# 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発現調節機構

## §3-1. Introduction

*T. thermophilus* のリジン生合成には、11の遺伝子が関与すると考えられる。そのうち7つの酵素遺伝子はLysクラスターに含まれており（Fig. 3-1）、polycistronicに転写されている（Fig. 1-9）。このLysクラスターは前章までに述べられたように、クラスターの最上流からの転写がattenuationメカニズム、即ち、翻訳とcoupleしたleader peptideを介するメカニズムによって制御されていることを明らかにした（第1, 2章）。

一方で本菌のリジン生合成酵素遺伝子でLysクラスター内にコードされていない構造遺伝子は4つ存在し、第3, 4, 8, 9番目の反応を触媒する酵素をコードしている遺伝子（順に*hicdh*, *lysN*, *lysJ*及び*lysK*）であり、全て当研究室でクローニングされた[1, 2, 3, 4]。

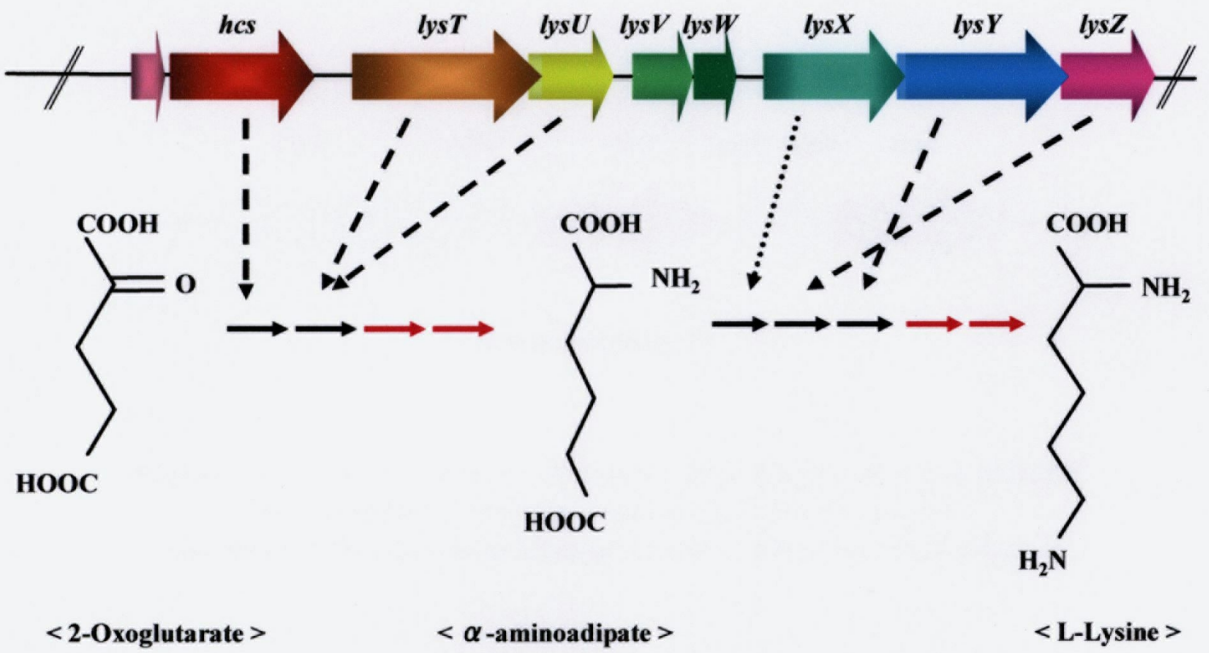



**Figure 3-1.　Lysクラスターに含まれる酵素遺伝子とリジン生合成経路**
リジンは11の遺伝子から構成される9段階の反応で生合成されるが、Lysクラスターに含まれる酵素遺伝子は、そのうち7つのみである。

ドイツにおいて行われていた *T. thermophilus* HB27 株のゲノム解析は 2003 年度に終了し [5]、その解析結果から *hicdh*, *lysN* 及び *lysJ-lysK* クラスターに関してはクラスターを形成していることが明らかになった（Fig. 3-2）。

本研究の目的は、*T. thermophilus* のリジン生合成の調節機構の全貌を明らかにすることであり、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ためには Lys クラスターの発現調節機構の解析のみならず、Lys クラスターに含まれていないこれら 4 つの遺伝子の発現調節機構を研究することが不可欠であると考えられる。

そこで、本章では、*T. thermophilus* のリジン生合成の調節機構を解明する研究の一環として *lysJ* 及び *lysK* を含むクラスターを主軸にして Lys クラスターに属さないこれらの酵素遺伝子の発現制御解析を行うことにした。

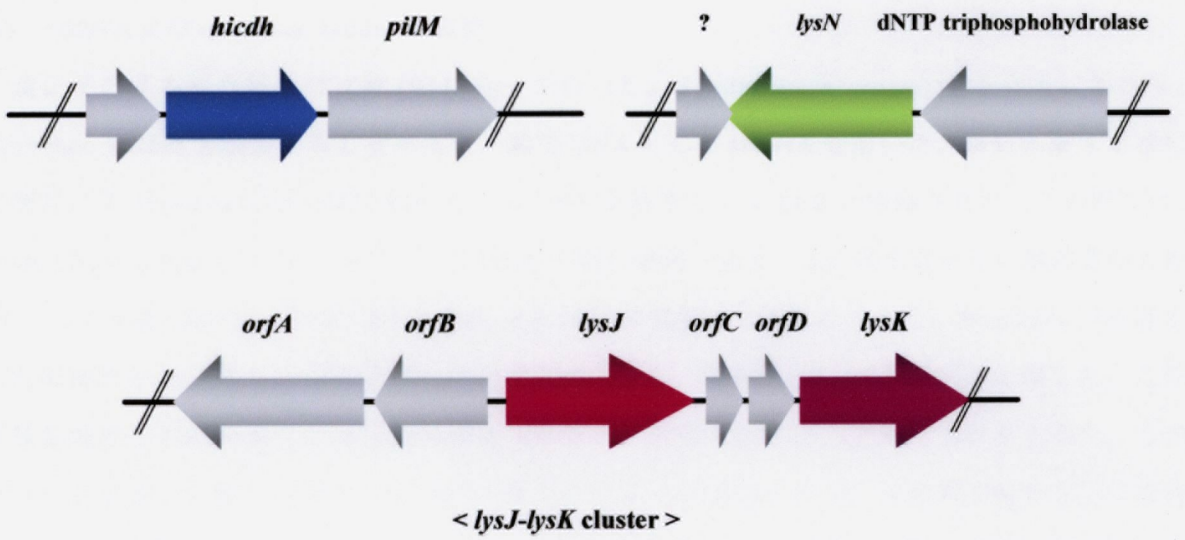



**Figure 3-2.　Lys クラスターに含まれない酵素遺伝子のゲノム上での配置**

ゲノム解析結果からそれぞれの location は、以下のように示された。

*hicdh*, 990630-991634; *lysN*, 40775-39582; *lysJ*, 1320414-1321601; *lysK*, 1323117-1323102

## § 3-2. Materials and Methods

### § 3-2-1. *T. thermophilus* HB27 株のゲノム DNA 抽出

高度好熱性細菌 *T. thermophilus* HB27 株は、文献 [6, 7, 8] に従って培養した。集菌した同菌体を 10 ml の TE 緩衝液に再懸濁し、lysate buffer（10 % SDS, 600 µl; 20 ng/ml Proteinase K, 60 µl）を加えて溶菌させた。その後、5 M NaCl 溶液を 2 ml、CTAB/NaCl 溶液を 1.6 ml 加え、65 ℃で 10 分間インキュベートした。この溶菌液に対し、クロロホルム抽出、フェノール抽出を行い、上清をイソプロパノール沈殿した。凝集してきたゲノム DNA をエタノールでリンスした後、TE 緩衝液に溶解しゲノム DNA 溶液とした。

### § 3-2-2. S1-nuclease mapping

(a) ssDNA 及び sequence ladder の調製

遺伝子の基本的な操作は文献 [9] に従って行った。S1-nuclease mapping を行うにあたり、sequence ladder を調製する必要があり、鋳型 DNA として ssDNA を用いた。解析に要する遺伝子断片は *T. thermophilus* HB27 株のゲノム DNA を鋳型として PCR で増幅させた。この断片は、S1-nuclease mapping に用いるプローブ DNA と同じ配列であり、*lysJ* 構造遺伝子の翻訳開始点を +1 として上流 -360 bp、下流 180 bp の配列を PCR で増幅させたものである。Sequence で確認をした同断片を M13 ファージベクターにサブクローンし、大腸菌 JM105 株を形質転換した。この形質転換株と別途培養しておいた同菌株を混合し、軟寒天培地上でプラーク形成させた。このプラークをさらに新しく培養した JM105 株とともに LB 培地で 37 ℃、8 時間培養した。この培養液を遠心分離し、上清 1 ml に対して 20 % PEG8000-2.5 M NaCl 溶液を 200 µl 加えて混合し、4 ℃で 12 時間以上静置した。次いで遠心分離し、沈殿したファージ粒子を集め、TE 緩衝液に溶解し、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿後、TE 緩衝液に溶解し ssDNA 溶液とした。

この ssDNA 溶液を鋳型として、5 末端を $^{32}P$ で標識した lysJ(S1-Rv)-ladder を用いて sequence ladder を調製した。sequence 反応に用いたプログラムを以下に示した。尚、使用した primer は Table 3-1 に示した。

94 ℃, 5 min → (94 ℃, 30 s → 65 ℃, 30 s → 72 ℃, 1 min) × 36 cycle → 72 ℃, 7 min → 4 ℃, ∞

Table 3-1.　S1-nuclease mapping に関連する primer 一覧

| Primer Name | Sequence |
|---|---|
| lysJ(S1-Fw)-probe | 5'-CGGGATCCAGCCCCCAAGAGGGGGTCTACCACC-3' |
| lysJ(S1-Rv)-probe | 5'-GGAATTCGCCCAGGTTGGCCACCCCGTACCCG-3' |
| lysJ(S1-Rv)-ladder | 5'-GCCCAGGTTGGCCACCCCGTACCCG-3' |

(b)　プローブ DNA の調製

*lysJ* 翻訳開始点を +1 として、上流 360 bp、下流 180 bp の配列を増幅するような合成オリゴヌクレオチドを設計した。*T. thermophilus* のゲノム DNA を鋳型として、上記のプライマー及び Ex-*taq* を用いて PCR を行い、目的配列を増幅した。PCR に用いたプログラムを以下に示した。尚、用いた合成オリゴヌクレオチドは Table 3-1 に示した。

94 ℃, 5 min → (94 ℃, 30 s → 65 ℃, 30 s → 72 ℃, 1 min) × 30 cycle → 72 ℃, 7 min → 4 ℃, ∞

アガロース電気泳動後に目的バンドを精製し、T4 polynucleotide kinase を用いて [γ-32P]ATP で 5' 末端を標識した。Microspin G-25 column で過剰な [γ-$^{32}$P]ATP を除去し、sense 鎖の 5 末端リン酸基を除去するために *Bam*HI で消化した。*Bam*HI 処理後に Microspin G-25 column で消化断片を除去したものを S1-nuclease mapping のプローブ、lysJ(-360/+180) とした (Fig. 3-3)。

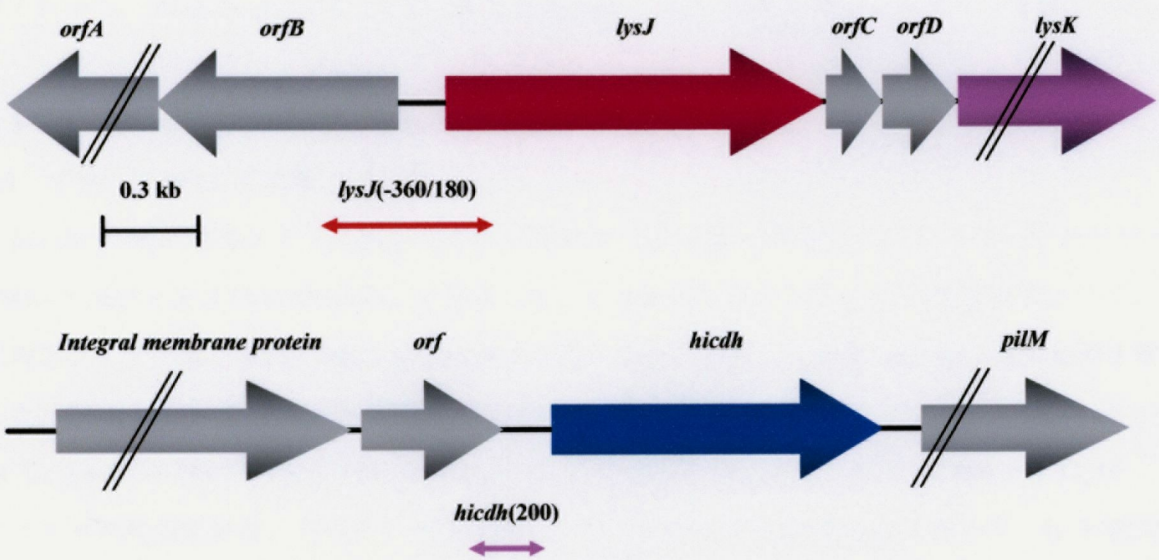



**Figure 3-3.　S1-nuclease mapping 及び EMSA プローブ配置**

S1-nuclease mapping 用のプローブは、*lysJ* 翻訳開始点を +1 として上流 -360 bp、下流 +180 bp の 540 bp 断片が PCR によって得られるように設計した。

EMSA 用のプローブは *hicdh* 開始コドンから上流の 200 bp の PCR 断片が得られるように設計した。

(c) Total RNA の調製

*T. thermophilus* HB27 株を TM medium に植菌し、70 ℃で 12 時間前培養し、菌体を集菌した後に M M培地を用いて 4 回洗浄した。洗浄した菌体を MM 培地に再懸濁し、前培養サンプルとした。その後、新しい MM 培地に終濃度 0.2 % になるように植菌すると同時に、必要に応じて additive を加えた。それぞれに終濃度が 1 mM, 5 mM になるようにリジン、オルニチン、アルギニンを添加して、引き続き 70℃で 16 時間振盪培養した。集菌後、約 5x10⁹cell ずつに小分けして -80℃で保管し、必要に応じて Total RNA を抽出することにした。Total RNA は 40 μg/ml の lysozyme 溶液で溶菌させた後、QIAGEN 社の RNeasy® Minikit 及び QIA shuredder™ を用いて抽出した。

(d) Hybridization 及び S1-nuclease digestion

2 pmol のプローブ DNA と 40 μg の Total RNA を共エタノール沈殿させ、風乾させた。ハイブリダイゼーションは風乾させたサンプルを 20 μl の S1-hybridization バッファー中 80 ℃で溶解変性させた後、45 ℃まで温度を下げたのち、そのままの温度で 16 時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後のサンプルは 100 U の S1-nuclease を含む S1-digestion バッファー中で 37 ℃, 1 時間かけて消化させ、その後エタノール沈殿した。エタノール沈殿後のサンプルは泳動バッファーに溶解した後、urea 変性アクリルアミドゲルに供した。泳動は、3000V, 8 時間かけて行った。Imaging plate に 12 時間露光させた後、FLA-3000 を用いてシグナルを検出した。

### § 3-2-3. Electrophoresis-Mobility Shift Assay (EMSA)

(a) プローブ DNA の調製

*hicdh* の翻訳開始点を +1 としてその上流 200 bp の配列が増幅されるようなプライマー、EMSAhicdhFw 及び EMSAhicdhRv を設計した。*T. thermophilus* のゲノム DNA を鋳型として、上記のプライマー及び KOD⁺ DNA polymerase (TOYOBO) を用いて PCR を行い、目的配列を増幅した。PCR に用いたプログラムを以下に示した。

94 ℃, 2 min → (94 ℃, 30 s → 60 ℃, 30 s → 72 ℃, 30 s) × 30 cycle → 72 ℃, 5 min → 4 ℃, ∞

アガロース電気泳動後、目的バンドを精製し、T4 polynucleotide kinase を用いて、[γ-32P]ATP で 5' 末端を標識した。Microspin G-25 column で過剰な [γ-$^{32}$P]ATP を除去したサンプルを EMSA のプローブ、hicdh(200) とした (Fig. 3-3)。尚、本実験で用いた合成オリゴヌクレオチドは、Table 3-2 に示した。

Table3-2　EMSA プローブ調製に用いた合成オリゴヌクレオチド

| Primer Name | Sequence |
|---|---|
| EMSAlysJFw | 5' -GGGTCCATGTTACCGGGGCCGCGG-3' |
| EMSAlysJRv | 5' -GCTCAGCTTTTGCCCCGGGCGCGCA -3' |

(b)　細胞粗抽出液の調製

*T. thermophilus* HB27 株を TM medium に植菌し、70 ℃で 12 時間前培養した。集菌した菌体を、M M培地を用いて 4 回洗浄した後に菌体を MM 培地に再懸濁し、前培養サンプルとした。その後、新しい MM 培地に終濃度 0.2 % になるように植菌すると同時に、必要に応じて additive を加え、引き続き 7 0 ℃で 16 時間振盪培養した。菌体を超音波破砕し、遠心分離によって得られた細胞粗抽出液を、タンパク質定量 [10] 後に 1 mg/ml に調製した。

(c)　結合反応及びその検出

10 µl の細胞抽出液を予め EMSA バッファー中で 60 ℃、5 分間プレインキュベートした。その後、1 pmol のプローブ DNA を添加し、60 ℃で 20 分間インキュベートした後、アクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動後のアクリルアミドゲルで電気泳動した後、80 ℃で乾燥させ、Imaging plate に 12 時間露光した後、FLA-3000 でシグナルを検出した。

## § 3-3. Results

### § 3-3-1. S1-nuclease mapping による *lysJ* の TSP 解析

*lysJ* に対する S1-nuclease mapping の結果を Fig. 3-4 に示す。共に泳動した sequence ladder から、*lysJ* の TSP はグアニン残基であることが明らかとなった。転写開始点であるこのグアニン残基は、*lysJ* 翻訳開始点の 100 bp 上流であり、塩基配列の解析からその上流には主要 σ 因子によって認識される -35 consensus 配列、-10 consensus 配列と類似の配列（-35,TTGACA; -10,TAGGCT）が見出された。(Fig. 3-5)

また、この転写は、培養液に最終代謝産物であるリジンを添加しても変化は観察されなかった（Fig. 3-4)。その一方で、類似生合成と考えられるアルギニン生合成の最終代謝産物であるアルギニンを培養液に添加することで、その転写量が減少することが観察されたことから (Fig. 3-4)、アルギニンによる転写制御の存在が示唆された。Lys クラスターと同様に TSP から *lysJ* 開始コドンまでに 100 bp からなる配列の存在が確認されたことから、この領域がアルギニン

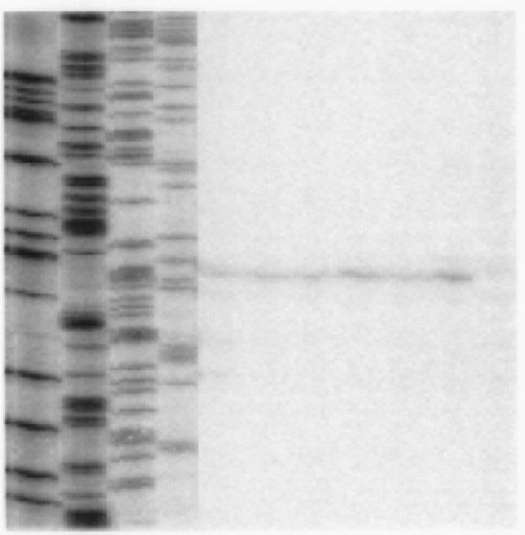



**Figure 3-4. S1-nuclease mapping による *lysJ* TSP の同定**
A, G, C, T; ssDNA を鋳型として作製した sequence ladder,
数字はサンプルとして用いた Total RNA を抽出した *T. thermophilus* の培養条件
1, MM medium; 2, MM + 1 mM lysine; 3,MM + 5 mM lysine; 4, MM + 1 mM ornithine;
5, MM + 5 mM ornithine; 6, MM + 1 mM arginine; 7, MM + 5 mM arginine

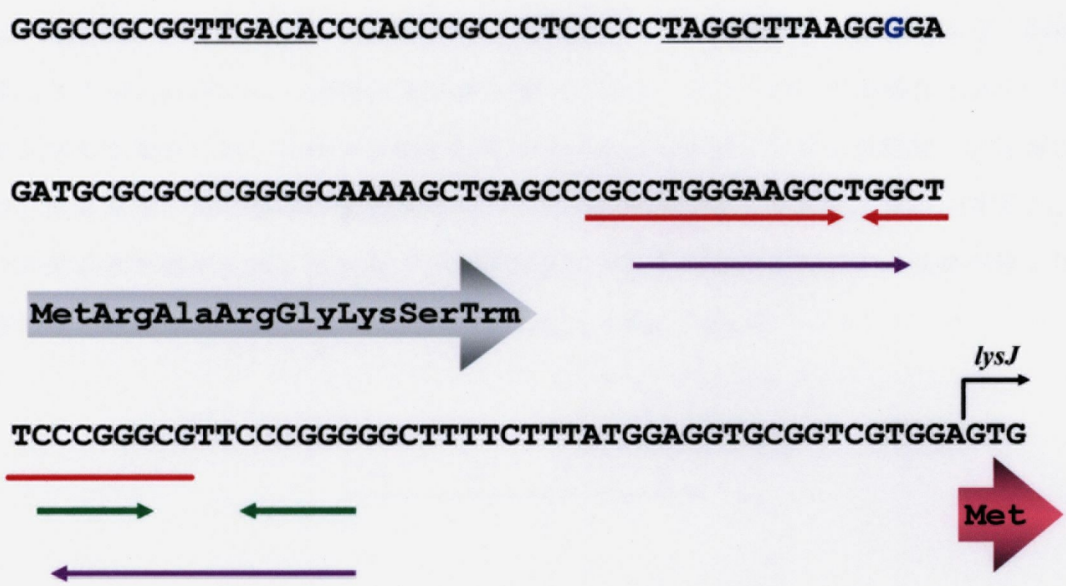



**Figure 3-5.　*lysJ* 上流の塩基配列**

推定される-35, -10プロモーター配列及びリボソーム結合部位は下線で、同定されたTSPであるグアニン残基は青色で示した。TSPと*lysJ*開始コドン間に見出されたinverted repeat sequenceは矢印で示した。

### § 3-3-2.　EMSA による *hicdh* 上流結合因子の探索

*hicdh* 翻訳開始点を +1 として上流 200 bp の配列をプローブ DNA とした EMSA で、MM 培地で培養した *T. thermophilus* の細胞粗抽出液を用いた場合、シフトバンドが観察された。アルギニンを添加した場合には、如何なる変化も生じていなかったが、リジンを添加して培養したときには、MM 培地のみの場合に観察されたシフトバンドが消失していた。また、リジン、アルギニンの共添加の場合には、アルギニン単独添加と比較してシフトバンドの強度が弱くなりはしたものの、同移動度のシフトバンドが認められた（Fig. 3-6）。

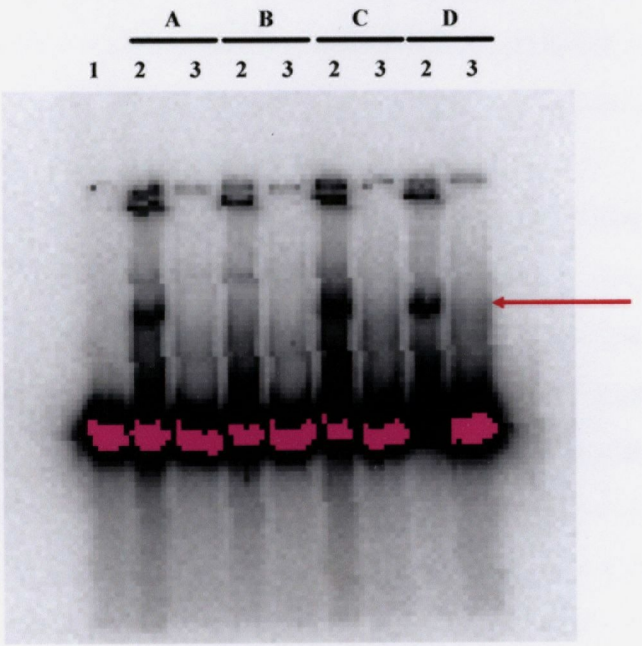



**Figure 3-6.　*hicdh* を対象とした EMSA 解析**

A - D は、EMSA 反応に用いた細胞粗抽出液を調製した *T. thermophilus* の培養条件を、数字は EMSA 反応組成を示している。

A, MM medium; B, MM + 5 mM lysine; C, MM + 5 mM arginine; D, MM + 5 mM lysine and arginine

1, Hot probe; 2, Hot probe + 100 μg 細胞粗抽出タンパク質;

3, Hot probe + 100 μg 細胞粗抽出タンパク質 + Cold probe

シフトバンドは赤矢印で示した。