存されていない３残基は、まさにこの部位のものであった。K152については他に脱リン酸化、アルドール縮合のときのエノラートの負電荷を安定する機能も併せ持っていると推定されており、基質1、2位の部位の認識には直接関与しない可能性が考えられる。

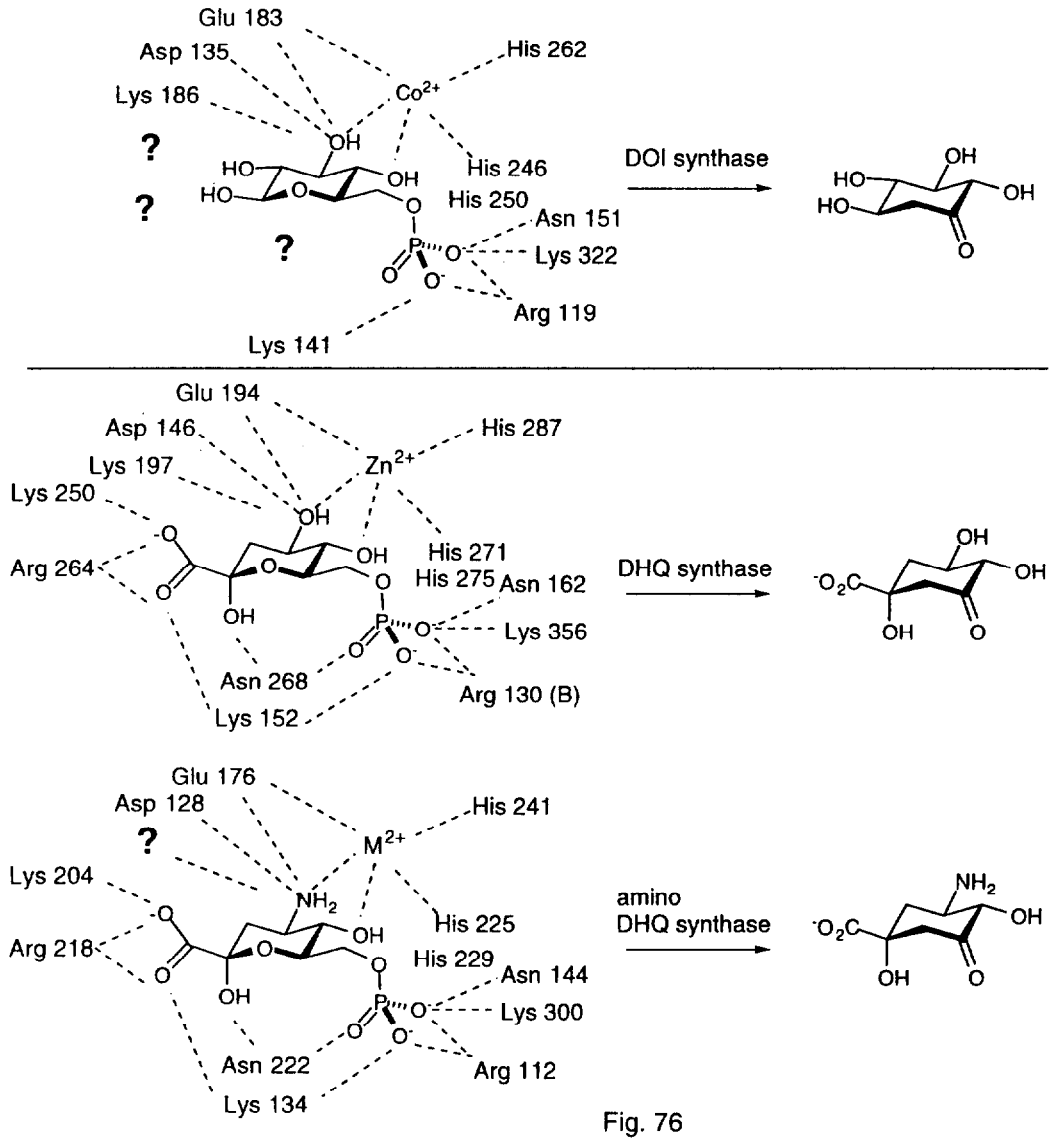


Fig. 76

リファマイシン生合成に含まれるアミノDHQ合成酵素（RifG of *Amycolatopsis mediterranei*、28.8% in 302 aa overlap)との比較ではさらに基質3位の認識に関する残基が異なっていた[41]。*E. nidulans*由来のDHQ合成酵素のK197が3位水酸基を認識する一方で、アミノDHQ合成酵素ではその周辺の残基がアミノ基を認識しているものと思われる。この特異的な3位水酸基の認識は3-デオキシ-G-6-Pの酵素反応の効率の低さと関連していると考えられる。

また、DHQの結晶構造解析によると、ニコチンアミド依存性酵素に見られるRossmanホールド構造はN末端側に存在する。N末端側配列はDHQ合成酵素全体で見てもあまり保存されていないが、Rossmanホールドに特徴的なグリシン豊富なモチーフGGGXXGGXXXGがBtrCにも保存されている（Fig. 74の——）。

以上の一次構造の比較検討からBtrCすなわち組み換えDOI合成酵素はDHQ合成酵素類の一種として考えることができ、反応機構が類似しているということを一次構造的にも示すことができた。

次に得られた一次構造から反応機構について考察してみたい。

DOI合成酵素とDHQ合成酵素の反応機構は類似しているが立体化学を厳密に考慮すると幾分違いが存在する。一つはアルドール型縮合反応のときの遷移状態が異なっていると考えられ、DHQ合成酵素反応では基質のアルデヒド由来の水酸基がアキシアル位に、DOI合成酵素反応ではエクアトリアル位にくる（Fig. 77）。

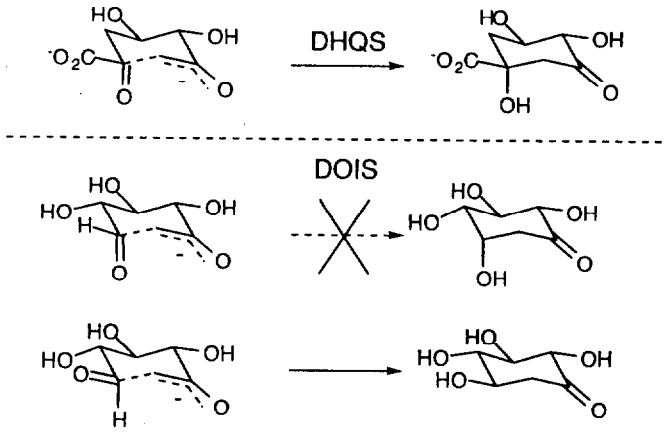


Fig. 77

このことはアルドール型縮合反応時のいす型6員環遷移状態を考えれば生成物の選択性を理解することができる。すなわちDAHPは1位のカルボキシル基がエクアトリアル位、カルボニルがアキシアル位にくるような遷移状態をとる。一方、G-6-Pにはカルボキシル基が存在しないのでアルデヒドのカルボニル酸素がエクアトリアル位にくる遷移状態をとり反応が進行すると考えられる。DHQ合成酵素の結晶構造解析によるとアルドール反応時の遷移状態を安定化する残基の存在が示唆されており、DOI合成酵素内ではどのように制御されているのかは大

変興味深い。

もう一つは脱リン酸化反応の向きに起因すると考えられ、基質6位の水素は立体特異的にDOIのデオキシ化部位に保持されるがその立体特異性が反対な点である（Fig. 78）。

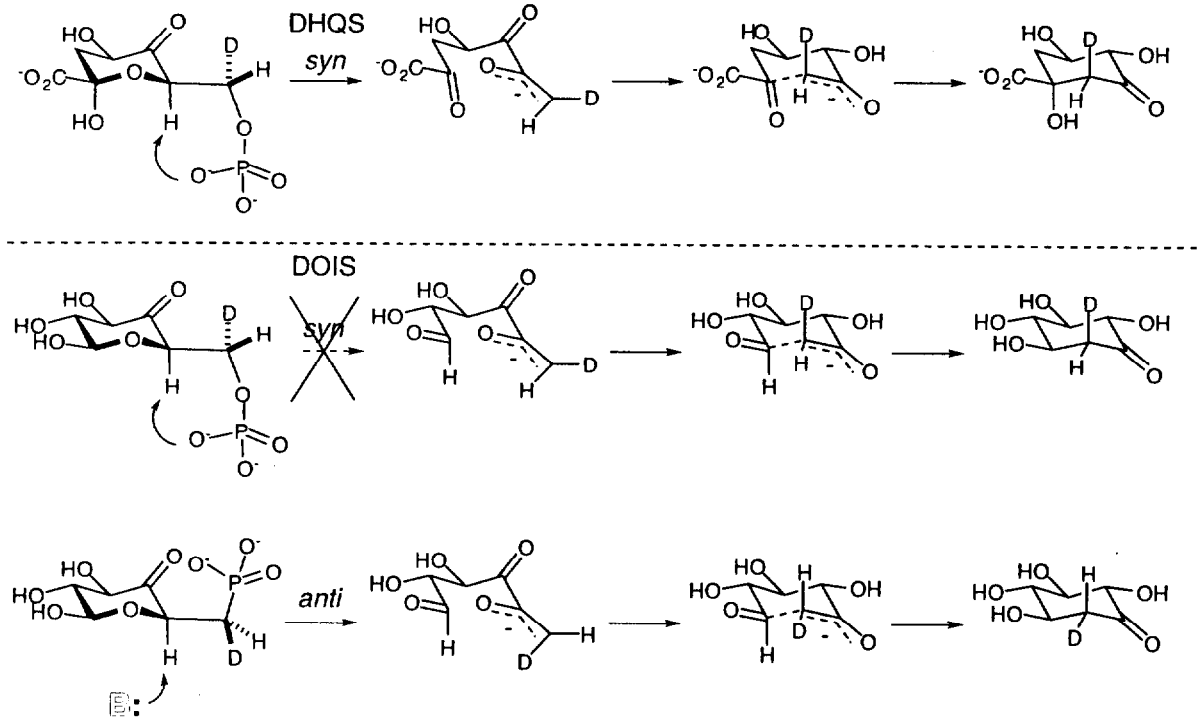
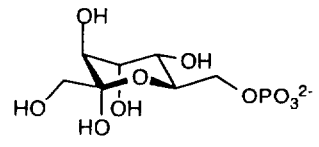


Fig. 78

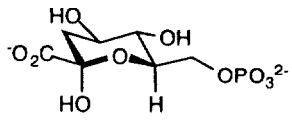
序論にも述べたとおり、DHQ合成酵素反応の脱リン酸化については、ホモホスホン酸アナログ、カルバサイクリックアナログ、2-デオキシ（G-6-Pの1位部分）アナログを用いて詳細に検討されている。これらの研究からはリン酸の酸素原子が塩基となり、β位の水素を引き抜くと同時に脱リン酸化が*syn*で進行すると考えられている。この*syn*脱離は、その後のアルドール縮合のいす型遷移状態を考えると化学的に合理的である。この脱リン酸に関するコンフォメーションは結晶構造解析からも予想されることである。

同じ型の反応機構がDOI合成酵素でも起きているとすると、生成物の立体特異性が逆となってしまう。反対に*anti*型脱リン酸化反応後いす型遷移状態を通ってアルドール縮合が起きると考えれば生成物の立体化学を解釈することができる。一次構造的には脱リン酸化に関与するアミノ酸残基はほとんど保存されている。実際に酵素内で*anti*型で反応が進行するとなると基質内のリン酸基ではない塩基となるアミノ酸残基が必要となるが、そのような残基が存在するか否か興味があるところである。

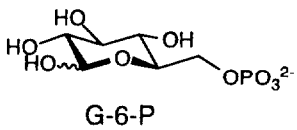
アカボース生合成のC_7Nサイクリトールの形成反応は基質をセドヘプツロース-7-リン酸としてDHQ合成酵素反応に似た機構で進行すると考えられている。酵素および酵素反応生成物は同定されていないが、セドヘプツロース-7-リン酸が基質であるとするとG-6-Pの2位と3位の立体化学が反対であり、基質認識を考えると酵素構造がどうなっているかが興味深い（Fig. 79）。



sedoheptulose 7-phosphate



DAHP



G-6-P

Fig. 79

4-4.2　　*btr*遺伝子クラスターについて

本研究においては*btrC*以外に*btr*A、*btr*B、*btr*D、*btr*Eも同時に取得することができた（*btrA*と*btrE*は全長を同定できていない）。これら遺伝子は一つのオペロン中に存在しており生合成遺伝子クラスターを形成していると考えられた。

ホモロジー検索からBtrB（432 aa）は*B. subtilis*のGlutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (429 aa, *gsa*B, SWISS PROT P71084)と216残基中77残基（35.6%）の相同性を示した。ブチロシン生合成にはいくつかアミノ化の段階が含まれており、BtrBはブチロシン生合成におけるアミノ化に関与する酵素と思われる。また、BtrE（>343 aa）は*B. subtilis*のsorbitol dehydrogenase（352 aa, *dhs*O, SWISS PROT Q06004）と167残基中35残基の相同性（21.0%）を示した。ブチロシン生合成経路には、アミノ化反応の前の脱水素酵素による酸化反応が存在すると考えられ、BtrEもブチロシン生合成酵素の一つとして考えられる。BtrAとDについては相同性のあるタンパク質は見つからなかったが、これら*btr*遺伝子はブチロシン生合成に関与する酵素タンパク質をコードしていると考えられる。今後、これらの遺伝子がコードするタンパク質が生合成に関与する可能性を確かめるために、*B. circulans*の染色体上の遺伝子を破壊し、ブチロシン生合成が遮断されることを検討する必要がある。また、どこの段階で遮断されているかを明らかにして機能の確定を進めていくことが重要である。

4-4.3　　BtrCの性質について

BtrCは大腸菌で大量発現することができ、それ自身でDOI合成酵素活性あることが明らかとなった。すなわち*B. circulans*のDOI合成酵素の23 kDaサブユニットがなくても、42 kDaサブユニットだけで活性を有するということである。しかしながら、Co^{2+}を含まない緩衝液や硫安分画条件、透析条件下ではすぐに変性してしまい活性が激減した。また、*B. circulans*由来のDOI合成酵素と比較して非常に不安定で、4℃、-75℃どちらにおいても10日後には半分以下の活性しか保持していなかった。すなわち*B. circulans*由来のDOI合成酵素は23 kDaサブユニットが存在することによって42 kDaとヘテロダイマーを形成し酵素構造を安定化することができるが、BtrCの場合42 kDaサブユニットどうしがホモダイマー構造をとるものの、それほど安定ではないと考えられる。また、第2章の部分精製における二つの活性画分の分離は、42 kDaサブユニットどうしのホモダイマーと、23 kDaおよび42 kDaのサブユニットからなるヘテロダイマーの違いであった可能性が考えられる。

組み換えDOI合成酵素の比活性は1.1 μmol/min/mgであり*B. circulans* 由来のDOI合成酵素の比活性0.018 μmol/min/mgに比べてかなり高い値であった。また、酵素反応速度論定数も効率の高い値として求まった。この違いもまた23 kDaサブユニットの有無によって生じていると考えられる。BtrCではホモダイマー構造をとることにより効率よく酵素反応を触媒できることに対し、*B. circulans* 由来のDOI合成酵素は23 kDaサブユニットが存在するため酵素反応を効率よく触媒できない可能性がある。*E. nidulans*のDHQ合成酵素の結晶構造はホモダイマーとして報告されており、BtrCがホモダイマー構造をとっていることと対応づけることができる。そのX線結晶構造解析からは、互いのサブユニット由来のR130が触媒反応に関わると推測されており、ホモダイマー構造をとることにより効率良く反応が進行するものと考えられる。

酵素の安定性と合わせて考えると、23 kDaサブユニットはタンパク質安定因子、酵素反応抑制因子の両方を兼ね備えたタンパク質と考えられる。今のところ23 kDaサブユニットに対する遺伝子は同定できていない。今後、このタンパク質の遺伝子をクローニングし機能解析をおこなう必要がある。

4-4.4　　BtrCの利用について

E. coli / pDS4をLB培地を用いて培養したときに、IPTGで誘導してから2時間後の培養液に10 mg/100 mlの濃度でDOIが検出された。その他いくつかの培養条件で検討したが、それ以上のDOIの生産は観測されなかった。培養によりDOIを効率よく生産するには、さらなる条件の検討が必要である。例えば、*E.coli*以外の宿主としてアミラーゼやプロテアーゼを菌体外に多量に分泌する*B. subtilis*を*btrC*遺伝子を含むベクターで形質転換し培養を行えば、培地中の栄養（グルコース）を効率よくDOI合成酵素反応に供給するシステムを構築できる可能性がある。また将来の技術として*btrC*を光合成植物や微生物に組み込むことにより、二酸化炭素を直接DOIに変換する系の開発が可能になると考えられる。

ヘキソキナーゼとBtrCの混合酵素系を用いたときには11時間で20-30%のD-グルコースをDOIに変換することができた。すなわちグルコースからDOIへのワンポット合成系を構築することができた。このDOIの生産系では酵素の他にグルコースとATPが必要となる。グルコースは米やトウモロコシなどに由来する炭水化物として簡単に手に入る化合物であるので、ATPさえ供することができれば、より効率の良い生産系を構築できると考えられる。

ATP合成はアセテートキナーゼやピルビン酸キナーゼを用いたATP再生系や[75]、リポソームを用いてバクテリオロドプシンでリポソーム内外に電位差を生じさせATP合成酵素を駆動することにより合成する方法が考えられる[76]。これらATP合成系とDOI合成系を組み合わせることによりグルコースからDOIへの生産系を構築できる可能性がある（Fig. 80）。

実際に具体化するには大きな問題がいくつもあるが、ヘキソキナーゼとDOI合成酵素を利用したグルコースの炭素六員環化合物へ変換系をグリーンルートとして活用できると考えられる。

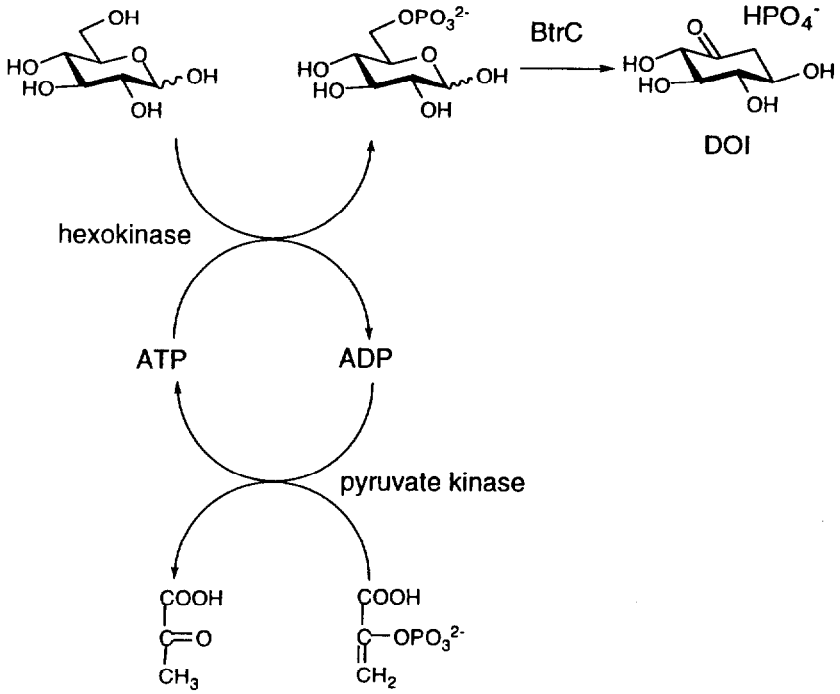


Fig. 80

4 - 5　結論

DOS含有アミノグリコシド抗生物質の生合成遺伝子のDOI合成酵素遺伝子*btrC*を初めて同定することができた。この抗生物質群の生合成研究における大きな発展である。また、*btrC*以外にもブチロシン生合成酵素をコードすると考えられる遺伝子の存在を明らかにした。

また、*btrC*遺伝子産物BtrCは様々な生物種からのDHQ合成酵素と有意な相同性持っていることが明らかになった。さらに、*E. nidulans*由来のDHQ合成酵素のX線結晶構造解析で示唆されている触媒残基が13個中10個保存されていることがわかった。保存されていない残基も基質の構造の違いによるものであり、DOI合成酵素が一次構造的にもDHQ合成酵素と類似性があることを示すことができた。

また*btrC*遺伝子を大量発現させ、BtrCがDOI合成酵素活性を有していることが明らかとなった。この組み換えDOI合成酵素は、*B. circulans*の培養菌体から得られるDOI合成酵素よりも不安定であるが、高い酵素活性を有していることがわかった。*B. circulans*由来のDOI合成酵素と組み換えDOI合成酵素の違いは23 kDaサブユニットタンパク質の有無であり、このタンパク質は構造安定因子、酵素反応抑制因子の２つの機能を持ち合わしていると考えられた。

また組み換えDOI合成酵素とヘキソキナーゼを組み合わせることにより、グルコースからDOIへの変換系を構築することができた。

結語および今後の展望

2-デオキシストレプタミン（DOS）含有アミノ配糖体抗生物質生合成において、世界で初めて純粋な酵素タンパク質として2-デオキシ-*scyllo*-イノソース（DOI）合成酵素を単離し、その酵素遺伝子（*btrC*）を同定した[58,65]。DOS含有アミノ配糖体抗生物質類の生合成研究、DOI合成酵素研究の新展開が期待できる。

本研究ではブチロシン生産菌*Bacillus circulans*由来のDOI合成酵素について検討した。第２章ではDOI合成酵素反応機構について検討した。まず、*B. circulans*の無細胞抽出液にDOI合成酵素活性を検出し、酵素の存在を明らかにした。次に部分精製酵素溶液とラベル化基質、デオキシ化基質を用いた酵素反応を解析することにより、基質4位の酸化反応を基点として反応が進行し、脱リン酸化、還元、アルドール縮合という多段階反応がDOI合成酵素内で起こることを明らかにすることができた。第３章では反応を触媒する酵素を純粋に得ることに成功し、生化学的性質を明らかにした。第４章では精製酵素の部分的アミノ酸配列を決定し、それを基にDNAプローブを作成しDOI合成酵素遺伝子*btrC*をクローニングすることができた。さらに*btrC*遺伝子を大量発現させることに成功した。また、組み換えDOI合成酵素とヘキソキナーゼを用いてグルコースからDOIへの変換に成功しクリーンな有用物質生産系、すなわちグリーンルートへの礎を築いた。

本研究の結果から今後の展開について考えてみたい。大きく分けて二つの研究の方向性があり、1つはブチロシン生合成研究、もう一つはDOI合成酵素についての研究である。

ブチロシン生合成の逐次過程については生合成遮断変異株を用いた実験により示されている。すなわち、DOSとグルコサミンからまずパロマミンが生成し、アミノ化されてネアミンとなり、それにリボースまたはキシロースが結合してリボスタマイシン、キシロスタシンが形成される。そして、DOS1位のアミノ基に4-amino-2-hydroxybutyric acidが結合することによりブチロシンが生合成されると考えられる[22]（Fig. 81）。

しかしながらブチロシン生合成酵素遺伝子の報告は一つもなかった。本研究では生合成遺伝子の一つである*btrC*を同定し、また遺伝子クラスターと考えられる*btr*遺伝子群を発見した。生合成過程を考慮すると、今回DNA塩基配列を決めた遺伝子の他にも生合成酵素遺伝子が存在すると考えられる。そこで、今回得られたDNAの周辺の遺伝子を解析することにより、全ての生合成酵素遺伝子を発見できると思われる。またそれらのコードするタンパク質が生合成に関与する可能性を確かめるために、*B. circulans*の染色体上の遺伝子を破壊しブチロシン生合成を遮断するかを検討する必要がある。

、DOS含有アミノグリコシド抗生物質の生合成においてはネアミンがどの経路により生成するのかは生物種によって異なった報告がされており、ネオマイシン生産菌*Streptomyces fradiae*ではネオサミンCを経て生合成される[77]（Fig. 81 route A）。これはDOSとのグリコシド結合形成における糖供与体の違いによるものと考えられる（Fig. 81 route AかB）。ブチロシン生合成酵素遺伝子クラスターには、この反応を触媒するグリコシル化酵素の遺伝子が存在すると考えられ、遺伝子解析を進めることでその生合成過程の違いを解明できる可能性がある。また、少なくとも2つのグリコシル化酵素遺伝子が含まれているはずで、それら異なった部位のグリコシル化反応を触媒する酵素間の構造の違いを検討することにより、結合様式を決める要因についての有益な情報が得られると考えられる。

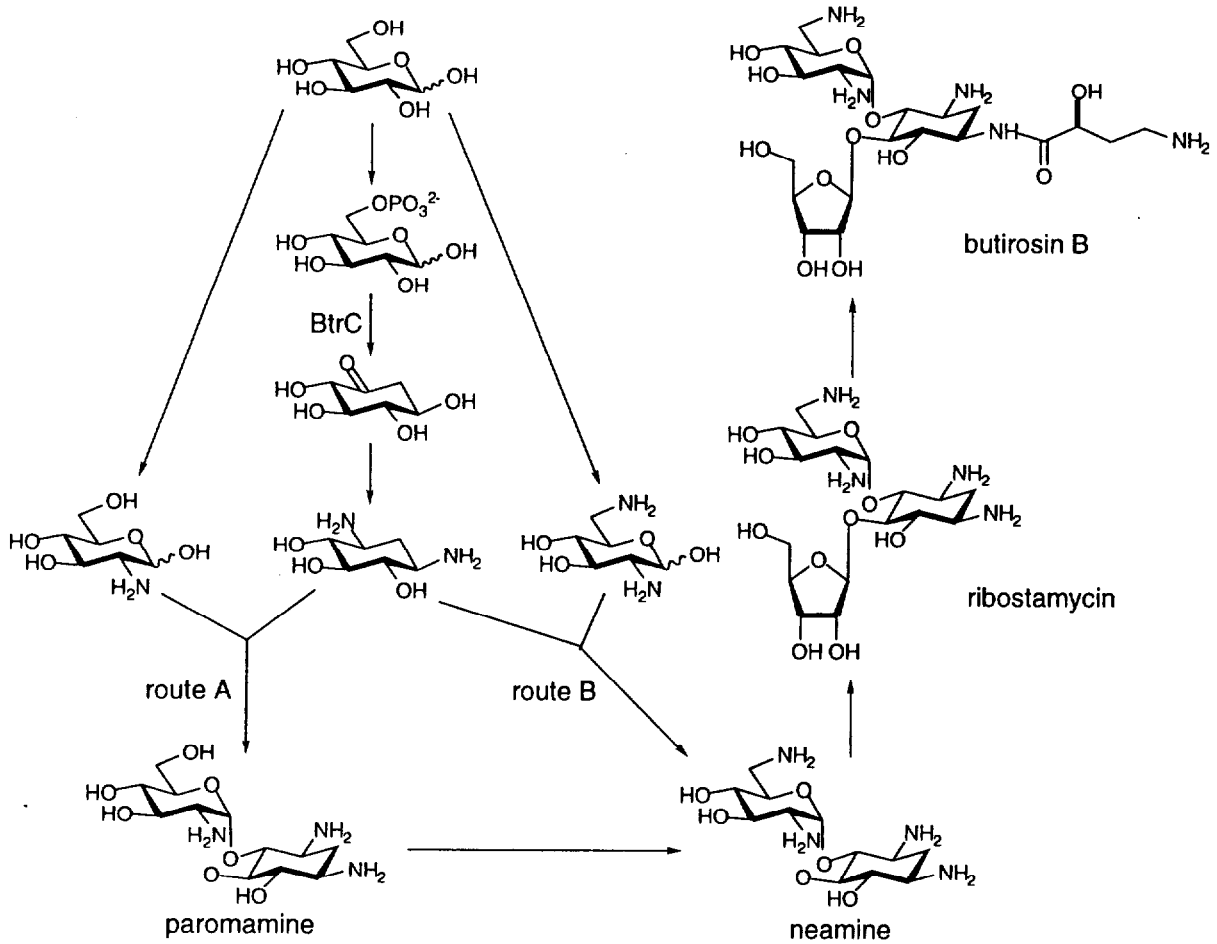


Fig. 81

ポリケチド系抗生物質におけるポリケチド合成酵素（PKS）およびペプチド系抗生物質におけるノンリボソーマルペプチド合成酵素（NRPS）はモジュールという、一連の鎖伸長反応を触媒するいくつかの反応の活性部位が連なった繰り返し構造を有している。遺伝子操作によりそのモジュールの数や順番を組み合わせることにより非天然型の化合物までもが生産されるようになってきている[78]。ア

ミノグリコシド抗生物質生合成においても様々な種類のグリコシル化酵素、修飾酵素を組み合わせることにより非天然型抗生物質を生産できる可能性がある。またポリケチドやペプチド系抗生物質においてはアグリコン骨格構造も重要であるが、糖の種類、結合様式によって異なった構造、活性を有する化合物が多数存在し、アミノグリコシド抗生物質生合成における糖鎖合成システムと組み合わせる"engineered biosynthesis"によりさらに有用な抗生物質を生産できる可能性がある。

DOI合成酵素の23 kDaサブユニットは構造安定因子、酵素反応抑制因子の２つの機能を持ち合わしていると考えられたが、その機能解析も大変興味深い。まず対応する遺伝子を取得することが必須であり、その後は*btrC*と同様に発現させ、組み換えDOI合成酵素と共存させた場合どのような活性や安定性を有するのか、もしくは全く違う機能を持っているのか検討する必要がある。もし酵素活性の制御因子として生体内で働いているのであれば、DOI合成酵素は生育に必ずしも必要のない二次代謝酵素であるためにそのような制御を受けている可能性が考えられる。

一方、抗生物質生合成の制御系としては、放線菌*S. griseus*におけるストレプトマイシン生合成のA-ファクターによる制御がよく知られている[79]（Fig. 82）。

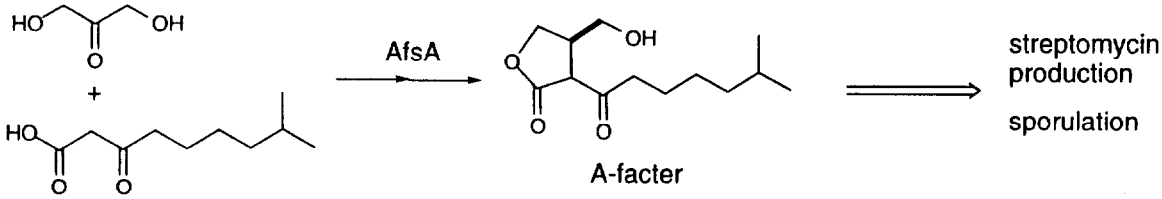


Fig. 82

この一連の研究においては、リプレッサーとして機能しているA-ファクターレセプターの同定から生合成遺伝子全体の転写因子までもが明らかにされている[80]。放線菌ではない*B. circulans*におけるブチロシン生合成系にもこのような生合成制御機構が存在するかしないか興味深い。

DOI合成酵素反応機構研究については、第４章でも述べたとおり脱リン酸化とアルドール反応の立体特異性の解明が重要である。脱リン酸化についてはDHQ合成酵素の研究と同様に、Fig. 83に示したカルバサイクリックアナログ、ホスホン酸やホモホスホン酸アナログ、1-デオキシアナログを用いて酵素反応を検討し、中間体の構造決定をすることにより解明できると考えられる。

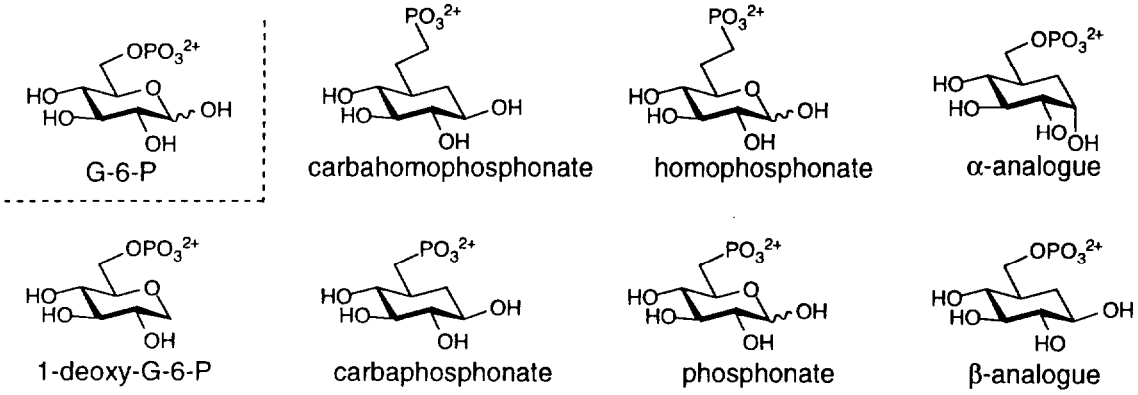


Fig. 83

アルドール反応の立体特異性は、酵素に認識される基質の立体配置に基づくと考えられる。すなわち生成物の立体化学を考えるとG-6-Pのβアノマーが酵素反応の基質になっていると予想される。そこで、α型およびβ型カルバサイクリックアナログの阻害活性を検討することにより、どちらのアノマーが認識され反応が進行するのかを予想することでアルドール反応の立体特異性を理解できると考えられる。

一方、酵素の結晶化を検討し、X線結晶構造解析により酵素構造を解析することは大変重要である。特異的な阻害剤を用いて結晶化を検討すれば、酵素-基質-補酵素複合体の配置が明らかとなり、さらに詳細な反応機構、基質認識様式が解明できると考えられる。

また、DHQ合成酵素のX線結晶構造解析の座標をもとにDOI合成酵素について構造予測を行えば、活性部位の構造を予想出来ると考えられ現在検討中である。その情報から興味が持たれるアミノ酸残基を部位特異的に変異させ、DOI合成酵素の変異体をつくり、酵素活性、基質認識に与える影響を解析することも重要である。さらにいろいろな基質類縁体まで認識できるようになれば、新規抗生物質生産にもつながると考えられる。

ヘキソキナーゼ、DOI合成酵素を用いてワンポットでグルコースからDOIへの変換を示せたが、今後はさらに効率のよい生産系の構築が課題である。また将来の化石資源枯渇を考えた場合、生産されたDOIを化学工業における原料となる芳香族化合物などに変換する検討も重要である。

今後は、ブチロシン生合成を遺伝学的・酵素学的に解明していくと共に、DOI合成酵素反応機構の酵素化学的解明を目指して研究を進行させていく必要がある。あわせて、DOI合成酵素を鍵酵素として用いたグルコースからの有用物質生産系”グリーンルート”の確立も興味深い。

参考文献

[1] 大岳　望　編、大岳、遠藤、柿沼、瀬戸、田中　著　生理活性微生物化学（1985）、共立出版

[2] 大岳　望　著、生合成の化学（1986）、大日本図書

[3] Hori, K., Kurotsu, T., Kanda, M., Miura, S., Nozoe, A. & Saito, Y. Studies on gramicidin S synthetase. Purification of the heavy enzyme obtained from some mutants of *Bacillus brevis*. *J. Biochem.* **84**, 425-434 (1978).

[4] Cortes, J., Haydock, S. F., Roberts, G. A., Bevitt, D. J. & Leadlay, P. F. An unusually large multifunctional polyketide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* **348**,176-187 (1990).
Donadio, S., Staver, M. J., McAlpine, J. B., Swanson, S. J. & Katz, L. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Sience* **252**, 675-679 (1991).

[5] Pieper, R., Luo, G., Cane, D. E. & Khosla, C. Cell-free synthesis of polyketides by recombinant erythromycin polyketide synthases. *Nature* **378**, 263-266 (1995).

[6] Townsend, C. A. Structural studies of natural product biosynthetic proteins. *Chem. Biol.* **4**. 721-730 (1997).

[7] Roach, P. L., Clifton, I. J., Hensgens, C. M. H., Schofield, C. J., Hajdu, J. & Baldwin, J. E. Structure of isopenicillin *N* synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature* **387**, 827-830 (1997).
Roach, P. L., Clifton, I. J., Fülöp, V., Harlos, K., Barton, G. J., Hajdu, J., Andersson, I., Schofield, C. J. & Baldwin, J. E. Crystal structure of isopenicillin *N* synthase is the first from a new structural family of enzyme. *Nature* **375**, 700-704 (1995).

[8] Valegard, K., Terwischa van Scheltinga, A. C., Lioyd, M. D., Hara, T., Ramaswamy, S., Rerrakis, A., Thompson, A., Lee, H-J., Baldwin, J. E., Schofield, C. J., Hajdu, J. & Andersson, I. Structure of a cephalosporin synthase. *Nature* **394**, 805-809 (1998).

[9] Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D. and Sacchettini, J. C. Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Åresolution. *Biochemistry* **33**, 10871-10877 (1994).

[10] Wendt, K. U., Poralla, K. & Schulz, G. E. Structure and function of a squalene cyclase. *Science* **277**, 1811-1815 (1997).
Starks, C. M., Bach, K., Chappell, J. & Noel, J. P. Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tabacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science* **277**, 1815-1820 (1997).
Lesburg, C. A., Zhai, G., Cane, D. E. & Christianson, D. W. Crystal structure of pentalene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* **277**, 1820-1824 (1997).

[11] Rinehart, K. L., Jr. & Stroshane, R. M. Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. *J. Antibiot.* **29**, 319-353 (1976).

Rinehart, K. L., Jr. & Suami, T. (*Ed*). *Aminocyclitol antibiotics*. ACS Symposium Series No. 125. American Chemical Society, Washington D. C. (1980).

[12] Walker, J. B. & M. S. Walker, M. S. Streptomycin biosynthesis. Transamination reaction involving inosamines and inosadiamines. *Biochemistry* **8**, 763-770 (1969).

[13] Itoh, S., Odakura, Y., Kase, H., Satoh, S., Takahashi, K., Iida, T., Shirahata, K. & Nakayama, K. Biosynthesis of astromicin and related antibiotics. I. Biosynthetic studies by bioconversion experiments. *J. Antibiot.* **37**, 1664-1669 (1984).
Odakura, Y., Kase, H., Itoh, S., Satoh, S., Takasawa, S., Takahashi, K., Iida, T., K. Shirahata, K. & Nakayama, K. Biosynthesis of astromicin and related antibiotics. II. Biosynthetic studies with blocked mutants of *Micromonospora olivasterospora*. *J. Antibiot.* **37**, 1670-1680 (1984).

[14] Chen, C. H.-G. & Eisenberg, F., Jr. Myoinosose-2 1-phosphate: An intermediate in the myoinositol 1-phosphate synthase reaction. *J. Biol. Chem.* **250**, 2963-2967 (1975).

[15] Byun, S. M., Jenness, R., Ridley, W. P. & Kirkwood, S. The stereochemistry of D-glucose-6-phosphate: 1L-*myo*-inositol-1-phosphate cycloaldlase on the hydrogen atoms at C-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 961-967 (1973).

[16] Loewus, M. W., Loewus, F. A., Brillinger, G.-U., Otsuka, H & Floss, H. G. Stereochemistry of the *myo*-inositol-1-phosphate synthase reaction. *J. Biol. Chem.* **255**, 11710-11712 (1980).

[17] Majumder, A. L., Johnson, M. D. & Henry, S. A. 1L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1348**, 245-256 (1997).

[18] Distler, J, Mansouri, K., Mayer, G., Stochmann, M. & Piepersberg, W. Streptomycin biosynthesis and its regulation in Streptomycetes. *Gene* **115**, 105-111 (1992).
Ahlert, J., Distler, J., Mansouri, K. & Piepersberg, W. Identification of *stsC*, the gene encoding the L-glutamine:*scyllo*-inosose aminotransferase from streptomycin-producing Streptomycete. *Arch. Microbiol.* **168**, 102-113 (1997).

[19] Dairi, T., Ohta, T., Hashimoto, E. & Hasegawa, M. Self cloning in *Micromonosporea olivasterospora* of *fms* genes for fortimicin A (astromicin) biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **232**, 262-270 (1992).

[20] Rinehart, K. L., Jr., Malic, J. M., Nystrom, R. S., Stroshane, R. M., Truitt, S. T., Taniguchi, M., Rolls, J. P., Haak, W. J. & Ruff, B. A. Biosynthetic incorporation of [1-^{13}C]glucosamine and [6-^{13}C]glucose into neomycin. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 2263-2265 (1974).

[21] Daum, S. J., Rosi, D. & Goss, W. A. Mutational biosynthesis by idiotrophs of *Micromonospora purpurea*. II. Conversion of nonamino-containing cyclitols to aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiot.* **30**, 98-105 (1977).
Daum, S. J., Rosi, D. & Goss, W. A. Production of antibiotics by biotransformation of 2,4,6/3,5-pentahydroxycyclohexanone and 2,4/3,5-tetrahydroxycyclohexanone by a deox-

ystreptamine-negative mutant of Micromonospora purpurea. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 283-284 (1977).

[22] Furumai, T., Takeda, K., Kinumaki, A., Ito, Y. & Okuda, T. Biosynthesis of butirosins. II. Biosynthetic pathway of butirosins elucidated from cosynthesis and feeding experiments. *J. Antibiot.* **32**, 891-899 (1979).

[23] Kase, H., Iida, T., Odakura, Y., Shirahata, K. & Nakayama, K. Accumulation of 2-deoxy-*scyllo*-inosamine by a 2-deoxystreptamine-requiring idiotroph of *Micromonospora sagamiensis*.. *J. Antibiot.* **33**, 1210-1212 (1980).

[24] Fujiwara, T., Takahashi, Y., Matsumoto, K. & Kondo, E. Isolation of an intermediate of 2-deoxystreptamine biosynthesis from a mutant of *Bacillus circulans*. *J. Antibiot.* **33**, 824-829 (1980).

Igarashi, K., Honma, T., Fujiwara, T. & Kondo, E. Structure elucidation of an intermediate of 2-deoxystreptamine biosynthesis. *J. Antibiot.* **33**, 830-835 (1980).

[25] Suzukake, K., Tokunaga, K., Hayashi, H., Hori, M., Uehara, Y., Ikeda, D. & Umezawa, H. Biosynthesis of 2-Deoxystreptamine. *J. Antibiot.* **38**, 1211-1218 (1985).

[26] Lucher, L. A., Chen, Y-M. & Walker, J. B. Reactions catalyzed by purified L-glutamine: keto-*scyllo*-inisitol aminotransferase, an enzyme required for biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 452-459 (1989).

[27] Kakinuma, K., Ogawa, Y., Sasaki, T., Seto, H. & Otake, N. Stereochemistry of ribostamycin biosynthesis. An application of ^{2}H NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5614-5616 (1981).

Kakinuma, K., Ogawa, Y., Sasaki, T., Seto, H. & Otake, N. Mechanism and stereochemistry of the biosynthesis of 2-deoxystreptamine and neosamine C. *J. Antibiot.* **42**, 926-933 (1989).

[28] Goda, S. K. & Akhtar, M. Neomycin biosynthesis: The incorporation of D-6-deoxyglucose derivatives and variously labelled glucose into 2-deoxystreptamine ring. Posturated involvement of 2-deoxyinosose synthase in tne biosynthesis. *J. Antibiot.* **45**, 984-994 (1992).

[29] Rotenberg, S. L. & Sprinson, D. B. Isotope effects in 3-dehydroquinate synthase and dehydratase. *J. Biol. Chem.* **253**, 2210-2215 (1978).

[30] Yamauchi, N.& Kakinuma, K. Confirmation of *in vitro* synthesis of 2-deoxy-*scyllo*-inososc, the earliest intermediate in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine, using cell free preparations of *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* **45**, 774-780 (1992).

[31] Yamauchi, N.& Kakinuma, K. Enzymatic carbocycle formation in microbial secondary metabolism. The mechanism of 2-deoxy-*scyllo*-inosose synthase reaction as a crucial step in the 2-deoxystreptamine biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. Org. Chem.* **60**, 5614-5619 (1995).

Yamauchi, N.& Kakinuma, K. Biochemical studies on 2-deoxy-*scyllo*-inosose, an early intermediate in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine. IV. A clue to the similarity of 2-deoxy-*scyllo*-inosose synthase to dehydroquinate synthase. *J. Antibiot.* **46**, 1916-1918 (1993).

[32] Frost., J. W., Bender, J. L., Kadonaga, J. T.& Knowles, J. R. Dehydroquinate synthase from *Escherichia coli*: Purification, Cloning, and Construction of Overproductions of the enzyme. *Biochemistry* **23**, 4470-4475 (1984).

[33] Rotenberg, S. L. & Sprinson, D. B. Mechanism and stereochemistry of 5-dehydroquinate synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **67**, 1669-1672 (1970).

[34] Turner, M. J., Smith, B. W. & Haslam, E. The shikimate pathway. Part IV. The stereochemistry of the 3-dehydroquinate dehydratase reaction and observation on 3-dehydroquinate synthetase J. *Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 52-55 (1975).

[35] Widlanski, T., Bender, S. L. & Knowles, J. R. Stereochemical course of the cryptic elimination and cyclization steps in the reaction catalyzed by dehydroquinate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1873-1875 (1987).

Widlanski, T., Bender, S. L. & Knowles, J. R. Dehydroquinate synthase: the use of substrate analogues to probe the late steps of the catalyzed reaction. *Biochemistry* **28**, 7572-7582 (1989).

[36] Bender, S. L., Widlanski, T. & Knowles, J. R. (1989) Dehydroquinate synthase: The use of substrate analogues to probe the early steps of the catalyzed reaction. *Biochemistry* **28**, 7560-7572.

[37] Knowles, J. R. Mechanistic ingenuity in enzyme catalysis: Dehydroquinate synthase. *Aldrichimica Acta.* **22**, 59-66 (1989).

[38] Bartlett, P. A., McLaren, K. L. & Marx. Divergence between the enzyme catalyzed and non-catalyzed synthesis of 3-dehydroquinate. *J. Org. Chem.* **59**, 2082-2085 (1994).

[39] Carpenter, E. P., Hawkins, A. R., Frost, J. W. & Brown, K. A. Structure of dehydroquinate synthase reveals an active site capable of multistep catalysis. *Nature* **394**, 299-302 (1998).

[40] Floss, H. G. Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Nat. Prod. Rep.* **394**, 433-452 (1997).

[41] August, P. R., Tang, L., Yoon, Y. J., Ning, S., Muller, R., Yu, T. W., Taylor, M., Hoffmann, D., Kim, C, G,, Zhang, X., Hutchinson, C. R. & Floss, H. G. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of Amycolatopsis mediterranei S699. *Chem Biol.* **5**, 69-79 (1998).

[42] Degwert, U., Hülst, R. V., Pape, H., Herrold, R. E., Beale, J. M., Keller, P. J., Lee, J. P.& Floss, H. G. Studies on the biosynthesis of the α-glucosidase inhibitor acarborse: Vanienamine, a *m*-C_7N unit not derived from the shikimate pathway. *J. Antibiot.* **40**, 855-861 (1987).

[43] Toyokuni, T. Jin, W.-Z. & Rinehart, K. L., Jr. Biosynthetic studies on validamycins: A C_2 + C_2 + C_3 pathway to an aliphatic C_7N unit. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3481-3482 (1987).

[44] Weller, D. D. & Rinehart, K. L., Jr. Biosynthesis of the antitumor antibiotic pactamycin. A methionine-derived ethyl group and C_7N unit. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 6757-6760 (1978).

[45] Parry, R. J., Bornemann, V. & Subramanian, R. Biosynthesis of the nucleotide antibiotic aristeromycin. *J. Am. Chem. Soc.* **1115**, 5819-5824 (1989).

[46] Sakuda, S., Zhou, Z.-Y., Takao, H. & Yamada, Y. Mechanism of the cyclopentane ring formation of allosamizoline, an aminocyclitol derivative of the chitinase inhibitor allosamidin. *Tetrahedron Lett.* **37**, 5711-5714 (1996).

[47] Liu, Y., Thoden, J. B., Kim, J., Berger, E., Gulich, A. M., Ruzicka, F. J., Holden, H. M. & Frey, P. A. Mechanistic roles of tyrosine 149 and serine 124 in UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**, 10675-10684 (1997).

Thoden, J. B., Frey, P. A. & Holden, H. M. Molecular structure of the NADH/UDP-glucose abortive complex of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* **35**, 5137-5144 (1996).

Thoden, J. B., Frey, P. A. & Holden, H. M. Crystal structures of the oxidized and reduced forms of UDP-galactose 4-epimerase isolated from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**, 2557-2566 (1996).

[48] Chang, C.-W. T., Chen, X. H. & Liu, H.-W. CDP-6-deoxy-6,6-difuluoro-D-glucose: A mechanism-based inhibitor for CDP-D-glucose 4,6-dehydratase. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 9698-9699 (1998).

He, X, Thorson, J. S. & Liu, H.-W. Probing the coenzyme and substrate binding events of CDP-D-glucose 4,6-dehydratase: Mechanistic implication. *Biochemistry* **35**, 4721-4731 (1996).

[49] Kudo, F., Yamauchi, N., Suzuki, R. & Kakinuma, K. Kinetic isotope effect and reaction mechanism of 2-deoxy-*scyllo*-inosose synthase derived from butirosin-producing *Bacillus circulans*. *J. Antibiot.* **50**, 424-428 (1997).

[50] Iwase, N., Kudo, F., Yamauchi, N. & Kakinuma, K. Substrate specificity of 2-deoxy-*scyllo*-inosose synthase, the starter Enzyme for 2-deoxystreptamine biosynthesis, toward deoxyglucose-6-phosphates and proposed mechanism. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2396-2407 (1998).

[51] Lardy, H. A. & Fischer, H. O. Phosphoric esters of biological importance I. The synthesis of glucose-6-phosphate. *J. Biol. Chem.* **164**, 513-519 (1946).

[52] Lemieux, R. U. & Jones, J. D. The proton magnetic resonance spectra and tautomeric equilibria of aldoses in deuterium oxide. *Can. J. Chem.* **44**, 249-262 (1966).

[53] Yamauchi, N. & Kakinuma, K. Biochemical studies on 2-deoxy-*scyllo*-inosose, an early intermediate in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine. I. Chemical synthesis of 2-deoxy-*scyllo*-inosose and [2,2-$^2H_2$]-2-deoxy-*scyllo*-inosose. *J. Antibiot.* **45**, 756-766 (1992).

[54] Laemmli, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).

[55] Lowry, O. H., Roseberough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the frolin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).

[56] Loewus, M. W. Hydrogen isotope effects in the cyclization of D-glucose 6-phosphate by *myo*-inositol-1-phosphate pathway. *J. Biol. Chem.* **252**, 7221-7223 (1977).
Sherman, W. R., Stewart, M. A. & Zinbo, M. Mass spectrometric study on the mechanism of D-glucose 6-phosphate-L-*myo*-inositol 1-phosphate cyclase. *J. Biol. Chem.* **244**, 5703-5708 (1969).

[57] Kumagai, A. H. & Akamatsu, N. Biosynthesis of N-acetyl-l-glucosamine from D-glucose by *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **499**, 447-449 (1977).

[58] Kudo, F., Hosomi, Y., Tamegai, H. & Kakinuma, K. Purification and characterization of 2-deoxy-*scyllo*-inosose synthase derived from *Bacillus circulans*. A crucial carbocyclization enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiot.* **52**, 755-762 (1999).

[59] Davis, B. J. Disk electrophoresis-II method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427 (1964).

[60] Bender, S. L., Mehdi, S. & Knowles, J. R. Dehydroquinate Synthase: The Role of Divalent Metal Cations and of Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Catalysis. *Biochemistry* **28**, 7555-7560 (1989).

[61] Millar, G. & Coggins, J. R. The complete amino acid sequence of 3-dehydroquinate synthase of *Escherichia coli* K12. *FEBS Lett.* **200**, 11-17 (1986).

[62] Hombergh, J. P. T. W. V. D., Moore, Charles, I. G. & Hawkins, A. R. Overproduction in *Escherichia coli* of the dehydroquinatr synthase domain of the *Aspergillus nidulans* pentafunctional AROM protein. *Biochem. J.* **284**, 861-867 (1992).
Moore, J. D., Coggins, J. R, Virden, R. & Hawkins, A. R. Efficient independent activity of a monomeric, monofunctional dehydroquinate synthase derived from the N-terminus of the pentafunctional AROM protein of *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* **301**, 297-304 (1994).

[63] Hasan, N. & Nester, E. W. Dehydroquinate synthase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **253**, 4999-5004 (1978).

[64] Moore, J. D., Skinner, M. A., Swatman, D. R., Hawkins, A. R. & Brown, K. A. Reactivation of 3-dehydroquinate synthase by lanthanoide cations. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7105-7106 (1998).

[65] Kudo, F., Tamegai, H., Fujiwara, T., Tagami, U., Hirayama, K. & Kakinuma K. Molecular cloning of the gene for the key carbocycle-forming enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptanine-containing aminocyclitol antibiotics and its comparison with dehydroquinate synthase. *J. Biol. Chem.* (submitted)

[66] Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S & Miller, G. H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**, 138-163 (1993).

[67] Aubert-Pivert, E. & Davies, J. Biosynthesis of butirosin in *Bacillus circulans* NRRL B3312: identification by sequence analysis and insertional mutagenesis of the *butB* gene involved in antibiotic production. *Gene* **147**, 1-11 (1994).

[68] Sarwar, M. & Akhtar, M. Cloning of aminoglycoside phosphotransferase (*APH*) gene from antibiotic-producing strain of *Bacillus circulans* into a high-expression vector, pKK223-3. *Biochem. J.* **268**, 671-677 (1990).

[69] Schägger, H. & Jacow, G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379 (1987).

[70] Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular Cloning: *A Laboratory Mannual.*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY (1989).

[71] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**,403-10 (1990).

[72] Pearson, W. R. & Lipman, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 2444-2448 (1988).

[73] Li, K, & Frost, J. W. Synthesis of Vanillin from D-glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10545-10546 (1998).

Frost, J. W., & Draths, K. M. Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 557-579 (1995).

[74] Sols, A., Fuente, G. D. L, Villar-Palasi, C. & Asensis, C. Substrate specificity and some other properties of baker's yeast hexokinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **30**, 92-101 (1958).

[75] Wong, C.-H. & Whitesides, G. M. *Enzymes in synthetic organic chemistry*, Tetrahedron organic chemistry series Volume 12, (1994), Pergamon.

[76] Pitard, B., Richard, P. Dunach, M., Girault, G. & Rigaud, J.-L. ATP synthesis by the F_0F_1 ATP synthase from thermophilic *Bacillus* PS3 reconstituted into liposomes with bacteriorhodopsin. 1. Factor defining the optical reconstitution of ATP synthases with bacteriorhodopsin. *Eur. J. Biochem.* **235**, 769-778 (1996).

Pitard, B., Richard, P. Dunach, M., Girault, G. & Rigaud, J.-L. ATP synthesis by the F_0F_1 ATP synthase from thermophilic *Bacillus* PS3 reconstituted into liposomes with bacteriorhodopsin. 2. Relationships between proton motive force and ATP synthesis. *Eur. J. Biochem.* **235**, 779-788 (1996).

[77] Fang, J.-R., Pearce, C. J. & Rinehart, K. L., Jr. Neomycin biosynthesis: the involvement of neamine and paromamine as intermediates. *J. Antibiot.* **37**, 77-79 (1984).

[78] Cane, D. E., Walsh, C. T. & Khosla, C. Harnessing the biosynthetic code: Combinations, permutations, and mutations. *Science.* **282**, 63-68 (1998).

[79] Hara, O. & Beppu, T. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus* - the role of A-factor. *J. Antibiot.* **35**, 1208-1215 (1982).
Hara, O. & Beppu, T. Induction of streptomycin-inactivating enzyme by A-factor in *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.* **35**, 349-358 (1982).

[80] Ando, N., Matsumori, N., Sakuda, S., Beppu, T. & Horinouchi S. Involvement of *afsA* in A-factor biosynthesis as a key enzyme. *J Antibiot.* **50**, 847-852 (1997).
Onaka, H. & Horinouchi, S. DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequence. *Mol. Microbiol.* **24**, 991-1000 (1997).
Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T. & Horinouchi, S. Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* **177**, 6083-6092 (1995).

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました本学教授 柿沼 勝己先生に深く感謝いたします。

また、終始有益なご助言とご指導を賜りました本学助教授 江口 正先生に深謝いたします。

また、初期の研究を行うにあたりご指導頂きました山内 敬明博士（現九州大学 助教授）に深謝します。

また、常なるご指導激励頂きました本学助手 為我井 秀行博士、松島 芳隆博士に感謝します。

この課題に関連して共同研究を行った鈴木 理恵子氏、岩瀬 徳明氏、細見 佳宏氏、佐々木 聡子氏、太田 康勝氏、久力 久子氏、南後 恵理子氏に感謝いたします。

Bacillus circulans SANK72073をご恵与下さいました三共株式会社に感謝いたします。

*Bacillus circulans*の培養を行うにあたり、その培地の主成分となる脱脂大豆粉をご提供して下さいました不二製油株式会社に感謝いたします。

N末端アミノ酸配列分析で大変お世話になりました藤原 健智博士に感謝いたします。

LC-ESI-MSを行っていただいた味の素株式会社、平山 和雄博士、田上 宇乃氏に感謝いたします。

内部配列分析を行っていただいた山本 一夫博士（東京大学 助手）に感謝いたします。

遺伝子操作をご指導下さいました大西 康夫博士（東京大学 助手）、岡本 悦哉博士に感謝いたします。

また、有益な討論をしていただきました柿沼・江口研の皆様に感謝します。

平成十一年　二月

工藤　史貴

付録：推定アミノ酸配列およびDNA塩基配列

pDS1-pDS1-pDS-5 (see Fig.57)

btrA: (1)-3512; >3512. BtrA: >1329 AA; >153168 MW;
unknown function

……YLEQRRPSRFDQIKKVCGDLPWIIRSSGEEDLNETTNAGAYLSLVCEHRDNFYEVLAQVMLSGS
TEHARNQNRRFVSRDLHDHEPIPVFVQPLVQSEHPGHPVPYDATPYVRKEDLQTIIGLLKNLHSTM
PDYALDCEWVGDSDFGTISMTSLTELADGKLTGQIAFGFDLFSTQHVKANNSVRYLLPGDELNLWQ
GHIFQEVNMQSLFLVQTRPAKNYRLFQHVYELSASSKKELEKDAALCLDAKEFISQGGKPFFGKFI
KAVTLNEAWNAYLQYTGKDVKEDIAAILVEFGTRTEHAGIMFNQVGIPVIRIEIALIPESMTYIVL
DPFSLQCRLYSHNKEVKALEYETREIIPLPDNCILVQDREGKHQQREAMAVSADEYFNEVLNKPFF
SEKTKEHLTANSAYPAYSFIFHGKDDARSPSYYANDAERLTAETVDDFLKSREWPEASANYFLALF
HAKNLLKDGNIAAYVGRQPDDRGRSNETLVYWKVLRIHHLLAKCSSRDRDTLLERVRAEMSVNSAV
IELRLDVLFLFEQYLDALCIYSKREEEALIQSFIGILSSVKDEDLPVVLDLARNGIFNAGHLCQFL
KHAIENRHLFDLYRNYSLVGKEFAIIPYDLSVVSRFPYFNEVFVDLNNEMNKYESLGELSSSIFHT
VVETYDKSAKEILLSVIDDGSPSYYQAYLRLLTEWLGLIRQFDKNEKVIQTFLDWIGVQEDRQAEI
EDYFLEEIHWKTRIEEAEAGTAEDLSLTNLHQLHNVLHQWSLHLVPASNGAHMPLFVKEMVAFAQS
FSEQENRLLRMQKDFFEIELAMCTHKAGFMFYKHSVTVEFSEPPSVHDDEIARLSAFASFMNKCND
WFEAYRFRTHYEKVAGTWTCYMTVKSVEDGALQQSDYKTIFHIIRFVLDSSYDFSHNPLSAVEDLS
AQLNEPEWKDIFRKLVNYRVHFDDEGQFINLKLFAMSTFFTYLCLSPSLRSRLLSLYRDGFDRMVG
ELAVLEDGMARAGHYSEWLEHYESATYTALFLAAIYPLETVGKLESLRDRRLTYDIVARNLLKHKD
AANKVIETLPTWDKALQSSMTDKLLHYCPAKFFKTVSSVNEVAKELSKRSKSFKRAKQVLLNAYAD
SLEPDLLRQFIDDLQYVPYAGTEAQNQQLDKYLTDSGKKRYDIQKEILYI

btrB: 3556-4851;1295 bp. BtrB: 432 AA; 48379 MW;
homology to GLUTAMATE-1-SEMIALDEHYDE 2,1-AMINOMUTASE

MKQETVKSSEQLLSVLGTYIDSPVDPFRKERVMFSRGSGAYLFDYDGGNYIDLMNGKGSIILGHND
PSVNAALRNFLEQDREVVTGPSKPIIDLAERIKKDSALPDAKVSFYTTGTAACRAAVYAARDYSGK
KIVLSSGYHGWDPMWRQQGPLLEPNEDGVIEFYFIPELLERALTAHKDQVALVIFSPDYTYLSAST
MERILGICRAHGVLVCCDDVKQGYRHRQGSSLELVTTEKADMYVFSKGLSNGHRISCVVSSDEIMA
ETKEHTYTAYYQMLPILSSLETLKKMESGKGYDLIRSYGQTLTGNLKELFVQSSLPIEVNGSSIFQ
LVFGDEELEEAFYREAFIQGLILFEGDNQSLSLCMDKDVQVDLIRRFANVTDVLSEQFKHLRGKEV
TTEQTFRTAWNMIDGASDLLPYEKQLKLLDNLIGGG

btrC: 4857-5960;1104 bp. BtrC: 368 AA; 40746 MW;
homology to AroB (dehydroquinate synthase)

MTTKQICFADRCFNFAFGEHVLESVESYIPRDEFDQYIMISDSGVPDSIVHYAAEYFGKLAPVHIL
RFQGGEEYKTLSTVTNLQERAIALGANRRTAIVAVGGGLTGNVAGVAAGMMFRGIALIHVPTTFLA
ASDSVLSIKQAVNLTSGKNLVGFYYPPRFVFADTRILSESPPRQVKAGMCELVKNMLILENDNKEF
TEDDLNSANVYSPKQLETFINFCISAKMSVLSEDIYEKKKGLIFEYGHTIGHAIELAEQGGITHGE
AIAVGMIYAAKIANRMNLMPEHDVSAHYWLLNKIGALQDIPLKSDPDSIFHYLIHDNKRGYIKLDE
DNLGMILLSGVGKPAMYNQTLLTPVRKTLIKEVIREGL

btrD: 5966-6790;825 bp. BtrD: 275 AA; 31753 MW;
unknown function
MNQDKRAFMFISPHFDDVILSCASTLMELMNQGHTCKVLTVFGGCPSVRFQPGEIARQYAAEDLGL
FEDEIEGDHLSILVARRLQEDQQAFRHLPGVQVEVLSFPDAIYRENKGQPYYRTEADLFGIPDKQD
EDIFLPKIETYLQSCDLARKYTWVFPAISKHVDHRLLTKAGLRLMSQGYPVLFYSEFPYWQQHNEF
LQDGWRQLELRNSVYTPVKRAAVLEYKTQLLGLFGEEAETKINNGGVLSEAELFWIQETDTQACRY
SRPLSPEPLQT

btrE: 6817-(7845); >1029 bp. BtrE: >343 AA; >38269 MW;
homology to ALCOHOL DEHYDROGENASE
MEILTYTGPSRLIVETAEELPLKSGECRIQSLYSGISHGTEMGAYRGIAPYFTRDMDSETRLFEDL
AEEHKVKYPIRSCEDDAWFIGYSNVGKIIEVGAEVEGFTVGDIVFSHGRHQTIVCKHHKKIFKLPQ
KLEPELGIFYTNLMTAYNAVLDTRIKIGDVVVVSGLGVVGQLIAQLAKLSGATVVGVDPLENRLNI
AREVEIDYVFNPNRTDVAKEIREITNNRGADAVFEVSGHSTALNQAIRIAAPDTVITAVGWYQGGQ
SVLNLSEEFHQNRITIRASQTLGIDPSISHMYDDARRRNIGKDLLLKLKLRNLISHRIPFGDAPKA
YEMIDKHPHEVLQ……

Sequence (pDS5-pDS1-pDS2) 7845 BP; 2034 A; 1825 C; 1907 T; 2079 G
GGTACCTAGAGCAGCGCGAACCATCCCGATTCGATCAAATTAAAAAAGTTTGCGGGGACCTTCCAT
GGATTATCAGAAGCTCCGGGGAAGAAGACTTAAACGAAACGACGAATGCCGGCGCTTATCTCAGTT
TAGTTTGTGAGCACAGGGATAACTTTTACGAGGTGCTTGCGCAGGTCATGCTCAGCGGAAGCACGG
AGCACGCCAGGAACCAGAATAGACGTTTCGTGAGCCGGGATTTGCACGATCATGAGCCTATTCCCG
TGTTTGTCCAGCCGCTGGTCCAATCGGAGCATCCGGGTCATCCCGTTCCTTATGACGCAACCCCTT
ATGTCAGGAAAGAGGATTTACAAACGATCATCGGTCTGCTTAAAAACCTCCACAGCACCATGCCGG
ACTATGCGCTTGATTGCGAATGGGTAGGGGACTCGGACTTCGGAACGATTTCCATGACAAGCTTAA
CGGAACTTGCCGACGGAAAACTCACGGGGCAGATTGCTTTCGGATTCGATCTTTTCTCTACGCAGC
ATGTGAAAGCGAACAATAGTGTCCGGTATCTGCTGCCGGGCGACGAGTTGAACTTGTGGCAGGGGC
ATATTTTTCAGGAAGTGAACATGCAAAGTTTGTTTCTCGTGCAAACAAGACCGGCTAAGAACTACC
GCTTGTTCCAGCACGTCTACGAGCTGTCGGCATCTTCCAAAAAAGAATTGGAAAAGGATGCCGCTC
TTTGTCTGGATGCAAAGGAGTTCATCTCGCAGGGCGGCAAGCCGTTCTTCGGCAAGTTTATTAAGG
CGGTGACCTTGAACGAAGCCTGGAACGCCTATCTTCAGTACACCGGCAAAGACGTTAAGGAGGATA
TCGCCGCTATCCTGGTGGAATTCGGTACGAGAACGGAACATGCCGGAATTATGTTTAATCAGGTCG
GAATTCCGGTCATTCGTATCGAGATTGCGCTTATACCGGAAAGTATGACTTATATCGTACTTGATC
CGTTTTCCCTGCAGTGCCGTTTGTACAGCCACAACAAAGAAGTCAAGGCATTGGAATACGAGACCA
GGGAAATTATTCCCCTTCCGGACAACTGCATTCTTGTTCAGGATCGTGAGGGGAAGCACCAGCAGC
GGGAGGCCATGGCGGTATCGGCGGACGAGTACTTTAACGAGGTGTTAAACAAGCCCTTCTTCTCGG
AAAAGACTAAAGAGCATTTGACAGCAAATAGCGCCTATCCGGCTTACAGCTTCATTTTTCATGGAA
AAGATGATGCCCGCTCACCGAGTTACTACGCAAATGACGCCGAACGGTTGACGGCTGAAACGGTTG
ACGATTTTTTAAAAAGCCGTGAGTGGCCGGAAGCATCGGCGAATTATTTCCTGGCCTTATTTCATG
CGAAAAACTTGCTCAAAGACGGGAACATCGCCGCTTATGTCGGACGGCAGCCGGATGACCGGGGCC
GGTCTAATGAAACGCTCGTGTACTGGAAGGTGCTGCGCATCCATCATCTGCTGGCCAAATGCAGCA
GCCGGGACCGGGATACGCTGTTGGAGCGGGTCCGTGCGGAAATGAGCGTTAATTCGGCCGTCATCG
AGCTGCGGCTGGACGTGCTGTTTTTATTCGAGCAATATCTGGACGCCTTGTGCATTTATTCGAAGC
GGGAGGAAGAGGCGCTGATCCAAAGCTTTATCGGCATACTTTCTTCCGTTAAGGATGAAGACCTGC
CGGTCGTTCTGGATCTAGCCCGCAACGGGATTTTTAACGCGGGTCACCTGTGCCAATTTTTAAAGC
ATGCCATAGAGAACCGGCACTTGTTCGATCTTTACCGGAACTATTCTCTAGTCGGCAAAGAGTTTG
CCATCATTCCGTACGATTTGAGCGTCGTCAGCAGATTCCCGTATTTTAACGAGGTTTTCGTTGATT
TGAACAACGAGATGAATAAATACGAGTCGCTCGGCGAGTTAAGCAGCTCTATTTTTCATACCGTAG
TCGAAACCTACGATAAATCGGCCAAAGAAATTCTTTTGAGCGTGATAGATGACGGCAGTCCGTCTT
ATTATCAAGCGTATCTCAGACTGTTAACCGAATGGCTCGGTTTAATCCGGCAGTTCGATAAGAACG
AGAAAGTCATTCAAACTTTCCTTGACTGGATCGGGGTCCAAGAAGATCGGCAAGCGGAAATCGAAG

ATTACTTCCTGGAAGAAATTCATTGGAAAACAAGAATAGAAGAAGCCGAGGCGGGTACTGCCGAAG
ACTTGTCGTTAACTAATTTGCATCAGCTGCACAACGTGCTGCACCAGTGGTCGTTGCACTTGGTTC
CCGCGTCCAATGGCGCTCATATGCCTCTTTTCGTCAAAGAGATGGTGGCGTTCGCCCAATCTTTTT
CCGAACAGGAAAACCGATTGCTGCGGATGCAAAAAGACTTTTTTGAAATCGAGCTGGCGATGTGTA
CGCACAAGGCAGGGTTTATGTTCTACAAGCATTCCGTAACTGTCGAATTTAGCGAGCCTCCTTCCG
TACATGACGACGAAATCGCGAGACTATCGGCTTTTGCCTCTTTTATGAACAAGTGCAACGATTGGT
TCGAGGCTTATCGTTTCCGCACTCATTACGAGAAGGTAGCCGGAACCTGGACCTGTTATATGACCG
TAAAATCCGTCGAAGACGGCGCACTTCAGCAAAGCGATTACAAAACGATTTTTCATATCATAAGGT
TTGTTTTAGACAGCTCGTACGATTTTTCGCATAATCCGCTTTCTGCGGTTGAGGATTTGTCCGCTC
AATTGAATGAACCGGAATGGAAAGATATTTTCCGGAAGCTGGTAAACTATCGTGTCCATTTTGACG
ATGAAGGGCAGTTTATTAACTTGAAATTGTTCGCCATGTCCACTTTCTTTACGTACCTGTGTCTTT
CGCCGTCCCTGCGAAGCCGCCTGCTCTCCTTGTACCGGGATGGATTCGATCGTATGGTCGGTGAGC
TCGCCGTACTGGAAGACGGGATGGCGCGCGCCGGTCATTACTCGGAATGGCTCGAGCATTATGAAT
CGGCAACCTATACCGCCTTATTCCTTGCGGCTATTTATCCTTTGGAGACAGTGGGCAAGCTGGAGT
CGCTGCGTGACCGGCGGTTGACCTACGATATCGTGGCCAGAAACTTGCTCAAGCACAAAGATGCCG
CCAATAAAGTTATCGAGACGCTGCCAACCTGGGATAAAGCGCTGCAATCCAGTATGACGGACAAGC
TGCTGCACTATTGTCCGGCTAAATTTTTCAAAACCGTTTCTTCTGTTAACGAAGTGGCCAAGGAGC
TCTCCAAACGAAGCAAATCGTTTAAACGTGCCAAGCAGGTTTTACTCAACGCGTATGCGGATTCCT
TGGAGCCAGACCTTTTGCGACAATTCATCGACGACTTGCAGTATGTCCCTTATGCCGGGACCGAGG
CGCAAAATCAACAACTGGATAAATACCTGACGGATTCCGGGAAAAAGAGATATGACATTCAAAAAG
AAATTTTGTATATCTGATCGCCGTATCGCACGTTACGACTAAGGAGTGAACGATGAAATGAAACAG
GAAACGGTTAAAAGTTCGGAACAGCTGCTATCCGTACTCGGTACTTATATCGATTCGCCGGTCGAT
CCCTTCCGCAAGGAAAGAGTGATGTTTTCAAGGGGAAGCGGGGCTTATTTGTTCGATTACGACGGC
GGCAATTATATCGACCTGATGAACGGGAAAGGGTCTATTATACTGGGGCACAACGATCCGAGCGTC
AATGCCGCCTTGCGGAATTTTCTGGAGCAGGACCGAGAGGTTGTAACGGGTCCTTCCAAACCGATC
ATTGATCTGGCCGAACGGATCAAGAAAGACAGCGCTTTGCCGGATGCGAAGGTTTCGTTCTATACG
ACCGGAACCGCCGCCTGCAGAGCGGCCGTGTATGCCGCACGCGATTACAGCGGCAAGAAAATCGTC
CTCAGCTCGGGATACCACGGCTGGGATCCCATGTGGAGGCAGCAGGGGCCACTGCTGGAACCGAAT
GAGGATGGGGTGATCGAGTTTTATTTCATCCCCGAGCTGCTGGAACGCGCCTTAACGGCGCATAAG
GATCAAGTCGCCTTGGTCATATTTTCGCCGGACTATACGTATTTATCGGCTTCGACGATGGAGAGA
ATCCTTGGCATATGCCGGGCGCACGGAGTCCTGGTTTGCTGCGACGATGTGAAGCAGGGCTACCGG
CACCGTCAAGGGTCTTCCCTTGAGCTTGTGACGACTGAGAAGGCCGACATGTACGTCTTCTCCAAA
GGGTTGTCGAACGGGCACCGGATTTCATGCGTGGTGAGTTCGGACGAGATCATGGCGGAGACCAAG
GAGCACACGTACACGGCCTACTACCAGATGCTGCCGATTCTGTCGTCCCTGGAAACGCTGAAAAAA
ATGGAATCCGGTAAAGGCTACGATTTGATACGTTCTTACGGTCAAACCTTGACGGGGAATTTGAAA
GAGCTGTTCGTTCAATCCTCTCTGCCCATCGAAGTGAACGGCAGCTCCATTTTTCAGCTGGTATTC
GGAGACGAAGAGCTGGAGGAGGCGTTTTACCGGGAAGCCTTTATTCAGGGACTCATTCTATTCGAG
GGGGATAATCAGTCGCTTTCCCTGTGCATGGACAAAGACGTTCAAGTGGACCTGATTCGCAGGTTT
GCGAACGTAACCGATGTCTTATCGGAGCAATTTAAACACCTGAGAGGAAAAGAGGTTACGACCGAG
CAAACGTTCAGAACCGCTTGGAACATGATTGACGGGGCATCGGATTTGCTTCCCTATGAGAAACAG
CTCAAACTTCTCGATAATTTGATCGGTGGAGGTTAAACATGACGACTAAACAAATTTGTTTTGCGG
ACCGGTGTTTTAACTTTGCATTCGGCGAACATGTTTTGGAATCGGTTGAATCCTATATTCCCCGGG
ATGAATTCGATCAATATATCATGATTTCGGACTCGGGGGTACCGGACTCGATTGTTCATTATGCGG
CCGAATACTTCGGCAAACTCGCCCCTGTACATATTCTTCGCTTTCAGGGCGGAGAAGAATACAAAA
CACTTTCAACCGTGACAAATTTGCaAGAGCGGGCAATTGCTCTGGGAGCCAACCGAAGAaCCGCTA
TCGTAGCGGTTGGCGGAGGGTTAACCGGAAACGTTGCCGGAGTGGCGGCCGGCATGATGTTTCGCG
GGATTGCGCTTATTCACGTTCCGACCACGTTTTTGGCGGCCTCCGATTCGGTTCTTTCGATTAAGC
AGGCTGTTAATTTAACGAGCGGAAAGAACCTGGTCGGCTTTTATTATCCGCCACGCTTCGTGTTCG
CCGATACCCGAATCTTGTCGGAGTCGCCGCCCCGTCAGGTGAAAGCGGGAATGTGCGAGCTGGTAA
AAAATATGCTGATTCTGGAAAACGACAACAAGGAATTTACAGAGGATGATTTAAATTCAGCCAATG
TGTATTCTCCGAAGCAGCTGGAGACGTTTATCAACTTCTGCATATCGGCCAAAATGTCGGTATTAA
GCGAAGATATTTACGAGAAAAAGAAGGGCCTGATCTTTGAGTACGGCCATACGATCGGTCATGCGA
TCGAGCTTGCCGAGCAGGGAGGGATCACGCACGGAGAAGCCATTGCAGTGGGCATGATTTACGCCG
CTAAAATAGCGAACCGGATGAACCTGATGCCCGAACATGACGTGTCCGCCCATTACTGGCTTTTAA
ATAAAATCGGGGCCTTGCAGGATATTCCGCTCAAATCGGACCCGGATTCGATCTTCCATTATTTAA
TCCACGATAACAAGAGGGGCTACATTAAGCTGGATGAGGATAATTTGGGTATGATTTTACTTAGCG
GAGTCGGTAAACCGGCGATGTATAACCAAACGCTGCTTACACCGGTCAGAAAAACGCTCATAAAAG
AAGTGATCCGGGAAGGGCTGTAAGGATGAACCAGGATAAGCGTGCTTTTATGTTCATCTCGCCTCA

CTTCGATGATGTCATTTTGTCGTGCGCCTCGACTTTAATGGAACTGATGAATCAGGGGCACACCTG
CAAGGTGCTGACCGTATTCGGGGGCTGCCCGTCGGTTCGCTTTCAGCCCGGCGAGATTGCCAGACA
GTACGCAGCCGAGGATTTGGGATTGTTCGAGGATGAAATAGAGGGCGATCACTTGTCCATACTCGT
GGCGCGCCGACTCCAGGAGGATCAGCAGGCATTCCGGCATCTTCCCGGTGTACAGGTCGAAGTACT
TTCCTTTCCGGATGCCATCTACAGGGAAAATAAGGGGCAGCCTTATTACCGGACGGAGGCAGACTT
ATTCGGCATTCCGGACAAACAGGACGAAGATATTTTCCTGCCTAAAATCGAAACCTATTTGCAGTC
CTGCGATCTTGCCCGGAAATACACCTGGGTATTTCCCGCCATCTCCAAACATGTCGATCACCGGCT
GCTGACCAAAGCCGGTTTGAGGCTGATGTCGCAAGGGTATCCAGTGCTTTTCTATTCCGAATTTCC
GTACTGGCAGCAGCACAATGAGTTTTTACAGGACGGATGGCGTCAGTTGGAATTGAGAAACAGCGT
CTACACACCGGTAAAAAGAGCCGCTGTATTGGAATACAAAACGCAGCTGCTCGGATTGTTCGGCGA
GGAGGCGGAAACGAAAATCAATAACGGCGGAGTCCTTAGCGAAGCCGAGCTATTTTGGATACAAGA
AACGGATACTCAAGCTTGGCGGGTATTCCGGTCTTTAAGTCCCGAACCGCTTCAAACCTGACACAA
AGAAAAGGAGTGCTTTCCATGGAAATTTTAACGTACACGGGTCCAAGCCGATTAATCGTGGAAACG
GCGGAAGAATTGCCGTTAAAGAGCGGCGAATGCCGGATACAGTCCCTCTATTCCGGGATCAGTCAC
GGAACGGAAATGGGGGCTTACAGAGGTATCGCTCCCTATTTCACAAGAGATATGGATTCCGAAACC
CGGTTGTTCGAGGATCTGGCCGAAGAACATAAAGTTAAATATCCGATCCGGAGCTGCGAGGACGAT
GCCTGGTTTATCGGGTATTCGAACGTAGGGAAAATTATTGAAGTTGGAGCGGAGGTCGAAGGATTT
ACGGTCGGAGATATCGTGTTTTCCCACGGCAGGCATCAAACGATCGTGTGCAAGCATCACAAAAAG
ATCTTTAAACTTCCCCAAAAGCTGGAGCCTGAGCTCGGCATTTTCTACACAAACCTGATGACGGCT
TATAACGCTGTATTGGACACGAGAATTAAAATCGGGGACGTTGTCGTCGTGTCGGGACTCGGCGTA
GTCGGGCAGTTAATCGCTCAATTAGCCAAACTGTCCGGCGCCACAGTCGTCGGAGTCGACCCGCTT
GAGAACAGACTGAACATCGCCAGGGAAGTTGAAATCGACTATGTGTTTAATCCGAATCGGACGGAT
GTCGCCAAGGAAATCAGAGAGATTACGAATAACCGGGGTGCCGATGCCGTCTTCGAAGTATCCGGT
CATTCAACGGCTTTGAATCAAGCGATTCGCATAGCGGCGCCGGACACGGTAATTACAGCCGTAGGC
TGGTATCAGGGCGGGCAATCGGTGCTGAATCTTTCCGAAGAATTTCACCAGAACCGGATTACGATC
CGCGCTTCGCAAACTCTCGGGATCGATCCTTCCATCAGCCATATGTATGACGATGCGAGAAGAAGG
AATATCGGGAAAGATCTGCTGCTTAAGCTTAAACTCCGCAACCTGATCAGCCACCGGATTCCGTTC
GGCGATGCGCCGAAAGCCTACGAAATGATCGATAAACACCCGCATGAAGTTCTGCAG

pDS23? (partial sequence, see Fig.54)

acsA: (1)-1646; >1646 bp. AcsA: >548 AA; >61607 MW;
hology to ACETYL-COENZYME A SYNTHETASE (*B.subtilis*)
AGRPSGFHKEMAQASEELDIEWVDREDGLILHYTSGSTGKPKGVFHVHNAMVQHYYTGNIVLDLKE
DDVYWCTADPGWVTGTSYGIFAPWLNGATNVIRGGRFSPQDWYNTIQKYGVTVWYSAPTAFRMLMG
AGDDVVKQFDLSSLRHVLSVGEPLNPEVVRWGLKVYGQRIHDTWWMTETGGQLICNYPSMPIKPGS
MGRPIPGVEAAIIDDSGNVLPPNRMGNLAVKTPWPSMMRKIWNNPAKYEEYFRISGWYISGDSAYM
DEDGYFWFQGRIDDVINTAGERVGPFEVESKLVEHPAVAEAGVIGKPDPMRGEIIKAFIALREGFE
PSDELKADIAKFVKEGLSAHASPREIEFKDKLPKTRSKIMRRVLKAWELNLPTATCRRLKIKRGKI
GRHFFALQLLFFRGSDSVLMQVVRFRLIEKPKDKPGAAKQSSLAASRAFLKIYPVRSADLTCRIFY
RGRQPGLSGIIHGRHFVIPVVFDGRDCVFGRESGIDLLYFVASQHSRHVAFNLSLEEFSFHCSFKP
LPFPFAVSPVGEDGVCLSDS

???: 2472-1996 complementary ; 477 bp. ???: 159 AA; 18020 MW;
unkown function
MNMWSLIMNAAVEKKPELFPDTSFKRPSTVVQATVSDVSGKLPSDLNRQSGHVVTDWFNRKYIPTT
VDNSMKSMSTIEYNGINYIAQDQTPGDMVKSKFVIVREKSVNSLLKELSAVLNKLPAKNRRPLSFY
KPKDYDEDAPSEIDPRKEEAIRAPLPE

pPbpF or *pbp*A: 3582-(2792) complementary; >791 bp. PbpF or PbpA:
>263 AA; >29368 MW;
hology to PENICILLIN-BINDING PROTEIN (*B. subtilis*)
MAKKLSFLQNPGVRKTLKVTFHTVKWLFVAFLVVGIMGGAAAFGYVSALVKNEPVRNKEEMRKKIE
ENAITGFVYFNDDAVIGQLRTEEDRRLAELKEIPQVVLDAVLAIEDNDFYKHNGVDLKGLSRAVTQ
KLLNEDVQTGGSTITQQLTRRVFLTLDRDAGRKAKEILLSLRMERLLSKDEILLAYLNKIPYGNGS
AGYNLFGIKAAAKGIFNIDDLNRLNVAQAAYLAGIPQQPSNYSAYTSSARPIRRDSKTRLPARSF

leuA: 134 AA; (4763)-4359 complementary; >405 bp. LeuA: >135 AA;
>15209 MW;
hology to 2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE
LQGAPHKQIEFLVRASKLHVAFQRNGIVALHKRVEKFVHVDRLTGGVAFGEIVALQHAGNRQFGGQ
LHHIGKSQGAEPFRVVTNGSLLRIENLEDLLFVRLRIALHVFFRQQLARPGFPRRSPIRPVKSPIR
SCT

Sequence (partial pDS6) 4763 BP in 6600 BP; 1085 A; 1199 C; 1180
T; 1289 G; 10 other (1-2795, 2806-4763).
AGAGCTTGCATGCCTGCAGGAAGGCCAAGTGGATTTCACAAGGAAATGGCGCAGGCGTCCGAAGAA
CTCGACATCGAATGGGTAGACCGTGAAGACGGATTGATTCTGCATTACACATCCGGTTCGACAGGC
AAGCCCAAAGGCGTTTTCCATGTGCATAACGCCATGGTTCAGCATTACTATACGGGCAATATTGTC
CTTGATCTTAAAGAAGACGACGTGTACTGGTGTACGGCCGATCCAGGCTGGGTTACCGGCACATCT
TACGGTATTTTCGCCCCTTGGCTTAACGGAGCTACGAACGTAATCCGCGGCGGACGTTTCAGTCCG
CAGGATTGGTATAATACGATTCAGAAATACGGCGTGACCGTCTGGTACAGCGCTCCGACCGCTTTC
CGTATGCTCATGGGTGCCGGAGACGATGTGGTCAAACAGTTTGATCTTTCATCGCTCCGTCATGTA
CTGAGCGTAGGGGAGCCTCTTAACCCGGAAGTTGTCCGCTGGGGGCTGAAAGTATACGGCCAGCGT
ATTCATGACACCTGGTGGATGACCGAAACAGGCGGCCAGCTCATCTGTAATTACCCGAGCATGCCG
ATCAAGCCGGGCTCCATGGGACGTCCGATTCCCGGCGTGGAAGCCGCCATTATCGATGACAGCGGC
AATGTTCTTCCGCCTAACCGGATGGGCAACCTCGCGGTCAAAACGCCTTGGCCGTCCATGATGCGC
AAAATTTGGAACAACCCTGCGAAATACGAAGAGTATTTCAGAATAAGCGGCTGGTATATATCCGGG
GACTCCGCTTACATGGATGAGGACGGCTACTTCTGGTTCCAGGGCCGTATCGACGACGTTATTAAC
ACAGCGGGCGAACGGGTTGGCCCGTTTGAGGTGGAAAGCAAACTGGTCGAGCATCCGGCGGTTGCG
GAAGCGGGTGTTATCGGCAAGCCGGATCCGATGCGCGGCGAGATTATCAAAGCGTTCATCGCGCTT
CGCGAAGGGTTCGAGCCATCCGATGAACTTAAAGCGGACATCGCCAAGTTTGTAAAAGAAGGTTTG
TCTGCGCACGCATCTCCTCGGGAGATCGAATTTAAAGACAAACTTCCTAAAACGCGCAGTAAAATC
ATGCGCCGCGTGCTCAAAGCTTGGGAACTTAACCTGCCGACAGCGACCTGTCGACGATTGAAGATT
AAGAGAGGAAAGATCGGCCGTCACTTTTTTGCTCTGCAACTGCTTTTTTTCAGGGGTTCGGATTCC
GTTCTCATGCAAGTTGTGCGATTCCGCTTGATAGAAAAGCCAAAAGATAAGCCCGGAGCTGCCAAG
CAATCAAGCTTGGCAGCCTCACGGGCTTTTCTTAAAATTTATCCGGTGCGATCCGCGGACTTAACG

TGCCGCATATTTTACCGCGGAAGACAACCGGGACTCTCCGGCATCATTCACGGCCGACACTTTGTA
ATACCCGTCGTGTTTGACGGACGAGATTGCGTATTCGGCAGAGAGAGCGGCATCGATCTTTTGTAC
TTCGTCGCTTCTCAGCATAGTAGACATGTAGCGTTTAACTTATCTTTAGAAGAATTCTCGTTCCAT
TGCAGCTTCAAACCATTGCCGTTTCCTTTCGCGGTCAGTCCTGTAGGAGAGGACGGTGTCTGCTTA
TCCGATTCCTGATCGGAACCGCCGTTCCCTCCGTTTTGGCCGCTTCCGTCTGACCCGCTGCCTCCG
CCTCCCGGAACTAATCCGGAGTCAATGGAGGAGTTGGAGCCCGTCGAAGAGGCTTTTCCGGGAGCG
GATTCCCGCCCGGCTACGTCAACCGCCGTGACATAGTAAGATTGGGCGGAAGACGGGCTGACGCTG
TCCGTAAACTTGCTGTCGCTTCCGGTCATGACAACCTTGCCCGTTTGCCGGATATACGGACCGCCG
TTGTCGGAACGGTACAGCCGATAGCCGACTACGTCGTTGTTCCCGCTTGGCTGGAACGTGATGACC
ACGGAGCCGCCCGACTTGGTTGCCGTCACTCTGGAAGGGGCGCTCGGATCGCTTCCTCCTTGCGTG
GATCGATCTCGGAAGGCGCGTCCTCGTCGTAATCCTTCGGTTTGTAGAAGCTGAGCGGACGGCGGT
TTTTGGCCGGGAGTTTGTTCAGAACCGCCGACAGCTCTTTCAGCAGGGAATTGACCGACTTCTCGC
GGACAATAACAAATTTCGATTTCACCATATCGCCCGGAGTCTGGTCCTGCGCAATGTAGTTAATGC
CGTTGTATTCAATAGTACTCATGGATTTCATCGAGTTATCGACGGTTGTAGGGATGTATTTGCGGT
TAAACCAATCCGTCACCACGTGTCCGGACTGCCGGTTCAAATCGCTCGGAAGCTTGCCGGATACGT
CGGATACGGTCGCCTGAACGACCGTAGAAGGCCGTTTAAACGAGGTGTCCGGGAACAGCTCGGGTT
TCTTCTCGACGGCGGCGTTCATAATGAGCGACCACATATTCATGGCACGCTGAGTCCGGCTTGCTC
AGCTTATTCACCGGAAGCTCGTAACCGCCCACACACCGGACCGTAATGTTCGGGGTATACCCATGA
ACCAGGCGTCGGCGTCATCCTCGTAAGCGGTTTGCGACACGGTATTTGCGTAAATTAAGCTTTTCT
GAAATTGTCGCGTCTTCGTAATACGTTCTCATATTTTGTTATCAGTAGCATTCTCGGAAAAAAGGT
GGCTTATTCTGCCATAATATTTCGTCATCCTATTCGGTATAACCTTTTTAATCTTTTGGAAGCGCT
ACCGTCATCTTAGTACGTTTAACxxxxxxxxxxGGAAGCTTCTGGCGGGTAATCGCGTTTTTGAAT
CCCGTCGGATTGGGCGCGCGCTGCTTGTGTATGCCGAATAGTTGCTCGGCTGTTGGGGAATGCCGG
CAAGGTAAGCAGCCTGGGCGACATTCAGCCGATTCAGATCGTCGATATTGAAGAtGCCTTTGGCGG
CCGCTTTAATGCCGAACAGGTTATAGCCGGCAGATCCGTTTCCGTAAGGGATTTTATTTAAATAGG
CCAGCAGAATCTCGTCTTTGGATAAAAGTCTTTCCATCCTCAAGGACAGCAGGATTTCTTTGGCTT
TACGTCCCGCATCCCGGTCCAATGTCAGAAAAACGCGTCTGGTCAGCTGCTGGGTGATCGTACTTC
CGCCGGTTTGTACGTCTTCGTTCAGCAGTTTCTGCGTTACGGCACGGGATAAGCCTTTTAAGTCAA
CCCCGTTGTGTTTGTAAAAATCGTTATCTTCAATCGCGAGCACCGCATCAAGAACGACTTGAGGAA
TTTCTTTTAATTCGGCAAGCCGCCTGTCTTCTTCCGTACGAAGCTGTCCGATAACGGCATCGTCGT
TAAAGTAGACAAAACCCGTGATGGCGTTCTCTTCGATTTTTTTGCGCATTTCCTCTTTATTCCGGA
CGGGTTCGTTTTTGACAAGAGCGCTTACGTAACCGAAAGCGGCGGCTCCTCCCATAATTCCGACAA
CAAGAAATGCCACAAACAACCACTTAACCGTATGAAAGGTGACTTTAAGCGTTTTTCGGACTCCCG
GATTTTGTAAAAAAGAGAGTTTTTTTGCCATATTACCAGGATTCCTCCTTTAATAACCGCCTCAAT
TATAGCACAAAGCCAAAATCTTGAATACCGTCGTGACTTGGGTCCTAAGGACTGCGAATTGACACC
GTTTGTTTCTTTATGATATAAATTTAGGGAACTGGATATTAATCAAAATGCGTCGATGGACTTCAG
TAGCGGGAAGATGCAGGGAACAGAGAGCCGATGGCGGGTGTGAATCGGTGCCGGTCTCCTCAGCGA
AATACCGTCCGGAGCAGAGATTGTGAACACGAGAGCAGCCGCCCGTATGATCCGGAACGGCTTGAC
GACCGCCGCCTGGACAGGATAGAGCGGAAGTTTCTTTCAGTAGCTTTCTTCCGGGATCTTTCCCGT
TATCCGAATGAAGTGAAAGTGCCAGCCCGGCCCGTATGCCGGTGAAGGTGCTTTAATTAGGGTGGT
ACCGCGGGTTTAAAGCCTTCTCGTCCCTTGTGGACAGGAAGGCTTTTTGTTATGCAGCGAAAAACT
ACAGCGACGAGAGGGATGGAAGCGAGATGACGTTGAAAGACGTATGGGAAAAGTTGTCGGCCGAGC
AGAAGGCCGAAGCGGAACGCCAGGTTGAGATCCTGCGCGCGGAGCGGTTGAAATTGTGCCGGAGGA
AGAATTGAGGCTGAAGATCGCCGAGTCCCTTGCGGACAACCGGCCGCTCAAAATCAAGCTGGGTCT
GGACCCTTCCGCGCCCGATATTCATGTGGGCCATACCGTAGTGCTTCACAGGCTCCGGCAGTTCCA
GGAACTGGGACATCATGTGCAGCTTCTGATCGGAGACTTCACGGGCCGTATCGGCGATCTACGGGG
AAATCCGGGACGCGCAAGCTGCTGACGGAAGAAGACGTGAAGCGCAATGCGGAGACGTACAAAAAG
CAGATCTTCAAGATTCTCGATCCGAAGCAGACTACCGTTTGTTACAACTCGGAATGGCTCAGCCCC
CTGACTTTTGCCGATGTGGTGGAGCTGTCCGCCAAATTGACGGTTGCCCGCGTGCTGGAGCGCGAC
GATTTCTCCAAACGCTACACCTCCGGTCAGCCTATCCACGTGCACGAATTTTTCTACCCGCTTATG
CAGGGCTACGATTCCGTTGCGCTGAAATGCGACGTGGAGCTTGGAGGCACGGACCAGAAATTCAAT
CTGCTTATGGGGCGCACCCTGCAG