

# 微生物による芳香族化合物の生産および異化に関する研究

静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府  
食品栄養科学専攻 博士後期課程  
平成 25 年度入学 山梨 智也

指導教員 静岡県立大学 准教授 鮎 信学

## 目次

1. 緒言 .....	1
第一章 大腸菌における脂肪酸合成の阻害による細胞内 malonyl-CoA 量の増大 .....	3
2. 序論 .....	4
2.1 ポリケタイド .....	4
2.2 ポリケタイドと脂肪酸の生合成 .....	5
2.3 大腸菌の脂肪酸合成酵素 .....	7
2.4 大腸菌の脂肪酸合成における転写制御因子 FadR .....	8
2.5 グリオキシル酸回路 .....	8
2.6 緊縮応答と飢餓シグナル ppGpp .....	9
2.7 III 型ポリケタイド合成酵素 .....	10
2.8 本章の目的 .....	12
3. cerulenin による脂肪酸合成酵素の阻害 .....	14
3.1 malonyl-CoA の間接的な定量系の構築 .....	14
3.2 cerulenin による脂肪酸合成酵素の阻害実験 .....	16
4. アンチセンス RNA による脂肪酸合成酵素遺伝子のノックダウン .....	19
4.1 アンチセンス RNA 法 .....	19
4.2 アンチセンス RNA 用プラスミドの構築 .....	20
4.3 大腸菌における脂肪酸合成酵素のアンチセンス RNA の発現 .....	22
5. 脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株の作製 .....	23
5.1 $\Delta fabB$ 株、 $\Delta fabH$ 株の取得 .....	23
5.2 $\Delta fabF$ 株の取得 .....	28
5.3 FAS 遺伝子の二重破壊株 $\Delta fabBH$ 株、 $\Delta fabFH$ 株の取得 .....	30
5.4 FAS 破壊株における脂肪酸量、flaviolin 生産量、細胞内 malonyl-CoA、acetyl-CoA 濃度の測定 .....	31
6. 脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株における qRT-PCR による転写量解析 .....	35
6.1 転写量解析による FAS 破壊株における malonyl-CoA プール増強の解明 .....	35
6.2 転写量解析による FAS 破壊株における acetyl-CoA プール増強の解析 .....	37
7. 脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株における飢餓シグナル ppGpp の解析 .....	40
7.1 HPLC を用いた脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株の ppGpp 量解析 .....	40
7.2 LC-MS を用いた ppGpp 分析系の構築 .....	43
7.2.1 ppGpp 分析条件の検討 .....	43
7.2.2 LC-MS を用いた <i>E. coli</i> BL21 株および $\Delta fabH$ 株における ppGpp 量の解析 .....	44
8. 第一章のまとめ .....	46
9. 第一章の実験項 .....	48

第二章 大腸菌生体内における一次代謝流量を調節する因子の探索と解析 .....	62
10. 序論 .....	63
10.1 Keio collection .....	63
10.2 Keio collection を用いた一次代謝流量を調節する未知因子のスクリーニング .....	65
11. $\Delta pdxJ$ 株における極性効果による <i>acpS</i> の転写抑制 .....	66
11.1 PdxJ .....	66
11.2 $\Delta pdxJ$ 株における極性効果による <i>acpS</i> の転写抑制 .....	67
12. 第二章のまとめ .....	70
13. 第二章の実験項 .....	71
第三章 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路の <i>in vitro</i> 再構築 .....	74
14. 序論 .....	75
14.1 $\beta$ -ケトアジピン酸経路 .....	75
14.2 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 .....	76
14.3 RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路に関する遺伝子破壊株の生育実験とトランスクリプトーム解析 .....	76
14.4 ビオチン依存性カルボキシラーゼ .....	77
14.5 本章の目的 .....	79
15. protocatechuate branch の <i>in vitro</i> 再構築 .....	80
15.1 組換え PcaHG、PcaB、PcaL タンパク質の精製 .....	80
15.2 PcaHG の反応 .....	81
15.3 PcaHG + PcaB の反応 .....	84
15.4 PcaHG + PcaB + PcaL の反応 .....	90
15.5 Pca 酵素についての考察 .....	94
16. catechol branch の <i>in vitro</i> 再構築 .....	96
16.1 組換え CatA、CatB、CatC タンパク質の精製 .....	96
16.2 CatA を用いた <i>in vitro</i> 反応 .....	97
16.3 CatB を用いた <i>in vitro</i> 反応 .....	99
16.4 CatC の <i>in vitro</i> 反応 .....	101
16.5 CatC と PcaL の反応 .....	103
16.6 Cat 酵素についての考察 .....	103
17. $\beta$ -ケトアジピン酸経路に関する遺伝子破壊株を用いた基質異化物の解析 .....	105
17.1 $\Delta catC$ 株における catechol 異化物の解析 .....	105
17.1.1 $\Delta catC$ 株の作製 .....	105
17.1.2 $\Delta catC$ 株における catechol 異化物の解析 .....	105
17.2 $\Delta pcaIJ$ 株による protocatechuate および catechol 異化物の解析 .....	109

17.2.1 $\Delta pcaIJ$ 株の作製.....	109
17.2.2 $\Delta pcaIJ$ 株による protocatechuate および catechol 異化物の解析 .....	111
17.3 $\Delta pcaB$ 株における protocatechuate 異化物の解析 .....	113
17.3.1 $\Delta pcaB$ 株における protocatechuate 異化物の HPLC 解析 .....	113
17.3.2 $\Delta pcaB$ 株におけるプロトカテク酸異化中間体の同定 .....	115
17.4 17 節の小括 .....	123
18. 新規長鎖 acyl-CoA carboxylase Ro02782 および新規長鎖脂肪酸 CoA ligase Ro02781 の機能解析 .....	124
18.1 Ro02782 の相同性検索 .....	124
18.2 組換え Ro02782 を用いた <i>in vitro</i> 反応.....	126
18.2.1 組換え Ro02782 の精製 .....	126
18.2.2 組換え Ro02782 を用いた <i>in vitro</i> 反応.....	126
18.3 組換え Ro02781 を用いた <i>in vitro</i> 反応.....	128
18.3.1 RHA1 株を用いた組換え Ro02781 の精製.....	128
18.3.2 組換え Ro02781 を用いた <i>in vitro</i> 反応.....	128
18.4 $\Delta ro02781$ 株および $\Delta ro02782$ 株の作製 .....	130
18.4.1 $\Delta ro02781$ 株の作製.....	130
18.4.2 $\Delta ro02782$ 株の作製.....	132
18.5 Ro02782 および Ro02781 に関する考察.....	133
19. 第三章のまとめ .....	134
20. 第三章の実験項 .....	135
第四章 総括 .....	147
引用文献 .....	150
謝辞 .....	159



## 1. 緒言

微生物や植物が生産する天然有機化合物は、その多様な化学構造のため生理活性を示す。しかしながら、未開拓「生物資源」の発見数が減少しているため、新規化合物の発見数は減少している。それでもなお、食品産業や創薬において新規化合物の必要性は変わらない。微生物や植物の遺伝子情報が容易に入手可能となり、二次代謝物の生合成遺伝子を大腸菌や放線菌といった微生物ホストに導入し、有用化合物の異種生産を行うことが広く行われている。現在、本来の生産生物が有する様々な反応を触媒する生合成酵素を組み換えるあるいは組み合わせることによって、非天然型の天然有機化合物を創製することが可能となった。この技術を用いてゲノム解析により見出された未利用の遺伝子資源を活用することで、現代においても非天然型の「新規」天然有機化合物の創生は可能である。

ポリケタイドは酢酸を構成単位とする天然有機化合物の総称である。その多様な構造が反映された様々な生物活性を示す。しかしながら、生産生物からの収量が少ない場合や複雑な構造による有機合成の煩雑さを伴う場合などにおいて、ポリケタイドは大量精製が困難なことが多い。そこで、ポリケタイドの微生物による異種生産が注目されている。大腸菌で異種生産を行う利点として、大腸菌は二次代謝物を生産せず、その異化経路を持たないクリーンホストであることが挙げられる。しかしながら、元々の一次代謝量が少なく組換え大腸菌によるポリケタイド生産では収量が少ない (figure 1-1 上段)。ポリケタイドの微生物生産においては、その前駆体である malonyl-CoA が十分に供給される必要がある。また、malonyl-CoA は脂肪酸合成の前駆体でもある。故に、大腸菌において malonyl-CoA の生合成は脂肪酸合成と共に厳格に制御されており、malonyl-CoA の濃度は低く抑えられている。本研究では、メタボリックエンジニアリングにより大腸菌の一次代謝流量の改善を行い、malonyl-CoA のプールを増強させることで芳香族ポリケタイドの大量生産を目指した。その方法として、大腸菌の脂肪酸合成酵素 (Fatty Acid Synthase, FAS) の阻害を行った。FAS を阻害することで、malonyl-CoA の代謝流路が脂肪酸合成からポリケタイド生産に傾くようにした。

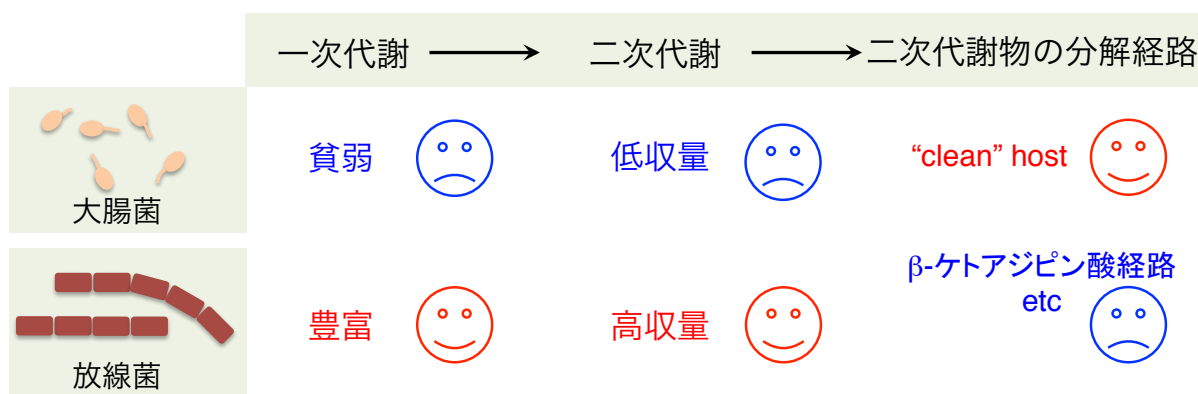


figure 1-1. 大腸菌および放線菌を用いた異種生産の比較

また、私は大腸菌の一次代謝の改変に関する研究として、大腸菌 *Escherichia coli* BW25113 株における 1 遺伝子欠損株のコレクションである Keio collection を用いて、欠損させるとポリケタイドの増産が誘発される因子のスクリーニングを行った。

一方、放線菌は大腸菌と並びものつくりのホストとして用いられる微生物であるが、大腸菌と比較して一次代謝量が多く二次代謝物の生産量も高収量で得られる利点がある。しかしながら、放線菌にはβ-ケトアジピン酸経路などの芳香族化合物の異化経路が存在し、組換え放線菌では生産された芳香族ポリケタイドが分解されてしまう恐れがある (figure 1-1 下段)。β-ケトアジピン酸経路は 1960 年代、70 年代を中心としてグラム陰性菌である *Pseudomonas* 属や *Acinetobacter* 属で広く研究されており、その全反応が決定されている。しかし、グラム陽性菌である放線菌における本経路に関しては、遺伝子のアノテーションはされているものの、一つひとつの酵素に対して機能解析が行われていないのが現状である。したがって、グラム陽性菌とグラム陰性菌のβ-ケトアジピン酸経路について相違点があるにも関わらず、それらが看過されている可能性がある。そこで本研究では、不明な部分が多い土壌放線菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 株におけるβ-ケトアジピン酸経路に関して、その全容を明らかにすることを目的とした。その方法として、本経路における *protocatechuate branch* および *catechol branch* における各酵素について *in vitro* 反応で再構築し、グラム陰性菌と異なる点があるかを精査した。加えて、本経路中の遺伝子欠損株を作製し、起点となる化合物を投与した時に経路通りの異化物が蓄積するかを確かめた。

私はこれらの微生物による芳香族化合物の生産と異化に関する研究から、大腸菌および放線菌を用いた芳香族ポリケタイド大量生産に適したクリーンホストを構築するための基盤構築を目指した。

## 第一章 大腸菌における脂肪酸合成の阻害による細胞内 malonyl-CoA 量の増大

## 2. 序論

### 2.1 ポリケタイド

ポリケタイド (polyketide) とは、細菌、カビおよび植物が生合成する天然有機化合物の一種である。ポリケタイドは酢酸などの低級脂肪酸を構造の基本単位とする二次代謝産物の総称である。ポリケタイドは極めて構造多様性の高い化合物群であり、その構造多様性が反映された多種多様な生理活性をもつ。例えば、lovastatin (コレステロール抑制剤)、erythromycin (抗生物質)、FK506 (免疫抑制剤)、doxorubicin (抗腫瘍剤)、ivermectin (抗寄生虫剤) など (figure 2-1)、私たちはポリケタイドを含む天然有機化合物から多大な恩恵を受けてきた。

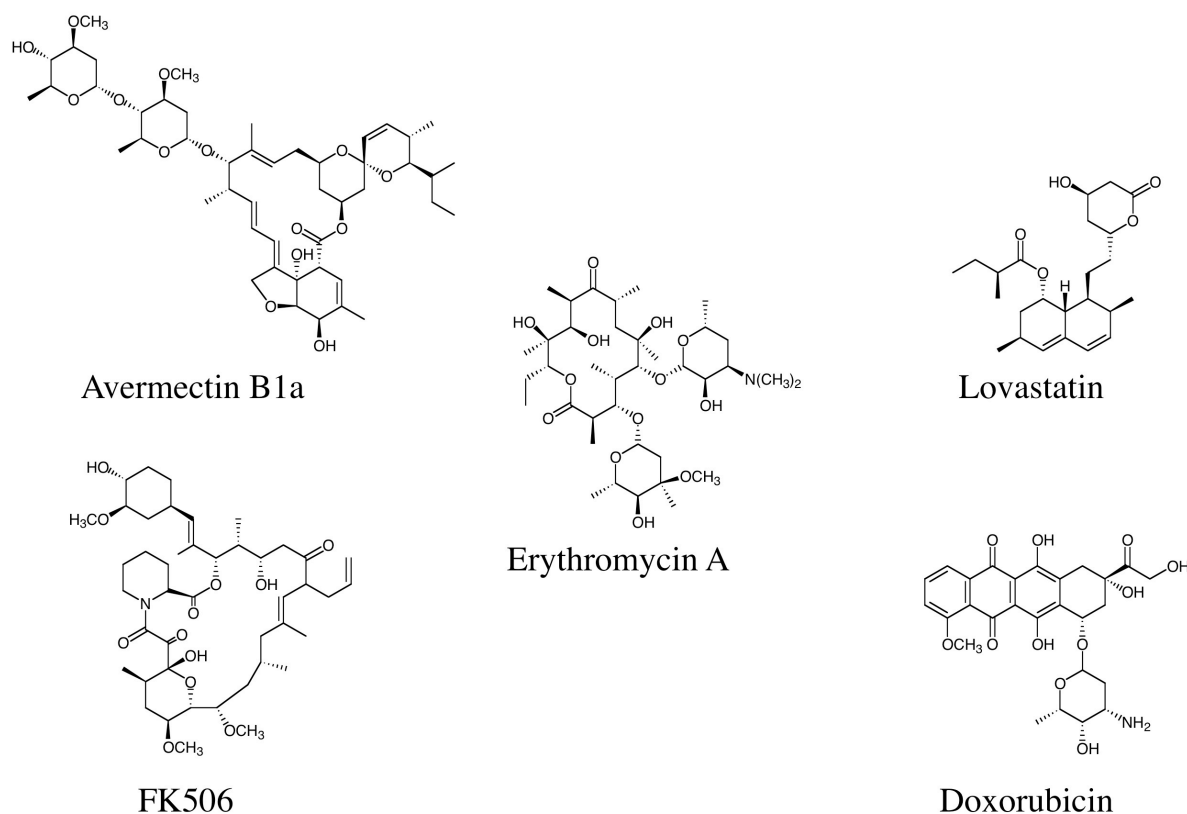


figure 2-1. ポリケタイドの構造例

1907 年、John Norman Collie は、植物が生産する芳香族化合物の多くが「 $\text{CH}_2\text{CO}$ 」をビルディングブロックとして生成していると推測した。例えば、カビの代表的なポリケタイドである orcellinic acid は、ベンゼン環に 4 つの置換基を有するが、元を正せば 4 分子の酢酸から形成されていることが分かる (figure 2-2)。現在では、 $^{13}\text{C}$  を用いた標識実験などにより、芳香族化合物だけではなく、マクロライド、ポリエン、ポリエーテル等、種々の構造のものがあることが分かっている。

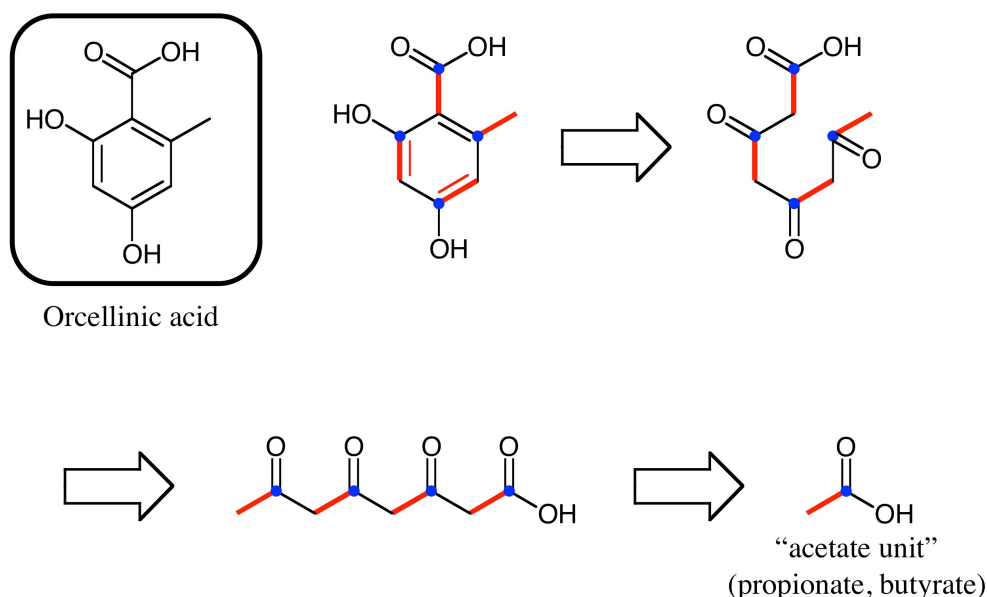
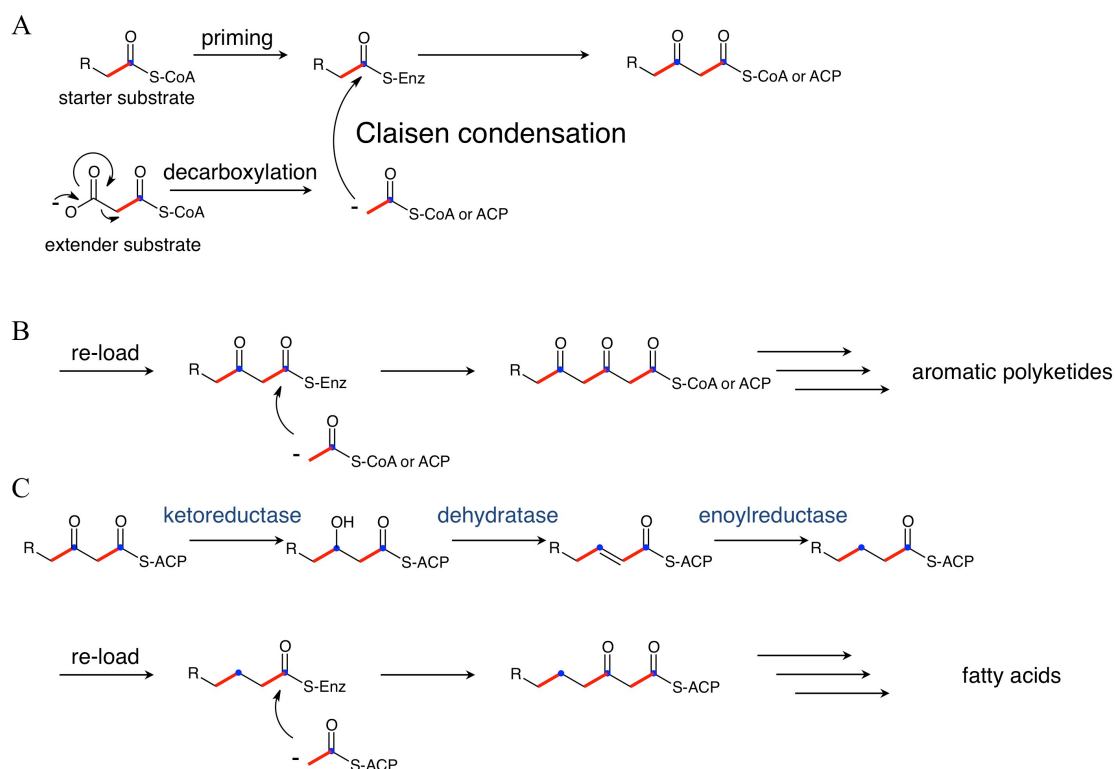


figure 2-2. orsellinic acid の生合成

## 2.2 ポリケタイドと脂肪酸の生合成

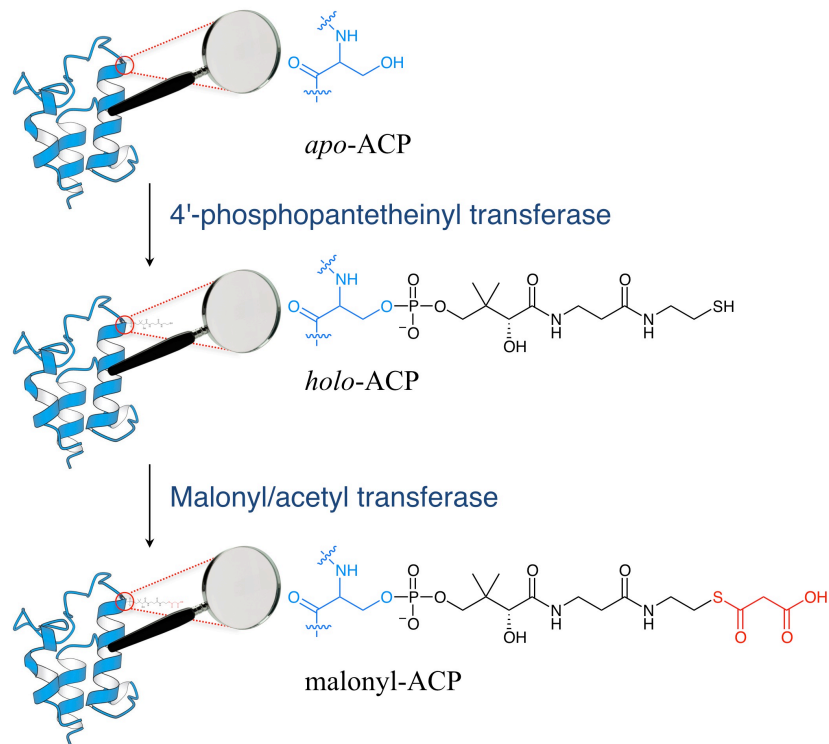
ポリケタイドの生合成は、スターター基質に対し、伸長鎖基質が縮合されることによって開始される。この縮合反応を触媒するのが **ketosynthase (KS)** と呼ばれる酵素または触媒ドメインである。**KS<sup>1)</sup>**は、スターター基質を **KS** の活性中心である **cysteine** にチオエステルを介して結合する (figure 2-3A)。この反応を **priming** と呼ぶ。次に、**KS** とスターター基質間のチオエステルに対し、伸長鎖基質の脱炭酸を伴う **Claisen** 縮合が起こり、**diketide** が生成される (figure 2-3A)。芳香族ポリケタイドの生合成では、**diketide** が再び **KS** にローディングされ (**re-load**)、**KS** と **diketide** 間のチオエステルに対し伸長鎖基質の **Claisen** 縮合が起こり、**triketide** となる (figure 2-3B)。この **KS** による反応が繰り返し行われることで、芳香族ポリケタイドは生合成される。

脂肪酸の生合成は、ポリケタイドのそれと類似な点が多い。例えば、脂肪酸生合成においても **KS** は鍵酵素であり、**diketide** 合成までの反応は同一である (figure 2-3A)。ポリケタイド合成との相違点は、芳香族ポリケタイドでは **diketide** が **KS** に **re-load** されたのに対し、脂肪酸生合成では、**diketide** が **ketoreductase<sup>1)</sup>**、**dehydratase<sup>1)</sup>**、**enoylreductase<sup>1)</sup>**により修飾を受け、 $\beta$ 位の **keto** 基がメチレンに還元される (figure 2-3C)。還元された中間体が再び **KS** に **re-load** され更なる縮合を受けるのはポリケタイドと同様である (figure 2-3C)。



**figure 2-3. 芳香族ポリケタイドと脂肪酸の生合成**

芳香族ポリケタイドおよび脂肪酸の生合成において、伸長鎖基質は主に malonyl-CoA 由来である。しかしながら、後述の III 型ポリケタイド合成酵素を除いて、ほとんどの場合、malonyl-CoA は直接 KS の基質にならず、malonyl-ACP (acyl carrier protein (ACP<sup>1)</sup>) と呼ばれる約 100 アミノ酸ほどのタンパク質と malonyl 基とのチオエステルが KS の基質となる (figure 2-4)。このとき、malonyl-CoA から malonyl-ACP に malonyl 基を受け渡すタンパク質が malonyl/acetyl transferase (MAT<sup>1)</sup>) である (figure 2-4)。また、ACP は翻訳後修飾を受け、holo 体にならないと MAT の基質になることができない。この ACP の翻訳後修飾を触媒し、apo 体の ACP に phosphopantetheinyl 基を結合し、holo 体に変換するのが 4'-phosphopantetheinyl transferase (PPTase) である (figure 2-4)。PPTase は、apo 体の ACP と CoASH から holo 体の ACP を生成する。特に脂肪酸合成経路の ACP である AcpP を活性化する PPTase を acyl carrier protein synthase (AcpS) と、芳香族ポリケタイドや非リボソーム依存ペプチドの生合成に関与する ACP を活性化する PPTase を sfp と呼ぶ。

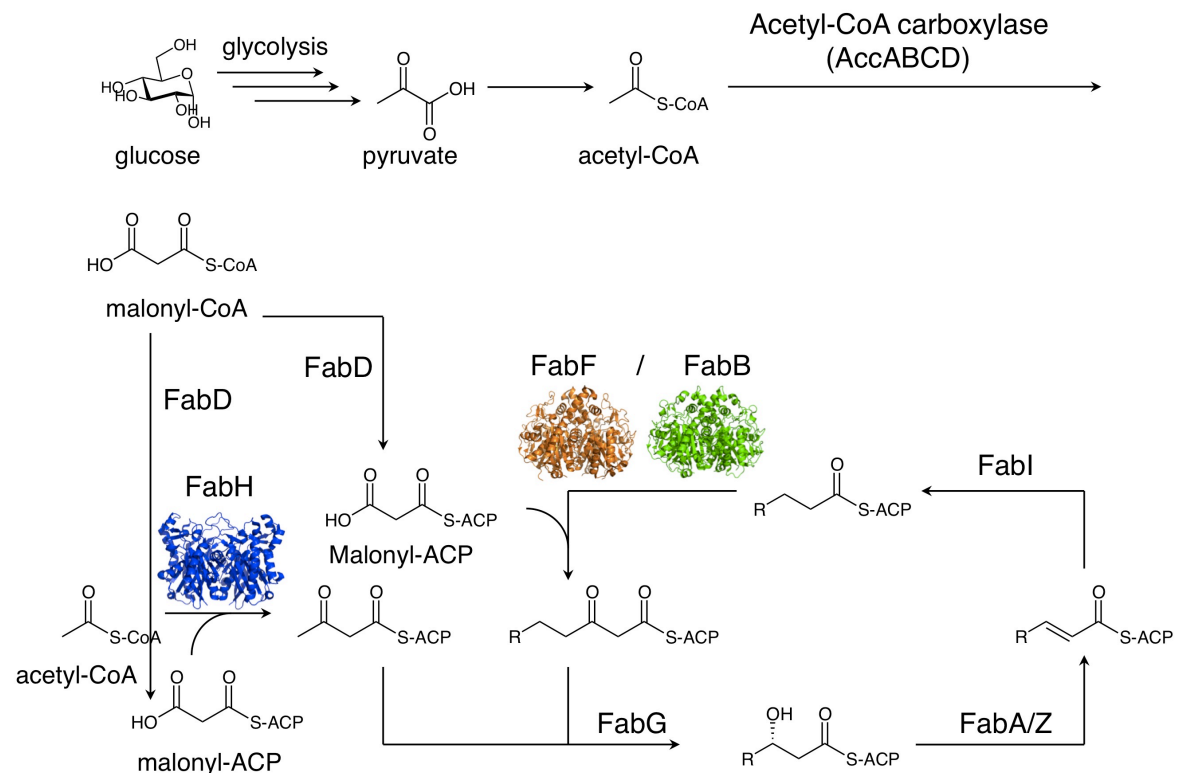


**figure 2-4. apo-ACP、holo-ACP、malonyl-ACP のイメージ**

### 2.3 大腸菌の脂肪酸合成酵素

大腸菌の脂肪酸合成の KS は、FabH、FabF、FabB の 3 種類である<sup>2)</sup>。FabH は、脂肪酸合成の初発反応である acetyl-CoA と malonyl-ACP の縮合反応を触媒する。FabF または FabB は炭素鎖長 4 以上の脂肪酸中間体に対し malonyl-ACP の縮合反応を行う。前述の ketoreductase は FabG、dehydratase は FabZ と FabA、enoylreductase は FabI、malonyl/acetyl transferase は FabD、acyl carrier protein synthase は AcpS である (figure 2-5)

<sup>2)</sup>。



**figure 2-5. 大腸菌の脂肪酸合成経路** acetyl-CoA carboxylase (AccABCD) は acetyl-CoA を malonyl-CoA に変換する酵素である。pyruvate は解糖系により glucose から合成される。

## 2.4 大腸菌の脂肪酸合成における転写制御因子 FadR

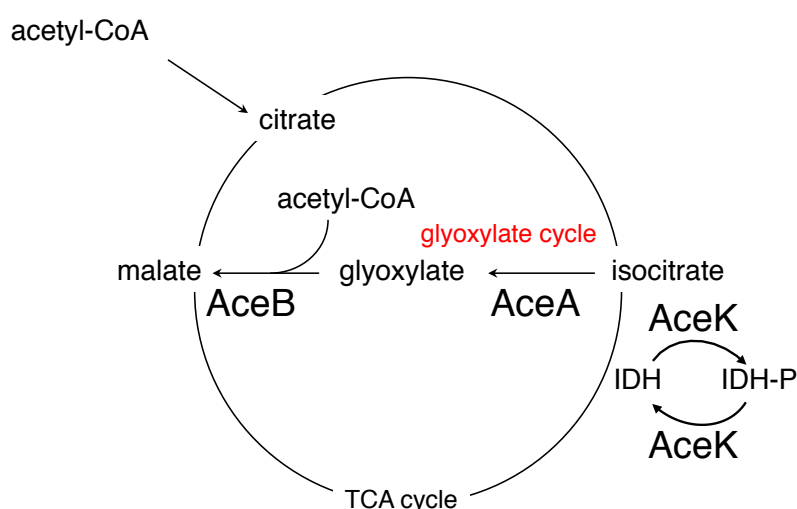
転写制御因子 FadR は、大腸菌の脂肪酸合成における正のレギュレーターである。FadR は *fabA*、*fabB*、*fabH*、そして *fadR* 自身の転写を正に制御する<sup>3, 4)</sup>。また、FadR は脂肪酸のβ-酸化においては、*fad* 遺伝群を負に制御する。*fad* 遺伝子群は、脂肪酸トランスポーターをコードする *fadL*、脂肪酸-CoA ligase をコードする *fadD*、acyl-CoA dehydrogenase をコードする *fadE*、3-hydroxy acyl-CoA-dehydrogenase/enoyl CoA-hydratase 複合体をコードする *fadB*、acetyl-CoA-C-acyltransferase をコードする *fadA*、そして 2,4-dienoyl-CoA reductase をコードする *fadH* で構成される<sup>5, 6)</sup>。加えて、FadR はグリオキシル酸回路に関する負の制御因子である IclR に関しても、その転写を正に制御する<sup>7)</sup>。この FadR レギュロンの制御については、長鎖 acyl-CoA が FadR のオペレーター部位への結合を阻害する形で負のフィードバックを受けている<sup>7)</sup>。

## 2.5 グリオキシル酸回路

大腸菌は TCA 回路のバイパス経路である、グリオキシル酸回路を有している (figure 2-6)。本回路は、1957 年にハンス・クレブスらにより発見された<sup>8)</sup>。よって、本回路では多くの酵素が TCA 回路と共通している。本回路に関する遺伝子として、*aceB*、



*aceA*、*aceK* が挙げられる。これらは大腸菌において *ace* オペロン (*aceBAK*) を形成しており、転写制御因子である *IclR* によって負に制御される<sup>9)</sup>。*AceB* は isocitrate lyase、*AceA* は malate synthase、そして、*AceK* は isocitrate dehydrogenase (IDH) kinase/phosphorylase である。acetyl-CoA が TCA 回路に流入した場合、2-オキソグルタル酸とスクシニル CoA が生成する段階で2つの炭素原子が CO<sub>2</sub> として放出されるため炭素源とはならない。これに対して、グリオキシル酸回路は2-オキソグルタル酸とスクシニル CoA の経路を迂回して、イソクエン酸からリンゴ酸とコハク酸を生成するため、炭素数の減少を伴わないでオキサロ酢酸に至ることができる。したがって、グリオキシル酸回路は異化経路ではなく同化反応経路であると言える。



**figure 2-6. グリオキシル酸回路の概要** 本回路中の *AceB* は isocitrate lyase、*AceA* は malate synthase、そして、*AceK* は isocitrate dehydrogenase (IDH) kinase/phosphorylase である。IDH-P は IDH のリン酸化体である。

## 2.6 緊縮応答と飢餓シグナル ppGpp

微生物は、脂肪酸枯渇、アミノ酸枯渇、温度変化あるいは pH 変化など、常に変化する環境に対応しながら生存しており、それぞれの環境変化に対応するシステムを備えている。このような環境応答システムの一つである緊縮応答は、外的環境に素早く対応し、生存するために、微生物生体内の転写再構築を引き起こす<sup>10, 11, 12)</sup>。緊縮応答は、主に二種類の核酸、guanosine tetraphosphate (ppGpp) と guanosine pentaphosphate (pppGpp) によって引き起こされることが知られている。ppGpp と pppGpp は、緊縮応答を引き起こす飢餓シグナル分子であるが、生理学的な特性の違いが認められない

ため二つ合わせて(p)ppGpp と呼ばれている<sup>10)</sup>。(p)ppGpp に関する代謝反応には、RelA と SpoT と呼ばれる二つの酵素が関わっている。RelA は、リボソームに付随していて、アミノ酸飢餓が起きた際に、GTP に ATP のピロリン酸を転移することによって、緊縮応答シグナルの pppGpp を合成する酵素である<sup>13)</sup>。一方、SpoT は、脂肪酸飢餓や炭素源飢餓が起きた際に、acyl carrier protein (ACP) が結合することによって活性化され、RelA と同じく GTP に ATP のピロリン酸を転移することによって pppGpp を合成する酵素である<sup>14)</sup>。また、SpoT は、pppGpp を合成するだけではなく、(p)ppGpp 分解活性を保持しており、ppGpp を GDP とピロリン酸に、pppGpp を GTP とピロリン酸にそれぞれ分解する<sup>15)</sup>。そして、RelA もしくは SpoT によって作り出された pppGpp は、pppGpp 5'-phosphohydrolase (GppA) に脱リン酸化されることによって ppGpp に変換される<sup>16)</sup>。

緊縮応答の作用機構には、ppGpp と RNA polymerase (RNAP) と ppGpp の特異的な転写因子 DksA が関与している。緊縮応答の間、ppGpp と DksA は RNAP に結合し、転写を抑制する。具体的には、全般的な RNA の発現低下、細胞増殖遺伝子の発現低下、ストレス遺伝子と飢餓遺伝子の高発現などを引き起こす<sup>17)</sup>。したがって、微生物は、緊縮応答によって貧栄養環境に適応し、悪環境が改善されるまでの時間を耐え忍ぶことができる。

## 2.7 III 型ポリケタイド合成酵素

III 型ポリケタイド合成酵素 (III 型 PKS) は高等植物、原核および真核微生物に広く分布し、主に芳香族ポリケタイドの合成を触媒する<sup>18)</sup>。III 型 PKS は、KS のホモダイマーで形成されるが、伸長反応の他にポリケタイド鎖の閉環、芳香化も触媒する多機能な酵素である。カルコン合成酵素 (CHS) 以来、スチルベン合成酵素 (STS) などが見いだされてきた<sup>18)</sup>。CHS は、*p*-coumaroyl-CoA と、3 分子の malonyl-CoA からフラボノイドの鍵中間体である naringenin chalcone の合成を触媒する (figure 2-7)。これに対し、STS は、全く同一の基質から CHS とはポリケタイド鎖中間体の閉環様式が異なるため、resveratrol を生成する (figure 2-7)。興味深いことに CHS と STS はアミノ酸配列で約 70% と高い相同性を有するにも関わらず、異なる反応を触媒する。種々の III 型 PKS の X 線結晶構造が明らかとなっている現在では、III 型 PKS の反応は酵素内のアミノ酸残基のわずかな差異により制御されていることが分かっている<sup>18)</sup>。従って、III 型 PKS の反応はアミノ酸配列のみからその反応を予測することが困難である。また、III 型 PKS は植物だけではなく、原核および真核微生物にも存在することが明らかになっている。放線菌 *Streptomyces griseus* から発見された RppA は、

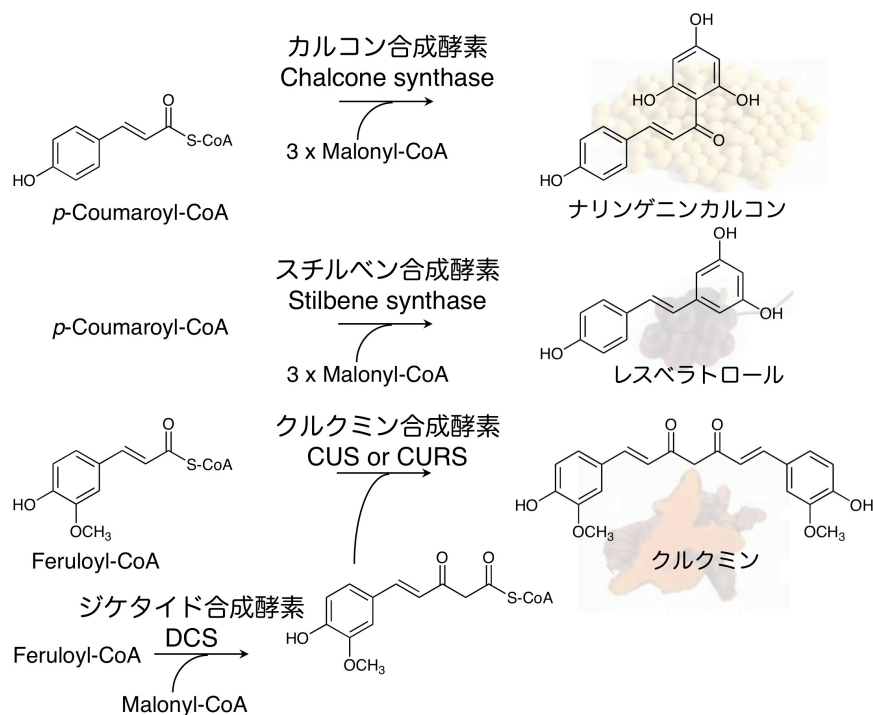


figure 2-7. III 型ポリケタイド合成酵素の反応

微生物由来としては世界で初めて機能が解明された III 型 PKS であり、5 分子の malonyl-CoA を縮合し 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN) の合成を触媒する (figure 2-8) <sup>19)</sup>。III 型 PKS によって生合成される植物ポリケタイドには興味深い活性を示すものが多い。前述のように、ウコンに含まれる curcumin やブドウの resveratrol、大豆の Genistein などは植物ポリケタイドであり、いずれも抗酸化作用を持つ。特に、curcumin は制ガン作用、resveratrol は延命作用、genistein はエストロゲン様作用をそれぞれ示す。

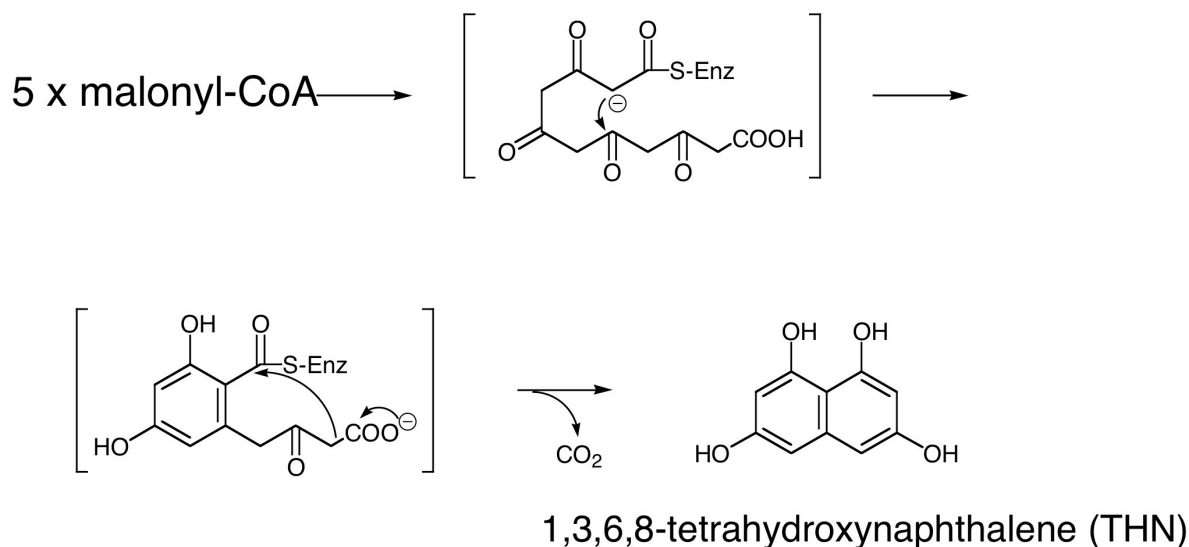


figure 2-8. RppA の反応

## 2.8 本章の目的

微生物や植物が生産する天然有機化合物は、その多様な化学構造のため生理活性を有するものが多い。しかしながら、生物資源の発見数の減少に伴い、新規な二次代謝産物の発見数は減少している。

私が所属する研究室では以前、イネゲノムのポリケタイド合成酵素を網羅的に解析し（このような研究をゲノムマイニングと呼ぶ）、新規酵素、クルクミノイド合成酵素（CUS）を発見した。また、コンビナトリアルバイオシンセシスにより非天然型の **curcumin** 誘導体の大腸菌による生産に成功している<sup>20)</sup>。このようにゲノム解析により見い出された未利用「遺伝子資源」を活用することで、新規な天然有機化合物が創生できる。フェルラ酸を **feruloyl-CoA** に変換する酵素、**4-coumarate:CoA ligase (4CL)** および **CUS** を大腸菌で発現することにより、フェルラ酸から **curcumin** を合成する微生物生産系を構築した<sup>20)</sup>。しかしながら、生産量は～100 mg/l と低く、実用にはほど遠かった。

この理由のひとつに、基質の供給量の問題がある。大腸菌において **malonyl-CoA** の生合成は脂肪酸合成経路と共に厳格に制御されており<sup>21)</sup>、**malonyl-CoA** の濃度は低く抑えられている<sup>22)</sup>。細胞内の **malonyl-CoA** の代謝プールを増強し、ポリケタイドの増産を試みる研究例は過去にある。例えば、Koffas らは解糖系の **metabolite network modeling** と遺伝子破壊・導入により、大腸菌内の **malonyl-CoA** の濃度を 4 倍に高めている<sup>23)</sup>。また、宮久らは、**acetyl-CoA carboxylase** を発現させることにより、植物ポリケタイドである **flavonol**、**flavone** の増産に成功している<sup>24)</sup>。これらは代謝の脇道を遺伝子破壊により遮断する、または代謝の本道を遺伝子導入により強化することにより **glucose** から **malonyl-CoA** を生産する代謝流量を増大している。しかしながら、ポリケタイド合成酵素だけではなく、脂肪酸合成酵素も **malonyl-CoA** を基質とするため（figure 2-5）、**malonyl-CoA** 合成を増強させるだけでは、微生物において高いポリケタイドの生産量は得られない。

本章の目的は、脂肪酸合成酵素（FAS）の阻害をし、**malonyl-CoA** の代謝プールを増強することで二次代謝産物の生産に適した微生物宿主を開発することである。FAS の阻害は次の 3 つの方法で行った。第一に **FabB** および **FabF** の阻害剤 **cerulenin** を用いた。第二にアンチセンス法により FAS 遺伝子の転写を阻害する。第三に FAS 遺伝子の破壊株を作製した。以上により FAS を阻害し、**malonyl-CoA** の代謝流路が脂肪酸合成からポリケタイド合成に傾いた微生物を合成することを目指した。そして、実際に FAS の阻害が大腸菌の脂肪酸合成量を低下させ、**malonyl-CoA** プールを増強し、ポリケタイドの増産に繋がることを明らかにした。

さらに私は、FAS の阻害における **malonyl-CoA** プールの増強に関して、脂肪酸合成に関わる遺伝子の転写量の観点から詳しく解析するために、大腸菌の脂肪酸合成にお

ける正の転写制御因子である FadR に着目した。そして、qRT-PCR により *fadR* および脂肪酸合成に関与する遺伝子の転写量解析を行った。また、大腸菌の FAS を阻害することにより脂肪酸合成量が低下するために、FAS 阻害を受けた大腸菌では脂肪酸飢餓による緊縮応答が起きていることが考えられた。そこで私は、FAS 遺伝子破壊株における緊縮応答の飢餓シグナルである ppGpp 量を測定することで、FAS 破壊株における脂肪酸合成量の低下に関する機構解明を目指した。

### 3. cerulenin による脂肪酸合成酵素の阻害

#### 3.1 malonyl-CoA の間接的な定量系の構築

III 型 PKS である RppA は、5 分子の malonyl-CoA から THN の合成を触媒する<sup>19)</sup> (figure 3-1)。THN は Monooxygenase である MomA により赤色色素 flaviolin、紫色色素 mompain に酸化される<sup>25)</sup> (figure 3-1)。私は malonyl-CoA を間接的に定量するため、大腸菌における RppA、MomA 発現系を構築した。RppA、MomA は大腸菌の生体内において malonyl-CoA を基質として flaviolin と mompain を生産する。つまり、flaviolin、mompain を定量することで malonyl-CoA 量を間接的に定量できると考えた。

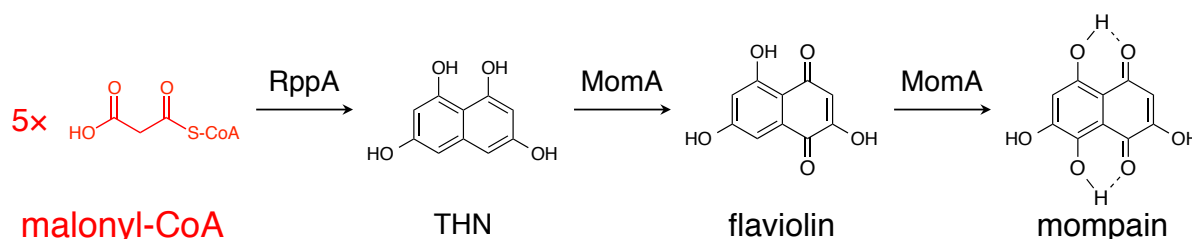


figure 3-1. RppA と MomA 発現大腸菌の反応経路

私は、大腸菌で RppA と MomA を発現させるために、IPTG による発現誘導が可能な T5 プロモーターを持つ pQE2 を使い、pQE2-*rppArbsmomA* を構築した (figure 3-2)。構築した pQE2-*rppArbsmomA* を大腸菌に導入し、その培養液の酸性酢酸エチル抽出物を分析したところ、RppA と MomA 産物である flaviolin と mompain を HPLC により確認した (figure 3-3)。

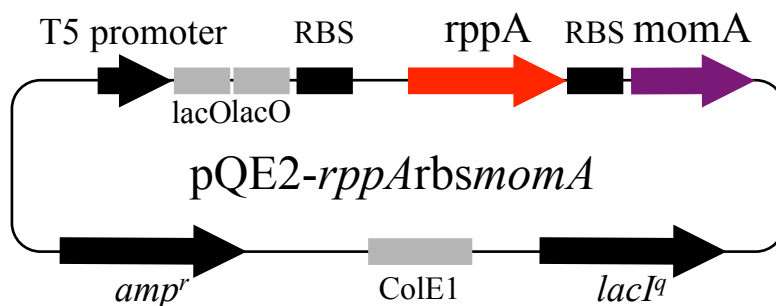
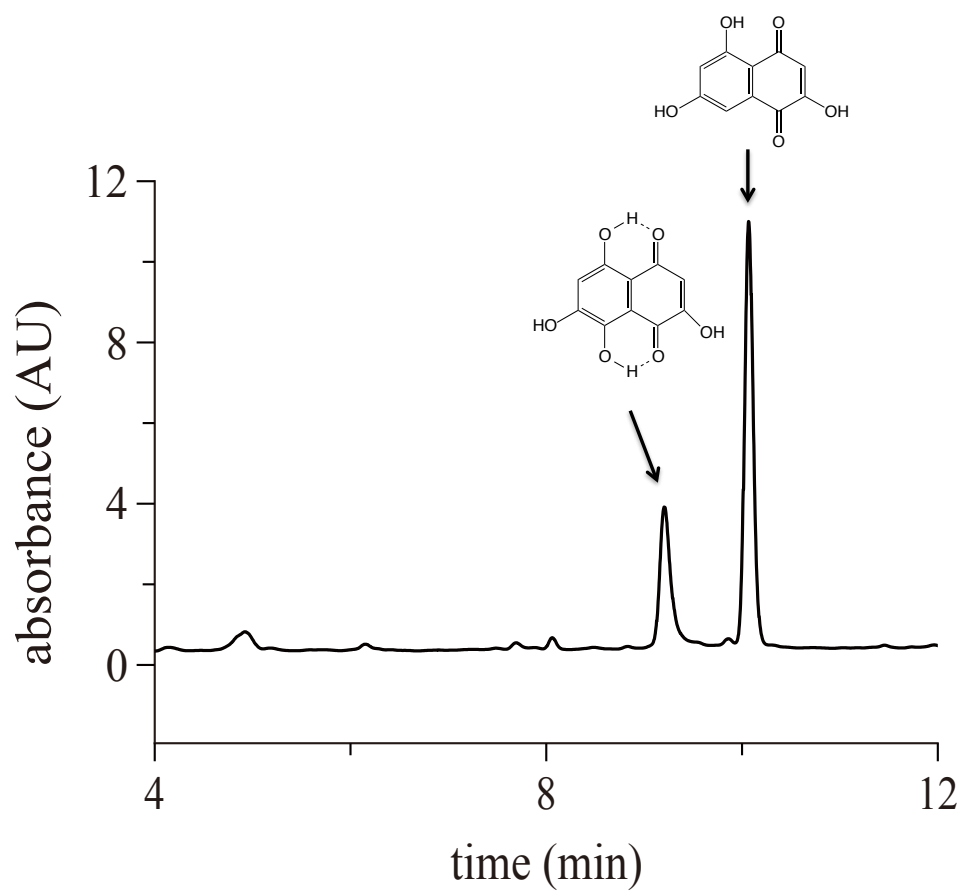


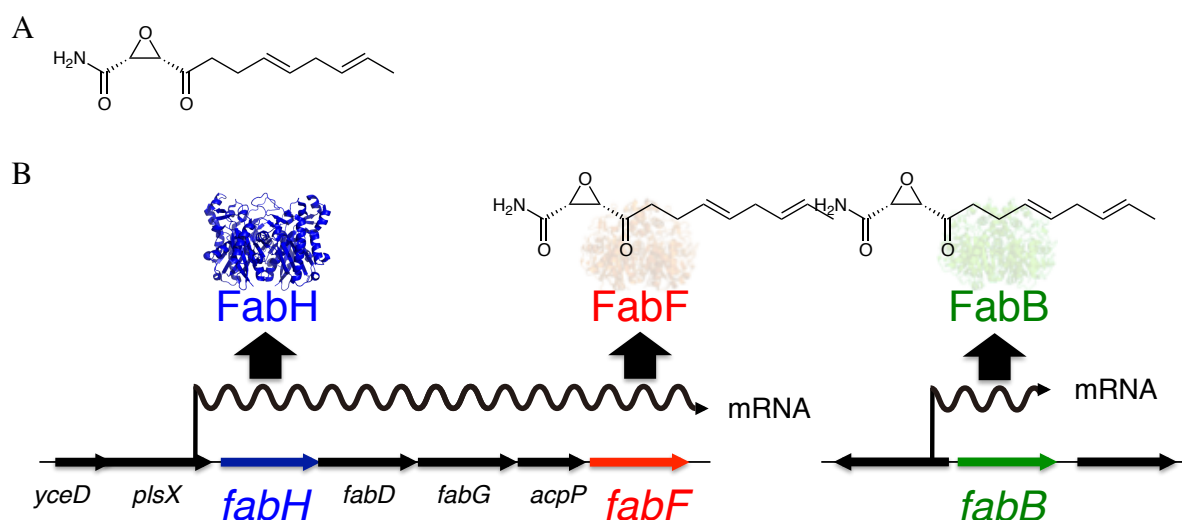
figure 3-2. pQE2-*rppArbsmomA* のコンストラクト RBS は ribosome binding site、amp<sup>r</sup> はアンピシリン耐性遺伝子、ColE1 は複製起点を示す。



**figure 3-3.** pQE2-*rppArbsmomA* 組換え大腸菌の HPLC 分析 mompain は 9 分、flaviolin は 10 分に溶出する。

### 3.2 cerulenin による脂肪酸合成酵素の阻害実験

cerulenin は、*Cephalosporium caerulens* が産生する抗真菌性抗生物質である。微生物および動植物の脂肪酸合成を阻害する抗生物質であり、脂肪酸合成経路の FabB/F を阻害する (figure 3-4) <sup>26)</sup>。私は、大腸菌を用いてポリケタイドを生産する際、培地に cerulenin を添加することによって、脂肪酸合成に使用される malonyl-CoA 量を抑制できるのではないかと考えた (figure 3-5)。つまり、FabH 以降の FabB/F による脂肪酸合成が起きなくなるため、malonyl-ACP の消費量が減少すると考えられる。また、同時にポリケタイド合成酵素を発現させると、余剰になった malonyl-CoA がポリケタイドの生産に用いられるのではないかと考えた (figure 3-5)。そこで、pQE2-*rppArbsmomA* を導入した大腸菌 *E. coli* BL21 株、BL21/pQE2-*rppArbsmomA* を用いて、cerulenin による脂肪酸合成酵素の阻害実験を試みた。様々な濃度で cerulenin を投与した結果、組換え大腸菌の培養液は flaviolin および mompain の生産により赤紫色になり、その呈色度合いに差異が見られた (figure 3-6)。



**figure 3-4. cerulenin による FabB および FabF の阻害** (A) cerulenin の構造。(B) cerulenin は脂肪酸合成酵素 FabB および FabF を阻害するが、FabH や RppA などの III 型 PKS は阻害しない。



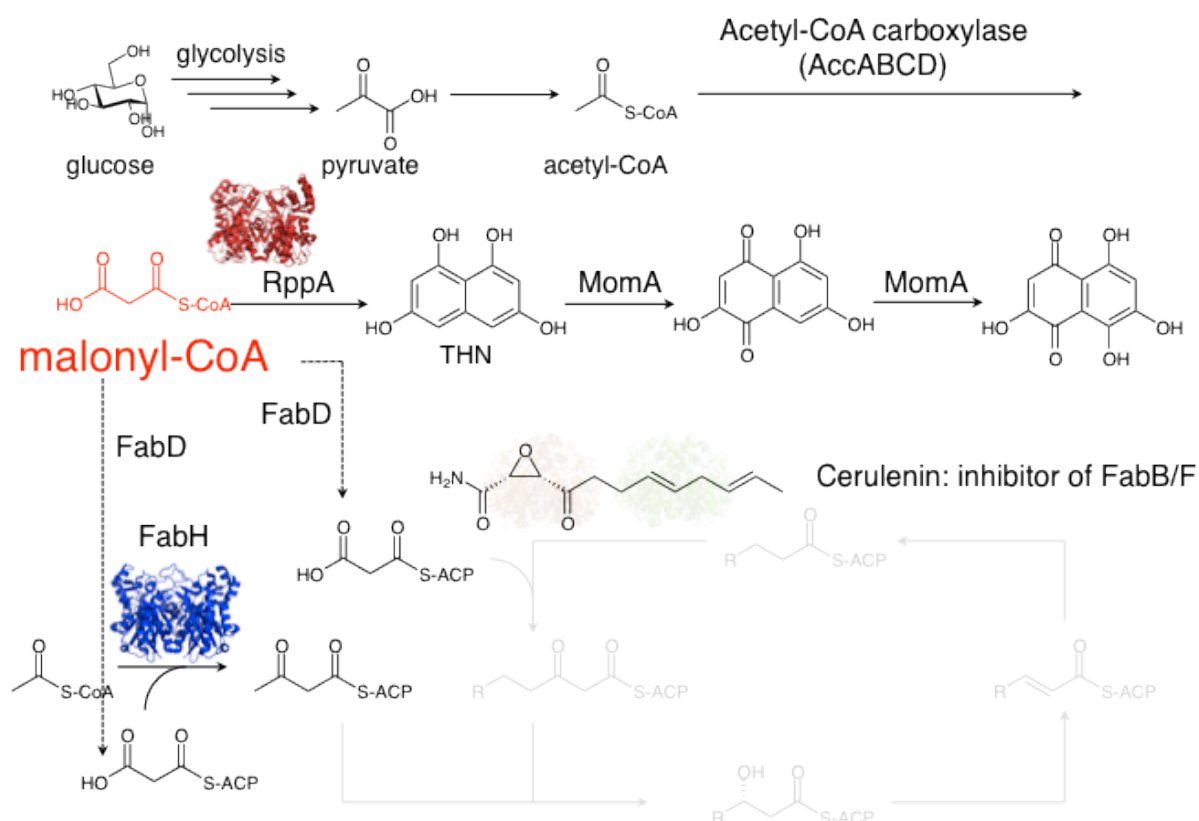


figure 3-5. cerulenin 投与による一次代謝の流路操作

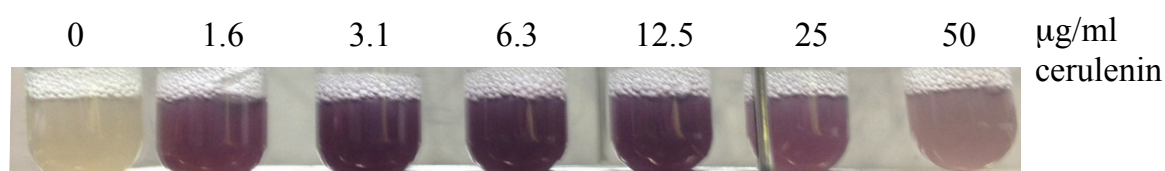


figure 3-6. cerulenin 添加試験における本培養開始 12 時間後の試験管の様子 左から、0、1.6、3.1、6.3、12.5、25、50 µg/ml の終濃度で cerulenin を投与した。

この培養液を酢酸エチルにて抽出し、flaviolin および mompain を定量した (figure 3-7)。生産された flaviolin、mompain は、flaviolin 量に換算することで評価した。その結果、*E. coli* BL21 株において flaviolin 生産量は cerulenin 濃度 6.3 µg/ml の時に最大となり、約 103 mg/ml であった。これは cerulenin 無添加時と比較し、14 倍の生産量であった (figure 3-7)。以上の結果から、脂肪酸合成を阻害することは、ポリケタイドの生産向上につながる事が明らかとなった。

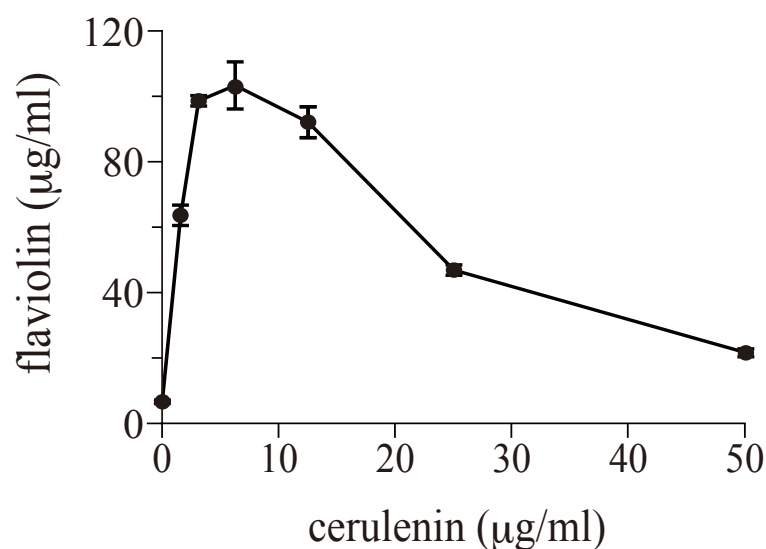


figure 3-7. cerulenin 添加試験における flaviolin の生産量

また、最大の flaviolin 生産量を示した cerulenin 濃度、6.3  $\mu\text{g/ml}$ より低濃度では cerulenin の効果は顕著ではないことが flaviolin 生産量から判断できる。一方、高濃度の cerulenin では flaviolin は増産されなかった。阻害効果が大き過ぎるため、生育に必要な脂肪酸が十分に供給されず、生育阻害が起きてしまうためだと考えられる。

本実験の結果より、脂肪酸合成酵素の阻害はポリケタイド増産に有効な手段であることが明らかとなった。しかしながら cerulenin は高価であり、工業規模の生産には適さない。また、本実験系は、cerulenin の投与のタイミングと菌体の生育とを慎重に見計らう必要があり複雑である。私はその複雑さを回避するべく、菌株自体を形質転換し、より培養が容易になる方法がないかと考えた。そこで私はアンチセンス RNA で FAS 遺伝子の転写をノックダウンすることで阻害し、芳香族ポリケタイドの増産を目指した。

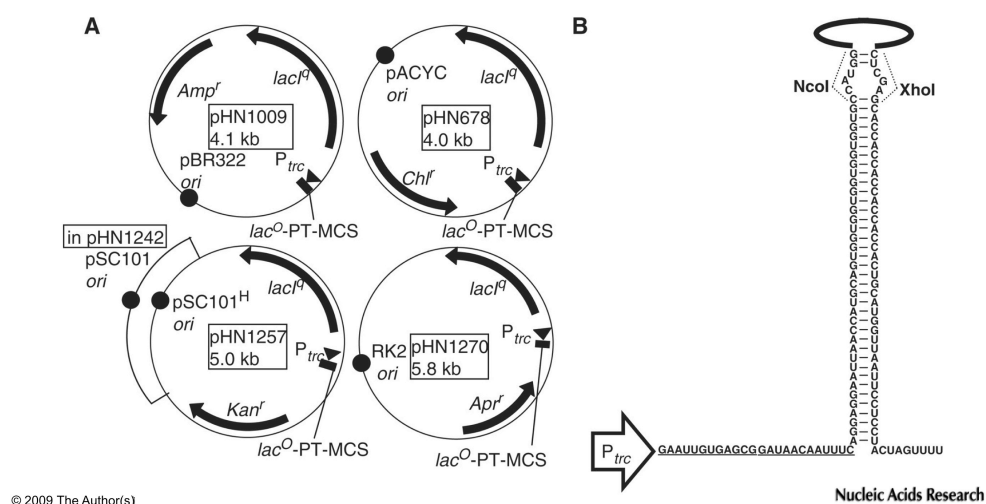
#### 4. アンチセンス RNA による脂肪酸合成酵素遺伝子のノックダウン

##### 4.1 アンチセンス RNA 法

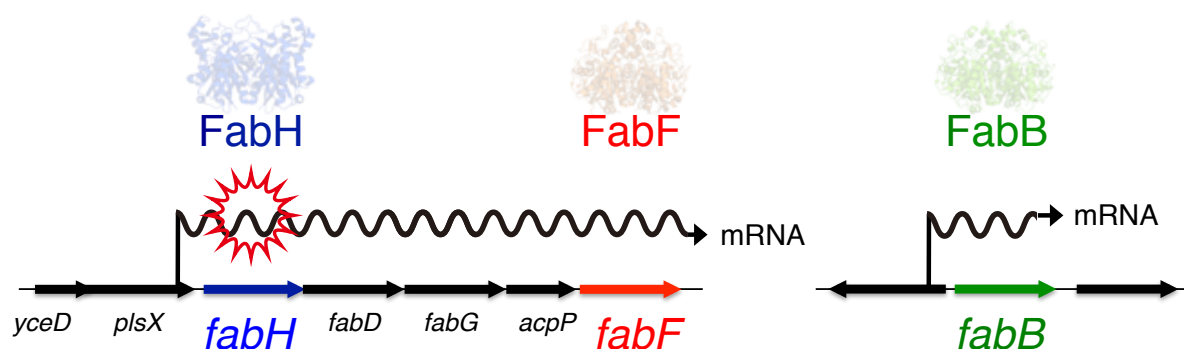
アンチセンス RNA 法は、標的遺伝子の mRNA に相補的な配列を持つ一本鎖のアンチセンス RNA をハイブリダイズさせ、mRNA が翻訳されることを妨げる方法である<sup>27)</sup>。アンチセンス RNA 法の利点として、遺伝子破壊と異なり、生育に必須な遺伝子であっても遺伝子ノックダウンの標的とすることができることが挙げられる。アンチセンス RNA 法には 2 種類の方法がある。1 つは、人工的に合成した核酸あるいは核酸類縁体を培養液中に添加し、菌体の細胞に取り込ませる方法である。もう 1 つは、アンチセンス RNA 発現用ベクターを形質転換させて、細胞内でアンチセンス RNA を発現する方法である。

アンチセンス RNA 法において一般的に、標的 mRNA のリボソーム結合部位 (ribosome binding site、以下 RBS) からスタートコドン周辺にハイブリダイズするアンチセンス RNA を用いるのが有効とされている<sup>28)</sup>。独立行政法人、産業技術総合研究所、生物プロセス部門、主任研究員である中島らは、80~160 塩基からなるアンチセンス配列が、38 塩基からなる逆向き繰り返し配列に挟まれた形の RNA (末端対合型アンチセンス RNA) を用いると、ノックダウンの効率が劇的に上昇することを見いだした<sup>29)</sup>。また中島らは、複製起点の異なるアンチセンス RNA 用ベクターを開発し、菌体内で多重の遺伝子ノックダウンができるようにした (figure 4-1)<sup>30)</sup>。

そこで私は、前述の cerulenin による脂肪酸合成酵素の阻害実験の結果を踏まえて、*E. coli* BL21/pQE2-*rppArbsmomA* 株に対して、アンチセンス RNA を発現させることで脂肪酸合成酵素遺伝子をノックダウンさせることにより (figure 4-2)、malonyl-CoA の消費が抑えられるのではないかと考え、以下の実験を行った。



**figure 4-1.** 末端対合型アンチセンス RNA 用発現ベクター pHN (Nakashima, N. & Tamura, T. *Nucl. Acids Res.* **37**, e103-e103 (2009)より抜粋) (A) pHN1009、pHN678、pHN1257、pHN1270 のコンストラクト。(B) 末端対合型アンチセンス RNA の構造。



**figure 4-2.** 脂肪酸合成酵素のアンチセンス RNA によるノックダウン *fabH* と *fabF* は同一の転写単位で転写される。

#### 4.2 アンチセンス RNA 用プラスミドの構築

大腸菌 *E. coli* BL21/pQE2-*rppArbsmomA* 株にアンチセンス RNA を発現させるため、アンチセンス RNA 用プラスミドの構築を行った。大腸菌 *E. coli* W3110 株のクロモソームを鋳型に PCR 法にて *fabH* (figure 3-3)、*fabF* (figure 3-4)、*fabB* (figure 3-5) のアンチセンス RNA 用 DNA 断片を増幅し、pHN678、pHN1257、pHN1270 にクローニングした。pQE2、pHN678、pHN1257、pHN1270 は複製起点、薬剤耐性マーカーがそれぞれ異なるため、不和合性を起こさない。

```

CCTGGAATCTGTATACCCAGCTGGTTTTGAGCTGCTGGACGGTGGCAAAAGCGGAAGTCTGCGGTAGC
AGGACGCTGCCAGCGAACTCGCAGTTTTGCAAGTGACGGTATATAACCGAAAAGTGACTGAGCGTACAT
GTATACGAAGATTATTGGTACTGGCAGCTATCTGCCCGAACAAGTGCGGACAAACGCCGATTGCGGAA
AAATGGTGGACACCTCTGACGAGTGGATTGTCACCTCGTACCGGTATCCGCGAACGCCACATTGCCGCG
CCAAACGAAACCGTTTTCAACCATGGGCTTTGAAGCGGCGACACGCGCAATTGAGATGGCGGGCATTGA
GAAAGACCAGATTGGCCTGATCGTTGTGGCAACGACTTCTGCTACGCACGCTTTCCCGAGCGCAGCTT
GTCAGATTCAAAGCATGTTGGGCATTAAAGGTTGCCCGGCATTTGACGTTGCAGCAGCCTGCGCAGGT
TTCACCTATGCATTAAGCGTAGCCGATCAATACGTGAAATCTGGGGCGGTGAAGTATGCTCTGGTCGT
CGGTTCCGATGTACTGGCGCGCACCTGCGATCCAACCGATCGTGGGACTATTATTATTTTTGGCGATG
GCGCGGGCGCTGCGGTGCTGGCTGCCTCTGAAGAGCCGGAATCATTTCCACCCATCTGCATGCCGAC
GGTAGTTATGGTGAATTGCTGACGCTGCCAAACGCCGACCGCGTGAATCCAGAGAATTCAATTCATCT
GACGATGGCGGGCAACGAAGTCTTCAAGGTTGCGGTAACGGAAGTGGCGCACATCGTTGATGAGACGC
TGGCGGCGAATAATCTTGACCGTTCTCAACTGGACTGGCTGGTTCCGCATCAGGCTAACCTGCGTATT
ATCAGTGCAACGGCGAAAAAACTCGGTATGTCTATGGATAATGTCGTGGTGACGCTGGATCGCCACGG
TAATACCTCTGCGGCCTCTGTCCCGTGCGCGCTGGATGAAGCTGTACGCGACGGGCGCATTAAGCCGG
GGCAGTTGGTTCTGCTTGAAGCCTTTGGCGGTGGATTACCTGGGGCTCCGCGCTGGTTTCGTTTCTAG

```

**figure 4-3.** *fabH* アンチセンス RNA (*asfabH*) の配列 *asfabH* の配列を黄色でハイライトした。*fabH* の coding region を青字で示す。灰色は上流遺伝子の coding region、下線は rbs を示す。

CATTGATTACATCAACGGCCACCAGGCGTAAGTGAACATCTCCAGGCGGTCGTTTCGACCGCCTGAGTT  
 TTATCTTTTTGTCCCACTAGAAATCATTTTTTCCCTCCCTGGAGGACAAACGTGTCTAAGCGTCGTGTA  
 GTTGTGACCGGACTGGGCATGTTGTCTCCTGTGCGCAATACCGTAGAGTCTACCTGGAAAGCTCTGCT  
 TGCCGGTCAGAGTGGCATCAGCCTAATCGACCATTTCGATACTAGCGCCTATGCAACGAAATTTGCTG  
 GCTTAGTAAAGGATTTTAACTGTGAGGACATTATCTCGCGCAAAGAACAGCGCAAGATGGATGCCTTC  
 ATTCAATATGGAATTGTGCTGGCGTTCAGGCCATGCAGGATTCTGGCCTTGAAATAACGGAAGAGAA  
 CGCAACCCGCATTGGTGCCGCAATTGGCTCCGGGATTGGCGGCCTCGGACTGATCGAAGAAAACCACA  
 CATCTCTGATGAACGGTGGTCCACGTAAGATCAGCCCATTTCTTCGTTCCGTCAACGATTGTGAACATG  
 GTGGCAGGTCATCTGACTATCATGTATGGCCTGCGTGGCCCGAGCATCTCTATCGCGACTGCCTGTAC  
 TTCCGGCGTGCACAACATTGGCCATGCTGCGCGTATTATCGCGTATGGCGATGCTGACGTGATGGTTG  
 CAGGTGGCGCAGAGAAAGCCAGTACGCCGCTGGGCGTTGGTGGTTTTGGCGCGGCACGTGCATTATCT  
 ACCCGCAATGATAACCCGCAAGCGGCGAGCCGCCCGTGGGATAAAGAGCGTGATGGTTTCGTACTGGG  
 CGATGGTGCCGGTATGCTGGTACTTGAAGAGTACGAACACGCGAAAAACCGGTCGCAAAATTTACG  
 CTGAACCTCGTCGGCTTTGGTATGAGCAGCGATGCTTATCATATGACGTCACCGCCAGAAAATGGCGCA  
 GGCGCAGCTCTGGCGATGGCAAATGCTCTGCGTGATGCAGGCATTGAAGCGAGTCAGATTGGCTACGT  
 TAACGCGCACGGTACTTCTACGCCGGCTGGCGATAAAGCTGAAGCGCAGGCGGTGAAAACCATCTTCG  
 GTGAAGCTGCAAGCCGTGTGTTGGTAAGCTCCACGAAATCTATGACCGGTCACCTGTTAGGTGCGGCG  
 GGTGCAGTAGAATCTATCTACTCCATCCTGGCGCTGCGCGATCAGGCTGTTCCGCCAACCATCAACCT  
 GGATAACCCGGATGAAGGTTGCGATCTGGATTTTCGTACCGCACGAAGCGCGTCAGGTTAGCGGAATGG  
 AATACTCTGTGTAACCTCCTTCGGCTTCGGTGGCACTAATGGTTCTTTGATCTTTAAAAAGATCTAA

**figure 4-4. *fabF* アンチセンス RNA (*asfabF*) の配列** *asfabF* の配列を黄色でハイライトした。*fabF* の coding region を橙字で示す。灰色は上流遺伝子の coding region、下線は rbs を示す。

GGCGGTGGCTCGATCTTAGCGATGTGTGTAAGGCTGCGCAAATTTCTCTATTAAATGGCTGATCGGAC  
 TTGTTTCGGCGTACAAGTGTACGCTATTGTGCATTTCGAAACTTACTCTATGTGCGACTTACAGAGGTAT  
 TGAATGAAACGTGCACTGATTACTGGCCTGGGCATTGTTTCCAATCATCGGTAATAACCAGCAGGAAGT  
 CCTGGCATCTCTGCGTGAAGGACGTTTACGGGATCACTTTCTCTCAGGAGCTGAAGGATTCGGGCATGC  
 GTAGCCACGTCTGGGGCAACGTAAAACCTGGATACCACTGGCCTCATTGACCGCAAAGTTGTGCGCTTT  
 ATGAGCGACGCATCCATTTATGCATTCCCTTTCTATGGAGCAGGCAATCGCTGATGCGGGCCTCTCTCC  
 GGAAGCTTACCAGAATAAACCGCGCGTTGGCCTGATTGCAGGTTCCGGCGGCGGCTCCCCGCGTTTCC  
 AGGTGTTTCGGCGCTGACGCAATGCGCGGCCCGCGCGCCTGAAAGCGGTTGGCCCGTATGTGGTCACC  
 AAAGCGATGGCATCCGGCGTTTCTGCCTGCCTCGCCACCCCGTTTAAATTCATGGCGTTAACTACTC  
 CATCAGCTCCGCGTGTGCGACTTCCGCACACTGTATCGGTAACGCAGTAGAGCAGATCCAACCTGGGCA  
 AACAGGACATCGTGTGTTGCTGGCGGCGGCGAAGAGCTGTGCTGGGAAATGGCTTGCGAATTCGACGCA  
 ATGGGTGCGCTGTCTACTAAATACAACGACACCCCGGAAAAAGCCTCCCGTACTTACGACGCTCACCG  
 TGACGGTTTTCGTTATCGCTGGCGGCGGCGGTATGGTAGTGGTTGAAGAGCTGGAACACGCGCTGGCGC  
 GTGGTGCTCACATCTATGCTGAAATCGTTGGCTACGGCGCAACCTCTGATGGTGACAGACATGGTTGCT  
 CCGTCTGGCGAAGGCGCAGTACGCTGCATGAAGATGGCGATGCATGGCGTTGATACCCCAATCGATTA  
 CCTGAACTCCCACGGTACTTCGACTCCGGTTGGCGACGTGAAAGAGCTGGCAGCTATCCGTGAAGTGT  
 TCGGCGATAAAGAGCCCGGCGATTTCTGCAACCAAAGCCATGACCGGTCACCTCTCTGGGCGCTGCTGGC  
 GTACAGGAAGCTATCTACTCTCTGCTGATGCTGGAACACGGCTTTATCGCCCCGAGCATCAACATTGA  
 AGAGCTGGACGAGCAGGCTGCGGGTCTGAACATCGTGACCGAAACGACCGATCGCGAACTGACCACCG  
 TTATGTCTAACAGCTTCGGCTTCGGCGGCACCAACGCCACGCTGGTAATGCGCAAGCTGAAAGATTAA

**figure 4-5. *fabB* アンチセンス RNA (*asfabB*) の配列** *asfabB* の配列を黄色でハイライトした。*fabB* の coding region を緑字で示す。下線は rbs を示す

#### 4.3 大腸菌における脂肪酸合成酵素のアンチセンス RNA の発現

大腸菌 *E. coli* BL21/pQE2-*rppArbsmomA* 株に構築したアンチセンス RNA 発現用プラスミドを導入した。これらの菌株を用いて、脂肪酸合成酵素遺伝子 (*fabB*、*fabF*、*fabH*) のノックダウン実験を行った。

本培養開始後 12 時間後の培養上清から抽出した flaviolin 量を figure 4-6 に示す。いずれのアンチセンス RNA 発現用ベクターを使用した場合も、空ベクターのみを導入したサンプルと比べて、flaviolin 生産量が増加する傾向が見られた。しかし、その増加量は cerulenin による脂肪酸合成阻害実験と比べ低かった。最も良好な結果が得られたのは、pHN1257-FabF を形質転換した組換え体であり、空ベクター導入株に比べて約 1.4 倍、88  $\mu\text{g/ml}$  の flaviolin 生産量となった。

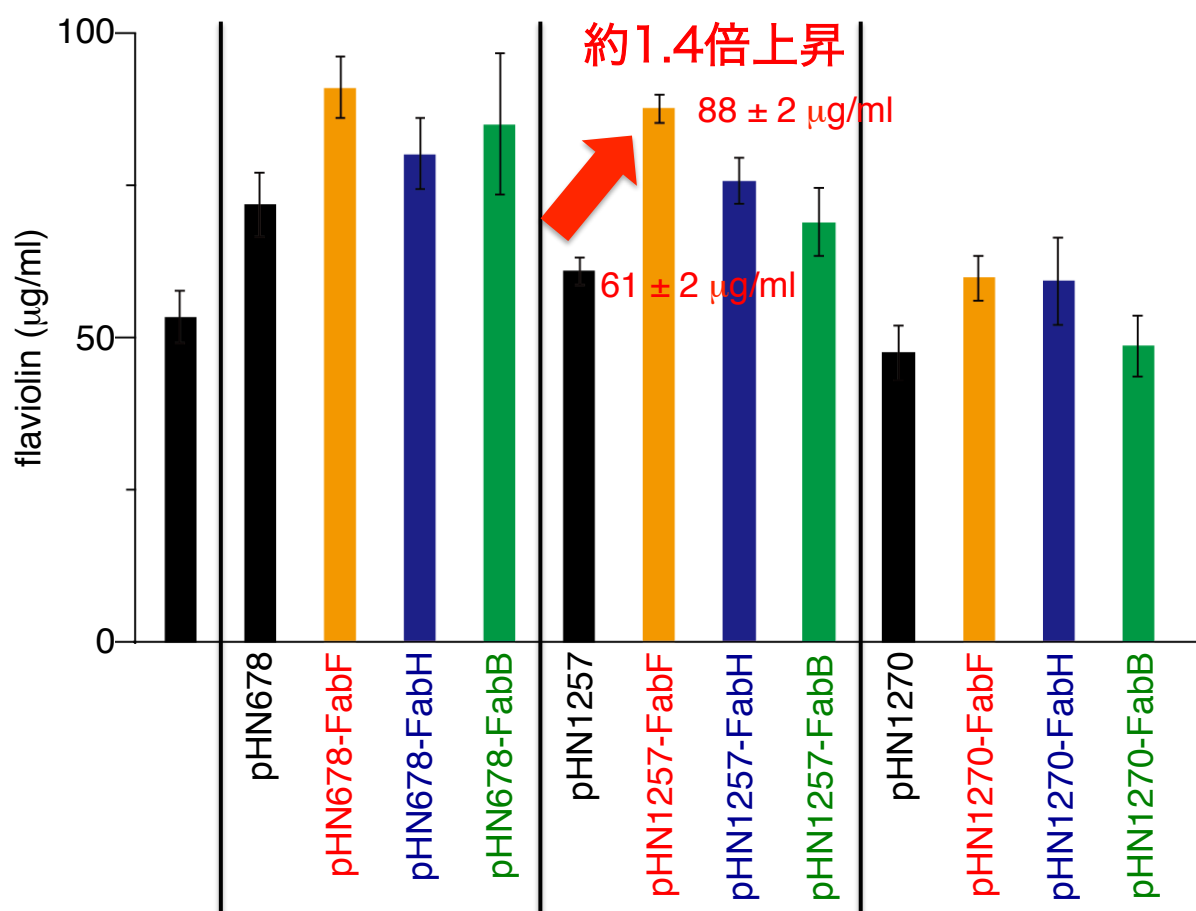


figure 4-6. *E. coli* BL21/pQE2-*rppArbsmomA* 株を用いたアンチセンス RNA による FAS のノックダウン実験における本培養 12 時間後の flaviolin 生産量 pHN1257-FabF を用いた時に最も良好な結果が得られ、ネガティブコントロールに比べて約 1.4 倍の flaviolin 生産量となった。

## 5. 脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株の作製

### 5.1 $\Delta fabB$ 株、 $\Delta fabH$ 株の取得

脂肪酸はリン脂質として生体膜の構成成分であり、 $\beta$ 酸化によるエネルギー源として重要である。そのため、多くの微生物において脂肪酸合成酵素遺伝子は必須遺伝子であり、脂肪酸合成酵素遺伝子の破壊株は栄養要求性株となる。一方、脂肪酸は安価であり、培地に添加することで脂肪酸要求性株であっても生育させることができる。

大腸菌 *E. coli* BL21 株の脂肪酸合成酵素遺伝子 *fabB*、*fabH* の破壊株の作製スキームを以下に示す。目的遺伝子領域を薬剤耐性マーカー、カナマイシン耐性遺伝子 (*aphII*) で置換する方法により遺伝子を破壊することにした。*aphII* 配列は、*loxP* 配列<sup>31)</sup>で囲むことにより、組換え後、Cre リコンビナーゼ<sup>31)</sup>により *aphII* 配列を除去できるように設計した (figure 5-1)。

遺伝子破壊用 DNA を構築するために、*loxP* 配列に挟まれたカナマイシン耐性遺伝子 (*lox71-aphII-lox66*) を標的遺伝子上流 2 kbp および下流 2 kbp で挟んだ DNA 断片をクローニングした (figure 5-1、作製したコンストラクト)。クローニングは GENEART® Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen 社) を用いて行った。標的遺伝子上流および下流配列は BL21 株のクロモソームを鋳型にし、*lox71-aphII-lox66* は pKU490 を鋳型にし、PCR 法により増幅した。以上により、 $\Delta fabB$  Km<sup>r</sup> 株作製のコンストラクト (figure 5-2) および  $\Delta fabH$  Km<sup>r</sup> 株作製のコンストラクト (figure 5-3) を作製し、pUC19- $\Delta fabB$  および pUC19- $\Delta fabH$  を得た。



**figure 5-1.** *fabB*、*fabH* のノックアウトのスキーム 遺伝子破壊株が in-frame 破壊株になるよう、作製したコンストラクトに標的遺伝子の ATG コドン、TGA コドンおよびそのすぐ上流 20 bp を組み込んだ (B)。遺伝子破壊株は、19 mer のペプチドを生産するよう設計されており (C)、下流遺伝子に対する極性効果がない。

AGCCGCAACATAAAGAGATCGTCAAAAACCGGCGCGCTTACCGCCTCATCTTTCTGCTCCGCCAACGACGCATATTCACGAGTGTGCCTCA  
 TAATCGGGAACATTGCTTACCATTGGCAGATGATCGCGGGTGGCACAACGCACACCGCAGCGCGCTCTTTTATCAGTGACATCAACCTCTTTTG  
 CCCACTGTGCTGCGGGAACAATCAATCAACCGTGGCGATTCTGCTGCTGATCGTCTCACTGTACGCGGTATCTTCGCTGCGCGGATGATA  
 ACTGGCAACCAATACAATGATGTTGATTGCGCGGATTTTGTGGCGTGAGATAACCGTCATAGCACAGCACCTGCTTCAGCTCTGCCAGTTCCGGC  
 GTTGTGCGAATATAGCTGACCTGCCCGGCAACGGAATACACCGGGAGAGTGCAGCTTGTGGTGAAACGGGCGATTGATGCCCGTTGCGCGATA  
 CCACTACGCTGTGTGTTGCTTGCTGATCTCCTGCAAAATTCAACAACCAACAGTCATCCTTACGGGAAAAATTTCTGTAAGTATGATAATA  
 AATCTGCAAAACCTGCTGTTGCGCCAGTTCCAGCACATTACGGGTGAGTTCTGCTGGGCACAGCCAACACCTTGGCGATAAGTAATGCCGCTG  
 CAATTTGTGCAACGCCCGTAATTTGTTCAACCGCATTTGCTCAACGGGTACAGCCAGTTCTGCGGGTAAATCCATTGACAAACATCTGTGCGA  
 TTTTATGCTGGCTTTTCTCATCCAGCCTAACTGCGTGACGCCGACAGTCATGATCAAAATTTAACGGGTAATTTGGTGTAAAAACCGACGAGC  
 AAAAGTAAACGCATTAGAGAAAAAGCGGTTTAGCGCCTCATCGTGTGTTGCTTAATAACGGATACAACGCCCCCTGGCGATTGCGGGAAGCACCC  
 AGCGCGGGGGCTTTCATCCGCGCAATAAAGCGTTACCTGCCAGCGCGCGTAATAGCGCCAGCGACAACAACCGCGTGGCAATACCACCGCGCA  
 TAATCGCGCTTCCCGTTTGTGCTGCGCGGTAAACACGGCGCGGAGCAGGGGAGCGGTAATGTCTGTTCATCACCCGCAAGCAT  
 TTCCCGTTTTCGCGCCAAAGCCCTTACGTTTGTGATCGTGATCCGGCGTCTGCAAAACCGCGCGGACAAAACCGCGAGAGCTAAATGTGCGC  
 AGCGTGCCGCGCGGACGCGCAACCTTGCCATGGCGTTAAACAGATTTTGCCTCCACATATCCGGGTTTTTCGCTGGCGCAAGCCGTCCAGAA  
 ACCAGGATCTACTTTTTGATTAGCGAATCGTCCAGTTGGCTGGTCAGTTCTGTTAATATCGCCAAACATAAATCCAGCGTCACGCGGCTGCG  
 ATCGCAATAAAGAGACGGAACCGGGCAAGGGCATTTGGCGATGCGCCTGAAGTGTGCTTCTGCCACGGAGAGTTCGCGGCTTGGTGTGATG  
 GCTAAGGCTAAATCCGACGCGGTGAGGGGAAATTTCTCAAACTAATGAAATGTAAGCGTTGTAATTGCGCTTGGCGATGCGCTTCGCGAACT  
 GATCAATGCCTGCCATAGCGTCAGGAAGTTAATCCGGTGCCGAAGCGCTCTCTGCTACCACAACAGAGGATGTGGATGCTCAGGAAGCG  
 TACCTCTAATTTGGTGTGCTCCAGAAAAACATAACGCGTCTCTTCCAGCCGTTATCGTTGGAAAAATAGACATCGTCAAAATCTCGGGAACA  
 GGTGTACCCCTCAGCATTAATTCGAGGTGGCAGGTGTATGGAGTAGTGTTCACGTAAGTTACTCGTCTTACAGCGGTGGCTCGATCTTAG  
 CGATGTGTGAAGCTGCGCAATTTCTCTATTAAATGGCTGATCGGACTTGTTCGGCGTACAAGTGTACGCTATTGTGCTTTCGAACTTACT  
 CTATGTGCGACTTACAGAGTATTGAATGACCGTtccgtatagcatatcatataggaagttatGAGCTCATTTAAATCCGTTGGATACACCAAG  
 GAAAGTCTACACGAACCTTTGGCAAAATCCTGTATATCGTGCGCAAAAGGATGGATATACCGAAAAATCGCTATAATGACCCCGAAGCAGGG  
 TTATGCGAGCGGAAATGCAGCTCACGGTAAGTGTGCGGTTTTCAGTACCAGCGTACAGCTTCACGCTGCCGCAAGCACTCAGGGCGCAAGG  
 GCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAAAACGGTGTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGA  
 AAACGCAAGCGCAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACGCAAGCGAACCAGAA  
 TTGCCAGCTGGGCGCCCTCTGTTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGGCGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGAT  
 CAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGACGCGAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCT  
 ATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGGTTCGGCTGTGACGCGAGGGGCGCCGCTTCTTTTGTCAAG  
 ACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGCGGCTTCTTGCAGCTGTGCTCG  
 ACGTTGTCTACTGAAGCGGGAGGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCAGGGGCGAGGATCTCTGTCTCTCACCTGTCTCTGCCGAGAAAGT  
 ATCCATCATGGCTGATGCAATGCGCGGCTGCATACGCTTGTATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCA  
 CGTACTCGGATGGAAGCCGCTTGTGCTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTTCGCCAGGCTCAAGG  
 CGCGATGCCCGACGGCGCATCTCGTGTGACCATGGCGATGCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAATGGCCGCTTTCTTGGATTCTAT  
 CGACTGTGGCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGCAATGGGCTGAC  
 CGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGCGGGACTCTGGG  
 GTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGGAGATTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTT  
 TTCCGGGACGCCGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCAACCCCGGTAGGATGCCGCTCGCCAGTCTGATT  
 GGTGAGCTCATGAAGATTTAAATACCGGTataacttcgtatagcatatcatataggaagttatGAGCTCATTTAAATCCGTTGGATACACCAAG  
 TAGGTGCGGTAAGGCGCGCAGCGTCGCATCCGACGTTACGCGCCAATGCGGCCTCCGGCACTAACACAAAAGGGAACCCGATGGTTCCCTTTT  
 TCACATCATTGACAATCGCCGCTGTTCCAGGCAAACTTCCGCTTGTGCTGATTTCTTCTGAAAAGACGTACGCGTTAAATCCTGCCAACGCA  
 CTGTAACCTGAAACAGAGAGATGAGACGGGATACTCTCGCTTGGCTGCTGCTGAGTAAATGCATGACTGCTGTAAGCCAAACCGAAA  
 CACGATCTTCTGCCAATTTTTCGCTCTTCCGCATCGCTTTTTCGCGTTTTCTCACCTACATGACTGTAGGGCTGCCGTTGCCGTTATCCCGCT  
 GTTTGTTTCATCATGATCTGGGCTATGGCAATACCATGGTTCGGGATTCGCGTGGGATTCAGTTTCTGGCTACGGTGTGACGCGTGGCTATGCC  
 GGGCGATGGCGGATCAATATGGCGCAAAACGTTTCGGCGCTTCAGGGGATTTAGCTTGTGGTCTGGCTGGCGGCGGCTTGTGCTGGCGCGGA  
 TTTTGCCTGTCTCCGCAACGTTCAAAATTTGCCCTGTGGTTCATGGGCGGTTGATTCTTGGCTTTGGTGAAGGCAAGCTTACTGACAGGCGCTCT  
 GACCTGGGGTTAGGCATCGTAGGGCAAAACACTCTGGCAAAAGTGTGTCATGGAATGGAATGGCGATTACGGTGCCCTCGCTGTTGGTGTCT  
 CCGCTTGGCTGTTGATTATAGCCATTACGGTTTTTGGCGACTGGCGATACCACAATGGTATTACCTTACTGGCGTGGGCTGTAAACGGCA  
 CAGTGCAGAAAGTACCGGCCCTGGCGGGAACGTCATCGCTGTGGAGCGTTGTGGGCTTATCTGAAACAGGGTTAGTCTGGCACTACA  
 AGCGGTTGGTTTTGCTGTTATCGGGACTTTTCGTTTCGCTCTACTTTGCCAGCAAAGGATGGGCGATGGCGGGCTTTACTCTTACCGCGTTTGGC  
 GCGCATTTTGTGCTGATGCGCGTCTATGTTGGCTGGATGCCGACCGTTTTGGCGGCGTGAAGTGGCGATTGTCTCTGCTTGTAGAAACGG  
 TGGGCTTGTGCTGCTCTGGCAAGCCCAAGTGATGGGTGCGATGAGCGGCGCGCGGTTAACCGGAGCCGATGTTCCGTTATGCTTTCTTCG  
 GCTGGGCGTGGAGGTGGTTAAACGCGTCCCTCACAAGTTTCGCGGACCGCACTGGGCGGTTACGCGCGGTTTACGATATCGCCCTCGGCGTC  
 TCCGGGCGCTGGCGGGAATGCTGGCGACACGTTTGGTTACTCTTCGTTATTTCTTGGCGGCGATCTGCGGCTGCTGGGTATTATTGTCA  
 CGATACTGTCTATTCGTCGGGTTAACGAACAGCCAGACAGCATCAGGATAATCGCGACTAACAGTATCCACAGCGCGGACGCGTTGCCAT  
 ATTTTGAACGTGTCCATCATCGGTGGAAGGATTAAGCAGCGGTTGCATAACACGCGGATCAATCCCTTTAACCCGCGGTTGATAAAGCTGA  
 TTAAGAATATCTCGGCTGGGCGAAGAAAGCGATGATTGCGCAGAAAGACCATATTTTGTGCTGATATATGCCGATAACGCCGCCAGTTTAC  
 TGGCATCTAAAGGTTGTTTTAGCGTCATCTGTAGTATCCAGCGTGGCGGTATTTTGTGCTTACGCTGACGCGCCTGTAGCCAGGTAC  
 CAGATGGTTAAACAGTTTCGCTGGAATTAACCTCGCCATCTTTACCCCGGAAAGTTCAGCATCGATTGCCAGATCTGTTTGTGGGTTCCCCC  
 GTTGGCGCGCAAGTTTGGTACCAGCTGTTTAGCGCATGTGCTCCGCGGTAATAAAGGACGGTCGGTGCCTCGCGCTGCTGTGGTTGCG  
 GAATAACCATCTTCCCTTC

**figure 5-2. Δ*fabB* Km<sup>r</sup>株作製のコンストラクトの配列** 赤字は *aphII* 遺伝子配列、緑字は *fabB* の部分配列（start、stop codon は太字）、下線は PCR に用いた相同領域を示す。lox71 および lox66 の配列を黄色でハイライトした。

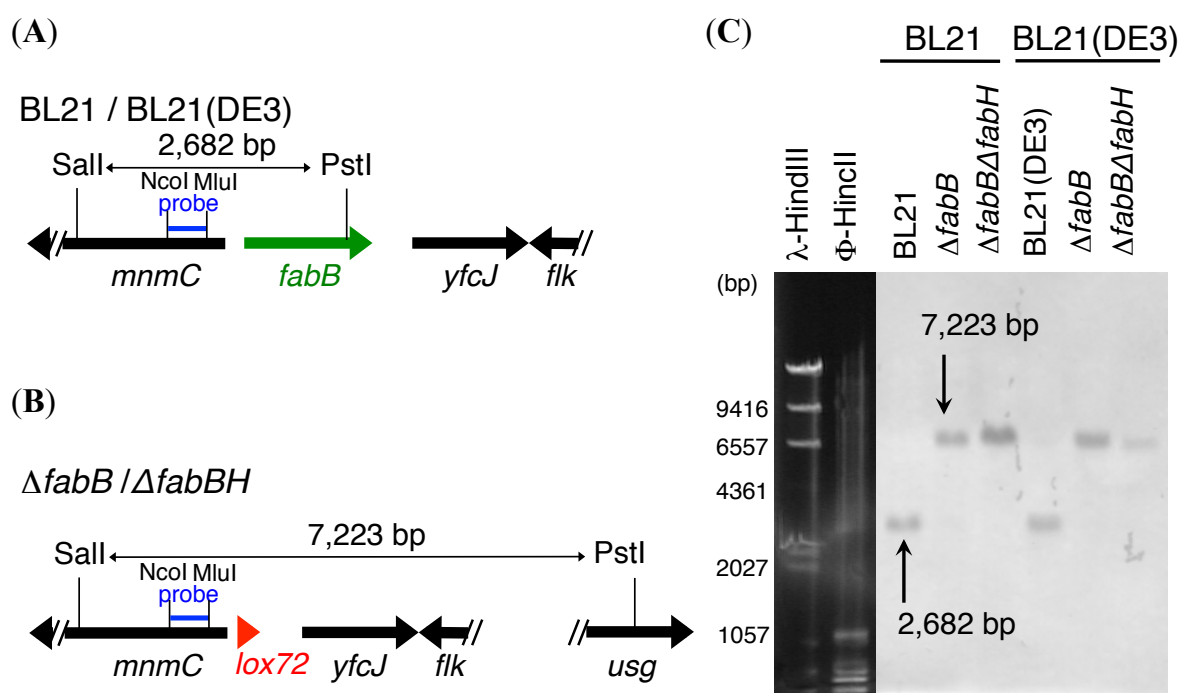


ACTCTATGACGTTACAAAGTTAATATGCGCGCCCTATGCAAAAGGTAAAATTACCCCTGACTCTCGATCCGGTTCGTACGGCTCAAAAACGCCT  
 TGATTACCAGGGTATCTATACCCCTGATCAGGTTGAGCGCCTCGCCGAATCCGTAGTCAGTGTGGACAGTGATGTGAATGCTCCATGTCGTTT  
 GCTATCGATAACCAACGCTCTCGCAGTGTTAAACGGCGATGCGAAGGTGACGGTAACGCTCGAGTGTGACGGTTGCGGGAAGCCGTTTACTCATC  
 AGGTGATACACAACGATGTTGTTTATGTCCTGTCGTTTACAGCAACAGGCTGAAGCACTGCCGGAAGCGTATGAACCGATTGAG**GTTAAAC**GAATT  
 CGGTGAAATCGATCTGTTTGAATGGTTGAAGATGAAATCATCTCGCCTTGCCCGTAGTTCCGGTGCATGATTCTGCAACACTGTGAAGATGTCC  
 GAAGCGGACATGGTCTTTGGTGAACGCTGAAGAAGCGCAAAAGCCAAACCCATTTGCCGTATTAGCCAGCTTAAAGCGTAAGTAATTGGTGC  
 TCCCCGTTGGATCGGGGATAAACCGTAATTGAGGAGTAAGTCCATGGCCGTACAACAGAATAAACCAACCCGTTCCAAACGTGGCATGCGTCG  
 TTCCCATGACGCGCTGACCCAGTACCAGCCTGTCTGTAGACAAACCTTGGTGAAAAACACCTGCGTCACCACATCACTGCCGACGGTTAC  
 TACCGCGCCGCAAGGTATCGCTAAGTAATCACGCGTCTGCGTGATG**AGCTT**AGTGAGGATTTTCCCCAGGCAACTGGGGAAAGACCAAAACC  
 GGGCGCGACGATACCTTGACACGTCTAACCCCTGGCGTTAGATGTCATGGGAGGGGATTTTGGCCCTTCCGTGACAGTGCCGTCAGCATTTGCAG  
 GCACTGAATTTCTAATTCGCAACTCACTCTTCTTTTAGTCGGCAATCCCGACGCCATCACGCCATTACTTGCTAAAGCTGACTTTGAACAACGTT  
 CGCGTCTGCAGATTATCTGCGCAGTCAGTTATCGCCAGTGATGCCCGCCTTCGCAAGCTATCCGCGCCAGTCGTGGGAGTTCAATGCGCGT  
 GGCCCTGGAGCTGGTGAAAGAGGTGAGCGCAAGCCTGTGTGAGTCCGCTAATACCGGGGCACTGATGGGGCTGGCAAAATTATTTACTCAAG  
 CCCCTGGAGGGGATTGAGCGTCCGGCGCTGGTGACGGTATTACCACATCAGCAAAAGGGGCAAAACGGTGGTCTTGACTTAGGGGCCAACGTCG  
 ATTGTGACAGTACAATGTTGGTGCAATTTGCCATTATGGGCTCAGTTCTGGCTGAAGAGGTGGTGAAATTTCCCAATCTCGCGTGGCGTTGCT  
 CAAGATCTGTATCAAGAGACAGGATAAGGATCGATTCGATGATTTGAACAAGATGGATTGACAGCGAGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCT  
 CTTGAAGCCAATGAGTT**GTTAAAC**GGCAAGACAGATGTGTGGTTGTGACGGCTTTACAGGAAATGTCACATTAAGACAGATGGAAGGTGTTG  
 TCAGGATGTTCTTTCTCTGCTGAAATCTCAGGGTGAAGGAAAAACGGTCTGGTGGCTACTGTTATTAAGCGTTGGCTACAAAAGAGCCT  
 GACGAGGCGATTCACTCACCTCAACCCGACCAAGTATAACGGCGCCTGTCTGTTAGGATTGCGCGGCACGGTGATAAAAAGTCATGTTGCAGCC  
 AATCAGCGAGCTTTTGGCGTCCGATTTGAACAGGCAAGTGCAGGCGGTGACGCGACAAGTCTCTCAGCGAATTTGCCGCTCGCCTGGAATCTGTAT  
 ACCAGCTGGTTTTGGCTGCTGGACGGTGGCAAAAGCGGAACCTGCGGTAGCAGGACGCTGCCAGCGAATTCGCAAGTGACGGTA  
 TATAACGAAAAGTGACTGACGCTAC**ATGTACCGTtctgtagcatatcattatagcaagttat****GAGCTCATTTAAATTCGTTGGATACACCAAG**  
**GAAAGCTTACACGAACCTTTGGCAAAATCCTGTATATCGTGCGAATAAGGATGGATATACCGCAAAAAATCGCTATAATGACCCCGAAGCAGGG**  
**TTATGCAGCGGAAAAATGCAGCTCACGGTAACGTATGCGCTATTTCAGTACCAGCGTACAGCTTCACGCTGCCGCAAGCACTCAGGGCGCAAGG**  
**GCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAAGAACGGTGCCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGA**  
**AAACGCAAGCGCAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAA**  
**TTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGGCCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGAT**  
**CAAGATCTGTATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTTGAACAAGATGGATTGACAGCGAGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCT**  
**ATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGGTTCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCGGTTCTTTTTGTCAAG**  
**ACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCG**  
**ACGTGTCTGCTGAAGCGGGGAGGGACTGGCTGCTATTTGGGCGAAGTGCAGGGGCGAGATCTCTGTCTCTCACCTGTCTGCGGAGAAAGT**  
**ATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCA**  
**CGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAATGTTTCGCCAGGCTCAAGG**  
**CGCGCATGCCGACGAGGATCTCGTGTGACCATGGCGATGCTGCTTTCGCCGAATATCATGTTGGAAAAATGGCCGCTTTCTTGAGATTCAAT**  
**CGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGCAATGGGCTGAC**  
**CGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGG**  
**GTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCAGGAGATTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTT**  
**TTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCAACCCCGGTAGGATGCCGCTCGCCAGTCGATT**  
**GGCTGAGCTCATGAAGATTTAAATACCGGT****tataacttctgtagcatatcattatagcaagttat****GAGCTCATTTAAATTCGTTGGATACACCAAG**  
 ATTAACACATGACGCAATTTGCTGTTCCCTGGACAGGGTTCTCAAAACCGTTGGAATGCTGGCTGATGTTGCGGCGAGCTATGCAATTTGT  
 CGAAGAAACGTTTGTG**AGCTT**CTGCGGCGCTGGGCTACGACCTGTGGGCGCTGACCCAGCAGGGGCCAGCTGAAGAACTGAATAAAACCTGG  
 CAAACCCAGCCAGCGCT**CTTGAC**TGCATCTGTTGCGCTGTACCGCTATGGCAGCAGCAGGGCGGTAAAGCACCGGCAATGATGGCCGGTCACA  
 GCCTGGGGGAATATCCGCGCTGGTTGCGCTGGTGTGATTGATTTCGCTGATGCGGTGCGTCTGGTTGAGATGCGCGGCAAGTTTATGCAAGA  
 AGCCGTACCGGAAGGCACGGGCGCTATGGCGGCAATCATCGGTCTGGATGATGCGTCTATTGCGAAAGCGTGTGAAGAAGCTGCAGAAGGTGAG  
 GTCGTTTCTCCGTAACCTTAACTCTCCGGGACAGGTGGTTATTGCCGCTCATAAAGAAGCGGTTGAGCGTGTGGCGCTGCCGTGTAAAGCTG  
 CGGGCGCAAAACGCGCTCTGCCGTTACAGTGAGCGTACCGCTCTCACTGTGCGCTGATGAAACAGCAGCGGCAAACTGGCAGTAAAGTACG  
 GAAAAATCACCTTTAACGCACCAACAGTTCTGTTGTAATAACGTTGATGTGAATGCGAAACCAATGGTGATGCCATCCGTGACGCACTGGTA  
 CGTCAGTTGTATAACCCGGTTCAGTGGACGAAGTCTGTTGAGTACATGGCAGCGCAAGGCGTAGAACATCTCTATGAAGTCGGCCCGGGCAAAAG  
 TGCTTACTGGCCTGACGAAACGCATT**CTCGAC**ACCTGACCGCCTCGCGCTGAACGAACCTTCAGCGATGCGAGCGCGCTCGAGCTTTAAAA  
 GAGGAAAAATCATGAATTTTGAAGGAAAAATCGCACTGGTAACCGGTGCAAGCCGCGGAATTTGGCCGCGCAATTTGCTGAAACGCTCGCAGCCCGT  
 GGGCGGAAAGTTATTGGCACTGCGACCAAGTGAATAAGCGCTCAGGCGATCAGTGATTATTTAGGTGCTAACGGCAAGGCTGATGTTGAATG  
 TGACCGACCCGCGCATCTATCGAATCTGTTCTGGAAAAAATTCGCGCGGAATTTGGTGAAGTGGATATCCTGGTCAATAATGCCGGTATCACTCG  
 TGATAACCTGTTAATGCGAATGAAAGATGAAGAGTGAACGATATTATCGAAACCAACCTTTTCATCTGTTTTCCGCTGTGCAAAAGCGGTAATG  
 CGCGCTATGATGAAAAAGCGTCATGGTCTGATTATCACTATCGGTTCTGTGGTTGGTACCATGGGAAATGGCGGTCAGGCCAACTACGCTGCGG  
 CGAAAGCGGGCTTGATCGGCTTCACTAAATCACTGGCGTGCAGAGTTGCGTACGCGGATTTACTGTAAACGTTGTTGCTCCGGGCTTTATTGA  
 AACGACATGACACGTGCGCTGAGCGATGACCAGCGTGGCGGTATCCTGGCGCAGGTTCTGCGGGTTCGCTCGGCGGCGCACAGGAAATCGCC  
 AACCGGTTGCATTCCTGGCATCCGACGAAGCAGCTTACATCAGGGTGAACTTTGCATGTGAACGGCGGATGTACATGGTCTGACCGCGAT  
 TTGACAAAAATGCTCATGTTGCGCGCAGCTGCGGTGTTAGTAGTAATAATTTAGTGCAAAATGATTGCGTTATTGGGGGGTAAGGCGCTCAAAA  
 TAACGTAAAAATCGTGGTAAGACCTGCCGGGATTTAGTTGCAAAATTTTCAACATTTTATACACTACGAAACCATCGCGAAAGCGAGTTTGTAT  
 AGGAAATTTAAGAGTATGAGCACTATCGAAGAACGCGTTAAGAAAAATTTATCGCGCAACAGCTGGGCGTTAAGCAGGAAGAAGTTACCAACAATG  
 CTTCTTTCTGTTGAAGACCT

figure 5-3. *ΔfabH* Km<sup>r</sup>株作製用のコンストラクトの配列 赤字は *aphII* 遺伝子配列、  
 青字は *fabB* の部分配列（start、stop codon は太字）、下線は PCR に用いた相同領域を  
 示す。lox71 および lox66 の配列を黄色、二本鎖断片処理に用いた HincII サイトを赤、  
 HindIII サイトを青でハイライトした。破壊に用いた断片は HincII-HindIII 断片である。

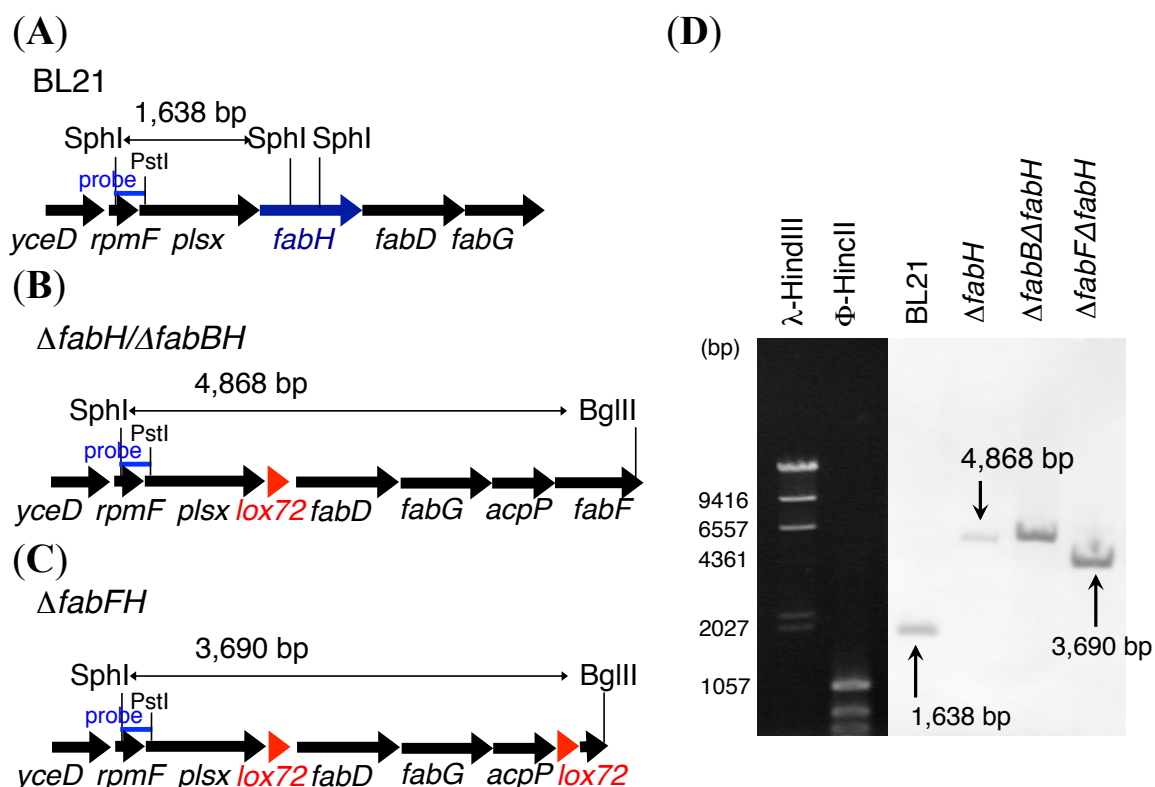
pUC19- $\Delta fabB$  および pUC19- $\Delta fabH$  を制限酵素処理により二本鎖 DNA 断片としたのち、*E. coli* BL21/pKD46 にエレクトロポレーションで導入した。pKD46 は  $\lambda$ Red を発現する温度感受性プラスミドである<sup>32)</sup>。 $\lambda$ Red による染色体上の相同組換えを行う際、破壊の標的となる遺伝子上流および下流の塩基配列と相同性を有する DNA 断片が必要となる。その相同領域の大きさは 36 bp<sup>32)</sup>、800~1000 bp<sup>33)</sup> と様々である。*fabB* の破壊株については、pUC19- $\Delta fabB$  を EcoRI、HindIII で消化し得た上下流 2 kb ずつのコンストラクトを *E. coli* BL21/pKD46 にエレクトロポレーションにて導入することにより  $\Delta fabB$  Km<sup>r</sup> 株をカナマイシン耐性株として取得した。その後、Cre recombinase 発現用プラスミド 705-Cre (GENE BRIDGES 社) を導入した。705-Cre のプロトコールに従い、Cre タンパク質の発現および *loxP* 部位特異的組換えを行った。

そして、*aphII* の脱落による in frame mutant を取得し、サザンハイブリダイゼーションで遺伝子破壊の確認を行った (figure 5-4)。また、同様の操作を大腸菌 *E. coli* BL21(DE3) 株でも行い、 $\Delta fabB$  株を取得した (figure 5-4)。

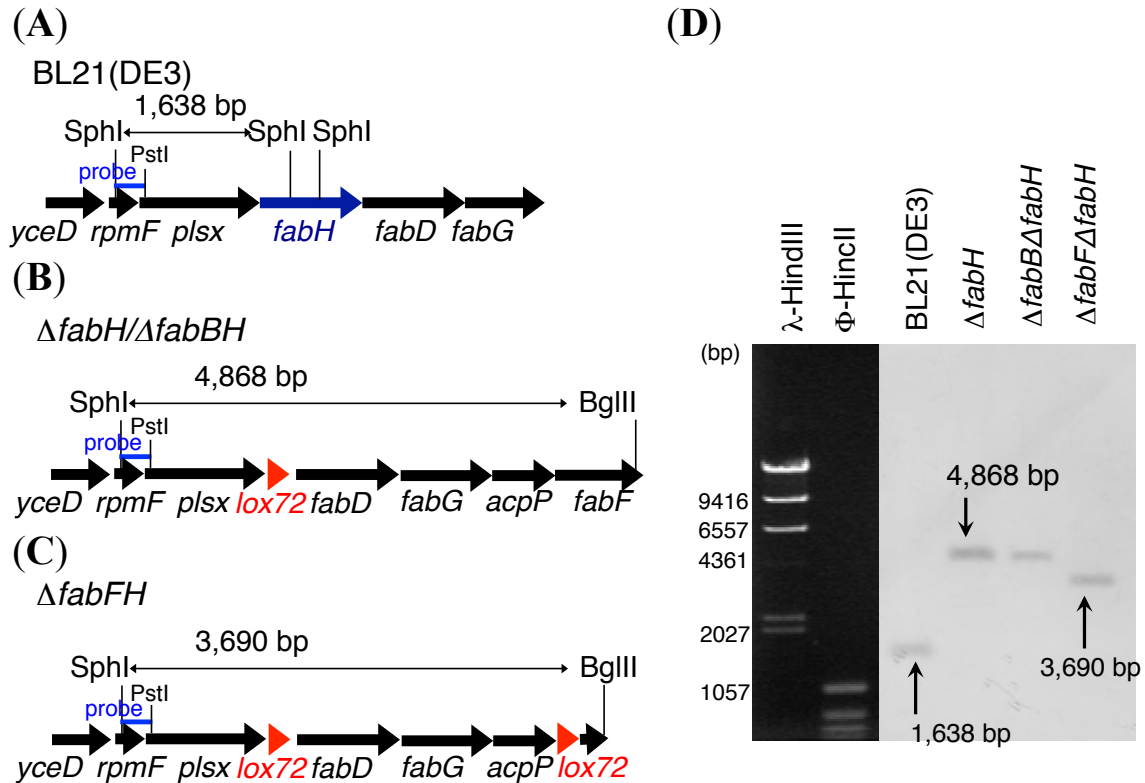


**figure 5-4.  $\Delta fabB$  および  $\Delta fabBH$  株における *fabB* 破壊確認のサザンハイブリダイゼーション** (A) *E. coli* BL21 および BL21(DE3) 株の遺伝子配座。 (B)  $\Delta fabB$  および  $\Delta fabBH$  株の遺伝子配座。 (C) サザンハイブリダイゼーション。クロモソームは制限酵素 *SalI* および *PstI* で消化した。プローブは pUC19- $\Delta fabB$  を *NcoI* および *MluI* で消化して得られた約 470 bp の断片 (図中青) を用いた。BL21 および BL21(DE3) 株は 2,682 bp 付近にバンドが見られるのに対し、 $\Delta fabB$  および  $\Delta fabBH$  株では 7,223 bp 付近にバンドが見られる。

*fabH* の破壊株に関しては、pUC19- $\Delta fabH$  を HincII、HindIII で消化し得た上流約 400 bp、下流約 100 bp を含むコンストラクトを *E. coli* BL21/pKD46 にエレクトロポレーションにて導入することにより  $\Delta fabH$  Km<sup>r</sup> 株をカナマイシン耐性株として取得した。その後、 $\Delta fabB$  株の作製と同様に、705-Cre プラスミドの導入、Cre タンパク質の発現および *loxP* 部位特異的組換えを行い、in frame mutant を取得した。その確認はサザンハイブリダイゼーションで行った (figure 5-5)。また、同様の操作を大腸菌 *E. coli* BL21(DE3) 株でも行い、 $\Delta fabH$  株を取得した (figure 5-6)。



**figure 5-5.** BL21 株における *fabH* 破壊確認のサザンハイブリダイゼーション (A) *E. coli* BL21 株の遺伝子配座。 (B)  $\Delta fabH$  および  $\Delta fabBH$  株の遺伝子配座。 (C)  $\Delta fabFH$  株の遺伝子配座。 (D) サザンハイブリダイゼーション。クロモソームは制限酵素 SphI および BglII で消化した。プローブは pUC19- $\Delta fabH$  を SphI および PstI で消化して得られた約 300 bp の断片 (図中青) を用いた。BL21 株は 1,638 bp 付近にバンドが見られるのに対し、 $\Delta fabH$  および  $\Delta fabBH$  株では 4,868 bp、 $\Delta fabFH$  株では 3,690 bp 付近にバンドが見られる。

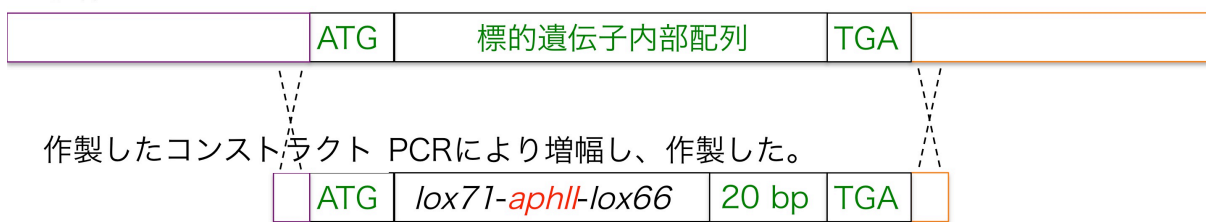


**figure 5-6.** BL21(DE3)株における *fabH* 破壊確認のサザンハイブリダイゼーション (A) *E. coli* BL21 株の遺伝子配座。 (B)  $\Delta fabH$  および  $\Delta fabBH$  株の遺伝子配座。 (C)  $\Delta fabFH$  株の遺伝子配座。 (D) サザンハイブリダイゼーション。クロモソームは制限酵素 *Sph*I および *Bgl*III で消化した。プローブは pUC19- $\Delta fabH$  を *Sph*I および *Pst*I で消化して得られた約 300 bp の断片 (図中青) を用いた。BL21 株は 1,638 bp 付近にバンドが見られるのに対し、 $\Delta fabH$  および  $\Delta fabBH$  株では 4,868 bp、 $\Delta fabFH$  株では 3,690 bp 付近にバンドが見られる。

## 5.2 $\Delta fabF$ 株の取得

$\Delta fabF$   $Km^r$  株作製のコンストラクトは、*fabF* の上流、下流領域 50 bp ずつを PCR プライマーとしての 5' 位に付加することにより、PCR を用い一段階で作製した (figure 5-7、5-8)。これを大腸菌 *E. coli* BL21/pKD46 にエレクトロポレーションにて導入することにより  $\Delta fabF$   $Km^r$  株をカナマイシン耐性株として取得した。その後、*fabB*、*fabH* の破壊と同様に、705-Cre プラスミドの導入、Cre タンパク質の発現および *loxP* 部位特異的組換えを行い、in frame mutant を取得した。*fabF* の破壊確認はサザンハイブリダイゼーションで行った (figure 5-9)。また、同様の操作を大腸菌 *E. coli* BL21(DE3) 株でも行い、 $\Delta fabF$  株を取得した (figure 5-9)。

### A 親株



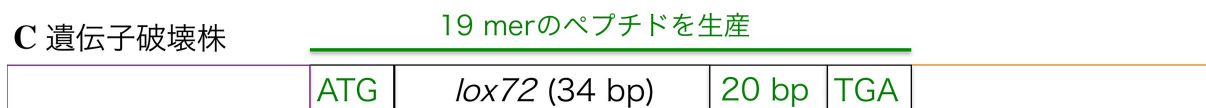
λ Redによる染色体上で相同組換え

### B カナマイシン耐性株



Creを用いたloxP配列の相同組換えによりaphII配列を除去

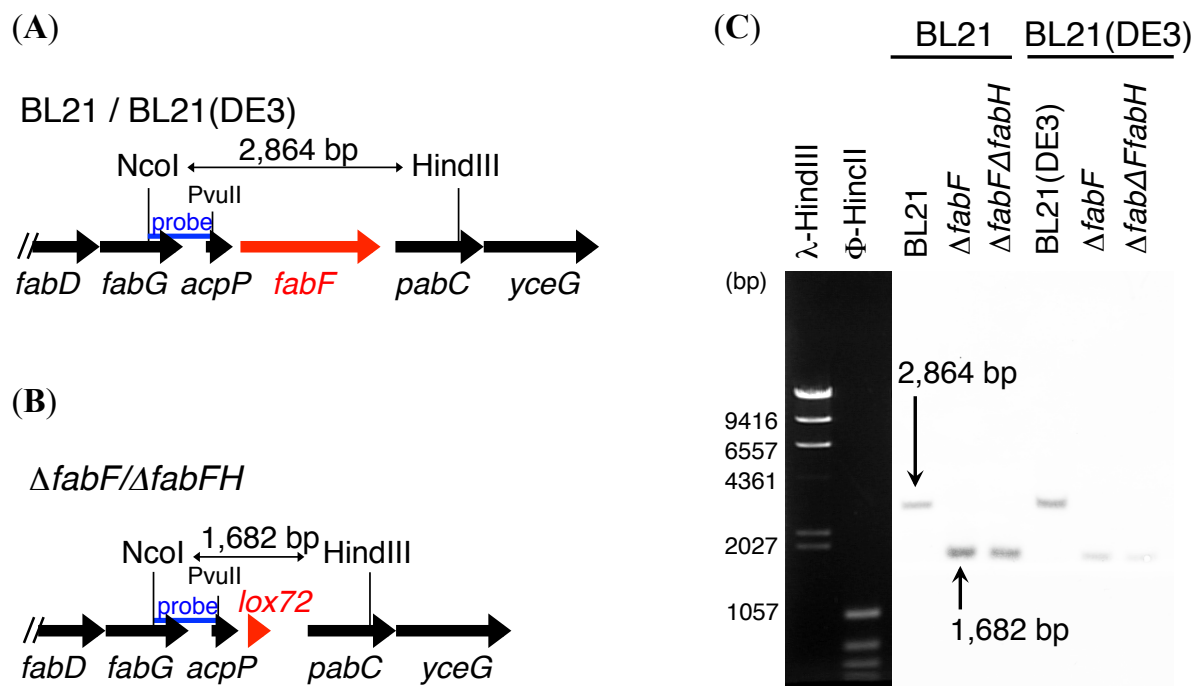
### C 遺伝子破壊株



**figure 5-7.** *fabF* のノックアウトのスキーム 遺伝子破壊株が in-frame 破壊株になるよう、作製したコンストラクトに標的遺伝子の ATG コドン、TGA コドンおよびそのすぐ上流 20 bp を組み込んだ (B)。遺伝子破壊株は、19 mer のペプチドを生産するよう設計されており (C)、下流遺伝子に対する極性効果がない。

```
TCTTTTGTCCCACTAGAAATCATTTTTTCCCTCCCTGGAGGACAAACGTGTACCGTtcgtagcatatacgaagttatGAGCTCATTT
AAATCCGTGGATACACCAAGGAAAGTCTACACGAACCCTTGGCAAAATCCTGTATATCGTGCAGAAAAGGATGGATATACCGAAAAATCGC
TATAATGACCCCGAAGCAGGGTTATGCAGCGGAAATGCAGCTCACGGTAACATGATGCCGTATTGTCAGTACCAGCGTACAGCTTCACGCTGCC
GCAAGCACTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACAGTAAAGGCCAGTCCGCAGAAACGGTGTGACCCCGGATGAATGTCAGCTA
CTGGGCTATCTGGACAAGGGAACGCAAGCGCAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTAA
TGGACAGCAAGCGAACCAGGATGTCAGCTGCGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTCTTGCAGCCAA
GGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCC
GGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGGTGTTCGGCTGTCAGCGCAGGGG
CGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAATGCAGGACGAGGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCG
TTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCACTCA
CCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCG
AAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGGCCAGCCG
AATGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGATGCCGATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGAAAA
TGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG
CTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGT
TCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAA
AGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCCACCCCGGTAG
GATGCCGCTCGCCAGTGCATTGGCTGAGCTCATGAAGATTTAAATACCGGTataaacttcgtagcatatacgaacGGTACTTTGATCT
TTAAAAAGATCTAAGTTGTCATTTCCACCCATATAAAAGG
```

**figure 5-8.** Δ*fabF* Km<sup>r</sup>株作製用のコンストラクトの配列 赤字は *aphII* 遺伝子配列、橙色は *fabF* の部分配列 (start、stop codon は太字)、下線は PCR に用いた相同領域を示す。lox71 および lox66 の配列を黄色でハイライトした。



**figure 5-9.**  $\Delta fabF$  および  $\Delta fabFH$  株における  $fabF$  破壊確認のサザンハイブリダイゼーション (A) *E. coli* BL21 および BL21(DE3) 株の遺伝子配座。(B)  $\Delta fabF$  Km<sup>r</sup> 株の遺伝子配座。(C) サザンハイブリダイゼーション。クロモソームの制限酵素は NcoI および HindIII で消化した。プローブは  $fabF$  の上流領域を NcoI および PvuII で消化して得られた約 500 bp の断片 (図中青) を用いた。BL21 および BL21(DE3) 株は 2,864 bp 付近にバンドが見られるのに対し、 $\Delta fabF$  および  $\Delta fabFH$  株では 1,682 bp 付近にバンドが見られる。

### 5.3 FAS 遺伝子の二重破壊株 $\Delta fabBH$ 株、 $\Delta fabFH$ 株の取得

上述のとおり、私は大腸菌 *E. coli* BL21 および BL21(DE3) における  $fabB$ 、 $fabH$ 、 $fabF$  について単一破壊株を作製した。続いて、FAS 遺伝子の単一破壊株にさらに遺伝子破壊を重ねることで FAS 遺伝子の二重破壊株を作製することにした。 $\Delta fabB$  株に  $fabH$  の破壊を重ねることで  $\Delta fabBH$  株、 $fabF$  の破壊を重ねることで  $\Delta fabBF$  株の作製を試みた。また、 $\Delta fabF$  株に  $fabH$  の破壊を重ねることで  $\Delta fabFH$  株の作製を行った。これらのうち、 $\Delta fabBH$  株、 $\Delta fabFH$  株に関しては取得することに成功した (figure 5-10)。同様の操作を大腸菌 *E. coli* BL21(DE3) 株でも行い、 $\Delta fabBH$  株、 $\Delta fabFH$  株を取得した。しかし、 $\Delta fabBF$  株に関しては取得できなかった。 $\Delta fabBH$  株における  $fabB$  の破壊は figure 5-4、 $fabH$  の破壊は figure 5-5、5-6 に示したとおり、サザンハイブリダイゼーションで確認した。 $\Delta fabFH$  株における  $fabF$  の破壊確認は figure 5-9、 $fabH$  の破壊は figure 5-5、5-6 に示した。 $fabB$  と  $fabF$  の二重破壊は、炭素数 4 以上の脂肪酸を合成する能力を失わせるため、脂肪酸合成が完全に阻害されてしまうために生育が不可能となり、



成功しなかったと推測される。また、詳細は割愛するが、*fabB* 破壊株は全て脂肪酸要求性株であり通常の条件では生育できないが、容易にまた再現性よく revertant が生じる。この *fabB* 破壊株の revertant を  $\Delta fabB^*$  とする。また、 $\Delta fabBH$  株についても、脂肪酸を添加しない通常条件で生育する菌株が取得されたために、 $\Delta fabB^*$  に *fabH* の破壊を行ったと考えられ、 $\Delta fabB^*H$  株が生じたと考えられる。

#### 5.4 FAS 破壊株における脂肪酸量、flaviolin 生産量、細胞内 malonyl-CoA、acetyl-CoA 濃度の測定

当研究室の曾根が *E. coli* BL21 株の FAS 破壊株における脂肪酸量について、GC-MS による分析を行った。その結果、親株と比較して FAS 破壊株の脂肪酸総量は  $\Delta fabB^*$  株以外で減少しており、特に FAS 二重破壊株では顕著な減少が見られた (figure. 5-11、5-12)。また、当研究室の大石が FAS 破壊株における flaviolin の生産試験および、生体内の malonyl-CoA、acetyl-CoA の濃度を測定した。その結果、FAS 破壊株は親株よりも多くの flaviolin を生産し、その前駆体である malonyl-CoA の生体内濃度も上昇していることが判明した。さらに興味深いことに、malonyl-CoA のみならず、その前駆体である acetyl-CoA に関しても生体内濃度が上昇していることが明らかとなった (figure. 5-13 から 5-15)。

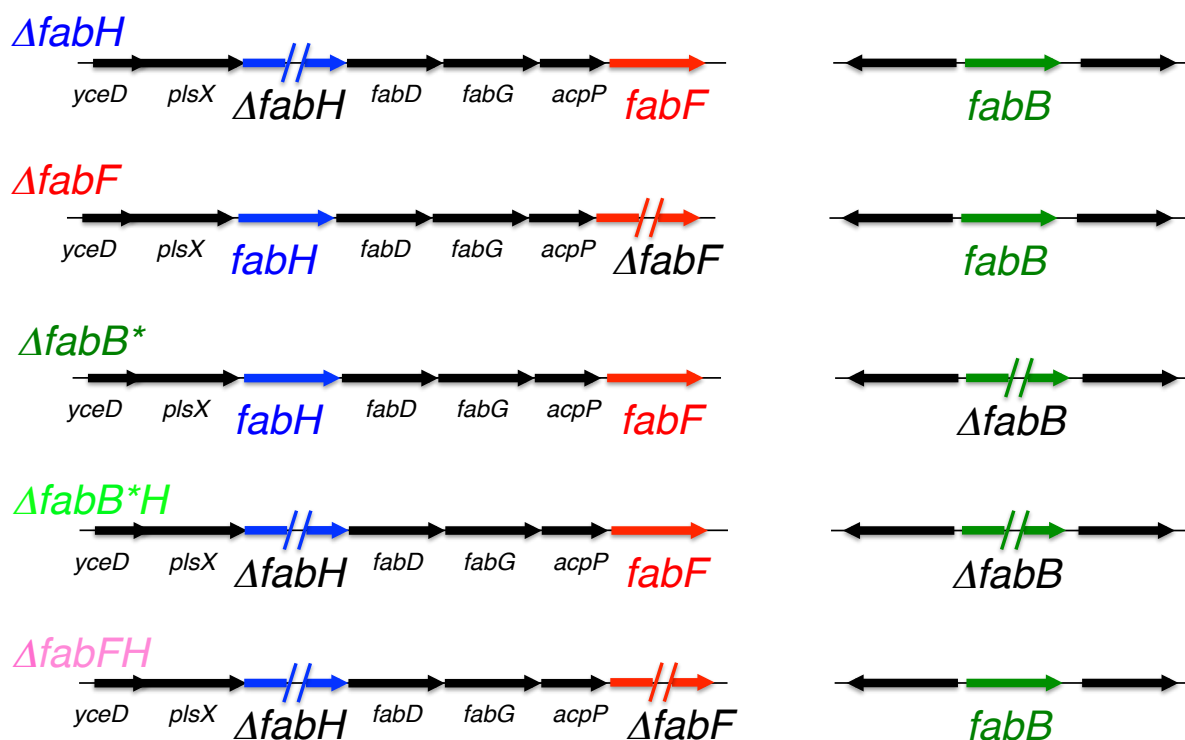
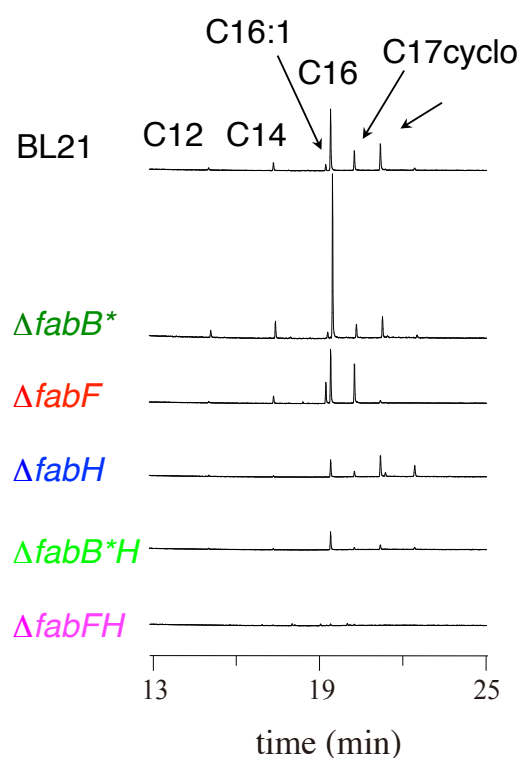
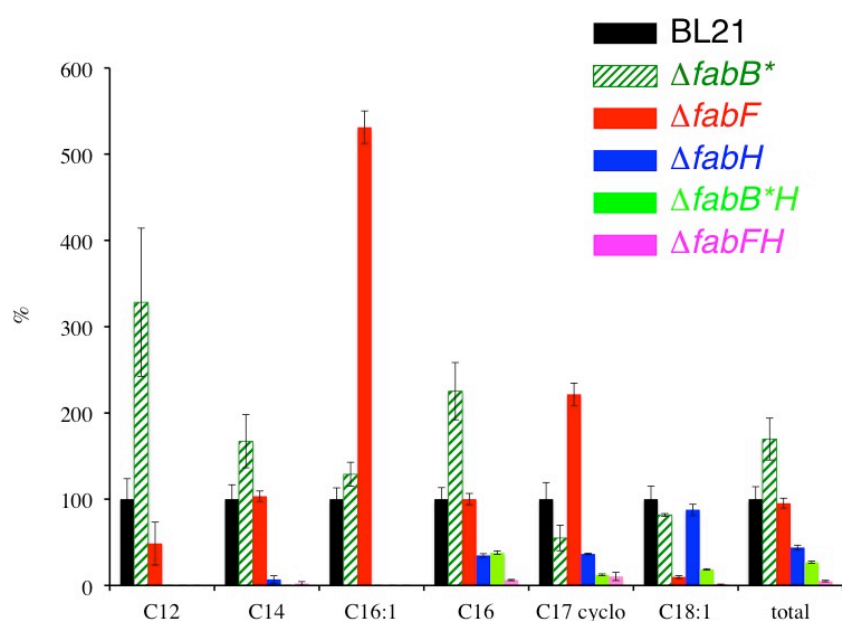


figure 5-10. 本研究で作製した FAS 遺伝子破壊株の遺伝子配座



**figure 5-11.** FAS 破壊株の脂質の GC/MS 分析（出典：曾根祐輔修士論文『芳香族ポリケタイドの新規生合成経路の発掘研究と異種生産』 **figure 2-1**）



**figure 5-12.** FAS 破壊株の脂肪酸の分布（出典：曾根祐輔修士論文『芳香族ポリケタイドの新規生合成経路の発掘研究と異種生産』 **figure 2-2**）



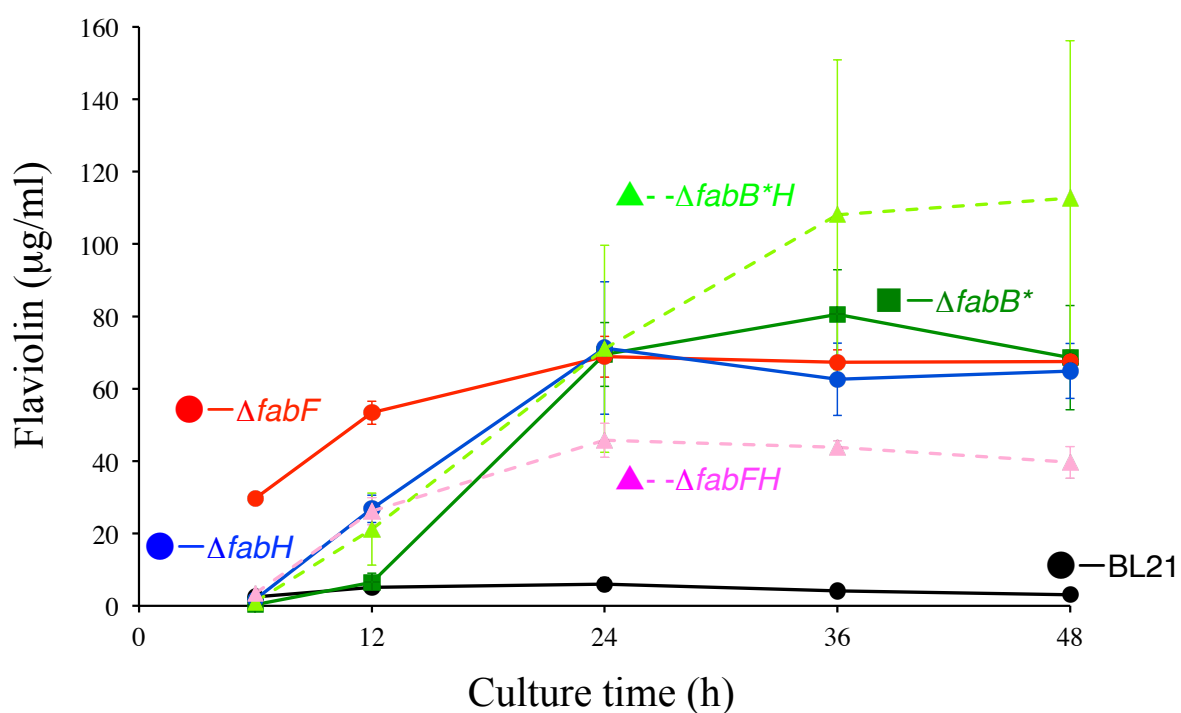


figure 5-13. FAS 破壊株における flaviolin 生産試験の結果 (大石奈穂美修士論文『微生物の脂肪酸合成阻害 有用物質大量生産の基盤の構築』Figure 5-7A を改変)

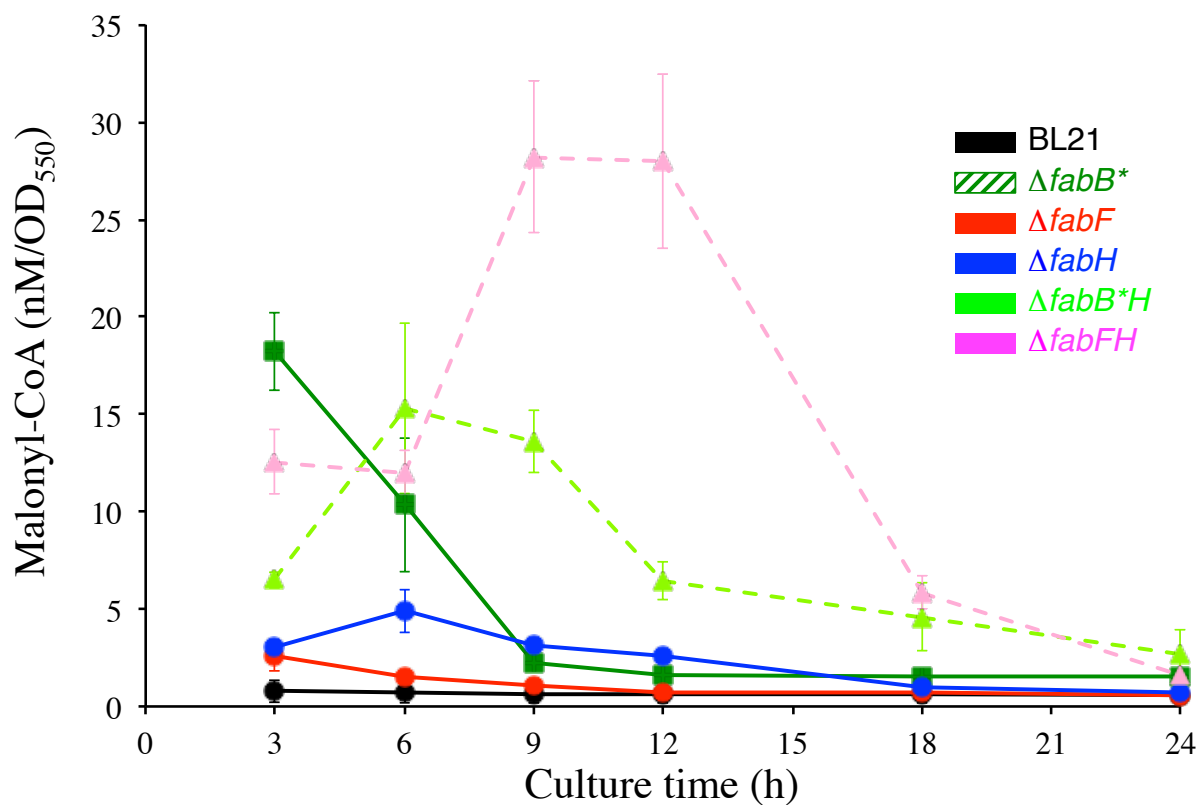


figure 5-14. FAS 破壊株における malonyl-CoA 濃度解析結果 (大石奈穂美修士論文『微生物の脂肪酸合成阻害 有用物質大量生産の基盤の構築』Figure 5-7A を改変)

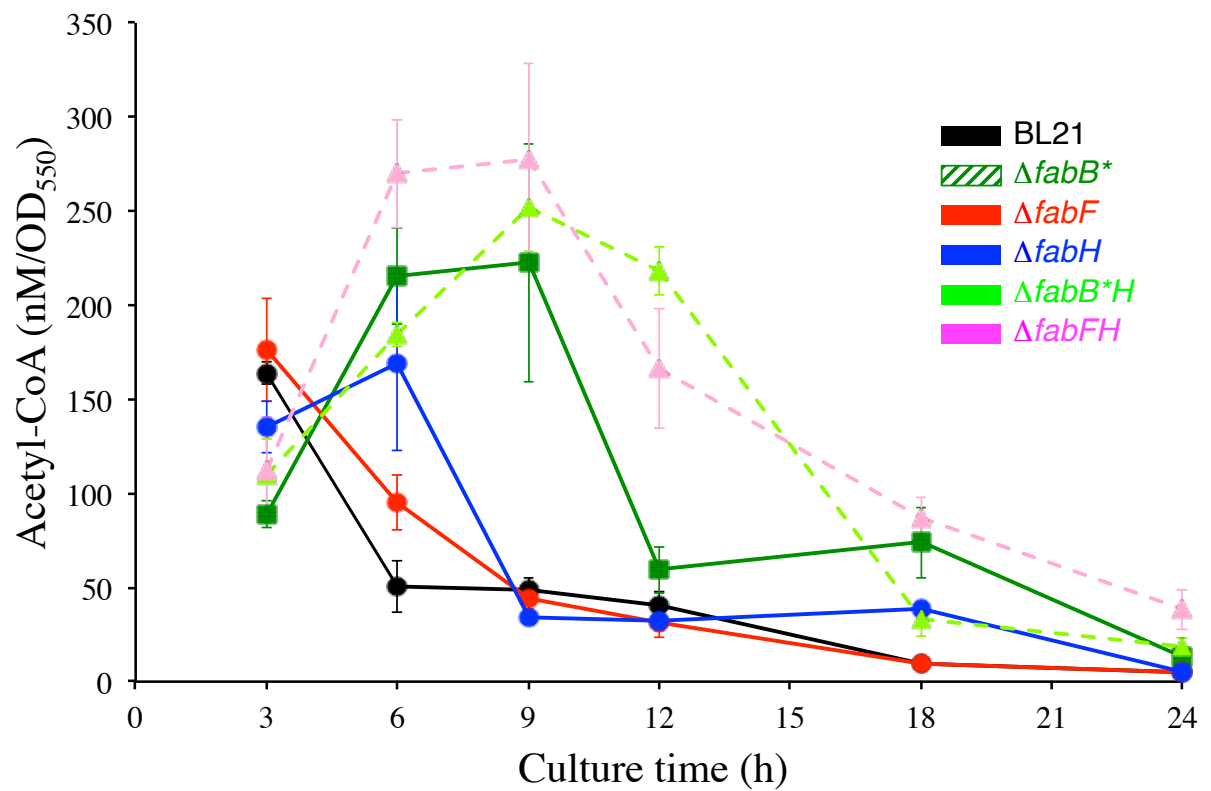


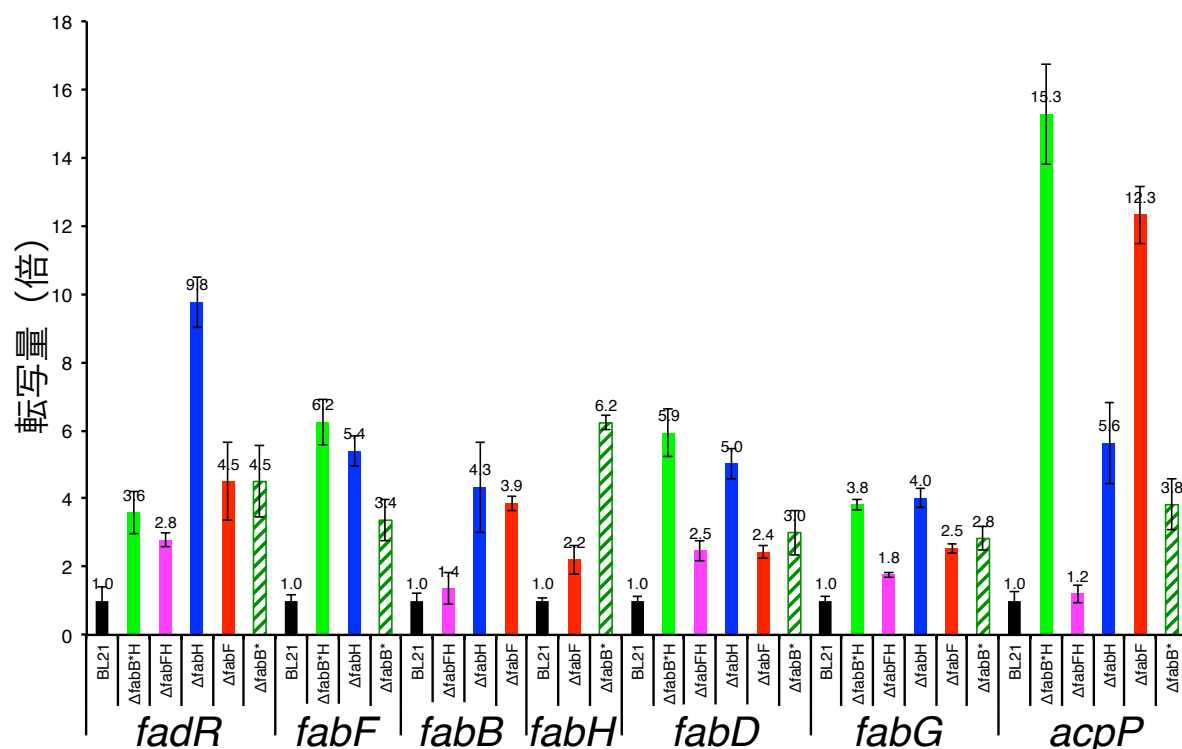
figure 5-15. FAS 破壊株における acetyl-CoA 濃度解析結果(大石奈穂美修士論文『微生物の脂肪酸合成阻害 有用物質大量生産の基盤の構築』Figure 5-7B を改変)

## 6. 脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株における qRT-PCR による転写量解析

### 6.1 転写量解析による FAS 破壊株における malonyl-CoA プール増強の解明

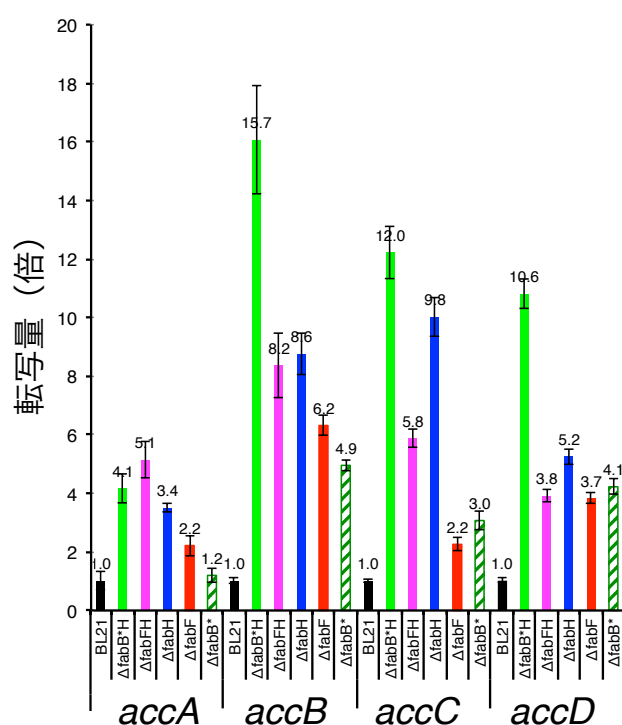
前節で示したとおり、FAS 破壊株は親株と比較して生体内 malonyl-CoA 量が増加していることが明らかとなった。私はこの malonyl-CoA プールの増強を遺伝子の転写による観点から詳しく解析するために、脂肪酸合成における正のレギュレーターである FadR に着目した。FadR は *fadR* 自身の転写および、脂肪酸合成における *fabH* オペロン、*fabB* の転写を正に制御すると報告されている<sup>3,4)</sup>。大腸菌において、FadR により脂肪酸合成が正に制御されると、長鎖 acyl-CoA が生成する。また、長鎖 acyl-CoA は *fadR* を負にフィードバックし、FadR を DNA から解離すると報告されている<sup>5,6)</sup>。一方、前述のとおり FAS 破壊株では脂肪酸合成量が低下しており、長鎖 acyl-CoA の生成量も少なくなっていると予想される。したがって、FAS 破壊株では *fadR* の転写において、負のフィードバックが弱くなり、FadR が遺伝子の転写を継続させることが予想できる。そこで私は、*E. coli* BL21 株および FAS 破壊株の対数増殖期における *fadR* の転写量を qRT-PCR により解析した。

その結果、FAS 破壊株における *fadR* の転写量は BL21 親株と比較して、いずれの FAS 破壊株においても上昇していることが判明した (figure 6-1)。さらに、FAS 破壊株では *fadR* の転写量増加に伴い、FAS 遺伝子の転写量が上昇していることが予想された。実際に、*fabB* の転写量および *fabH* オペロン中の遺伝子である *fabF*、*fabH*、*fabD*、*fabG*、*acpP* の転写量を解析した結果、いずれの遺伝子に関しても FAS 破壊株において転写量が上昇していた (figure 6-1)。



**figure 6-1.** qRT-PCR による FAS 破壊株における *fadR*、*fabB*、*fabF*、*fabH*、*fabD*、*fabG*、*acpP* の転写量解析 FAS 破壊株における転写量は、BL21 親株の転写量を 1.0 倍としたときの倍率である。それぞれの測定は n=3 で行った。

また、大腸菌において *fadR* を過剰発現させると acetyl-CoA を malonyl-CoA に変換する酵素である acetyl-CoA carboxylase (ACC) の発現が上昇すると報告されている<sup>34)</sup>。上述のとおり、FAS 破壊株では *fadR* の転写量が上昇していることが判明した。したがって、FAS 破壊株における ACC 遺伝子である *accA*、*accB*、*accC*、*accD* の転写量も増加していることが予想された。実際に ACC 遺伝子の転写量を解析した結果、FAS 破壊株において全ての ACC 遺伝子の転写量が上昇していた (figure 6-2)。つまり、FAS 破壊株では BL21 親株と比較して、acetyl-CoA を malonyl-CoA に変換する流路が増強されていることが示唆された。

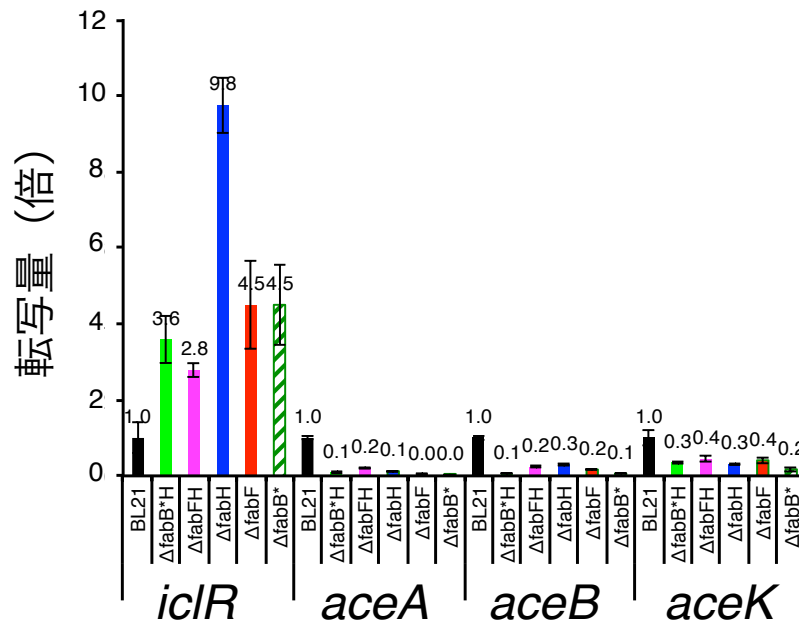


**figure 6-2. qRT-PCR による FAS 破壊株における *accA*、*accB*、*accC*、*accD* の転写量解析** FAS 破壊株における転写量は、BL21 親株の転写量を 1.0 倍としたときの倍率である。それぞれの測定は n=3 で行った。

## 6.2 転写量解析による FAS 破壊株における acetyl-CoA プール増強の解析

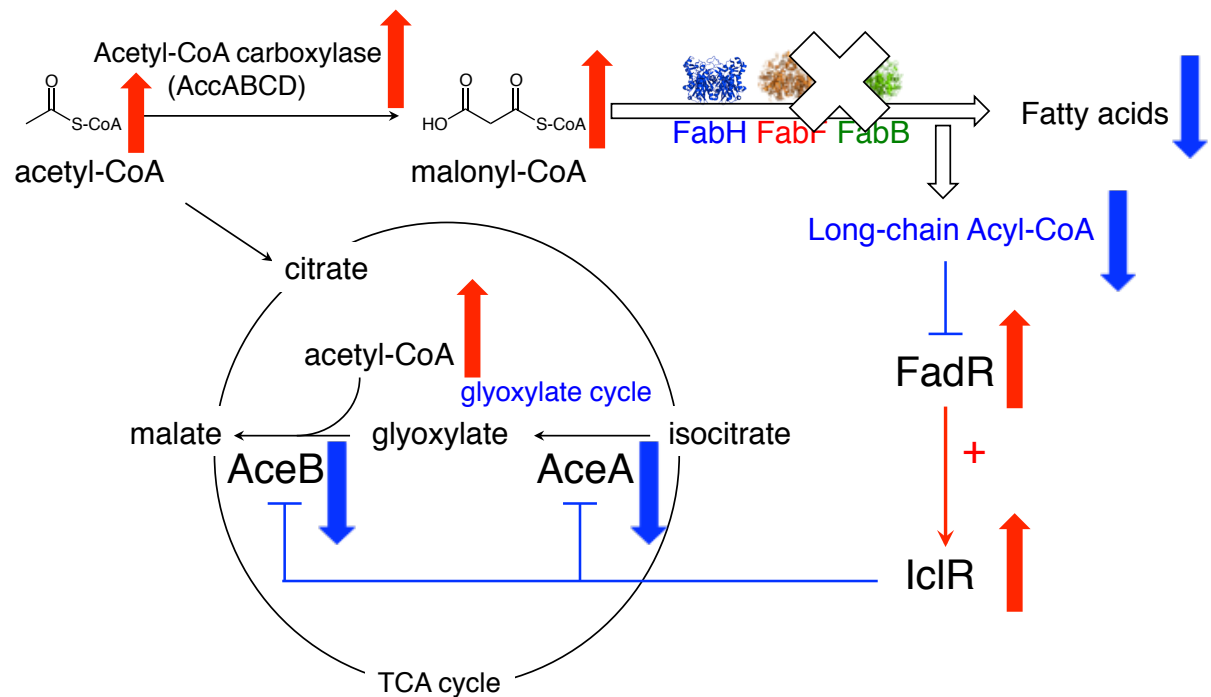
上述のように、FAS 破壊株における malonyl-CoA のプール増強は、脂肪酸合成における転写制御因子 *fadR* の転写量上昇が起点となっていることを明らかにした。また、FAS 破壊株において、malonyl-CoA 濃度のみならず、その前駆体である acetyl-CoA 濃度も上昇していた (figure 5-14)。

転写制御因子 *IclR* は、acetyl-CoA の代謝に関するグリオキシル酸回路中の *ace* オペロンの転写を負に制御すると報告されている<sup>7)</sup>。また、*iclR* の転写は *FadR* により正に制御されることが報告されている。本研究において、FAS 破壊株では *fadR* の転写量が増加していたので、*iclR* の転写量も上昇していることが予想された。そこで実際に FAS 破壊株における *iclR* および *ace* オペロンの *aceA*、*aceB*、*aceK* の転写量を解析した。その結果、予想したとおり、いずれの FAS 破壊株においても *iclR* の転写量が増加していた (figure 6-3)。一方、*ace* オペロンにおける 3 種類の遺伝子に関しては、いずれも FAS 破壊株において大幅な転写量の減少が見られた (figure 6-3)。したがって、グリオキシル酸回路で使用される acetyl-CoA が減少したことが一因となり、FAS 破壊株の acetyl-CoA プールの増強をもたらしたと考えられる。



**figure 6-3. qRT-PCR による FAS 破壊株における *iclR*、*aceA*、*aceB*、*aceK* の転写量解析** FAS 破壊株における転写量は、BL21 親株の転写量を 1.0 倍としたときの倍率である。それぞれの測定は n=3 で行った。

以上の実験結果より、FAS 破壊株において脂肪酸合成における正のレギュレーターである FadR が *fadR* 自身の転写量を上昇させていることが明らかとなった。そして、*fadR* の転写量上昇により、ACC 遺伝子の転写も正に制御され、acetyl-CoA を malonyl-CoA に変換する流路が増強されたことが判明した。よって、FAS 破壊株では BL21 親株と比較して malonyl-CoA の細胞内プールが増大したことを、遺伝子の転写の観点から裏付けることができた。また、FAS 破壊株における細胞内 acetyl-CoA 濃度の増強に関しても、*fadR* が関与していることを明らかにした。具体的には、*fadR* の転写量が上昇したことにより転写制御因子である *iclR* の転写が増加し、グリオキシル酸回路に関する *ace* オペロンの転写が抑制されていた。そして、グリオキシル酸回路で使用される acetyl-CoA が減少したことが一因となり、acetyl-CoA プールが増強したと推測される (figure 6-4)。



**figure 6-4. FAS 破壊株における acetyl-CoA、malonyl-CoA プールの増強** FAS 破壊株では、*fadR* の転写量が上昇したことにより転写制御因子 *iclR* の転写が増強され、グリオキシル酸回路中の *ace* オペロンの転写が抑制された。そして、グリオキシル酸回路で使用される acetyl-CoA が減少したことが一因となり、acetyl-CoA プールが増強したと推測される。そして、*fadR* の転写量上昇により、ACC 遺伝子の転写も正に制御され、acetyl-CoA を malonyl-CoA に変換する流路が増強されたことで malonyl-CoA 濃度の上昇に関与したと考えられる。

## 7. 脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株における飢餓シグナル ppGpp の解析

上述のとおり、FAS 破壊株の脂肪酸量は親株と比較して顕著に減少していた。したがって、FAS 破壊株では脂肪酸飢餓による緊縮応答が起きていると予想できる。よって、FAS 破壊株では飢餓シグナル ppGpp が多く分泌されていると考えられる。そこで私は、FAS 破壊株の ppGpp 量を分析することとした。

### 7.1 HPLC を用いた脂肪酸合成酵素遺伝子破壊株の ppGpp 量解析

野村らによる実験方法<sup>35)</sup>を参考にして、*E. coli* BL21 親株および FAS 破壊株の ppGpp の抽出および HPLC 分析を行った。2 L のバッフル付き三角フラスコを用いて、各菌株を 1 L の LB 培地で OD<sub>600</sub> が 0.5 になるまで培養し、1 L 分の菌体を集菌した。その後、菌体をメタノールに再懸濁し、超音波破碎を行った。そして、遠心分離後のメタノール層にクロロホルムおよび滅菌水を加えて混合し、再び遠心分離を行った。最後に、水層の濃縮乾固物を 7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.0) 20  $\mu$ l に溶解し、HPLC のサンプルとした。HPLC 分析は、陰イオン交換カラム PARTISIL 10 SAX 4.6 ID  $\times$  250 mm (Hichrom 社) を用いて行った (実験項)。

HPLC による ppGpp 分析によって、28 分あたりに ppGpp のピークが見られた (figure 7-1)。ppGpp 標品の分析より、検量線を作製し、大腸菌菌体内の ppGpp 量を算出した。その結果、*E. coli* BL21 親株では 0.056 nM/OD<sub>550</sub> であったのに対し、 $\Delta fabH$  株では約 3.8 倍の 0.21 nM/OD<sub>550</sub> であった。親株と比較して ppGpp 量が明らかに多かったのは  $\Delta fabH$  株のみであり、残りの FAS 破壊株については親株と同等あるいは少量の増加がみられた程度であった (figure 7-2)。また、Keio collection における  $\Delta fabF$  株、 $\Delta fabH$  株においても同様に、*E. coli* BW25113 株との ppGpp 量の比較を行った。*E. coli* BW25113 株においても  $\Delta fabH$  株の ppGpp 量が親株の 0.095 nM/OD<sub>550</sub> と比較して約 2.4 倍の 0.226 nMOD<sub>550</sub> となっており、*E. coli* BL21 株と同様の結果が得られた (figure 7-3)。本実験においては、*E. coli* BL21 親株および BW25113 株の生育ステージが対数増殖期である、OD<sub>600</sub>=0.5 の一時点における ppGpp 量だけを測定した。この濁度が全ての菌株において、同じ生育ステージにあるとは限らず、 $\Delta fabH$  株においてのみ緊縮応答が起きていたとも考えられる。したがって、各菌株における ppGpp 量に関して、経時的な分析を行う必要がある。しかしながら、本実験で用いた ppGpp の抽出方法では、培養量が 1 L と大容量であるために、ppGpp の抽出課程においてバラつきが出てしまう可能性や HPLC 分析におけるカラムへのダメージも懸念される。よって私は、HPLC よりも高感度で ppGpp を測定できると予想される LC-tripleQ MS を用いた ppGpp の分析系を構築することとした。



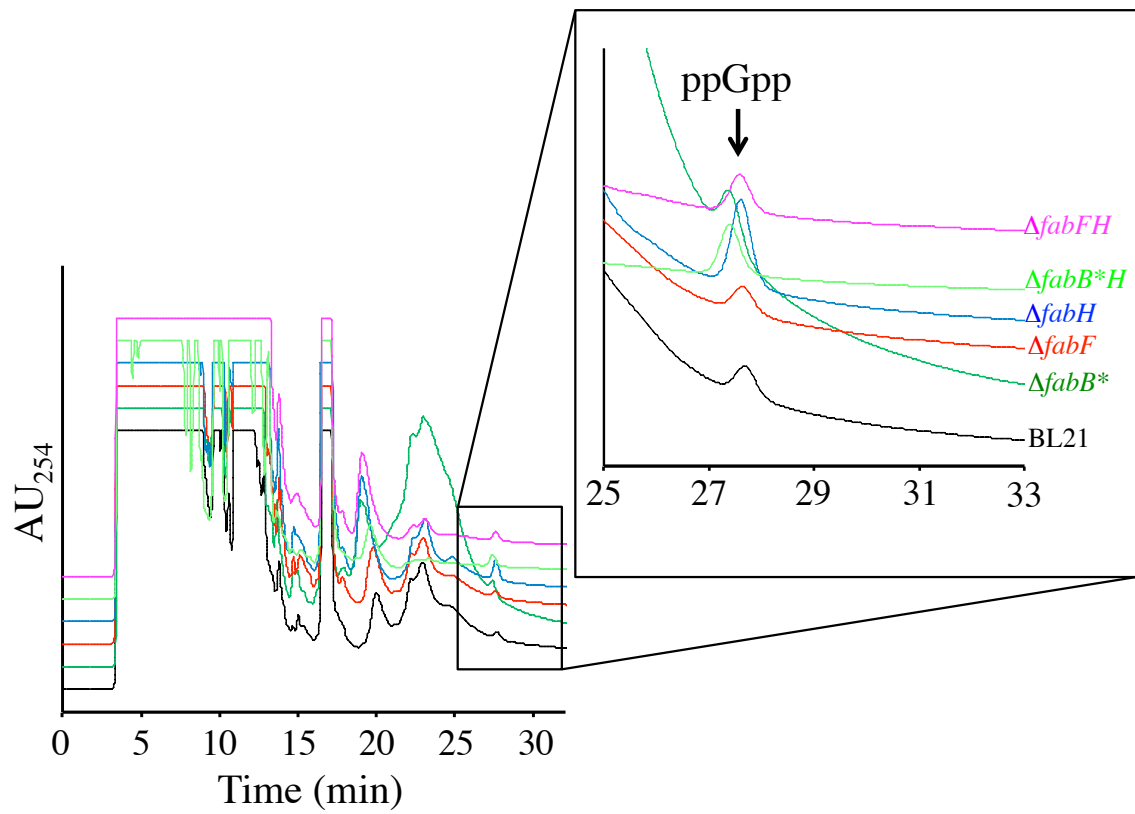


figure 7-1. *E. coli* BL21 株および FAS 破壊株における ppGpp の HPLC 解析

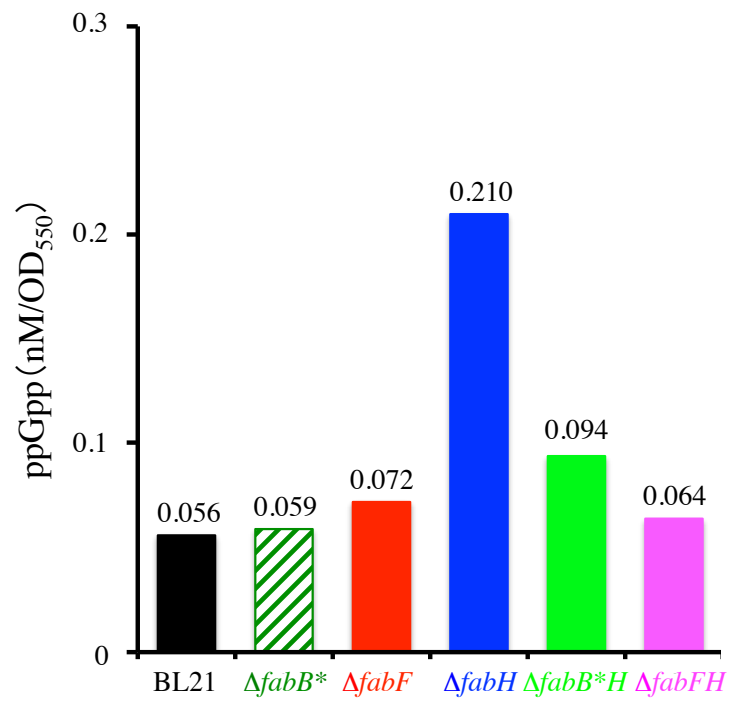


figure 7-2. *E. coli* BL21 株および FAS 破壊株における ppGpp の定量

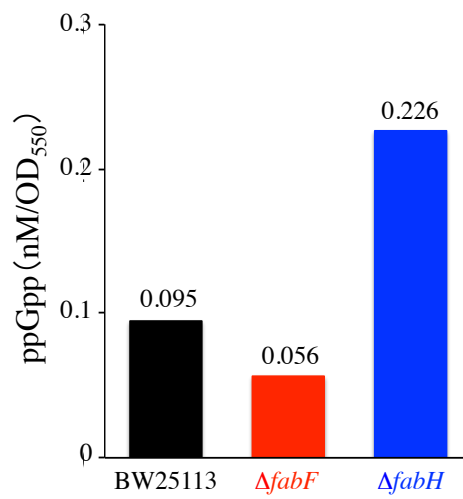
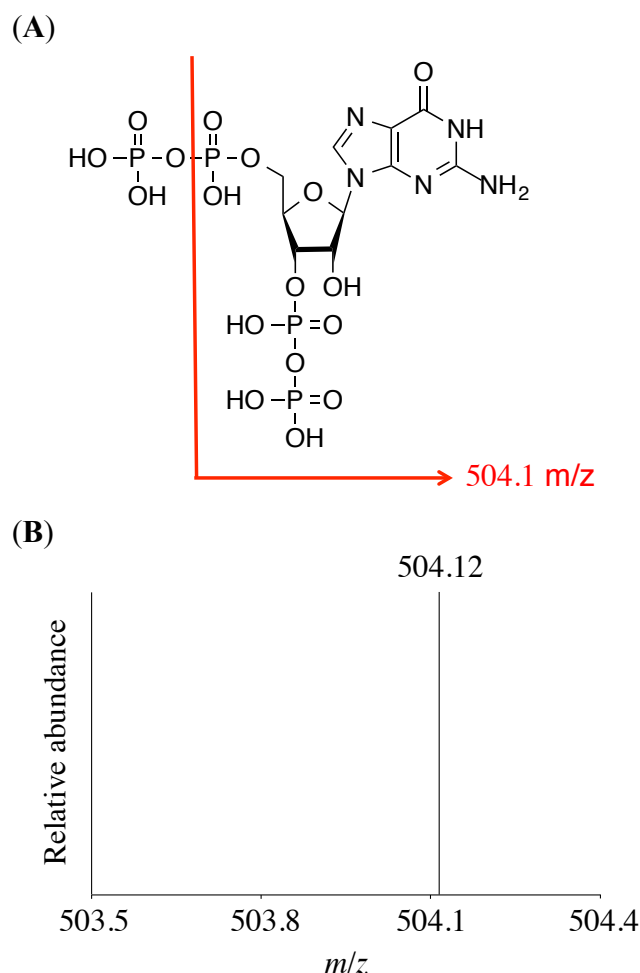


figure 7-3. *E. coli* BW25113 株および FAS 破壊株における ppGpp の定量

## 7.2 LC-MS を用いた ppGpp 分析系の構築

### 7.2.1 ppGpp 分析条件の検討

7.1 のとおり、HPLC を用いた菌体中の ppGpp 分析には、1 L の培養液を用いた。よって、複数の菌体から一度に抽出を行うのには困難を要するため、私はより少量の菌体から ppGpp を高感度で分析することを目的とし、LC-tripleQ MS を用いた ppGpp の分析系の構築を目指した。まず私は当研究室の戸塚と共に、ppGpp 標品を LC-tripleQ MS で分析するための条件を検討した。その結果、figure 7-3 で示した MS/MS スペクトルを有する ppGpp の product ion の検出に成功した (figure 7-4)。次に、最適化した条件を用いて、ppGpp の検量線を作成した。1 pmol から 25 pmol の ppGpp で LC-tripleQ MS で分析した。その結果、相関係数 0.982 と精度の良好な検量線を得ることができた (figure. 7-5)。続いて私は、実際に大腸菌の菌体から抽出した ppGpp を LC-tripleQ MS で分析することとした。



**figure 7-4.** ppGpp の構造と negative ion mode での MS/MS スペクトル (A) ppGpp の分子構造。最適化の指標にした product ion を赤矢印で示した。(B) ppGpp の MS/MS スペクトルを示した。

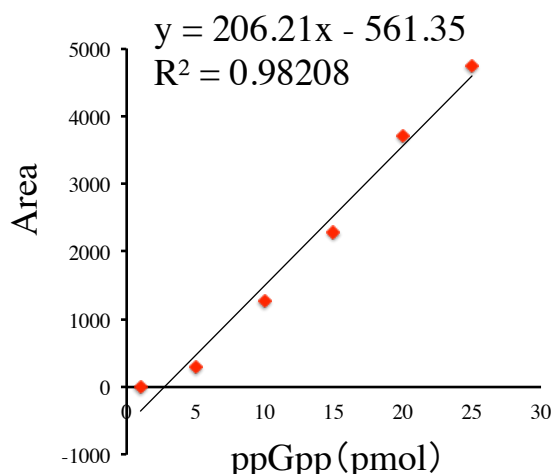
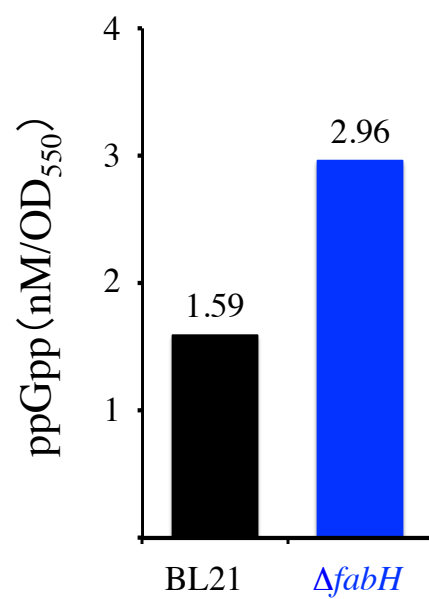


figure 7-5. LC-MS で分析した ppGpp の検量線

#### 7.2.2 LC-MS を用いた *E. coli* BL21 株および $\Delta fabH$ 株における ppGpp 量の解析

7.2.1 において構築した LC-tripleQ MS を用いた ppGpp の分析系を用いて、大腸菌 *E. coli* BL21 株および $\Delta fabH$  株の ppGpp の定量を行った。OD<sub>600</sub> が 0.5 になるまで生育させた LB 培地 10 ml 分の菌体を使用して、7.1 の実験と同様の方法を用いて ppGpp の抽出を行った。最終的に 50  $\mu$ l の 20 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> : acetonitrile = 1 : 1 溶液に溶かして、そのうちの 5  $\mu$ l をインジェクションした。

その結果、*E. coli* BL21 親株では 1.59 nM/OD<sub>550</sub> であったのに対し、 $\Delta fabH$  株では約 1.9 倍の 2.96 nM/OD<sub>550</sub> であった (figure 7-6)。親株と比較して $\Delta fabH$  株の ppGpp 量が多いのは、HPLC で分析した結果と一致した。LC-tripleQ MS で分析した結果、大腸菌菌体内の ppGpp 量に 10 倍程度の違いが見られた。これは、1 L 分の菌体を用いた時はうまく ppGpp が抽出できなかったと考えられる。今後は繰り返し実験を行い、再現性を取る必要がある。また、*E. coli* BL21 親株および FAS 破壊株における経時的な ppGpp 量の変化を測定することで、FAS 破壊株における脂肪酸飢餓による緊縮応答が生育におけるどの段階で起きているのかを精査したい。



**figure 7-6.** LC-MS を用いた *E. coli* BL21 株および  $\Delta fabH$  株における ppGpp の定量

## 8. 第一章のまとめ

第一章では芳香族ポリケタイドの生産に適した微生物宿主の開発を目的として、3つの方法で大腸菌における脂肪酸合成酵素 (FAS) の阻害による malonyl-CoA 代謝プールの増強を図った。1 つめは、脂肪酸合成酵素 FabF、FabB の阻害剤である cerulenin を用いた実験、2 つめとして、アンチセンス RNA 法を用いた脂肪酸合成酵素遺伝子のノックダウン、3 つめに FAS 遺伝子破壊株を作製した。ポリケタイドの前駆体は malonyl-CoA である。一方、malonyl-CoA は脂肪酸合成の基質でもあり、その生合成は厳格に制御されている。そのため、微生物において malonyl-CoA を基質とする二次代謝酵素を発現しても高い生産量は得られない。そこで、大腸菌の脂肪酸合成経路を阻害することで、malonyl-CoA の代謝流路がポリケタイド生産に傾くように宿主を改良した。

1 つめの FAS 阻害方法である cerulenin の実験では、cerulenin の投与濃度を振り分けることにより、ポリケタイド増産において最適な cerulenin 濃度を発見することができた。大腸菌 *E. coli* BL21/pQE2-rppArbsmomA 株に 6.25  $\mu\text{g/ml}$  の cerulenin を投与すると 103 mg/ml であった。これは cerulenin 無添加時と比較し、14 倍の生産量であった。しかし、それより低濃度では cerulenin の脂肪酸合成酵素阻害効果があまりみられず、flaviolin 生産量の増加がみられなかった。逆に高濃度においても、flaviolin の増産はされなかった。

2 つめのアンチセンス RNA による FAS 遺伝子 *fabH*、*fabF*、*fabB* のノックダウンでも、flaviolin の生産量が増加した。最も効果的であったのは、アンチセンス RNA 発現ベクター pHN1257 を用いて *fabF* を発現抑制した場合であり、pHN1257 のみを形質転換したコントロールと比較して約 1.4 倍の flaviolin 増産がみられた。cerulenin と比べるとアンチセンス RNA による FAS 阻害は、阻害効果が小さかった。

FAS 阻害方法の 3 つめとして、 $\lambda$ Red recombinase による相同組換えおよび Cre/loxP 系を用い、大腸菌 *E. coli* BL21 株の FAS 遺伝子 *fabH*、*fabF*、*fabB* の in-frame mutant および *fabB/fabH*、*fabF/fabH* の二重破壊株を作製した。FAS 破壊株では、*E. coli* BL21 株と比較して脂肪酸量の顕著な減少が見られ、flaviolin 生産量も多くなっていた。また、生体内 acetyl-CoA および malonyl-CoA 濃度を測定した結果、各 FAS 破壊株では親株よりもそれらの濃度が高かった。特に  $\Delta fabFH$  株では、それぞれ 6 倍、45 倍濃度が親株よりも高かった。加えて私は、脂肪酸生合成の正の制御因子 *fadR*、acetyl-CoA を malonyl-CoA へと変換する acetyl-CoA carboxylase、*accABCD* や FAS 遺伝子の転写量を解析した。その結果、各 FAS 破壊株において *fadR*、*accABCD*、FAS 遺伝子の転写量が親株よりも上昇していた。以上より、脂肪酸生合成に関する酵素の転写量の上昇が malonyl-CoA 量の増大の一因であることが判明した。さらに、各 FAS 破壊株ではグリオキシル酸回路における負の転写抑制因子 *iclR* の転写量が上昇し、同回路の生

合成酵素 *aceA*、*aceB*、*aceK* の転写が抑制されていた。グリオキシル酸回路で消費される acetyl-CoA の量が減少したことが細胞内 acetyl-CoA プール増強の原因の 1 つであると推測された。

また私は、FAS 破壊株において親株と比較して脂肪酸量が減少していることから、脂肪酸飢餓による緊縮応答が起きているのではないかと考えた。そこで、FAS 破壊株における緊縮応答の飢餓シグナルである ppGpp の分析を行った。その結果、 $\Delta fabH$  株においては、親株や他の FAS 破壊株と比べて ppGpp 量が高いことが判明した。それは、*E. coli* BL21 株だけではなく、*E. coli* BW25113 株における  $\Delta fabH$  株 (Keio collection) でも同様であった。くわえて、LC-tripleQ MS による ppGpp の分析系の構築を行った。

## 9. 第一章の実験項

### 材料

*Escherichia coli* HST08 株、*Escherichia coli* BL21 株、pUC19、DNA polymerase や制限酵素、DNA ligase は Takara biochemical 社より購入し、DNA 操作に用いた pQE2 は QIAGEN 社より購入した。大腸菌 *E. coli* BW25113 株および  $\Delta fabH$  株 (Keio collection) は国立遺伝学研究所の National BioResource Project から購入した。*E. coli* の生育に用いた LB (Luria-Bertani) broth (Lennox) は Sigma-Aldrich 社より購入した。Tween 40、Tween 80 は東京化成工業株式会社より購入した。オレイン酸および cerulenin は和光純薬工業株式会社より購入した。ppGpp は、TriLink BioTechnologies 社より購入した。

### 3.1 の実験、pQE2-*rppArbsmomA* の構築

pQE2-*rppArbsmomA* を構築するために、まずは pUC19-*rppA* と pUC19-*rbsmomA* を作成した。その後、pQE2 に両遺伝子をクローニングした。

まず、pUC19-*rppA* の構築を行った。pET16b-*rppA*<sup>19)</sup>を鋳型にし、以下のプライマーを用いて PCR により *rppA* を増幅した。PCR で増幅後、エタノール沈殿を行い、*rppA* および pUC19 を制限酵素 EcoRI および HindIII で消化した。電気泳動後、目的のバンドを回収・精製し、T4 DNA ligase による ligation により pUC19-*rppA* を構築した。また、DNA シークエンスにより PCR エラーがないことを確認した。

次に、pUC19-*rbsmomA* の構築を行った。pMF1 (pIJ6021-*rppAmomA*)<sup>25)</sup>を鋳型にし、以下のプライマーを用いて PCR により *rbsmomA* を増幅した。PCR で増幅後、エタノール沈殿し、*rbsmomA* および pUC19 を制限酵素 XbaI および HindIII で消化した。電気泳動後、目的のバンドを回収・精製し、T4 DNA ligase による ligation により pUC19-*rbsmomA* を構築した。また、DNA シークエンスにより PCR エラーがないことを確認した。

続いて、構築した 2 つのベクターを、タンパク発現ベクターである pQE2 へクローニングした。pUC19-*rppA* を制限酵素 NdeI および SpeI で消化した。また pUC19-*rbsmomA* を制限酵素 XbaI および HindIII で消化した。制限酵素で切断した *rppA* 配列、*rbsmomA* 配列を pQE2 へ ligation した。以上の操作により、pQE2-*rppArbsmomA* を構築した。



プライマー	制限酵素サイト	配列
rppA_F	GAATTC : EcoR I CATATG : Nde I	5'-GCGGAATTCGCAT <b>ATGGCGACCCTGTGCC</b> -3'
rppA_R	AAGCTT : HindIII ACTAGT : Spe I	5'-GCAAGC <b>TTACTAGTCGGACAGCGCAAC</b> -3'
momA_F	TCTAGA : XbaI	5'- GCGTCTAGAATTAAAGAGGAGAAATTAAGT <b>ATGACCGACCTCATCCTCC</b> -3'
momA_R	AAGCTT : HindIII	5'-GCGAAGCTT <b>TCAGCTCCCACTCTGGTTTCG</b> -3'

赤字は *Streptomyces griseus* の *rppA* の配列、および *Streptomyces antibiotics* の *momA* の配列であり、スタートコドンとストップコドンを bold で示す。AGGAGA は pQE2 のリボソーム結合部位である。

### 3.1 の実験、pQE2-*rppArbsmomA* 組換え大腸菌のサンプル抽出と分析

100 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地（以下、LB amp 培地）2 ml に、pQE2-*rppArbsmomA* を有した *E. coli* BL21 を植菌し 37°C で 12 時間培養した。この前培養液を新たな LB amp 培地 50 ml に 1%植菌し、30°C で本培養を開始した。本培養開始から 2 時間後、終濃度が 0.1 mM になるように isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を加え、さらに培養した。本培養開始後、12 時間経過した培養液をサンプリングした。200 µl の培養上清に、1 N HCl を 1 滴加え酸性にした後に、800 µl の酢酸エチルを用いて抽出した。酢酸エチル抽出物を遠心分離後、その酢酸エチル層 700 µl を遠心エバポレーターで濃縮乾固し、200 µl のメタノールに溶解した。メタノール溶液 10 µl を新しいマイクロチューブに分注し、全量を HPLC 解析に用いた。分析カラムは COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-ARII column (4.6×150 mm ;ナカライテスク)を使用した。溶媒は、蒸留水/アセトニトリル (0.1%トリフルオロ酢酸、TFA) を用い、カラム温度は 40°C、流速は 1.0 ml/min に設定した。グラジエントは、アセトニトリルが 19 分間で 10% から 100%になるように設定した。吸光度は 280 nm で検出した。分析して検出されたピーク面積値から、flaviolin、mompain の生産量を評価した。flaviolin および mompain は、精製した標品を用いて検量線を作成することで定量を行った。

### 3.2 の実験、cerulenin による脂肪酸合成酵素の阻害試験

100 µg/ml のアンピシリンを含む LB amp 培地 2 ml に、*E. coli* BL21/pQE2-*rppArbsmomA* を植菌し、37°C で 12 時間振盪培養した。この前培養液を新たな LB amp 培地 50 ml に 1%植菌し、37°C で本培養を開始した。本培養開始から 1.5 時間後、終濃度が 0.1 mM になるように IPTG を加え、同時に cerulenin も添加した。cerulenin 添

加時に、培養液 2 ml を試験管へ移動させた。cerulenin の DMSO 溶液を、終濃度が 0、1.6、3.1、6.3、12.5、25、50  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加した。0  $\mu\text{g/ml}$  は、DMSO のみを添加したネガティブコントロールである。全てのサンプルにおいて、添加した DMSO が 4  $\mu\text{l}$  になるように調整し、各サンプル間の DMSO 量に差異が出ないようにした。本培養開始後、12 時間経過した培養液をサンプリングした。flaviolin、mompain の抽出および定量は、3.1 の実験と同様に行った。本実験は、n=3 で行った。

#### 4.2 の実験、 アンチセンス RNA 用プラスミドの構築

大腸菌 *E. coli* W3110 株のクロモソームを鋳型にして、以下のプライマーを用いて PCR によりアンチセンス RNA 発現用ベクターに導入するための DNA 断片を増幅した。

##### *fabF* 用プライマー

as*fabF* F : CTCGAATTCCTCGAGGTCGTTTCGACCGCCTGAGTT

as*fabF* R : CAGAAGCTTCCATGGCCAGGTAGACTCTACGGTATT

##### *fabH* 用プライマー

as*fabH* F : CGCGAATTCCTCGAGCTGCCAGCGAACTCGCAGTT

as*fabH* R : CACAAGCTTCCATGGGGGCAGATAGCTGCCAGTACCAAT

##### *fabB* 用プライマー

as*fabB* F : CGCGAATTCCTCGAGACAAGTGTACGCTATTGTGCAT

as*fabB* R : CACAAGCTTCCATGGGAAACAATGCCCAGGC

GAATTC : EcoRI 認識配列、CTCGAG : XhoI 認識配列、AAGCTT : HindIII 認識配列、CCATGG : NcoI、赤字は *fabF* の上流および内部配列 (figure 4-4)。青字は *fabH* の上流および内部配列 (figure 4-3)。緑字は *fabB* の上流および内部配列 (figure 4-5)。

各セットの PCR プライマーを用いて、PCR で増幅後、エタノール沈殿を行った。その後、各 DNA 断片および pUC19 を制限酵素 EcoRI および HindIII で消化した。電気泳動後、目的のバンドを回収・精製し、ligation により pUC19-as*fabF*、pUC19-as*fabH*、pUC19-as*fabB* を構築した。DNA シークエンスにより PCR エラーがないことを確認した。pUC19-as*fabF*、pUC19-as*fabH*、pUC19-as*fabB* をそれぞれ制限酵素 XhoI および NcoI で消化しアンチセンス配列を回収した。アンチセンス RNA 発現用ベクター pHN678、pHN1257、pHN1270 を制限酵素 XhoI および NcoI で消化しアンチセンス配列を ligation した。以上により、pHN678-*fabF*、pHN1257-*fabF*、pHN1270-*fabF*、pHN678-*fabH*、pHN1257-*fabH*、pHN1270-*fabH*、pHN678-*fabB*、pHN1257-*fabB*、pHN1270-*fabB* を作製した。

#### 4.2 の実験、大腸菌 *E. coli* BL21/pQE2-*rppArbsmomA* 株へのアンチセンス RNA 用プラスミドの形質転換

大腸菌 BL21/pQE2-*rppA* 株のケミカルコンピテントセルに各アンチセンス RNA 用プラスミドを形質転換した。選択マーカーは、pQE2 ベクターのアンピシリンおよび各アンチセンスベクターの薬剤耐性遺伝子 (pHN678: クロラムフェニコール、pHN1257: カナマイシン、pHN1270: アプラマイシン) に従って、複数の抗生物質を LB 培地に添加した。また、Negative Control としてアンチセンス RNA 用ベクターのみを形質転換した菌株 (以下、ネガコン株) も作製した。

#### 4.3 の実験、アンチセンス RNA による脂肪酸合成酵素遺伝子のノックダウン実験

LB amp 培地 (100 µg/ml) 2 ml に、アンチセンス RNA 発現株およびネガコン株を植菌し、37 °C で 12 時間振盪培養を行った。この前培養液を新たな LB amp 培地 2 ml に 1 % 植菌し、37 °C で本培養を開始した。本培養開始から 1.5 時間後、終濃度が 0.1 mM になるように IPTG を加えた。本培養においても 12 時間培養を行った。本培養終了後、各培養液の培養上清 200 µl に、1 N HCl を 1 滴加え酸性にした後に、800 µl の酢酸エチルを用いて抽出した。抽出物を遠心分離後、酢酸エチル層 700 µl を遠心エバポレーターで濃縮乾固し、200 µl のメタノールに溶解した。そのうち、10 µl を新しいマイクロチューブに分注し、全量 HPLC へとインジェクションした。分析して検出されたピーク面積値から、flaviolin、mompain の生産量を評価した。本実験のサンプル数は  $n = 3$  で行った。

#### 5.1 の実験、GENEART による pUC19- $\Delta fabB$ および pUC19- $\Delta fabH$ の作製

脂肪酸合成酵素 (FAS) の遺伝子破壊株用プラスミドの構築は、GENEART (Seamless Cloning and Assembly Kit: invitrogen™) のプロトコールに従った。以下、箇条書きで説明する。

- (1) インサート断片を以下のプライマーを用いて PCR 法で増幅させ、エタノール沈殿した。(fab 遺伝子上流 2 kbp、下流 2 kbp および *loxP* 配列)

pUC19- $\Delta fabB$  の上流領域増幅用プライマー

fabBup\_F

AATTCGAGCTCGGTACAGCCGCAAACATAAAGAGATCGTC

fabBup\_R

GAACGGTACATTCAATACCTCTGTAAGTCGCA

pUC19- $\Delta fabB$  の *lox71-aphII-lox66* 領域増幅用プライマー

fabBlox\_F

ATTGAATGTACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGAGCTC

fabBlox\_R

GCGCATTATACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATACCGG

pUC19- $\Delta fabB$  の下流領域増幅用プライマー

fabBdown\_F

GAACGGTATAATGCGCAAGCTGAAAGATTAAT

fabBdown\_R

AGCTTGCATGCCTGCAGAAGGGAAGATGGTTATTCCGCAA

pUC19- $\Delta fabH$  の上流領域増幅用プライマー

fabHup\_F

AATTCGAGCTCGGTACACTCTATGACGTTACAAAGTTAAT

fabHup\_R

GAACGGTACATGTACGCTCAGTCACTTTTCGG

pUC19- $\Delta fabH$  の *lox71-aphII-lox66* 領域増幅用プライマー

fabHlox\_F

CGTACATGTACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGAGCTC

fabHlox\_R

CGCGGAGCTACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATACCGG

pUC19- $\Delta fabH$  の下流領域増幅用プライマー

fabHdown\_F

GAACGGTAGCTCCGCGCTGGTTCGTTTCTAGG

fabHdown\_R

AGCTTGCATGCCTGCAAGGTCTTCAACGAAAGAAGCATTG

- (2) DNA の濃度を測定し、ligation に使用する DNA 量を決定した。
- (3) GENEART® の 説明書に従い、インサート DNA、pUC19L ベクター、5×Reaction Buffer、滅菌水、10×Enzyme mix をマイクロチューブに入れ、反応液を調製した。
- (4) 反応液を 30 分間室温で静置し、その後、氷上に置いた。
- (5) 反応液 6-8  $\mu$ l を One Shot® TOP10 コンピテントセルに加えた。

- (6) 30 分間氷上で静置した後、42°C で 30 秒間ヒートショックし、氷上に戻した。
- (7) 氷上で 2 分間静置後、250  $\mu$ l の SOC 培地を加えた。
- (8) マイクロチューブを水平にし、200 rpm、37°C で 1 時間培養し、薬剤耐性遺伝子を発現させた。
- (9) 抗生物質入りのプレートにまき、37°C で一晩培養した。
- (10) 形成されたコロニーを用いて、プラスミドを抽出しインサート DNA の確認を行った。

### 5.1 の実験、 $\lambda$ red recombinaseによる $\Delta fabB$ Km<sup>r</sup>株、 $\Delta fabH$ Km<sup>r</sup>株の取得

$\Delta fabB$  Km<sup>r</sup>株を作製するために、pUC19- $\Delta fabB$  を EcoRI および HindIII で消化した。電気泳動後、目的のバンドを回収・精製し、figure 5-2 に示す約 5.6 kb の断片が得られた。これを *fabB* 破壊用の DNA 断片として使用した。

*fabH* Km<sup>r</sup>株を作製するために、pUC19- $\Delta fabH$  を HincII および HindIII で消化した。電気泳動後、目的のバンドを回収・精製し、figure 5-3 に示す約 2.3 kbp の断片が得られた。これを *fabH* 破壊用の DNA 断片として使用した。

- (1) *E. coli* BL21 株に pKD46 を導入し、*E. coli* BL21/pKD46 株を取得した。
- (2) *E. coli* BL21/pKD46 を SOB amp 培地 (100  $\mu$ g/ml) 1 ml に植菌し、37°C で一晩振盪培養した。これを前培養液とする。
- (3) 新たな SOB amp 培地 2 ml に L-Arabinose 水溶液を終濃度が 10 mM になるように加えた。この培地に前培養液を 1 % 植菌し、30°C で数時間振盪培養を行い  $\lambda$ red recombinase を発現させた。この菌体を用いエレクトロポレーション用のコンピテントセルを作製した。
- (4) 破壊株作製用の DNA 断片をエレクトロポレーションで形質転換させた。(1.8 kV、25  $\mu$ F、250  $\Omega$ )
- (5) 370 で 2 時間培養後、LB Km 培地にプレーティングし、37°C でコロニーが形成されるまで培養した。 $\Delta fabB$  Km<sup>r</sup>株の取得には培地に 0.1% tween 40、0.1% tween 80、0.02% オレイン酸を添加した。
- (6)  $\Delta fabB$  Km<sup>r</sup>株および $\Delta fabH$  Km<sup>r</sup>株作製の際は、カナマイシン耐性のコロニーをピックアップし、LB Km 培地と LB Amp + Km 培地 ( $\Delta fabB$  Km<sup>r</sup>株用の培地には 0.1%tween 40、0.1%tween 80、0.02%オレイン酸を添加) の両方に植菌し、アンピシリン入りの培地で生育しないことを確認した。アンピシリン耐性株は、破壊株用 DNA 断片作製時に混入した pUC19- $\Delta fabB$  または pUC19- $\Delta fabH$  が形質転換された株であると考え除外した。
- (7) 相同組換えチェック用の PCR プライマーを用いてコロニーPCR を行い、染色体上で相同組換えが起こっていることを確認した。染色体上で相同組換えが起こった

場合のみに増幅されるように、各脂肪酸合成酵素遺伝子の上流 2 kbp よりさらに上流の配列を Forward プライマーとした。また、Reverse プライマーは *loxP* 配列の最初の 30 bp 付近から増幅されるように設計した。

遺伝子破壊株チェック用のコロニーPCR に用いたプライマーを以下に示す。

$\Delta fabB$  用 Forward : CAGAACACAAACCGCGAGAACCTAA

$\Delta fabB$  用 Reverse : ATAACCTTCGTATAATGTATGCTATACGAAC

$\Delta fabF$  用 Forward : CCAGCGCTGTTGACTGCATCTG

$\Delta fabF$  用 Reverse : ATAACCTTCGTATAATGTATGCTATACGAAC

$\Delta fabH$  用 Forward : CAACCACAGGCTGCCTTTTCTTTG

$\Delta fabH$  用 Reverse : ATAACCTTCGTATAATGTATGCTATACGAAC

## 5.2 の実験、 $\lambda$ Red recombinase による $\Delta fabF$ Km<sup>r</sup> 株の取得

*fabF* の破壊に際して、*loxP* 配列を *fabF* 上流 50 bp および下流 50 bp で挟む配列が増幅するように以下のプライマーを設計し、PCR で増幅した。その後エタノール沈殿を行い、破壊株作製の DNA として用いた。その後の実験方法は、5.1 の実験と同様。

### *fabF* 破壊用プライマー

Forward:

TCTTTTTGTCCCACTAGAAATCATTTTTTCCCTCCCTGGAGGACAAACGTG

TACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGAGCTC

Reverse:

CCTTTTATATGGGTGGGAAATGACAACCTTAGATCTTTTAAAGATCAAAG

TACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTA

## 5.1、5.2 の実験、サザンハイブリダイゼーション用プローブ作製

DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) のプロトコールに従い、以下の手順でサザンハイブリダイゼーション用プローブを作製した。

- (1) 制限酵素処理およびゲル精製によりプローブ用 DNA 断片を精製した。*fabB* および *fabH* に関しては、GENEART®により構築した遺伝子破壊用プラスミドを用いた。*fabB* については、pUC19- $\Delta fabB$  を NcoI および MluI で消化して得られた約 470 bp の断片を用いた。*fabH* については、pUC19- $\Delta fabH$  を SphI および PstI で消化して得られた約 300 bp の断片を用いた。*fabF* については *fabF* 上流 2 kbp を増幅した DNA を NcoI および PvuII で消化して得られた約 500 bp の断片を用いた。
- (2) 精製した DNA と滅菌水を合わせて 16  $\mu$ l になるように調整し、マイクロチューブ

に加えた。

- (3) 沸騰水中で 10 分間 DNA を熱変性させた後、ただちに氷水の入った容器内で冷却させた。
- (4) よく混和した DIG-High Prime 4  $\mu$ l を変性させた DNA に加え混和した後、手短に遠心した。
- (5) 37°C で 1 時間インキュベートした。
- (6) 0.2 M の EDTA 2  $\mu$ l を加えて、ラベリング反応を停止させた。

#### 5.1、5.2 の実験、サザンハイブリダイゼーション

クロモソームの制限酵素処理およびナイロンメンブレンへの DNA の転写

- (1) クロモソームの制限酵素処理を 37°C、over night で行った。使用した制限酵素は  $\Delta fabB$  Km<sup>r</sup> 株 : SalI および PstI、 $\Delta fabH$  Km<sup>r</sup> 株 : SphI および BglII、 $\Delta fabF$  Km<sup>r</sup> 株 : NcoI および HindIII である。
- (2) 制限酵素処理後、1%アガロースゲルで電気泳動した。EtBr でゲルを染色後、定規とともにゲル撮影装置（日本ジェネティクス）で写真撮影した。
- (3) 蒸留水で洗浄し、0.125 M HCl（depurination solution）中で約 10 分間振盪した。
- (4) 蒸留水で洗浄後、denaturation buffer 中で 30 分間振盪し、DNA を一本鎖化した。

denaturation buffer の組成

1 L あたりに、87.66 g の NaCl、20 g の NaOH を含む。

- (5) 蒸留水で洗浄し、neutralization buffer 中で 30 分間振盪した。

neutralization buffer の組成

1 L あたりに、87.66 g の NaCl、60.5 g の Trizma base を含む。pH は 7.5 に調整した。

- (6) 蒸留水で洗浄後、ナイロンメンブレン Amersham Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>（GE Healthcare）に DNA を転写した。DNA の転写には、キャピラリーブロットティング装置またはバキュームトランスファー装置（BIO CRAFT）を用い、試薬として 20×SSC を使用した。20×SSC は、1 L 中に 88.23 g Tri-sodium citrate、175.32 g の NaCl を含み、pH が 7 から 8 になるように調整した水溶液である。
- (7) DNA 転写後のメンブレンをアルミホイルで包み、80°C で 2 時間ベーキングし DNA を固定させた。

この後の操作は、DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter KitI（Roche）のプロトコールに従った。

### DNA プローブのハイブリダイゼーション

- (1) ハイブリダイゼーション温度 (42°C) まで加温した適量の DIG Easy Hyb (ハイブリダイゼーション溶液) を用い、ハイブリダイゼーションオーブンで 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。
- (2) DIG ラベルした DNA プローブ (約 25 ng/ml) を 5 分間煮沸させた後、ただちに氷水中で冷却させて変性させた。
- (3) 変性後のプローブをあらかじめ 50°C に加温した DIG Easy Hyb に加えて混和した。
- (4) プレハイブリダイゼーション溶液を捨てて、3 で作製したハイブリダイゼーション溶液を加え 50°C、over night でハイブリダイゼーションを行った。

### ストリンジェンシー洗浄

- (1) 2×SSC、0.1%SDS 溶液中で、ハイブリダイゼーション後のメンブレンを振盪させて、洗浄を行った。(15~25°C 下、5 分間×2 回)
- (2) 0.5×SSC、0.1%SDS 溶液中でメンブレンを振盪させて、洗浄を行った。(65°C、15 分間×2 回)

### 免疫検出

#### 用いた試薬

- ・ 洗浄用バッファー 0.1 M マレイン酸、0.15 M NaCl、0.3% (v/v) Tween 20、pH7.5
- ・ マレイン酸バッファー 0.1 M マレイン酸、0.15 M NaCl、pH7.5
- ・ 検出用バッファー 0.1 M Tris-HCl、0.1 M NaCl、pH9.5
- ・ ブロッキング溶液 10×ブロッキングストック溶液をマレイン酸バッファーで 10 分の 1 希釈した。
- ・ 抗体溶液 抗ジゴキシゲニン-AP をブロッキング溶液で希釈し 150 mU/ml にした。
- ・ 発色基質溶液 10 ml の検出用バッファーに NBT/BCIT 200 µl を加えた。

ここからの作業 (発色反応を除く) は 15~25°C で振盪させながら行った。

- (1) メンブレンを洗浄用バッファー中で 5 分間振盪し洗浄した。
- (2) ブロッキング溶液 (100 ml/メンブレン 100 cm<sup>2</sup>) 中で、30 分間インキュベートした。
- (3) 抗体溶液 (20 ml/メンブレン 100 cm<sup>2</sup>) で、30 分間インキュベートした。
- (4) 洗浄用バッファー (100 ml/メンブレン 100 cm<sup>2</sup>) 中で、15 分間×2 回、洗浄した。
- (5) 検出用バッファー中で、5 分間平衡化させた。
- (6) 10 ml の発色基質溶液中にメンブレンを入れ、暗下でインキュベートし発色反応を行った。
- (7) 目的のバンドが見えたので、メンブレンを 50 ml の TE (pH8.0) 中で 5 分間振盪し



発色反応を停止させた。

### 5.3 の実験、Cre の発現による *loxP* 部位特異的組換え

705-Cre のプロトコールに従い、Cre タンパク質の発現および *loxP* 部位特異的組換えを行った。

#### 705-Cre のプロトコール

- (1)  $\Delta fab$  Km<sup>r</sup> 株のコンピテントセルを作製し、705-Cre を導入した。Cre が発現してプラスミドが脱離しないように 30°C で 2 時間、薬剤耐性遺伝子発現のための培養を行い、12.5 µg/ml のクロラムフェニコール (Cm) および 15.0 µg/ml のカナマイシンが入った LB 寒天培地 (LB Cm-Km) にまいた。
- (2) 液体 LB Km 培地 1 ml に形成されたコロニーより植菌し、30°C で 4 時間程度振盪培養した。その後、培養温度を 37°C に変えて終夜培養した。
- (3) 翌日、Cre 発現後の培養液を LB 寒天培地にまき、37°C で培養しシングルコロニーを形成させた。シングルコロニーをピックアップし、LB 培地および LB Km 培地に植菌し、37°C で培養した。
- (4) LB 培地のみに生育した株および BL21 元株を用いて、*fab* 遺伝子および *fab* 遺伝子の上下流 2 kbp が増幅するようにプライマーを組み合わせ PCR を行った。増幅された PCR 断片の大きさの違いで、遺伝子が破壊されているかどうかを確認した。

### 6.1 および 6.2 の実験

#### *E. coli* BL21 株および各 FAS 破壊株における RNA 抽出と cDNA 作製

脂肪酸入り (0.1% tween40、0.1% tween80、0.02% オレイン酸) LB 寒天培地に *E. coli* BL21 株および FAS 破壊株のグリセロールストックを植菌し、37°C で 12 時間インキュベートしコロニーを形成させた。次に、各菌株のシングルコロニーを取り、LB 液体培地 2 mL に植菌し、37°C、245 rpm で前培養を行った。*E. coli* BL21 株と  $\Delta fabF$  株は 15 時間、 $\Delta fabB^*$ 、 $\Delta fabH$ 、 $\Delta fabB^*H$ 、 $\Delta fabFH$  株は 18 時間培養した。その後、2 mL の LB 液体培地に各前培養液を 1%植菌し、37°C、245 rpm で O.D<sub>600</sub> が 1.3 になるまで培養した。各菌株の培養液を 0.5 ml ずつ取り、RNA 抽出に用いた。RNA の抽出は、RNA protect Bacteria reagent および RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用い、キットのプロトコールに従い RNA 抽出を行った。

### 6.1 および 6.2 の実験

#### qRT-PCR による遺伝子転写量の測定

qRT-PCR には、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いた。qRT-PCR

に用いた各遺伝子のプライマーおよび qRT-PCR の反応液組成は以下に示したとおりである。qRT-PCR の反応条件は、95°C で 30 秒間初期変性を行った。その後、95°C で 5 秒、60°C で 30 秒反応させるサイクルを 40 サイクル行い、変性およびアニーリング/伸長反応を行った。*rrsA* を標準遺伝子として $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて各遺伝子の転写量について *E. coli* BL21 親株を 1.0 倍とした時の値を算出した。サンプル数は n=3 で行った。

#### qRT-PCR の反応液組成

SYBR <i>Premix Ex Taq</i> II	12.5 $\mu$ l
PCR Forward Primer	1 $\mu$ l
PCR Reverse Primer	1 $\mu$ l
cDNA ( 9 ng/ $\mu$ l )	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	8.5 $\mu$ l

#### 6.1 および 6.2 の実験に用いた qRT-PCR 用のプライマー

<i>rrsA</i> -RTPCR-F	AGATCTGGAGGAATACCGGT
<i>rrsA</i> -RTPCR-R	GTCGACTTAACGCGTTAGCT
<i>fadR</i> -RTPCR-F	ATCTGGAATAACCGCTTCC
<i>fadR</i> -RTPCR-R	ATTATTCACCTTCGTCGGC
<i>fabF</i> -RTPCR-F	GGCAATACCGTAGAGTCTACCT
<i>fabF</i> -RTPCR-R	GCGAGATAATGTCCTCACAGT
<i>fabB</i> -RTPCR-F	ATCGGTAATAACCAGCAGGA
<i>fabB</i> -RTPCR-R	GATTGCCTGCTCCATAGAA
<i>fabH</i> -RTPCR-F	CGAGTGGATTGTCACCTCGTA
<i>fabH</i> -RTPCR-R	GTGCGTAGCAGAAGTCGTT
<i>fabD</i> -RTPCR-F	GCCAGCTGAAGAAGTGAATAA
<i>fabD</i> -RTPCR-R	TACGGCTTCTTGTCATGAAC
<i>fabG</i> -RTPCR-F	AAGTTATTGGCACTGCGAC
<i>fabG</i> -RTPCR-R	TATCACGAGTGATACCGGC
<i>acpP</i> -RTPCR-F	AGCACTATCGAAGAACGCG
<i>acpP</i> -RTPCR-R	CTGGTGGCCGTTGCTGTA
<i>accA</i> -RTPCR-F	GTTAGCCGTCAGGATGAGAA
<i>accA</i> -RTPCR-R	GGTATAAGGACGCTGTGGAT
<i>accB</i> -RTPCR-F	ATCGAGCTGGTTGAAGAATC
<i>accB</i> -RTPCR-R	CGTACGATGTGACCACTGAT

accC-RTPCR-F	AACTGGCACAATCCATCTCC
accC-RTPCR-R	CGTTCCGCCAGATAGATAGC
accD-RTPCR-F	ATTCCTGAAGGGGTGTGGA
accD-RTPCR-R	CCTTCATCTAACAGGCTATGC
iclR-RTPCR-F	AGCCCAACTGAGCGAAGAACA
iclR-RTPCR-R	GTTACACGGTGCTCATCGAAA
aceA-RTPCR-F	GGCAGAAAAACCTCGACGAC
aceA-RTPCR-R	GCTGCTGCACTTTCTCAACG
aceB-RTPCR-F	ACAGGCAACAACAACCGATG
aceB-RTPCR-R	CAGGCAACGTTCCGTTATCA
aceK-RTPCR-F	GCTTCGAGATTGCGGAGA
aceK-RTPCR-R	TAACGCGCATCAGCAGAG

#### 7.1 の実験 *E. coli* BL21 株および FAS 破壊株における HPLC を用いた ppGpp の定量

野村らの論文<sup>35)</sup>を参考にし、以下の方法で *E. coli* BL21 株および FAS 破壊株における ppGpp を抽出した。まずは、脂肪酸入り (0.1% tween40、0.1% tween80、0.02% オレイン酸) LB 寒天培地に *E. coli* BL21 株および FAS 破壊株のグリセロールストックを植菌し、37°C で 12 時間インキュベートしコロニーを形成させた。次に、各菌株のシングルコロニーを取り、LB 液体培地 50 mL に植菌し、37°C、120 rpm で前培養を行った。*E. coli* BL21 株と  $\Delta fabF$  株は 15 時間、 $\Delta fabB^*$ 、 $\Delta fabH$ 、 $\Delta fabB^*H$ 、 $\Delta fabFH$  株は 18 時間培養した。次に、新たに 2 L のバッフル付き三角フラスコに LB 培地 1 L を用意し、前培養液を 1% (10 ml) 植菌し、OD<sub>600</sub> が 0.5 になるまで 30°C、100 rpm で本培養を行った。本培養終了後、1 L 分の菌体を集菌した。その後、各菌株のペレットを 30 ml の methanol に懸濁し、超音波破碎した。破碎後、4°C、10,000 rpm で 30 分間遠心分離を行った。50 ml のプラスチックチューブを用意し、上清を 15 ml ずつ分けて、クロロホルム 25 ml、滅菌水 10 ml を入れて混合した。そして、4°C、10,000 rpm で 15min を行った。その後、水層を全量取り、遠心エバポレータで濃縮乾固した。1 ml 以下まで濃縮後、全量をフィルターで濾過し、完全に濃縮乾固させた。濃縮乾固物を 20  $\mu$ l の low ionic buffer に溶解し、全量を HPLC で分析した。HPLC の分析条件は以下の通りである。ppGpp 標品の分析から検量線を作製し、菌体からの抽出物からの面積値を検量線に当てはめることで、ppGpp 量を算出した。

## HPLC 分析条件

カラム : PARTISIL 10 SAX 4.6 ID×250 mm (Hichrom)

溶媒 : A (low-ionic strength buffer) : 7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 4.0

B (high-ionic strength buffer) : 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0.5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pH 5.4

グラジエント A/B : 0 min (100/0)、20 min (0/100)、40 min (0/100)、41 min (100/0)

254 nm で分析

### 7.2.1 の実験 LC-MS を用いた ppGpp の分析系の構築

#### 7.2.1 tripleQ MS を用いた ppGpp イオン化の条件の最適化検討

ppGpp のイオン化の条件は、毎回測定時に最適化を行った。その一例の条件を示す。

Ion mode: negative ion mode

Tune method

- Spray voltage 4000 V
- Vaporizer temperature 0 °C
- Sheath gas pressure 50
- Ion sweep gas pressure 0
- Aux gas pressure 0
- Capillary temperature 270 °C
- Tube lens offset -115 V
- Collision pressure 1.5 mTorr
- Collision energy 25 V

negative ion mode における MS/MS の測定条件

parent ion  $m/z$  602. product ion  $m/z$  504.2

#### 7.2.1 の実験 ppGpp の検量線の作成

TriLink Biotechnologies 社から購入した ppGpp 標品 (100 mM 水溶液) を、20 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  とアセトニトリルの等量混合液で希釈した。作製した標品から 1 pmol、5 pmol、10 pmol、15 pmol、20 pmol、25 pmol をインジェクションし、その面積値から検量線を作製した。

### 7.2.1 の実験 LC-MS 解析における LC の条件

カラム : SeQuantZIC-HILIC 3.5  $\mu\text{m}$  200 $\text{\AA}$  2.1 ID $\times$ 150 mm (Merck 社)

溶媒 : A: 20 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  B : acetonitrile

Isocratic 分析 A/B : 50/50

### 7.2.2 の実験 LC-MS を用いた *E. coli* BL21 株および $\Delta fabH$ 株における ppGpp 量の解析

脂肪酸入り (0.1% tween40、0.1% tween80、0.02% オレイン酸) LB 寒天培地に *E. coli* BL21 株および $\Delta fabH$  株のグリセロールストックを植菌し、37°C で 12 時間インキュベートしコロニーを形成させた。次に、各菌株のシングルコロニーを取り、LB 液体培地 2 mL に植菌し、37°C、120 rpm で前培養を行った。*E. coli* BL21 株は 15 時間、 $\Delta fabH$  株は 18 時間培養した。これを前培養液とした。50 mL の新たな LB 液体培地を用意し、前培養液を 1%植菌し、OD<sub>600</sub> が 0.5 になるまで培養した (37°C、120 rpm)。10 mL の菌体を集菌した (8,000 rpm、10 min、4°C)。ペレットを 500  $\mu\text{l}$  の methanol に懸濁し、超音波破碎した (BIORUPTOR を用いて 30 秒の破碎を 10 回行った)。その後、上清を得るために遠心分離を行った (15000 rpm、20 min、4°C)。上清 500  $\mu\text{l}$  を取り、クロロホルム 800  $\mu\text{l}$ 、滅菌水 300  $\mu\text{l}$  を入れて混合した。水層とクロロホルム層を分けるために、遠心分離を行った (15,000 rpm、15min、4°C)。水層を取り、ultra MC フィルター (Merck) で濾過後 (12000 g、4 min、4°C)、0.22  $\mu\text{m}$  の水層フィルター (ラボラボカンパニー) で更に濾過し、遠心エバポレーターで濃縮乾固した。50  $\mu\text{l}$  の 20 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ :acetonitrile=1:1 溶液に溶かして LC-MS サンプルとした。そのうちの 5  $\mu\text{l}$  をインジェクションした。LC-MS の分析条件は 7.2.1 の実験と同様である。

## 第二章 大腸菌生体内における一次代謝流量を調節する因子の探索と解析

## 10. 序論

### 10.1 Keio collection

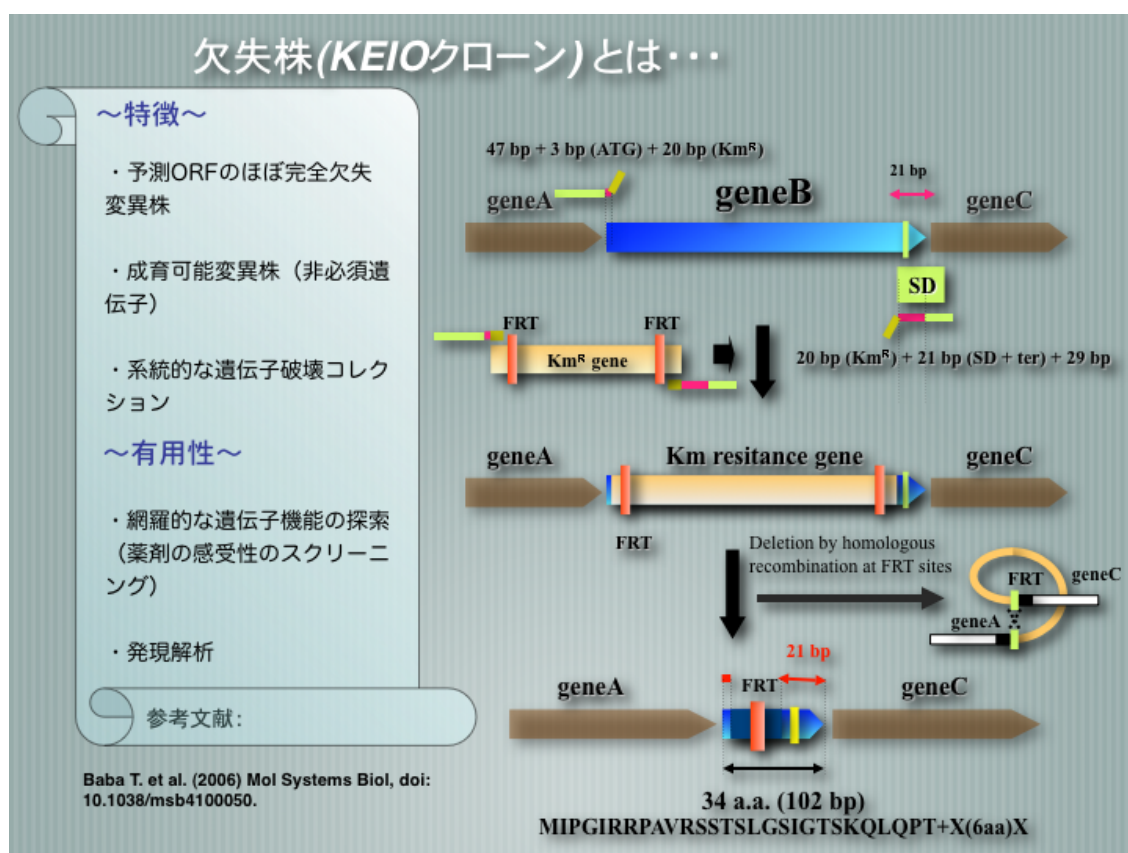


figure 10-1. Keio collection

(出典: <http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/nbrp/explanation/KEIOCollection.jsp>)

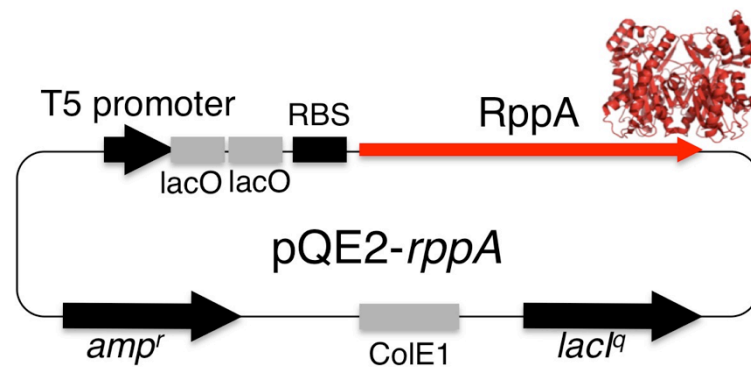
大腸菌には 4,288 の遺伝子がある。奈良先端科学技術大学院大学の森浩禎博士らが作製した Keio collection (figure 10-1) は、*E. coli* K-12 BW25113 株を親株として、3,985 種類の非必須遺伝子について単一遺伝子欠損株を作製したものである<sup>36)</sup>。森らは、 $\lambda$  Red による相同組換え<sup>32)</sup>を用い、予想遺伝子の 4,288 遺伝子の遺伝子破壊を試みた。その結果、303 遺伝子が必須遺伝子であることが判明し<sup>36)</sup>、結果として、3,985 遺伝子の破壊株コレクションの作製に成功した。本破壊株コレクションは、FRT/FLP リコンビネーションを用いて欠失株として作製されている (figure 10-1)。FLP recognition target (FRT) 配列に挟まれたカナマイシン耐性遺伝子配列の外側から、 $\lambda$  Red の認識に必要な 50 bp の相同領域を有する PCR プライマーで増幅し、染色体上の相同遺伝子と相同組換えを起こさせる。この相同組換え体に FLP リコンビナーゼを発現させることで、2 つの FRT 配列間で相同組換えが起こり、挟まれたカナマイシン耐性遺伝子が脱落する。以上の操作により、遺伝子欠失株が作製できる。特徴的な点としては、破壊する遺伝子の開始コドンおよび終始コドンとそのすぐ上流 18 bp を PCR プライマー (50 bp の相同領域を有する) にそれぞれ含めることで、遺伝子欠失株は破壊する遺





## 10.2 Keio collection を用いた一次代謝流量を調節する未知因子のスクリーニング

私は大腸菌における RppA の発現プラスミド pQE2-*rppA* (figure 10-4) を構築することにより、生体内の malonyl-CoA 量を簡便に評価する系を構築した。そして、pQE2-*rppA* を Keio collection 全 3,985 株に導入した。前章でも述べたように、RppA は、5 分子の malonyl-CoA から THN の合成を触媒する。THN は空気中で直ちに酸化されて、赤色色素 flaviolin に変換される。したがって、菌株が生産する flaviolin を測定することによって菌体内における malonyl-CoA 量を間接的に定量することが可能である。本実験においては、各菌株の flaviolin 生産量に関して、96 穴プレートを用いて吸光度測定を行うことで比較した。



**figure 10-4.** pQE2-*rppA* のコンストラクト RBS は ribosome binding site、amp<sup>r</sup> はアンピシリン耐性遺伝子、ColE1 は複製起点を示す。

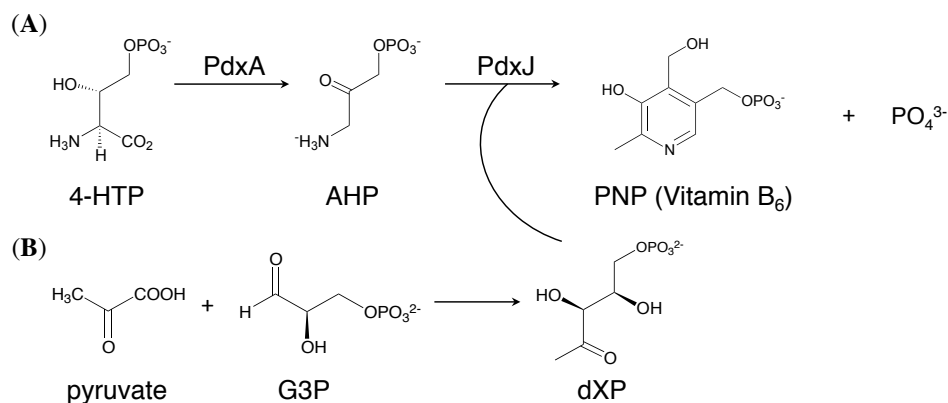
私は当研究室の山本と共に、3,985 株の *rppA* 組換え体について、LB 培地、37℃において好氣的に 24 時間培養し、それらの培養上清中の flaviolin 量を定量した。その結果、遺伝子を欠損させると flaviolin 生産量が上昇する陽性株がいくつか得られた。本論文では、そのうち陽性株である  $\Delta$ *pdxJ* 株について詳細を述べることとする。PdxJ は、vitamin B6 の生合成に関与している。私は、*yhjB* 遺伝子の欠損が如何にして flaviolin の生産量を上昇させたのかを明らかにするために以下の実験を行った。

## 11. $\Delta pdxJ$ 株における極性効果による $acpS$ の転写抑制

### 11.1 PdxJ

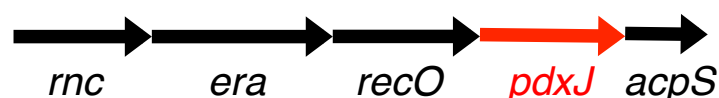
PdxJ は、vitamin B<sub>6</sub> 誘導体の 1 つである pyridoxine 5-phosphate (PNP) の合成を触媒する。PdxJ は、その反応基質として 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (dXP) を用いる。dXP は、非メバロン酸経路においてピルビン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸 (G3P) より dXP synthase によって合成される (figure. 11-1)<sup>37)</sup>。  $pdxJ$  欠損株において malonyl-CoA プールが増強された要因として 2 つの可能性が考えられる。1 つめの可能性として、極性効果による必須遺伝子  $acpS$  の転写抑制が挙げられる。染色体上において  $pdxJ$  のすぐ下流には、脂肪酸合成において重要な役割を果たすアシルキャリアープロテイン (AcpP) の holo 化を触媒する  $acpS$  がある (figure. 11-2)。すなわち、 $pdxJ$  の破壊による極性効果により  $acpS$  の転写が抑制されたと考えられる。脂肪酸合成が阻害されると、malonyl-CoA プールが増強されるのは第一章に示したとおりである。

またもう一つの可能性として、 $pdxJ$  が欠失することで dXP の消費が抑制され、ピルビン酸が余剰となり、余剰となったピルビン酸の代謝流路が変化し、acetyl-CoA および malonyl-CoA 合成に用いられるという可能性が考えられる。私は、1 つめの可能性を検討すべく、 $pdxJ$  欠損株の in-frame mutant の作製および  $acpS$  遺伝子の転写量解析を行った。



**figure 11-1. PdxJ の反応** Vitamin B<sub>6</sub> 生合成経路 (A) および非メバロン酸経路

(B) AHP と非メバロン酸経路の生成物である dXP の反応を触媒し、PNP (Vitamin B<sub>6</sub>) を生成する。



**figure 11-2.  $pdxJ$  を含むオペロン**  $pdxJ$  のすぐ下流には必須遺伝子  $acpS$  が存在する。

## 11.2 $\Delta pdxJ$ 株における極性効果による $acpS$ の転写抑制

Keio collection は figure 10-2 で示したように、ターゲットとなる遺伝子に対してカナマイシン耐性遺伝子と相同組換えを起こすことによって目的遺伝子の欠損株を取得している。したがって、この状態の遺伝子欠損株は **in-frame mutant** ではないために、欠損させた遺伝子の下流に極性効果が生じている可能性がある。本実験における  $pdxJ$  欠損株において、脂肪酸合成において重要な  $acpS$  の転写が抑制された可能性を検証するために、 $pdxJ$  欠損株に FLP リコンビナーゼを発現させカナマイシン耐性遺伝子を除去することで、**in-frame mutant** を取得した。本実験では、 $pdxJ$  欠損株のうちカナマイシン耐性遺伝子保有株を  $\Delta pdxJ$  ( $Km^r+$ ) 株、**in-frame mutant** を  $\Delta pdxJ$  ( $Km^r-$ ) 株と呼ぶこととする (figure 11-3)。

私は、*E. coli* BW25113 株、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^r+$ ) 株、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^r-$ ) 株の対数増殖期における  $acpS$  の転写量を qRT-PCR により解析した。その結果、*E. coli* BW25113 株の  $acpS$  転写量を 1.0 とした場合、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^r+$ ) 株では 0.1、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^r-$ ) 株では 0.3 となった (figure 11-4)。つまり、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^r-$ ) 株では極性効果がなくなったことによって、 $acpS$  の転写量が回復したと考えられる。また私は、同 3 菌株における脂肪酸量および細胞内 malonyl-CoA 量および脂肪酸量を測定した。その結果、脂肪酸量については、*E. coli* BW25113 親株における総脂肪酸を 100 とした場合、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^r+$ ) 株では 69 と減少していた。 $\Delta pdxJ$  ( $Km^r-$ ) 株では、 $acpS$  の転写量が回復したために、脂肪酸合成量も増え、親株の 79% の脂肪酸量が見られた (figure 11-5)。一方、malonyl-CoA 濃度に関しては、親株では 0.19 nM/OD<sub>600</sub> であったのに対し、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^r+$ ) 株では脂肪酸合成が阻害されていることが起因して 0.68 nM/OD<sub>600</sub> と増加していた。なお、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^r-$ ) 株では、0.21 nM/OD<sub>600</sub> であり親株と近い値を示した (figure 11-6)。

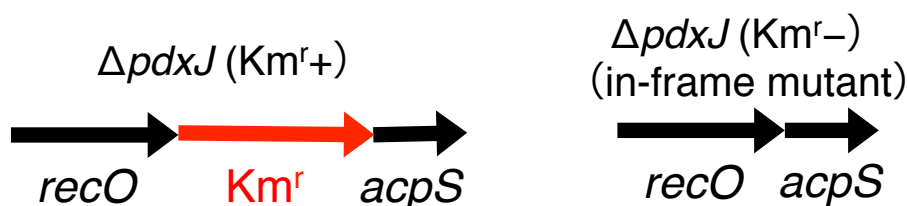
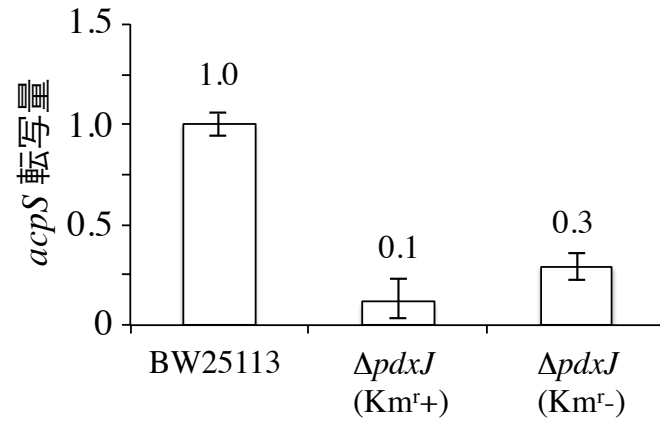
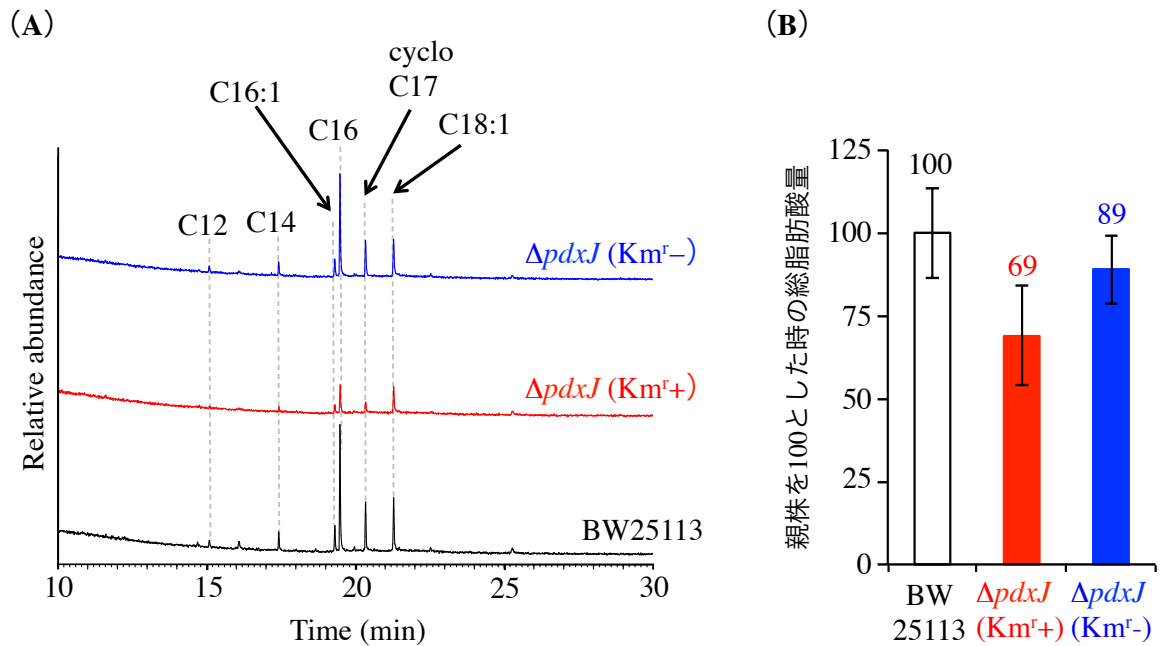


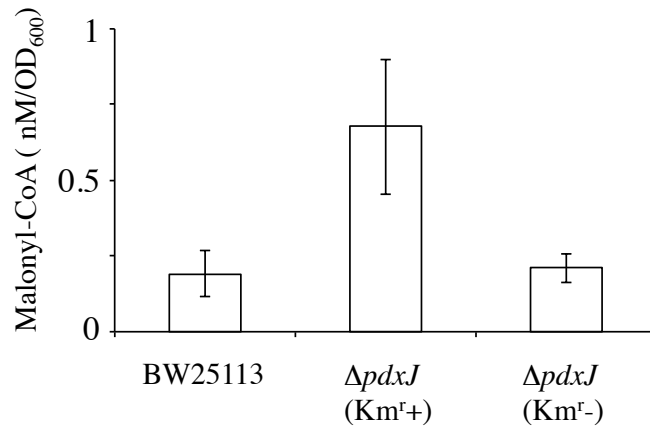
figure 11-3.  $\Delta pdxJ$  ( $Km^r+$ ) 株および  $\Delta pdxJ$  ( $Km^r-$ ) 株における遺伝子配座。



**figure 11-4.** *E. coli* BW25113、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^{r+}$ )、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^{r-}$ ) における qRT-PCR による *acpS* の転写量解析 各サンプルは n=3 で行った。

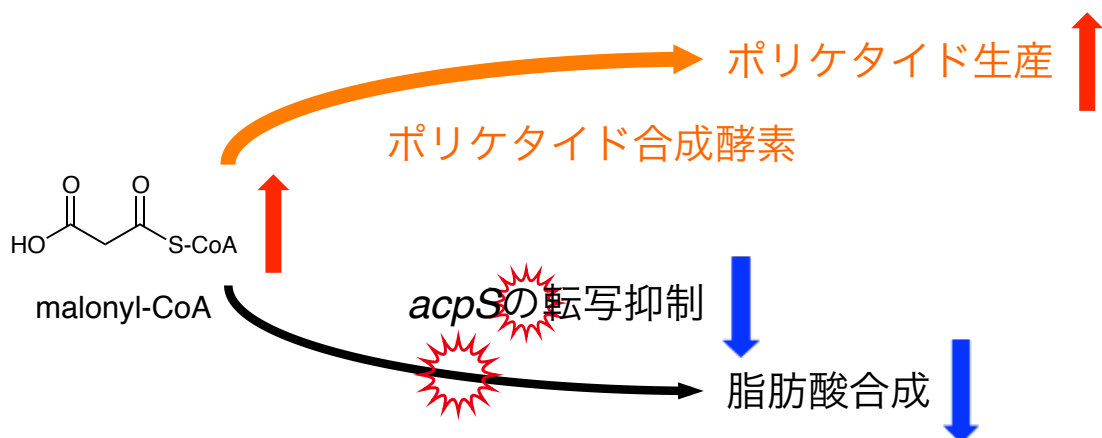


**figure 11-5.** *E. coli* BW25113、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^{r+}$ )、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^{r-}$ ) における脂肪酸の分析 (A) GC/MS による脂質の分析結果、(B) 総脂肪酸量の比較。各サンプルは n=3 で実験を行った。



**figure 11-6.** *E. coli* BW25113、 $\Delta pdxJ$  (Km<sup>+</sup>)、 $\Delta pdxJ$  (Km<sup>-</sup>) における細胞内 malonyl-CoA の分析 各サンプルは n=3 で行った。

以上の実験結果より、私は *pdxJ* 欠損株による下流遺伝子の極性効果により *acpS* の転写量が減少し、脂肪酸合成が阻害されたことが flavin 増産に寄与したことを明らかにした (figure 11-7)。figure. 11-4 に示したように、 $\Delta pdxJ$  (Km<sup>+</sup>) 株での *acpS* の転写量は親株と比較して 9 割減少しており、 $\Delta pdxJ$  (Km<sup>-</sup>) 株では親株の 7 割少なかった。それでも、この 2 割の *acpS* 転写量の差が脂肪酸合成において、重要な課程である ACP の holo 化に大きな影響を与えたと考えられる。よってこの *acpS* 転写量の差が、figure. 11-5 および figure. 11-6 に示したとおり、菌体内の脂肪酸量、malonyl-CoA 量の違いにも現れたことが示唆される。また、in-frame mutant である  $\Delta pdxJ$  (Km<sup>-</sup>) 株において *acpS* の転写量が親株と同等まで回復しなかったのは、欠損した *pdxJ* 中に *acpS* の転写を制御している塩基配列がある可能性が考えられる。または、PdxJ が合成されないことで、一部の一次代謝のバランスが崩れたことが、脂肪酸合成に関する遺伝子の転写量に影響を及ぼした可能性も考えられる。



**figure 11-7.** *pdxJ* 欠損株におけるポリケタイド増産の要因

## 12. 第二章のまとめ

奈良先端科学技術大学院大学の森浩禎博士らが開発した **Keio collection** は、大腸菌 *E. coli* BW25113 株を親株とした 3,985 種類の非必須遺伝子の単一遺伝子欠損株コレクションである。私は、これらの中に、欠損させるとポリケタイドの生産量を上昇させる遺伝子が存在するのではないかと考えた。そこで私は、全欠損株に pQE2-*rppA* を導入した **Keio collection** を用い、flaviolin の定量を行った。その結果、いくつかの遺伝子欠損株について、flaviolin の生産量が親株である *E. coli* BW25113/pQE2-*rppA* よりも増加した。flaviolin 生産量が増加した理由として、malonyl-CoA の代謝流量が増強された、細胞内 ATP などの発酵エネルギーが上昇した、プラスミド、mRNA、タンパク質の安定性が向上しポリケタイド合成酵素の量が増えた等の可能性が考えられた。私は、スクリーニング陽性株のうち  $\Delta$ *pdxJ* 株に関して、flaviolin 生産量が増加した要因について精査した。

*pdxJ* 欠損株では、**Keio collection** において in-frame mutant 作製前のカナマイシン耐性遺伝子が除去されていない株によって、下流遺伝子の転写が極性効果を受けたことが判明した。*pdxJ* の即下流の遺伝子である脂肪酸合成に関する *acpS* の転写量が減少し、脂肪酸合成が阻害されたことが flaviolin 増産に寄与したことを明らかにした。

## 13. 第二章の実験項

### 10.2 の実験

Keio collection の pQE2-*rppA* 形質転換体が生産する flaviolin の定量

- (1) 96 穴ディープウェルに 800  $\mu$ l ずつ LB Amp 培地 (50  $\mu$ g/ml) を入れ、グリセロールストックを 5  $\mu$ l 植菌した。コントロールとして、KEIO collection の元株である *E. coli* BW25113 株に pQE2、pQE2-*rppA* を形質転換した *E. coli* BW25113/pQE2 株および *E. coli* BW25113/pQE2-*rppA* 株も同じ 96 穴ディープウェルプレートに空ウェルに植菌した。
- (2) 12 時間 1,500 rpm で振とう培養し、前培養とした。
- (3) 96 穴ディープウェルに 800  $\mu$ l ずつ LB Amp 培地を入れ、前培養液を 20  $\mu$ l ずつ植菌し、37°C、1,500 rpm で本培養を開始した。n = 2 で行った。
- (4) 本培養開始 1.5 時間後に 4 mM IPTG を 20  $\mu$ l (終濃度 0.4 mM) 入れてタンパク質の発現を誘導した。
- (5) 本培養 24 時間後に培養を止めた。
- (6) 96 穴ディープウェルを 3,500 rpm で 10 分間遠心して集菌した。
- (7) 上清 200  $\mu$ l を 96 穴マルチプレートに入れ、マルチプレートリーダーで flaviolin の吸収波長である 447 nm の吸光度を測定した。

### 11.2 の実験

*E. coli* BW25113 株および  $\Delta$ *pdxJ* 株における qRT-PCR による *acpS* の転写量解析

#### RNA 抽出と cDNA 作製

LB 寒天培地に *E. coli* BW25113 株、 $\Delta$ *pdxJ* ( $Km^r$ +) 株、 $\Delta$ *pdxJ* ( $Km^r$ -) 株のグリセロールストックを植菌し、37°C で 12 時間インキュベートしコロニーを形成させた。次に、各菌株のシングルコロニーを取り、LB 液体培地 2 mL に植菌し、37°C、245 rpm で 18 時間前培養を行った。その後、2 mL の LB 液体培地に各前培養液を 1%植菌し、37°C、245 rpm で O.D600 が 1.3 になるまで培養した。各菌株の培養液を 0.5 ml ずつ取り、RNA 抽出に用いた。RNA の抽出は、RNA protect Bacteria reagent および RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用い、キットのプロトコールに従い RNA 抽出を行った。

#### qRT-PCR による遺伝子転写量の測定

qRT-PCR には、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いた。qRT-PCR に用いた各遺伝子のプライマーおよび qRT-PCR の反応液組成は以下に示したとおりである。qRT-PCR の反応条件は、95°C で 30 秒間初期変性を行った。その後、95°C

で 5 秒、60°C で 30 秒反応させるサイクルを 40 サイクル行い、変性およびアニーリング/伸長反応を行った。*rrsA* を標準遺伝子として、 $\Delta\Delta C_t$  法を用いて各遺伝子の転写量について、*E. coli* BL21 親株を 1.0 倍とした時の値を算出した。各サンプル数は  $n=3$  で行った。

#### qRT-PCR の反応液組成

SYBR Premix Ex Taq II	12.5 $\mu$ l
PCR Forward Primer	1 $\mu$ l
PCR Reverse Primer	1 $\mu$ l
cDNA ( 9 ng/ml )	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	8.5 $\mu$ l

#### qRT-PCR に用いたプライマー

rrsA-RTPCR-F	AGATCTGGAGGAATACCGGT
rrsA-RTPCR-R	GTCGACTTAACGCGTTAGCT
acpS-RTPCR-F	AGCACGGATATTGTGGAGAT
acpS-RTPCR-R	CCGAGCTCATCATTGAATACT

## 11.2 の実験

*E. coli* BW25113 株および $\Delta pdxJ$  株における LC-MS による細胞内 malonyl-CoA 量解析

*E. coli* BW25113 株および $\Delta pdxJ$  ( $Km^+$ ) 株、 $\Delta pdxJ$  ( $Km^-$ ) 株のグリセロールストックを LB 寒天培地に植菌し、37°C で 12 時間インキュベートしコロニーを形成させた。シングルコロニーをピックアップし、LB 液体培地 2 ml に植菌し、37°C、245 rpm で 12 時間培養した。これを前培養とした。次に、丸底フラスコに 50 ml ずつ LB 培地を入れ、前培養液を 500  $\mu$ l 植菌し、30°C、120 rpm で本培養を開始した。本培養 8 時間後に培養を止め、集菌を行った (10,000 rpm で 5 分間)。50 ml 分の菌体を 1 ml の滅菌水に懸濁し、懸濁液を 2 ml のマイクロチューブに移した。430  $\mu$ l の 6 % Perchloric acid を加え、菌体を完全に懸濁させることで、細胞の破碎を行った。その後、3 M  $K_2CO_3$  を加え、発泡がなくなるまで混合し、pH 試験紙によって中性になっていることを確認した。そして、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離を行い、上清を 0.22  $\mu$ m の親水性フィルター (ラボラボカンパニー) で濾過した。そのろ液を LC-tripleQ MS のサンプルとした。

LC-tripleQ MS (Thermo 社 TSQ Quantum) での分析カラムは、COSMOSIL Packed



Column 3C<sub>18</sub>-EB 2.0×150 mm (Nacalai Tesque) を用いた。溶媒は、5 mM 酢酸アンモニウム/メタノールを用い、流速は 200 µl/min に設定した。グラジエントは、5 mM 酢酸アンモニウム/メタノールが、0-2.5 min 95/5、2.5-8 min 55/45、8-8.5 min 95/5、8.5-15 min 95/5 となるように設定した。カラム温度は 40°C に設定した。parent ion *m/z* 854.1、product ion *m/z* 346.7 で検出した。本実験は n=3 で行った。

## 11.2 の実験

*E. coli* BW25113 株および  $\Delta pdxJ$  株における GC-MS による脂肪酸の定量

*E. coli* BW25113 株および  $\Delta pdxJ$  株、 $\Delta pdxJ$  (Km<sup>r</sup>+) 株、 $\Delta pdxJ$  (Km<sup>r</sup>-) 株のグリセロールストックを LB 寒天培地に植菌し、37°C で 12 時間インキュベートしコロニーを形成させた。シングルコロニーをピックアップし、LB 液体培地 2 ml に植菌し、37°C、245 rpm で 12 時間培養した。これを前培養とした。次に、丸底フラスコに 50 ml ずつ LB 培地を入れ、前培養液を 500 µl 植菌し、30°C、120 rpm で本培養を開始した。本培養 8 時間後に培養を止め、集菌を行った (10,000 rpm で 5 分間)。培養液 1.5 ml より菌体を回収し遠心エバポレーターで 2 時間乾燥を行った。脂肪酸の抽出には methylation and purification of fatty acids (Nacalai tesque) を用いた。分析カラムは HP-5 MS (30 m × 0.25 id, 0.25 µm film thickness; Agilent) を使用した。グラジエントは 100°C 5 min, 100°C から 250°C を 10°C/min で 15 min, 250°C で 10 min 合計 30 min であり、移動相は He を用いた。化合物データベースの中から各脂肪酸メチルエステルの分子量を照合し、各ピークの面積を求めた。それらの合計を総脂肪酸量とした。

### 第三章 *Rhodococcus jostii* RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路の *in vitro* 再構築

## 14. 序論

### 14.1 $\beta$ -ケトアジピン酸経路

$\beta$ -ケトアジピン酸経路 ( $\beta$ -ketoadipate pathway) は、原核微生物およびカビに広く保存されている芳香族化合物の分解経路である<sup>38)</sup>。 $\beta$ -ケトアジピン酸経路は、protocatechuate branch と catechol branch と呼ばれる分岐経路から構成される (figure 14-1)。protocatechuate branch は、*p*-cresol、4-hydroxybenzoate やリグニンのモノマーから生成される protocatechuate を $\beta$ -ケトアジピン酸に異化する経路である。catechol branch は、芳香族炭化水素、含窒素芳香族化合物やリグニンのモノマーから生成される catechol を $\beta$ -ケトアジピン酸に異化する経路である。 $\beta$ -ケトアジピン酸は、さらに2段階代謝されることにより、TCA 回路の基質である acetyl-CoA および succinyl-CoA に異化される<sup>38)</sup>。

本経路は、原核微生物において広く保存されており、グラム陽性菌では *Bacillus* 属、*Rhodococcus* 属、*Arthrobacter* 属、*Nocardia* 属に存在している<sup>38)</sup>。また、グラム陰性菌では、*Acinetobacter* 属、*Alcaligenes* 属、*Burkholderia* 属、*Comamonas* 属、*Enterobacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Azotobacter* 属、*Rhizobium* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Agrobacterium* 属に保存されている<sup>38)</sup>。また、真菌においても同経路は存在しており、*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属、*Rhodotorula* 属などに広く分布していることが知られている。 $\beta$ -ケトアジピン酸経路に関与する酵素群の解析は、*Pseudomonas putida*<sup>39, 40)</sup>、*Acinetobacter calcoaceticus*<sup>41, 42, 43)</sup>、*Agrobacterium tumefaciens*<sup>44, 45, 46)</sup>などのグラム陰性菌において広く研究されている。

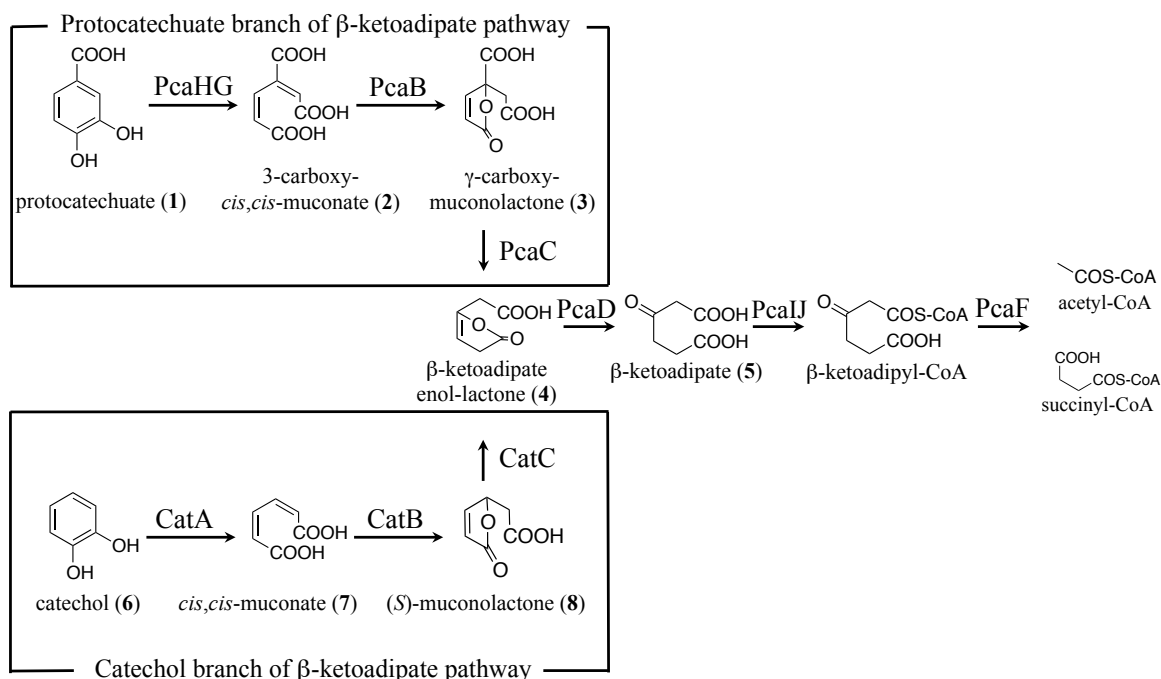


figure 14-1. グラム陰性菌における $\beta$ -ケトアジピン酸経路

## 14.2 *Rhodococcus jostii* RHA1

*Rhodococcus jostii* RHA1 (以下、RHA1) は、 $\gamma$ -ヘキサクロロシクロヘキサン (lindane) 汚染土壌から単離された放線菌である<sup>47)</sup>。また、RHA1 は *Rhodococcus* 属で最初に全ゲノム配列が決定された菌株である<sup>48)</sup>。RHA1 は環境汚染物質として懸念されているポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyl, PCB) やフタル酸類縁化合物などの難分解性芳香族化合物を効率的に分解する能力を持っており、バイオレメディエーションへの応用が期待されている。一般に $\beta$ -ケトアジピン酸経路に関する遺伝子は染色体上にコードされており<sup>38)</sup>、RHA1 においても *pca* 遺伝子群、*cat* 遺伝子群は染色体上にコードされている<sup>48)</sup>。RHA1 は、線形プラスミドである pRHL1、pRHL2、pRHL3 の 3 つを有しており、pRHL1 には、テレフタル酸 (terephthalate) を protocatechuate に異化する *tpa* 遺伝子群、フタル酸 (phthalate) を protocatechuate に異化する *pad* 遺伝子群がコードされている<sup>48)</sup>。また、catechol branch の上流となる安息香酸 (benzoate) を catechol に異化する *ben* 遺伝子群は、染色体上にコードされている<sup>49)</sup>。このような多様な代謝酵素の存在が、RHA1 の特徴の 1 つである。

上述のとおり、RHA1 における *pca* 遺伝子群は染色体上に存在し、*pcaJHGBLFR* からなるクラスターを形成している<sup>47, 50)</sup>。これらの酵素により protocatechuate は acetyl-CoA および succinyl-CoA まで異化される。*pcaH* および *pcaG* は protocatechuate 3,4-dioxygenase の 2 つのサブユニットをコードしている<sup>48)</sup>。*pcaB* は 3-carboxy-*cis,cis*-muconate lactonizing enzyme をコードしており、3-carboxy-*cis,cis*-muconate のラクトン化を触媒する<sup>48)</sup>。*pcaL* は  $\gamma$ -carboxymuconolactone decarboxylase および  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone hydrolase からなる融合タンパク質をコードしている<sup>48, 50, 51)</sup>。また、*cat* 遺伝子群は *catRABC* から構成されている<sup>50, 52)</sup>。*catA* は catechol 1,2-dioxygenase、*catB* は *cis, cis*-muconate lactonizing enzyme、*catC* は muconolactone isomerase をコードしている<sup>53)</sup>。

## 14.3 RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路に関する遺伝子破壊株の生育実験とトランスクリプトーム解析

原らは、RHA1 の $\beta$ -ケトアジピン酸経路における protocatechuate branch 中の遺伝子 *pcaB*、*pcaL* の各単独破壊株である  $\Delta$ *pcaB* 株、 $\Delta$ *pcaL* 株を作製し、テレフタル酸またはフタル酸を唯一の炭素源としたときの生育能を調べた。その結果、 $\Delta$ *pcaL* 株はテレフタル酸、フタル酸の両方で生育可能であるが、 $\Delta$ *pcaB* 株はフタル酸を唯一の炭素源として生育できないことを明らかにした。したがって、原らは RHA1 がテレフタル酸を炭素源とする時、 $\beta$ -ケトアジピン酸経路の protocatechuate branch および catechol branch の両方を使用している可能性がある<sup>と結論づけた</sup><sup>54)</sup>。

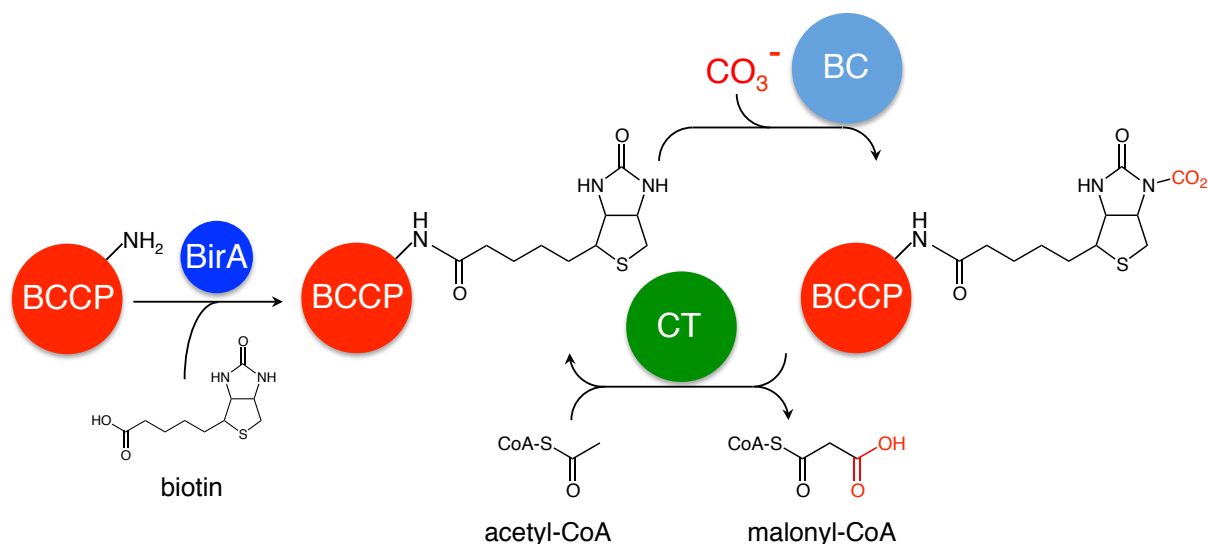
また、原らは、テレフタル酸を唯一の炭素源として RHA1 を生育させたとき、ピル

ビン酸を唯一の炭素源とした場合と比較して、発現が2倍以上上昇した遺伝子が521個存在することをマイクロアレイ解析により見いだした<sup>54)</sup>。その中には、catechol 異化に関与する *cat* 遺伝子群が含まれているだけでなく、acetyl-CoA carboxylase と相同性の高い *ro02782* も含まれていた。*ro02782* 遺伝子は、テレフタル酸を唯一の炭素源として *R. jostii* RHA1 を生育させた場合、ピルビン酸を炭素源とした時と比較して、発現が約40倍向上していた。原らは、この機能未知酵素 Ro02782 が RHA1 のβ-ケトアジピン酸経路における protocatechuate branch から catechol branch へのバイパス経路に関与している可能性が高いと推測した<sup>54)</sup>。

#### 14.4 ビオチン依存性カルボキシラーゼ

ビオチン依存性カルボキシラーゼは3つのサブユニットまたはドメインで構成されている。具体的には、biotin carboxylase (BC)、biotin carboxyl carrier protein (BCCP)、carboxyltransferase (CT) である。これらは2段階の反応によって炭酸イオンを有機化合物に固定する。1段階目の反応は BC を触媒として補酵素であるビオチンに炭酸を固定する反応である。2段階目の反応は CT を触媒としてビオチンに固定された炭酸を、基質におけるカルボキシル基の受容体に転移させる反応である。この2つの反応を架橋するのが BCCP であり、ビオチンの保持、炭酸の固定、運搬を担っている。また、BCCP のリジン残基にビオチンを付加する BirA もビオチン依存性カルボキラーゼの反応に関係する。

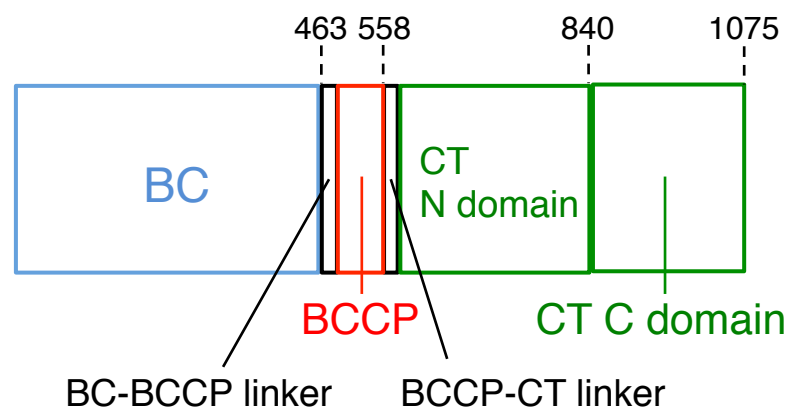
細菌では、acetyl-CoA carboxylase (ACC) は複数のサブユニットから構成されている。大腸菌においては、BC サブユニット、BCCP サブユニット、2つの CT サブユニットからなり、*accABCD* という遺伝子にコードされている。ここでは、大腸菌における acetyl-CoA を malonyl-CoA に変換する反応について概説する。まず、BirA が BCCP のリジン残基にビオチンを付加し、BC が BCCP に付加したビオチン上に CO<sub>2</sub> を固定化する。CT がこの CO<sub>2</sub> を acetyl-CoA に受け渡すことによって、malonyl-CoA が生成される (figure 14-2)。



**figure 14-2. BC、BCCP、CT、BirA による反応** BirA は BCCP にビオチンを結合し活性化状態である holo 体にする酵素である。次に BC が触媒することによって、ATP と  $\text{CO}_3^-$  により BCCP に付加したビオチンに  $\text{CO}_2$  を結合する。そして、CT により  $\text{CO}_2$  が acetyl-CoA に結合される。以上の反応により、acetyl-CoA は malonyl-CoA に変換される。

一方、ほとんどの真核生物では、ACC は約 250 kDa の大きさをもつ一本鎖のマルチドメイン酵素である。他のビオチン依存性カルボキシラーゼとして、propionyl-CoA carboxylase (PCC)<sup>55)</sup>、3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC)<sup>56)</sup>、pyruvate carboxylase (PC)<sup>57,58)</sup>、urea carboxylase (UC)<sup>59)</sup>などが挙げられる。ACC、PCC は $\alpha$ 位のカルボキシル化を行い、MCC は $\gamma$ 位のカルボキシル化を行う。

Tran らは、データベース解析により、細菌が持つ約 120 kDa の新規単鎖マルチドメイン型ビオチン依存性カルボキシラーゼを同定した<sup>60)</sup>。本酵素群は N 末端に BC ドメイン、中央に BCCP ドメイン、C 末端に CT ドメインをもつ (figure 14-3)。この酵素のホモログはグラム陽性菌、グラム陰性菌の両者に存在する。例えば、*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*、*Rhodopseudomonas palustris*、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* などに存在し、それぞれが高度に保存されたアミノ酸配列を有している<sup>60)</sup>。また、Tran らは *R. palustris* における新規カルボキシラーゼを用いて、この酵素が短鎖・中鎖の acyl-CoA よりも長鎖 acyl-CoA に高い反応性を示すことを明らかにした。その結果、これらの新規マルチドメイン型カルボキシラーゼを long-chain acyl-CoA carboxylase (LCC) と名付けた<sup>60)</sup>。



**figure 14-3.** 新規単鎖マルチドメイン型ビオチン依存性カルボキシラーゼのドメイン構造 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* における LCC (MapLCC) の例を示す。BC は biotin carboxylase、BCCP は biotin carboxyl carrier protein、CT は、carboxyltransferase である。数字は N 末端からのアミノ酸数を示す。

#### 14.5 本章の目的

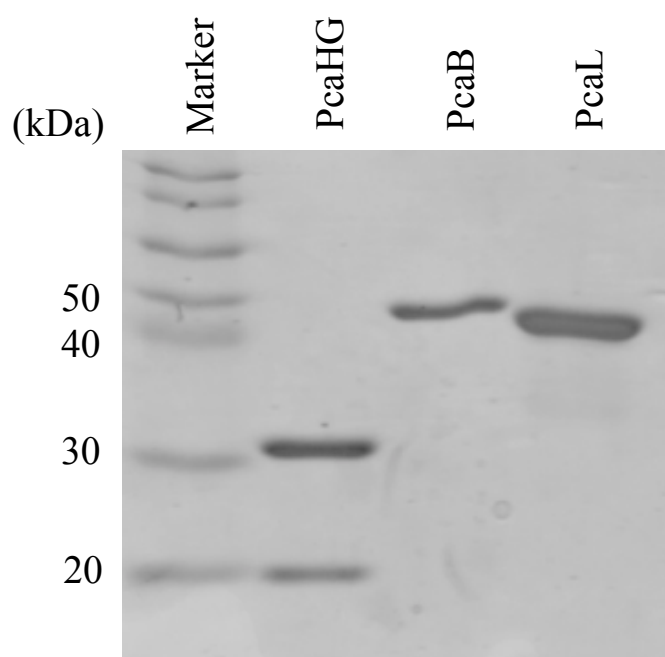
本章では、RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路について、その全容解明を目指した。グラム陰性菌の $\beta$ -ケトアジピン酸経路経路とは異なる部分があるにも関わらず、それらが見過ごされている可能性を考え、以下の実験を行った。まず、 $\beta$ -ケトアジピン酸経路のうち protocatechuate branch における PcaHG、PcaB、PcaL について、大腸菌を用いて組換えタンパク質を精製し *in vitro* 再構築を行った。その結果、PcaHG の protocatechuate 3,4-dioxygenase 活性、PcaB の 3-carboxy-*cis,cis*-muconate cycloisomerase 活性、PcaL の  $\gamma$ -carboxymuconolactone decarboxylase および  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone hydrolase 活性を *in vitro* で再構築することに成功した。次に、catechol branch における CatA、CatB、CatC に関して *in vitro* 再構築を行った。CatA は大腸菌を用いて、CatB および CatC は RHA1 を用いて組換えタンパク質を精製し、CatA の catechol 1,2-dioxygenase 活性、CatB の *cis,cis*-muconate cycloisomerase 活性、CatC の muconolactone isomerase 活性を確認した。

続いて、RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路の遺伝子破壊株を用いて、経路中の化合物である catechol、protocatechuate を投与した時に、異化中間体の蓄積が見られるかどうかを検討した。第一に $\Delta catC$  株を作製し、*catC* の欠損が catechol の異化に与える影響を調べた。第二に、 $\Delta pcaIJ$  株を用いた catechol および protocatechuate 異化物の解析を行った。第三に、 $\Delta pcaB$  株を用いた protocatechuate 異化物の解析を行った。さらに RHA1 の $\beta$ -ケトアジピン酸経路において、protocatechuate branch と catechol branch のバイパス経路に関与する可能性が指摘されている機能未知酵素である Ro02782 および Ro02781（後述）について、その機能解析を目指した。

## 15. protocatechuate branch の *in vitro* 再構築

### 15.1 組換え PcaHG、PcaB、PcaL タンパク質の精製

$\beta$ -ケトアジピン酸経路における protocatechuate branch の *in vitro* 再構築を行うために、protocatechuate branch に関する 3 つの酵素をコードする *pcaHG*、*pcaB*、*pcaL* をクローニングした。まず、RHA1 のクロモソームを鋳型に PCR 法にて各遺伝子の配列を増幅した。次に、PCR 産物を pUC19 に連結し、pUC19-*pcaHG*、pUC19-*pcaB*、pUC19-*pcaL* を構築した。シーケンス解析により、インサートに PCR エラーがないことを確認した。その後、各インサートを発現ベクター pColdI にサブクローニングし、pColdI-*pcaHG*、pColdI-*pcaB*、pColdI-*pcaL* を構築した。次に、各プラスミドを大腸菌 *E. coli* BL21 株へと導入した。それぞれの大腸菌を 0.1 mM IPTG 誘導下、常法に従って培養した結果、可溶性画分および不溶性画分に PcaHG、PcaB、PcaL タンパク質が SDS-PAGE により検出された。そこで、各可溶性画分から Ni-NTA spin column (QIAGEN) を用いて組換えタンパク質を精製し、酵素標品とした (figure 15-1)。



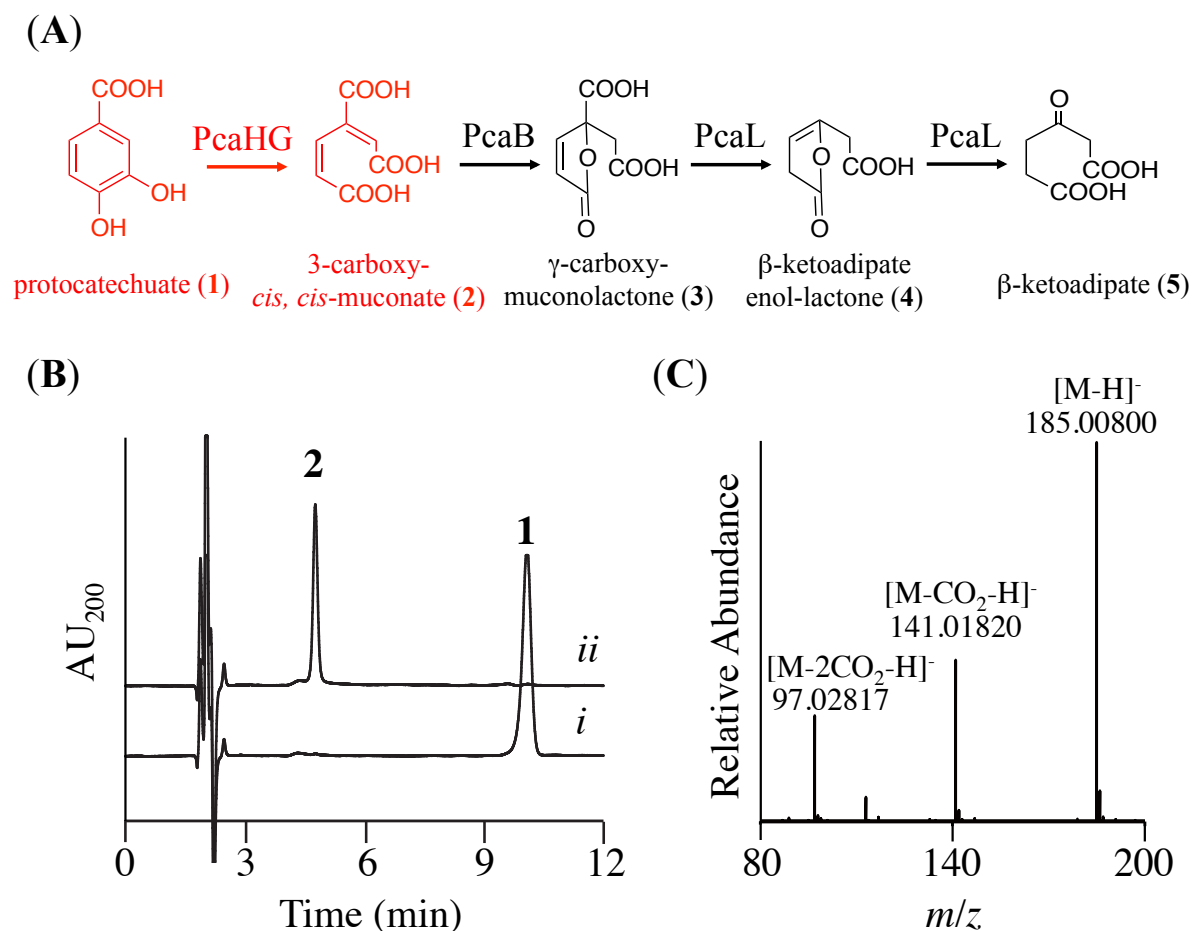
**figure 15-1. PcaHG、PcaB、PcaL タンパク質の精製** アクリルアミド濃度 12% のゲルを使用した。ゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。PcaHG に関しては PcaH と PcaG という 2 つのサブユニットのヘテロダイマーであり、それぞれのバンドが見えている。PcaH、PcaG、PcaB、PcaL の理論分子量はそれぞれ 29 kDa、22 kDa、47 kDa、40 kDa である。



## 15.2 PcaHG の反応

protocatechuate branch における最初の反応は PcaHG によって触媒される。PcaHG は protocatechuate 3,4-dioxygenase をコードしており、protocatechuate (**1**) を酸化開裂し 3-carboxy-*cis,cis*-muconate (**2**) を生成する<sup>61,62</sup>。His-tag 精製した PcaHG を protocatechuate とインキュベートし、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters (Merck Millipore) を用いて反応液の限外ろ過を行った。続いて、HPLC を用いてその反応ろ液の分析を行った。その結果、PcaHG 反応生成物 **2** のピークが確認できた (figure 15-2B)。ネガティブコントロールとして、boiled enzymes を用いた場合には反応生成物のピークは見られなかった (figure 15-2B)。

PcaHG 反応生成物である化合物 **2** は、LC-ESI/HRMS および <sup>1</sup>H-NMR 解析によって同定した。HRMS 解析の結果から、化合物 **2** の *m/z* はネガティブモードで 185.00800 であり、3-carboxy-*cis,cis*-muconate の[M-H]<sup>-</sup>イオンの理論値 185.00916 と近似の値を示した (figure 15-2C)。また、化合物 **2** は不安定な化合物<sup>57</sup>であるため、大量に精製することが困難であった。そのために <sup>13</sup>C-NMR や二次元 NMR 解析を行うことができなかった。化合物 **2** の幾何異性に関しては、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルからカップリング定数を計算することで決定した。具体的には、4 位と 5 位のプロトン間において、カップリング定数が 12.0 Hz であった。この結果は二重結合を形成している 4 位と 5 位のプロトンが *cis* であることを示している (figure 15-3、15-4)。加えて、5 位のプロトンが dd になっていることから、2 位と 5 位のプロトン間には遠隔カップリングが起こっていると考えられる (figure 15-4)。さらに、2 位と 3 位のプロトンに関しては、それらの dienylic coupling が 1.7 Hz であることから *cis* 体と同定した (figure 15-4)。以上の結果より、protocatechuate と PcaHG の反応生成物 **2** が 3-carboxy-*cis,cis*-muconate であることを同定した。



**figure 15-2. PcaHG の *in vitro* 反応-HPLC と MS スペクトル** (A) protocatechuate branch の反応経路。赤字は PcaHG の反応。(B) PcaHG 反応の HPLC チャート。(i) Boiled PcaHG を使用した反応、(ii) active PcaHG を使用した反応。UV 吸収は 200 nm で測定した。(C) 3-carboxy-*cis, cis*-muconate (2) の LC-ESI/HRMS スペクトル。化合物 2 の  $[M-H]^-$ 、 $[M-CO_2-H]^-$ 、 $[M-2CO_2-H]^-$  イオンが確認できた。

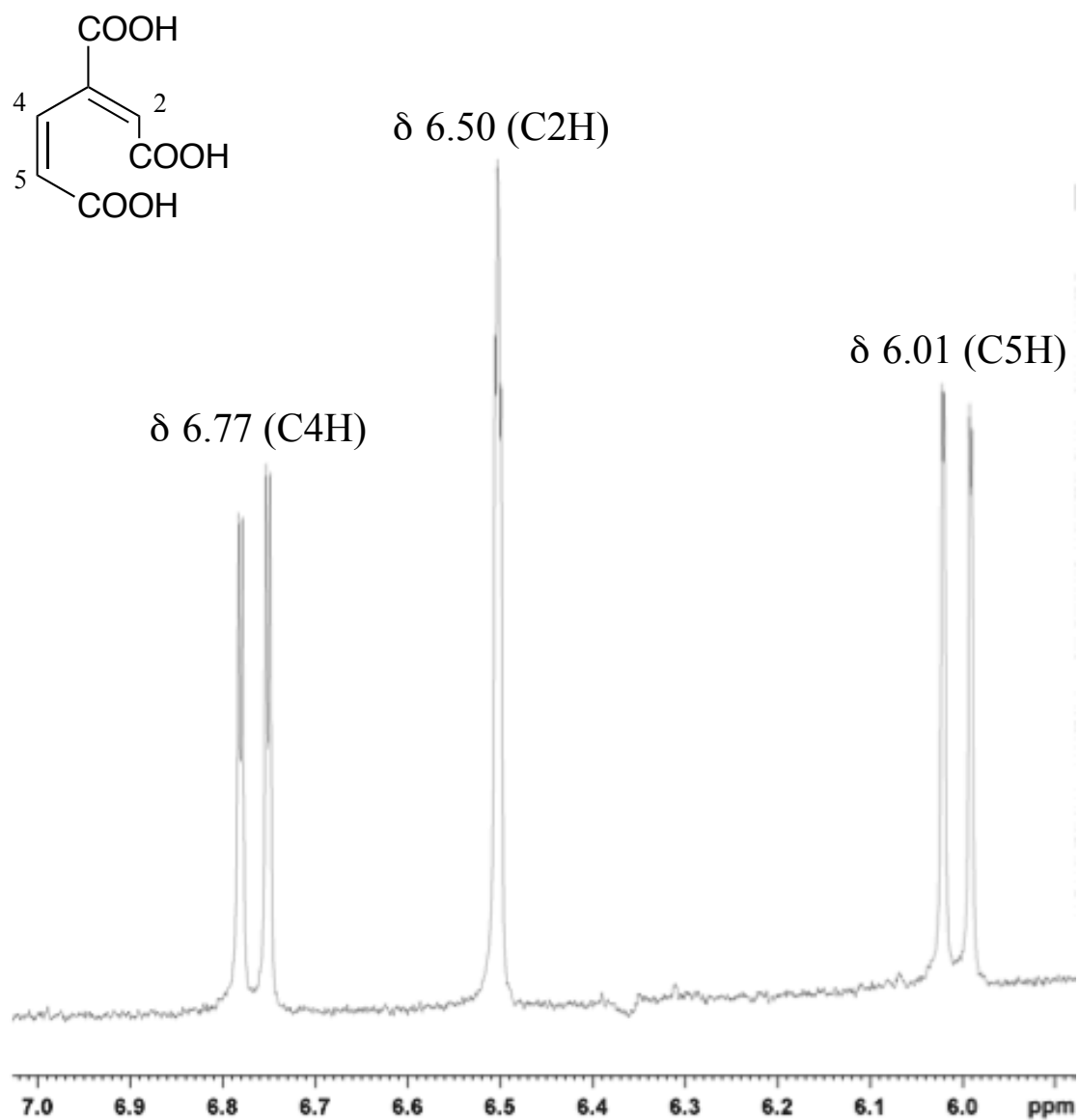


figure 15-3. 化合物 2 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

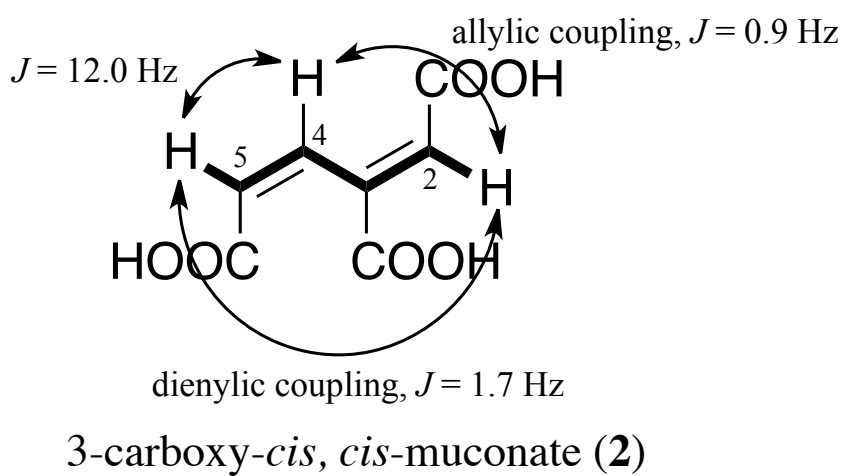
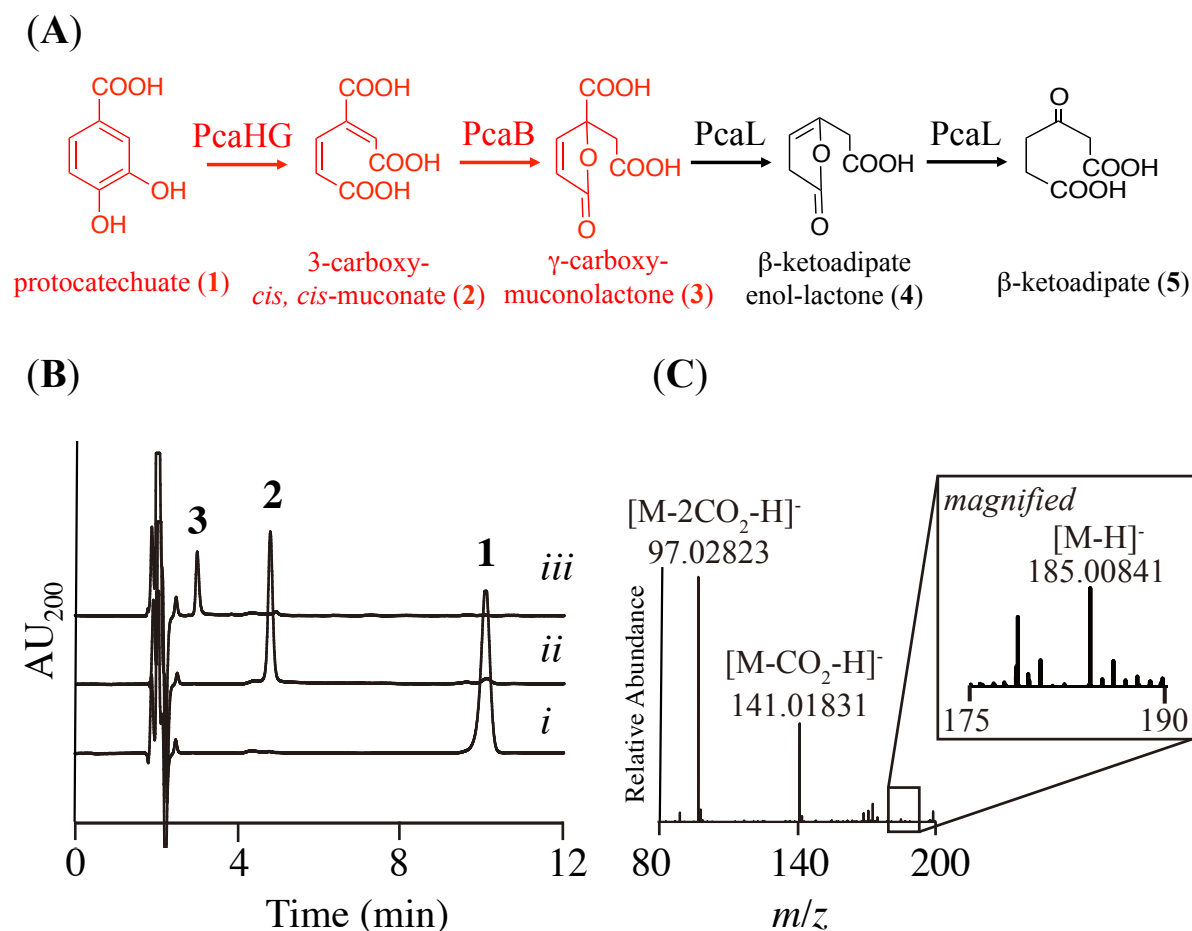


figure 15-4. 化合物 2 の  $^1\text{H-}^1\text{H}$  coupling と coupling 定数

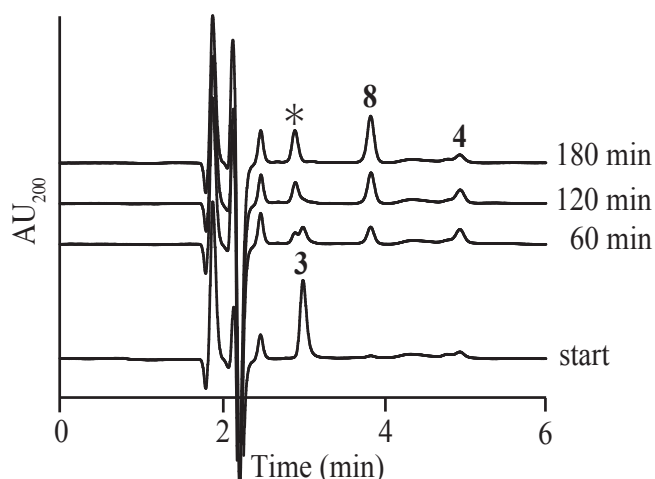
### 15.3 PcaHG + PcaB の反応

Protocatechuate branch における続いての反応は、PcaB による 3-carboxy-*cis,cis*-muconate のラクトン化（異性化）である。反応物として  $\gamma$ -carboxy-muconolactone (**3**) が生成する<sup>63)</sup>。 *in vitro* 反応の結果、active な PcaHG と PcaB を同時に反応させた時にのみ、PcaB 反応生成物のピークが確認できた (figure 15-5B)。一方、ネガティブコントロールとして boiled enzyme を使用した反応においては、生成物のピークは得られなかった (figure 15-5B)。また、HRMS 解析の結果から、PcaB 反応生成物 **3** の  $m/z$  は negative mode で 185.00841 であった (figure 15-5C)。その値は  $\gamma$ -carboxy-muconolactone における [M-H]<sup>-</sup> イオンの理論値 185.00916 と近似していた。以上の結果より、化合物 **3** を  $\gamma$ -carboxy-muconolactone と同定した。また、化合物 **3** は下記に述べるように不安定な化合物であるが故に、NMR 解析を行うことができなかった。

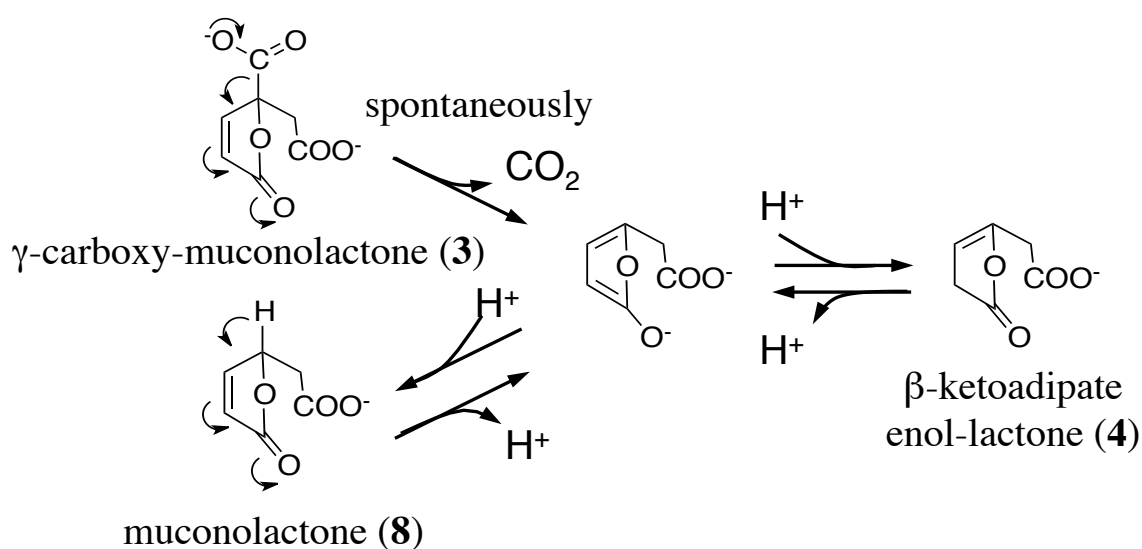
次に、化合物 **3** の不安定性を確かめるため、PcaHG と PcaB の反応ろ液を 30℃ でインキュベートした。そのろ液を HPLC にて分析した結果、経時的に化合物 **3** が減少していった (figure 15-6)。化合物 **3** は非常に不安定な化合物であり、自発的な脱炭酸によって  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone (**4**) が生成することが知られている<sup>39)</sup>。さらに、 $\beta$ -ketoadipate enol-lactone とその異性体である muconolactone (**8**) は平衡状態にあると報告されている (figure 15-7)<sup>39)</sup>。今回の実験条件においては、**4** よりも **8** の方へ平衡が傾いていた (figure 15-8)。



**figure 15-5. PcaHG と PcaB の *in vitro* 反応** (A) protocatechuate branch の反応経路。赤字は PcaHG、PcaB の反応。(B) PcaHG と PcaB 反応の HPLC チャート。(i) Boiled PcaHG と active PcaB を使用した反応、(ii) active PcaHG と boiled PcaB を使用した反応、(iii) active PcaHG と active PcaB を使用した反応。UV 吸収は 200 nm で測定した。(C)  $\gamma$ -carboxy-muconolactone (3) の LC-ESI/HRMS スペクトル。 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-2\text{CO}_2-\text{H}]^-$  イオンが確認できた。

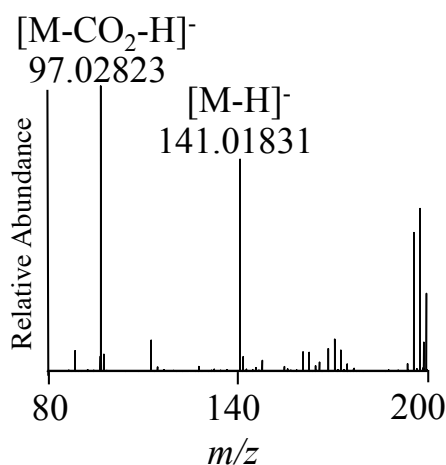


**figure 15-6. protococatechuate+PcaHG+PcaB の反応ろ液の HPLC 分析** 反応ろ液を 30℃でインキュベートし、60 分毎に HPLC 分析を行った。インキュベート開始時点では PcaB 反応生成物である  $\gamma$ -carboxy-muconolactone (3) のピークが見えているが、経時的に化合物 4 のピークが減少し、 $\beta$ -ketoadipate enol-lactone (4) および muconolactone (8) のピークが見えた。化合物 4 よりも化合物 8 の方へ平衡が傾いていた。\*は未同定の化合物。

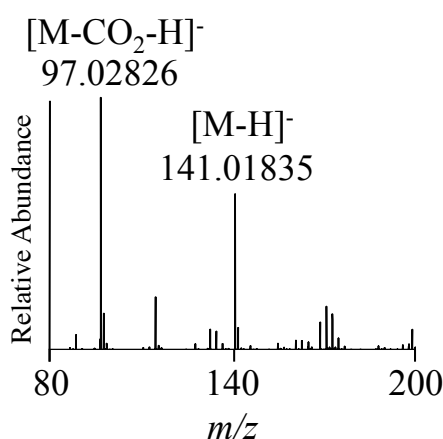


**figure 15-7.  $\gamma$ -carboxy-muconolactone (3) の脱炭酸反応と  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone (4)、muconolactone (8) への異性化反応** Ornston らによる予想反応<sup>57)</sup>。

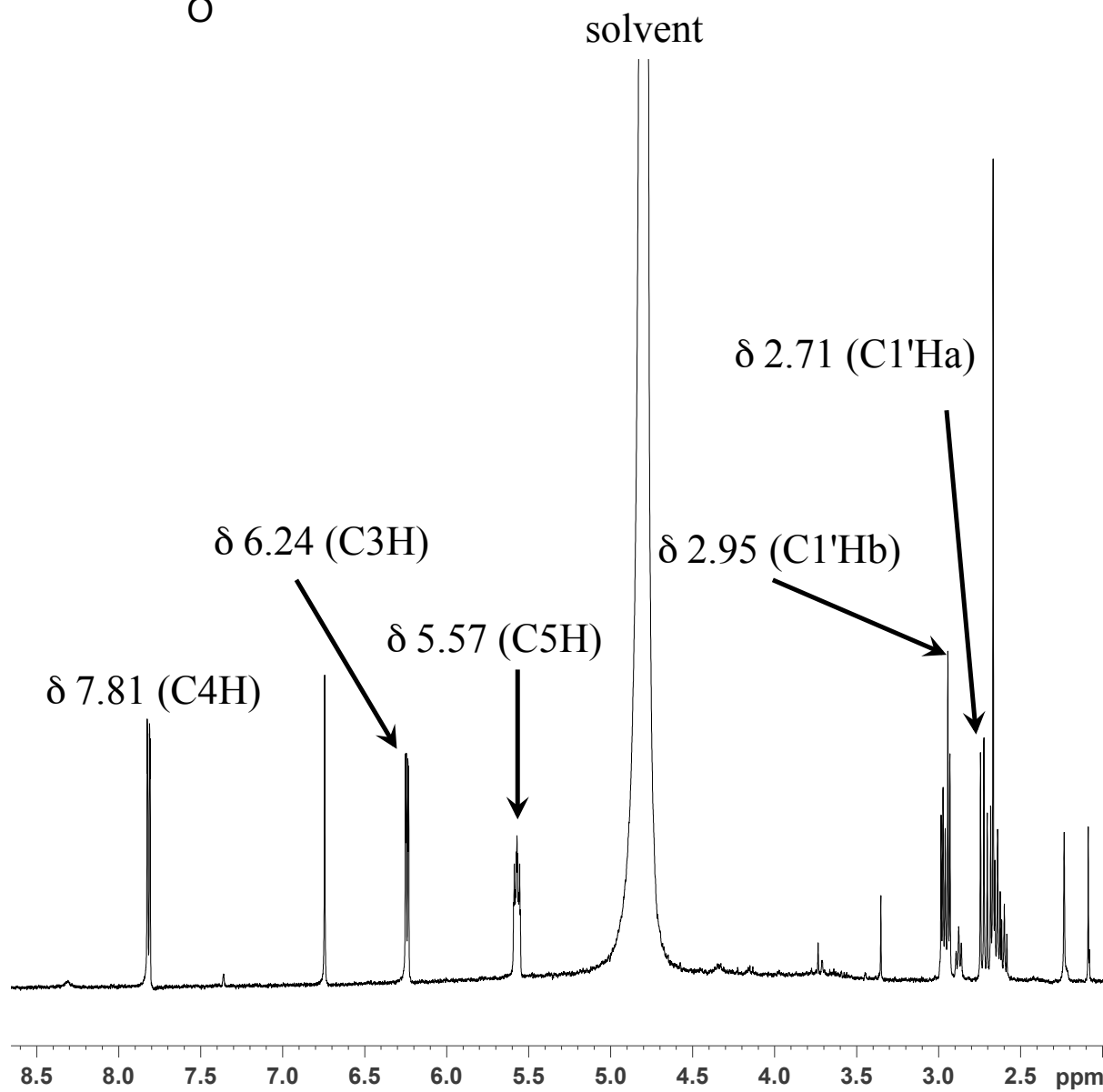
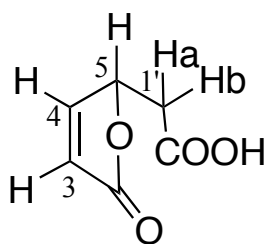
muconolactone (**8**) の分子式は  $C_6H_6O_4$  であり、 $[M-H]^-$  イオンの理論分子量は 141.01933 である。HRMS 解析の結果、化合物 **3** が脱炭酸して生成した化合物 **4** の  $m/z$  は 141.01831 であり、理論値とほぼ一致した (figure 15-8)。化合物 **8** と同様に、化合物 **4** についても分子量の確認をおこなった (figure 15-9)。化合物 **8** の  $^1H$ -NMR データは次のように帰属した。6.24 ppm と 7.81 ppm のダブルレットは、dihydrofuran ring の 3 位と 4 位のプロトンであると帰属した。5.57 ppm に見られる dddd は 5 位のプロトンである。カップリング定数が 16.6 Hz あることを考慮すると、2.71 ppm と 2.95 ppm の dd は、C1' の geminal protons であると帰属した (figure 15-10)。また、化合物 **4** の NMR データの帰属も行った (figure 15-11)。



**figure 15-8.** 化合物 **8** の MS スペクトル サンプルは protocatechuate + PcaHG + PcaB の *in vitro* 反応から精製した。

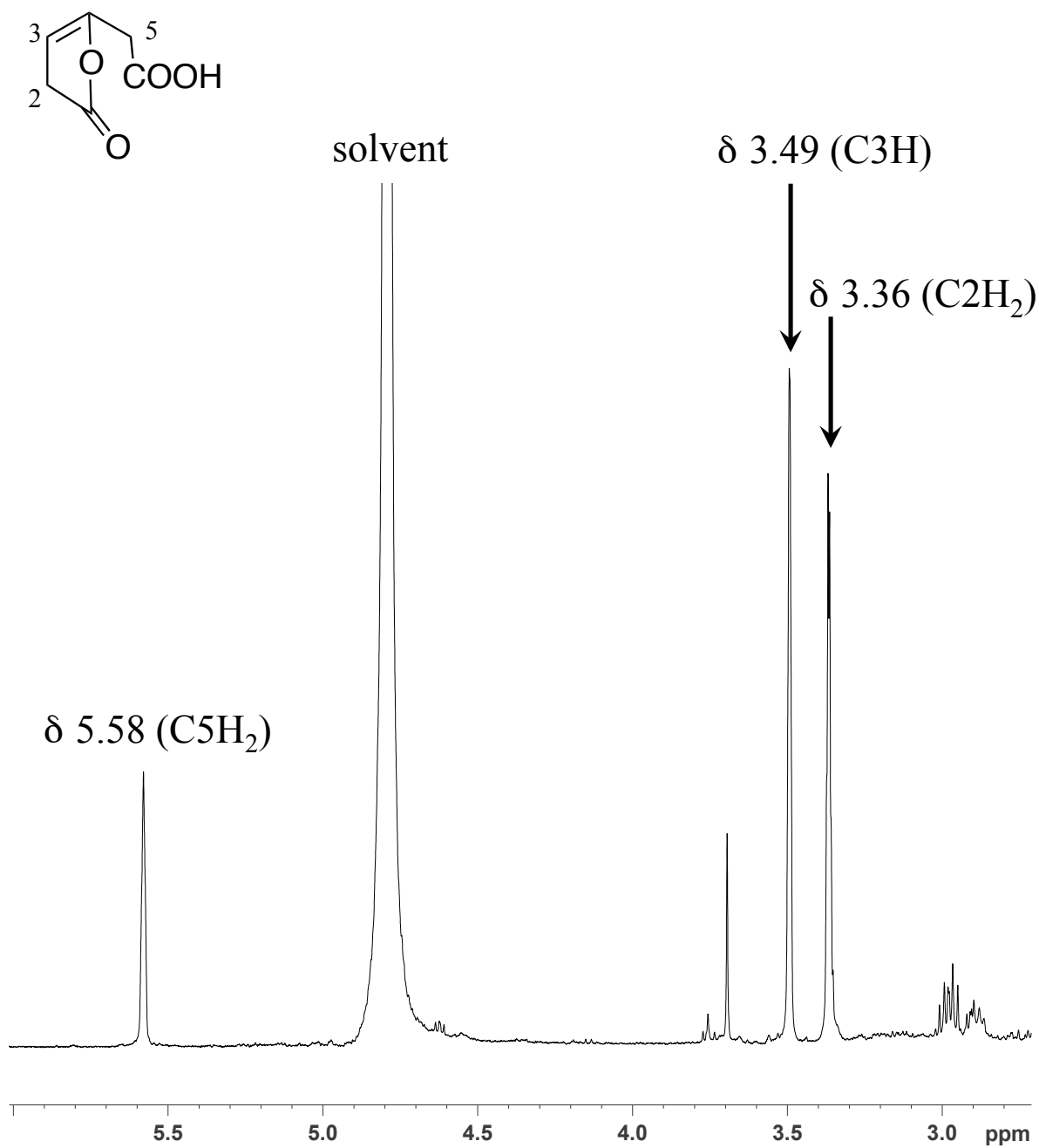


**figure 15-9.** 化合物 **4** の MS スペクトル サンプルは protocatechuate + PcaHG + PcaB の *in vitro* 反応から精製した。



**figure 15-10.** 化合物 8 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル 測定溶媒は  $\text{D}_2\text{O}$ 。サンプルは protocatechuate + PcaHG + PcaB の *in vitro* 反応から精製した。

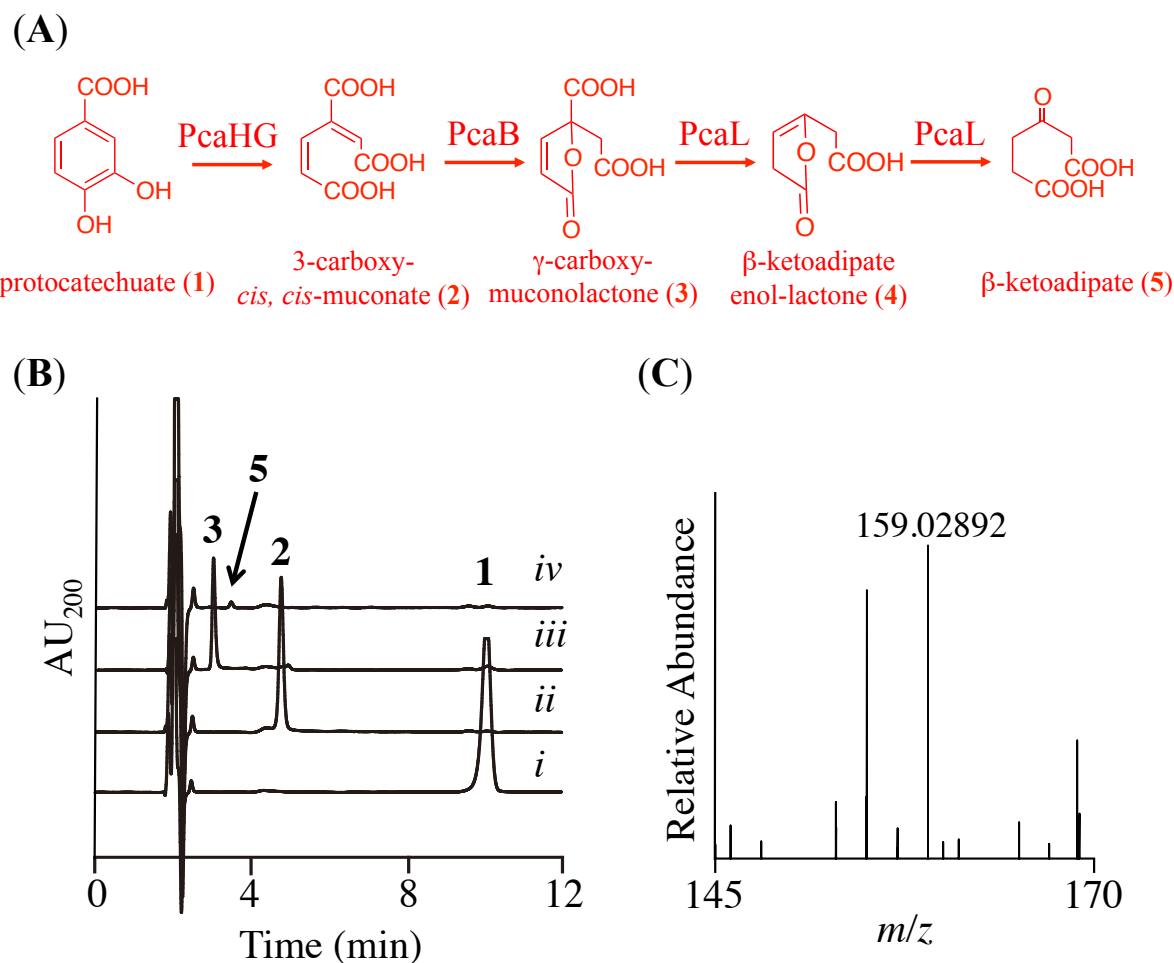




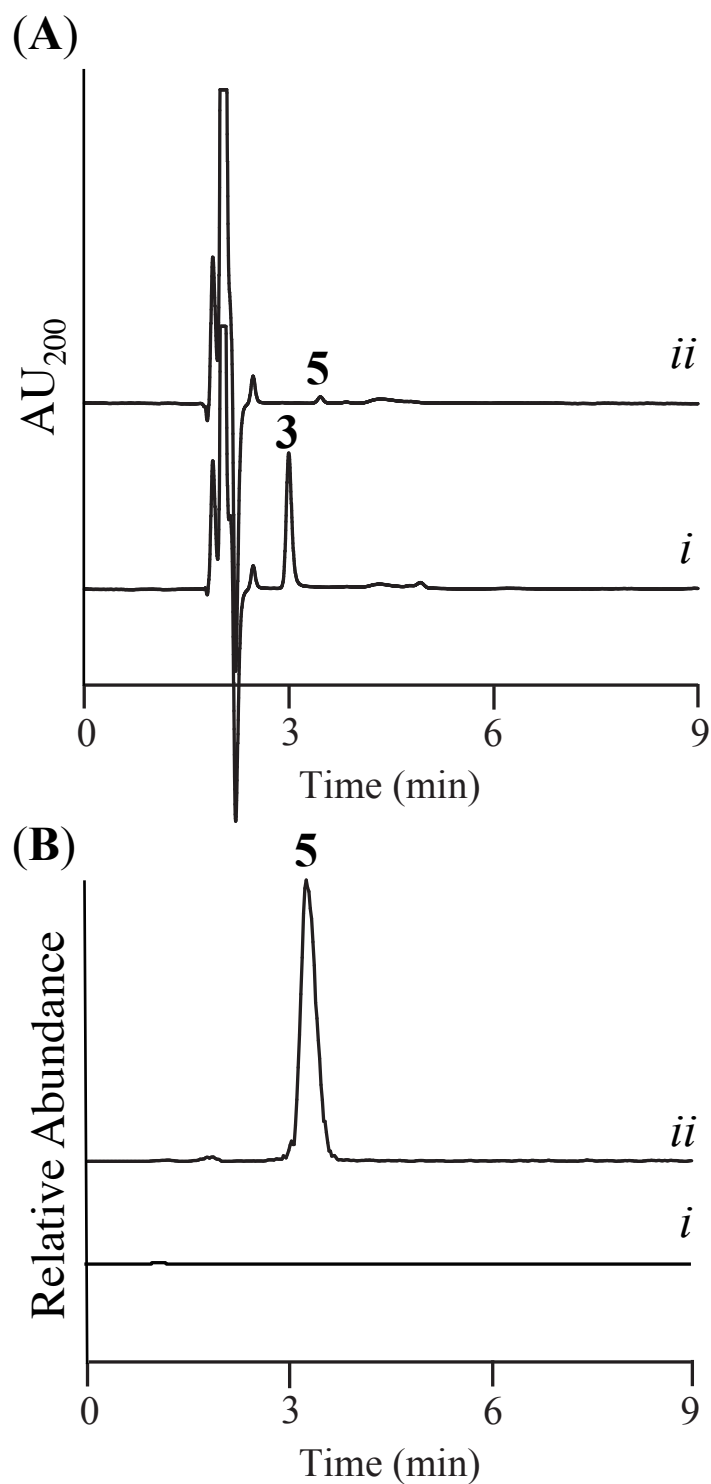
**figure 15-11.** 化合物 4 の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル 測定溶媒は  $\text{D}_2\text{O}$ 。サンプルは protocatechuate + PcaHG + PcaB の *in vitro* 反応から精製した。

#### 15.4 PcaHG + PcaB + PcaL の反応

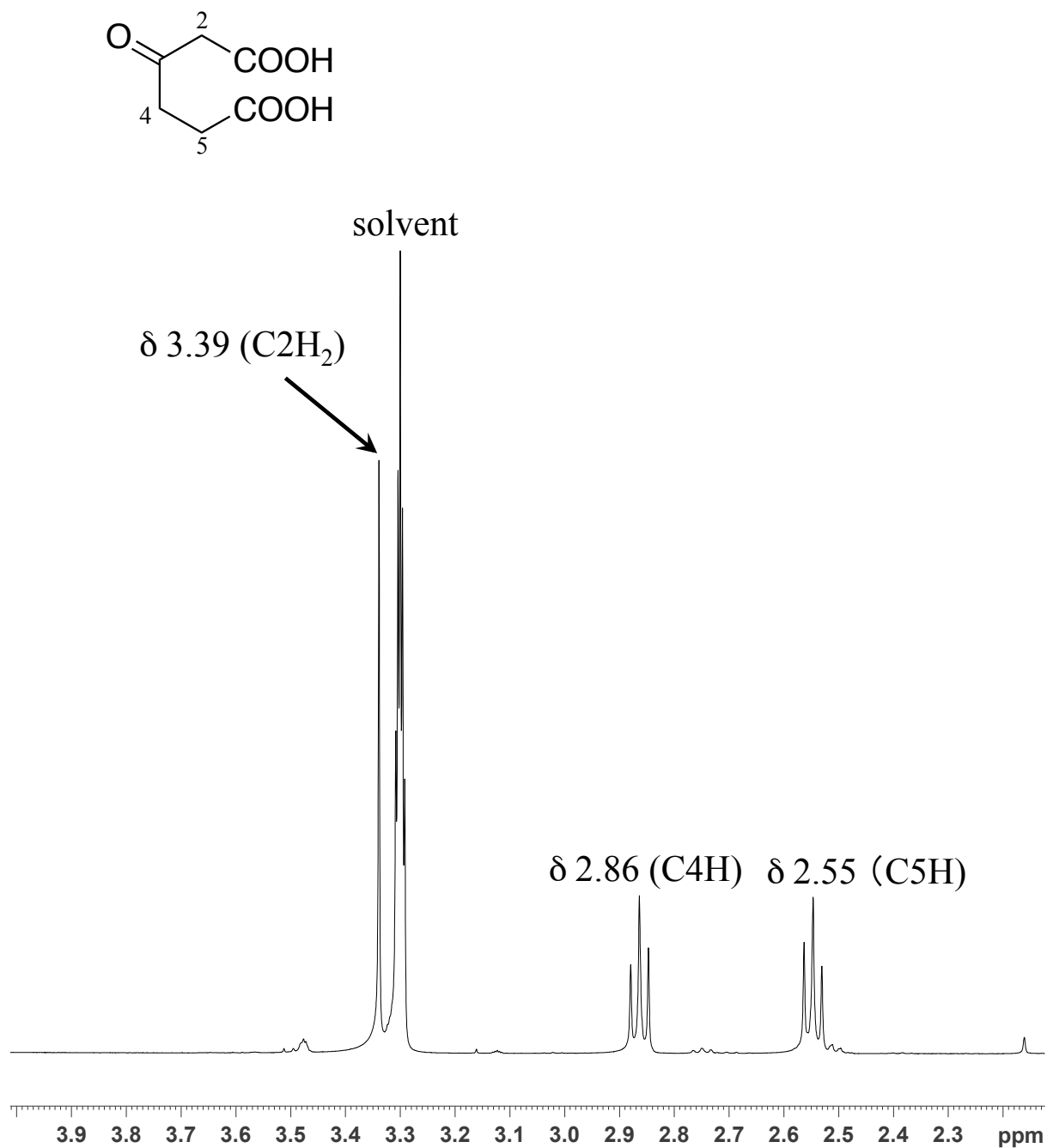
PcaL は  $\gamma$ -carboxy-muconolactone (**3**) の脱炭酸化酵素のドメインと  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone (**4**) の加水分解酵素のドメインの両者を有する融合タンパク質である。Protocatechuate と PcaHG、PcaB、PcaL を同時に反応させた結果、保持時間 3.3 分に反応生成物 **5** のピークが見られた (figure 15-12B)。このピークは boiled 酵素を用いた反応では得られなかった (figure 15-12B)。また、protocatechuate (**1**) と PcaHG、PcaB の反応ろ液に PcaL を反応させた時にも同様の結果が得られた (figure 15-13A)。HRMS 解析の結果より、本生成物の  $m/z$  は 159.02892 であり、 $\beta$ -ketoadipate における  $[M-H]^-$  イオンの理論値である 159.02990 と近似の値となった (figure 15-12C、15-13B)。さらに、 $^1\text{H-NMR}$  解析の結果も合わせて、PcaL 反応生成物 **5** が  $\beta$ -ketoadipate であることを確認した (figure 15-14) <sup>64)</sup>。さらに、PcaL と化合物 **4** の *in vitro* 反応および PcaL と化合物 **8** の *in vitro* 反応を行った。その結果、PcaL は化合物 **4** とは反応し化合物 **5** を生成したが、**8** とは反応しなかった (figure 15-15)。これらの結果より、PcaL が  $\gamma$ -carboxymuconolactone decarboxylase 活性と  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone hydrolase 活性の両方を有することを確認し、PcaL の最終的な生成物として  $\beta$ -ketoadipate を同定した。



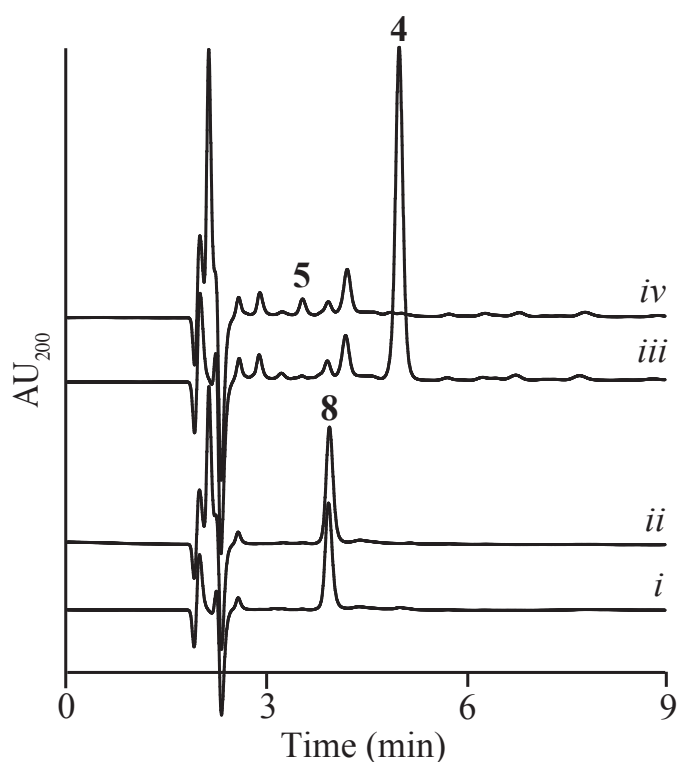
**figure 15-12.** PcaHG、PcaB、PcaL を用いた *in vitro* 反応における HPLC クロマトグラムと MS スペクトル (A) PcaHG、PcaB、PcaL の反応。(B) protocatechuate、PcaHG、PcaB、PcaL を用いた *in vitro* 反応における HPLC クロマトグラム。(i) boiled PcaHG、PcaB、PcaL の反応、(ii) PcaHG、boiled PcaB、PcaL の反応、(iii) PcaHG、PcaB、boiled PcaL の反応、(iv) PcaHG、PcaB、PcaL の反応。UV 吸収は 200 nm で測定した。(C)  $\beta$ -ketoadipate (5) の LC-ESI/HRMS スペクトル。[M-H]<sup>-</sup>イオンが確認できた。



**figure 15-13. PcaHG+PcaB 反応のろ液と PcaL の *in vitro* 反応** (A) boiled PcaL (*i*) および active PcaL (*ii*) を使用した反応の HPLC クロマトグラム。(B) boiled PcaL (*i*) および active PcaL (*ii*) を使用した反応の  $m/z$  159 におけるイオンクロマトグラム。active PcaL を用いた時にのみ、化合物 **5** の生成が確認できた。



**figure 15-14.** 化合物 5 の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル 測定溶媒は  $\text{CD}_3\text{OD}$ 。サンプルは protocatechuate + PcaHG + PcaB + PcaL の *in vitro* 反応から精製した。



**figure 15-15.** PcaL と化合物 4 または化合物 8 の *in vitro* 反応における HPLC クロマトグラム (i) boiled PcaL と 8 の反応、(ii) active PcaL と 8 の反応、(iii) boiled PcaL と 4 の反応、(iv) active PcaL と 4 の反応。化合物 4 のみが PcaL と反応し、化合物 5 を生成した。

### 15.5 Pca 酵素についての考察

本節において、RHA1 の $\beta$ -ケトアジピン酸経路における *protocatechuate branch* の *in vitro* 再構築を行った。RHA1 における Pca 酵素のアミノ酸配列は、*Pseudomonas* 属の同酵素と比較して中程度の配列相同性を有していた。例えば、PcaG と PcaH は *P. aeruginosa*<sup>62)</sup> と比較して、相同性がそれぞれ 42%、50%であった。また、PcaB は *P. putida*<sup>63)</sup> と比較して 41%の相同性を有していた。さらに、PcaL に関しては N 末端に存在している $\beta$ -ketoadipate enol-lactone hydrolase と C 末端の $\gamma$ -carboxy-muconolactone decarboxylase に分けて、*P. putida* の PcaC<sup>39)</sup> および PcaD<sup>65)</sup> との比較を行った。その結果、N 末端 (1-261 残基) は 45%、C 末端 (272-400 残基) は 49%の相同性を有していた。このように、RHA1 の Pca 酵素は *Pseudomonas* 属の Pca 酵素と 40 から 50%程度の配列相同性を有していた。PcaHG、PcaB に関してはグラム陰性菌と同様の反応を触媒す

ることを確かめることができた。バインドメイン酵素である PcaL については、本研究において初めて *in vitro* 反応を行い、PcaL がグラム陰性菌における PcaC および PcaD の反応を触媒することを確認した。

Chari らは化合物 **2** の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを報告していたが、ロングレンジ・カップリングについては触れていなかった<sup>66)</sup>。また、Ainsworth らは化合物 **2** のカップリング定数に関して、dienylic coupling が  $J = 0.9 \text{ Hz}$ 、allylic coupling が  $J = 2.1 \text{ Hz}$  であると報告している<sup>67)</sup>。彼らはこの異常なカップリング定数は、非平面性によるものであると説明していた。しかし、私の測定した化合物 **2** におけるカップリング定数は、figure 2-5 で示したとおり、dienylic coupling が  $J = 1.7 \text{ Hz}$ 、allylic coupling が  $J = 0.9 \text{ Hz}$  であった。この値は、化合物 **2** が 3-carboxy-*cis,cis*-muconate であることを強く示している。

また、Ornston らが記述しているとおり、化合物 **3** は非常に不安定であることが、本研究中においても確認できた。その不安定さ故に、化合物 **3** は自発的に脱炭酸反応し化合物 **4** になり、その後異性化して化合物 **8** になることも確認された。このことから、PcaL が 1 つの酵素で、 $\gamma$ -carboxy-muconolactone decarboxylase と  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone hydrolase の 2 つの機能を持つことの利点が挙げられる。それは、**3** を脱炭酸し **4** にした後に、即座に **5** への変換が可能な点である。PcaL が PcaC と PcaD に分かれている微生物においては、**3** が PcaC と反応し **4** を生成した後に、一度生成物を放出することになる。その後、**4** と PcaD が反応する間に **4** が **8** へと異性化する可能性が考えられる。RHA1 のような PcaL を有する微生物においては、PcaC と PcaD の反応が同一の酵素により触媒されるので、反応中間体の放出がなく、経路の下流へと速やかに中間体を送ることができるメリットがあると言える。さらに、化合物 **2** もまた熱や酸に不安定な化合物であるために、精製して NMR 解析をすることが困難であった。この化合物の不安定さから生じる化合物に関しては、後述の *pcaB* 破壊株における protocatechuate 異化物の解析の項で詳しく触れる。

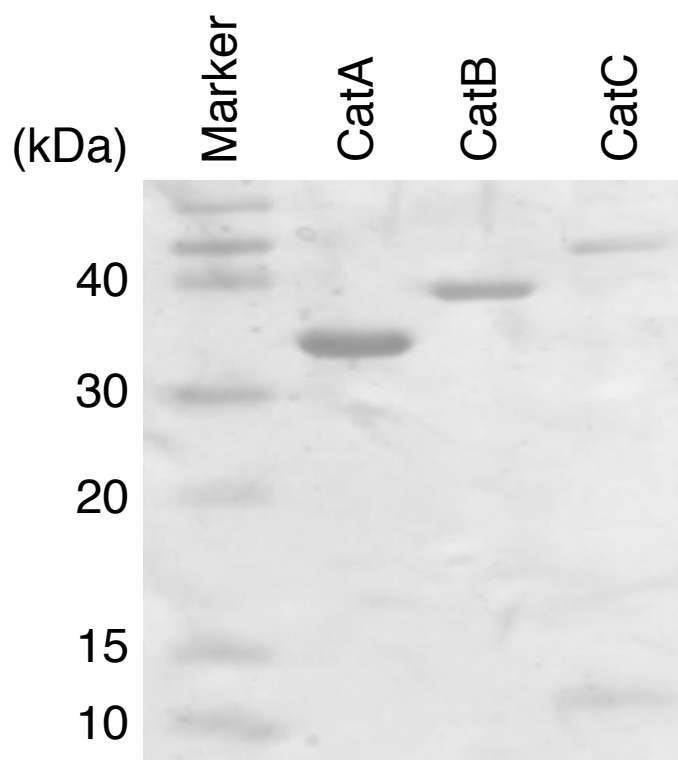
## 16. catechol branch の *in vitro* 再構築

### 16.1 組換え CatA、CatB、CatC タンパク質の精製

続いて、 $\beta$ -ケトアジピン酸経路における catechol branch の *in vitro* 再構築を行うために、同経路中の3つの遺伝子 *catA*、*catB*、*catC* をクローニングした。RHA1 のクロモソームを鋳型に PCR 法にて各遺伝子の配列を増幅し、pUC19 にクローニングすることで、pUC19-*catA*、pUC19-*catB*、pUC19-*catC* を構築した。シーケンス解析により、PCR エラーがないことを確認した後、各インサートをタンパク質発現ベクター pColdI にサブクローニングし、pColdI-*catA*、pColdI-*catB*、pColdI-*catC* を構築した。次に、各プラスミドを大腸菌 *E. coli* BL21 株へと導入した。それぞれの大腸菌を 0.1 mM IPTG 誘導下、常法に従って振盪培養した結果、CatA のみが可溶性タンパク質として取得できた。よって、CatA に関しては可溶性画分から Ni-NTA spin column を用いて、組換え CatA を精製し、酵素標品とした (figure 16-1)。

一方、大腸菌からは可溶性タンパク質として取得できなかった CatB および CatC に関しては、RHA1 株を宿主にした発現を試みた。具体的には、産業技術総合研究所の田村具博博士らが開発した、*Rhodococcus* 属用のタンパク質発現ベクターである pTipQC1<sup>68)</sup>を用いることとした。同ベクターを用いて、pTipQC1-*catB*、pTipQC1-*catC* を構築し、エレクトロポレーション法によって *R. jostii* RHA1 株を形質転換した。それぞれの形質転換体を 1  $\mu$ g/ml チオストレプトン誘導下、30°C で 48 時間培養した結果、CatB および CatC を可溶性タンパク質として取得できた。そこで、CatA と同様に Ni-NTA spin column を用いて、組換え CatB、CatC を精製した (figure 16-1)。

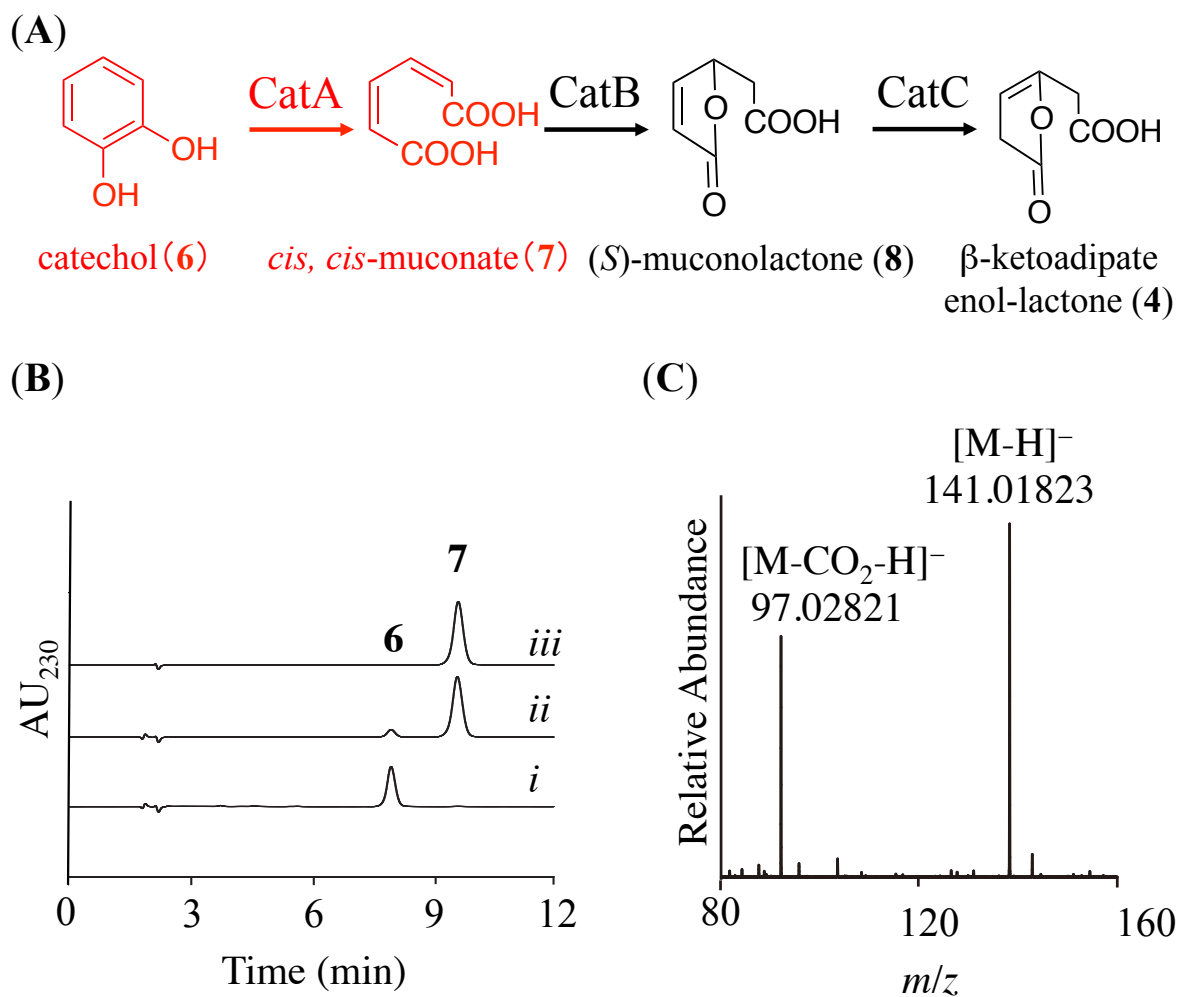




**figure 16-1.** 組換え CatA、CatB、CatC の SDS-PAGE アクリルアミド濃度 12% のゲルを使用した。ゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。CatA、CatB、CatC の理論分子量はそれぞれ 31 kDa、40 kDa、11 kDa である。

## 16.2 CatA を用いた *in vitro* 反応

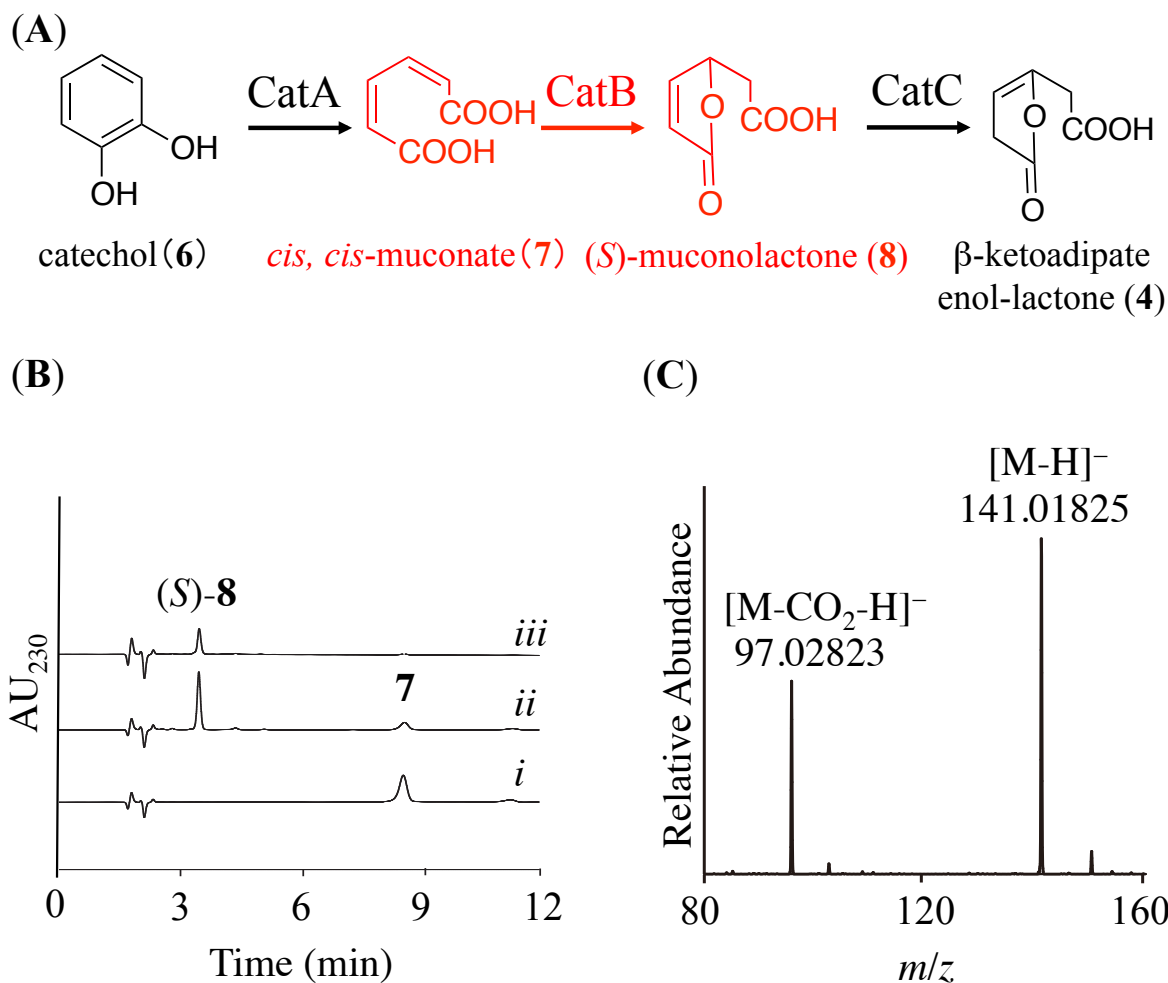
Catechol branch における初発反応は CatA によって触媒される。CatA は catechol 1,2-dioxygenase をコードしており、catechol (6) の酸化開裂反応を触媒し、*cis,cis*-muconate (7) を生成する<sup>69)</sup>。大腸菌より精製した組換え CatA を catechol とインキュベートし、反応液の限外ろ過を行った。HPLC を用いてその反応ろ液の分析を行った。その結果、CatA 反応生成物である *cis,cis*-muconate のピークが確認できた (figure 16-2B)。ネガティブコントロールとして、boiled enzyme を用いた場合には反応生成物のピークは見られなかった。LC-ESI/HRMS 解析の結果、CatA 反応生成物の *m/z* は negative モードで 141.01823 であった。この値は、*cis,cis*-muconanate における [M-H]<sup>-</sup>イオンの理論値 141.01933 と近似した (figure 16-2C)。



**figure 16-2. CatA 反応生成物の HPLC および MS 解析** (A) catechol branch における反応経路。赤色は CatA による反応。(B) CatA の *in vitro* 反応における HPLC クロマトグラム。(i) boiled CatA と化合物 **6** の反応、(ii) active CatA と化合物 **6** の反応、(iii) *cis,cis*-muconate (**7**) 標品。UV 吸収は 230 nm で測定した。(C) *cis,cis*-muconate (**7**) の LC-ESI/HRMS スペクトル。[M-H]<sup>-</sup>および[M-CO<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>イオンが検出された。

### 16.3 CatB を用いた *in vitro* 反応

catechol branch における 2 段階めの反応は、CatB による *cis,cis*-muconate (**7**) のラクトン化である。その結果として、(*S*)-muconolactone (**8**) が生成する<sup>70)</sup>。Active な CatB を *cis,cis*-muconate と反応させ HPLC 解析を行った結果、保持時間 3.8 分に反応生成物のピークが検出された (figure 16-3B)。一方、boiled enzyme を用いた場合にはこのピークは見られなかった (figure 16-3B)。MS 解析の結果より、本化合物の *m/z* は 141.01825 であり、(*S*)-muconolactone における [M-H]<sup>-</sup> イオンの *m/z* 141.01933 と近似の値を示した (figure 16-3C)。標品として用いた(*S*)-**8** は、CatB 発現用に形質転換を行った大腸菌 *E. coli* BL21/pQE2-*catB* 株を用いて、catechol を異化させることで精製した (実験項)。また、CatB による *cis,cis*-muconate の分子内ラクトン化で生成する muconolactone は *S* 体であるということが報告されている<sup>66)</sup>。また、(*S*)-**8** の旋光度を測定した結果、 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +45.2$  (*c* 0.15, CH<sub>3</sub>OH) であった。この値は、以前に報告された値と近似していた<sup>71, 72)</sup>。

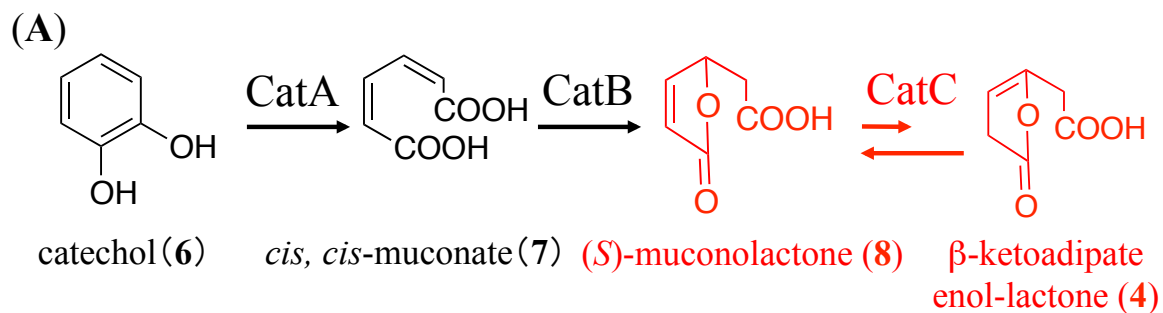


**figure 16-3. CatB 反応生成物の HPLC および MS 解析** (A) catechol branch における反応経路。赤色は CatB による反応。(B) CatB の *in vitro* 反応における HPLC クロマトグラム。(i) boiled CatB と化合物 **7** の反応、(ii) active CatB と化合物 **7** の反応、(iii) (*S*)-muconolactone (**8**) 標品。UV 吸収は 230 nm で測定した。(C) (*S*)-muconolactone の LC-ESI/HRMS スペクトル。[M-H]<sup>-</sup>および[M-CO<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>イオンが確認できた。

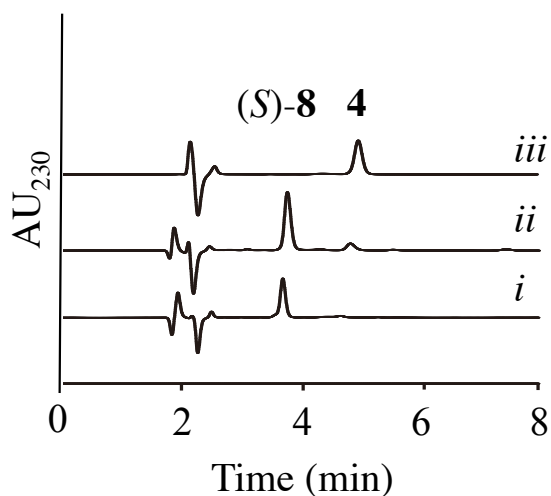
#### 16.4 CatC の *in vitro* 反応

Catechol branch における次の反応は、CatC による(*S*)-muconolactone (**8**) の異性化である<sup>73)</sup>。その生成物は、 $\beta$ -ketoadipate enol-lactone (**4**) である。*(S)*-muconolactone (**8**) と CatC の *in vitro* 反応によって、HPLC の結果から、保持時間 4.9 分に生成物のピークが検出された (figure 16-4B)。これは、前節において  $\gamma$ -carboxy-muconolactone (**3**) が脱炭酸して生成した化合物 **4** の保持時間と一致した。このピークは boiled CatC を用いたネガティブコントロールでは見られなかった (figure 16-4B)。また、CatC 反応生成物の HRMS 解析の結果、*m/z* はネガティブモードで 141.01835 であり、 $\beta$ -ketoadipate enol-lactone における  $[M-H]^-$  イオンの理論値 141.01933 と近似した。よって、CatC 生成物としての  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone を確認することができた。

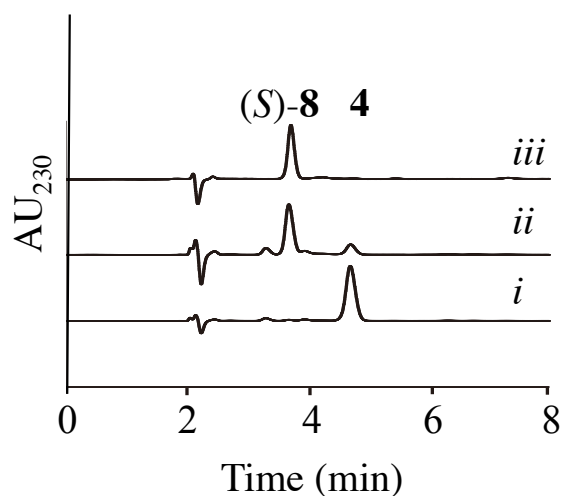
また、active CatC と化合物 **4** の *in vitro* 反応を行った。その結果、化合物(*S*)-**8** と同じ保持時間に生成物のピークが見られた (figure 16-4C)。Ornston らが報告した通り、CatC は  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone から(*S*)-muconolactone への異性化も触媒し、両化合物の平衡状態は化合物 **4** から化合物(*S*)-**8** へと強く傾いていることが確認できた<sup>39)</sup>。



(B)



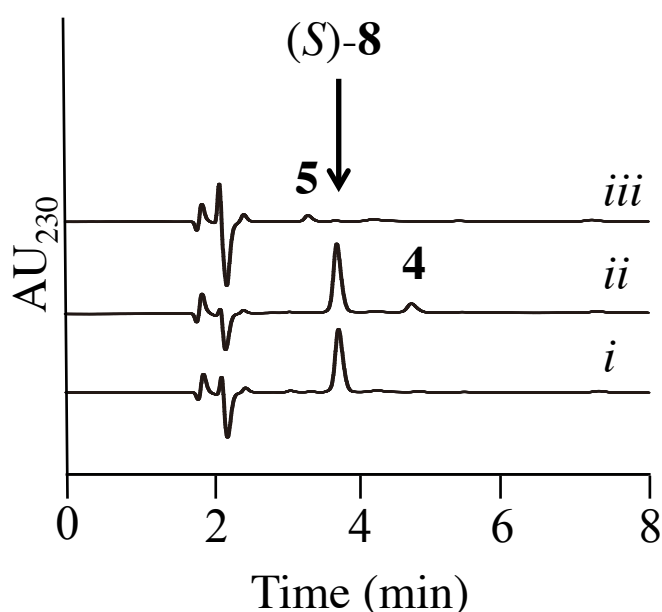
(C)



**figure 16-4. CatC 反応生成物の HPLC 解析** (A) catechol branch における反応経路。赤色は CatC による反応。CatC は化合物 **4** から化合物 (S)-**8** への異性化を強く触媒する。(B) (S)-muconolactone (**8**) と CatC の *in vitro* 反応における HPLC クロマトグラム。(i) Boiled CatC を用いた反応、(ii) active CatC を用いた反応、(iii) β-ketoadipate enol-lactone (**4**) 標品。(C) 化合物 **4** と CatC の *in vitro* 反応における HPLC クロマトグラム。(i) Boiled CatC を用いた反応、(ii) active CatC を用いた反応、(iii) (S)-muconolactone (**8**) 標品。UV 吸収は 230 nm で測定した。

### 16.5 CatC と PcaL の反応

上述の通り、CatC は化合物 (S)-**8** を化合物 **4** へと異性化する反応よりもその逆反応を強く触媒した。そこで、(S)-**8** を基質として CatC と PcaL を同時に反応させ、その反応ろ液を HPLC で分析した。その結果、保持時間 3.3 分に  $\beta$ -ketoadipate (**5**) のピークが見られた (figure 16-5)。このピークはネガティブコントロールには検出されなかった (figure 16-5)。この結果は、CatC によって **4** が生成すると PcaL による加水分解が速やかに起こり、**5** が生成するというを示している。



**figure 16-5.** (S)-muconolactone (**8**)と CatC 、PcaL 反応の HPLC クロマトグラム (i) boiled catC, と active PcaL の反応、(ii) active CatC と boiled PcaL の反応、(iii) active CatC と active PcaL の反応。UV 吸収は 230 nm で測定した。(iii)のみにおいて、 $\beta$ -ketoadipate (**5**) のピークが検出された。

### 16.6 Cat 酵素についての考察

本節では、RHA1 株の $\beta$ -ケトアジピン酸経路における catechol branch の *in vitro* 再構築を行った。RHA1 株における Cat 酵素のアミノ酸配列は、*Pseudomonas* 属の同酵素と比較して Pca 酵素と同様に中程度の配列相同性を有していた。CatA は *P. aeruginosa* PAO1<sup>74)</sup>の catechol 1,2-dioxygenase と比較して相同性が 38%であった。また、CatB は *P. putida*<sup>39)</sup>の *cis,cis*-muconate cycloisomerase と比較して 39%の相同性を有していた。同様に、CatC に関しては *P. putida*<sup>39)</sup>の muconolactone isomerase と比較して 51%相同であった。このように、RHA1 株の Cat 酵素は Pca 酵素と同じく *Pseudomonas* 属の酵素と比較して中程度の配列相同性であった。Cat 酵素に関しても、グラム陰性菌で報告さ

れているのと同様の反応を触媒することを確認した。

Ornston らが *P.putida* で示したのと同様、RHA1 株の CatC に関しても (S)-**8** から **4** への異性化反応を触媒するだけでなく、その逆反応も触媒した。また、Patrauchan らは、*pcaL* 破壊株が benzoate を唯一の炭素源とした培地で生育可能であることを示している<sup>75)</sup>。benzoate は *ben* 遺伝子群によって異化されて、catechol branch へと流入する<sup>49)</sup>。*pcaL* 破壊株では catechol を異化する際に **4** が **5** に変換されずに、CatC により (S)-**8** へと異性化されるはずである。その状況において *pcaL* 破壊株が生育するためには、(S)-**8** を炭素源にするしかないと考えられる。つまり、(S)-**8** を異化する未知の経路が存在する可能性が強く示唆された。そこで、私は RHA1 株における *catC* 破壊株を作製し、*catC* の破壊が catechol の異化に与える影響を調べることにした。



## 17. $\beta$ -ケトアジピン酸経路に関する遺伝子破壊株を用いた基質異化物の解析

### 17.1 $\Delta catC$ 株における catechol 異化物の解析

前節において、 $\beta$ -ケトアジピン酸経路中の catechol branch を *in vitro* で再構築した。その結果、CatC は(S)-muconolactone から $\beta$ -ketoadipate enol-lactone への異性化よりも $\beta$ -ketoadipate enol-lactone から(S)-muconolactone への異性化を強く触媒した。さらに、RHA1 株における catechol branch において、(S)-8 の異化に関する CatC 以外のルートの存在が示唆された。したがって、私は RHA1 株の *catC* 破壊株である $\Delta catC$  株を作製し、catechol 異化物の解析を行うこととした。

#### 17.1.1 $\Delta catC$ 株の作製

*catC* 遺伝子上流と下流をそれぞれ PCR で増幅し、pUC19 にクローニングし、pUC19-*catCup* および pUC19-*catCdown* を作製した。続いて、シーケンス解析によって PCR エラーがないことを確認した後に、pK18mobsacB<sup>76)</sup>と 3 断片ライゲーションすることで、pK18mobsacB- $\Delta catC$  を作製した。次に、同プラスミドを大腸菌 *E. coli* S17-1 株<sup>77)</sup>に導入し、RHA1 株と接合伝達することで、single crossover 株を取得した。single crossover 株を植え継ぎ培養することで double crossover 株を取得した (figure 17-1)。double crossover 株の確認は、サザンハイブリダイゼーションにより行った (figure 17-2)。

#### 17.1.2 $\Delta catC$ 株における catechol 異化物の解析

続いて、*catC* の欠損が catechol 異化に与える影響を調べるため、RHA1 株および $\Delta catC$  株について catechol の異化物を解析することとした。RHA1 株および $\Delta pcaB$  株を 1/5 LB 液体培地で定常期まで生育させた。次に、菌体を集菌し Tris-HCl buffer で wash 後、再度 Tris-HCl buffer に懸濁し、1 mM catechol を添加した。30°C でインキュベートし、catechol の異化を経時的に追った。培養液は、24 時間毎にサンプリングし、培養上清の酢酸エチル抽出物を HPLC にて解析した。

HPLC 分析の結果、RHA1 株においては培養開始前のサンプルに catechol (6) のピークが見られたが、本培養 3 日後には 6 が異化されてそのピークは完全に消失し、保持時間 9.5 分に *cis,cis*-muconate (7) のピークが見られた。7 のピークは本培養 5 日後時点においても検出された (figure 17-3A)。一方、 $\Delta catC$  株では本培養 3 日後には化合物 7 だけではなく、保持時間 3.8 分に(S)-muconolactone (8) ピークが検出された。本培養 5 日後には、*catC* が破壊されているにもかかわらず、蓄積した(S)-8 が減少していた (figure 17-3B)。

また、(S)-8 が Tris-HCl buffer 中で安定であることを確認した (figure 17-4)。これらの結果から、RHA1 株において *catC* を介さない未知の(S)-8 の異化経路が存在していることが示唆された (figure 17-5)。

### RHA1株の染色体

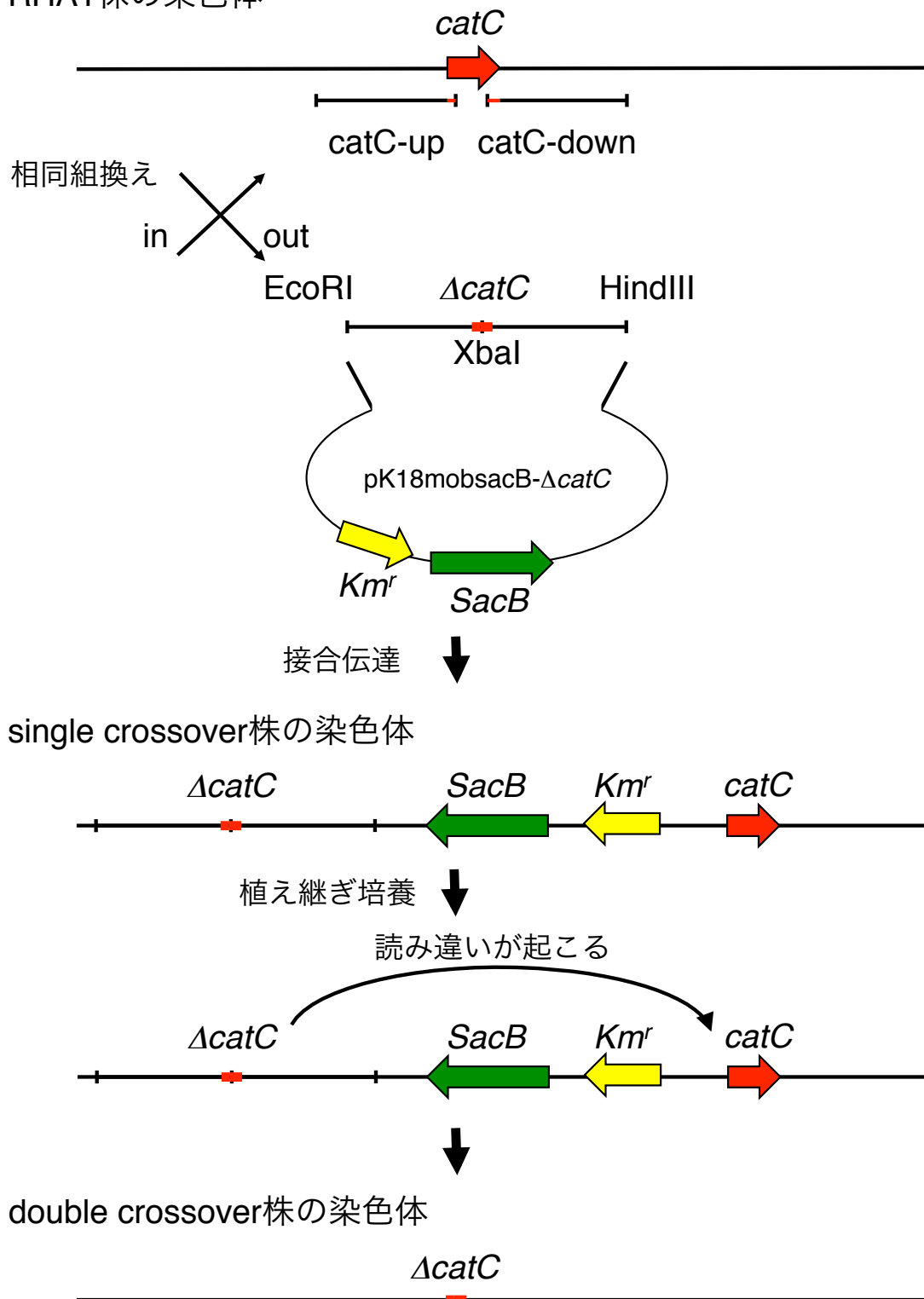
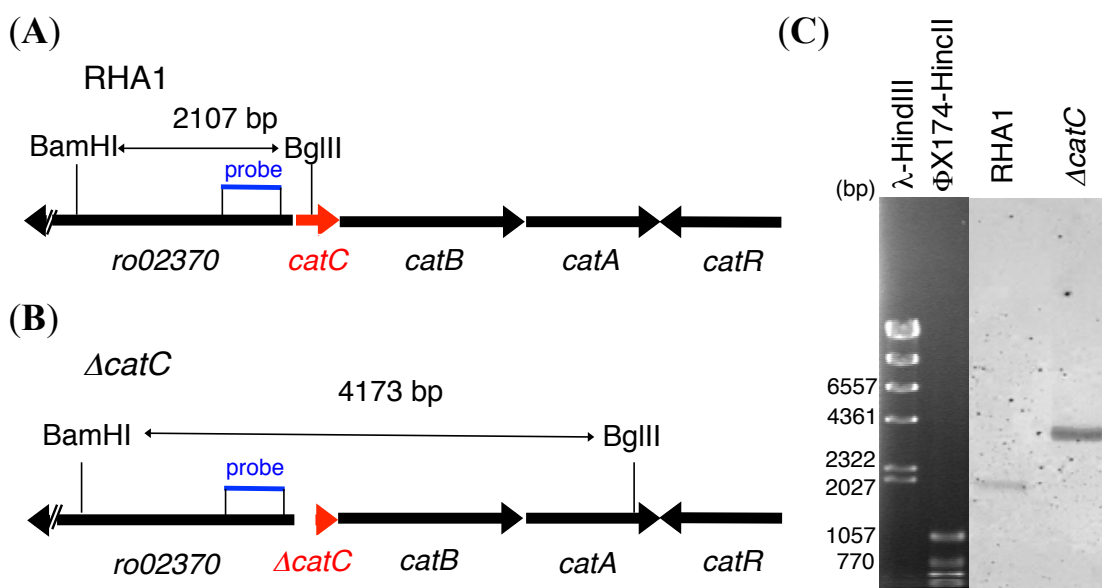
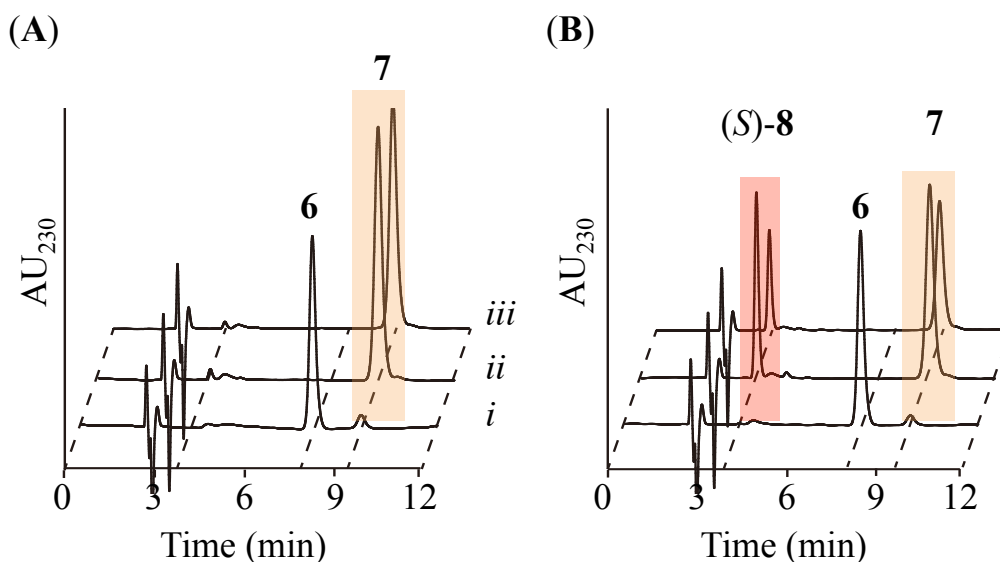


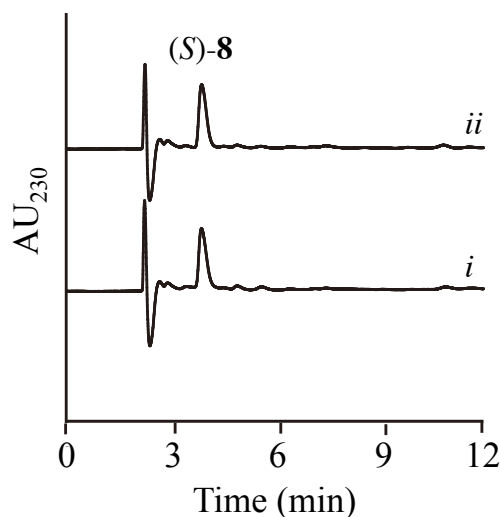
figure 17-1.  $\Delta catC$  株作製のスキーム



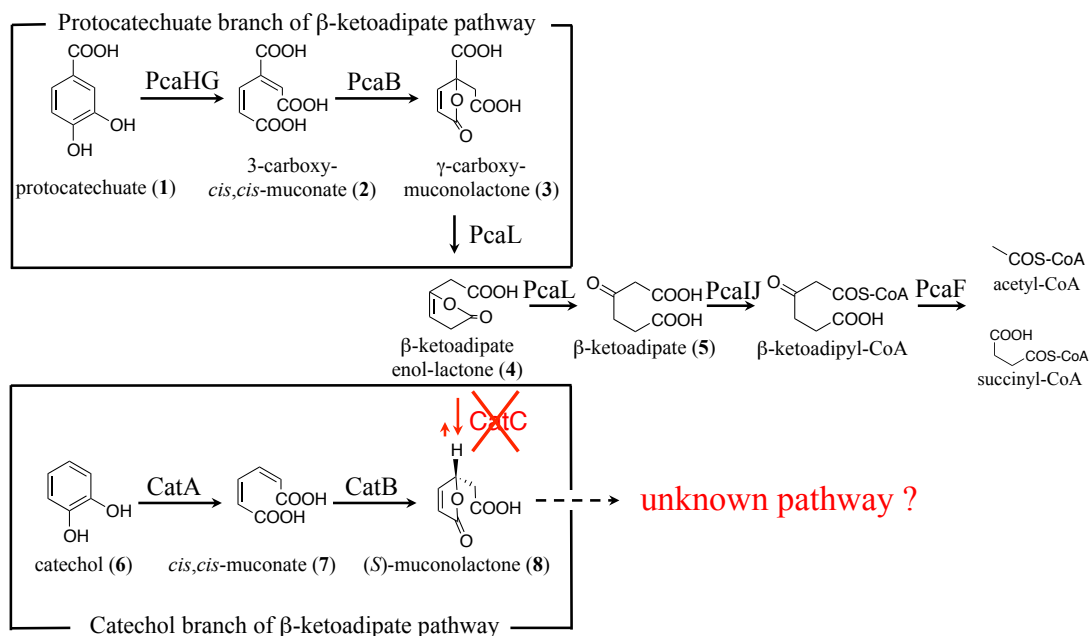
**figure 17-2.  $\Delta catC$  株のサザンハイブリダイゼーション** (A) RHA1 株の遺伝子配座。(B)  $\Delta catC$  株の遺伝子配座。(C) サザンハイブリダイゼーション。クロモソームは制限酵素 BamHI および BglIII で消化した。プローブは *catC*\_up\_conf プライマーと *catC*\_up\_R プライマーで増幅した約 900 bp の断片 (図中青) を用いた。RHA1 株は 2,107 bp 付近にバンドが検出されたのに対し、 $\Delta catC$  株では 4,173 bp 付近にバンドが見られた。



**figure 17-3. RHA1 株および  $\Delta catC$  株における catechol 異化物の HPLC 解析** (A) RHA1 株のクロマトグラム。(i) 本培養 1 日後、(ii) 本培養 3 日後、(iii) 本培養 5 日後の培養上清抽出物の解析。(B)  $\Delta catC$  株のクロマトグラム。(i) 本培養 1 日後、(ii) 本培養 3 日後、(iii) 本培養 5 日後の培養上清抽出物の解析。UV 吸収は 230 nm で検出した。 $\Delta catC$  株において (S)-muconolactone (8) が蓄積し、経時的に同化合物が減少していく様子が見られた。



**figure 17-4.** 化合物(S)-8 における Tris-HCl buffer 中での安定性の確認 Tris-HCl buffer (pH7.5) 1ml 中に 1 mM になるように(S)-8 を入れ、30°C、120 rpm で振盪培養を行った。培養前と培養 72 時間後に 200  $\mu$ l ずつサンプリングし、酢酸エチル抽出物のメタノール溶解物を HPLC で分析した。(i) 培養開始前、(ii) 培養 72 時間後のサンプル。(S)-8 は 30°C の Tris-HCl buffer 中で安定であった。



**figure 17-5.**  $\Delta catC$  株における (S)-muconolactone (8) 異化に関する新規経路の存在

## 17.2 $\Delta pcalJ$ 株による protocatechuate および catechol 異化物の解析

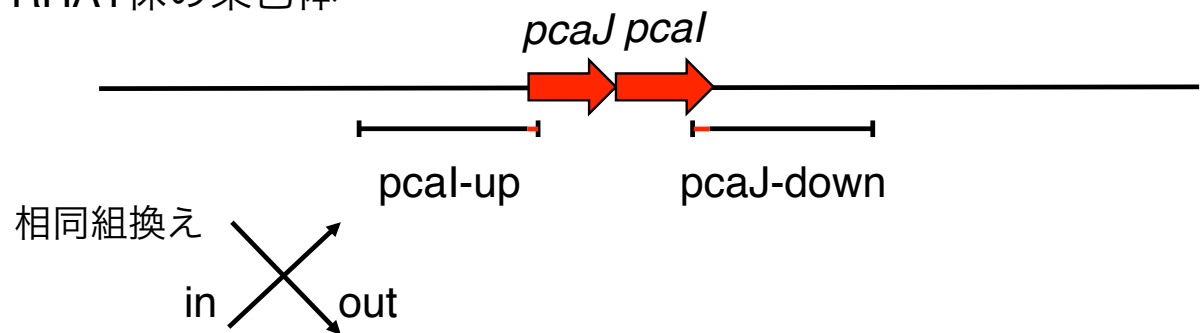
上述のとおり、 $\Delta catC$  株における catechol 異化物を解析した結果、(S)-**8** が蓄積した後に CatC を伴わない未知の経路によって異化されていることが示唆された。次に私は、 $\beta$ -ケトアジピン酸経路中の *pcaIJ* に着目した。*pcaIJ* は  $\beta$ -ケトアジピン酸経路において、 $\beta$ -ketoadipate:succinyl-CoA transferase をコードしており、 $\beta$ -ketoadipate を基質とした場合は succinyl-CoA と反応し、 $\beta$ -ketoadipyl-CoA と succinate を生成する<sup>40, 78, 79</sup>。

RHA1 株において *pcaIJ* を欠損させた場合、*Rhodococcus* 属においてもグラム陰性菌と同様の経路であれば、protocatechuate または catechol を与えた時に、両ルートから  $\beta$ -ketoadipate (**5**) までは異化されるがそれ以降の異化反応が進行せず、化合物 **5** が蓄積すると考えられる。そこで、私は *pcaIJ* の破壊株である  $\Delta pcalJ$  株を作製し、protocatechuate、catechol を異化させた時の異化物の解析を行うこととした。

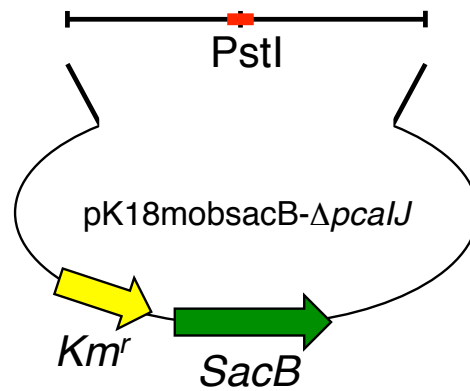
### 17.2.1 $\Delta pcalJ$ 株の作製

$\Delta pcalJ$  株作製のため、*pcaI* の上流と *pcaJ* の下流をそれぞれ PCR で増幅し、pUC19 にクローニングし、pUC19-*pcaI*<sub>up</sub> および pUC19-*pcaJ*<sub>down</sub> を作製した。続いて、シーケンス解析によって PCR エラーがないことを確認した後に、pK18mobsacB と 3 断片ライゲーションすることで、pK18mobsacB- $\Delta pcalJ$  を作製した。次に、作製した pK18mobsacB- $\Delta pcalJ$  を大腸菌 *E. coli* S17-1 株に導入し、RHA1 株と接合伝達することで、single crossover 株を取得した。single crossover 株を植え継ぎ培養することで double crossover 株を取得した (figure 17-6)。double crossover 株の確認は、サザンハイブリダイゼーションにより行った (figure 17-7)。

# RHA1株の染色体

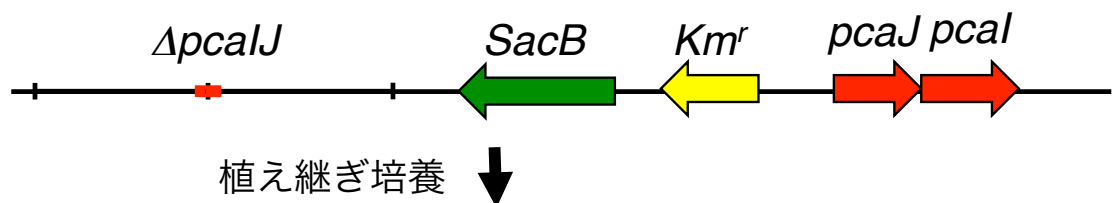


EcoRI  $\Delta pcalJ$  HindIII



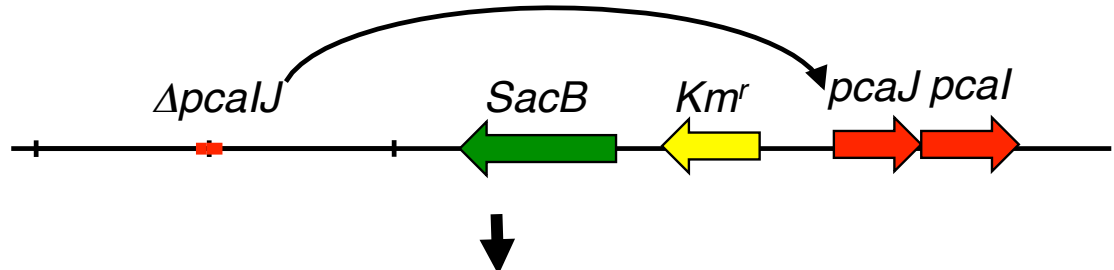
接合伝達

## single crossover株の染色体



植え継ぎ培養

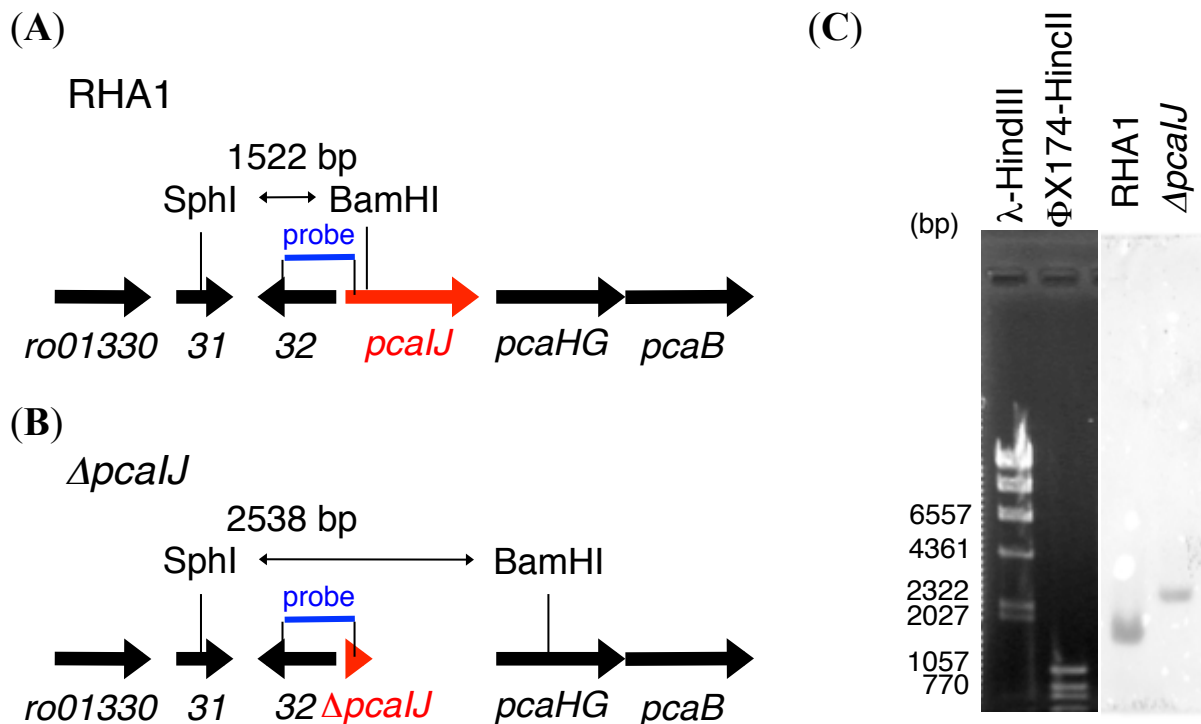
読み違いが起こる



## double crossover株の染色体

$\Delta pcalJ$

figure 17-6.  $\Delta pcalJ$  株の作製スキーム



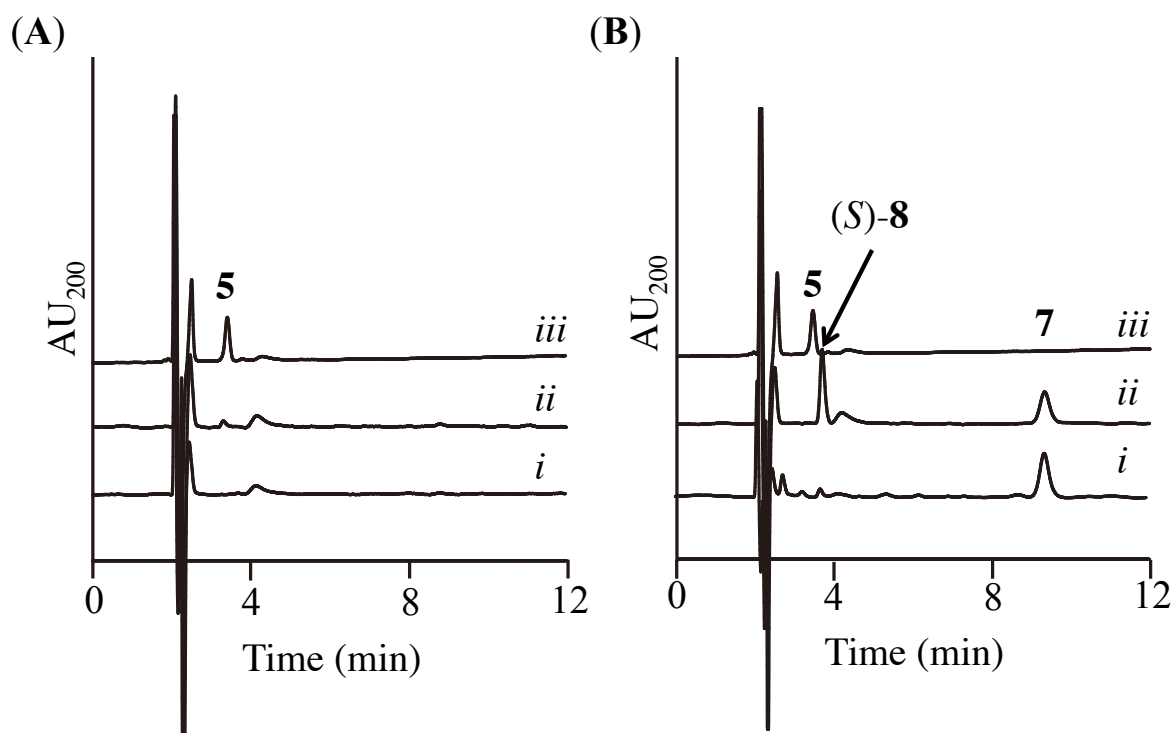
**figure 17-7.  $\Delta pcaIJ$  株のサザンハイブリダイゼーション** (A) RHA1 株の遺伝子配座。(B)  $\Delta pcaIJ$  株の遺伝子配座。(C) サザンハイブリダイゼーション。クロモソームは制限酵素 SphI および BamHI で消化した。プローブは *pcaI*\_up\_R プライマーと *pcaI*\_up\_conf プライマーで増幅した約 860 bp の断片 (図中青) を用いた。RHA1 株は 1,522 bp 付近にバンドが検出されたのに対し、 $\Delta pcaIJ$  株では 2,538 bp 付近にバンドが見られた。

### 17.2.2 $\Delta pcaIJ$ 株による protocatechuate および catechol 異化物の解析

次に、作製した  $\Delta pcaIJ$  株について、protocatechuate (1) および catechol (6) の異化物を解析することとした。まず、RHA1 株および  $\Delta pcaIJ$  株を 1/5 LB 液体培地で定常期まで生育させた。続いて、菌体を集菌し Tris-HCl buffer で wash 後、再度 Tris-HCl buffer に懸濁し、1 mM の 1 または 6 を添加した。30°C、120 rpm でインキュベートし、各基質の異化を調べた。培養は、24 時間毎にサンプリングし、培養上清の酢酸エチル抽出物を HPLC にて解析した。培養 3 日後の HPLC 解析の結果を figure 17-8 に示す。

PcaIJ は  $\beta$ -keto adipate:succinyl-CoA transferase であり、 $\Delta pcaIJ$  株では  $\beta$ -keto adipate (5) を異化することができずに化合物 5 が蓄積すると考えられた。HPLC 解析の結果、protocatechuate の異化においては、RHA1 株では protocatechuate が acetyl-CoA、succinyl-CoA まで異化されたために蓄積物のピークは見られなかった。それに対して、 $\Delta pcaIJ$  株では予想通りに化合物 5 の蓄積が見られた (figure 17-8)。一方、catechol の

異化においては、 $\Delta pcaIJ$  株において(*S*)-muconolactone (**8**) のピークは見られたが化合物 **5** のピークは確認できなかった (figure 17-8)。 $\Delta pcaIJ$  株において**5**が蓄積しなかったということは、やはり *Rhodococcus* における(*S*)-**8** の異化に関して、CatC ではない別の異化ルートが存在している可能性が示唆された。



**figure 17-8. RHA1 株および $\Delta pcaIJ$  株における protocatechuate、catechol 異化物の HPLC 解析** (A) protocatechuate 異化物のクロマトグラム。(i) RHA1 株 (ii)  $\Delta pcaIJ$  株 (iii)  $\beta$ -ketoadipate (**5**) の標品。(B) catechol 異化物のクロマトグラム。(i) RHA1 株 (ii)  $\Delta pcaIJ$  株 (iii) **5** の標品。波長は 200 nm で測定した。Protocatechuate、catechol を添加してから 3 日間培養後のサンプルにおける結果を示した。

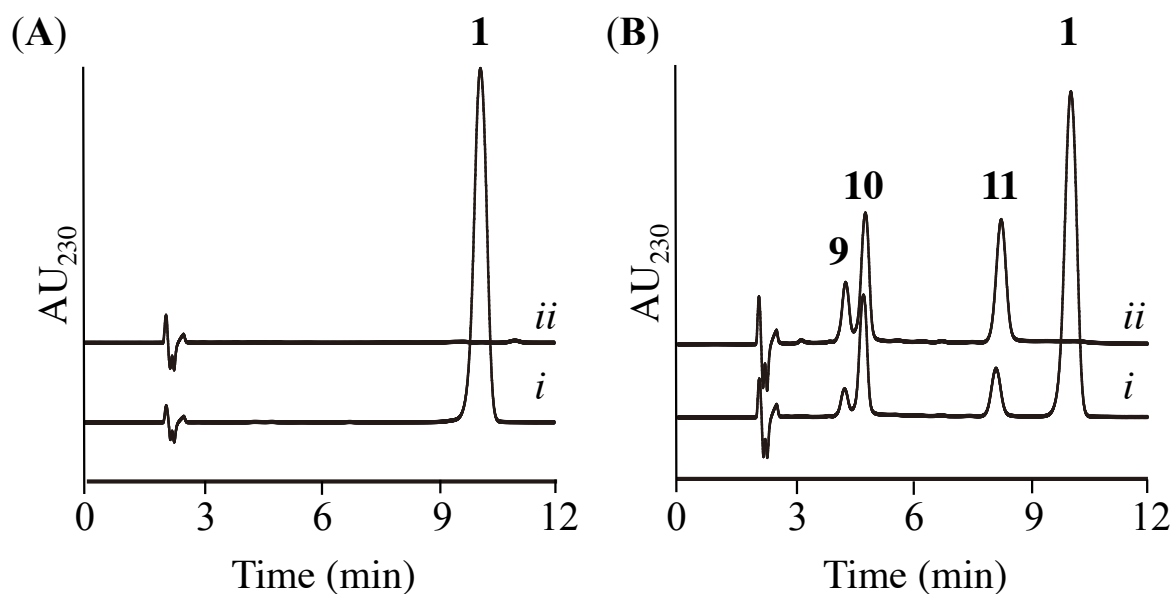


## 17.3 $\Delta pcaB$ 株における protocatechuate 異化物の解析

### 17.3.1 $\Delta pcaB$ 株における protocatechuate 異化物の HPLC 解析

原らは、 $\beta$ -ケトアジピン酸経路の遺伝子破壊実験により、protocatechuate branch から catechol branch へのバイパス経路が存在することを主張した<sup>80)</sup>。具体的には、プロトカテク酸以降の代謝に関与する *pcaB*、*pcaL* の各単独破壊株である  $\Delta pcaL$  株、 $\Delta pcaB$  株を作製し、テレフタル酸またはフタル酸を唯一の炭素源としたときの生育能を調べた。その結果、 $\Delta pcaL$  株はテレフタル酸、フタル酸の両方で生育可能であるが、 $\Delta pcaB$  株はフタル酸を唯一の炭素源として生育できないことを明らかにした。したがって、原らは RHA1 株がテレフタル酸を炭素源とする時、 $\beta$ -ケトアジピン酸経路の protocatechuate branch および catechol branch の両方を使用している可能性があるとして結論づけた<sup>54)</sup>。

そこで私は、RHA1 株および原博士から分与していただいた  $\Delta pcaB$  株について、テレフタル酸およびフタル酸異化経路の合流点となる protocatechuate (1) の異化物の解析を行い、catechol branch 中の異化中間体が存在するかどうかを確かめた。まず、RHA1 および  $\Delta pcaB$  株を 1/5 LB 液体培地で定常期まで生育させた。次に、菌体を集菌し Tris-HCl buffer で wash 後、再度 Tris-HCl buffer に懸濁し、1 mM の protocatechuate を添加した。30°C でインキュベートし、protocatechuate の異化を経時的に調べた。培養液は、24 時間毎にサンプリングし、培養上清の酢酸エチル抽出物を HPLC にて解析した。本培養 4 日後のサンプルを分析した結果、両菌株において protocatechuate が残存していた。RHA1 株においては protocatechuate 以外のピークは見られなかったのに対し、 $\Delta pcaB$  株では protocatechuate 異化物と思われるピークが複数見られた。本培養 7 日後には、両菌株において protocatechuate のピークが完全に消失していた。RHA1 株においては蓄積物のピークは全く見えず (figure 17-9A)、4 日後のサンプルで見られた  $\Delta pcaB$  株における蓄積物のピークは 7 日後のサンプルでも検出された (figure 17-9B)。 $\beta$ -ケトアジピン酸経路に従えば、 $\Delta pcaB$  株ではおそらく 3-carboxy-*cis,cis*-muconate が蓄積していると考えられる。しかし、HPLC 上では 3 つの未知化合物のピークがみられた (figure 17-9B)。そこで私は  $\Delta pcaB$  株による protocatechuate 異化物を解析するために、培養上清よりそれらの分離・精製を行った。

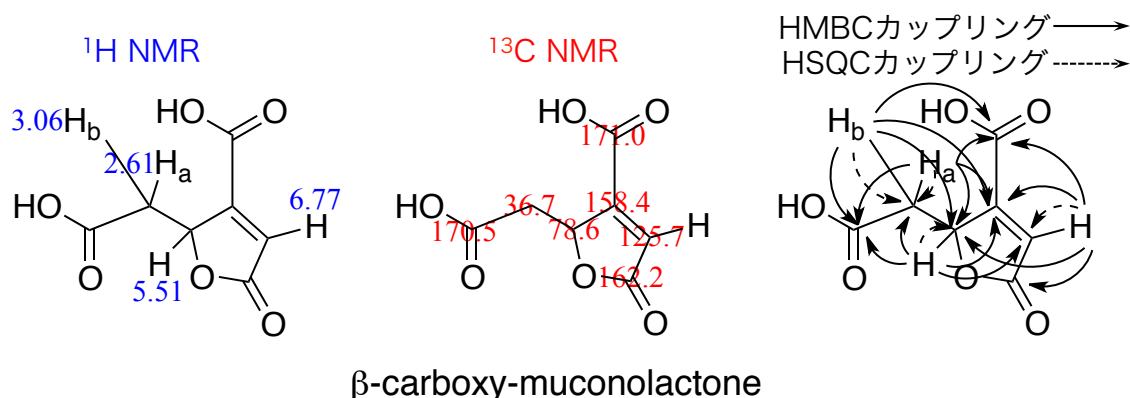


**figure 17-9. RHA1 株および $\Delta pcaB$  株における protocatechuate 異化物の HPLC 解析**  
**(A)** RHA1 株のクロマトグラム。(i) 本培養 4 日後、(ii) 本培養 7 日後の培養上清抽出物の解析。**(B)**  $\Delta pcaB$  株のクロマトグラム。(i) 本培養 4 日後、(ii) 本培養 7 日後の培養上清抽出物の解析。UV 吸収は 230 nm で検出した。 $\Delta pcaB$  株において RHA1 株には見られない 3 つのピーク **9**、**10**、**11** が検出された。

### 17.3.2 $\Delta pcaB$ 株におけるプロトカテク酸異化中間体の同定

$\Delta pcaB$  株のプロトカテク酸異化中間体の構造を解析するために、50 ml の培養上清から酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層の濃縮乾固物を順相シリカゲルクロマトグラフィー、逆相 HPLC による分取を行い、それぞれ単一のピークになるまで精製した。分取・精製を行った結果、3 つの化合物が得られた。それらの化合物を HPLC の保持時間の短い方から化合物 **9**、**10**、**11** とする。3 つの化合物について DART/TOF-MS により精密分子量を決定した。また、化合物 **9**、**11** においては NMR により  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、HSQC、HMBC 解析を行った。化合物 **10** に関しては、その構造が非常に不安定であり、精製中に異性化してしまったため単一化合物の NMR を取得できなかった。

化合物 **9** の DART/TOF-MS スペクトル、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトル、HSQC スペクトル、HMBC スペクトルを解析した結果、化合物 **9** は  $\beta$ -carboxy-muconolactone (**9**) であることが判明した (figure 17-10)。化合物 **9** における各 NMR スペクトルの詳細は figure 17-11 から figure 17-14 に示す。



Positive mode DART/TOF-MS  $m/z$  187.02607 (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_6^+$ , 187.02371)

**figure 17-10.  $\beta$ -carboxy-muconolactone の構造**  $\beta$ -carboxy-muconolactone (**9**).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  2.61 (dd, 1H,  $J = 8.0, 16.5$  Hz, C1'Ha), 3.06 (dd, 1H,  $J = 3.2, 16.5$  Hz, C1'Hb), 5.51 (ddd, 1H,  $J = 2.0, 3.2, 8.0$  Hz, C2H), 6.77 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, C4H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  36.7 (C1'), 78.6 (C2), 125.7 (C4), 158.4 (C3), 162.2 (C5), 170.5 (C2'), 171.0 (carboxyl group of C3). Positive mode DART/TOF-MS,  $m/z$  187.02607 (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_6^+$ , 187.02371).

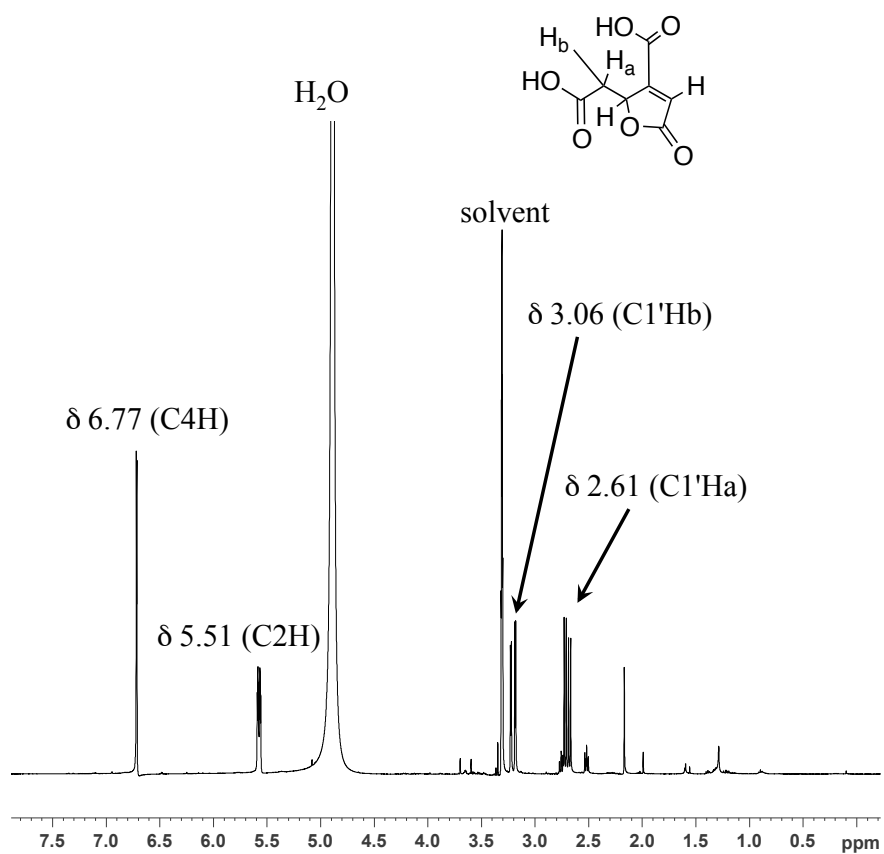


figure 17-11. 化合物9の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

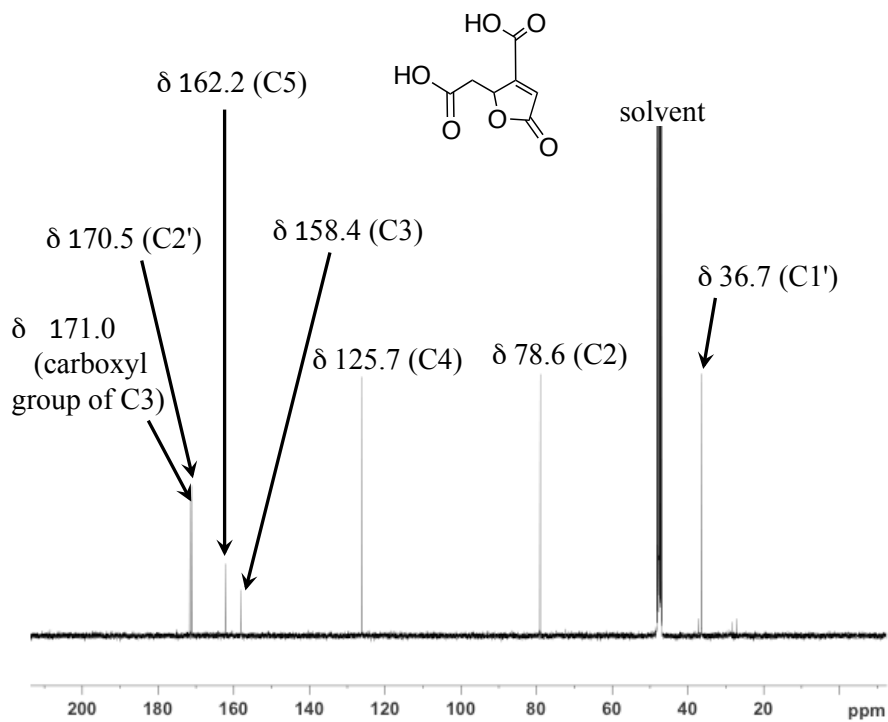


figure 17-12. 化合物9の <sup>13</sup>C-NMR スペクトル

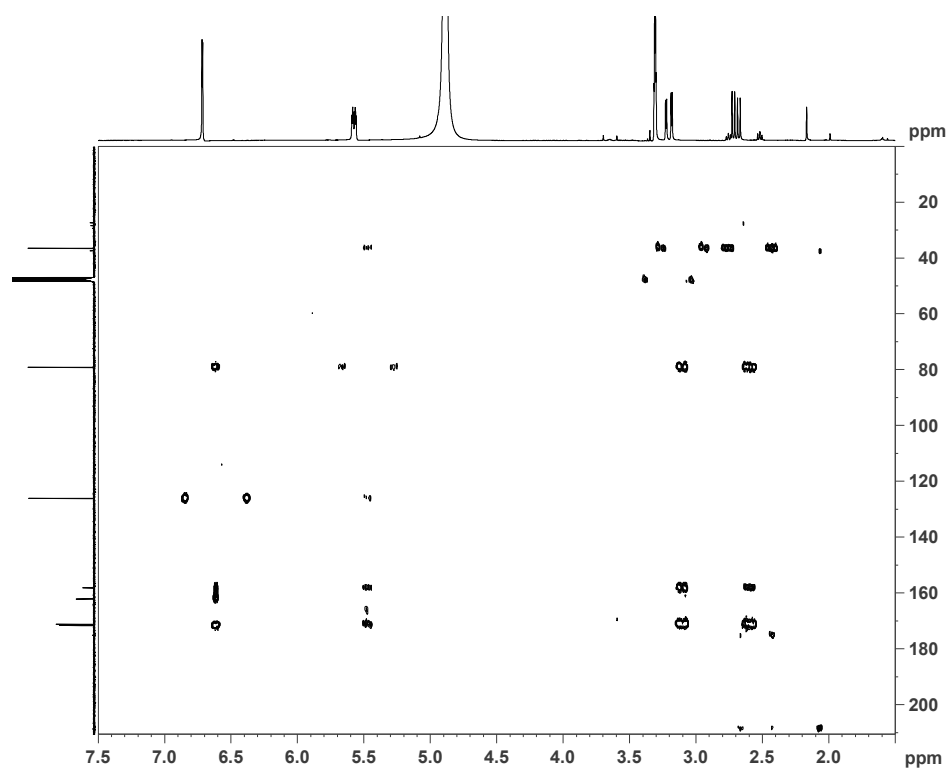


figure 17-13. 化合物 9 の HMBC スペクトル

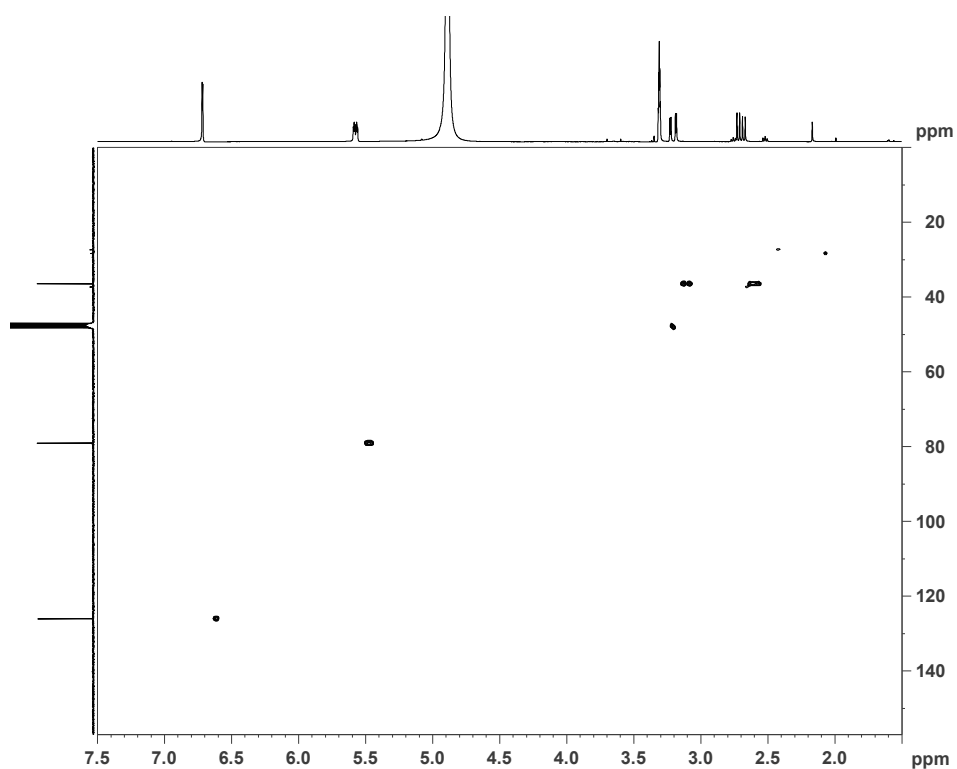
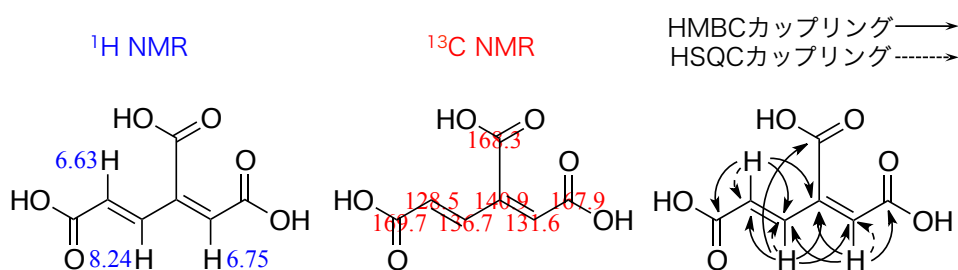


figure 17-14. 化合物 9 の HSQC スペクトル

化合物 **11** についても同様に、DART/TOF-MS スペクトル、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトル、HSQC スペクトル、HMBC スペクトルの解析を行った。その結果、化合物 **11** の候補として、3-carboxy-*trans,trans*-muconate および 3-carboxy-*cis,trans*-muconate の2つが考えられた。 $^1\text{H}$ -NMR における4位と5位のプロトン間のJ値は16.1であり、その幾何異性は *trans* であると判断した。さらに、NOESY スペクトルを解析し、化合物 **11** には3-carboxy-*trans,trans*-muconate でなければ現れないシグナルの存在が確認された (figure 17-20)。よって、化合物 **11** を3-carboxy-*trans,trans*-muconate (**10**) と同定した (figure 17-15)。化合物 **11** における各 NMR スペクトルの詳細は figure 17-16 から figure 17-20 に示す。

また、化合物 **10** については、DART/TOF-MS において Negative モードで  $m/z$  185.00810 に分子イオンピークが観測された。また、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルの解析により、3-carboxy-*trans,trans*-muconate と類似しているがケミカルシフトの異なるシグナルが得られた。4位と5位のプロトン間のJ値が16.0であり、その幾何異性は *trans* であると判断した (figure 17-21)。4位と5位のプロトンが *trans* である3-carboxy-muconate の異性体には、*trans,trans* 体 (化合物 **11**) および *cis,trans* 体が考えられる。化合物 **11** を *trans,trans* 体と同定したことから、化合物 **10** は *cis,trans* 体、すなわち 3-carboxy-*cis,trans*-muconate であると同定した (figure 17-22)。



3-carboxy-*trans,trans*-muconate

Negative mode DART/TOF-MS  $m/z$  185.01105 (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_6^-$ , 185.00916)

**figure 17-15. 化合物 **11** ( 3-carboxy-*trans,trans*-muconate ) の構造**  
 3-carboxy-*trans,trans*-muconate (**11**).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ):  $\delta$  6.63 (d, 1H,  $J = 16.1$  Hz, C5H), 6.75 (s, 1H, C2H), 8.24 (d, 1H,  $J = 16.1$  Hz, C4H);  $^{13}\text{C}$  NMR( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ):  $\delta$  128.5 (C5), 131.6 (C2), 136.7 (C4), 140.9 (C3), 167.9 (C1), 168.3 (carboxyl group of C3), 169.7 (C6). Negative mode DART/TOF-MS,  $m/z$  185.01105 (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_6^-$ , 185.00916).

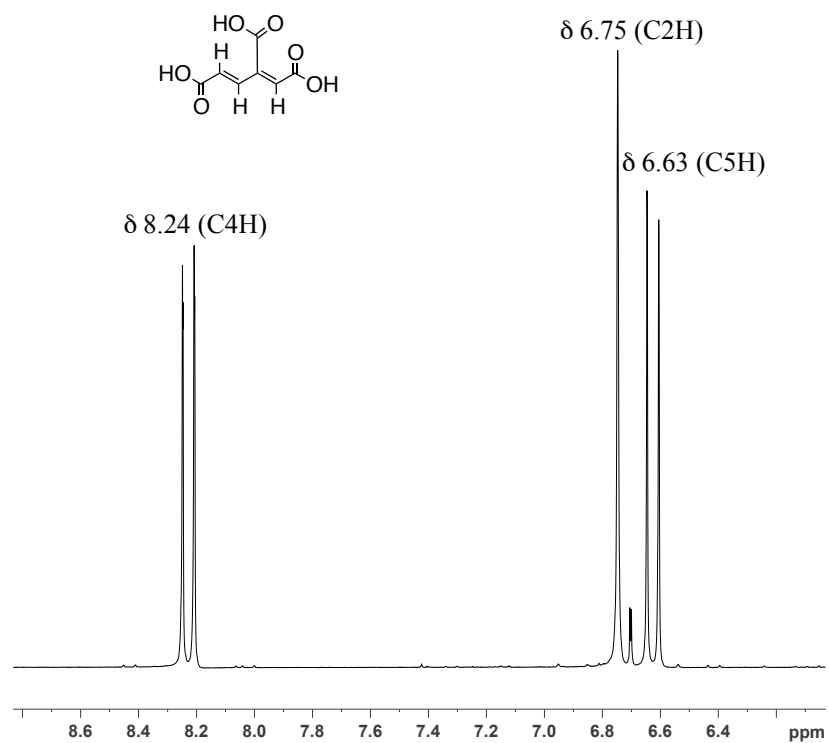


figure 17-16. 化合物11の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル

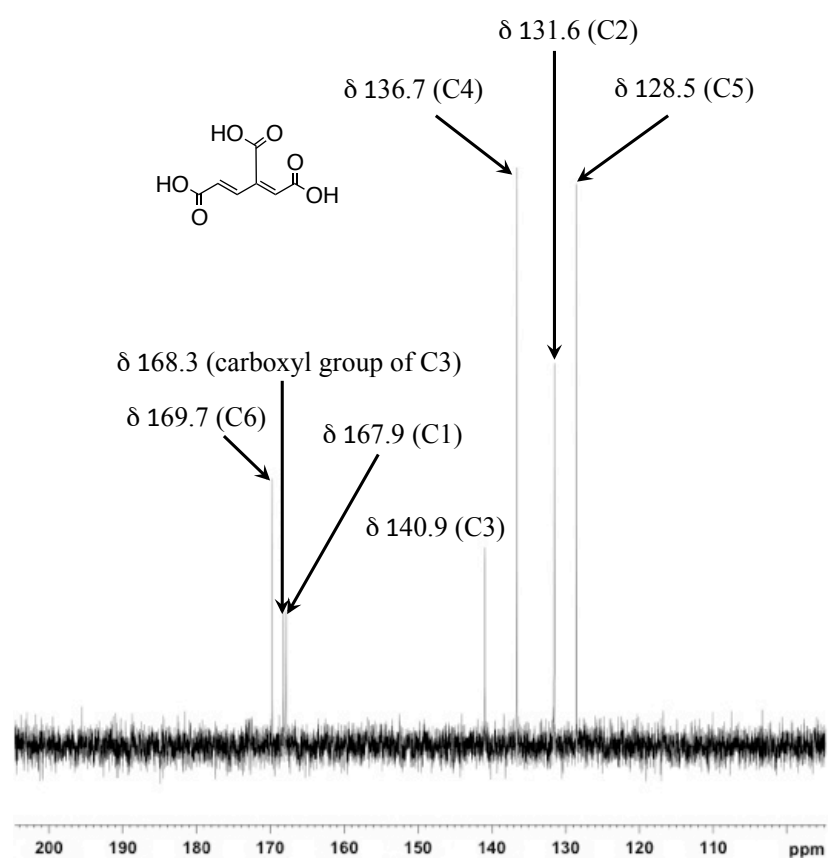


figure 17-17. 化合物11の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル

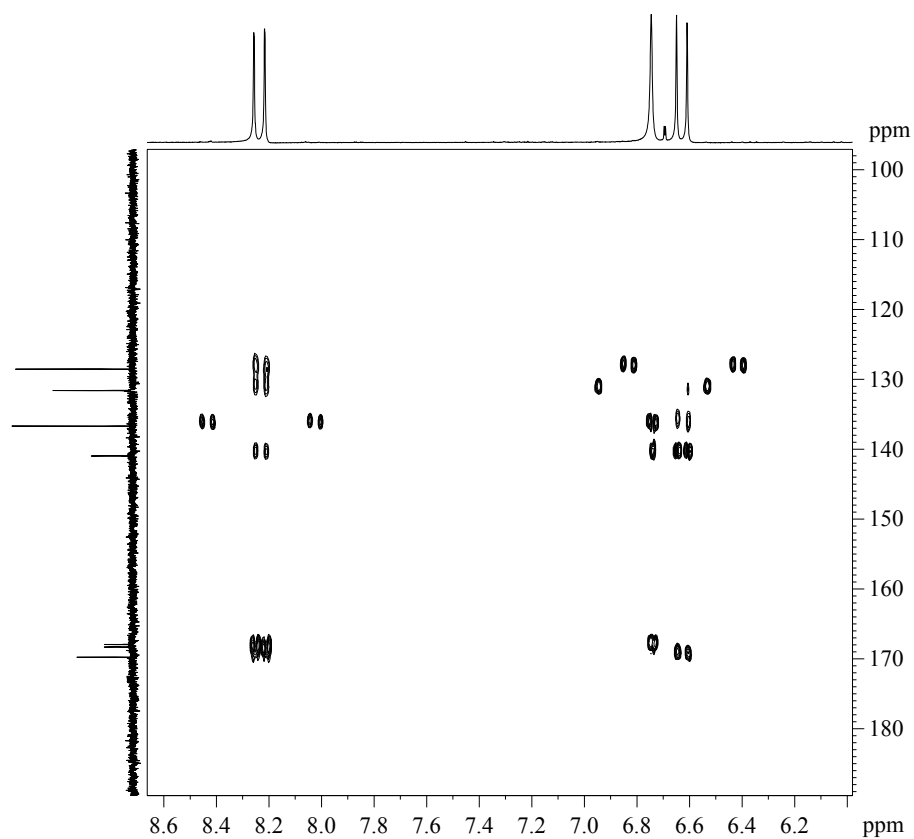


figure 17-18. 化合物 11 の HMBC スペクトル

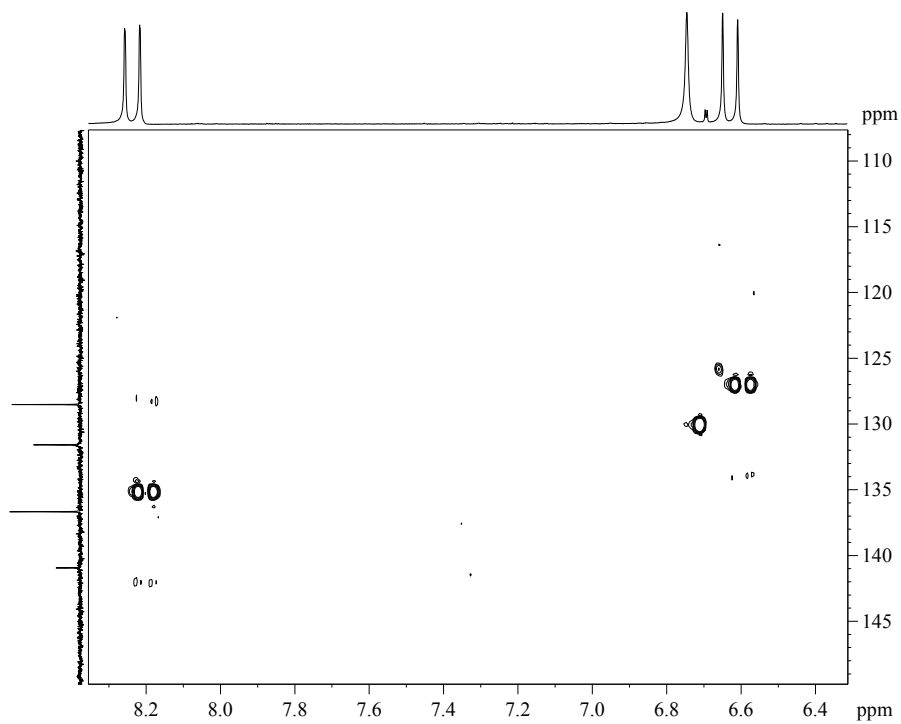
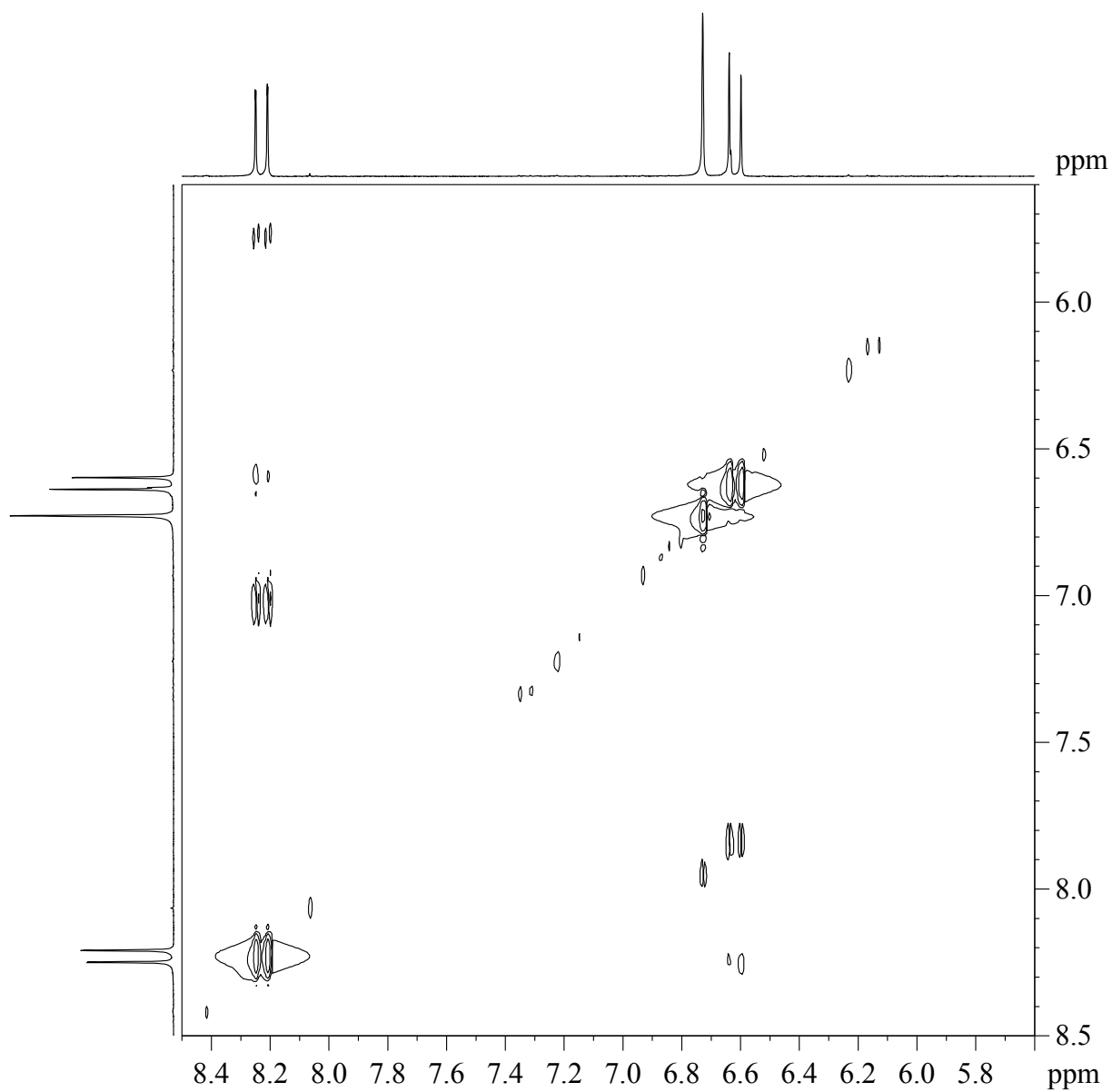


figure 17-19. 化合物 11 の HSQC スペクトル





**figure 17-20. 化合物 11 の NOESY スペクトル**

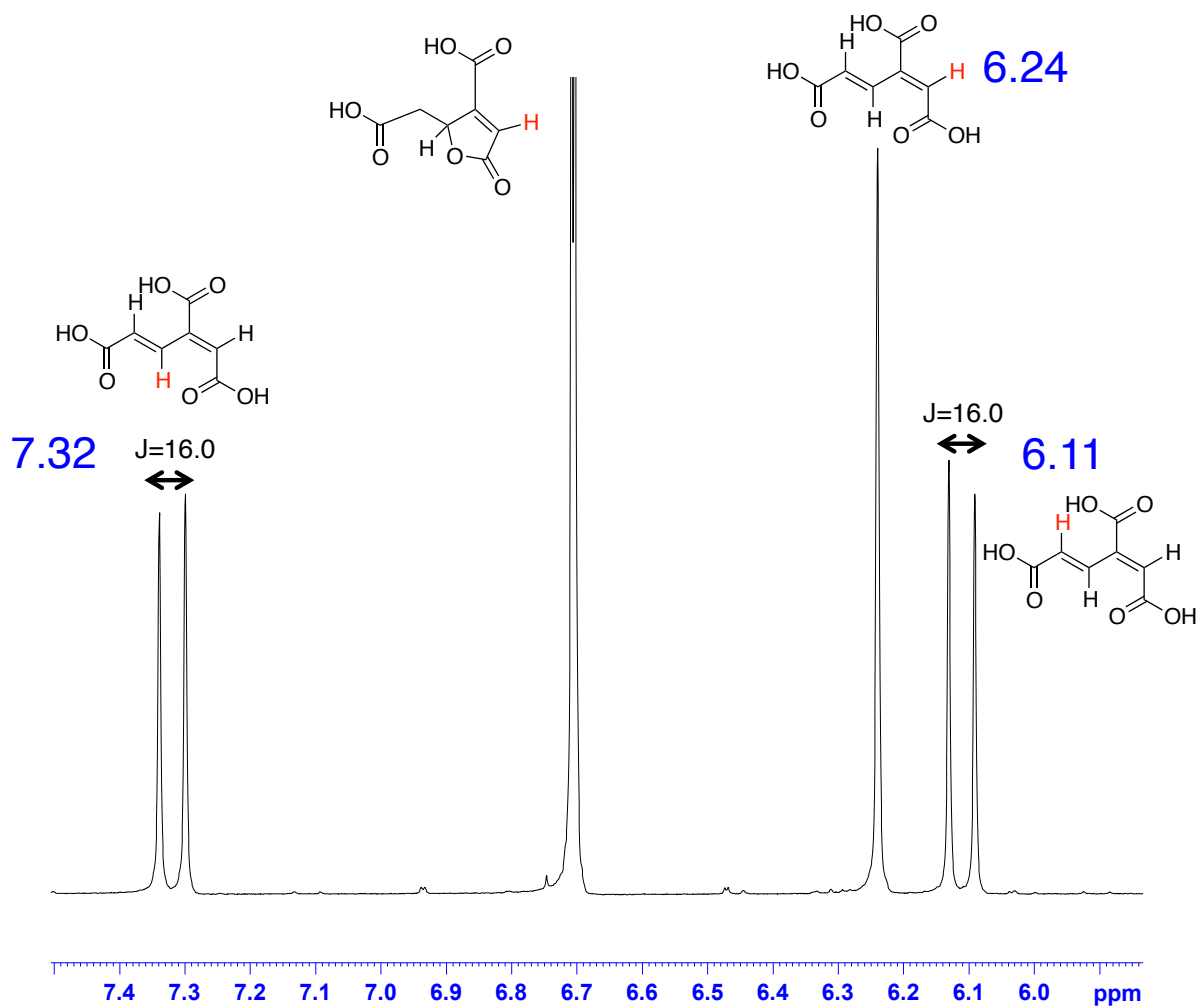
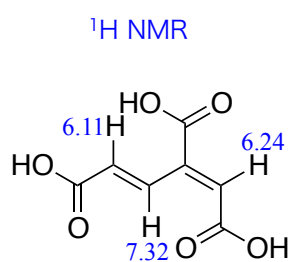


figure 17-21. 化合物 10 の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル



3-carboxy-*cis,trans*-muconate

Negative mode DART/TOF-MS  $m/z$  185.00810 (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_6^-$ , 185.00916)

figure 17-22. 化合物 10 の構造 3-carboxy-*cis,trans*-muconate (10).  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.11 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz, C5H), 6.24 (s, 1H, C2H), 7.32 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz, C4H). Negative mode DART/TOF-MS,  $m/z$  185.00810 (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_6^-$ , 185.00916).

#### 17.4 17 節の小括

本節では、RHA1 株の $\beta$ -ケトアジピン酸経路中の遺伝子である *catC*、*pcaIJ*、*pcaB* の破壊株を用いて基質の異化中間体を解析した。第一に、 $\Delta catC$  株において catechol を投与すると、一度 CatC の基質となる(S)-muconolactone (8) が蓄積するが、経時的に(S)-8 が異化されることが明らかとなった。この結果より、RHA1 株において *catC* を介さない未知の(S)-8 異化経路の存在が示唆された。

第二に、 $\Delta pcaIJ$  株において protocatechuate (1) および catechol (6) の異化中間体を解析した。その結果、1 の異化に関しては $\beta$ -keto adipate (5) の蓄積が確認できた。一方、6 の異化に関しては(S)-8 の蓄積は見られたものの、5 の蓄積は見られなかった。この結果より、やはり RHA1 株において(S)-8 が CatC 以外のルートによっても異化されるのではないかと推測された。

第三に、3-carboxy-*cis,cis*-muconate (2) のラクトン化を触媒する *pcaB* の破壊株  $\Delta pcaB$  株を用いて、protocatechuate 異化中間体の化学的分析を行った。当初の予想では、 $\Delta pcaB$  株の protocatechuate 異化中間体として、化合物 2 が蓄積すると思われた。しかし今回、培養上清の酢酸エチル抽出物から単離・精製できた化合物は $\beta$ -carboxy-muconolactone (9)、3-carboxy-*cis,trans*-muconate (10)、3-carboxy-*trans,trans*-muconate (11) の 3 つであった。これらは、いずれも 2 の異性体である。これらは 2 が構造的に不安定であるために、培養上清を酸性にする段階や酢酸エチル抽出を行っている間に異性化したものと考えられる。また、 $\Delta pcaB$  株において protocatechuate を異化させても catechol branch 中の化合物が蓄積することがなかった。したがって、 $\Delta pcaB$  株を用いた protocatechuate の異化中間体の解析では、protocatechuate branch から catechol branch へのバイパス経路を証明することができなかった。また、原らは、protocatechuate branch から catechol branch へバイパスさせるタンパク質として、acetyl-CoA carboxylase と相同性を有するが機能未知である Ro02782 が関与すると推測している<sup>54)</sup>。したがって、次節において私は Ro02782 および、それと隣接する Ro02781 の機能解析を行い、*Rhodococcus* における $\beta$ -ケトアジピン酸経路の未知バイパス経路を解明する糸口を探ることとした。

## 18. 新規長鎖 acyl-CoA carboxylase Ro02782 および新規長鎖脂肪酸 CoA ligase Ro02781 の機能解析

### 18.1 Ro02782 の相同性検索

RHA1 株における $\beta$ -ケトアジピン酸経路のバイパス経路に関与する可能性のある未知酵素 Ro02782 と既知の LCC との Blast 解析を行った結果、*M. avium* subspecies *paratuberculosis* の LCC (MapLCC) と 71%、*R. palustris* の LCC (RpLCC) と 53% という高いアミノ酸配列の相同性を示した (figure 18-1)。したがって、Ro02782 も MapLCC や RpLCC と同様に acyl-CoA carboxylase 活性を示す可能性が考えられたので、組換え Ro02782 タンパク質を調製し、*in vitro* 反応を行うこととした。

また、*ro02782* 遺伝子のすぐ上流には、*ro02781* 遺伝子が存在しており (figure 18-2)、*ro02781* の終止コドンが *ro02782* の開始コドンと重なることから、これらの遺伝子が共転写されることが予想された。さらに Blast 解析から、*ro02781* は長鎖脂肪酸 CoA 結合酵素と相同性を示した。興味深いことに、*M. avium* subspecies *paratuberculosis* および *R. palustris* の LCC の上流にも脂肪酸 CoA ligase が存在している。私は、Ro02781 が $\beta$ -ケトアジピン酸経路のバイパス経路に関与する可能性も考えて、Ro02781 についても組換えタンパク質を作製し *in vitro* 反応を行うことにした。



**figure 18-1. Ro02782 とそのホモログのシークエンスアライメント** RHA1 株における Ro02782 は、*M. avium* subspecies *paratuberculosis* の LCC (MapLCC) と 71%、*R. palustris* の LCC (RpLCC) と 53% のアミノ酸配列相同性を示した。上段から、Ro02782、MapLCC、RpLCC の順番である。アライメントは ESPrift<sup>81)</sup> を使用して作製した。

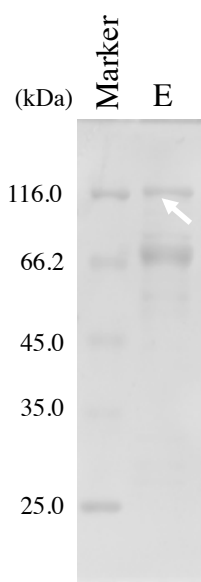


**figure 18-2. RHA1 株における ro02782 周辺の遺伝子配座** ro02780 は、TetR family transcriptional regulator、ro02781 は、AMP-dependent CoA ligase、ro02782 は、acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit、carboxyl transferase、biotin carboxyl carrier protein、ro02783 は、alcohol dehydrogenase/quinone oxidoreductase とそれぞれ相同性がある。

## 18.2 組換え Ro02782 を用いた *in vitro* 反応

### 18.2.1 組換え Ro2782 の精製

私は *ro02782* の機能解析を行うために、組換え Ro02782 を精製し、*in vitro* 反応を行うことにした。そこで、RHA1 株のクロモソームを鋳型に PCR 法にて *ro02782* 配列を増幅し、pUC19 にクローニングすることで、pUC19-*ro02782* を構築した。次に、*ro02782* を発現ベクター pColdI にクローニングし、pColdI-*ro02782* を構築した。続いて、構築したプラスミドを大腸菌 *E. coli* BL21 株に導入した。BL21/pColdI-*ro02782* を 0.1 mM IPTG 誘導下で振盪培養したところ、Ro02782 を可溶性タンパク質として取得することができた。そこで、その可溶性画分から Ni-NTA spin column を用いて組換え Ro02782 を精製し、酵素標品とした (figure 18-3)。



**figure 18-3.** 大腸菌 *E. coli* BL21/pColdI-*ro02782* による組換え Ro02782 の発現  
E は Elute 画分を示す。組換え Ro02782 を矢印でハイライトした。

### 18.2.2 組換え Ro02782 を用いた *in vitro* 反応

Tran らは *R. palustris* における新規単鎖マルチドメイン型ビオチン依存性カルボキシラーゼ (RpLCC) を用いて、種々の炭素鎖をもつ acyl-CoA との反応性を解析した。そして、RpLCC が短鎖・中鎖の acyl-CoA よりも長鎖 acyl-CoA に高い反応性を示すことを明らかにした<sup>60)</sup>。したがって、本実験で得られた組換え Ro02782 でも同様に様々な acyl-CoA と反応する可能性が示唆された。そこで私は、組換え Ro02782 と

acetyl-CoA、hexanoyl-CoA、octanoyl-CoA の *in vitro* 反応を行った。反応は、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、20 mM NaHCO<sub>3</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、1 mM CoA 体、2 mM ATP、組換え Ro02782 1 µg を 100 µl スケール、30°C で 1 時間インキュベートした。反応液は、MILLIPORE 社の Amicon Ultra 3K を用いて限外ろ過し、ろ液の一部を HPLC 分析した (figure18-4、figure18-5)。その結果、いずれの反応においても反応の進行は見られなかった。

また私は、RHA1 株において組換え Ro02782 を調製すれば、活性のあるタンパク質が得られるのではないかと考えて RHA1 株での発現用プラスミド pTipQC1-ro02782 を作製して、RHA1 株に導入した。しかしながら、現段階において私は RHA1/pTipQC1-ro02782 による組換え Ro02782 の精製に成功していない。

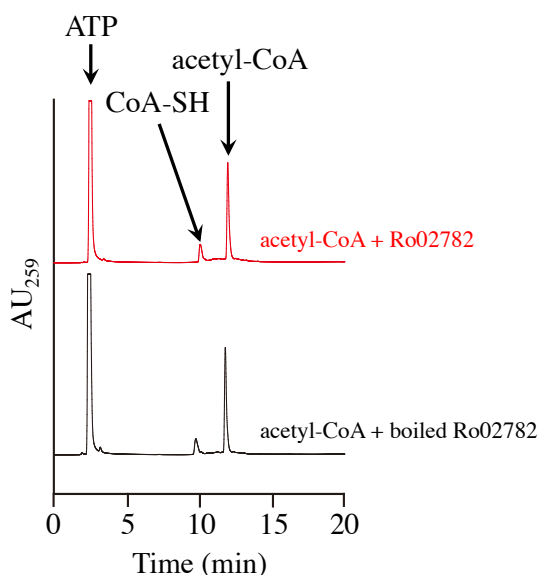


figure 18-4. 組換え Ro02782 と acetyl-CoA の *in vitro* 反応

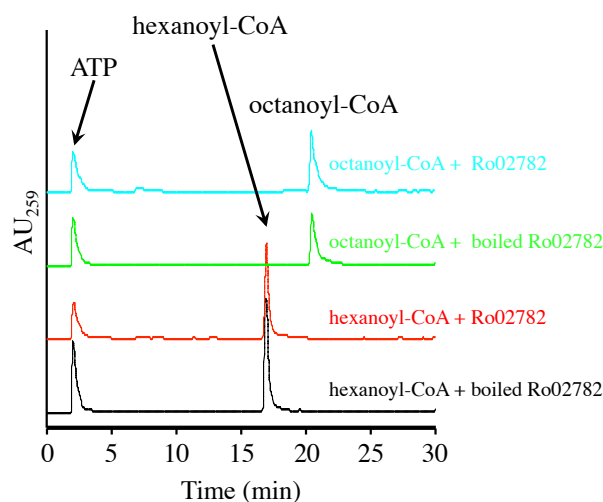
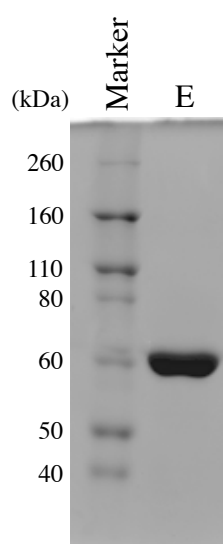


figure 18-5. 組換え Ro02782 と hexanoyl-CoA、octanoyl-CoA の *in vitro* 反応

### 18.3 組換え Ro02781 を用いた *in vitro* 反応

#### 18.3.1 RHA1 株を用いた組換え Ro2781 の精製

続いて、Ro02781 の機能解析を行うために、組換え Ro02781 を精製し、*in vitro* 反応を行うことにした。Ro02782 と同様に、RHA1 株のクロモソームを鋳型に PCR 法にて *ro02781* 配列を増幅し、pUC19 にクローニングすることで、pUC19-*ro02781* を構築した。次に、インサートを pTipQC1 へ導入し、pTipQC1*ro02781* を構築した。続いて、構築したプラスミドを *R. jostii* RHA1 株に導入した。RHA1/pTipQC1-*ro02781* を 1 µg/ml チオストレプトン誘導下で振盪培養したところ、Ro02781 を可溶性タンパク質として取得することができた。そこで、その可溶性画分から Ni-NTA spin column を用いて組換え Ro02781 を精製し、酵素標品とした (figure 18-6)。



**figure 18-6.** RHA1/pTipQC1-*ro02781* による組換え Ro02781 の発現 EはElute 画分を示す。

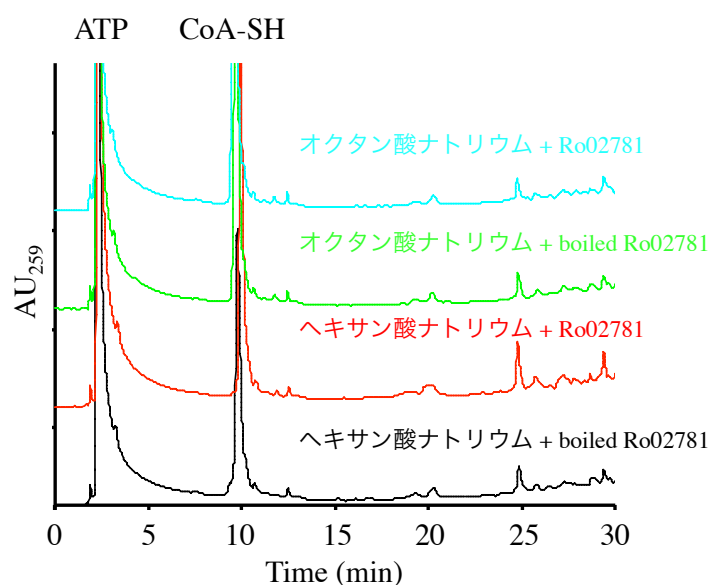
#### 18.3.2 組換え Ro02781 を用いた *in vitro* 反応

Ro02781 は Ro02782 と共転写されている可能性を述べたが、その基質として脂肪酸と反応し acyl-CoA を生成し、Ro02781 によって作られた acyl-CoA が Ro02782 と反応するのではないかと考えた。そこで私は、Ro02781 の基質としてヘキサン酸ナトリウム、オクタン酸ナトリウムを用いて *in vitro* 反応を行った。反応は、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.25 mM CoA-SH、0.5 mM ATP、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM ヘキサン酸ナトリウムまたはオクタン酸ナトリウム、組換え Ro02781 1 µg を 200 µl スケール、30°C にて 1 時間インキュベートした。反応液は、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters を用いて限外ろ過し、ろ液の一部を HPLC 分析した (figure 18-7)。その結果、いずれの反応に

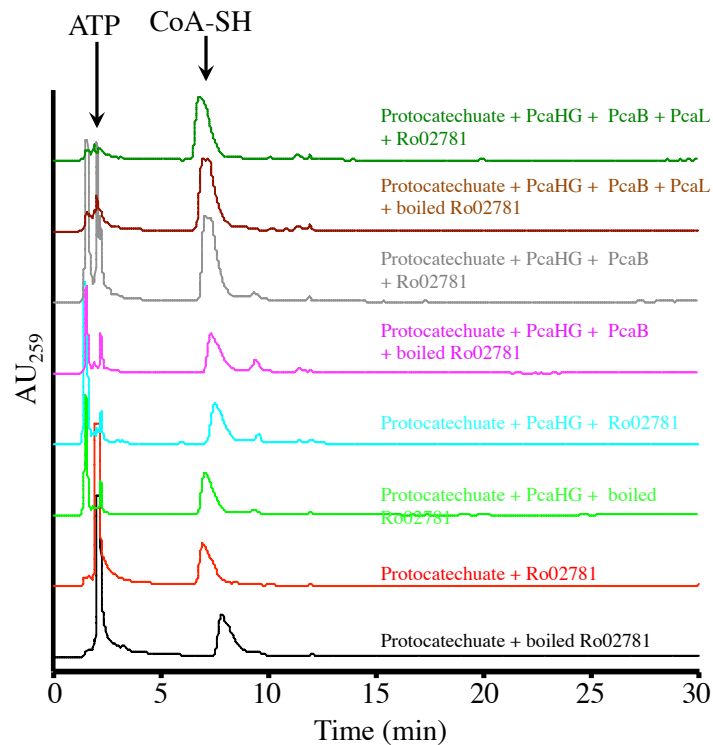


においても反応の進行は見られなかった。

また私は、Ro02781 が RHA1 株における $\beta$ -ケトアジピン酸の protocatechuate branch から catechol branch へのバイパスに関わっているのであれば、Ro02781 が protocatechuate branch 中の化合物と反応するのではないかと考えた。したがって私は、組換え Ro02781 と protocatechuate、Pca 酵素を組み合わせた *in vitro* 反応も行った。反応は、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM CoA-SH、0.2 mM ATP、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM protocatechuate、組換え Ro02781 1  $\mu$ g、Pca 酵素 1  $\mu$ g を 200  $\mu$ l スケール、30°C にて 1 時間インキュベートした。反応液は、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters を用いて限外ろ過し、ろ液の一部を HPLC 分析した (figure 18-8)。しかし、こちらにおいても全ての反応で反応生成物は見られなかった。



**figure 18-7.** 組換え Ro02781 とヘキサン酸ナトリウム、オクタン酸ナトリウムとの *in vitro* 反応 Ro02781 はどちらの基質とも反応が進行しなかった。



**figure 18-8.** 組換え Ro02781、プロトカテク酸、Pca酵素の反応 protocatechuate + Ro02781、protocatechuate + PcaHG + Ro02781、protocatechuate + PcaHG + PcaB + Ro02781、protocatechuate + PcaHG + PcaB + PcaL + Ro02781、全ての反応において反応が進行しなかった。

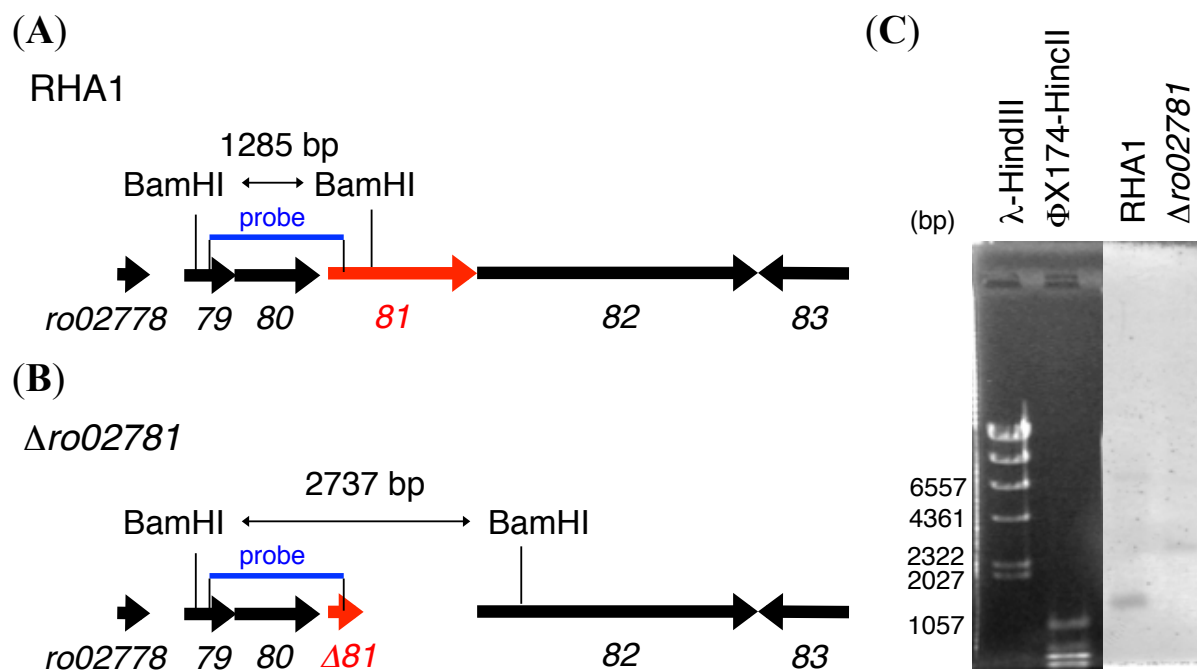
#### 18.4 $\Delta ro02781$ 株および $\Delta ro02782$ 株の作製

次に私は、*ro02781* および *ro02782* 遺伝子の欠損が RHA1 株の $\beta$ -ケトアジピン酸経路に及ぼす影響を調べるために、それぞれの単独破壊株を作製することとした。遺伝子の破壊方法は  $\Delta catC$  株および  $\Delta pcalJ$  株の作製と同様の方法で行った。

##### 18.4.1 $\Delta ro02781$ 株の作製

$\Delta ro02781$  株作製のため、*ro02781* の上流と *ro02781* の下流をそれぞれ PCR で増幅し、pUC19 にクローニングし、pUC19-81up および pUC19-81down を作製した。続いて、シーケンス解析によって PCR エラーがないことを確認した後に、pK18mobsacB と 3 断片ライゲーションすることで、pK18mobsacB- $\Delta 81$  を作製した。次に、作製した pK18mobsacB- $\Delta 81$  を大腸菌 *E. coli* S17-1 株に導入し、RHA1 株と接合伝達することで、single crossover 株を取得した。single crossover 株を植え継ぎ培養することで double

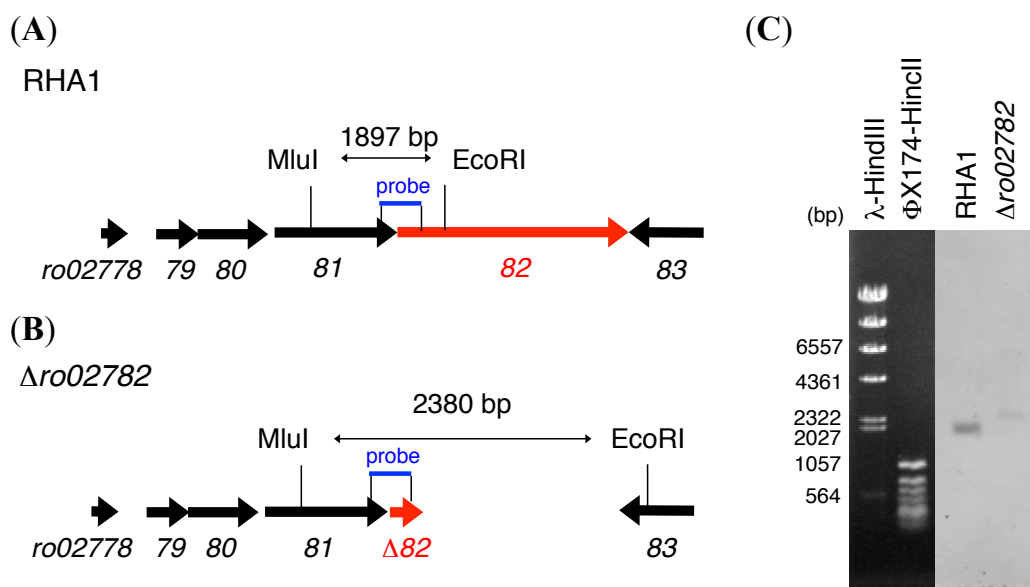
crossover 株を取得した。double crossover 株の確認は、サザンハイブリダイゼーションにより行った (figure 18-9)。



**figure 18-9.**  $\Delta ro02781$  株のサザンハイブリダイゼーション (A) RHA1 株の遺伝子配座。 (B)  $\Delta ro02781$  株の遺伝子配座。ro02779 以降の遺伝子は、ro027 を省略して表記した。 (C) サザンハイブリダイゼーション。クロモソームを BamHI で消化した。プローブは 81\_up\_conf プライマーと 81\_up\_R プライマーで増幅した 1,074 bp の断片 (図中青) を用いた。RHA1 株は 1,285 bp 付近にバンドが検出されたのに対し、 $\Delta ro02781$  株では 2,737 bp 付近にバンドが見られた。

### 18.4.2 $\Delta ro02782$ 株の作製

$\Delta ro02782$  株作製のため、*ro02782* の上流と *ro02782* の下流をそれぞれ PCR で増幅し、pUC19 にクローニングし、pUC19-81up および pUC19-81down を作製した。続いて、シーケンス解析によって PCR エラーがないことを確認した後に、pK18mobsacB と 3 断片ライゲーションすることで、pK18mobsacB- $\Delta 82$  を作製した。次に、作製した pK18mobsacB- $\Delta 82$  を大腸菌 *E. coli* S17-1 株に導入し、RHA1 株と接合伝達することで、single crossover 株を取得した。single crossover 株を植え継ぎ培養することで double crossover 株を取得した。double crossover 株の確認は、サザンハイブリダイゼーションにより行った (figure 18-10)。



**figure 18-10.  $\Delta ro02782$  株のサザンハイブリダイゼーション** (A) RHA1 株の遺伝子配座。 (B)  $\Delta ro02782$  株の遺伝子配座。 (C) サザンハイブリダイゼーション。クロモソームを MluI および EcoRI で消化した。プローブは 81\_down\_F プライマーと 82\_up\_R プライマーで増幅した 410 bp の断片 (図中青) を用いた。RHA1 株は 1,897 bp 付近にバンドが検出されたのに対し、 $\Delta ro02782$  株では 2,380 bp 付近にバンドが見られた。

以上のように、本実験において  $\Delta ro02781$  株および  $\Delta ro02782$  株の作製に成功した。今後は、本菌株に protocatechuate や catechol を投与した時に、従来の  $\beta$ -ケトアジピン酸経路どおりに投与した化合物が異化されるのかを確かめたい。もしも、未知の化合物が蓄積するのであれば、その化合物について精査したい。

## 18.5 Ro02782 および Ro02781 に関する考察

本節では、RHA1 の $\beta$ -ケトアジピン酸経路において、protocatechuate branch から catechol branch へのバイパスに関与する可能性がある、新規長鎖 acyl-CoA carboxylase carboxylase Ro02782 と新規長鎖脂肪酸 CoA ligase Ro02781 の機能解析を目的として実験を行った。まず私は、Ro02782 に関して大腸菌を用いて組換え Ro02782 を調製し acetyl-CoA、hexanoyl-CoA、octanoyl-CoA との *in vitro* 反応を行った。しかしながら、いずれの反応も進行しなかった。これには以下の理由が考えられる。1 つめは、大腸菌において精製した組換え Ro02782 がビオチン化されていないために、活性タンパク質として取得できていない可能性が挙げられる。この問題は、Ro02782 の発現と同時に大腸菌において acyl-CoA のビオチン化を触媒する BirA を発現させることによって解決するかもしれない。2 つめの可能性として、Ro02782 の基質が通常の脂肪酸合成の課程で生じる acyl-CoA ではなく、全く別の CoA 体であることが考えられる。この場合、RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路と関連付けるのであれば、本経路中に存在する CoA 体である $\beta$ -ketoadipyl-CoA もしくは本経路中の脂肪酸の CoA 体と反応させてみることによって、生成物が見られるかもしれない。また、私は RHA1 株において組換え Ro02782 を調製すれば、活性のあるタンパク質が得られるのではないかと考えて RHA1 での発現用プラスミド pTipQC1-ro02782 を作製して、RHA1 に導入した。しかしながら、現段階において私は RHA1/pTipQC1-ro02782 による組換え Ro02782 の精製に成功していない。

次に私は、Ro02781 に関して RHA1 を用いて組換え Ro02781 を調製した。そして、ヘキサン酸ナトリウム、オクタン酸ナトリウムとの *in vitro* 反応および protocatechuate、Pca 酵素との組み合わせによる *in vitro* 反応を行った。Ro02781 についても、全ての反応で反応生成物は見られなかった。

また私は、ro02781 および ro02782 遺伝子の欠損が RHA1 の $\beta$ -ケトアジピン酸経路に及ぼす影響を調べるために、それぞれの単独破壊株を作製した。なお、Tran らは、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) における LCC のノックアウト株 ( $\Delta$ PA14\_46320) の作製に成功している<sup>60)</sup>。Tran らは、本破壊株においてフマル酸を唯一の炭素源とした時や、Met-Val を唯一の窒素源として与えた場合に、その細胞への取り込まれ方が親株と変化していることを明らかにした<sup>60)</sup>。RHA1 においてもこのような現象が見られる可能性が考えられる。

## 19. 第三章のまとめ

第三章では、土壌放線菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 の芳香族化合物の異化経路である  $\beta$ -ケトアジピン酸経路について、組換えタンパク質を用いた *in vitro* 再構築を行った。また、本経路の遺伝子破壊株を作製し、それらの機能解析を行った。くわえて、本経路中の *protocatechuate branch* から *catechol branch* へのバイパスに関与すると示唆されている機能未知の長鎖 *acyl-CoA carboxylase carboxylase* Ro02782 および、同じく機能未知である長鎖脂肪酸 *CoA ligase* Ro02781 の機能解析を目指した。*ro02781* および *ro02782* に関してはその単一遺伝子欠損株の作製も行った。

RHA1 における本経路の *in vitro* 再構築に関して、*protocatechuate branch* の PcaHG、PcaB、PcaL および *catechol branch* の CatA、CatB、CatC による反応の *in vitro* 再構築を行った。その結果、PcaHG、PcaB、PcaL の反応では、それぞれ 3-carboxy-*cis,cis*-muconate、 $\gamma$ -carboxy-muconolactone、 $\beta$ -ketoadipate が生成することが確認できた。加えて、Cat 酵素に関しても、CatA、CatB、CatC の反応で、それぞれ *cis,cis*-muconate、(*S*)-muconolactone、 $\beta$ -ketoadipate enol-lactone が生成することを確認した。

また、RHA1 株に *catechol* を異化させると中間体が検出されないのに対し、*catC* 破壊株で *catechol* を異化すると (*S*)-muconolactone が蓄積され、培養を継続すると (*S*)-muconolactone が徐々に減少することが判明した。加えて、 $\Delta$ *pcaIJ* 株において、*catechol* を投与すると、(*S*)-muconolactone の蓄積は見られたが、 $\beta$ -ketoadipate の蓄積は見られなかった。これらの結果から、(*S*)-muconolactone の異化に関与する CatC を介さない未知経路の存在が示唆された。機能未知酵素である Ro02782 および Ro02781 に関しては、組換えタンパク質を調製し *in vitro* 反応を行ったが全ての反応において、反応生成物は見られなかった。

## 20. 第三章の実験項

### 使用した試薬、菌株

プロトカテク酸、カテコール、*cis,cis*-muconate は和光純薬工業株式会社から購入した。Luria-Bertani (LB) Lennox 培地は Sigma-Aldrich 社から購入した。大腸菌 *Escherichia coli* HST08 株、pColdI プラスミド、制限酵素、その他の DNA 修飾酵素はタカラバイオ株式会社より購入した。大腸菌 *E. coli* BL21 株は国立遺伝学研究所の National BioResource Project から購入した。*Rhodococcus. jostii* RHA1 株は長岡技術科学大学の福田雅夫教授より分譲していただいた。pTipQC1 プラスミドは独立行政法人、産業技術総合研究所、生物プロセス部門の田村具博博士から分譲していただいた。その他の試薬は全て、和光純薬工業株式会社より購入した。

### 15.1 の実験 組換え PcaHG、PcaB、PcaL タンパク質の精製

#### pColdI-*pcaHG*、pColdI-*pcaB*、pColdI-*pcaL* の構築

*R. jostii* RHA1 の染色体を鋳型とし、Table 1 に示すプライマーを用いて各遺伝子をクローニングするための PCR を行った。*pcaHG* には PcaHG\_F と PcaHG\_R、*pcaB* には PcaB\_F と PcaB\_R、*pcaL* には PcaL\_F と PcaL\_R を用いた。PCR により増幅した DNA 断片を pUC19 ベクターに連結し、pUC19-*pcaHG*、pUC19-*pcaB*、pUC19-*pcaL* を構築した。各インサートに PCR エラーがないことを確認し、タンパク質発現用ベクター pColdI へと連結した。そして、pColdI-*pcaHG*、pColdI-*pcaB*、pColdI-*pcaL* を構築した。

### 15.1 および 16.1 の実験 組換え PcaHG、PcaB、PcaL、CatA の発現と精製

pColdI-*pcaHG*、pColdI-*pcaB*、pColdI-*pcaL*、pColdI-*catA* を導入した大腸菌 *E. coli* BL21 株を 2 ml の LB amp 培地 (100 µg/ml) で 37°C において 12 時間培養した。その培養液を前培養液とし、新たな LB amp 培地 50 ml に 1% 植菌し、37°C で本培養を開始した。OD<sub>600</sub> が 0.5 に達したところで 15°C へと移動し、30 分間静置した。その後、0.1 mM となるように IPTG を添加し、タンパク質の発現誘導を行った。そして、15°C において 24 時間培養を行った。培養終了後、集菌を行い Lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0)、300 mM NaCl、10 mM imidazole、10% glycerol) に再懸濁した。超音波破碎機によって菌体を破碎した後、4°C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離を行った。遠心分離後、可溶性画分を Ni-NTA columns (QIAGEN) にアプライした。その後、wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0)、300 mM NaCl、20 mM imidazole、10% glycerol) で 2 回 wash した。His タグ精製タンパク質は Elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0)、300 mM NaCl、250 mM imidazole、10% glycerol) 300 µl で 2 回溶出した。その後、透析 buffer (10 mM Tris-HCl

(pH 7.5)、10% glycerol) で 2 L×2 回透析を行った。精製タンパク質の濃度は Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories)を用いて測定した。タンパク質のスタンダードとしてウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。精製タンパク質は-80°C で保存した。

#### 15.2 – 15.4 の実験 protocatechuate と Pca 酵素の *in vitro* 反応

本実験で用いた酵素反応液の組成は以下のとおりである。Pca 酵素 1 µg、1 mM protocatechuate、50 mM Tris-HCl (pH7.5) をトータル 300 µl になるように調製した。各酵素を 5 分間ボイルしたものをネガティブコントロールとして用いた。酵素反応は、30°C で 5 分間行い、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters (Merck Millipore) でろ過することにより、反応を停止させた。そのろ液を HPLC のサンプルとして用いた。HPLC にインジェクションした量は 5 µl である。HPLC は日本分光製の装置を用いた。逆相 HPLC に用いたカラムは、COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-PAQ column (4.6 × 150 mm、ナカライテスク) である。溶媒は 3%アセトニトリル水溶液 (0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA)) を用いて、isocratic 分析を行った。流速は 1 ml/min、カラム温度は 40°C、検出波長は 200 nm である。

#### 15. の実験 Pca 酵素による反応生成物の NMR および MS 解析

化合物 **4**、**5**、**8** については、10 ml の *in vitro* 反応液より各化合物を精製し、NMR および MS 解析を行った。化合物 **4**、**5**、**8** の精製のために、酵素反応液を 1 N HCl で酸性にし、酢酸エチル抽出を行った。次に、酢酸エチル層を遠心エバポレーターで濃縮乾固した。続いて、粗抽出物を少量のメタノールに溶解し、逆相 HPLC で各化合物の分取を行った。カラムは COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II column (20 × 250 mm; ナカライテスク) を用いた。溶媒は 10%メタノール (0.1% TFA) を用いた。流速は 3 ml/min であり、室温で分取を行った。化合物 **2** に関しては、酸性や熱により容易に異性化してしまう恐れがあったため、10 ml 分の *in vitro* 反応液を Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters でろ過し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥物をそのまま NMR 分析に用いた。

NMR 解析は Bruker AVANCE III 400 FT-NMR spectrometer (Bruker Corporation) を用いて行った。LC-ESI/HRMS 解析は、Q Exactive™ (Thermo Fisher Scientific) を使用した。LC-ESI/HRMS 解析に用いたカラムは、COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-PAQ column (2.0 × 150 mm; ナカライテスク) であり、溶媒は 3%アセトニトリル (0.1%ギ酸) を用いた。流速は 0.2 ml/min であり、カラム温度は 40°C で分析を行った。



## 16.の実験

### 16.1 の実験 pColdI-*catA*、pQE2-*catB*、pTipQC1-*catB*、pTipQC1-*catC* の構築

*R. jostii* RHA1 の染色体を鋳型とし、Table 1 に示すプライマーを用いて各遺伝子をクローニングするための PCR を行った。*pcaHG* には PcaHG\_F と PcaHG\_R、*pcaB* には PcaB\_F と PcaB\_R、*pcaL* には PcaL\_F と PcaL\_R を用いた。PCR により増幅した DNA 断片を pUC19 ベクターに連結し、pUC19-*pcaHG*、pUC19-*pcaB*、pUC19-*pcaL* を構築した。各インサートに PCR エラーがないことを確認し、タンパク質発現用ベクター pColdI へと連結した。そして、pColdI-*pcaHG*、pColdI-*pcaB*、pColdI-*pcaL* を構築した。

### 16.1 の実験 組換え CatB、CatC の発現と精製

pTipQC1-*catB* または pTipQC1-*catC* の RHA1 への導入はエレクトロポレーション法で行った。形質転換された RHA1 をクロラムフェニコール入り LB 培地 (LB cm、34 µg/ml) 2 ml で 30°C において 24 時間培養した。それを前培養液とし、新たな LB cm 培地 50 ml に 1% 植菌し、37°C で本培養を開始した。24 時間後、1 µg/ml となるようにチオストレプトンを添加し、タンパク質の発現を誘導した。さらに 24 時間培養し、集菌を行い 2 mg/ml のリゾチーム入り Lysis buffer に再懸濁した。氷上で 1 時間静置後、Pca 酵素と同様に超音波破碎および Ni-NTA カラムによる His タグ精製を行った。

### 16.2 – 16.5 の実験 Cat 酵素の *in vitro* 反応

本実験で用いた酵素反応液の組成は以下のとおりである。Cat 酵素 0.5 µM、1 mM の各基質 (catechol、*cis,cis*-mucononate、(*S*)-muconolactone、β-ketoadipate enol-lactone)、50 mM Tris-HCl (pH7.5) をトータル 300 µl になるように調製した。各酵素を 5 分間ボイルしたものをネガティブコントロールとして用いた。酵素反応は、30°C で 60 分間行い、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters でろ過することにより、反応を停止させた。そのろ液を HPLC のサンプルとして用いた。HPLC にインジェクションした量は 5 µl である。HPLC 分析条件は、検出波長が 230nm であること以外は、15.2-15.4 の実験と同様である。16.5 において β-ketoadipate の検出を行う際は 200 nm で分析を行った。

### 16.3 の実験 (*S*)-muconolactone の精製

LB amp 寒天培地に生育した *E. coli* BL21/pQE2-*catB* を釣菌し、2.5 ml の LB amp 液体培地 (50 µg/ml) に植菌し、37°C、245 rpm で 12 時間培養した。これを前培養液とし、新たな LB amp 液体培地 200 ml に 1% 植菌し、30°C、120 rpm で本培養を開始した。OD<sub>600</sub> が 0.5 になった時点で 0.1 mM となるように IPTG を添加した。さらに、24 時間 30°C で培養を行った。その後、菌体を回収し、100 ml の 50 mM Tris-HCl buffer

に再懸濁した。さらに、約 7 mg の *cis,cis*-muconate を添加し、30°C、120 rpm で 24 時間培養を行った。

100 ml の培養上清を 1 N HCl で酸性にし、酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチル層をロータリーエバポレーターおよび遠心エバポレーターで濃縮乾固した。次に、粗抽出物を少量のメタノールに溶解し、逆相 HPLC で (*S*)-muconolactone の分取を行った。カラムは COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II column (20 × 250 mm; ナカライテスク) を用いた。溶媒は 10%メタノール (0.1% TFA) を用いた。流速は 3 ml/min であり、室温で分取を行った。

### 16.3 の実験 muconolactone の旋光度測定

muconolactone の旋光度測定は、JASCO P-2200 digital polarimeter (日本分光) を用いた。測定溶媒はメタノール、温度は 20°C で行った。

### 17.1、17.2、18.4 の実験 $\Delta catC$ 、 $\Delta pcaIJ$ 、 $\Delta ro02781$ 、 $\Delta ro02782$ 株の作製

#### RHA1 における遺伝子破壊用プラスミドおよび接合実験用の大腸菌作製

RHA1 における遺伝子破壊株を作製するために、破壊の標的となる遺伝子の上下流約 1,500 bp を PCR によって増幅した。PCR に用いたプライマーは以下の Table2 から Table5 に示す。

$\Delta catC$  株作製のため、*catC* 上流を PCR で増幅し、その末端には EcoRI と XbaI サイトを付けた。一方、*catC* 下流には XbaI と HindIII サイトを付けた。それぞれを pUC19 ベクターに連結し、pUC19-*catC*up および pUC19-*catC*down を作製した。シーケンス解析によりインサートにエラーがないことを確認した。次に、インサートを切り出して、pK18mobsacB に連結し、pK18mobsacB- $\Delta catC$  を作製した。本プラスミドを *E. coli* S17-1 に導入した。作製した *E. coli*/pK18mobsacB- $\Delta catC$  を用いて RHA1 と接合実験を行った。同様の操作を  $\Delta pcaIJ$  株、 $\Delta ro02781$  株、 $\Delta ro02782$  株の作製に関しても行った。 $\Delta pcaIJ$  株用に pUC19-*pcaIJ*up、pUC19-*pcaIJ*down、pK18mobsacB- $\Delta pcaIJ$ 、大腸菌 *E. coli*/pK18mobsacB- $\Delta pcaIJ$  株を作製した。 $\Delta ro02781$  用には、pUC19-81up、pUC19-81down、pK18mobsacB- $\Delta 81$ 、*E. coli*/pK18mobsacB- $\Delta 81$  を作製した。 $\Delta ro02782$  用には、pUC19-82up、pUC19-82down、pK18mobsacB- $\Delta 82$ 、*E. coli*/pK18mobsacB- $\Delta 82$  を作製した。

#### RHA1 と大腸菌の接合実験

RHA 1 と組換え *E. coli* S17-1 株の接合実験は Van der Geize の論文<sup>81)</sup>を参考にして行った。ここでは例として、 $\Delta catC$  株の作製について述べる。まず、30 µg/ml のナリジ

クス酸入り 1/5 LB (ペプトン 2 g/L、Yeast extract 1 g/L、NaCl 10 g/L) 寒天培地 (1/5 LB Nal) に RHA1 を植菌し、30°C で 3 日間インキュベートした。生育した RHA1 の菌体を白金耳で掻き取り、新たなただの 1/5 LB 液体培地 1 ml に懸濁した。

また、*E. coli* S17-1-pK18mobsacB- $\Delta$ catC については、50  $\mu$ g/ml のカナマイシン入り LB (LB Km) 寒天培地に植菌し、37°C で 12 時間培養し生育させた。RHA1 と同様に新たなただの LB 培地に菌体を懸濁した。両菌株の懸濁液をそれぞれ 750  $\mu$ l ずつマイクロチューブに入れて混合した。そして、遠心分離を行い、上清を捨て新たな 1/LB 液体培地 1 ml に懸濁した。その内 200  $\mu$ l を 1/5 LB 寒天培地に植菌し、30°C で一晩静置培養した。翌日、生育した菌体を白金耳で掻き取り、新たな 1/5 LB 液体培地 1 ml に懸濁した。その内、150  $\mu$ l をナリジクス酸およびカナマイシン入りの 1/5LB 寒天培地 (1/5 LB Nal Km) に植菌した。その後、30°C で 3 日間培養し、コロニーを形成させた。

次に、形成されたコロニーを新たな 1/5 LB Nal Km 寒天培地およびナリジクス酸と 10%スクロース入りの 1/5 LB 寒天培地 (1/5 LB Nal Suc) の両方に植菌した。この操作によって、カナマイシン耐性とスクロース感受性の両方を有する 1 回組換え体をスクリーニングした。また、接合体が取得できているかを確認するために、*sacB* 配列の有無を PCR に確認した。

続いて、2 回組換え体を取得する操作を行った。1 回組換え体のコロニーを 1 ml の 1/5 LB Nal 液体培地に植菌し、30°C で 1 日から 2 日間、振盪培養を行った。その培養液の一部を 1/5 LB Nal Suc 寒天培地に植菌し、30°C で静置培養し、コロニーを形成させた。形成されたコロニーを用いて、2 回組換え体を取得できているかを確認するために、1/5 LB Nal Suc 寒天培地および 1/5 LB Nal Km 寒天培地に植菌して、1/5 LB Nal Suc 寒天培地のみに生育する株を選択した。最終的な遺伝子破壊の確認はサザンハイブリダイゼーションで行った。

#### RHA1 における遺伝子破壊株のサザン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おける基本操作は、第一章の大腸菌における FAS 破壊株の確認と同様の方法で行った。 $\Delta$ catC 株において、クロモソームを制限酵素 BamHI および BglIII で消化した。プローブは catC\_up\_conf プライマーと catC\_up\_R プライマーで増幅した約 900 bp の断片を用いた。 $\Delta$ pcaIJ 株では、クロモソームを SphI および BamHI で消化した。プローブは pcaI\_up\_R プライマーと pcaI\_up\_conf プライマーで増幅した約 860 bp の断片を使用した。 $\Delta$ ro02781 株に関しては、クロモソームを BamHI で消化した。プローブは 81\_up\_conf プライマーと 81\_up\_R プライマーで増幅した 1,074 bp の断片を用いた。 $\Delta$ ro02782 株については、クロモソームを MluI および EcoRI で消化した。プローブは 81\_down\_F プライマーと 82\_up\_R プライマーで増

幅した 410 bp の断片を使用した。

#### 17.1 の実験 RHA1 および $\Delta catC$ 株における catechol 異化物の HPLC 解析

RHA1 および  $\Delta catC$  株のグリセロールストックを 1/5 LB Nal 寒天培地に植菌し、30°C で静置培養を行い、コロニーを形成させた。コロニーを釣菌し、1/5 LB Nal 液体培地 2 ml に植菌した。30°C、120 rpm で 48 時間培養し前培養液とした。その後、新たな 1/5 LB Nal 液体培地 50 ml に前培養液を 1% 植菌し、30°C、120 rpm で 48 時間培養した。50 ml の培養液から集菌し、50 ml の 50 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer に懸濁し菌体の wash を行った。そして、新たな 50 ml の 50 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer に再懸濁すると同時に、catechol を 1 mM となるように添加した。この時点において、培養開始前のサンプリングを 200  $\mu$ l ずつ行った。30°C、120 rpm でインキュベートを開始した。24 時間毎に培養液を 200  $\mu$ l ずつサンプリングした。培養は 5 日間行った。培養上清 200  $\mu$ l に対して 1 N HCl で酸性にし、酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチル層を遠心エバポレーターで濃縮乾固した。次に、粗抽出物を 100  $\mu$ l のメタノールに溶解し、そのうち 5  $\mu$ l を逆相 HPLC で分析した。HPLC での分析条件は、15. および 16. の実験における *in vitro* 反応の実験と同様である。検出波長は 230 nm である。

#### 17.2 の実験

##### RHA1 および $\Delta pcaIJ$ 株における protocatechuate、catechol 異化物の HPLC 解析

RHA1 および  $\Delta pcaIJ$  株のグリセロールストックを 1/5 LB Nal 寒天培地に植菌し、30°C で静置培養を行い、コロニーを形成させた。コロニーを釣菌し、1/5 LB Nal 液体培地 2 ml に植菌した。30°C、120 rpm で 48 時間培養し前培養液とした。その後、新たな 1/5 LB Nal 液体培地 50 ml に前培養液を 1% 植菌し、30°C、120 rpm で 48 時間培養した。50 ml の培養液から集菌し、50 ml の 50 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer に懸濁し菌体の wash を行った。そして、新たな 50 ml の 50 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer に再懸濁すると同時に、protocatechuate または catechol を 1 mM となるように添加した。この時点において、培養開始前のサンプリングを 200  $\mu$ l ずつ行った。30°C、120 rpm でインキュベートを開始した。培養は 3 日間行った。24 時間毎に培養液を 200  $\mu$ l ずつサンプリングした。培養上清 200  $\mu$ l に対して 1 N HCl で酸性にし、酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチル層を遠心エバポレーターで濃縮乾固した。次に、粗抽出物を 100  $\mu$ l のメタノールに溶解し、そのうち 5  $\mu$ l を逆相 HPLC で分析した。HPLC での分析条件は、15. および 16. の実験における *in vitro* 反応の実験と同様である。検出波長は 200 nm である。

### 17.3 の実験 RHA1 株および $\Delta pcaB$ 株における protocatechuate 異化物の HPLC 解析

RHA1 および $\Delta pcaB$  株のグリセロールストックを 1/5 LB Nal 寒天培地に植菌し、30°C で静置培養を行い、コロニーを形成させた。コロニーを釣菌し、1/5 LB Nal 液体培地 2 ml に植菌した。30°C、120 rpm で 48 時間培養し前培養液とした。その後、新たな 1/5 LB Nal 液体培地 50 ml に前培養液を 1%植菌し、30°C、120 rpm で 48 時間培養した。50 ml の培養液から集菌し、50 ml の 50 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer に懸濁し菌体の wash を行った。そして、新たな 50 ml の 50 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer に再懸濁すると同時に、protocatechuate を 1 mM となるように添加した。この時点において、培養開始前のサンプリングを 200  $\mu$ l ずつ行った。30°C、120 rpm でインキュベートを開始した。培養は 7 日間行った。24 時間毎に培養液を 200  $\mu$ l ずつサンプリングした。培養上清 200  $\mu$ l に対して 1 N HCl で酸性にし、酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチル層を遠心エバポレーターで濃縮乾固した。次に、粗抽出物を 100  $\mu$ l のメタノールに溶解し、そのうち 5  $\mu$ l を逆相 HPLC で分析した。HPLC での分析条件は、15.および 16.の実験における *in vitro* 反応の実験と同様である。検出波長は 230 nm である。

### 17.3 の実験 化合物 9、10、11 の精製および NMR、MS 解析

上記の実験における、 $\Delta pcaB$  株の培養 7 日めの培養上清 50 ml を 1N HCl で酸性にし、酢酸エチルで抽出した。続いて、酢酸エチル層の濃縮乾固物を順相シリカゲルクロマトグラフィー、逆相 HPLC による分取を行い、それぞれ単一のピークになるまで精製した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、ベンゼン:アセトン=1:1 で行った。分取 HPLC に用いたカラムは COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II column (20  $\times$  250 mm; ナカライテスク) である。溶媒は 10%メタノール (0.1% TFA) を用いた。流速は 3 ml/min であり、室温で分取を行った。

### 18.2 の実験 組換え Ro02782 の精製

pColdI-ro02782 および pTipQC1-ro02782 の作製

使用したプライマー

82-F 5'-CGTCTAGACAT ATGACCCTGCTGGTCGCCA-3' (斜体は NdeI サイト、下線は XbaI サイト)

82-R 5'-CGAAGCTT GCGTCGCCCCCGTGAGTACTT-3' (斜体は HindIII サイト)

*R. jostii* RHA1 の染色体を鋳型とし、上記に示すプライマーを用いて ro02782 をクローニングするための PCR を行った。PCR により増幅した DNA 断片を EcoRI および HindIII で消化し、pUC19 ベクターに連結し、pUC19-ro02782 を構築した。インサートに PCR エラーがないことを確認し、pColdI および pTipQC1 へと連結した。そして、

pColdI-ro02782 および pTipQC1-ro02782 を構築した。*E. coli* BL21 にはケミカルコンピテントセルを用いた形質転換法で pColdI-ro02782、RHA1 にはエレクトロポレーション法により pTipQC1-ro02782 を導入した。

#### 18.2 の実験 *E. coli* BL21/pColdI-ro02782 を用いた組換え Ro02782 の精製

*E. coli* BL21/pColdI-ro02782 株を 2 ml の LB amp 培地 (100 mg/ml) で 37°C において 12 時間培養した。その培養液を前培養液とし、新たな LB amp 培地 50 ml に 1% 植菌し、37°C で本培養を開始した。OD<sub>600</sub> が 0.5 に達したところで 15°C へと移動し、30 分間静置した。その後、0.1 mM となるように IPTG を添加し、タンパク質の発現誘導を行った。そして、15°C において 24 時間培養を行った。培養後の菌体を用いて、15. の実験と同様にタンパク質を精製し、濃度測定も行った。

#### 18.2 の実験 RHA1/pTipQC1-ro02782 を用いた組換え Ro02782 の精製

RHA1/ pTipQC1-ro02782 株をクロラムフェニコール入り LB 培地 (34 µg/ml) 2 ml で 30°C において 24 時間培養した。それを前培養液とし、新たなクロラムフェニコール入り LB 培地 50 ml に 1% 植菌し、37°C で本培養を開始した。24 時間後、1 µg/ml となるようにチオストレプトンを添加し、タンパク質の発現を誘導した。さらに 24 時間培養し、集菌を行い 2 mg/ml のリゾチーム入り Lysis buffer に再懸濁した。氷上で 1 時間静置後、Pca 酵素、Cat 酵素と同様に超音波破碎を行い、タンパク質の発現を SDS-PAGE で確認したが、可溶性タンパク質として取得できなかった。

#### 18.2 の実験 組換え Ro02782 と acetyl-CoA、hexanoyl-CoA、octanoyl-CoA の *in vitro* 反応と HPLC 解析

反応液の組成は、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、20 mM NaHCO<sub>3</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、1 mM 基質、2 mM ATP、組換え Ro02782 1 µg を 100 µl スケールに調整した。反応液を 30°C で 1 時間インキュベートした。反応終了後、MILLIPORE 社の Amicon Ultra 3K を用いて限外ろ過し、ろ液 5 µl を HPLC 分析に用いた。

#### HPLC 分析条件

逆相 HPLC により分析を行った。分析カラムは、COSMOSIL Packed Column 5C<sub>18</sub> PAQ (4.6 × 150mm; Nacalai Tesque) を用いた。溶媒は 5 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.5)/メタノールを用い、カラム温度は 40°C、流速は 1.0 ml/min に設定した。グラジエントは、5 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.5)/メタノールが 0-5 min 99/1, 5-30 min 10/90 となるように設定した。吸光度は 259 nm で検出した。

### 18.3 の実験 組換え Ro02781 の精製

#### pTipQC1-*ro02781* の作製

使用したプライマー

81-F 5'-CGGAATTCCAATATGCCCCACTTCGCCTTCG-3' (斜体は NdeI サイト、下線は EcoRI サイト)

81-R 5'-GCAAGCTTACGATTGGCGACCAGC-3' (斜体は HindIII サイト)

*R. jostii* RHA1 の染色体を鋳型とし、上記に示すプライマーを用いて *ro02781* をクローニングするための PCR を行った。PCR により増幅した DNA 断片を EcoRI および HindIII で消化し、pUC19 ベクターに連結し、pUC19-*ro02781* を構築した。インサートに PCR エラーがないことを確認し、RHA におけるタンパク質発現用ベクター pTipQC1 へと連結した。そして、pTipQC1-*ro02781* を構築した。エレクトロポレーション法により pTipQC1-*ro02781* を RHA1 へ導入した。RHA1/pTipQC1-*ro02781* 株を LB cm 液体培地 (34 µg/ml) 2 ml で 30°C において 24 時間培養した。それを前培養液とし、新たな LB cm 液体培地 50 ml に 1% 植菌し、37°C で本培養を開始した。24 時間後、1 µg/ml となるようにチオストレプトンを添加し、タンパク質の発現を誘導した。さらに 24 時間培養し、集菌を行い 2 mg/ml のリゾチーム入り Lysis buffer に再懸濁した。氷上で 1 時間静置後、Pca 酵素、Cat 酵素と同様に超音波破碎および Ni-NTA カラムによる His タグ精製を行った。精製したタンパク質は SDS-PAGE によって確認し、濃度はブラッドフォード法によって測定した。BSA をタンパク質濃度測定の検量線作製に用いた。

### 18.3 の実験 組換え Ro02781 を用いた *in vitro* 反応と HPLC 解析

#### Ro02781 とヘキサン酸ナトリウム、オクタン酸ナトリウムの反応

反応液の組成は、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.25 mM CoA-SH、0.5 mM ATP、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM ヘキサン酸ナトリウムまたはオクタン酸ナトリウム、組換え Ro02781 1 µg であり、200 µl スケールで行った。反応液を 30°C にて 1 時間インキュベートした。反応液は、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters を用いて限外ろ過し、ろ液 5 µl を HPLC 分析に使用した。HPLC 分析の条件は、Ro02782 の実験と同様である。

#### Ro02781 と protocatechuate、Pca 酵素を組み合わせた *in vitro* 反応

反応液の組成は、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM CoA-SH、0.2 mM ATP、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM protocatechuate、組換え Ro02781 1 µg、Pca 酵素 1 µg を 200 µl に調整した。酵素反応液を 30°C にて 1 時間インキュベートした。反応後、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal

Filters を用いて限外ろ過し、ろ液のうち 5  $\mu$ l を HPLC 分析に用いた。

各化合物の NMR データおよび MS データ

*3-carboxy-cis,cis-muconate* (**2**).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.01(dd, 1H,  $J = 0.9$ , 12.0 Hz, C5H), 6.50 (m, 1H, C2H), 6.77 (dd, 1H,  $J = 1.7$ , 12.0 Hz, C4H). Negative mode LC-ESI/HRMS,  $[\text{M}-\text{H}]^- = 185.00800$  (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_6^-$ , 185.00916).

*$\gamma$ -carboxymuconolactone* (**3**). Negative mode LC-ESI/HRMS,  $[\text{M}-\text{H}]^- = 185.00841$  (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_6^-$ , 185.00916).

*$\beta$ -ketoadipate enol-lactone* (**4**).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  3.36 (d, 2H,  $J = 2.0$  Hz,  $\text{C2H}_2$ ), 3.49 (s, 2H, C3H), 5.58 (s, 1H,  $\text{C5H}_2$ ). Negative mode LC-ESI/HRMS,  $[\text{M}-\text{H}]^- = 141.01835$  (calculated for  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_4^-$ , 141.01933).

*$\beta$ -ketoadipate* (**5**).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  2.55 (t, 2H,  $J = 6.5$  Hz, C5H), 2.86 (t, 2H,  $J = 6.5$  Hz, C4H), 3.39 (s, 2H,  $\text{C2H}_2$ ). Negative mode LC-ESI/HRMS,  $[\text{M}-\text{H}]^- = 159.02898$  (calculated for  $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_5^-$ , 159.02990).

*muconolactone* (**8**).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  2.71 (dd, 1H,  $J = 8.2$ , 16.6 Hz, C1'Ha), 2.95 (dd, 1H,  $J = 4.8$ , 16.6 Hz, C1'Hb), 5.57 (dddd, 1H,  $J = 1.4$ , 1.9, 4.8, 8.2 Hz, C5H), 6.24 (dd, 1H,  $J = 1.9$ , 5.8 Hz, C3H), 7.81(dd, 1H,  $J = 1.4$ , 5.8 Hz, C4H). Negative mode LC-ESI/HRMS,  $[\text{M}-\text{H}]^- = 141.01831$  (calculated for  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_4^-$ , 141.01933).

*$\beta$ -carboxy-muconolactone* (**9**).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  2.61 (dd, 1H,  $J = 8.0$ , 16.5 Hz, C1'Ha), 3.06 (dd, 1H,  $J = 3.2$ , 16.5 Hz, C1'Hb), 5.51 (ddd, 1H,  $J = 2.0$ , 3.2, 8.0 Hz, C2H), 6.77 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, C4H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  36.7 (C1'), 78.6 (C2), 125.7 (C4), 158.4 (C3), 162.2 (C5), 170.5 (C2'), 171.0 (carboxyl group of C3). Positive mode DART/TOF-MS,  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 187.02607$  (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_6$ , 1.81 mmu error).

*3-carboxy-cis,trans-muconate* (**10**).  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.11 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz, C5H), 6.24 (s, 1H, C2H), 7.32 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz, C4H). Negative mode DART/TOF-MS,  $[\text{M}-\text{H}]^- = 185.00810$  (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_6^-$ , 185.00916).

*3-carboxy-trans,trans-muconate* (**11**).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ):  $\delta$  6.63 (d, 1H,  $J = 16.1$  Hz, C5H), 6.75 (s, 1H, C2H), 8.24 (d, 1H,  $J = 16.1$  Hz, C4H);  $^{13}\text{C}$  NMR( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ):  $\delta$  128.5 (C5), 131.6 (C2), 136.7 (C4), 140.9 (C3), 167.9 (C1), 168.3 (carboxyl group of C3), 169.7 (C6). Negative mode DART/TOF-MS,  $[\text{M}-\text{H}]^- = 185.01105$  (calculated for  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_6^-$ , 185.00916).



Table 1. RHA1 における $\beta$ -ketoadipate pathway の *in vitro* 再構築関連の PCR プライマー

Name	配列 (5'-3')	備考
PcaHG_F	CGGAATTCCATATGCTGCATCTGCCAGCCC	下線部は EcoRI、 イタリックは NdeI
PcaHG_R	CGCAAGCTTCGACACCTTTCTGCGTTGTG	下線部は HindIII
PcaB_F	CGGAATTCCATATGAACTCTCCGGAGCCTT	下線部は EcoRI、 イタリックは NdeI
PcaB_R	CGCAAGCTTGTGTGCGAGTGCGACTG	下線部は HindIII
PcaL_F	CGTCTAGACATATGACAGTCGCACTCGCA	下線部は XbaI、 イタリックは NdeI
PcaL_R	CGCAAGCTTCGTCGGTTCGGTAGCGG	下線部は HindIII
CatA_F	GCGAATTCCAAGGAGAAACATATGACCACC	下線部は EcoRI、 イタリックは NdeI
CatA_R	GCGAAGCTTTCTCTACGGGTGGAACGGG	下線部は HindIII
CatB_F	CGGAATTCCATATGACCGACCTGTGCGATCG	下線部は EcoRI、 イタリックは NdeI
CatB_R	CGCAAGCTTAAAGAGTGCCATCGGGTGGG	下線部は HindIII
CatC_F	CGGAATTCCATATGGCACTCTTTCACGTCC	下線部は EcoRI、 イタリックは NdeI
CatC_R	CGCAAGCTTGAGTCCAGAGACTCGCTGAC	下線部は HindIII

Table 2. *catC* 破壊株作製のための PCR プライマー

Name	配列 (5'-3')	備考
catC-up_F	GCGGAATTCAGATCACCACGATCCAGCC	下線部は EcoRI
catC-up_R	GCGTCTAGAGGACCTTCGGGTGCGAGGTCA	下線部は XbaI
catC_up_conf	AACGAGTCGTCGCCAATGCA	シーケンス解析用
catC-downF	GCGTCTAGAATCGAGATCATGCCGCTCAC	下線部は XbaI
catC-downR	GCGAAGCTTGTAGAGCGCAGGAAGCAGCT	下線部は HindIII
catC_down_conf	TCATCGCGCAACGCCTCAT	シーケンス解析用
sacB_F	GGCACTGTGCAAACTATCA	<i>sacB</i> 確認用
sacB_R	TTGCCTTTGATGTTTCAGCAG	<i>sacB</i> 確認用

Table 3. *pcaIJ* 破壊株作製のための PCR プライマー

Name	配列 (5'-3')	備考
pcaI_up_F	GCGGAATTCAACAGTCCGACGTTGATGTG	下線部は EcoRI
pcaI_up_R	GCGCTGCAGTTGTTGCTGACCGTCTCGA	下線部は PstI
pcaI_up_conf	AAGAACGGATCGTCCGGGAA	シーケンス解析用
pcaJ_down_F	CGCCTGCAGACAGCGTCGAGGACGTTCA	下線部は PstI
pcaJ_down_R	CGCAAGCTTCAACAGCGCCTTCCCGTAAC	下線部は HindIII
pcaJ_down_conf	CGCACAAAGTCCGCTCGAAT	シーケンス解析用
sacB_F	GGCACTGTCGAAACTATCA	<i>sacB</i> 確認用
sacB_R	TTGCCTTTGATGTTTCAGCAG	<i>sacB</i> 確認用

Table 4. *ro02781* 破壊株作製のための PCR プライマー

81_up_F	CGCGAATTCATGGTCGCGCATCTCATC	下線部は EcoRI
81_up_R	CGCTCTAGAGTGTGCGCAGGTAGTCGATCA	下線部は XbaI
81_up_conf	ATAGTGCTCGACCGGCCG	シーケンス解析用
81_down_F	GCGTCTAGATCAAGACCAACGGAATGAGC	下線部は XbaI
81_down_R	GCGAAGCTTGGAGGAAGCCGATATTGGTG	下線部は HindIII
81_down_conf	ATCTCGACGAGTTTCTGGTGG	シーケンス解析用

Table 5. *ro02782* 破壊株作製のための PCR プライマー

82_up_F	CGCGAATTCTGATCGACTACCTGCGACAC	下線部は EcoRI
82_up_R	CGCTCTAGAGACTGTCCGCATCGTCCT	下線部は XbaI
82_up_conf	TTGGCGGCACTGAACTACA	シーケンス解析用
82_down_F	GCGTCTAGAAGGAACTCGAGGCCATCG	下線部は XbaI
82_down_R	GCGAAGCTTCGGACGTCACCATCGAAT	下線部は HindIII
82_down_conf	ATCGTGCCCGGCATCGAT	シーケンス解析用

## 第四章 総括

ポリケタイドは微生物や植物が生産する二次代謝産物であり、その多様な構造が反映された様々な生物活性を示す。しかしながら、生産生物からの収量が少ない場合、複雑な構造のため有機合成が煩雑な場合など、ポリケタイドは大量調製が困難なことが多い。そのため、有用な化合物であっても実用化に至っていないものがある。一方、大腸菌や放線菌の組換え体を用いたポリケタイドの異種生産が注目されている。しかしながら、大腸菌は本来、二次代謝産物を生産しないため、組換え大腸菌によるポリケタイド生産では収量が少ない。また、放線菌は一次代謝量が豊富であり、二次代謝物の生産量も多くなる。しかし、放線菌には $\beta$ -ケトアジピン酸経路などの芳香族化合物の異化経路が存在し、組換え放線菌ではポリケタイドの分解が懸念される。本研究ではメタボリックエンジニアリングにより大腸菌の一次代謝流量の増強を行い、ポリケタイド収量の改善を目指した。また、不明な部分が多い土壌放線菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路の全容解明を目的として実験を行った。そして私は、これらの微生物による芳香族化合物の生産と異化に関する研究から、大腸菌および放線菌を用いた芳香族ポリケタイド大量生産に適したクリーンホストを構築するための基盤構築を目指した。

### 第一章 大腸菌における脂肪酸合成の阻害による細胞内 malonyl-CoA 量の増大

ポリケタイドの微生物生産においては、その前駆体である malonyl-CoA が十分に供給される必要がある。また、malonyl-CoA は脂肪酸合成の前駆体でもある。故に、微生物菌体内において malonyl-CoA の生合成は脂肪酸合成と同時に厳しく制御されており、malonyl-CoA の濃度は低く抑えられている。本研究では、メタボリックエンジニアリングにより大腸菌の一次代謝流量の改善を行い、malonyl-CoA のプールを増強させることで芳香族ポリケタイドの大量生産を目指した。その方法として、第一章では3つの方法で大腸菌における脂肪酸合成酵素 (FAS) の阻害による malonyl-CoA 代謝プールの増強を図った。1つめは、脂肪酸合成酵素 FabF、FabB の阻害剤である cerulenin を用いた実験、2つめとして、アンチセンス RNA 法を用いた脂肪酸合成酵素遺伝子のノックダウン、3つめに FAS 遺伝子破壊株を作製した。

1つめの FAS 阻害方法である cerulenin の実験では、cerulenin の投与濃度を振り分けることにより、ポリケタイド増産において最適な cerulenin 濃度を発見することができた。大腸菌 *E. coli* BL21/pQE2-rppArbsmomA 株に 6.25  $\mu\text{g/ml}$  の cerulenin を投与すると 103 mg/ml であった。これは cerulenin 無添加時と比較し、14 倍の生産であった。

2 つめのアンチセンス RNA による FAS 遺伝子 *fabH*、*fabF*、*fabB* のノックダウンでも、flaviolin の生産量が増加した。コントロール株と比較して、最大約 1.4 倍の flaviolin 増産がみられた。

FAS 阻害方法の 3 つめは、 $\lambda$ Red recombinase による相同組換えおよび Cre/loxP 系を用いた大腸菌 *E. coli* BL21 株の FAS 遺伝子壊株作製である。FAS 破壊株として、*fabH*、*fabF*、*fabB* の単一破壊株および *fabB/fabH*、*fabF/fabH* の二重破壊株を作製した。FAS 破壊株では、*E. coli* BL21 株と比較して脂肪酸量の顕著な減少が見られ、flaviolin 生産量も多くなっていた。また、生体内 acetyl-CoA および malonyl-CoA 濃度を測定した結果、各 FAS 破壊株では親株よりもそれらの濃度が高かった。特に  $\Delta fabFH$  株では、親株よりも acetyl-CoA では 6 倍、malonyl-CoA では 45 倍濃度が高かった。加えて私は、脂肪酸生合成の正の制御因子 *fadR*、*accABCD* や FAS 遺伝子の転写量を解析した。その結果、各 FAS 破壊株において *fadR*、*accABCD*、FAS 遺伝子の転写量が親株よりも増加していた。以上より、脂肪酸生合成に関する酵素の転写量の増加が malonyl-CoA 量の増大の一因であることが判明した。さらに、各 FAS 破壊株ではグリオキシル酸回路における負の転写因子 *iclR* の転写量が上昇し、同回路の生合成酵素 *aceA*、*aceB*、*aceK* の転写が抑制されていた。グリオキシル酸回路で消費される acetyl-CoA の量が減少したことが acetyl-CoA 量の増大の原因の 1 つであると推測された。

また私は、FAS 破壊株において親株と比較して脂肪酸量が減少していることから、脂肪酸飢餓による緊縮応答が起きているのではないかと考えた。そこで、FAS 破壊株における緊縮応答の飢餓シグナルである ppGpp の分析を行った。その結果、 $\Delta fabH$  株においては、親株や他の FAS 破壊株と比べて ppGpp 量が高いことが判明した。それは、*E. coli* BL21 株だけではなく、*E. coli* BW25113 株における  $\Delta fabH$  株でも同様であった。くわえて、LC-tripleQ MS による ppGpp の分析系の構築を行った。

## 第二章 大腸菌生体内における一次代謝流量を調節する因子の探索と解析

第二章では、大腸菌 *E. coli* BW25113 株における非必須遺伝子の単一破壊株コレクション Keio collection を用いて、欠損させるとポリケタイドの生産量を上昇させる因子をスクリーニングした。私は、全欠損株に pQE2-*rppA* を導入した Keio collection を用い、flaviolin の定量を行った。その結果、いくつかの遺伝子欠損株について、flaviolin の生産量が親株である *E. coli* BW25113/pQE2-*rppA* よりも増加した。flaviolin 生産量が増加した理由として、malonyl-CoA の代謝流量が増強された、細胞内 ATP などの発酵エネルギーが上昇した、プラスミド、mRNA、蛋白の安定性が向上しポリケタイド合成酵素の量が増えた等の可能性が考えられた。私は、スクリーニング陽性株のうち Vitamin B<sub>6</sub> の生合成に関与する *pdxJ* の欠損株について、flaviolin 生産量が増加した要因について精査した。

*pdxJ* 欠損株では、Keio collection において in-frame mutant 作製前のカナマイシン耐性遺伝子が除去されていない株によって、下流遺伝子の転写が極性効果を受けたことが判明した。*pdxJ* の即下流の遺伝子である脂肪酸合成に関する *acpS* の転写量が減少し、脂肪酸合成が阻害されたことが flaviolin 増産に寄与したことを明らかにした。

### 第三章 *Rhodococcus jostii* RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路の *in vitro* 再構築

第三章では、*R. jostii* RHA1 の芳香族化合物の異化経路である $\beta$ -ケトアジピン酸経路の全容解明を目指した。まず私は、本経路に関して組換えタンパク質を用いた *in vitro* 再構築を行った。また、本経路の遺伝子破壊株を作製し、それらの機能解析を行った。くわえて、本経路中の protocatechuate branch から catechol branch へのバイパスに関与すると示唆されている機能未知の長鎖 acyl-CoA carboxylase Ro02782 および、同じく機能未知である長鎖脂肪酸 CoA ligase Ro02781 の機能解析を目指した。*ro02781* および *ro02782* に関してはその単一遺伝子欠損株の作製も行った。

RHA1 における本経路の *in vitro* 再構築に関して、protocatechuate branch の PcaHG、PcaB、PcaL および catechol branch の CatA、CatB、CatC による反応の *in vitro* 再構築を行った。その結果、PcaHG、PcaB、PcaL の反応では、それぞれ 3-carboxy-*cis,cis*-muconate、 $\gamma$ -carboxy-muconolactone、 $\beta$ -ketoadipate が生成することが確認できた。加えて、Cat 酵素に関しても、グラム陰性菌で報告されているのと同様の反応を触媒することを確認した。

また、*R. jostii* RHA1 に catechol を異化させると中間体が検出されないのに対し、*catC* 破壊株で catechol を異化すると (*S*)-muconolactone が蓄積され、培養を継続すると (*S*)-muconolactone が徐々に減少することが判明した。加えて、 $\Delta$ *pcaIJ* 株において、catechol を投与すると、(*S*)-muconolactone の蓄積は見られたが、 $\beta$ -ketoadipate の蓄積は見られなかった。これらの結果から、(*S*)-muconolactone の異化に関与する CatC を介さない未知経路の存在が示唆された。機能未知酵素である Ro02782 および Ro02781 に関しては、組換えタンパク質を調製し *in vitro* 反応を行ったが全ての反応において、反応生成物は見られなかった。

以上、本研究で開発した大腸菌の FAS 破壊株は acetyl-CoA、malonyl-CoA を前駆体とする種々の二次代謝産物の異種生産に活用できると考えられる。また、Keio collection を用いたスクリーニングにより、欠損させるとポリケタイドの生産性を飛躍的に向上させる因子を発見した。最後に *R. jostii* RHA1 における $\beta$ -ケトアジピン酸経路の *in vitro* 再構築に初めて成功した。また、本経路における未知経路の発見から、RHA1 における本経路の全容解明に近づいたことで、組換え放線菌を用いた芳香族ポリケタイドの異種生産に向けた基盤を構築した。

## 引用文献

- 1) Keatinge-Clay, AT.: The structures of type I polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.*, **29**, 1050-1073 (2012).
- 2) White, SW., Zheng, J., Zhang, YM., and Rock, CO.: The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 791-831 (2005).
- 3) Campbell, JW., Cronan, JE Jr.: *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. *J. Bacteriol.*, **183**, 5982-5990 (2001).
- 4) My, L., Rekoske, B., Lemke, JJ., Viala, JP., Gourse, RL., Bouveret, E.: Transcription of the *Escherichia coli* fatty acid synthesis operon *fabHGD* is directly activated by FadR and inhibited by ppGpp. *J. Bacteriol.*, **195**, 3784-3795 (2013).
- 5) DiRusso, CC., Nyström, T.: The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Mol. Microbiol.*, **27**, 1-8 (1998).
- 6) Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, CO., Cronan, JE Jr.: Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* **57**, 522-42 (1993).
- 7) Cronan, JE Jr., Subrahmanyam, S.: FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency. *Mol. Microbiol.*, **29**, 937-943 (1998).
- 8) Kornberg, HL., Krebs, HA.: Synthesis of cell constituents from C<sub>2</sub>-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature*, 179, 988-991 (1957).
- 9) Yamamoto, K., Ishihama, A.: Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by IclR. *Mol. Microbiol.*, **47**, 183-194 (2003).
- 10) Cashel, M., Gentry, DR., Hernandez, VJ., and Vinella, D.: The stringent response. In *Escherichia Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Curtiss, R., and Neidhardt, F.C. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 1458–1496 (1996).

- 11) Nystrom, T.: Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Mol. Microbiol.*, **54**, 855–862 (2004).
- 12) Potrykus, K., and Cashel, M.: (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.*, **62**, 35–51. (2008).
- 13) Wendrich, TM., Blaha, G., Wilson, DN., Marahiel, MA., and Nierhaus, KH.: Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol. Cell.*, **10**, 779–788 (2002).
- 14) Battesti, A. and Bouveret, E.: Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism, *Mol. Microbiol.*, **62**, 1048-1063 (2006).
- 15) Gentry, DR., and Cashel, M.: Cellular localization of the *Escherichia coli* SpoT protein. *J. Bacteriol.*, **177**, 3890– 3893 (1995).
- 16) Hara, A., and Sy, J.: Guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate 5'-phosphohydrolase. Purification and substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1678–1683 (1983).
- 17) Magnusson, LU., Farewell, A., and Nystrom, T.: ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends. Microbiol.*, **13**, 236–242 (2005).
- 18) Austin, MB., and Noel, JP.: The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthase. *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 79-110 (2003).
- 19) Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S.: A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, **400**, 897-899 (1999).
- 20) Katsuyama, Y., Matsuzawa, M., Funa, N., and Horinouchi, S.: Production of curcuminoids by *Escherichia coli* carrying an artificial biosynthesis pathway. *Microbiology*, **154**, 2620-2628 (2008).
- 21) Magnuson, K., Jackowski, R., Rock, C. O., and Cornan, J. E. Jr.: Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **57**, 522-542 (1993).

- 22) Takamura, Y. and Nomura, G.: Changes in the intracellular concentration of acetyl-CoA and malonyl-CoA in relation to the carbon to the carbon and energy metabolism of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.*, **57**, 2249-2253 (1988).
- 23) Xu, P., Ranganathan, S., Maranas, C. D., and Koffas, M. A.: Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metab. Eng.*, **13**, 578-587 (2011).
- 24) Miyahisa, I., Kaneko, M., Funa, N., Kawasaki, H., Kojima, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S.: Efficient production of (2S)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 498-504 (2005).
- 25) Funa, N., Funabashi, M., Yoshimura, E., Horinouchi, S.: A novel quinone-forming monooxygenase family involved in modification of aromatic polyketides. *J. Biol. Chem.*, **280**, 14514-14523 (2005).
- 26) Omura, S.: The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as as inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 681-697 (1976).
- 27) Rasmussen, L. C., Sperling-Petersen, H.U., and Mortensen, K. K.: Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *Microb. Cell Fact.* **6**, 24 (2007).
- 28) Dryselius, R., Aswasti, S. K., Rajarao, G. K., Nielsen, P. E., and Good, L.: The translation start codon region is sensitive to antisense RNA inhibition in *Escherichia coli*. *Oligonucleotides*, **13**, 427-433 (2003).
- 29) Nakashima, N., Tamura, T., and Good, L.: Paired termini stabilize antisense RNAs and enhance conditional gene silencing in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*, **34**, e138 (2006).
- 30) Nakashima, N. and Tamura, T.: Conditional gene silencing of multiple genes with antisense RNAs and generation of mutator strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **37**, e103 (2009).
- 31) Ghosh, K. and Van Duyne G. D.: Cre-loxP biochemistry. *Methods*, **28**, 374-383 (2002).



- 32) Datsenko, K. A., Wanner, B. L.: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6640-6645 (2000).
- 33) Han, X., Bai, H., Liu, L., Dong, H., Liu, R., Song, J., Ding, C., Qi, K., Liu, H., and Yu, S.: The *luxS* gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.*, **55**, 21-27 (2013).
- 34) Zhang, F., Ouellet, M., Batth, TS., Adams, PD., Petzold, CJ., Mukhopadhyay, A., Keasling, JD.: Enhancing fatty acid production by the expression of the regulatory transcription factor FadR. *Metab. Eng.*, **14**, 653-660 (2012).
- 35) Nomura, Y., Izumi, A., Fukunaga, Y., Kusumi, K., Iba, K., Watanabe, S., Nakahira, Y., Weber, AP., Nozawa, A., Tozawa, Y.: Diversity in guanosine 3',5'-bisdiphosphate (ppGpp) sensitivity among guanylate kinases of bacteria and plants. *J. Biol. Chem.*, **289**, 15631-15641 (2014).
- 36) Baba, T., Takeshi Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H.: Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 1-10 (2006).
- 37) B. Laber, W. Maurer, S. Scharf, K. Stepusin, and FS. Schmidt.: Vitamin B6 biosynthesis: formation of pyridoxine 5'-phosphate from 4-(phosphohydroxy)-l-threonine and 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate by PdxA and PdxJ protein. *FEBS lett.*, **449**, 45-8 (1999).
- 38) Harwood, C. S. and Parales, R. E.: The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 553-590 (1996).
- 39) Ornston, LN., Stainer, RY.: The conversion of catechol and protocatechuate to  $\beta$ -ketoadipate by *Pseudomonas putida*. I. Biochemistry. *J. Biol. Chem.*, **241**, 3776-3786 (1966).
- 40) Parales, RE., Harwood, CS.: Regulation of the *pcaIJ* genes for aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, **175**, 5829-5838 (1993).

- 41) Patel, RN., Mazumdar, S., Ornston, LN.:  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone hydrolases I and II from *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Biol. Chem.*, **250**, 6567-6577 (1975).
- 42) Yeh, WK., Fletcher, P., Ornston, LN.: Evolutionary divergence of co-selected  $\beta$ -ketoadipate enol-lactone hydrolases in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Biol. Chem.* **255**, 6342-6346 (1980).
- 43) Shanley, MS., Neidle, EL., Parales, RE., Ornston, LN.: Cloning and expression of *Acinetobacter calcoaceticus* catBCDE genes in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **165**, 557-563 (1986).
- 44) Parke, D., Ornston, LN.: Enzymes of the  $\beta$ -ketoadipate pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. *J. Bacteriol.*, **165**, 288-292 (1986).
- 45) Parke, D.: Positive regulation of phenolic catabolism in *Agrobacterium tumefaciens* by the *pcaQ* gene in response to  $\beta$ -carboxy-*cis,cis*-muconate. *J. Bacteriol.*, **175**, 3529-3535 (1993).
- 46) Parke, D.: Supraoperonic clustering of *pca* genes for catabolism of the phenolic compound protocatechuate in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, **177**, 3808-3817 (1995).
- 47) Seto, M., Kimbara, K., Shimura, M., Hatta, T., Fukuda, M. and Yano, K. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3353-3358 (1995).
- 48) Mcleod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, S. J., Holt, R., Brinkman, F. S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W., and Etis, L. D.: The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15582-15587 (2006).

- 49) Kitagawa, W., Miyauchi, K., Masai, E. and Fukuda, M.: Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J. Bacteriol.*, **183**, 6598-6606 (2001).
- 50) Patrauchan, MA., Florizone, C., Dosanjh, M., Mohn, WW., Davies, J., Eltis, LD.: Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence. *J. Bacteriol.*, **187**, 4050-4063 (2005).
- 51) Eulberg, D., Lakner, S., Golovleva, LA., Schlömann, M.: Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: evidence for a merged enzyme with 4-carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate enol-lactone-hydrolyzing activity. *J. Bacteriol.*, **180**, 1072-1081 (1998).
- 52) Veselý, M., Knoppová, M., Nesvera, J., Pátek, M.: Analysis of *catRABC* operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 159-168 (2007).
- 53) Meagher, RB., Ngai, KL., Ornston, LN.: Muconolactone isomerase. *Methods in Enzymology*, **188**, 130-133 (1990).
- 54) Hara, H., Eltis, L. D., Davies, J. E., and Mohn, WW.: Transcriptomic Analysis Reveals a Bifurcated Terephthalate Degradation Pathway in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1 *J. Bacteriol.*, **189**, 1641-1647 (2007).
- 55) Huang, CS., Sadre-Bazzaz, K., Shen, Y., Deng, B., Zhou, ZH., Tong, L.: Crystal structure of the  $\alpha_6\beta_6$  holoenzyme of propionyl-coenzyme A carboxylase. *Nature*, **466**, 1001-1005 (2010).
- 56) Huang, CS., Ge, P., Zhou, ZH., Tong, L.: An unanticipated architecture of the 750-kDa  $\alpha_6\beta_6$  holoenzyme of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *Nature*, **481**, 219-223 (2011).
- 57) St Maurice, M., Reinhardt, L., Surinya, KH., Attwood, PV., Wallace, JC., Cleland, WW., Rayment, I.: Domain architecture of pyruvate carboxylase, a biotin-dependent multifunctional enzyme. *Science*, **317**, 1076-1079 (2007).

- 58) Xiang, S., Tong, L.: Crystal structures of human and *Staphylococcus aureus* pyruvate carboxylase and molecular insights into the carboxyltransfer reaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 295-302 (2008).
- 59) Fan, C., Chou, CY., Tong, L., Xiang, S.: Crystal structure of urea carboxylase provides insights into the carboxyltransfer reaction. *J. Biol. Chem.*, **287**, 9389-9398 (2012).
- 60) Tran, TH., Hsiao, YS., Jo, J., Chou, CY., Dietrich, LE., Walz, T., Tong, L.: Structure and function of a single-chain, multi-domain long-chain acyl-CoA carboxylase. *Nature*, **518**, 120-124 (2015).
- 61) Frazee, RW., Livingston, DM., LaPorte, DC., Lipscomb, JD.: Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas putida* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. *J. Bacteriol.*, **175**, 6194-6202 (1993).
- 62) Ohlendorf, DH., Orville, AM., Lipscomb, JD.: Structure of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* at 2.15 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **244**, 586-608 (1994).
- 63) Yang, J., Wang, Y., Woolridge, EM., Arora, V., Petsko, GA., Kozarich, JW., Ringe, D.: Crystal structure of 3-carboxy-*cis,cis*-muconate lactonizing enzyme from *Pseudomonas putida*, a fumarase class II type cycloisomerase: enzyme evolution in parallel pathways. *Biochemistry*, **43**, 10424-10434 (2004).
- 64) Pieper, DH., Pollmann, K., Nikodem, P., Gonzalez, B., Wray, V.: Monitoring key reactions in degradation of chloroaromatics by in situ <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance: solution structures of metabolites formed from *cis*-dienelactone. *J. Bacteriol.*, **184**, 1466-1470 (2002).
- 65) Yeh, WK., Fletcher, P., Ornston, LN.: Homologies in the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequences of γ-carboxymuconolactone decarboxylases and muconolactone isomerases. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6347-6354 (1980).
- 66) Chari, RVJ., Whitman, CP., Kozarich, JW., Ngai, KL., Ornston, LN.: Absolute stereochemical course of muconolactone Δ-isomerase and of 4-carboxymuconolactone

- decarboxylase: A  $^1\text{H}$  NMR "ricochet" analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5520-5521 (1987).
- 67) Ainsworth, AT., Kirby, GW.: Stereochemistry of  $\beta$ -carboxy- and  $\beta$ -hydroxymethyl-muconic derivatives. *J. Chem. Soc. C.*, 1483–1487 (1968).
- 68) Nakashima, N., Tamura, T.: Isolation and characterization of a rolling-circle-type plasmid from *Rhodococcus erythropolis* and application of the plasmid to multiple-recombinant-protein expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5557-5568 (2004).
- 69) Ngai, KL., Neidle, EL., Ornston, LN.: Catechol and chlorocatechol 1,2-dioxygenases. *Methods in Enzymology*, **188**, 122-126 (1990) .
- 70) Avigad, G., England, S., Olsen, BR., Wolfenstein-Todel, C., Wiggins, R.: Molecular properties of *cis,cis*-muconate cycloisomerase from *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.*, **89**, 651-662 (1974).
- 71) Sistrom, WR., Stainer, RY.: The mechanism of formation of  $\beta$ -ketoadipic acid by bacteria. *J. Biol. Chem.*, **210**, 821-836 (1954).
- 72) Douglas, WR., Alan, GS.: (+)-muconolactone from arene biotransformation in *Pseudomonas putida*: production, absolute configuration and enantiomeric purity. *Tetrahedron*, **50**, 3587-3594 (1994).
- 73) Ornston, LN.: The conversion of catechol and protocatechuate to  $\beta$ -ketoadipate by *Pseudomonas putida*. III. Enzymes of the catechol pathway. *J. Biol. Chem.*, **241**, 3795-3799 (1966).
- 74) Kukor, JJ., Olsen, RH., Ballou, DP.: Cloning and expression of the *catA* and *catBC* gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.*, **170**, 4458-4465 (1988).
- 75) Patrauchan, MA., Florizone, C., Eapen, S., Gómez-Gil, L., Sethuraman, B., Fukuda, M., Davies, J., Mohn, WW., Eltis, LD.: Roles of ring-hydroxylating dioxygenases in styrene and benzene catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Bacteriol.*, **190**, 37-47 (2008).

- 76) Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A.: Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, **145**, 69-73 (1994).
- 77) Simon, R., Priefer, U., and Puhler, A.: A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat. Biotechnol.*, **1**, 784-791 (1983).
- 78) Parales, RE., Harwood, CS.: Characterization of the genes encoding beta-ketoadipate: succinyl-coenzyme A transferase in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, **174**, 4657-4666 (1992).
- 79) Kaschabek, SR., Kuhn, B., Müller, D., Schmidt, E., Reineke, W.: Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: purification and characterization of 3-oxoadipate:succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *J. Bacteriol.*, **184**, 207-215 (2002).
- 80) Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, DI., and Metoz, F.: ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, **15**, 305-308 (1999).
- 81) Van der Geize, R., Hessels, GI., Van Gerwen, R., Van der Meijden, P., Dijkhuizen, L.: Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. *FEMS Microbiol. Lett.*, **205**, 197-202 (2001).

## 謝辞

本研究を遂行し、博士論文を作成するにあたり多くの方々にお世話になりました。ケミカルバイオロジー研究室准教授、鮎信学先生には研究に関することのみならず、人間として向上心を持ち続けることの重要性など幅広い指導をしていただき、深く感謝しております。また、韓国・鮮文大学助教、金承榮先生には研究に関する多くの助言をいただいただけでなく、プライベートでも仲良くしていただいたことに心より御礼申し上げます。実験材料に関して、pKU490 ベクターを提供していただいた北里大学教授、池田治生先生、pKD46 プラスミドを提供していただいた奈良先端科学技術大学院大学教授、森浩禎先生、*Rhodococcus jostii* RHA1 関連の菌株を分譲していただいたマレーシア工科大学准教授、原啓文先生のおかげで全ての実験を滞りなく遂行することができましたので、心から感謝申し上げます。また、東京大学生物生産工学センター細胞機能工学研究室教授、西山真先生および同研究室准教授、葛山智久先生には当研究室との合同研究室旅行を開催して、他大学の先生方や学生との交流の機会を与えていただいたのに加えて、放線菌学会等で研究に対する助言をいただきました。深く御礼申し上げます。東京工業大学生命理工学部田中・今村研究室教授、田中寛先生、同助教、嶋田友裕先生には大腸菌の一次代謝に関するディスカッションをしていただき、その後の研究を進めるための重要なポイントとなりました。また、その後の酒席では東京工業大学の学生と交流させていただき、心より感謝しています。

加えて、静岡県立大学食品栄養科学部の先生方にも、大変お世話になりました。生物分子工学研究室准教授、河原崎泰昌先生、同研究室助教、伊藤圭祐先生、食品蛋白質工学研究室准教授、伊藤創平先生、同研究室助教、中野祥吾先生には研究のアドバイスをいただいたり、幾度となく実験器具を貸与していただきました。心より感謝しております。植物機能開発研究室教授、小林裕和先生には私の就職先を決定する最初の一步である人脈づくりにおいて、株式会社鈴与総合研究所の中山滋理事長、流石啓司課長をご紹介いただいたことに深く感謝致します。また、本学薬学部医薬品製造化学講座教授、管敏幸先生、同講座助教浅川倫宏先生には、旋光度測定に際し親切丁寧にご指導していただきましたことに御礼申し上げます。

さらに、研究室の皆様にも多くのお力添えをいただきました。大石奈穂美さんには、第一章の大腸菌における脂肪酸合成酵素阻害実験に関して、私の作製した遺伝子破壊株を用いて生育試験、flaviolin および malonyl-CoA 定量試験に多大な労力を注いでいただき、感謝しています。大石さんの研究や部活など、何事にも夢中になる姿に勇気付けられました。曾根祐輔君には、FAS 破壊株を用いた脂肪酸量の解析を行っていただいたことに感謝します。また、後輩でありながら貪欲に知識を深め技能を高めようとする心構えと他の学生の研究にも率先してアドバイスを行う姿勢に関して、自分も

見習わなければならないと思いました。今後は学生のトップとして、ケミカルバイオロジー研究室を宜しくお願い致します。山本聡君とは3年間、脂肪酸合成酵素遺伝子の破壊実験および **Keio collection** のスクリーニングに関して共に苦労を分かちあいました。山本君の修論発表のスライドを鮎先生や曾根君のお力添えの下、徹夜で作製したことは良い経験となりました。蘇召軒さんには、**Keio collection** の実験に関してタイトなスケジュールであったにも関わらず、多くの実験を行ってくれたことや中国語の発音を教えていただいたことに御礼申し上げます。戸塚直希君には、大腸菌における LC-MS での ppGpp 分析系の構築および *Rhodococcus jostii* RHA1 の遺伝子破壊株の実験、Ro02782・Ro02781 の実験に関して、様々な困難に直面してもめげずに頑張ってくれたことに感謝しています。

また、修士の同期である小野寺溪斗さんには、研究室の先輩として実験操作に関して何も知らなかった私に、懇切丁寧に指導していただき非常に感謝しております。私が学部3年生へ編入学した時の同期である相澤光輝君、栗田克麻君には実験に関するアドバイスを多くいただき、感謝しています。私と共にケミカルバイオロジー研究室を卒業する天野結香子さんには、小さな幸福感を集めて日々の生活を豊かにしていく姿勢を勉強させていただきました。同様に、私と共に卒業する谷美生夏さんには、掃除の責任者として研究室内を綺麗に保つことに尽力していただいたことに感謝しています。また、後輩に対して同じ内容であっても何度もめげずにアドバイスをする姿勢を勉強させていただきました。中村修人君には、自分の実験ではないにも関わらず様々な助言をしていただいたことに感謝しています。また、中村君が今年度の幹事として多くの行事を企画してくれたので、いろいろな思い出ができました。今後も美味しい物を食べに行きましょう。大石和敬君には、自転車での下校時にいろいろな話をしていただいたことに感謝しています。このように、研究室の皆様に支えられて実験できたことに、深くお礼申し上げます。

最後に、長期にわたり心身ともに生活全般を支えてくださった、私の家族およびもう一つの家族と言っても過言ではない小野家の皆様に深く感謝いたします。

平成 28 年 2 月 4 日

山梨 智也