

トランスグリコシダーゼとペニシリン感受性のトランスペプチダーゼの両活性をにう。これら比較的高分子量(9万~6万)のPBPが細菌の増殖と形態の決定に必須であるのに対して、比較的低分子量(5万~4万)のPBP 4, 5, 6は増殖に必須ではないらしい。

β -ラクタム抗生物質の阻害機構については、基質類似体仮説が提唱されている。すなわち、ペニシリンは、ペプチドグリカン合成における前駆体のペンタペプチド側鎖の末端D-アラニル-D-アラニンの構造類似体であるというものである。そして、ペニシリンを分解する β -ラクタマーゼはペニシリン感受性の酵素から進化したものであると考えられている。大腸菌のPBPでは、1A, 1B, 2, 3, 5で、全アミノ酸配列が決定され、活性中心のセリン残基が同定された。このセリン残基の3残基カルボキシル側にはリジン残基が共通して認められ、数種類の β -ラクタマーゼ、*Bacillus*属のD-アラニンカルボキシペプチダーゼと共に、Ser-Xaa-Xaa-Lysは保存された配列であることが分かった。¹⁾この活性中心のセリンは、ペニシリンが関係する酵素で共通にアシル化される残基である。

最近、 β -ラクタマーゼとペニシリン感受性DD-ペプチダーゼの結晶構造が相次いで発表された。それらのうち、*Staphylococcus aureus*の β -ラクタマーゼ²⁾のものが最も詳細な解析が行われている。それによれば、 β -ラクタマーゼの構造は β -シート・ドメインと α -ヘリックス・ドメインからなり、活性中心はこの2つのドメインに挟まれる“くぼみ”に存在する。触媒残基のSer 70は“くぼみ”の底に位置し、塩橋を形成しているLys 73とGlu 166と共にこの底で三つ組の触媒中心を形成する。そして、 β -ラクタマーゼのペニシリンを分解する反応機構は、セリンプロテアーゼと類似のものであろうとするモデルが提出された。 β -ラクタマーゼの立体構造が明らかになったことにより、今後 β -ラクタム剤についてのドラッグ・デザインが急速に進むものと期待される。

大腸菌のPBPでは、1B³⁾と5で結晶解析が進行中であり、2⁴⁾と3⁵⁾では遺伝子操作により、疎水性の高い、タンパク質の膜結合に必須の部分を欠失させ、水溶性の型に変換したPBPの結晶化が試みられている。これらPBPの立体構造の解明が待たれるが、一方PBPのより複雑と思われるトランスペプチダーゼ、ならびにカルボキシペプチダーゼの反応機構も、 β -ラクタマーゼでの解析を基礎に今後明らかにされていく

であろう。

- 1) Asoh, S. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, 160, 231(1986).
- 2) Herzberg, O., Moulton, J.: *Science*, 236, 694(1987).
- 3) Matsushashi, M. *et al.*: *Abstr. of the ASM Conference on Antibiotic Inhibition of Bacterial Cell Surface Assembly and Function*, p. 13(1987).
- 4) Matsuzawa, H. *et al.*: *Abstr. of the ASM Conference on Antibiotic Inhibition of Bacterial Cell Surface Assembly and Function*, p. 22(1987).
- 5) Bartholome-De Belder, J. *et al.*: *Abstr. of the ASM Conference on Antibiotic Inhibition of Bacterial Cell Surface Assembly and Function*, p. 23(1987)

(東大・農・農化 松沢 洋)

パルスフィールドゲル電気泳動による 染色体構造解析の新展開

Schwartz と Cantor¹⁾によって開発された巨大DNA分子を分離するパルスフィールドゲル電気泳動法(PFG)の応用によって染色体の構造解析が新しい局面を迎えている。通常の電気泳動では20 kb程度までのDNA断片しか分離できなかったが、PFGでは9 MbまでのDNA断片を扱えるようになった。電場の方向を一定の時間間隔で変化させると、DNA分子がゲル中で新しい電場の方向に方向転換するのに要する時間はDNA分子の大きさに関係する。このことを利用して巨大DNAを分離するのがPFGである。新しい実験手法の開発はわれわれに新しい世界を見せてくれるものである。大腸菌染色体DNAのNot Iによる切断では20 kbから1 Mbの22断片が得られ、その制限酵素地図が作成され、遺伝子地図との対応がつけられた。²⁾F因子中には1カ所のNot I切断部位が存在することや、ある大腸菌株では*rrnD*と*rrnE*間が逆位していることが確かめられた。染色体の構造変化を物理的に確認することが容易になったわけである。

一方、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*では16本の染色体DNAが、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*では3本の染色体DNAが分離、検出されており、遺伝学的に確認されている染色体との対応がつけられている。^{3,4)}さらに、染色体のNot I制限酵素地図も両酵母で完成されつつある。まずはクローン化遺伝子のマッピングに役立つと思われる。染色体DNAのPFGパターンによる「核型分析」も可能であり、⁵⁾適当な制限酵素を組み合わせることにより株レベルで

の同定にも応用できそうである。

放線菌 *Streptomyces* 属の抗生物質生産にはプラスミドが関与しているという遺伝学的証拠が得られていたが、通常の電気泳動法ではそのプラスミドを検出することができていなかった。しかし、Kinashi ら⁶⁾による PFG 解析で 520 kb の線状プラスミド pKSL が *S. lasaliensis* の抗生物質生産に関与していることが示された。他の *Streptomyces* 属でも巨大線状プラスミドが検出されており、放線菌の抗生物質生産に関する遺伝子解析が急速に進むものと思われる。

最近、テロメアを利用した人工染色体ベクターが開発され、*S. cerevisiae* を宿主として 400 kb までのヒト DNA 断片を一挙にクローニングすることが可能になった。⁷⁾ この解析には PFG はなくてはならない解析手段となっている。遺伝子サイズの大きい高等真核生物の遺伝子の構造解析にも PFG は威力を発揮し、興味深い知見を与えてくれそうである。お楽しみはこれからだ。

- 1) Schwartz, D. C., Cantor, C. R.: *Cell*, 37, 67 (1984).
- 2) Smith, C. L. et al.: *Science*, 236, 1448(1987).
- 3) Carle, G. F. et al.: *Science*, 232, 65(1986).
- 4) Smith, C. L. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 15, 4481(1987).
- 5) Jonge, P. D. et al.: *Yeast*, 2, 193(1986).
- 6) Kinashi, H. et al.: *Nature*, 328, 454(1987).
- 7) Burke, D. T. et al.: *Science*, 236, 806(1987).

(財・発酵研 金子嘉信)

放線菌の遺伝子発現の多様性

遺伝子の発現は、RNA ポリメラーゼがプロモーター配列を認識し、転写することによって始まる。大腸菌では、プロモーター領域におけるコンセンサス配列が知られ、転写の様式は比較的単純である。これに対し放線菌は大腸菌と同じ原核生物でありながら、転写の様式が複雑であることが最近の研究で明らかとなってきた。

放線菌 (*Streptomyces*) の宿主・ベクター系の開発によって種々の抗生物質耐性遺伝子、酵素の生産に関与する遺伝子あるいは抗生物質合成に関与する遺伝子(群)がクローン化され、構造遺伝子領域だけでなくプロモーター領域の塩基配列も明らかにされている。^{1,2)} これらの配列を大腸菌の-35領域、-10領域のコンセ

ンサス配列と比較してみると、-35領域、-10領域共に類似しているもの、どちらか一方の領域のみが類似しているもの、類似性が全くみられないものなど多様性に富んでいる。また、1つの遺伝子が2つ以上のプロモーター領域を持つ場合が多いことも放線菌遺伝子の特徴であり、たとえばアガラーゼの遺伝子 (*dagA*)³⁾ は4つのプロモーター領域を有している。これらのことは、放線菌遺伝子の発現のためには多様なプロモーター領域に対応して、それらを認識し転写する RNA ポリメラーゼにも多様性が必要なことを示唆している。

さて、放線菌の遺伝子操作に汎用されているベクタープラスミドに pIJ 702⁴⁾ がある。このプラスミドにはチオストレプトン耐性遺伝子とチロシナーゼ遺伝子 (*mel*) が選択マーカーとして組み込まれている。とくに *mel* は、メラニン色素産生によってその発現を肉眼的に容易に識別できるため、遺伝子内にある3カ所の挿入失活部位を利用した組み換え体の取得がよく行われている。しかしながらこの *mel* は、すべての放線菌で発現するわけではない。*Streptomyces clavuligerus*, *S. kasugaensis*, *S. jumonjinensis* などの菌株においては *mel* が発現されずメラニンの産生が認められない。馬目ら⁵⁾ はこの現象がプロモーター領域の差によるものであることを示した。すなわち *S. jumonjinensis* は、*mel* 本来のプロモーター領域を認識する機能を持ってはいない。しかし他の *Streptomyces* 由来の DNA 断片を *mel* の上流に挿入すると、その中にははっきりとしたメラニンの産生を引き起こすものが認められた(11種14株から調製した DNA 試料のすべてからこのような DNA 断片が分離された)。これらの DNA 断片は、解析の結果、プロモーター活性を有すると考えられた。つまり、*S. jumonjinensis* の RNA ポリメラーゼは、*mel* 本来のプロモーターからは転写できないが、他のプロモーターからは転写できるわけである。これらの DNA 断片の塩基配列を *mel* と比較したところ、リボソーム結合部位の配列は *mel* と同じであったが、その上流域の配列は全く異なっていた。これらの結果は、放線菌のプロモーター領域は多様であり、その認識と転写開始のためには異なる RNA ポリメラーゼの必要なことをはっきりと示唆するものである。

Westpheling ら⁶⁾ は *S. coelicolor* の RNA ポリメラーゼには多様性があり、それらはシグマ因子の差によ