

第5章 総括

§ 5-1. 生物進化における遺伝子発現機構

必須アミノ酸であるリジンには大きく分けて2種類の生合成経路が知られている。1つは真正細菌や植物にみられる diaminopimelate (DAP) を経由する DAP 経路であり、他方は酵母やカビにおいてみられる α -aminoadipate (AAA) を経由する AAA 経路である。しかしながら、当研究室では、高度好熱性細菌 *T. thermophilus* HB27 株は真正細菌に属するにもかかわらず、必須アミノ酸であるリジンを一般的な真正細菌が行う diaminopimelate (DAP) を経由する DAP 経路ではなく、酵母やカビのように α -aminoadipate (AAA) を経由して生合成していること、さらに AAA 以降の生合成経路は、カビや酵母が行うサッカロピンを経由する AAA 経路とも異なり、アルギニン生合成経路に類似していることを現在までに示してきた [1, 2, 3, 4, 5, 6]。

本菌のリジン生合成酵素遺伝子をクローニングし、その酵素特性を解析することで、本リジン生合成の全体像が酵素機能のレベルで明らかになりつつある。その1つに feedback inhibition 機構が挙げられる。アミノ酸の生合成は、その経路の最終産物による経路の初発酵素、或いは経路分岐直後に位置する鍵酵素をターゲットとした酵素の活性抑制 feedback inhibition と同遺伝子の転写抑制 feedback repression によって流量調節されている。本菌のリジン生合成も一般の生合成に見られるように、最終産物であるリジンによって経路の初発酵素であるホモクエン酸合成酵素が feedback inhibition を受けることが近年の研究によって示されている [7]。

一方で、本菌のリジン生合成に関する転写レベルでの制御機構は現在までに全く明らかにされてこなかった。リジン生合成の調節機構の全貌を明らかにするためには、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。

この Lys クラスターに含まれる遺伝子は polycistronic に転写されており、従ってクラスターの発現は最も 5' 領域に位置する *hcs* 遺伝子上流に存在するプロモーターに依存して発現制御されることが明らかになった (第1章)。そしてこの制御機構は、*hcs*-leader peptide を翻訳する際に regulatory コドンでリボソームが stalling を起こし、mRNA が p-factor 非依存性転写終結構造を形成するという、*E. coli* の *trp* operon で提唱されている attenuation メカニズムに類似したものであることを明らかにした (第2章)。

一方、*Deinococcus radiodurans* は *T. thermophilus* と近縁であり、*T. thermophilus* と同様な経路でリジンを生合成すると考えられている。実際、ホモクエン酸合成酵素 (Hcs) についてアミノ酸配列を比較してみると、63.8 % と高い相同性がある。しかしながら *D. radiodurans* の *hcs* 上流には *T. thermophilus* と同様な leader peptide をコードするような配列は見出せない。進化的に近縁の菌においても全く異なる発現制御機構を有するということは大変興味深く、生合成・代謝系の進化を考える上で今後考慮しなければならない問題の 1 つであろう。

§ 5-2. 推定される *T. thermophilus* のリジン生合成酵素遺伝子発現調節機構

本菌のリジン生合成経路はロイシンやアルギニン生合成経路、そして TCA 回路と類似性を有している (Fig. 0-4)。アミノ酸の生合成は、その経路の最終産物による経路の初発酵素をターゲットとする酵素活性を抑制する feedback inhibition と遺伝子発現を抑制する feedback repression によって流量調節されていることは先に述べたが、本リジン生合成も例に漏れず、生合成最終産物であるリジンによって経路初発酵素であるホモクエン酸合成酵素が feedback inhibition を受けることが当研究室において明らかにされている [7]。本研究によって本菌のリジン生合成においてはもう 1 つの流量調節機構である遺伝子の発現調節機構も存在することが示された。この制御は leader peptide を介する attenuation メカニズムである。一方、Lys クラスターは基本的には polycistronic に転写されているが、*lysW-lysX* 間に複雑な二次構造を取り得る 103 bp の非翻訳領域が存在し、この部位が termination/antitermination に関わる可能性も考えられる (Fig. 5-1)。Lys クラスターはこの部位を境に、上流に *hcs*, *lysT*, *lysU*、そして下流に *lysX*, *lysY*, *lysZ* をコードしており、生合成反応経路ではそれぞれ AAA 上流、下流に分けられる。また、リジン生合成第 3 番目の反応を触媒する酵素をコードする *hicdh* 遺伝子の上流にリジンの有無に依存して発現制御される転写因子が結合する可能性が確認された (第 3 章)。従って、AAA 上流の発現は、リジンを共通のエフェクターとして、*hcs*-leader peptide を介した attenuation メカニズムと、*hicdh* 上流部位に結合する *trans* なメカニズムによって制御されているといえることができる。類似生合成経路で合成されるアルギニンによって、*hcs* の転写が活性化されることが見出されている (第 1 章)。また第 8 番目の反応を触媒する酵素をコードしている *lysJ* 遺伝子に関してはアルギニンによってその転写が抑制されることが見出されている (第 3 章)。この両者については解析が不十分のため、制御機構の詳細は不明である。*lysJ* 上流域には TSP と翻訳開始コドンの間に存在する 100 bp の領域に short peptide をコードし得る ORF が見出され、2 つのアル

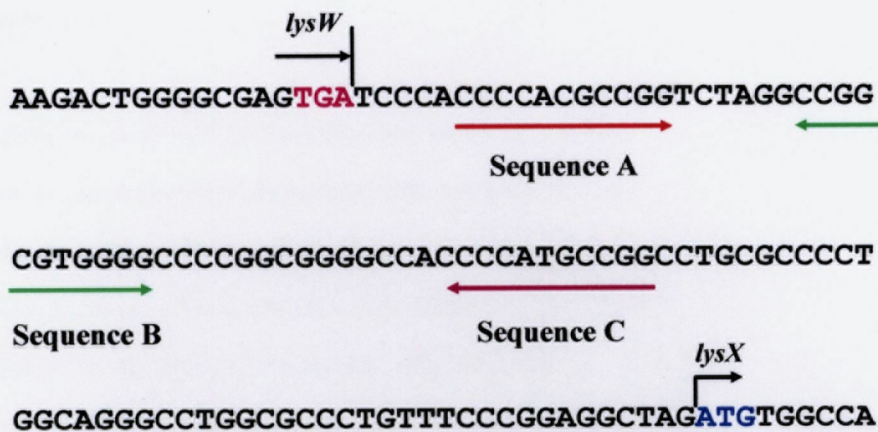


Figure5-1. *lysW-lysX* 間の塩基配列及び複雑な二次構造を取り得ると推測される配列
配列A及びCは配列Bと相補的であり、Bがどちらと塩基対を形成するかによって転写終結の有無が
決定されるかもしれない。

*lysW*の終始コドンはピンクで、*lysX*の開始コドンは青で示した。

ギニンコドンを含んでいることから *hcs* と同様な attenuation があるのかもしれない。また、両者共に ArgR 等アルギニン生合成関連の転写因子が関わっている可能性も考えられる。いずれにしろ、各酵素遺伝子の転写調節を詳細に解析する必要がある。

本研究では、これまでに研究されていなかった *T. thermophilus* HB27 株のリジン生合成関連酵素遺伝子の発現調節機構を解析し、多くの遺伝子を含む Lys クラスターの発現制御を明らかにすることができた。S1-nuclease mapping や reporter assay におけるリジンに対する感受性がほぼ同等であることから、本研究で明らかにした attenuation が同クラスターのリジンによる制御の主因子であるものと考えられるが、同クラスターの発現がアルギニンで活性化されること、さらには他の遺伝子発現調節には複数のメカニズム及びエフェクターが存在する可能性が考えられることより、まだその全貌が明らかになったとは言い難い。これらを1つずつ明らかにすることで *T. thermophilus* のユニークなリジン生合成の全体像、そして他の生合成・代謝系を含めた生命システムにおける進化メカニズム等について新たな知見が得られるものと期待され、本研究がその一助になれば幸いである。

§ 5-3. References

1. Nishiyama, M., et al. (1995) *Microbiology*, **141**, 1211-1219.
2. Kobashi, N., et al. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 1713-1718.
3. Miyazaki, J., et al.. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1864-1871
4. Miyazaki, T., et al.. (2004) *Microbiology*, **150(Pt7)**, 2327-2334.
5. Miyazaki, J., et al.. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 5067-5073.
6. Miyazaki, J., et al. (2002) *FEBS Lett.*, **512**, 269-274.
7. Wulandari, AP., et al. (2002) *FEBS Lett.*, **522**, 35-40.
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=genome&gi=530>

謝辞

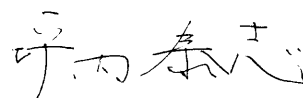
本研究を纏めるにあたり、多くの方々の御指導及び御助言を頂きました。此処に厚く御礼申し上げます。

素晴らしい研究の場を与えて下さり、実験全般のみならず、多方面に渡って御指導御鞭撻頂きました、東京大学大学院生物生産工学研究センター・細胞機能工学部門教授 西山真先生に深く御礼申し上げます。先生の元でなければ斯くも素晴らしい研究は出来得なかったと感じております。また、日々のきめ細やかな御指導を頂きました同研究部門助教授 葛山智久先生に深く感謝致します。加えて、共同研究をしてくださいました順天堂大学大学院・研究基盤センター生体分子研究部門助教授 村山季美枝先生及び同部門助手 峯木礼子先生、高ひかり先生、加賀直子先生、順天堂大学・アトピー疾患研究センター講師 西山千春先生に深く感謝の意を表します。

本研究は東京大学大学院生物生産工学研究センター・細胞機能工学部門において行われました。貴重な御助言を頂き、また有意義な研究生活を送りました同部門卒業生並びに在学生諸氏に感謝致します。

最後になりましたが、長い大学院生活の間にいつも私を励まし、支えてくださった家族に御礼申し上げます。

2005 年 3 月 吉日



論文内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成13年度博士課程 入学
氏名 坪内 泰志
指導教員名 西山 真

論文題目

***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**

Thermus thermophilus は、70 ℃で至適に生育する高度好熱性の真正細菌であり、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といった応用的研究にも広く利用されている。

必須アミノ酸であるリジンには2種類の生合成経路が知られている。1つは真正細菌や植物にみられる diaminopimelate (DAP)を経由する DAP 経路であり、他方は酵母やカビにおいてみられる α -aminoadipate (AAA)を経由する AAA 経路である。しかしながら、*T. thermophilus* は真正細菌に属するにもかかわらず、AAA を経てリジンを生合成していることが当研究室において見出された。加えて、全生合成遺伝子をクローニングした結果、AAA 以前のリジン生合成は酵母及びカビの生合成と同様にロイシン生合成及び TCA 回路の一部と類似していること、そして AAA 以降の生合成は酵母やカビで見られるようなサッカロピンを中間体とする生合成とは異なり、アルギニン生合成と類似していることが明らかとなり、本リジン生合成系が関連する生合成・代謝系進化を解明する鍵となるものと考えられる。

本菌のリジン生合成酵素遺伝子をクローニングし、その酵素特性を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が、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、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主要遺伝子クラスターを中心とした転写調節機構の解析を行った。

I. リジン生合成主要遺伝子クラスターの転写単位解析及び転写開始点の決定

本菌のリジン生合成には 11 の遺伝子に関与すると考えられるが、そのうち 7 つはクラスター (Lys クラスター) を形成している。リジン生合成酵素遺伝子の大半を含むこのクラスターの発現制御メカニズムを明らかにすることにより、リジン生合成における遺伝子発現の主要な部分を明らかにすることが出来ると考えられることから、このクラスターの発現制御機構を解析することにした。まず、このクラスターに含まれる遺伝子の転写単位を解明するために RT-PCR を行った。最小培地で生育させた *T. thermophilus* から抽出した Total RNA を鋳型とした結果、全遺伝子の連結部位で増幅が観察された。この結果より、これらの遺伝子は polycistronic に発現していることが明らかになり、Lys クラスターの発現がその最上流に位置する homocitrate synthase 遺伝子 (*hcs*) の発現調節に依存することが示唆された。そこで S1-mapping により *hcs* の転写開始点 (TSP) の解析を行ったところ、TSP は *hcs* 開始コドンの 111 bp 上流のアデニン残基であると決定された。また、その転写量は、リジン存在下で培養した条件では減少していたことから、リジンによる転写制御の存在が示唆された。

II. *T. thermophilus* を宿主とする reporter assay 系の構築とそれを用いた転写制御機構の解析

TSP から *hcs* 開始コドンまでの配列は、複雑な二次構造を取り得るのに加えて、Lys コドンを tandem に有する leader peptide 様 ORF (*hcs-leader*) をコードする可能性が示唆され、これが転写制御を担っている可能性が考えられた。そこで *hcs-leader* 部分がリジンによる Lys クラスターの発現調節に関与するか否かを解析することにした。*T. thermophilus* は遺伝子操作系が確立しているものの、転写制御機構の解析に適した reporter assay 系は存在していなかったため、まずレポータープラスミドの構築を行った。 α -galactosidase をコードしている *agaT* を knockout した *T. thermophilus* OF1053GD 株を宿主として *Bacillus stearothermophilus* 由来の耐熱性 α -galactosidase をコードする *agaA* をレポーター遺伝子として有する plasmid を構築した。プロモーターを含む *hcs* 上流配列を構築したレポータープラスミドの *agaA* 上流に組み込み、 α -galactosidase 活性を調べた結果、リジン存在下では α -galactosidase 活性が 1/4 まで減少した。一方で、*hcs* プロモーターを含むものの *hcs-leader* を除去した場合には、そのような活性の低下は観察されなかった。加えて、*hcs-leader* 内に存在する tandem なリジンコドンをグルタミンコドンに置換したものをを用いた場合にはリジンによる活性の低下は観察されなくなる一方、グルタミンによる活性の低下が観察され

るようになった。これらの結果より、*hcs-leader* が、そしてとりわけその内部に存在する tandem なリジンコドンがこの Lys クラスターの転写調節機構に重要な役割を担っていることが明らかになった。

III. *hcs-leader* の検出

転写調節メカニズムには activator/repressor 等の *trans* な因子によるものの他に、配列に依存する *cis* の調節メカニズムが存在する。後者の代表的なものに、大腸菌の *trp operon* で提唱された “classical” な attenuation mechanism と近年見出された riboswitch がある。riboswitch が mRNA の 5'-UT 領域が直接的にエフェクターと結合することによる転写制御であることから、両者の主たる相違は、leader 領域が翻訳されるか否かであるといえる。これまでの結果より、本菌の Lys クラスターは翻訳と couple した leader peptide を介する “classical” な attenuation による発現調節機構の制御下にあると推察されたが、TSP と *hcs-leader peptide* の推定開始コドンとの間は僅か 3 bp であり、SD 配列は見出されない。したがって、*hcs-leader peptide* が本当に産生されていることを示す必要があるものと考えられた。このことを証明するために、*hcs-leader* 配列が *agaA(his)₈* に fuse した融合タンパクを発現するプラスミドを構築し、*T. thermophilus* OF1053GD で融合タンパク質の生産を調べることにした。同形質転換体は α -galactosidase 活性を示し、その活性はリジンを添加することにより抑制されたことから、リジンによる制御が構築したプラスミドにおいても働くことが分かった。次いで、この fusion-AgaA を精製し、トリプシン処理後に TOF-MS で解析を行った。その結果、*hcs-leader* 由来の配列が得られたことから、*hcs-leader* が peptide として実際に *T. thermophilus* で発現していることが明らかとなった。以上の結果から、Lys クラスターの発現制御は “classical” な attenuation mechanism によるものであることが明らかになった。

IV. Lys クラスター以外に属するリジン生合成酵素遺伝子の発現調節機構の解析

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、*hichd*, *lysN*, *lysJ* 及び *lysK* の 4 つである。とりわけ配列解析から *lysJ* と *lysK* はクラスターを形成している可能性が示唆されたため、このクラスターについても発現制御解析を行った。S1-mapping により *lysJ* の TSP 解析を行った結果、*lysJ* 開始コドンの 100 bp 上流のグアニン残基であると決定された。またその転写量は、*hcs* とは異なりリジンではなくアルギニン存在下で培養した条件で減少していたことから、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* 開始コドンまでの配列がアルギニンを介した転写制御を担っている可能性が考えられる一方、*T. thermophilus* の細胞抽出液を用いたゲルシフトアッセイにより、プロモーター付近に結合するタンパク質の存在が示されたことから、*lysJ-lysK* クラスターは上述した Lys クラ

スターよりも複雑な転写制御を受けている可能性が考えられた。

V. 総括

本研究において、*T. thermophilus* のリジン生合成酵素遺伝子の発現制御機構の解析を行い、その大半を含む Lys クラスターが大腸菌の *trp operon* で提唱される “classical” な attenuation mechanism に類似した機構で転写調節されていることを示した。また本研究では、制御機構で鍵となる leader peptide の発現を証明することに成功したが、私が知る限りこれは同様な leader peptide を介した attenuation mechanism の中で、それを直接的に証明した初めての例といえる。本研究で作製した reporter assay 系を用いることで、他のリジン生合成の酵素遺伝子の解析が容易になるものと考えられ、まだ不明な点も多い AAA を介する *T. thermophilus* のリジン生合成の全貌が明らかにされるものと期待される。