

抗生物質の自己耐性と生合成調節機構の遺伝生化学

小河原 宏

明治薬科大学生化学教室, 〒204-8588 秋津市野塩 2-522-1

Genetic and Biochemical Studies on the Regulatory Mechanism of the Self-Resistance and Biosynthesis of Antibiotics

Hiroshi OGAWARA

Department of Biochemistry, Meiji Pharmaceutical University,
2-522-1, Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan

(Received December 5, 2000)

The following topics are described: 1. chemistry of β -lactamases; 2. β -lactamases from *Streptomyces* including distribution of β -lactamases in actinobacteria, properties of β -lactamases from *Streptomyces*, cloning and regulatory mechanism of expression of β -lactamase genes from *Streptomyces* and evolution and classification of β -lactamases in general; 3. penicillin-binding proteins from *Streptomyces* including β -lactam-producing- and non-producing strains and 4. eukaryotic-type protein kinases from *Streptomyces* including cloning of the genes and evolution and classification of eukaryotic-type protein kinases in general.

Key words— β -lactamases; *Streptomyces*; eukaryotic-type protein kinases; penicillin-binding proteins; gene; drug resistance

1. はじめに

1970 年前後は新抗生物質の探索もなかなか捗らず、一方では抗生物質耐性が話題になり始めた時期である。私が以前所属していた国立予防衛生研究所(予研, 現国立感染症研究所)抗生物質部では、 β -ラクタム剤に対するその当時主要な耐性機構であった β -ラクタマーゼに対する阻害剤を探索しており、私も関与していた。¹⁾ ちょうどその頃アメリカのグループにより放線菌から始めて 7 位にメトキシ基を有するセファマイシン系の β -ラクタム抗生物質が単離されセンセーションを起こしていた。²⁾ また一方で抗生物質耐性機構も盛んに研究され始めており、予研の鈴木、岡本などによりアミノグリコシド系抗生物質でのアセチル化、リン酸化、AMP 化やクロラムフェニコールのアセチル化などによる不活性化が始めて明らかにされていた。このような背景から、私は病原菌ではなく生産菌の 1 つである放線菌における β -ラクタムに対する自己耐性について取り上げることにした訳である。これが私の β -ラクタム/ β -ラクタマーゼ/放線菌とのつき合いの

始まりであり、その当時はこのように長くつき合うとは予想もしなかったことである。今から思えば長期間の研究とは大体このようにして始まるのではないかと思う。

2. β -ラクタマーゼの化学

β -ラクタマーゼ阻害剤の探索に用いた患者由来多剤耐性大腸菌の β -ラクタマーゼの活性中心についての化学的な知見を得るために、当時はまだ X 線解析の結果が出ていない時であったため、化学試薬を用い解析した。その過程で新しいアフィニティーラベル試薬を開発でき、その方法が *Methods in Enzymology* に掲載されることになった。³⁾ すなわち、ベンジルペニシリンイソチオシアネートである。その後も色々の試薬を合成したが、光アフィニティーラベル試薬は結局使わずにお蔵に(今でもフリーザーに)眠ったままになってしまった。

3. 放線菌の β -ラクタマーゼ

3-1. β -ラクタマーゼの分布 主な薬剤耐性機構として薬剤の分解を含む化学修飾、標的の変化、薬剤透過性の変化の 3 つが古くから知られている。

本総説は、平成 13 年度日本薬学会学術貢献賞の受賞を記念して記述したものであり、平成 12 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

そこで放線菌における β -ラクタム自己耐性の第1の候補として β -ラクタムの化学修飾すなわち β -ラクタマーゼについて検討した。そのためまず土壌から単離され *Streptomyces* として同定された菌 100 株につき β -ラクタマーゼを生産しているかどうかを液体培養上清で調べた。⁴⁾ その結果、約半数の菌で 2.3 単位/ml 以上の、残りの半数の菌で 1.4 単位/ml 以下の β -ラクタマーゼを生産していた。と言うことは *Streptomyces* 属放線菌の大部分が β -ラクタマーゼを構成的に菌体外に分泌していることを示していた。しかもこれら生産菌のベンジルペニシリンに対する最小阻止濃度との比較から、 β -ラクタマーゼの生産はベンジルペニシリンに対する耐性とは直接関係していないことも明らかとなった。一般に黄色ブドウ球菌や枯草菌などのグラム陽性菌はペニシリンに対して極めて高い感受性を示すが、*Streptomyces* 属放線菌はグラム陽性細菌であるにもかかわらずベンジルペニシリンに対する最小阻止濃度が 3.1—25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と感受性が低いことも判明した。生産の時間経過から考えて二次代謝産物として生産されしかもペニシリンに対する耐性とは直接関係しない生産されるとなると、 β -ラクタマーゼは放線菌のような非病原菌にとって一体何の目的があって生産されるのかという疑問が生じてくる。また病原菌による β -ラクタマーゼの生産は、ペニシリンが利用されるようになって産生する病原菌の種類が拡大すると同時に産生量も増大してきている。 β -ラクタム抗生物質を生産することが明らかにされた *Streptomyces* 属放線菌では果たしてどうなのかと言うことも、病原菌の β -ラクタマーゼとの関係あるいは由来を考えたとき重要な問題である。そこで予研の歌原良三博士と科研化学の清野昭雄博士のご厚意により、次に土壌から新たに分離した *Streptomyces* 属放線菌 100 株と、いまだほとんどペニシリンや他の抗生物質に曝される機会の少なかつたであろう約 30 年ほど前に土壌から分離し実験室に保管されていた *Streptomyces* 属放線菌 99 株につき β -ラクタマーゼの生産性、もし生産されるならばその性質がどのように変化したかを比較検討した。⁵⁾ その結果、Table 1 に示すように生産する放線菌の割合も生産する量も特に両者で有意の差が見られないことが明らかとなった。さらに生産される β -ラクタマーゼの等電点、分子量、基質特異性など

Table 1. Production of β -Lactamases in *Streptomyces*

Enzymatic activity (units/ml)	No. of strains	
	New	Old
0	28	24
<1	19	34
2-10	24	15
11-50	24	15
>50	5	11
Total	100	99

の諸性質も両者で差が見られなかった。このことは、*Streptomyces* 属放線菌は病原菌と異なりペニシリンの導入によって β -ラクタマーゼの生産性、その物理化学的諸性質がほとんど影響を受けないことを示し、 β -ラクタマーゼの生理的役割や進化を考える上で非常に示唆に富む結果を与えてくれた。

一方、*Streptomyces* 属放線菌は β -ラクタム抗生物質を生産するが、いわゆる稀少放線菌は β -ラクタムをほとんど生産しないことが古くから知られていた（三共株の岡崎尚夫博士からの私信）。そこで中瀬崇博士らとの共同研究で理研に保存されている Table 2 に示す 36 属 127 株の稀少放線菌につき、 β -ラクタマーゼを生産するかどうかを液体培養により調べた。⁶⁾ 一般に *Streptomyces* 属以外の稀少放線菌の生育速度は極めて遅く、7 日おきに 30 日以上にわたり測定した。その結果をベンジルペニシリンに対する最小阻止濃度と共に Table 3 に示した。すなわち、 β -ラクタマーゼを検出できた菌株は 36 属 127 株のうち *Aeromicrobium erythreum* JCM8359, *Actinomadura cremea* subsp. *rifamicini* JCM3309, *Saccharomonospora azurea* JCM7551, *Saccharothrix flava* JCM3296, *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *aerocolonigenes* JCM4150, *Saccharothrix waywayandensis* JCM9114 の 4 属 6 菌株にすぎず、*Saccharothrix* 属以外はほとんどの菌株が β -ラクタマーゼを生産しないことが判明した。しかも β -ラクタマーゼの生産とベンジルペニシリンに対する最小阻止濃度の間には *Streptomyces* 属放線菌のとき同様相関性は見られなかった。さらに Fig. 1 に示すように、これら稀少放線菌の 16S rRNA に基づく系統関係と β -ラクタマーゼ生産菌の系統関係は全く相関関係が見られなかった。*Saccharothrix* 属放線菌が β -ラクタムを生産するかどうかは現在不

Table 2. List of Actinomycete Strains Used in This Paper

Species	JCM No.	Species	JCM No.	Species	JCM No.	Species	JCM No.
<i>Actinokineospora</i>		<i>A. fastidiosa</i>	3276	<i>Kibdelosporangium</i>		<i>Rhodococcus</i>	
<i>A. diospyrosa</i>	9921	<i>A. mediterranei</i>	4789	<i>K. aridum</i> subsp. <i>aridum</i>	7912	<i>R. equi</i>	1311
<i>A. globicatena</i>	9922	<i>A. methanolica</i>	8087	<i>K. aridum</i> subsp. <i>largum</i>	9107	<i>R. erythropolis</i>	3201
<i>Actinomadura</i>		<i>A. orientalis</i> subsp. <i>lurida</i>	3141	<i>Kineosporia</i>		<i>R. rhodochrous</i>	3202
<i>A. atramentaria</i>	6250	<i>A. orientalis</i> subsp. <i>Orientalis</i>	4600	<i>K. aurantiaca</i>	3230	<i>Saccharomonospora</i>	
<i>A. aurantiaca</i>	8201	<i>Arthrobacter</i>		<i>Microbispora</i>		<i>S. azurea</i>	7551
<i>A. citrea</i>	3295	<i>A. globiformis</i>	1332	<i>M. rosea</i> subsp. <i>rosea</i>	3006	<i>S. cyanea</i>	7552
<i>A. coerulea</i>	3320	<i>A. polychromogenes</i>	2523	<i>M. amethystogenes</i>	3021	<i>S. glauca</i>	7444
<i>A. cremea</i> subsp. <i>cremea</i>	3308	<i>Brevibacterium</i>		<i>Micromonospora</i>		<i>Saccharopolyspora</i>	
<i>A. cremea</i> subsp. <i>rifamicini</i>	3309	<i>B. linens</i>	1327	<i>M. carbonacea</i> subsp. <i>carbonacea</i>	3139	<i>S. erythraea</i>	4026
<i>A. fulvescens</i>	6833	<i>B. linens</i>	2590	<i>M. charcea</i>	3031	<i>S. gregorii</i>	9687
<i>A. hibisca</i>	9627	<i>Catellatospora</i>		<i>M. halophytica</i> subsp. <i>halophytica</i>	3125	<i>S. hordei</i>	8090
<i>A. kilaniata</i>	3306	<i>C. citrea</i> subsp. <i>citrea</i>	7542	<i>M. olivasterospora</i>	7348	<i>S. taberi</i>	9383
<i>A. libanotica</i>	3284	<i>C. ferruginea</i>	7544	<i>Microtetraspora</i>		<i>Saccharothrix</i>	
<i>A. luteofluorescens</i>	4203	<i>C. matsumotoense</i>	9104	<i>M. fusca</i>	3183	<i>S. aerocolonigenes</i> subsp. <i>aerocolonigenes</i>	4150
<i>A. rugatobispora</i>	3366	<i>C. tsunoense</i>	9105	<i>M. glauc</i>	3300	<i>S. aerocolonigenes</i> subsp. <i>staurospoleus</i>	9734
<i>A. umbrina</i>	6837	<i>Catenuloplanes</i>		<i>M. niveoalba</i>	3149	<i>S. australiensis</i>	3370
<i>A. verrucosospora</i>	3147	<i>C. atrovinosus</i>	9535	<i>Nocardioidea</i>		<i>S. coeruleofusca</i>	3313
<i>A. vinacea</i>	3325	<i>C. japonicus</i>	9106	<i>N. albus</i>	3185	<i>S. coeruleoviolacea</i>	9110
<i>A. yumaensis</i>	3369	<i>Cellulomonas</i>		<i>N. luteus</i>	3358	<i>S. cryophyllis</i>	9111
<i>Actinoplanes</i>		<i>C. fimi</i>	1341	<i>N. plantarum</i>	9626	<i>S. espanaensis</i>	9112
<i>A. brasiliensis</i>	3196	<i>Corynebacterium</i>		<i>N. pyridinolyticus</i>	10369	<i>S. flava</i>	3296
<i>A. consettensis</i>	7624	<i>C. aquaticum</i>	1368	<i>N. simplex</i>	1363	<i>S. longispora</i>	3314
<i>A. deccanensis</i>	3247	<i>Couchioplanes</i>		<i>Nocardioopsis</i>		<i>S. mutabilis</i> subsp. <i>capreolus</i>	4248
<i>A. derwentensis</i>	7556	<i>C. caeruleus</i> subsp. <i>azureus</i>	3246	<i>N. alba</i>	9419	<i>S. mutabilis</i> subsp. <i>mutabilis</i>	3380
<i>A. durhamensis</i>	7625	<i>Curtobacterium</i>		<i>N. dassonvillei</i>	7437	<i>S. syringae</i>	6844
<i>A. ferrugineus</i>	3277	<i>C. citreum</i>	1345	<i>N. prasina</i>	3336	<i>S. texasensis</i>	9113
<i>A. italicus</i>	3165	<i>C. luteum</i>	1480	<i>Nonomuria</i>		<i>S. waywayandensis</i>	9114
<i>A. minutisporangius</i>	9458	<i>C. pusillum</i>	1350	<i>N. roseola</i>	3323	<i>Streptosporangium</i>	
<i>A. pallerronii</i>	7626	<i>Dactylosporangium</i>		<i>N. spiralis</i>	3286	<i>S. album</i>	3025
<i>A. philippinensis</i>	3001	<i>D. aurantiacum</i>	3083	<i>Planobispora</i>		<i>S. amethystogenes</i> subsp. <i>amethystogenes</i>	3026
<i>A. rectilineatus</i>	3194	<i>D. roseum</i>	3364	<i>P. longispora</i>	3092	<i>S. longisporum</i>	3106
<i>A. utahensis</i>	3122	<i>D. thailandense</i>	3084	<i>P. rosea</i>	3166	<i>S. nondiastaticum</i>	3114
<i>Actinosynnema</i>		<i>D. vinaceum</i>	3307	<i>Planomonospora</i>		<i>S. pseudovulgare</i>	3115
<i>A. mirum</i>	3225	<i>Geodermatophilus</i>		<i>P. parontospora</i> subsp. <i>antibiotica</i>	3094	<i>S. roseum</i>	3005
<i>A. pretiosum</i> subsp. <i>auranticum</i>	7343	<i>G. obscurus</i>	3152	<i>P. parontospora</i> subsp. <i>parontospora</i>	3093	<i>S. violaceochromogenes</i>	3281
<i>A. pretiosum</i> subsp. <i>pretiosum</i>	7344	<i>Glycomyces</i>		<i>P. venezuelensis</i>	3167	<i>S. vulgare</i>	3028
<i>Aeromicrobium</i>		<i>G. harbinensis</i>	7347	<i>Planotetraspora</i>			
<i>A. erythreum</i>	8359	<i>G. rutgersensis</i>	6238	<i>P. mira</i>	9131		
<i>A. fastidiosum</i>	8088	<i>Gordonia</i>		<i>Prauserella</i>			
<i>Amycolatopsis</i>		<i>G. terrae</i>	3229	<i>P. rogosa</i>	9736		
<i>A. azurea</i>	3275	<i>Herbidospora</i>					
		<i>H. cretacea</i>	8553				

明であるが、以上の結果は、 β -ラクタマーゼの生産と β -ラクタム抗生物質の生産とは何らかの関係があるらしいことを示している。以上の結果を含め

現在までの知見を総合すると、 β -ラクタマーゼが生産菌の β -ラクタム抗生物質に対する自己耐性や生合成（化学反応それ自身）に関与しているとは到

Table 3. Production of β -Lactamases and MICs in Actinobacteria

	β -Lactamase activity (units/ml)	Culture time (Day)	MICs (μ g/ml)
<i>A. erythreum</i> JCM8359	0.43	3	50
<i>A. cremea</i> subsp. <i>rifamicini</i> JCM3309	0.16	10-40	200
<i>S. azurea</i> JCM7551	0.11	37	50
<i>S. flava</i> JCM3296	1.04	7	500
<i>S. aerocolonigenes</i> subsp. <i>aerocolonigenes</i> JCM4150	0.92	7	200
<i>S. waywayandensis</i> JCM9114	0.16	7	50
<i>S. cacaoi</i> subsp. <i>cacaoi</i> JCM4352 (medium E)	1.59	8	100
<i>S. cacaoi</i> subsp. <i>cacaoi</i> JCM4352 (medium R)	1.51	3	100

Table 4. Substrate Specificity of β -Lactamase from *Streptomyces cacaoi*

	Relative hydrolysis rate (benzylpenicillin = 100)	K_m (μ M)	V_{max} (benzylpenicillin = 100)
Benzylpenicillin	100	63.8	100
Ampicillin	38	43.6	96.3
Cloxacillin	38	87.5	128.8
Methicillin	73	131	147.5
Carbenicillin	66	65.1	69.3
Cephaloridine	3.1	—	—
Cephalothin	0.7	—	—
Cephazoline	2.1	—	—
Cephalexin	1.9	—	—
Y-G19Z-G	3.1	—	—

底考えられないが、一方でいくつかの細菌由来 β -ラクタム抗生物質生合成遺伝子クラスター内に β -ラクタマーゼ遺伝子が見いだされており、 β -ラクタム抗生物質の生合成に何らかの関係があるあるいはあったものと思われる。他方、カビ由来の β -ラクタム抗生物質生合成遺伝子クラスターの構成は細菌由来のものと同様だが、 β -ラクタマーゼ遺伝子を含んでいない。このことからカビの β -ラクタム抗生物質生合成遺伝子は細菌特に放線菌に由来し、その後 β -ラクタマーゼ遺伝子は脱落したものと考えられている。⁷⁾

3-2. β -ラクタマーゼの性質 前述したように、*Streptomyces*属放線菌は β -ラクタム抗生物質のほかにクラブラン酸などの β -ラクタム骨格を有する β -ラクタマーゼ阻害剤を生産する。すなわち放線菌の中では β -ラクタム抗生物質/ β -ラクタマーゼ阻害剤、 β -ラクタマーゼ、 β -ラクタム抗生物質の標的であるペニシリン結合タンパク質の3者あるいは4者が阻害剤、基質、酵素、標的と言った複雑な関係にある。⁸⁾ 一方では病原菌 β -ラクタマーゼは放線

菌など β -ラクタムを生産する細菌の β -ラクタマーゼに由来したとも考えられている。⁸⁾ そこでこれら4者の関係と β -ラクタマーゼの進化との関係を明らかにする目的で、2, 3の放線菌由来の β -ラクタマーゼを精製しその性質を調べた。

まず後に述べるペニシリン結合タンパク質との関係から *Streptomyces cacaoi* KCCS0352 由来の β -ラクタマーゼを精製した。⁹⁾ 一般的なタンパク質の精製方法により精製した酵素は分子量 34,000；等電点 4.7；至適 pH 6.5 で、比活性は 2,430 単位/mg タンパク質であり *Bacillus cereus* や *Staphylococcus aureus* などほかのグラム陽性菌由来の β -ラクタマーゼとほぼ同程度の比活性を示した。ベンジルペニシリンを最もよく加水分解するが、グラム陽性菌の酵素としては珍しくクロキサシリンやメチシリンも相当程度加水分解した (Table 4)。阻害剤としてはほかのペニシリンと同等 N-ブロムコハク酸イミドにより強く阻害され、酵素活性へのトリプトファン関与が考えられた。ベンジルペニシリンを基質にすると K_m 値は pH の減少と共に増加しその

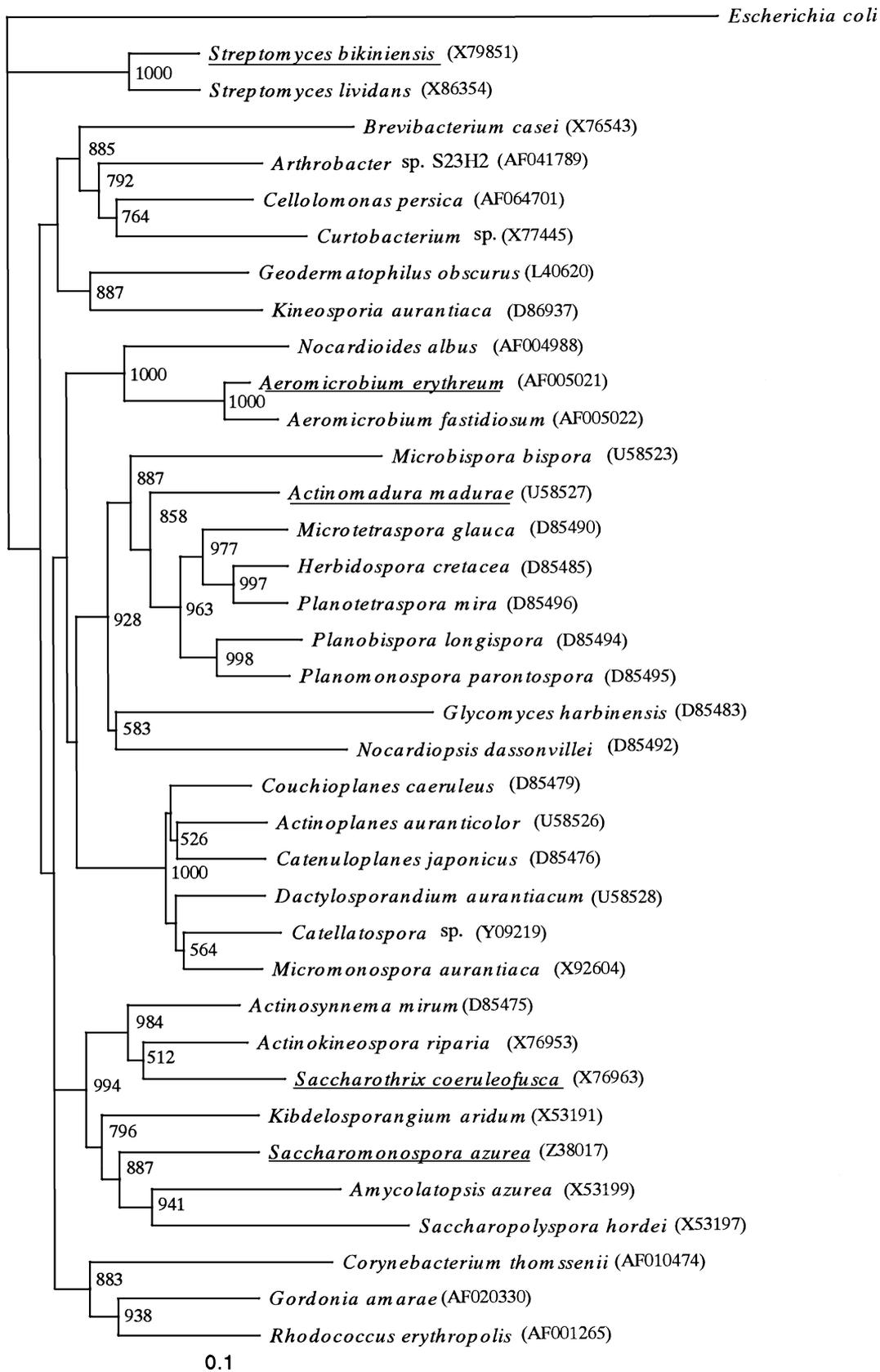


Fig. 1. Phylogenetic Tree Constructed on the Basis of Nucleotide Sequences of 16S rRNAs with Clustal W⁵⁸)

The GenBank accession numbers are indicated in parentheses. The bootstrap probabilities are shown at the left. The bar represents 0.1 substitution per site. *Escherichia coli* was used as an outgroup. The genera of the ones that showed β -lactamase activity are underlined.

pK_a は 6.5—7.0 であった。一方、クロキサシリンを基質にすると K_m 値は pH 7.5 で最小を示した。また pH と V_{max} との関係を調べるとベンジルペニシリンを基質にした場合はベル型の曲線を示すのに対して、クロキサシリンを基質にすると V_{max} はほとんど変化しなかった。さらに加水分解速度の温度による変化を両基質について測定するとやはり明確な差異が認められた。以上の結果から、*S. cacaoi* 由来の β -ラクタマーゼはベンジルペニシリンとクロキサシリンに対して、両者はペニシリンであるにもかかわらず異なった挙動を示すことが明らかとなった。

前述した放線菌由来 β -ラクタマーゼのスクリーニングで、いくつかの β -ラクタマーゼは酸化還元に関与しないにも関わらず、ブルーデキストランに結合することが明らかとなっていた。そこで次にその 1 つである *S. cellulosa* KCCS0127 由来の β -ラクタマーゼを精製した。¹⁰⁾ 硫酸アンモニウム分画、CM-セルローズカラムによる精製の後ブルーセファロースで精製すると、このアフィニティーカラムでの収率が 50% 以上で約 6 倍精製され、ゲル電気泳動などで均一な標品が得られた。一般にブルーデキストランに結合するタンパク質はその立体構造の類似性から“dinucleotide fold”と呼ばれる構造を持ち、NADP⁺、ATP などのジヌクレオチドを結合することが知られていた。¹¹⁾ そこでその結合を蛍光滴定で検討するとこの β -ラクタマーゼは NADP⁺、ATP とは相互作用が見られないが NADP⁺ を滴下すると蛍光強度が急速に低下し、結合定数 $1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ で結合することが判明した。さらに NADP⁺-アガロースのカラムを通過させても 0.5 M NaCl で始めて溶出されることも示され、この β -ラクタマーゼが NADP⁺ と相互作用することが明らかとなった。後述するように、グラム陰性菌プラスミド由来でクロキサシリンを加水分解する 2, 3 の β -ラクタマーゼ（いわゆる D 型 β -ラクタマーゼ）は、NADP⁺ の結合性については検討されていないがブルーデキストランを結合することが知られており、これら一群の β -ラクタマーゼの由来/進化を考える上で興味をそそる問題である。すなわち、現存する β -ラクタマーゼはデヒドロゲナーゼのような酸化還元酵素からプロテアーゼ/ペプチダーゼ（ β -ラクタマーゼは広い意味でのペプチダーゼである）など

多種類の酵素が収斂進化した結果であるとも推定された。

Streptomyces lavendulae KCCS0055 は異常な高頻度でアルギニン要求変異株（アルギニノコハク酸合成酵素遺伝子の欠失）を生成する。アルギニン要求変異株は同時に気中菌糸、胞子の生成を消失し、 β -ラクタマーゼ生産が窒素カタボライト抑制/炭素カタボライト抑制を受けるようになる。¹²⁾ この問題は抗生物質など二次代謝産物の産生上昇と窒素カタボライト抑制/炭素カタボライト抑制との関係から興味を持たれたが、未解決のまま放置されることになってしまった。その当時、このアルギニン要求変異株は他の放線菌でも高頻度に得られ、例えば *S. lividans* ではそれと同時にクロラムフェニコール感受性/テトラサイクリン感受性株が得られており、ホットな話題の 1 つであった。この変異株は、自然突然変異でも極めて高い頻度で得られることからプラスミドが関与していると当時は考えたが、放線菌の染色体は大腸菌などと異なり直鎖状であること、末端は繰り返し配列が多く DNA 断片が脱落しやすいことなどの現在の知見から考えれば、アルギニノコハク酸合成酵素遺伝子及び窒素カタボライト抑制/炭素カタボライト抑制関連遺伝子が繰り返し配列と関係しているか染色体の末端に存在することで説明されよう（この点はまだ証明されている訳ではないが）。

3-3. 遺伝子のクローニングと遺伝子発現調節機構 1987 年私たちはベルギーの Ghuysen 教授らとの共同研究として、*S. lividans*, pIJ702 の宿主ベクター系で、*S. cacaoi* KCCS0352 より β -ラクタマーゼの遺伝子を 19 kb の *SphI* 断片としてクローニングするのに成功した。¹³⁾ 最大生産条件下で生育した *S. cacaoi* のときよりこのプラスミドを含む *S. lividans* では約 30 倍の生産上昇が見られた。さらに興味あることに 19 kb の断片から 12.4 kb の部分を除去すると β -ラクタマーゼの生産は著しく減少し、さらに 1.8 kb までに縮めると 19 kb のときより約 1/50 以下に減少した。このことはここにクローニングした β -ラクタマーゼの構造遺伝子の上流に何らかの酵素活性を上昇させる遺伝子が存在することを示唆している。そこでまず β -ラクタマーゼ構造遺伝子領域のヌクレオチド配列を決定した。その結果、*S. cacaoi* の β -ラクタマーゼは 303 個の

アミノ酸よりなり, *Streptomyces albus* G や *Staphylococcus aureus* 由来の β -ラクタマーゼと相同性の高い A 型の β -ラクタマーゼと推定された.¹⁴⁾ さらに上流領域を削り上流領域が 1.4 kb 存在した場合は 4 単位/ml に減少し, 上流 0.4 kb では 1 単位/ml と最初の 1/50 に減少した. 同様の酵素活性の減少は上流領域に *Bam*HI リンカーを挿入しても観察され, さらには上流と β -ラクタマーゼ構造遺伝子とを別々のプラスミドに乗せ *S. lividans* に形質転換することによりこの上流領域の遺伝子は *trans* に作用することも明らかとなった.¹⁵⁾ このような背景の下で上流領域の約 3 kb のヌクレオチド配列を決定した.¹⁶⁾ 一般に放線菌の DNA は G+C 含量が約 72% と高く, ヌクレオチド配列の決定はヒト DNA などに比較して極めて困難であるが, 一方でこの性質を利用して ORF (open reading frames) 領域を決定するのは比較的簡単である (いわゆる Frame Analysis¹⁷⁾ の利用). これにより決定したヌクレオチド配列を解析すると, 4 つの ORF が見い出された. Fig. 2 にこれら遺伝子と β -ラクタマーゼ構造遺伝子との相対位置を示したが, ORF 1 (*blaA*, 2744—1764 位) と ORF 2 (*blaB*, 1770—832 位, ORF 1 とは一部重複している), ORF 3 (552—154 位) は β -ラクタマーゼ構造遺伝子 (*bla*) と逆向き

に並んで存在し, ORF 4 (50—778 位) は β -ラクタマーゼ構造遺伝子と同方向に離れて存在した. *BlaA* は 326 個のアミノ酸よりなり, この領域に *Bam*HI リンカーを挿入すると生産される酵素量は約 1/50 に低下しアクチベーターをコードするものと考えられた. 実際 *BlaA* のアミノ酸配列を SE-QHP, FASTA などで相同検索すると, *LysR*, *AmpR* といった調節タンパク質と高い相同性が見られ, DNA との結合に必要なヘリックス-ターン-ヘリックス構造を持ち, アクチベーターをコードしていることが確認された. 放線菌の遺伝子でよく見られることであるが, S1 マッピングで転写開始点を決めると転写開始点は *BlaA* の翻訳開始点と同じか 1 塩基違いであることも判明した. また *BlaA* と *BlaB* はオペロンとして同時に転写されることも明らかとなった. ORF 2 は 312 個のアミノ酸よりなるタンパク質 (*BlaB*) をコードし, この領域に *Bam*HI リンカーを挿入すると約 1/20 に生産量が減少することからアクチベーターをコードするものと考えられた. しかし BESTFIT などのプログラムでその相同性を検討すると pBR322 由来の β -ラクタマーゼと 39.2% の類似性を示し, さらに SXXX や KS/TG などの β -ラクタマーゼの活性に必須なアミノ酸配列も検出された. しかしこのタンパク質は β

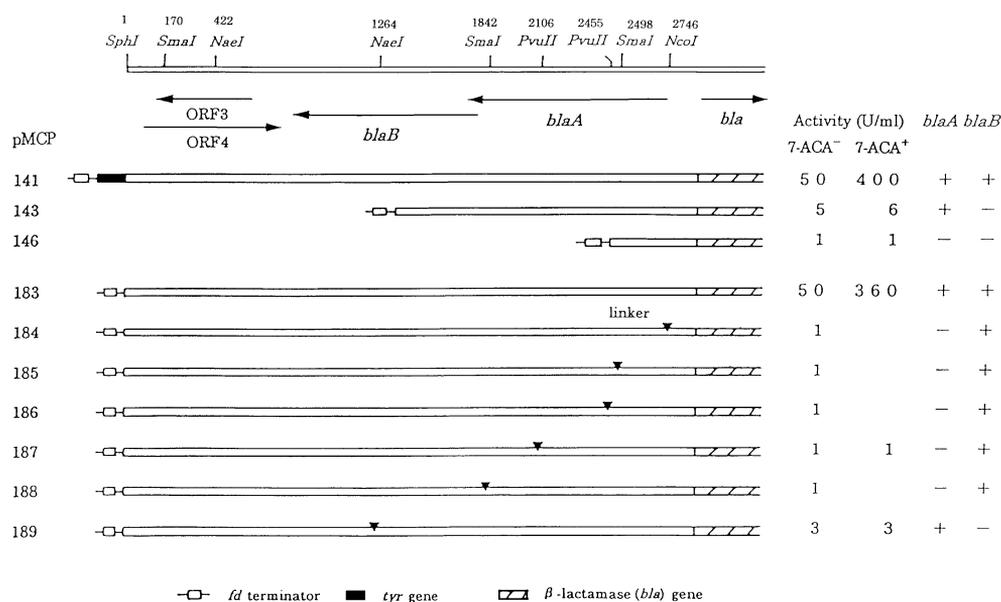


Fig. 2. Influence on *bla* Expression of Upstream Region of *S. cacaoi* DNA Fragments

β -Lactamase activity values (units per ml) are those obtained with *S. lividans* 1326 harboring the indicated plasmids. The numbers above the restriction sites are those of the nucleotides from *Sph*I site. Symbols: open bar: *S. cacaoi*, hatched bar: *bla*, closed car: thiostrepton resistance gene, closed triangle: *Bam*HI linker, open box: *fb* terminator. Arrows denote C-terminals of the indicated ORFs.

-ラクタマーゼ活性を示さず、 β -ラクタムを結合してシグナルを BlaA に伝達するものと考えられる。ORF 3 及び ORF 4 は実際にタンパク質をコードしているかどうか不明であり、特に高い相同性を示すタンパク質も見あたらないが、両者は反対方向に重複しておりこの領域に BamHI リンカーを挿入すると発現する酵素量はやや増加することから酵素発現に何らかの負的作用をしていると考えられるが詳細は不明である。以上の結果、BlaA 及び BlaB の2つのタンパク質が β -ラクタマーゼの活性上昇に関係することが明らかとなったが、両遺伝子は酵素の誘導にも必須であることも判明した。すなわち、通常の状態でも *S. lividans* 中で BlaA 及び BlaB が存在すると約 50 単位/ml の β -ラクタマーゼを生産するが、これに 7-アミノセファロスポラン酸 (7-ACA) を添加すると 400 単位/ml まで上昇する。しかし BlaA あるいは BlaB のいずれかが欠失あるいは破壊されているとこの誘導効果は全く見られない (Fig 2)。すなわちこれら遺伝子は活性化のみでなく、誘導現象にも深く関わっていることが明らかとなった。¹⁸⁾

それではこれら遺伝子がどのようにして β -ラクタマーゼの活性調節に関与しているのであろうか？先程 BlaA タンパク質は DNA 結合モチーフを有すると述べたが実際に BlaA が DNA に結合するかどうかをゲルシフトアッセイ、DNアーゼ I フットプリントアッセイで調べた。¹⁹⁾ その結果、BlaA タンパク質は β -ラクタマーゼ構造遺伝子 (*bla*, 2942—3919 位) と *blaA* との間の *bla* 転写開始点の直前でそのプロモーター領域を含む約 50 bp に結合することが明らかとなった。この領域には繰り返し配列や逆転繰り返し配列は存在しないが、G+C 含量が多い放線菌であるにもかかわらず LysR 群タンパク質の DNA 結合モチーフである T-A に富む T-N₁₁-A 配列²⁰⁾があることは特筆すべきことである。以上の結果をまとめると、BlaB タンパク質が β -ラクタム剤あるいはペプチドグリカン構成成分に対する一種のセンサーとしてその情報を認識し、BlaA タンパク質にその情報を伝達し、BlaA タンパク質が BlaA と β -ラクタマーゼ構造遺伝子のプロモーター直前の DNA 領域に結合することによりこれらタンパク質の発現に正の効果をもたらしたものと考えられる。アクチベーター/レプレッサーによる β -ラクタ

マーゼの発現調節は 2, 3 のほかの菌でも知られているが、それぞれの菌でかなり異なった機構で調節されていることは、²¹⁾ 個々の遺伝子がモザイク的に寄り集まってこれら遺伝子発現調節系を形成した可能性を示し、遺伝子の進化の観点から大変興味深い。

つぎに *S. cellulosa* 由来でブルーデキストランを結合する β -ラクタマーゼの遺伝子をショットガン法で 2.3 kb の DNA 断片としてクローニングした。²²⁾ クローニングには SacI を用いたがこの過程で片側の SacI 領域が欠失してしまった。しかしこの遺伝子を有するクローンは親株に比較して約 6 倍の β -ラクタマーゼ活性を示し、さらに硫酸アンモニウムで部分精製した酵素はブルーデキストランに結合する性質を保持していた。ついでこの遺伝子のヌクレオチド配列を決定した。²³⁾ 前述したように、ある種のグラム陰性菌プラスミド由来の β -ラクタマーゼはクロキサシリンを加水分解し、ブルーデキストランを結合する (いわゆる D 型 β -ラクタマーゼ)。したがって *S. cellulosa* の β -ラクタマーゼも D 型 β -ラクタマーゼと相同性が高いものと予想された。しかし、この予想に反して決定された配列は D 型 β -ラクタマーゼと全く相同性が見られず、逆にグラム陽性菌から通常単離される A 型 β -ラクタマーゼと高い相同性を示した。さらに NADP⁺ を結合するタンパク質に特徴的な GXXGXXG とか RHXXXXR などと言ったアミノ酸配列も見い出せなかった。したがって、この酵素による NADP⁺ の結合には特徴的なアミノ酸配列よりもむしろ全体の立体構造が重要であると推定された。その点については部位特異的変異導入による実験と関連してまた後で述べる。

それではほかのブルーデキストランを結合する放線菌由来の β -ラクタマーゼではどうであろうか？この点を明らかにする目的で、ほかのブルーデキストラン結合 β -ラクタマーゼの遺伝子をクローニングし、ヌクレオチド配列を決定した。まず *S. lavendulae* KCCS0263 由来 β -ラクタマーゼ遺伝子を、*S. cellulosa* 由来 β -ラクタマーゼ遺伝子を用いる交雑法で 7.6 kb の DNA 断片としてクローニングし、ヌクレオチド配列を決定した。²⁴⁾ その結果は先の *S. cellulosa* の場合と同様に A 型 β -ラクタマーゼの特徴を示していた。さらにもう1つのブルーデキストラン結合 β -ラクタマーゼの遺伝子を

Streptomyces fradiae Y59 より同様の方法でクローニングし、 β -ラクタマーゼ構造遺伝子領域のヌクレオチド配列を決定した。²⁵⁾ その結果、*S. fradiae* Y59 の β -ラクタマーゼは 306 個のアミノ酸よりなり、*S. cellulosa* や *S. lavendulae* と同様 A 型 β -ラクタマーゼの配列を有することが判明した。クローニングの過程で、これらの遺伝子では *S. cacaoi* の場合と異なり上流領域が存在してもそれほど活性が上昇しないことが示唆されていた。そこで *S. cacaoi* との比較を含めて *S. fradiae* Y59 の β -ラクタマーゼ構造遺伝子上流のヌクレオチド配列を決めることとした。その前に、 β -ラクタマーゼ構造遺伝子上流約 730 bp の DNA 断片を持つプラスミド pMCP261 と上流約 5 kb の DNA 断片を持つプラスミド pMCP229 を作成し、それぞれ別々に宿主である *S. lividans* へ形質転換し、その液体培養に伴う酵素活性の時間経過と、7-アミノセファロsporin酸による誘導現象を追跡した。²⁶⁾ その結果、上流 5 kb の領域が存在しても *S. cacaoi* の場合と異なり約 4 倍しか活性が上昇しないこと、7-アミノセファロsporin酸が存在しても誘導現象は全く見られないことが判明した。このことは β -ラクタマーゼ構造遺伝子上流の遺伝子構成が、*S. cacaoi* と *S. fradiae* とで全く異なることを予想させた。そこでこの領域のヌクレオチド配列を決定してみると、予想通り全く異なることが明らかとなった。一応 ORF らしき配列として 4 つ確認されたが、139 個のアミノ酸からなる ORF 4 が *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 由来の調節タンパク質らしいタンパク質 (GenBank accession number AL031031-2) 及び *Actinosynnema pretiosum* 由来のリファマイシン合成に関与する未知のタンパク質 (GenBank accession number U33059-2) とやや高いホモロジーを示したのみで、ほかの ORF はいずれも少なくとも調節タンパク質とは相同性は見られなかった。しかし本当にこの ORF 4 が発現し、調節に関与しているかどうかは明らかにされていない。

次にどのアミノ酸がブルーデキストランとの結合に関与しているかを *S. fradiae* Y59 の遺伝子を用い、キメラ遺伝子を作成すると共に部位特異的変異導入法を用いて検討した。²⁵⁾ *S. cacaoi* の遺伝子と比較し *S. cacaoi* と *S. fradiae* の遺伝子をそれぞれ 3 分割しキメラプラスミドを作成し、*S. lividans* を形

質転換後 β -ラクタマーゼを部分精製し、ブルーデキストランと混合し、Sephadex を通過させることにより結合性を検討した。*S. fradiae* の β -ラクタマーゼはブルーデキストランと混合して Sephadex カラムを通過させると複合体を形成するため先端に溶出される。その結果、C 末端から約 1/3 の 194 位から 306 位の領域はブルーデキストランの結合に関与せず、むしろ結合に対して負の影響を示すことが明らかとなった。さらに TSK AF-ブルー-Toyopearl 650 ML ゲルを用いより定量的に解析した。N 末端より 2/3 が *S. fradiae* 由来の場合、*S. fradiae* の場合と同程度の結合性を示し、N 末端より 1/3 が *S. fradiae* の場合は約 1/2 の酵素活性がカラムを通過するが、N 末端 1/3 と C 末端 1/3 が *S. fradiae* の場合は *S. cacaoi* の場合と同様結合性は消失する。N 末端 1/3 が *S. cacaoi* の場合は *S. cacaoi* の場合と同様全く結合しない。以上の結果は N 末端 1/3 が *S. fradiae* 酵素のブルーデキストラン結合性に必須で、中間の 1/3 部分はこの結合性を強化しているが、C 末端 1/3 はこの結合性を弱めていることを示している。ついで前述の 3 種のブルーデキストラン結合 β -ラクタマーゼで共通のアミノ酸を *S. cacaoi* の対応するアミノ酸に置換する、変位の領域をアミノ酸 40 位から 194 位に限定するの 2 点を考慮して部位特異的置換を行った。その結果、G65R/T66D, R51K/T52K, R56H/L57P, D95Q, P79A/I80Y, R94L/D97L, E101R, H53V, S170Q/V171L, T86I/I87L のアミノ酸置換 β -ラクタマーゼ、115K/116R の欠失及び 125L/126P の欠失 β -ラクタマーゼでは結合にほとんど影響を与えなかったが、E50Q アミノ酸置換 β -ラクタマーゼでは *S. fradiae* の酵素よりやや強く結合した。以上の結果、*S. fradiae* 由来 β -ラクタマーゼのブルーデキストラン/NADP⁺ 結合性は、特定のアミノ酸と言うよりはむしろ結合部位全体としての三次元構造によって決定されていると結論した。同様の結論は大腸菌の D-グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素でも知られている。²⁷⁾ またこの変異導入で G65R/T66D や R51K/T52K では酵素活性が上昇し、R56H/L57P と P79A/I80Y では酵素活性がほとんど消失し、82SXFK85 の酵素活性発現に必須なモチーフ近傍のアミノ酸置換が三次元的立体構造を劇的に変化させ酵素活性発現に影響を与えたものと推定された。

3-4. β -ラクタマーゼの分類と進化 β -ラクタマーゼは病原菌が産生することで注目を集めているが、同時に非病原性細菌である *Streptomyces* 属放線菌や *Bacillus* 更にはシアノバクテリア（藍藻、藍色植物）も産生することが報告されている。²⁸⁾ ただし真核細胞であるカビは β -ラクタム抗生物質を産生しているが、 β -ラクタマーゼを生産するという報告はない（ただ、*Candida* などある種のカビが β -ラクタマーゼを生産するという古い報告はあるが、これが現在言われている β -ラクタマーゼに相当するかどうかは不明であり、むしろ産生しないと考えた方が妥当である）。 β -ラクタマーゼはいくつかの点でアミノグリコシドやマクロライド抗生物質など、ほかの抗生物質の耐性に関与している酵素とは異なるように思える。例えば、化学修飾に限って言えばアミノグリコシド抗生物質ではアセチル化、リン酸化、AMP 化などいくつかの機構が耐性に関与しているが、 β -ラクタムの場合 β -ラクタマーゼと言う一つの酵素で耐性をまかなっている。ただストレプトマイシンでも生合成遺伝子のクラスター内に存在しているのはリン酸化酵素のみのものである。またアミノグリコシド抗生物質では不活性化産物であるリン酸化アミノグリコシドが生合成の中間産物として生産されるが、 β -ラクタムの場合不活性化産物であるペニシロ酸は生合成中間産物ではないし、細菌の β -ラクタム生合成遺伝子クラスターには β -ラクタマーゼの遺伝子が存在するとはいえカビの β -ラクタム生合成遺伝子の中には β -ラクタマーゼの遺伝子が存在しないことでも分かるように、 β -ラクタムの生合成に β -ラクタマーゼが関与しているという証拠はない。一方、 β -ラクタマーゼの生理的機能と関係して最近 Jacobs ら²⁹⁾ は大腸菌でのペプチドグリカンの合成と分解のバランスを取るため、細胞質で循環している前駆体のうち UDP-N-アセチルムラミルペンタペプチドとアンヒドロ-N-アセチルムラミルトリペプチドとの相対的な濃度比を感知することにより、 β -ラクタマーゼの発現が調節されているというモデルを提出した。しかし大腸菌においても β -ラクタマーゼの生理的機能は依然として不明であるし、グラム陽性菌での機能は更に明確ではない。そこで病原菌 β -ラクタマーゼとの進化上の関係を詳細に明らかにする目的で、従来の基質特異性、物理化学的性質、生化学的性質に基づく分類とは異なり、最近明らかにされつつあるヌクレオチド配列/アミノ酸配列を基に再分類することを試みた。³⁰⁾ 近隣結合法で系統樹を作成すると、Fig. 3 に示すように従来の分類とわず

か異なり β -ラクタマーゼは6群に分類された。類似の系統樹は他の方法例えば最尤法である Molphy などのプログラムでも得られた。IV群は金属タンパク質で、従来の分類ではB群に対応する。V群はOXA型の β -ラクタマーゼであり、従来の分類ではD型に対応する。Fig. 3に示した系統樹からも明らかのように、これら2群の β -ラクタマーゼはほかの群の β -ラクタマーゼとは全く異なった起源に由来すると考えられる。III群は従来の分類のC型に対応し、I、II、VI群の β -ラクタマーゼとは、Joris ら³¹⁾ が提唱する7個の β -ラクタマーゼモチーフ以外には共通のアミノ酸配列は見あたらない。またIII群の β -ラクタマーゼには、A型でI群に属し大腸菌由来のRTEM型 β -ラクタマーゼの触媒活性に関与していると考えられているアミノ酸配列SDNも見い出せない。III群の β -ラクタマーゼで特記すべき点は、グラム陰性菌で β -ラクタムを生産しその生合成遺伝子のクラスターの一部となっている *Lysobacter lactamgenus* の β -ラクタマーゼが、大腸菌など β -ラクタムを生産しないグラム陰性菌由来の β -ラクタマーゼとこの系統樹で近似の位置を占めていることである。⁷⁾ このことは後に述べるように β -ラクタマーゼの起源を考える上で極めて重要なことである。

私がここで提唱した分類の特徴は、従来の分類のA型 β -ラクタマーゼをI、II、VIの3群に細分化したことである（I群とII群は1つのグループと考えてもよいかもしれない）。特に放線菌由来の β -ラクタマーゼは、*Bacillus cereus* や *Bacillus licheniformis* などグラム陽性菌染色体に由来する β -ラクタマーゼに近似するグループと、*Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter diversus* や *Klebsiella oxytoca* などグラム陰性菌染色体に由来する β -ラクタマーゼに近似するものに分類したことである。さらに前者には前述した *Streptomyces cacaoi* などの β -ラクタマーゼが属し、後者にはブルーデキストランを結合する *S. cellulosa*, *S. fradiae* や *S. lavendulae* 由来の酵素が属することである。実際にII群の放線菌由来の β -ラクタマーゼとII群のグラム陰性菌由

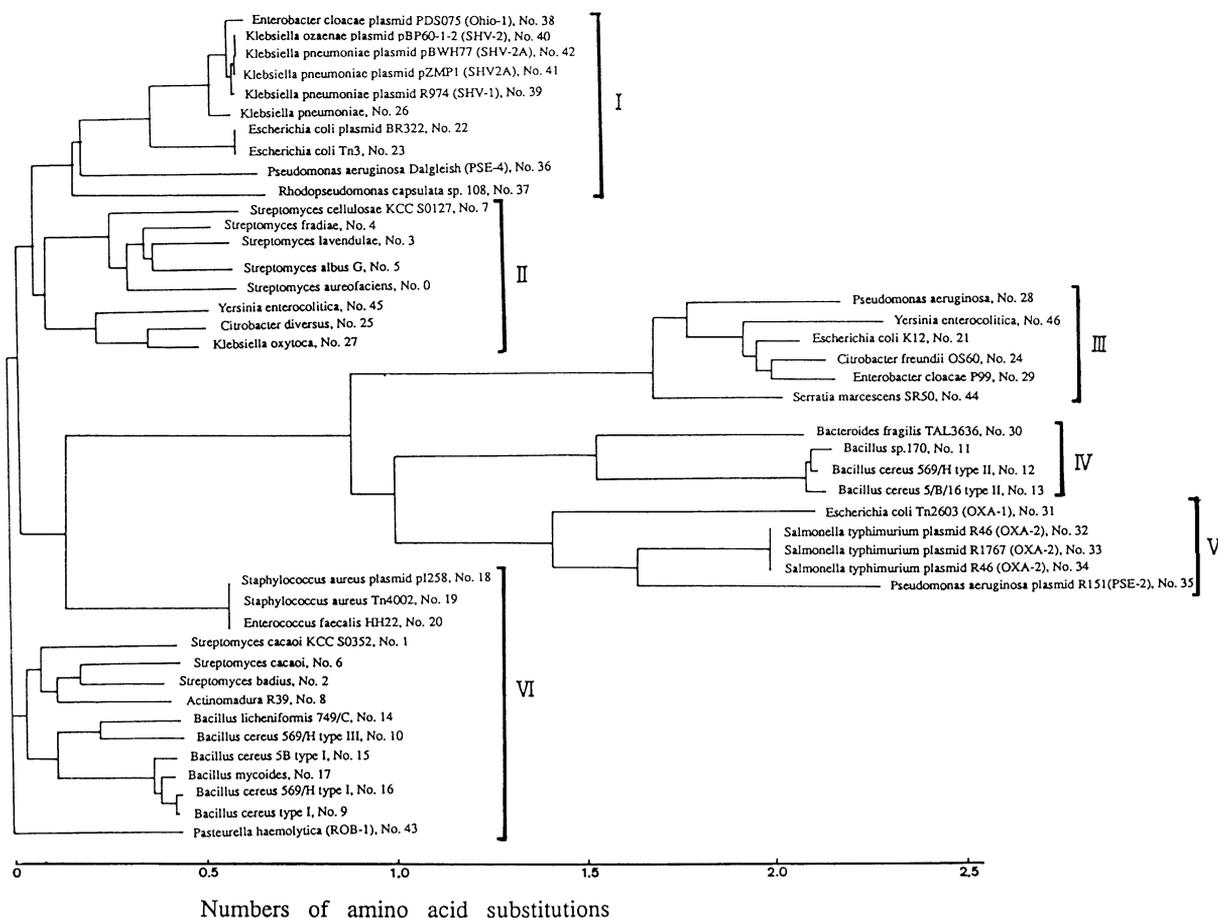


Fig. 3. Phylogenetic Tree Based on Amino Acid Sequence of 47 β -Lactamases
The tree was constructed by the neighbor-joining method.⁵³⁾

来 β -ラクタマーゼ間のアミノ酸置換数は、II 群の放線菌由来の β -ラクタマーゼと VI 群の放線菌由来 β -ラクタマーゼ間のアミノ酸置換数より少なく、放線菌同士より II 群内の β -ラクタマーゼ同士の方がアミノ酸配列として近似していることが確認された。このことは β -ラクタマーゼの進化を考える上で大変重要なことである。また後述するように現在は *Streptomyces* において β -ラクタマーゼは耐性にそれほど大きく寄与していないと思われるが、少なくともかつては β -ラクタム耐性の主要な原因を担っていたものと考えられる。このようなことを考えつつ Fig. 3 に示した系統樹から想像をたくましくして β -ラクタマーゼの進化の様子を推定すれば、次のようになるであろう。すなわち、放線菌の II 群の β -ラクタマーゼ遺伝子は *Y. enterocolitica* などグラム陰性菌に伝達されると共にグラム陰性菌のプラスミドに伝達され、現在のグラム陰性病原細菌における β -ラクタム耐性の主要な原因となり、

もう一方の VI 群の放線菌 β -ラクタマーゼ遺伝子は *B. cereus* などと共にグラム陽性菌のプラスミドに伝達されグラム陽性菌での β -ラクタム耐性の主要な原因となったとするものである。両者ともペニシリンの分解を主とするペニシリナーゼ型である特徴を有する。一方、*L. lactamgenus* のようなグラム陰性菌で β -ラクタムを生産する細菌に由来する β -ラクタマーゼは、大腸菌などグラム陰性菌に伝達されセファロスポリンを主として加水分解する一群の β -ラクタマーゼ（いわゆるセファロスポリナーゼ）を形成したと考えられる。すなわち、現在存在する β -ラクタマーゼは β -ラクタム抗生物質を生産する 2 つのグループすなわち放線菌で代表されるグラム陽性菌と *Lysobacter* で代表されるグラム陰性菌に由来し、それぞれが基質特異性の異なる一群の酵素を形成したというものである。もう一点、ROB-1 β -ラクタマーゼ (No. 43) の基質特異性やクラブラン酸による阻害は I 群のグラム陰性菌プラスミド由

来の β -ラクタマーゼと類似するが、*Pasteurella* や *Haemophilus* などのプラスミドによっても仲介されている。しかしまた *Pasteurella aerogenes* の1菌株ではその染色体によってもコードされている。これらの結果、ROB-1 β -ラクタマーゼはグラム陽性菌の β -ラクタマーゼとグラム陰性菌の β -ラクタマーゼを繋ぐリンクをなしているのではないかと想像される。このことはいくつかのアミノ酸配列の保存性からも支持される。 β -ラクタマーゼの進化を考えた場合、グラム陽性菌例えば、*B. cereus*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces cacaoi* などはアミノ酸配列の類似した複数の β -ラクタマーゼを生産していることも興味深い。以上を読むと遺伝子は勝手に動き回っているように思われるであろうが、実際そうであるという例を私どもの研究から1つ挙げてみよう。

大腸菌の β -ラクタマーゼ遺伝子をプローブにして、GenBank データベースで TFASTA プログラムを用いてアミノ酸配列の類似性をスクリーニングしてみると、硝酸還元性のグラム陰性菌である *Paracoccus denitrificans* のチトクロームオキシダーゼサブユニットIIの翻訳領域上流約50 bpのヌクレオチド配列から帰納したアミノ酸配列は、グラム陰性菌染色体由来 β -ラクタマーゼの約130個のアミノ酸配列と異常に高い相同性を示すことが判明した。³²⁾ 京大の宮田隆教授らとの共同研究で、このような事象が偶然に起こる確率は 10^{-17} 以下であることが明らかになった。しかしこの配列は約110個のアミノ酸領域に限られ、その前後では全く相同性は見られなかった。また β -ラクタマーゼの活性発現に必須なアミノ酸配列のうち一部を保持していたが、SXXKなどのモチーフは欠いていた。さらにヌクレオチド配列で比較しても β -ラクタマーゼの一部の領域のみが相同性が高くその前後では全く相同性は見られなかった。すなわち、*P. denitrificans* で見いだされた配列はグラム陰性菌 β -ラクタマーゼの配列の一部であることが明らかとなった。しかもこの配列はコドン利用率、5S rRNAに基づく菌の系統関係などの解析から *P. denitrificans* それ自身に由来するものであり、大腸菌など他の菌由来でないことも判明した。現在 *P. denitrificans* が β -ラクタマーゼを生産するかどうか不明であるが、 β -ラクタマーゼ遺伝子の断片が転座して出現したと言うこ

とはDNA断片が想像以上に転座しやすいことを示している。しかもこの場合、ヌクレオチド断片の両端には逆転繰り返し配列や繰り返し配列と言った転座の際よく見られる配列は存在しないので、現在未知の機構でも転座は容易に起こるものと考えられる。

4. 放線菌のペニシリン結合タンパク質

前述したように多くの放線菌は、 β -ラクタム耐性とは無関係に菌体外に β -ラクタマーゼを分泌する。このことは少なくとも現在において、 β -ラクタマーゼは自己耐性にほとんど関与していないことを意味している。それでは何が放線菌での β -ラクタム耐性に関与しているのであろうか？そこで β -ラクタムを生産しない *Streptomyces cacaoi* と β -ラクタムを生産する *Streptomyces olivaceus* 及び *Streptomyces clavuligerus* の3種の放線菌のペニシリン結合タンパク質 (PBP) をその当時定法になっていたフルオログラフィーを用いて検討した。その結果判明したことは、放線菌のPBPは一般に他の細菌で見られない特徴を示すということである。第一に放線菌のPBPはいずれも β -ラクタムの生産とは無関係にベンジルペニシリンに対する親和性が極めて低い。³³⁾ 最も高い *S. cacaoi* のPBP 3 (M64) でも飽和するには $10 \mu\text{g/ml}$ のベンジルペニシリンを必要とし、大腸菌などの数10倍も検出に時間が必要である。これは放線菌がグラム陽性菌であるにもかかわらず非常に高いMIC値を示すことに反映している。例えば、大腸菌では $[^{14}\text{C}]$ ベンジルペニシリンを用いた場合、1—2日の感光でPBPが検出できるが、放線菌の場合、同様の条件下で2—6ヵ月必要である。第二に β -ラクタムを生産せず β -ラクタマーゼを生産する *S. cacaoi* の場合、膜結合PBPとして分子量105000 (以下M105), M91, M64, M55, M47の少なくとも5種類の、条件によっては9種以上のタンパク質が検出できた。一方、*S. olivaceus* と *S. clavuligerus* の場合はそれぞれ2個及び5個のタンパク質しか検出できなかった。この原因として菌の生育時期による影響とか菌による可溶化の条件が異なる、いくつかのPBPは生存に必須ではないなどの可能性が考えられるが、PBPが細胞壁の伸長、隔壁の形成などに関与しているとする2個と言うのはいかにも少なすぎる。そこで一番考え得る可能性は β -ラクタムの生産がPBPの見かけ上の数に影響を与えている

というものである。β-ラクタムを生産する *S. olivaceus* や *S. clavuligerus* の方が、β-ラクタムを生産せず、β-ラクタマーゼを生産する *S. cacaoi* よりベンジルペニシリンに対して耐性が高く、前者の PBP のフルオログラフィーバンドが後者のものより薄いと言うことは上記のことを支持している。第三に *S. cacaoi* においてはメシリナムは M91 に結合するし、メチシリンは M105, M64 及び M55 に結合し、クラブラン酸は高濃度でのみ PBP 1 (M105) に結合するが、*S. olivaceus*, *S. clavuligerus* においては濃度が高くてみずれの PBP にも結合しない。第四に β-ラクタム非生産菌の PBP は互いに類似しこれはほかの細菌のものとも類似するが、β-ラクタム生産菌の PBP は互いにも全く異なる。第五に放線菌の生育時期も特に β-ラクタム生産菌の PBP パターンに大きな影響を与えている。さらに培養上清、細胞質内の PBP についてもこれら β-ラクタム生産菌と非生産菌ではその PBP の数が異なる。この β-ラクタム生産による PBP パターンの差異はこれらがいずれも同じ属に属することを考えると顕著な特徴である。例えば、*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* は異なる属であるが類似の PBP パターンを与え、*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* はまたほぼ同一のパターンを与えるからである。また PBP・ベンジルペニシリン複合体からの [¹⁴C] の遊離が一般に極めて遅いことも特徴である。その上、いずれの PBP でも完全な遊離は見られない。さらに放線菌の β-ラクタム耐性における PBP の役割を追跡するために NTG 処理によりペニシリン高度耐性株を取得した(親株のベンジルペニシリンに対する MIC=100—250 μg/ml, 変異株の MIC=1,000—4,000 μg/ml) 結果、この変異株では同時にメシリナム、セファマイシン C、メチシリンに対する MIC 値も上昇していた。この変異株の PBP パターンで2つの特異な変化が見られた。第一に PBP 1* (M130) の量が異常に増加したことである。第二にベンジルペニシリンなどの PBP 特に多くの β-ラクタムの標的と考えられる PBP 2 (M91) に対する親和性が低下したことである。³⁴⁾ 以上の結果は、放線菌の β-ラクタムに対する耐性の主要な原因は PBP の本質的な構造変化であることを更に裏付けるものである。³⁵⁾

私たちは放線菌由来主要 PBP の遺伝子をクロー

ニングし、さらに放線菌の β-ラクタム耐性における PBP の役割を詳細に検討すべく色々努力したが、PBP を短時間で検出する方法がネックになって成功しなかった。最近 Kendrick ら³⁶⁾ は孢子形成と関連して、フルオレッセインを結合したペニシリンを用い PBP を迅速に検出する方法を開発した。しかし誠に残念なことに、詳細な方法を聞く前に彼女は亡くなってしまった。

5. 放線菌の真核生物型タンパク質キナーゼ

5-1. 遺伝子のクローニング

真核生物、原核生物を問わずリン酸化はシグナル伝達系の主要な調節機構の1つである。しかし興味あることに最近まで原核生物の主要なリン酸化部位はヒスチジン/アスパラギン酸³⁷⁾ であり、真核生物ではチロシンあるいはセリン/スレオニン³⁸⁾ であると考えられてきた。一方で、ヒスチジン/アスパラギン酸系(いわゆる二成分系)のリン酸化は10年ほど前、植物などで検出され、³⁹⁾ また非真核生物型チロシンあるいはセリン/スレオニンリン酸化系は古くから原核生物でも知られていた。1991年になり Munoz-Dorado ら⁴⁰⁾ は真核生物由来タンパク質キナーゼの保存領域のヌクレオチド配列に基づいた PCR 法を用い、グラム陰性菌で特徴的な形態分化を示す *Myxococcus xanthus* より真核生物型セリン/スレオニンキナーゼ遺伝子をクローニングした。放線菌は種々の二次代謝産物を産生(生理学的/生化学的分化)すると共に、気中菌糸/孢子形成(形態学的分化)を行うことが知られている。そこで放線菌の複雑な分化過程に真核生物型タンパク質キナーゼが関与するのではないかと考え、*Myxococcus* と類似の方法でその遺伝子を *Streptomyces coelicolor* A3(2) よりクローニングすることを試みた。その結果、現在までのところ7種類の真核生物型タンパク質キナーゼ遺伝子がクローニングできた。現在、英国の Hopwood 教授を中心に *S. coelicolor* DNA の全塩基配列が決定されつつあるが、それによれば20種以上の真核生物型タンパク質キナーゼ様遺伝子の存在が確認されている。最初に7種のうち2種のタンパク質キナーゼ遺伝子 *pkaA* と *pkaB* が、6.3 kb の *Bam*HI 断片としてクローニングされた。⁴¹⁾ そのヌクレオチド配列を決定してみると、*pkaA* と *pkaB* が縦列に並びそのほかタンパク質合成の遊離因子遺伝子 (*prfB*) がこれも同じ方向に存在した

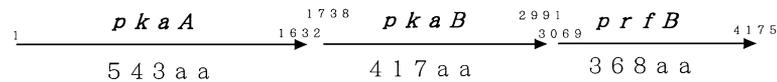


Fig. 4. The Relative Positions of the Genes, *pkaA*, *pkaB* and *prfB*

The numbers of amino acid residues are indicated below the gene and the numbers of nucleotides from 5'-end of *pkaA* are shown beside the gene. The arrows denote C-terminals of the indicated ORFs.

(Fig. 4).⁴²⁾ PkaA は 543 個のアミノ酸よりなり、PkaB は 417 個のアミノ酸よりなる。両タンパク質共に N 末端領域は真核生物型キナーゼの触媒ドメイン共通配列 I ~ XI をすべて含み、一方 C 末端側は互いに共通配列を持たずそれぞれ特有の配列を持っていた。ついでこれら遺伝子が本当にタンパク質キナーゼ活性を発現しているかどうか、大腸菌発現系を用い検討した。その結果、*pkaA* は pET3a 系では発現せず、グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現できた。IPTG で誘導すると融合タンパク質の分子量に相当する 84 kDa のバンドのみが誘導され、さらに [³²P]あるいは [³⁵S]メチオニン + [³⁵S]システインを用いて検討した結果、84 kDa のバンドのみが特異的に誘導発現した。また [³²P]で標識したバンドを抽出し 6 M HCl で加水分解してどのアミノ酸がリン酸化されるかを調べるとスレオニンが強く、セリンが弱くリン酸化されていた。以上の結果、*pkaA* 遺伝子は大腸菌で発現し自己リン酸化し、真核生物のキナーゼと異なり主としてスレオニンをリン酸化するキナーゼであることが判明した。また、*pkaA* 遺伝子の C 末端部分を削り 439 個のアミノ酸からなるタンパク質でも同様にキナーゼ活性を示した。すなわち、*pkaA* の C 末端側約 100 アミノ酸は、キナーゼ活性には関与していないことも明らかになった。一方、*pkaB* は pET3a 系で発現され、*pkaA* と同様に解析した結果、*pkaB* もキナーゼ活性を示しリン酸化されるアミノ酸はスレオニンで、セリン、チロシンはリン酸化されなかった。先程 C 末端側のアミノ酸配列はそれぞれ特有の配列を示すと述べたが、PkaA タンパク質の C 末端はプロリンとグルタミン酸に富み、真核細胞の転写因子である Sp1 がプロリンとグルタミン酸に富むことから考えて、PkaA は DNA 結合タンパク質である可能性が示唆される。なお、*pkaA*, *pkaB* と *prfB* の 3 種の遺伝子が縦列に存在するが、これら遺伝子はいずれも monocistronic に発現していた。また *pkaB* 遺伝子

の保存領域を用い他の放線菌と交雑させると調べたすべての放線菌で交雑するバンドが見られることから、ここに述べた真核生物型タンパク質キナーゼは、放線菌に幅広く分布し、何らかの生理的役割を果たしているものと思われる。ここで *prfB* について少々述べたい。原核生物の遊離因子には RF1 と RF2 の 2 つが存在し、後者は UGA と UAA コドンでの終止を触媒する。現在までに *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis* のグラム陰性菌、グラム陽性菌の両者から RF2 の遺伝子がクローニングされているが、いずれも途中で未熟な UGA 終止コドンを含み、この位置で終止することなしに +1 の frameshift を起こし、RF1 特異的終止コドンである UAG まで読み進み、ここで終止し、RF2 の合成を完成する。さらに +1 の frameshift を起こすのに必要な Shine-Dalgarno 様配列⁴³⁾と homopolymeric 配列⁴⁴⁾が存在するが、放線菌ではこのような途中の終止コドンは無いし、+1 frameshift や Shine-Dalgarno 様配列も存在しない。さらに放線菌の RF2 の終止コドンは RF1 も RF2 も触媒する UAA コドンである。⁴²⁾ 同じグラム陽性菌である *B. subtilis* でも大腸菌と同様なことが見られるので、放線菌でどうしてこのような現象が見られるか不思議である。

ついで *pkaB* のキナーゼドメイン VI, VII, VIII を含む 165bp の PCR 反応生成物をプローブにして *S. coelicolor* 染色体 DNA と交雑することにより、sch1, sch2-1, sch2-2, sch3, sch4, sch5, sch6 の 7 種の 1.8 kb から 9.4 kb の DNA 断片をクローニングした。ついでこれら断片をプローブにコード領域の DNA 断片をクローニングし、ヌクレオチド配列を決定した。その結果、sch1 は 510 個のアミノ酸からなる PkaE を、sch3 は 667 個のアミノ酸からなる PkaF を、sch4 は 592 個のアミノ酸からなる PkaG を、sch5 は 598 個のアミノ酸からなる PkaD を、sch6 は 745 個のアミノ酸からなる PkaC をコードしていることが明らかになった。また Sch2-1 は堀之内らが既にクローニングしている AfsK で

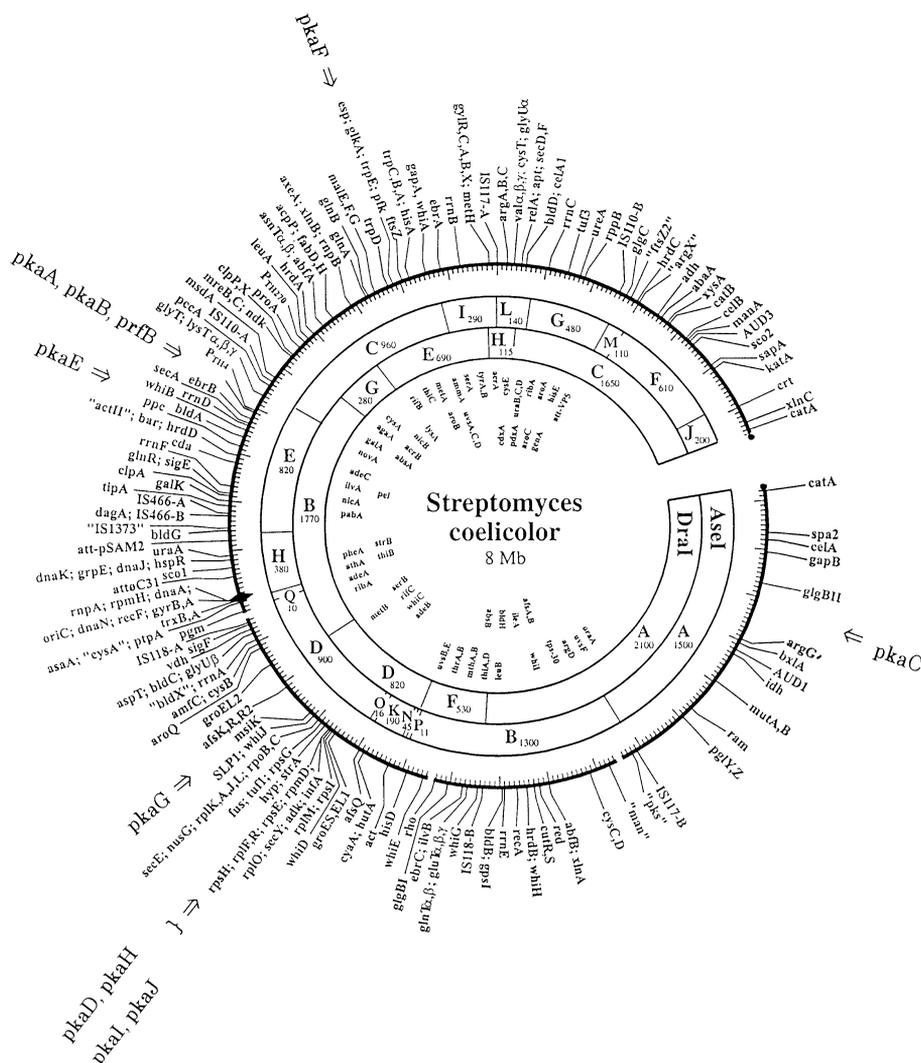


Fig. 6. Approximate Positions of Eukaryotic-Type Protein Kinase-Like Genes on the Chromosome of *S. coelicolor* A3(2) The map was constructed by a slight modification of Fig. 20.1 of the reference.⁵⁹⁾

えていることが明らかとなった。しかし20種以上の真核生物型タンパク質キナーゼがどのような順序でシグナルを伝達し、放線菌における分化過程にどのように影響を与えているかは今後に残された問題である。

5-2. 分類と進化 ここ数年20種近くの微生物の全塩基配列が決定され、新たに続々と全塩基配列が決定されつつあると同時に、ヒトのゲノムの塩基配列も今年中にはほとんど解明されようとしている。このような状況になってみると、これまで述べてきたいわゆる真核生物型タンパク質キナーゼがどの範囲の原核生物に分布し、そのキナーゼ同士でどのような進化上の関係があるか興味を持たれる。そこで各種細菌でどのように真核生物型タンパク質キナーゼが分布しているかを2成分系の分布と対比し

て調べてみた。⁴⁸⁾ その結果を Table 5 に示す。この表から明らかなように、真核生物型キナーゼは原核生物で偏在していることが際だった特徴である。例えば、proteobacteria で言えば、*E. coli* や *H. influenzae* では検出できないのに対して、特異な分化をする *M. xanthus* では6種以上存在している。またグラム陽性菌では胞子を形成する *B. subtilis* でも2種しか検出されていないにもかかわらず、*M. tuberculosis* や *S. coelicolor* では10種以上見出されている。さらに、真核生物に近いとされる archaea bacteria では *P. horikoshii* で1種検出されているが他の種では全く検出されていない。これに反して、従来原核生物で知られてきた2成分系のヒスチジン/アスパラギン酸キナーゼ系は *P. horikoshii* で1種しか検出されないと言う例外を除いて、いず

Table 5. Distribution of Protein Kinases in Bacteria

Category	Species	Genome size (bp)	Number of eukaryotic-type protein kinase	Number of two component system
Proteobacteria	<i>E. coli</i>	4,639,221	0	30
	<i>H. influenzae</i>	1,830,135	0	4
	<i>H. pylori</i>	1,667,867	1	4
	<i>M. xanthus</i>	—	>6	—
Gram-positive bacteria	<i>B. subtilis</i>	4,214,814	2	36
	<i>M. genitalium</i>	580,073	1	—
	<i>M. pneumoniae</i>	816,394	1	—
	<i>M. tuberculosis</i>	4,411,529	11	14
	<i>S. coelicolor</i>	—	>20	—
Chlamydia	<i>C. trachomatis</i>	1,042,519	2	—
Spirochete	<i>B. burgdorferi</i>	910,724	0	4
	<i>T. pallidum</i>	1,138,011	0	3
Rickettsia	<i>R. prowazekii</i>	1,111,523	0	4
O ₂ -reducing bacteria	<i>A. aeolicus</i>	1,551,335	1	4
Cyanobacteria	<i>Synechocystis</i> sp.	3,573,470	8	32
Archaea	<i>M. jannaschii</i>	1,664,987	0	—
	<i>M. thermoautotrophicum</i>	1,751,377	0	15
	<i>A. fulgidus</i>	2,178,400	0	24
	<i>P. horikoshii</i>	1,738,505	1	1

れも数種検出されている。⁴⁹⁾ これはどうしてなのだろうか？ 5種以上検出されている種を見るときも極めて特徴的な分化を示すという特性を持っていることが分かる。例えば、*M. xanthus* は胞子の詰まった果実体を形成し、滑るように固体表面を移動する。*M. tuberculosis* と *M. leprae* (5種以上の真核生物型タンパク質キナーゼを有している) はいずれも極めてゆっくりとしか生育しないし、ある条件下では未発達な菌体を形成する。また *S. coelicolor* は気中菌糸や胞子を形成すると共に抗生物質などの二次代謝産物を生産する。さらに *Synechocystis* sp. は藍藻で、真核生物の葉緑体の起源と考えられているチラコイドを形成する。したがって、真核生物型タンパク質キナーゼは進化の過程で、これら特殊な種のみで保存されてきたと考えられる。そこで次に保存領域のアミノ酸配列に基づく系統樹を近隣結合法 (Clustal W) で作成し、その類似性を比較、検討した (Fig. 7)。その結果、Zhang⁵⁰⁾ が言うようにある種からのキナーゼは1つのクラスターの一部になるが、必ずしもそうではないことが判明した。例えば、*C. trachomatis* からの CTPknD と CTPkn5 は異なる枝に属し、*M. tuberculosis* のキナーゼ遺伝子は色々な枝に分散してい

る。しかも分岐後置換頻度がいずれもかなり高い。言うことは、それぞれのキナーゼは分岐後高い頻度でアミノ酸を置換したことを示している。この点は Rdf2 プログラム⁵¹⁾ 及び PROTDIST プログラム⁵²⁾ で解析することにより確認された。すなわち、キナーゼ反応に必要な主要なアミノ酸は保存されているが、1菌種からのキナーゼであっても原核生物の真核生物型タンパク質キナーゼはある場合には互いに遠い距離でしか関係していないことが判明した。さらに真核生物由来の遺伝子も原核生物由来の遺伝子と系統樹上区別できないほど類似していることも明らかとなった。同様な系統樹はほかの方法すなわち Oden (近隣結合法),⁵³⁾ Molphy (最尤法),⁵⁴⁾ Phylip (最大節約法)⁵²⁾ でも得られ、上記のことが確認された。

次にこれらキナーゼ遺伝子の G+C 含量を由来種の遺伝子の平均 G+C 含量と比較すると、2, 3 の例外を除いていずれも由来種の遺伝子の G+C 含量に近いことが判明した (Table 6)。このことは、キナーゼ遺伝子のコドン利用性が保持されており、ほかの遺伝子に近いことを示している。これらの結果、真核生物型のタンパク質キナーゼは、真核生物が原核生物から分離する以前から原核生物に存在

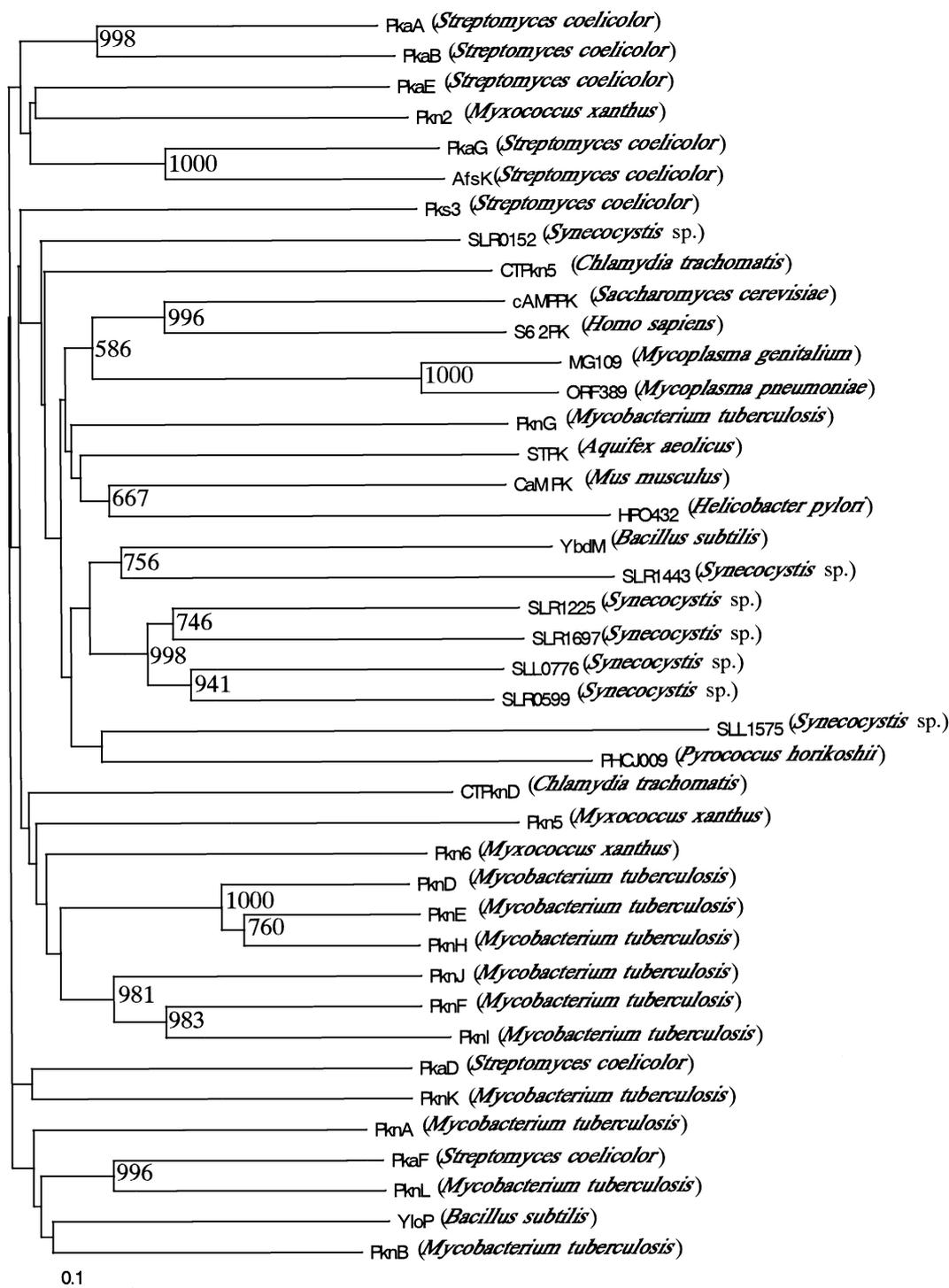


Fig. 7. Phylogenetic Tree Constructed on the Basis of Amino Acid Sequences of the Conserved Subdomains I-XI in 41 Eukaryotic-Type Protein Kinases Using a Neighbor-Joining Method, Clustal W⁵⁸⁾

The numbers at the branch points are bootstrap probabilities. The scale-bar indicates 0.1 substitutions per site. The figure is cited from the reference.⁴⁸⁾

し、多くの原核生物ではその生存に必要でなかったために進化の過程で消失し、いくつかの細菌ではその必要性から保持してきたことを強く示唆している。またコドン利用性から判断して、*S. coelicolor* 由来の Pks3 や *Synechocystis* の SLL0776 は例外で

あり、近年、水平伝達によりほかの種から伝達されたことを窺わせる結果である。

6. おわりに

以上、抗生物質をはじめとする多くの生理活性物質を生産することで知られる放線菌において、 β -

Table 6. Guanine+Cytosine Mole Percentage of Various Species and Protein Kinases

Species	Protein kinase	G+C% in coding region	
<i>S. coelicolor</i>		71.67	
	PkaA	75.51	
	PkaB	77.54	
	PkaD	74.81	
	PkaE	75.36	
	PkaF	73.26	
	PkaG	77.21	
	AfsK	76.31	
	Pks3	65.31	
<i>M. xanthus</i>		68.58	
	Pkn2	71.45	
	Pkn5	67.75	
	Pkn6	68.17	
<i>S. cerevisiae</i>		39.73	
	cAMPPK	40.96	
<i>M. musculus</i>		52.76	
	CaM_PK	51.31	
<i>H. sapiens</i>		52.85	
	S6_2PK	57.14	
<i>H. pylori</i>		39.65	
	HPO432	33.91	
<i>B. subtilis</i>		44.32	
	YloP	44.24	
	YbdM	41.93	
<i>M. genitalium</i>		31.74	
<i>M. pneumoniae</i>	MG109	32.61	
		41.03	
<i>M. tuberculosis</i>	ORF389	40.79	
		65.81	
	PknA	67.75	
	PknB	63.31	
	PknD	65.31	
	PknE	65.72	
	PknF	67.58	
	PknG	66.13	
	PknH	66.93	
	PknI	67.35	
	PknJ	65.68	
	PknK	67.93	
	PknL	65.16	
	<i>C. trachomatis</i>		41.55
		CTPkn5	42.99
		CTPknD	40.22
<i>A. aeolicus</i>		43.58	
	STPK	44.83	
<i>Synechocystis</i> sp.		48.66	
	SLL1575	49.76	
	SLR1225	49.29	
	SLR1443	50.98	
	SLR1697	50.64	
	SLR0152	49.34	
	SLL0776	39.61	
	SLR0599	54.45	
		42.31	
		45.81	
<i>P. horikosii</i>	PHCJ009	45.81	

ラクタムに対する自己耐性に関与している β -ラクタマーゼとペニシリン結合タンパク質の生化学と遺伝子発現機構並びに病原菌において猛威を振るうこれらタンパク質との関係と、二次代謝産物生合成の遺伝子発現の調節に関与している真核生物型タンパク質キナーゼとを、分解と合成という観点から対比して研究してきた結果の一端を述べた。 β -ラクタム関連の研究については一応の結論が得られたと思うが、真核生物型タンパク質キナーゼの研究はこれからプロテオーム解析などを十分に使いこなしてシグナル伝達機構の全容を解明しなければならない。しかし、真核生物でもそうであるが、これらキナーゼは一般に複雑に絡み合っており、1つを不活性化してもほかのキナーゼが相補する可能性が高く、問題を複雑にしている。いずれにしても、近い将来シグナル伝達機構の全貌が明らかになることを期待したい。

本論文は、私が25年間明治薬科大学薬学部生化学教室において研究した成果を纏めたものである。この間のもう1つの大きな研究テーマとして、制癌剤をはじめとする新規生理活性物質の単離とその生化学的研究がある。そのうち特にタンパク質チロシンキナーゼの特異的阻害物質としてのゲニステインの発見^{55,56}とAIDS治療薬剤としての一連の物質⁵⁷は重要なものと位置づけているが、これらについてはここではふれなかった。現在の真核生物における種々のシグナル伝達系の華々しい展開を見、私どものゲニステインに関する論文の引用を見るにつけて、試薬としてのゲニステインが多少ともこのシグナル伝達系の解明に貢献できたのではないかと自負している。またAIDS治療薬剤の開発はヒューマンサイエンス振興財団のプロジェクトの一環として行ったものであるが、実用にはならなかったとはいえ財団から特に選ばれてSCID-Huマウスの実験を行っていただいた。有効な抗AIDS薬の開発を一日も早く見たいものである。

謝辞 ここで述べた研究を行うに当たっては多くの共同研究者の協力なしには出来なかった。これらの方々の氏名は引用文献の著者以外にも多数ある。名前を挙げて感謝の意を表したい。片山(西崎)博子、嶋田(三好)佐知子、蓮見(清水)弥生、東恭一郎の各氏にはスタッフとして主にスクリーニング

で活躍していただいた。また中野路子（現オクラホマ大）、秋山徹（現東大分生研教授）両博士には助手あるいは講師として教室の初期の基盤整備に多大な努力を払っていただいた。私がここまで研究を推進できたのも両氏に負うところが多い。また、抗生物質研究の手ほどきから始まり終始御指導、御支援下さった梅沢濱夫先生、予研、明治薬科大学での研究の機会を与えて下さった水野伝一先生、鈴木友二先生に衷心より感謝申し上げます。

これらの研究は文部省科学研究費のほか内藤記念科学振興財団、鈴木謙三研究財団、日本私学振興財団、Wacksman 財団をはじめとする多数の団体からの御援助を戴き行われたものである。ここに記して感謝申し上げます。また研究費を戴く際の方々の御支援にも、心より感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Umezawa H., Mitsunashi S., Hamada M., Iyobe S., Takahashi S., Utahara R., Osato Y., Yamazaki S., Ogawara H., Maeda K., *J. Antibiotics*, **26**, 51–54 (1973).
- 2) Nagarajan R., In “*Cephalosporins and Penicillins*,” ed. by Flynn E. H., Academic Press Inc., New York, 1972, pp. 636–661.
- 3) Ogawara H., Umezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 481–489 (1973); Ogawara H., *Tanpakushitsu Kakusan Kouso*, **20**, 1214–1227 (1975). Ogawara H., *Methods Enzymol.*, **46**, 531–537 (1976); Ogawara H., Shimada S., *Tanpakushitsu Kakusan Kouso*, **22**, 185–189 (1980).
- 4) Ogawara H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 402–408 (1975).
- 5) Ogawara H., Horikawa S., Shimada-Miyoshi S., Yasuzawa K., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **13**, 865–870 (1978).
- 6) Ogawara H., Kawamura N., Kudo T., Suzuki K., Nakase T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 3014–3017 (1999).
- 7) Ogawara H., In “*Bioscience and Actinomycetes*,” ed. by Society for Actinomycetes Japan, Igaku Syuppan Center, Tokyo, 1994, pp. 132–143.
- 8) Ogawara H., *The Actinomycetologist*, **41**, 22–25 (1982).
- 9) Ogawara H., Mantoku A., Shimada S., *J. Biol. Chem.*, **256**, 2649–2655 (1981).
- 10) Ogawara H., Horikawa S., *J. Antibiotics*, **32**, 1328–1335 (1979).
- 11) Thompson S. T., Cass K. H., Stellwagen E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 669–672 (1975).
- 12) Matsubara – Nakano M., Kataoka Y., Ogawara H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 124–128 (1980).
- 13) Lenzini M. V., Nojima S., Dusart J., Ogawara H., Dehottay P., Frere J. M., Ghuysen J. M., *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 2915–2920 (1987).
- 14) Lenzini M. V., Ishihara H., Dusart J., Ogawara H., Joris B., Beeumen J. V., Frere J. M., Ghuysen J. M., *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**, 371–376 (1988).
- 15) Urabe H., Lenzini M. V., Mukaide M., Dusart J., Nakano M. M., Ghuysen J.-M., Ogawara H., *J. Bacteriol.*, **172**, 6427–6434 (1990).
- 16) Urabe H., Ogawara H., *J. Bacteriol.*, **174**, 2834–2842 (1992).
- 17) Bibb M. J., Findlay P. R., Johnson M. W., *Gene*, **30**, 157–166 (1984).
- 18) Urabe H., Ogawara H., *Actinomycetologica*, **7**, 65–67 (1993).
- 19) Urabe H., Ogawara H., *Actinomycetologica*, **10**, 50–53 (1996).
- 20) Goethals K., van Montagu M., Holsters M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 1646–1650 (1992).
- 21) Ogawara H., *Actinomycetologica*, **10**, 104–111 (1996); Ogawara H., *Pharmacia*, **33**, 150–154 (1997).
- 22) Urabe H., Toyama K., Ogawara H., *J. Antibiotics*, **43**, 1483–1488 (1990).
- 23) Ogawara H., *Gene*, **124**, 111–114 (1993).
- 24) Sendouda A., Urabe H., Ogawara H., *FEMS Microb. Lett.*, **112**, 343–348 (1993).
- 25) Kurai S., Urabe H., Ogawara H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 260–263 (1995).
- 26) Ogawara H., Katashiro Y., Higashi K., Urabe H., *Actinomycetologica*, **13**, 82–88 (1999).
- 27) Branlant G., Branlant C., *Eur. J. Biochem.*, **150**, 61–66 (1985).
- 28) Kushner D. J., Brevil C., *Arch. Microbiol.*, **112**, 219–223 (1977).
- 29) Jacobs C., Frere J.-M., Normark S., *Cell*, **88**, 823–832 (1997); Jacobs C., *Science*, **278**, 1731–1732 (1997).

- 30) Ogawara H., *Mol. Phylogenetics Evol.*, **2**, 97–111 (1993).
- 31) Joris B., Ghuysen J.-M., Dive G., Renard A., Dideberg O., Charlier P., Frere J.-M., Kelly J. A., Boyington J. C., Moews P. C., Knox J. R., *Biochem. J.*, **250**, 313–324 (1987).
- 32) Ogawara H., Kuma K., Miyata T., *Microbiol. Immunol.*, **37**, 399–403 (1993).
- 33) Ogawara H., Horikawa S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 1–7 (1980).
- 34) Ogawara H., Horikawa S., *J. Antibiotics*, **33**, 620–624 (1980); Horikawa S., Nakazawa H., Ogawara H., *J. Antibiotics*, **33**, 1363–1368 (1980); Nakazawa H., Horikawa S., Ogawara H., *J. Antibiotics*, **34**, 1070–1072 (1981).
- 35) Ogawara H., *Microbiol. Reviews*, **45**, 591–619 (1981).
- 36) Hao J., Kendrick K. E., *J. Bacteriol.*, **180**, 2125–2132 (1998); Hao J., Kendrick K. E., *J. Bacteriol.*, **182**, 5521–5529 (2000).
- 37) Parkinson J. S., Kofoed E., *Annu. Rev. Genet.*, **26**, 71–112 (1972).
- 38) Hunter T., Cooper J. A., *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 897–930 (1985); Hanks S. K., Quinn M., Hunter T., *Science*, **241**, 42–52 (1988).
- 39) Koshland Jr. D. E., *Science*, **262**, 532 (1993).
- 40) Munoz-Dorado J., Inouye S., Inouye M., *Cell*, **67**, 995–1006 (1991).
- 41) Urabe H., Ogawara H., *Gene*, **153**, 99–104 (1995).
- 42) Ogawara H., Urabe H., Ohtaki R., Nakamura Y., *J. Bacteriol.*, **177**, 5342–5345 (1995).
- 43) Curran J. F., Yanus M., *J. Mol. Biol.*, **203**, 75–83 (1988).
- 44) Atkins J. F., Weiss R. B., Gesteland R. F., *Cell*, **62**, 413–423 (1990).
- 45) Horinouchi S., *Actinomycetologica*, **7**, 68–87 (1993).
- 46) Ogawara H., GenBank Accession Number AB019513.
- 47) Urabe H., Bibb M., Ogawara H., submitted.
- 48) Ogawara H., Aoyagi N., Watanabe M., Urabe H., *Microbiology*, **145**, 3343–3352 (1999).
- 49) Ogawara H., *Actinomycetologica*, **13**, 1–8 (1999).
- 50) Zhang C. C., *Mol. Microbiol.*, **20**, 9–15 (1996).
- 51) Pearson W. R., Lipman D. J., *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **85**, 2444–2448 (1988).
- 52) Felsenstein J., Phylip, Version 3.5c, University of Washington, U.S.A., 1995.
- 53) Ina Y., DDBJ, National Institute of Genetics, 1991.
- 54) Adachi J., Hasegawa M., Computer Science Monographs No. 27, Institute of Statistical Mathematics, Tokyo, 1992.
- 55) Ogawara H., Akiyama T., Ishida J., Watanabe S., Suzuki K., *J. Antibiotics*, **39**, 606–608 (1986).
- 56) Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y., *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592–5595 (1987); Akiyama T., Ogawara H., *Methods Enzymol.*, **201**, 362–370 (1991); Akiyama T., Ogawara H., In “*Protein Phosphorylation*,” ed. by Sefton B. M., Hunter T., Academic Press Inc., New York, 1998, pp. 553–561.
- 57) Nakashima H., Ichiyama K., Hirayama F., Uchino K., Ito M., Saitoh T., Ueki M., Yamamoto N., Ogawara H., *Antiviral Research*, **30**, 95–108 (1996); Ueki M., Watanabe S., Ishii Y., Okunaka S., Uchino K., Saitoh T., Higashi K., Yamamoto N., Nakashima H., Ogawara H., submitted; Ueki M., Watanabe S., Saitoh T., Yamamoto N., Nakashima H., Ogawara H., submitted.
- 58) Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680 (1994).
- 59) Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A., In “*Practical Streptomyces Genetics*,” The John Innes Foundation, Norwich, 2000.