

***Thermus thermophilus* におけるリジン生合成酵素**

遺伝子の発現調節機構に関する研究

**Analysis of transcriptional and translational regulation of lysine
biosynthesis in *Thermus thermophilus***

東京大学大学院生命科学研究科 応用生命工学専攻

Graduate School of Agriculture and Life Science

Department of Biotechnology

The University of Tokyo

平成 13 年度入学 坪内 泰志

Taishi Tsubouchi

担当指導教員 西山 真

Makoto Nishiyama

目次

序章	1
§ 0-1. α -aminoadipate を経由するリジン生合成の発見	1
§ 0-2. 生体内分子生合成経路における流量調節機構	8
§ 0-3. 遺伝子の発現制御機構	13
§ 0-4. 本研究の目的と本論文の構成	18
§ 0-5. References	19
第 1 章 <i>T. thermophilus</i> HB27 株のリジン生合成酵素遺伝子クラスター (Lys クラスター) の転写解析	22
§ 1-1. Introduction	22
§ 1-2. Materials and Methods	24
§ 1-3. Results	35
§ 1-4. Discussion	45
§ 1-5. References	50
第 2 章 <i>Thermus</i> リジン生合成酵素遺伝子にみられる leader peptide を介した 発現調節機構	52
§ 2-1. Introduction	52
§ 2-2. Materials and Methods	54
§ 2-3. Results	58
§ 2-4. Discussion	65
§ 2-5. References	71

第3章	Lysクラスター以外の領域にコードされているリジン生合成酵素遺伝子の発現調節機構	72
§ 3-1.	Introduction	72
§ 3-2.	Materials and Methods	74
§ 3-3.	Results	78
§ 3-4.	Discussion	81
§ 3-5.	References	83
第4章	<i>T. thermophilus</i> HB27 株の転写因子、 <i>argR</i> 遺伝子のクローニング	84
§ 4-1.	Introduction	84
§ 4-2.	Materials and Methods	87
§ 4-3.	Results	90
§ 4-4.	Discussion	94
§ 4-5.	References	96
第5章	総括	98
§ 5-1.	生物進化における発現制御機構	98
§ 5-2.	推定される <i>T. thermophilus</i> のリジン生合成遺伝子発現調節機構	99
§ 5-3.	References	101
謝辞		102
論文要旨		103

序章

§ 0-1. α -aminoadipate を経由するリジン生合成の発見

イソロイシンやリジンには、幾つかの異なる経路が存在するという、非常に興味深い知見がある。何故、生物は同一化合物を合成するために独立した生合成経路を形成してきたのかを明らかにすることは、生物の初期進化を考察していくうえで非常に重要である。

当研究室では、高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* は、一般に知られているリジン生合成経路を有しておらず、特殊な経路で必須アミノ酸であるリジンを生合成していることを示してきた。本菌のリジン生合成経路を解明していくことは、アミノ酸生合成関連酵素の代謝機構や酵素遺伝子の発現調節機構を解明する基盤研究であると同時に、生物の初期進化を解明する端緒にも繋がる有意義な研究であると考えられる。本研究は、未だ解明されていない本菌のリジン生合成経路の全貌を明らかにしていく研究の一環として行われたものであり、本章では本研究を行うに至った経緯を簡単に紹介する。

T. thermophilus HB27 株は静岡県峰温泉において単離された高度好熱性の真正細菌であり [1]、70 °C で至適に生育する。本菌は、大腸菌と同様に遺伝子工学的手法が適用可能であるという利点から生化学或いは分子生物学の基礎研究領域において幅広く研究されている。さらに、高温域で生育する本菌の特徴を利用した酵素の耐熱化研究等の応用的研究にも広く利用されている。本菌のゲノムプロジェクトはドイツにおいて行われ、本年度にその解析が報告されている [2]。

当研究室では *Thermus flavus* におけるアミノ酸生合成経路の代謝制御系を研究するにあたり、リジン、スレオニン、メチオニン、イソロイシンの一般的な生合成経路の初発酵素である **Aspartate kinase (AK)** の **feedback inhibition** 機構に関して研究を行ってきた [3]。細菌には3種類の異なる AK をもつものや AK を1つしかもたないもの等様々なものが存在するが、AK 活性を細胞内の全活性として考えてみると、その活性はリジンとスレオニンの両アミノ酸によって制御されているとすることができる [4, 5]。しかしながら本菌の AK はスレオニンによる **feedback inhibition** は確認されたものの、リジンに関してはその作用は認められなかった。*T. flavus* が AK を初発酵素とするリジン生合成をもっているならば、同菌にはリジンによって制御される他の AK が存在すると考えられた。そこで、*T. flavus* と同様なアミノ酸生合成系を有していると推測され、遺伝子操作が可能な *T. thermophilus* HB27 株において AK 遺伝子破壊株を作製し、その表現型を解析することとした。この破壊株は、リジン要求性は示さなかったものの、スレオニン、

メチオニン要求性を示した。この結果は、*T. thermophilus* HB27 株には AK は一つしかないことを示すと同時に、同菌のリジン生合成は一般に知られている AK を初発酵素とし diaminopimelate (DAP) を経由する DAP 経路ではなく、他の生合成経路によって行われている可能性が示された [6]。そこで、このリジン生合成を解明するために、本菌を NTG 処理することでリジン要求株を作製した。次いで、それらの栄養要求性を調べたところ、取得したリジン要求性変異株のいくつかにおいて、酵母やカビで見られるリジン生合成経路の中間代謝産物である α -aminoadipate (AAA) を添加することによってリジン要求性が回復することが分かった。この結果から、本菌のリジン生合成が AAA を経由する経路によって行われていることが示された。

リジンの生合成経路は現在までに一般的な真正細菌や植物等で見られる、アスパラギン酸を基質とし DAP を経由する DAP 経路と、酵母やカビに見られる、2-oxoglutarate を基質とし AAA を経由する AAA 経路の 2 つが知られている (Fig. 0-1) [7, 8, 9]。本菌においてリジンは前述したように、後者の経路を辿って生合成されていることが示唆された。さらに解析を進めるために当研究室では本菌のリジン生合成関連酵素遺伝子のクローニングを行った。

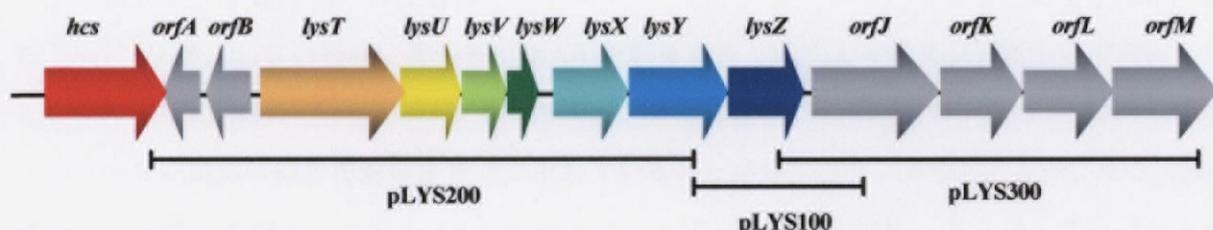


Figure 0-2. *T. thermophilus* HB27 株におけるリジン生合成酵素遺伝子のクローニング

hcs, homocitrate synthase; *lysT*, homoaconitase large subunit; *lysU*, homoaconitase small subunit; *lysV*, putative ORF; *lysW*, hypothetical conserved protein; *lysX*, putative α -aminoadipate *N*-acetyltransferase; *lysY*, *N*-acetyl δ -(α -aminoadipyl) phosphate reductase; *lysZ*, *N*-acetyl α -aminoadipate kinase

Table 0-1. *T. thermophilus* HB27 株のリジン生合成酵素遺伝子破壊株の栄養要求性

Mutant with knockout of	<i>hcs</i>	<i>lysT</i>	<i>lysU</i>	<i>lysV</i>	<i>lysW</i>	<i>lysX</i>	<i>lysY</i>	<i>lysZ</i>
MP	-	-	-	+	-	-	-	-
MP + lysine	+	+	+	+	+	+	+	+
MP + AAA	+	+	+	+	-	-	-	-
MP + Ort	N.T.	N.T.	N.T.	+	-	-	-	-

MP, minimal medium; +, Growth; -, No growth; N.T., Not tested

方法は本菌の特徴である自然形質転換能を利用し、リジン要求株を相補する遺伝子断片を回収するという方法で行われた。その結果、pLYS200 と名付けたプラスミドが得られた。このプラスミドに挿入された DNA 断片の上流・下流を含むプラスミドとして pLys100, pLys300 を構築し挿入断片の塩基配列解析を行ったところ、この領域には *hcs*、*lysT*、*lysU*、*lysV*、*lysW*、*lysX*、*lysY*、*lysZ* という 8 つの遺伝子から構成されるクラスターが見出された (Fig. 0-2)。それぞれの破壊株の解析結果から、*lysV* 以外の遺伝子破壊株は全てリジン要求性を示したことから本クラスターはリジン生合成関連酵素遺伝子クラスター (Lys クラスター) であると同定された。また、*hcs*、*lysT*、*lysU* の遺伝子破壊株は AAA を添加することによってリジン要求性が回復したことから、*hcs*、*lysT*、*lysU* が AAA より上流の、そして *lysW*、*lysX*、*lysY*、*lysZ* が AAA 以降のリジン生合成経路に関わる遺伝子をコードしていることが分かった。さらに、*lysX*、*lysY*、*lysZ* 遺伝子破壊株に酵母やカビ等の AAA からリジンへ至る経路の中間体であるサッカロピンを添加してもリジン要求性が回復しなかった。これらの結果、AAA からリジンへの変換は現在までに知られていない新規の生合成経路で行われていることが示唆された (Fig. 0-3)。

本菌のリジン生合成経路を構成する遺伝子産物のホモロジー検索を行った結果、*hcs* がロイシン生合成経路の初発酵素 2-isopropylmalate synthase と、*lysTU* が TCA cycle の aconitase 及びロイシン生合成経路の 3-isopropylmalate isomerase と、*lysY*、*lysZ* がそれぞれアルギニン生合成経路の *N*-acetylglutamylphosphate reductase、*N*-acetylglutamate kinase と高い相同性を示した (Fig. 0-4)。従って、本菌のリジン生合成経路の AAA 上流は TCA cycle やロイシン生合成経路と類似した、酵母やカビに見られる生合成経路と同様の経路で、そして AAA 以降は酵母やカビで行われているサッカロピンを經由する経路ではなく、アルギニン生合成経路 [と類似した経路で行われていることが推定された (Fig. 0-4) [10]。

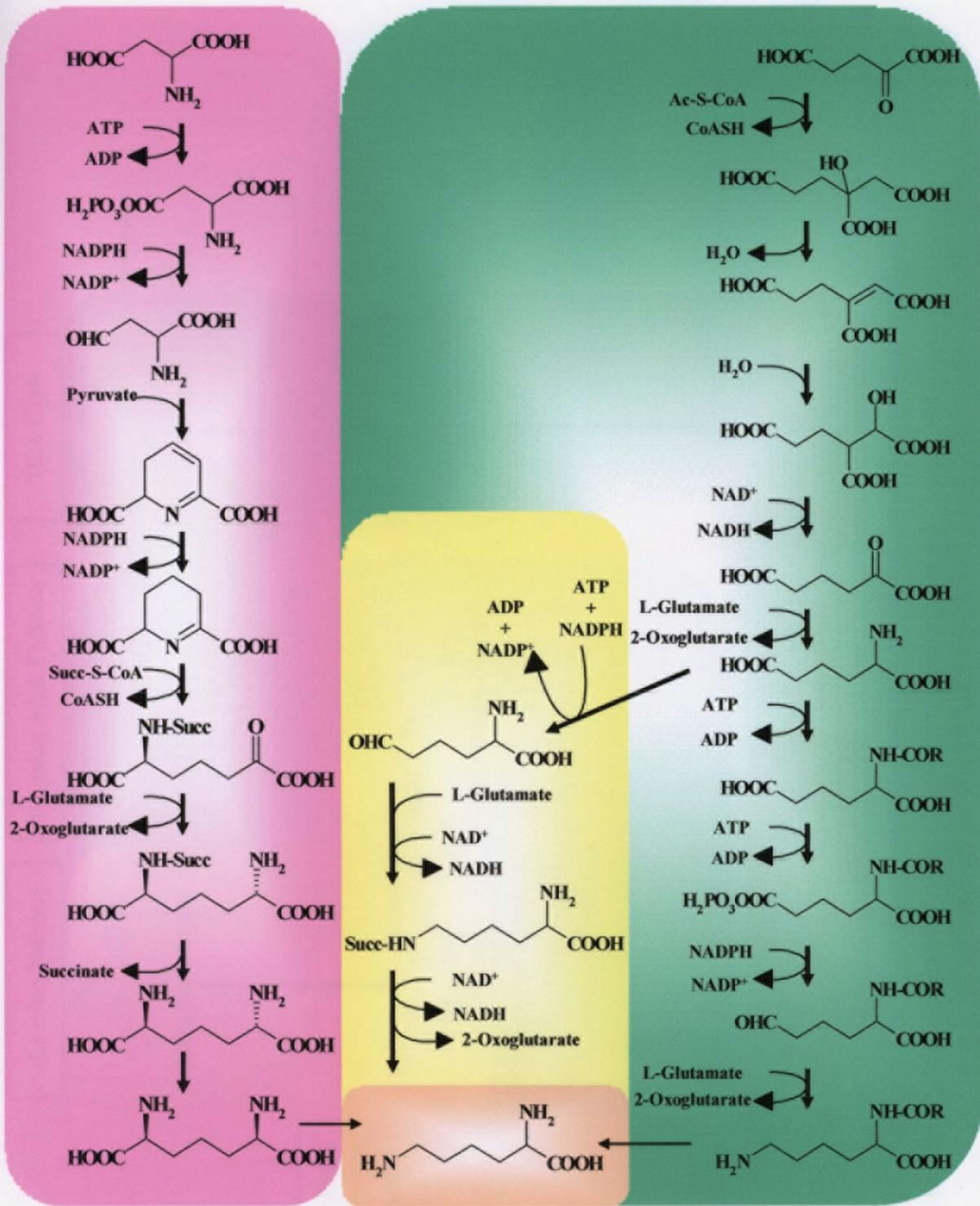


Figure 0-3. DAP 経路、Yeast-AAA 経路及び *Thermus*-AAA 経路

一般的な真正細菌や植物が行う DAP 経路 (ピンク)、酵母やカビが行う AAA 経路 (黄)、そして *T. thermophilus* が行う AAA 経路 (緑) を示した。

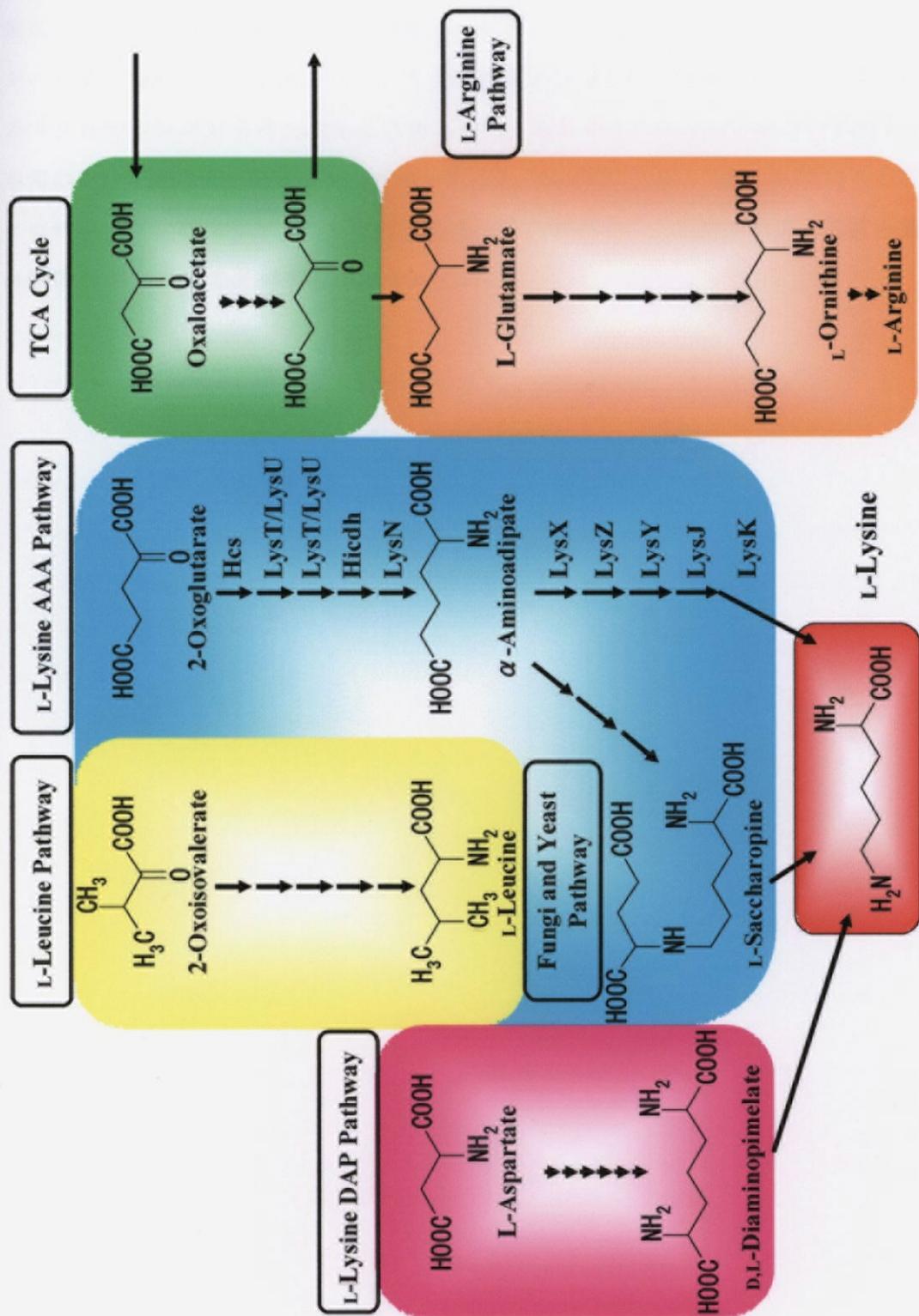


Figure 0-4. リジン、ロイシン、アルギニン合成経路及びTCA 回路の類似性比較
T. thermophilus が行うリジン合成経路は、AAA 上流がロイシン合成及びTCA回路に、AAA 下流が、アルギニン合成経路に類似性が見出された。

したがって、本菌のリジン生合成経路は、生合成酵素の代謝調節及び発現調節機構を解明すると同時に、生物の初期進化を解明する鍵となる、興味深い研究対象であるといえる。

類似生合成における反応機構から本菌のリジン生合成は11の遺伝子がコードする9段階の酵素反応によって構成されることが類推されたが、このLysクラスターにはその内7つしかコードされていなかった。本菌のリジン生合成経路の全貌を明らかにするためには、残りの4遺伝子のクローニングが不可欠であるため、残る4遺伝子のクローニングが行われた。その結果、本菌のリジン生合成に関与する残りの4遺伝子、*hicdh*[11], *lysN*[12], *lysJ*[13]そして *lysK*[14]のクローニングに成功し、それらの酵素の動力学的解析から、各酵素は広い基質特異性を有する多機能酵素であることが明らかとなっている。

§ 0-2. 生体内分子生合成経路における流量調節機構

生物はその生命活動を維持するために、核酸や脂質、タンパク質等の高分子化合物を生合成しなければならない。そのためには何千種類もの化学反応を生体内で行う必要があり、酵素はその反応の殆ど全てを触媒するという重要な役割を果たしている。またそれと同時に、生育環境中には利用可能な成分は限られているため、必要量以上の高分子化合物の生産を調節するメカニズムをも有していなければ、生命活動は維持できない。

こうした反応を制御する機構の主要なものとして、酵素活性を調節する **feedback inhibition** と呼ばれる機構と、遺伝子発現を調節する **feedback repression** という機構が知られている。**feedback inhibition** は代謝・生合成経路の初発酵素、或いは経路分岐直後に位置する鍵酵素の活性を調節する際によくみられる機構である。この **feedback inhibition** により、生体内において必要以上の産物の生成が抑制され、効率の良い生命活動を行うことが可能となることから、**feedback inhibition** は生命活動を支える重要な制御機構の1つであると言える。

feedback inhibition に関する研究は特にアミノ酸生合成において精力的に行われてきた。リジンやメチオニン、スレオニン、イソロイシンの一般的な生合成経路の初発酵素である AK はアスパラギン酸に ATP の γ 位のリン酸を付加して、4-aspartylphosphate を生成する反応を触媒する (Fig. 0-5)。

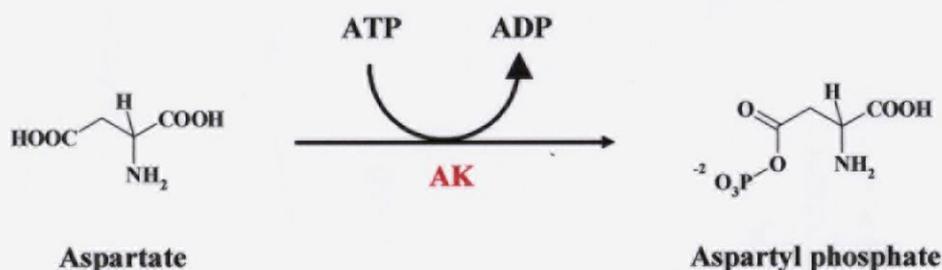


Figure 0-5. Aspartate kinase 反応

本酵素はDAP経路の初発酵素であり、アスパラギン酸にATPの γ 位リン酸を付加することでアスパラチルリン酸を生成する反応を触媒する。

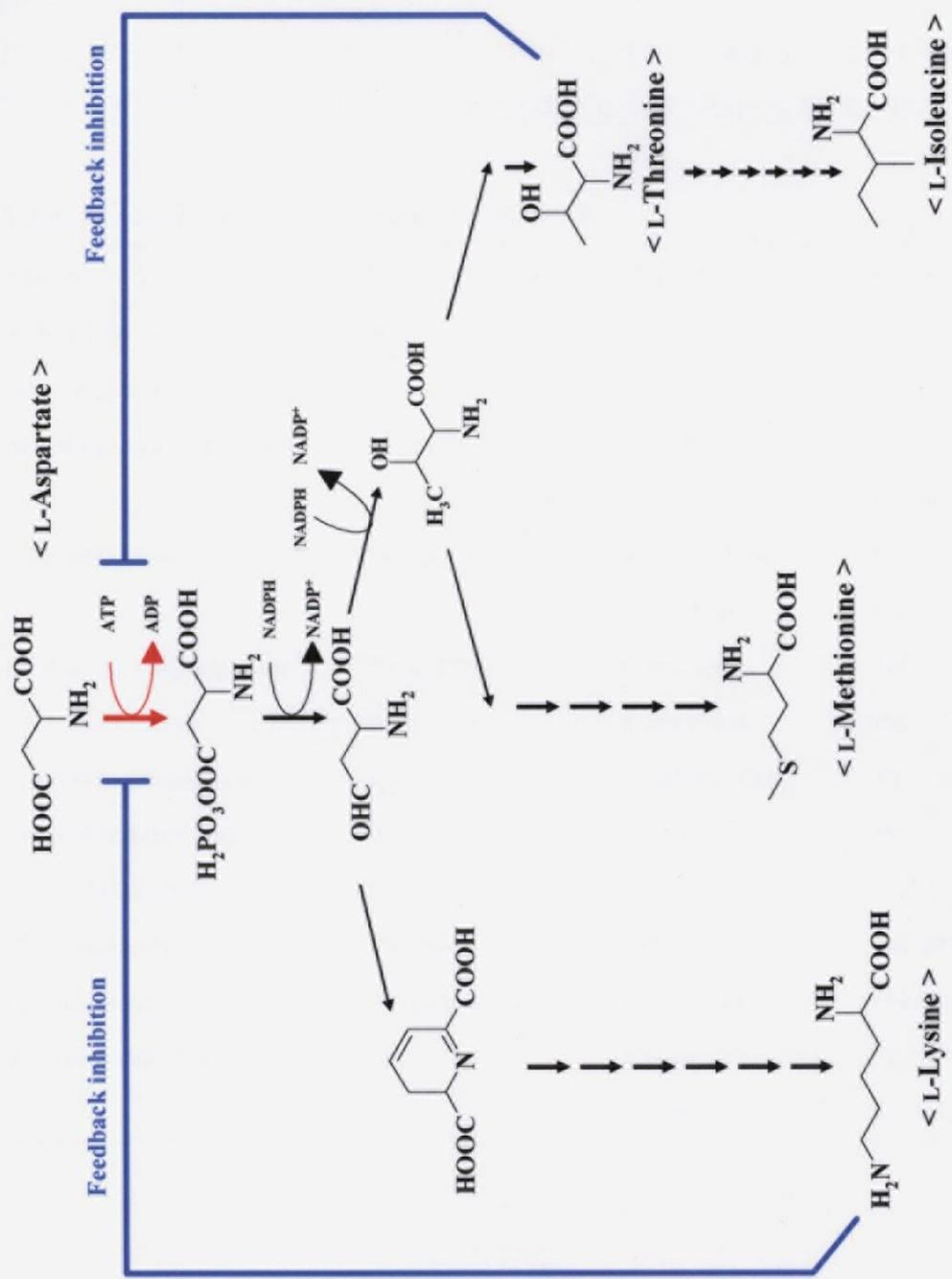


Figure 0-6. DAP 経路で報告されている Feedback inhibition 機構
 DAP 経路の初発酵素である AK はリジン及びスレオニン双方によって Feedback inhibition を受ける。

AK は各種微生物をはじめ多くの生物に存在し、生合成最終産物であるリジンやスレオニンによって feedback inhibition を受ける (Fig. 0-6) [15, 16]。AK 以外でもセリンによって 3-phosphoglycerate dehydrogenase[17] が、フェニルアラニンでは chorismate mutase[18, 19] が、チロシンでは prephenate dehydratase[20] が feedback inhibition で流量調節されていることが知られている (Table 0-2)。これらの酵素はアロステリック酵素と呼ばれ、共通した立体構造をもつ制御ドメインを有している [21]。このドメインと、それぞれのアミノ酸が結合し、立体構造上に変化が生ずることで、反応が抑制されるものと考えられている [17, 18, 19, 20, 22, 23]。

Table 0-2. Feedback inhibition で制御される酵素一覧

Enzyme	Metabolic system	Example	Regulatory ligand
3-phosphoglycerate dehydrogenase	Ser	<i>E. coli</i> SerA	Ser
Acetohydroxyacid synthase	Val, Leu, Ile	<i>E. coli</i> ilvH <i>Arabidopsis</i>	Val Ile, Val
Aspartate kinase	Thr, Met and/or Lys	<i>B. subtilis</i> LysC <i>E. coli</i> LysC	Lys Lys
Homoserine dehydrogenase	Thr and Met	<i>E. coli</i> ThrA	Thr
Chorismate mutase	Phe	<i>E. coli</i> PheA	Phe
Prephenate dehydrogenase	Tyr	<i>B. subtilis</i> ThrA	Tyr
Prephenate dehydratase	Phe	<i>B. subtilis</i> PheA	Phe
Formyl FH ₄ hydrolase	Purine	<i>E. coli</i> PurU	Met, Gly
Phenylalanine hydroxylase	Phe catabolism	Rat PheOH	Phe, BH ₄
ppGpp synthetase	Stringent response	<i>E. coli</i> RelA	Unknown
Threonine deaminase	Ile	<i>S. typhimurium</i> IlvA <i>B. subtilis</i> IlvA	Ile, Val Ile, Val

また、アミノ酸生合成以外では、プリン生合成でこの制御機構が研究されている。ADPとGDPによってプリン生合成の初発酵素である **Ribose phosphate pyrophosphokinase** が [24, 25]、さらに ATP、ADP、AMP、そして GTP、GDP、GMP によって IMP への初発酵素である **Amide phosphoribosyl transferase**[26] が **feedback inhibition** を受けることが知られている (Fig. 0-7)。さらに、ピリミジン生合成においては CTP によって **aspartate carbamoyltransferase** がこの調節を受けている [27, 28]。

遺伝子発現レベルの制御様式である、**feedback repression** も代謝経路の初発酵素、或いは経路分岐直後に位置する鍵酵素の遺伝子を対象とした制御機構であり、その遺伝子の転写を抑制する機構である。この転写発現機構については、次項で紹介する。

T. thermophilus HB27 株のリジン生合成においてもその生合成経路の初発酵素であるホモクエン酸合成酵素 (Hcs) が生合成最終産物であるリジンによって **feedback inhibition** を受けることが当研究室の Wulandari によって示されている [29]。Hcs のリジンに対する活性阻害の K_i 値は $9.4 \mu\text{M}$ であり、同酵素が非常に高感受性で活性調節を受けていることが明らかになっている。

§ 0-3. 遺伝子の発現制御機構

生物がその生命活動を維持し続けるために行っている様々な反応を制御する機構として、酵素活性レベルでの調節機構 feedback inhibition について、§ 0-2 で述べたが、この他に遺伝子の発現を調節する機構として feedback repression がある。この機構は、各種反応によって生じた最終代謝産物と activator/repressor 等の *trans* な因子が相互作用し、遺伝子の発現制御領域に結合することで遺伝子発現を調節するものであり、代謝経路の初発酵素、或いは経路分岐直後に位置する鍵酵素の遺伝子の発現調節機構としてよくみられる。この feedback repression により、結果として生体内において必要以上の代謝産物の生成が抑制され、効率の良い生命活動を行うことが可能となる。このように、feedback repression は feedback inhibition と並んで効率の良い生命活動を支える重要な制御機構あるといえる。この feedback repression に関する研究は、糖代謝やアミノ酸生合成において行われてきた。

アミノ酸生合成にみられる feedback repression としては、大腸菌 *Escherichia coli* の *trp* operon が有名である [30]。この operon はコリスミン酸からトリプトファンを合成するための3つの酵素をコードしており (Fig. 0-8)、*trp* operon の5つの遺伝子が *trp* repressor の制御下で同時に発現される。

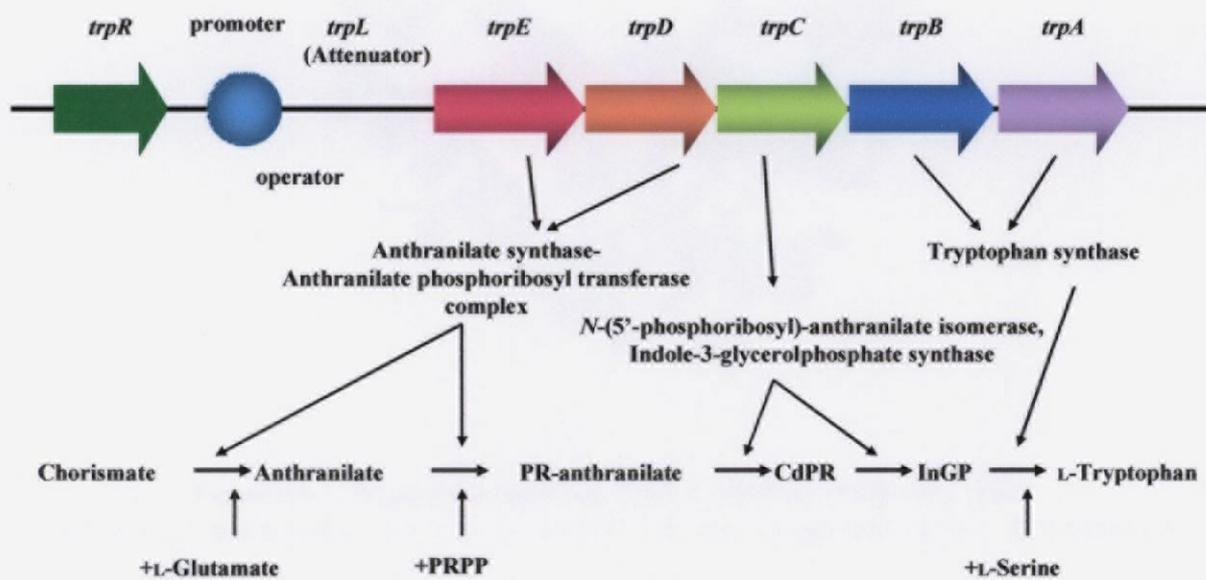


Figure 0-8. 大腸菌 *trp* operon とトリプトファン生合成経路

PR, phosphoribosyl; PRPP, phosphoribosyl pyrophosphate;

CdPRP, carboxyphenyl-aminodeoxyribose phosphate;

InGP; indoleglycerol phosphate

trp repressor は *trpR* によってコードされている homodimer タンパクであり (Fig. 0-9) [31, 32]、トリプトファンを生合成経路の最終代謝産物であるトリプトファンと complex を形成することで *trp* operator に結合し、その転写量を 1/70 まで下げることが報告されている [30, 33]。

加えてこの *trp* operon にはもう 1 つの制御機構である attenuation も存在することが示されている [34, 35]。この機構は塩基配列に依存する *cis* な調節である。*trpE* の上流に短いペプチドをコードする領域 *trpL* が存在し、その領域内に regulatory コドン (2 残基の Trp) が tandem に存在する leader ペプチドがコードされている。この leader ペプチドの翻訳が Trp-tRNA^{Trp} の存在量によって増減し、それに伴って *trpE* 以下に続く mRNA の転写量が調節される (Fig. 0-10)。トリプトファンが環境中に存在する場合には充分量の Trp-tRNA^{Trp} が生成される。その結果として下流に伸長した mRNA が、 ρ -factor 非依存性の転写終結モチーフを形成することで RNA ポリメラーゼが DNA から解離し、転写が終結する。一方でトリプトファンが存在しない条件下では Trp-tRNA^{Trp} の量が少なくなるため、リボソームが regulatory コドンで停滞してしまい、mRNA が上述したものとは別の二次構造と形成し、転写終結モチーフは形成されなくなる。そのため RNA ポリメラーゼが下流の遺伝子の転写を行うことができ、その結果としてトリプトファンが合成されることになる。



Figure 0-9. Tryptophan repressor, TrpR の立体構造 (PDB code, 1P6Z)

本転写因子は二量体を形成し、トリプトファン存在下で *trp* operon operator 部位に結合し、転写を抑制する。

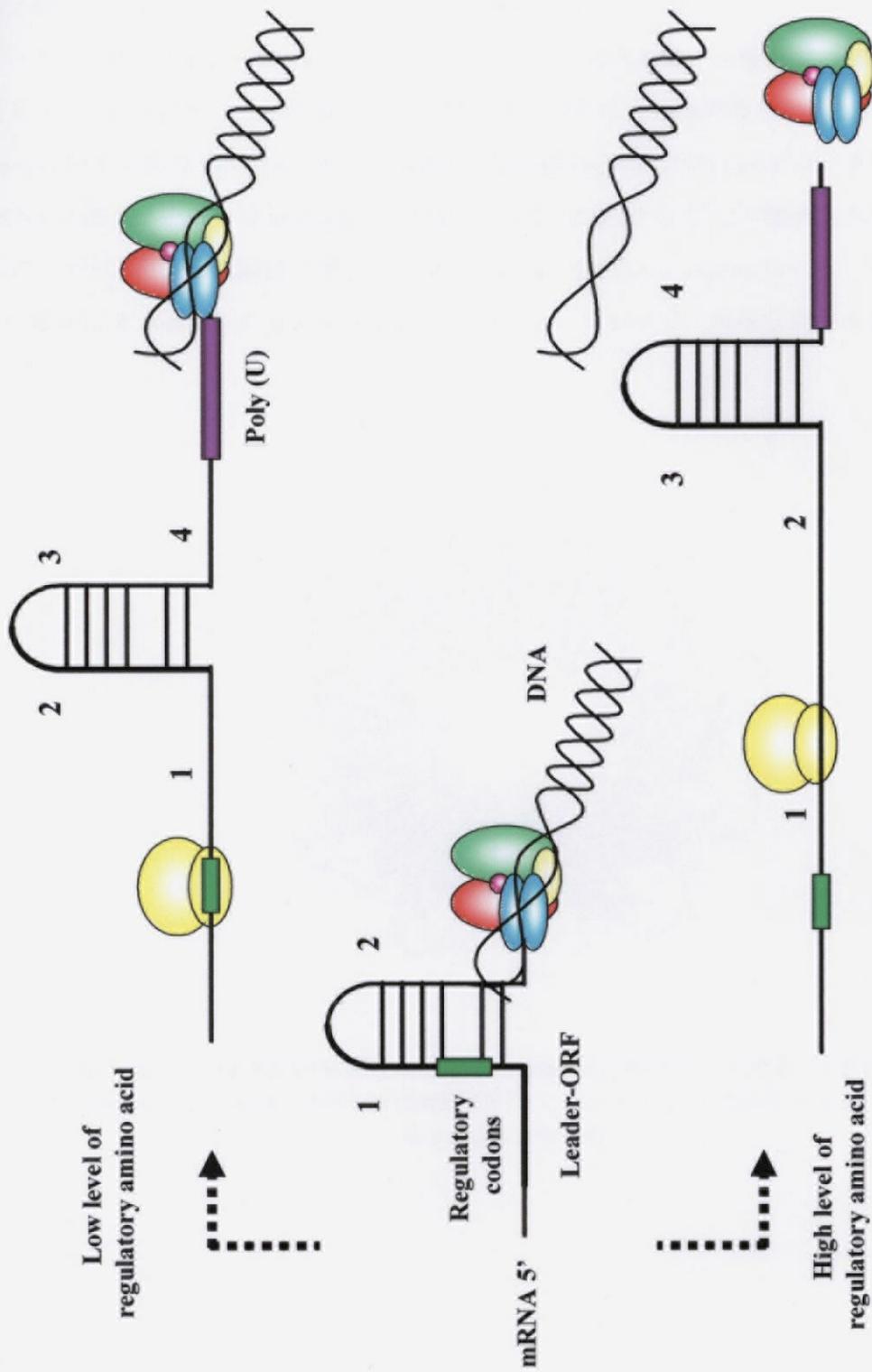


Figure 0-10. 大腸菌 *trp* operon で提唱されている attenuation メカニズム

トリプトファン存在下では ρ -factor 非依存性の転写終結モチーフを形成するが、トリプトファン欠乏時には alternative な構造である antitermination モチーフを形成することで先の転写終結モチーフが形成し得なくなる。従って下流の構造遺伝子の転写は行われることになる。

同様な制御はフェニルアラニン [36, 37]、ヒスチジン [36, 38, 39]、ロイシン [36, 40, 41, 42]、イソロイシン [41, 43, 44]、スレオニン生合成 [36, 41, 45] においても提唱されており、*E. coli* のアミノ酸生合成において広く保存された制御機構であるといえる。

一方で、枯草菌 *Bacillus subtilis* の *trp* operon では構造遺伝子上流の 5' 非翻訳領域 (5'-UTR) によって制御される [46, 47, 48, 49]。この機構では生合成の最終産物であるトリプトファンと、*trans* な因子である TRAP (*trp* RNA-binding attenuation protein) が complex を形成し、転写途中の mRNA に結合することで attenuation が誘引される (Fig. 0-11)。この機構も生体内に存在するトリプトファン量が発現調節の因子であることから、feedback repression として扱われているが、この機構は *B. subtilis* の *trp* operon にしか見出されておらず、特殊な例である。



Figure 0-11. *trp* RNA-binding attenuation protein, TRAPの立体構造(PDB code, 1UTV)

枯草菌 *B. subtilis* の *trp* operon における発現調節因子で、2 unit (1 unit が 12 量体からなる) で活性を呈する。赤線は mRNA を示している。

B. subtilis の *trp* operon は転写因子によって制御されているが、こうした *trans* な因子を介さない制御機構が近年になって見出された。この機構は生合成産物がリガンドとして mRNA の 5'-UTR と直接的に相互作用することで attenuation を誘引し、発現制御することが報告されている [50]。このメカニズムは riboswitch と呼ばれ、メチオニン [51, 52, 53] やリジン [54, 55, 56] 等のアミノ酸生合成に関与する酵素遺伝子の発現調節だけでなく、リボフラビン [57, 58, 59] やチアミン [60, 61, 62] 等の補酵素や核酸の塩基成分である purine の生合成 [57, 58, 59] の制御メカニズムとしても、*Bacillus/Clostridium* 属や *Fusobacterium* 等多岐に渡る生物種に見出され [63, 64, 65]、現在精力的に研究が行われている (Table 0-3)。

Table 0-3 現在までに報告されている Riboswitch の特性

Riboswitch	Functional system	Ligand	Organisms
<i>RFN</i> -element	Riboflavin biosynthesis and transport	FMN	<i>Bacillus/Clostridium</i> group
<i>THI</i> -element	Thiamin biosynthesis; transport of thiamin and related compounds	TPP	<i>Bacillus/Clostridium</i> group <i>Deinococcus</i> , <i>Thermotogales</i> and <i>Fusobacterium</i>
B12-element	Cobalamin biosynthesis; transport of cobalamin and related compounds; cobalt transport; cobalamin-independent isozymes of cobalamin-dependent enzymes	Coenzyme B12	<i>Bacillus/Clostridium</i> group <i>Thermotogales</i> , <i>Chloroflexus</i> and <i>Fusobacterium</i>
S-box	Methionine biosynthesis and transport; SAM metabolism	SAM	<i>Bacillus/Clostridium</i> group <i>Picrotoga</i> and <i>Chloroflexus</i>
G-box or XrtR regulon	Purine metabolism and transport	Purines	<i>Bacillus/Clostridium</i> group <i>Fusobacterium</i>
L-box or LYS-element	Lysine biosynthesis, transport and catabolism	Lysine	<i>Bacillus/Clostridium</i> group <i>Thermotogales</i>

§ 0-4. 本研究の目的と本論文の構成

当研究室では *T. thermophilus* HB27 株のリジン生合成に関与する全生合成酵素遺伝子のクローニングに成功している。*E. coli* で発現・精製した各酵素の解析より、本菌のリジン生合成に関与する酵素の多くが、複数の関連代謝・生合成の反応を触媒することができることが明らかとなり、その調節機構や、代謝・生合成系の進化について高い興味もたれる。以上のような酵素の特性を詳細に解析することで、酵素レベルでの本リジン生合成の全体像が明らかになりつつある。さらに、リジン生合成の代謝・調節機構の全貌を明らかにするためには、酵素レベルの代謝調節だけではなく、本生合成に関与する酵素遺伝子の発現制御機構を解析することが必要であると考えられる。そこで、本研究では、本菌のリジン生合成の全貌を解明する一環として、本リジン生合成に関与する酵素遺伝子の多くを含む Lys クラスターを中心とした転写調節機構の解析を行った。第 1 章では、Lys クラスターの転写開始点の決定、及びリジンによる発現調節、さらには 5' 領域の転写調節への関与について述べる。第 2 章では前章で見出した attenuation の詳細な解析結果について、また、第 3 章ではこの Lys クラスター以外の領域にコードされている他のリジン生合成酵素遺伝子の発現調節に関する解析の経過を、第 4 章で発現調節機構に関連する可能性のある転写因子をコードする遺伝子のクローニングについて報告する。そして第 5 章で総括的な discussion を行う。

§ 0- 5. References

1. Oshima, T., and Imahori, K., (1974) *Int. J. System Bacteriol.*, **24**, 102-112.
2. Henne A., *et al.* (2004) *Nature Biotechnol.*, **22(5)**: 547-553.
3. Nishiyama, M., *et al.* (1995) *Microbiology*, **141**, 1211-1219.
4. Tosaka, O., *et al.* (1993) *Trends Biotechnol.*, **1**, 70-76.
5. Moir, D. and Paulus, H. (1997) *J. Biol. Chem.*, **252**, 4648-4654.
6. Kobashi, N., *et al.* (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 1713-1718.
7. Broquist, H. P. (1971) *Methods Enzymol.*, **17**, 112-129.
8. Irvin, SD., and Bhattacharjee JK. (1998) *J. Mol. Evol.*, **46**, 401-408.
9. Vogel, H. J. (1964) *Am. Natl.*, **98**, 446-455.
10. Cunin, RA. (1986) *Annu. Rev. Microbiol.*, **30**, 409-425
11. Miyazaki, J., *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1864-1871
12. Miyazaki, T., *et al.* (2004) *Microbiology*, **150(Pt7)**, 2327-2334.
13. Miyazaki, J., *et al.* (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 5067-5073.
14. Miyazaki, J., *et al.* (2002) *FEBS Lett.*, **512**, 269-274.
15. Biswas, DK and Mazumder, R. (1966) *Biochim Biophys Acta.* **130(2)**, 531-534.
16. Biswas, DK., *et al.* (1968) *J. Biol Chem.*, **243(13)**, 3655-1660.
17. Schuller DJ., *et al.* (1995) *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 69-76.
18. Xue, Y., *et al.* (1994) *Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 10814-10818.
19. Strater, N., *et al.* (1997) *Structure*, **5**, 1437-1452.
20. Kobe, B., *et al.* (1999) *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 442-448.
21. David, MC. and Boaz, S. (2001) *Curr. Opin.*, **11**, 694-700.
22. Changeux, JP. (1961) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **26**, 313-330.
23. Gallagher, DT., *et al.* (1998) *Structure*, **6**, 465-475.
24. Zoref, E., *et al.* (1975) *J. Clin. Invest.*, **56(5)**, 1093-1099.
25. Becker, MA. and Kim, M. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262(30)**, 14531-14537.
26. Zhou, G. and *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268(14)**, 10471-10481.
27. Honzatko, RB., *et al.* (1982) *J. Mol. Biol.*, **160**, 219-263.
28. Gouaux, JE., *et al.* (1990) *Biochemistry*, **29**, 7702-7715.

29. Wulandari, AP., *et al.* (2002) *FEBS Lett.*, **522**, 35-40.
30. Shimizu, Y., *et al.* (1973) *Proc. Natl. Sci. USA.*, **70(7)**, 1990-1994.
31. Schevitz, RW., *et al.* (1985) *Nature*, **317**, 782-786.
32. Joachimiak, A., *et al.* (1983) *J. Biol. Chem.*, **258(20)**, 12641-12643.
33. Bogosian, G., *et al.* (1984) *Mol. Gen. Genet.*, **193(2)**, 244-250.
34. Shimizu, N., *et al.* (1974) *FEBS Lett.*, **40(1)**, 80-83.
35. Miozzari, GF. and Yanofsky, C. (1978) *J. Bacteriol.*, **133(3)**, 1457-1466.
36. Keller, EB. and Calvo, JM. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76(12)**, 6186-6190.
37. Vacher, J., *et al.* (1985) *EMBO J.*, **4(2)**, 509-513.
38. Lynn, SP., *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, **194(1)**, 59-69.
39. Lee, DN. and Landick, R. (1992) *J. Mol. Biol.*, **228(3)**, 759-777.
40. Wessler, SR. and Calvo, JM. (1981) *J. Mol. Biol.*, **149(4)**, 579-597.
41. Johnson, DL. and Somerville, RL. (1983) *J. Bacteriol.*, **155(1)**, 49-55.
42. Bartkus, JM., *et al.* (1991) *J. Bacteriol.*, **173(5)**, 1634-1641.
43. Lawther, RP. and Hatfield, GW. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77(4)**, 1862-1866.
44. Chen, JW., *et al.* (1991) *J. Bacteriol.*, **173(7)**, 2328-2340.
45. Lynn, SP., *et al.* (1982) *J. Bacteriol.*, **152(1)**, 363-371.
46. Babitzke, P. and Yanofsky, C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90(1)**, 133-137.
47. Gollnick, P. (1994) *Mol. Microbiol.*, **11(6)**, 991-997.
48. Babitzke, P., *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269(24)**, 16597-16604.
49. Antson, AA., *et al.* (1994) *J. Mol. Biol.*, **244(1)**, 1-5.
50. Alexey, GV., *et al.* (2004) *Trends Genet.*, **20(1)**, 44-50.
51. Johansen, LE., *et al.* (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 5200-5209.
52. Christiansen, LC., *et al.* (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 2540-2550.
53. Saxild, HH., *et al.* (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 6175-6183.
54. Kochhar, S. and Paulus, H. (1996) *Microbiology*, **142**, 1635-1639.
55. Mandal, M., *et al.* (2003) *Cell*, **113**, 577-588.
56. Grundy, FJ., *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 12057-12062.
57. Lee, JM., *et al.* (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 7371-7380.
58. Vitrechak, AG., *et al.* (2002) *Nucleic Acid Res.*, **30**, 3141-3151.

59. Winkler, WC., *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 15908-15913.
60. Miranda-Rios, J., *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 9738-9741.
61. Rodionov, DA., *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 48949-48959.
62. Winkler, WC.,*et al.* (2002) *Nature*, **419**, 952-956.
63. Epshtein, V., *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 5052-5056.
64. McDaniel, BA., *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 3083-3088.
65. Winkler, WC., *et al.* (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 701-707.