

第1章 *T. thermophilus* 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

§ 1-1. Introduction

本研究で取り扱っている *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) を経由せず、酵母やカビと同等に α -aminoadipate (AAA) を経由して生合成すること、さらに AAA 以降は、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が現在までに当研究室で明らかになっている [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]。

アミノ酸の生合成は通常、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した、酵素レベルでの活性抑制である feedback inhibition と転写レベルでの抑制である feedback repression によって流量調節がなされている。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 を受けることが当研究室の Wulandari らの研究によって示された (Fig. 1-1) [8]。

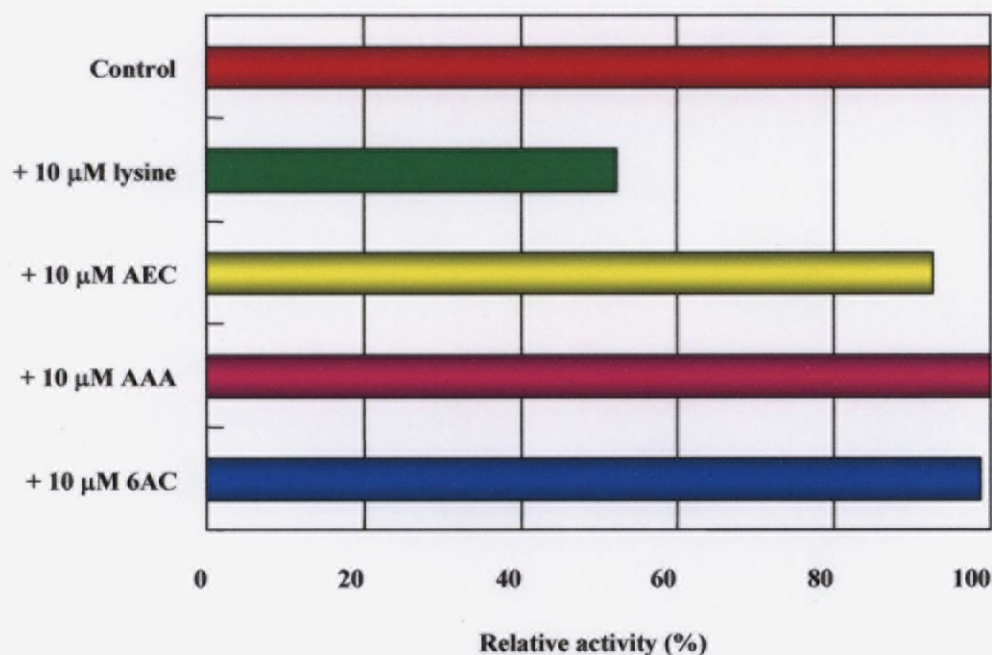


Figure 1-1. リジン及びその関連化合物の Hcs 活性に対する影響 (Wulandari, AP., *et al* より)
添加化合物 (additive) 非存在下での活性を 100 % とし、その相対活性として
additive 存在下における活性を算出した。

AEC, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine; AAA, α -aminoadipate; 6AC, 6-aminocaproate

しかしながら本リジン生合成の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いない。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。

そこで本研究は、リジン生合成の転写レベルでの発現調節機構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 11 の構造遺伝子のうち、7 つを含んでいるリジン生合成酵素遺伝子クラスター（Lys クラスター）の転写発現調節機構の解析を目的とした。

本研究の研究対象である Lys クラスターは、その塩基配列が決定されているだけで実際の転写単位に関する知見は全く得られていなかったことから、本章では先ず、その転写単位に関する研究を行うことにした。さらに転写単位に関する結果を受けて、Lys クラスターの転写におけるリジンの影響を調べると同時に、新たなレポーターアッセイ系の構築及びそれを用いて明らかになった Lys クラスター転写機構の概要について述べる。

§ 1-2. Materials and Methods

§ 1-2-1. RT-PCR

(a) Total RNA の調製

高度好熱性細菌 *T. thermophilus* HB27 株を TM medium[9, 10] に植菌し、70 °C で 12 時間前培養した。この前培養液から集菌した菌体を、最小培地 (MM 培地) [9, 10] 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 % になるように植菌し、70 °C で 16 時間振盪培養した。集菌後、約 5×10^9 cell ずつに小分けして -80 °C で保管し、必要に応じて Total RNA を抽出することにした。Total RNA の抽出は 40 µg/ml の lysozyme 溶液で溶菌させた後、RNeasy® Minikit, QIA shredder™ (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出した Total RNA サンプルは吸光度測定、及びアガロース電気泳動に供することで確認した (data not shown)。

(b) Reverse transcription

逆転写反応に用いた合成オリゴヌクレオチドは、遺伝子特異的プライマーとして合成オリゴヌクレオチドを塩基配列に基づいて設計し (Fig. 1-2)、Table 1-1 にまとめて示した。12 µl の前反応液 (10 pmol プライマー, 40 nmol dNTPs) を 65 °C で 5 分間ブレインキュベートし、予め調製しておいた 8 µl の逆転写反応液と十分に混合した。その後、65 °C で 1 時間反応させることで、逆転写反応を行った。またコントロールとして、逆転写酵素を含まない逆転写反応液とも同条件で逆転写反応を行った。尚、逆転写反応には、Thermoscript™ (Invitrogen) を用いた。

(c) RT-PCR サイクル条件の検討

予備実験として、逆転写反応後の PCR における最適増幅サイクル数を決定するために、恒常的に発現している 16SrRNA の遺伝子特異的プライマーを用いてサイクル数の決定を行った。使用した primer は Table 1-1 に示した。PCR は Ex-taq (TaKaRa) を用いて以下に示したプログラムを用いて行った。

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

サイクル数の X は 5, 10, 13, 15, 18, 20, 23, 25, 28 を示し、同サイクル数で増幅効率を比較した。

Detection value はフリーソフトである Image J[11] を用いて算出した。尚、本実験で行った逆転写反応は上記の通りである。

Table 1-1. RT-PCR に用いた primer 一覧

Primer Name	Sequence
hcs-lysT/F	5'-CTCCACTACGGGGAGGAGGAG-3'
hcs-lysT/R	5'-GCTTCCGGCGATGGAGTCCAC-3'
lysT-lysU/F	5'-CGGGGGCGCATGGGGGCCCCG-3'
lysT-lysU/R	5'-CCTCAAGTGGGCGAAGGCGTA-3'
lysU-lysV/F	5'-GGGGAGGAGCGCTTTGCCCTCCGTCCCCCG-3'
lysU-lysV/R	5'-CAGGAAGGCCCCGCAGGCCTCGCACTCCAG-3'
lysV-lysW/F	5'-CTGCCCCCGCTGCGGCCACACCTTTGAGGT-3'
lysV-lysW/R	5'-CAAGGGGTCAAGCCCCACCACTCAAGCTC-3'
lysW-lysX/F	5'-GAGAACCCGGAGCTTGCGGAG-3'
lysW-lysX/R	5'-GCCCAGGACCATGGGGAGGGC-3'
lysX-lysY/F	5'-AGTCGGAGCGGGGGCTTTTGGTCAACGAGG-3'
lysX-lysY/R	5'-CGCGAAGCGCCTCGAGGTCACCTTCTTCAC-3'
lysY-lysZ/F	5'-TCCACCGCTACCCCGACCCCGTTTCGTCC-3'
lysY-lysZ/R	5'-GCCGCAGTAGACCATCTCAAAGATCTCCAG-3'
16S-cont.F	5'-GAAGGGGAGGCGGCCCGGCAGCACCTCATT-3'
16S-cont.R	5'-CATGTGGACCGGGATGCGGATGGTGCGGGC-3'

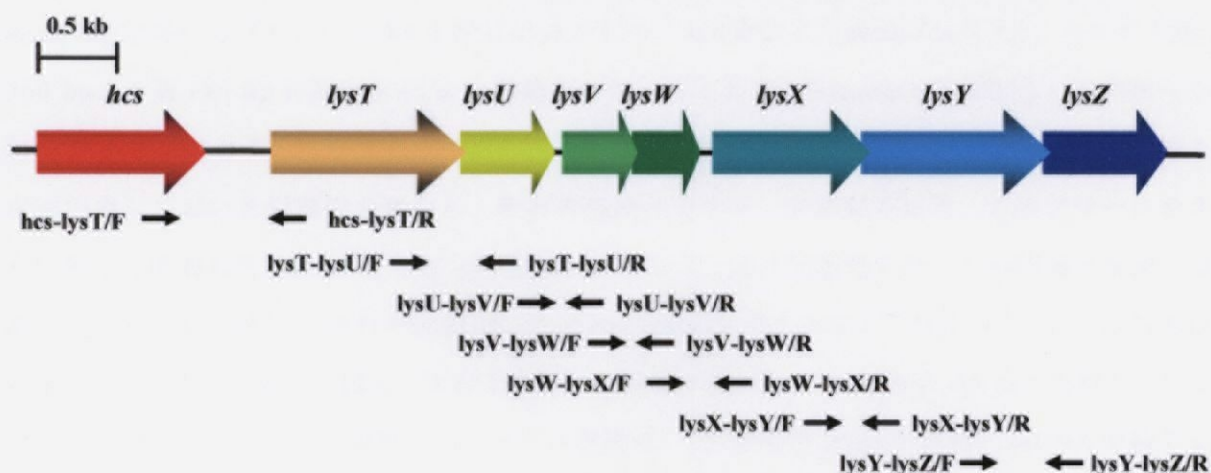


Figure 1-2. Lys クラスターと RT-PCR primer の位置関係

RT-PCRに用いた各プライマーの組合せを示した。
それぞれの組合せは各ORF間のコネクタ部位を挟むように設計した。

(d) PCR

逆転写反応後のPCRはEx-*taq*を用いて以下に示したプログラムで増幅を行った。

94 °C, 5 min → (94 °C, 30 s → 65 °C, 30 s → 72 °C, 1 min) × 20 cycle → 72 °C, 7 min → 4 °C, ∞

増幅反応後のサンプルはアガロース電気泳動に供し、増幅バンドを検出した。尚、使用したprimerはTable 1-1にまとめて記した。

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

T. thermophilus HB27 株は、文献 [2, 9, 10] 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 °C 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。

§ 1-2-3. S1-nuclease mapping

(a) single strand DNA 及び sequence ladder の調製

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 single strand DNA (ssDNA) を用いた。解析に要する遺伝子断片 *hcs* (-360/+180) 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、*hcs* 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 °C、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 °C 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 100 µl 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 20 µl 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 ³²P で標識した *hcs*(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 1-2 に示した。

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

Table 1-2. S1-nuclease mapping に関連する primer 一覧

Primer Name	Sequence
hcs(S1-Fw)-probe	5'-CGGGATCCCGGAGGACATCGCCCGCCACCT-3'
hcs(S1-Rv)-probe	5'-GGAATTCGAGGACCTCGGCGTCCTTGCGGGAC-3'
hcs(S1-Rv)-ladder	5'-GAGGACCTCGGCGTCCTTGCGGGAC-3'

(b) プローブ DNA の調製

hcs 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 (Fig. 1-3)。 *T. thermophilus* HB27 株のゲノム 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 1-2 に示した。

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

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 -³²P]ATP を除去し、sense 鎖の 5' 末端リン酸基を除去することでノイズを低減するために *Bam*HI で消化した。*Bam*HI 処理後に Microspin G-25 column で消化小断片を除去したものを S1-nuclease mapping のプローブ、*hcs*(-360/+180) とした。

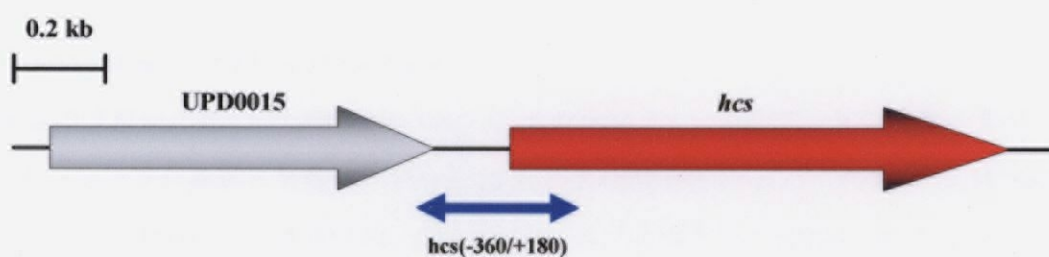


Figure 1-3. *hcs* TSP をターゲットとした S1-nuclease mapping 用の probe 設計

Hcs 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。

(b) プローブ DNA の調製

hcs 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 (Fig. 1-3)。 *T. thermophilus* HB27 株のゲノム 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 1-2 に示した。

94 °C, 5 min → (94 °C, 30 s → 65 °C, 30 s → 72 °C, 1 min) × 30 cycle → 72 °C, 7 min → 4 °C, ∞
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 -³²P]ATP を除去し、sense 鎖の 5' 末端リン酸基を除去することでノイズを低減するために *Bam*HI で消化した。*Bam*HI 処理後に Microspin G-25 column で消化小断片を除去したものを S1-nuclease mapping のプローブ、*hcs*(-360/+180) とした。

(c) Total RNA の調製

T. thermophilus HB27 株を TM medium に植菌し、70 °C で 12 時間前培養し、菌体を集菌した後に MM 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を、そして終濃度が 5 mM になるようにアルギニンを添加して、引き続き 70 °C で 16 時間振盪培養した。集菌後、約 5×10^9 cell ずつに小分けして -80 °C で保管し、必要に応じて Total RNA を抽出した。Total RNA は 40 μ g/ml の lysozyme 溶液で溶菌させた後、QIAGEN 社の RNeasy® Minikit 及び QIA shredder™ 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 μ g 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 μ l の S1-hybridization バッファー (3 M NaOAc, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM HEPES, pH7.4) 中 80 °C で溶解変性させた後、45 °C まで下げた後 16 時間保温することで行った。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 (2 M NaCl, 20 mM ZnSO₄, 0.3 M NaOAc, pH4.6) 中で 37 °C, 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 (富士フイルム) を用いてシグナルを検出した。

§ 1-2-4. reporter gene assay

(a) reporter gene assay プラスミドの構築

遺伝子の基本的な操作は文献 [12] に従って行った。pOF5714[13, 14] を *Bgl*II-*Eco*RI で、約 5.5 kb の L-fragment と約 2.5 kb の S-fragment に消化した。この 2 断片をそれぞれ pET26b(+) に繋げ換え、pET26-L、pET26-S を作製した。pET26-S は以降の操作における利便性を考慮して、部位特異的変異（部位特異的変異）により *Nde*I site を欠失した pUC18Nd(-) に繋げ直した (Fig. 1-4)。この操作によって得られたプラスミドを p18Nd(-)-S と命名した。構築したプラスミド、p18Nd(-)-S に部位特異的変異を施し、*agaA* 内部の *Nde*I site を消去すると共に *slpA* プロモーター上流に *Not*I site を導入した (Fig. 1-5)。解析対象配列を繋ぎ変えた p18Nd(-)-S' から S-fragment を取り出すために *Bgl*II-*Eco*RI で消化し、同処理で pET26-L から取り出した L-fragment、そして *Eco*RI 後に脱リン酸化した pUC18 の 3 断片で ligation 反応を行った (Fig. 1-6)。

(b) 解析対象配列のサブクローニング

PCR で増幅させた断片は、クローニングベクター pBlue Script I IKS(Stratagene) に繋げ、DNA シーケンサーを用いてその塩基配列を確認した。確認の取れた配列を p18Nd(-)-S' に組み込み、レポータープラスミドの構築を進めた。PCR を行うにあたり用いたプライマーは、Table 1-3 に示した。構築した配列の概念図を Fig. 1-7 に示すと共に構築したプラスミドの詳細を Table 1-4 に記した。

(c) レポータープラスミド保持菌株の培養

構築したプラスミドを用いて *T. thermophilus* OF1053GD (Aga^T, Gal⁺, Km^s) を形質転換した。レポータープラスミドと挿入した配列の特徴の関連を Table 1-4 に示した。

50 µg/ml の Km を含む TM 寒天培地で選択した形質転換体を、同液体培地を用いて 60 °C で 16 時間振盪培養した。遠心分離によって集菌した菌体を、MM 液体培地で 4 回洗浄し、この菌体を MM 液体培地で再懸濁し前培養液とした。この前培養液を、50 µg/ml の Km を含む TM 培地に終濃度 0.5 % になるように植菌し、OD₆₀₀ ≒ 0.4 になるまで 60 °C で培養した。アミノ酸やアナログ等の additive を加える場合はこの時点で添加し、さらに 4 時間、60 °C で培養を継続した。培養後の菌体を超音波破碎し、遠心分離で細胞粗抽出液を得た。この細胞粗抽出液のタンパク定量 [18] を行った後、1 mg/ml のタンパク溶液に調製した。

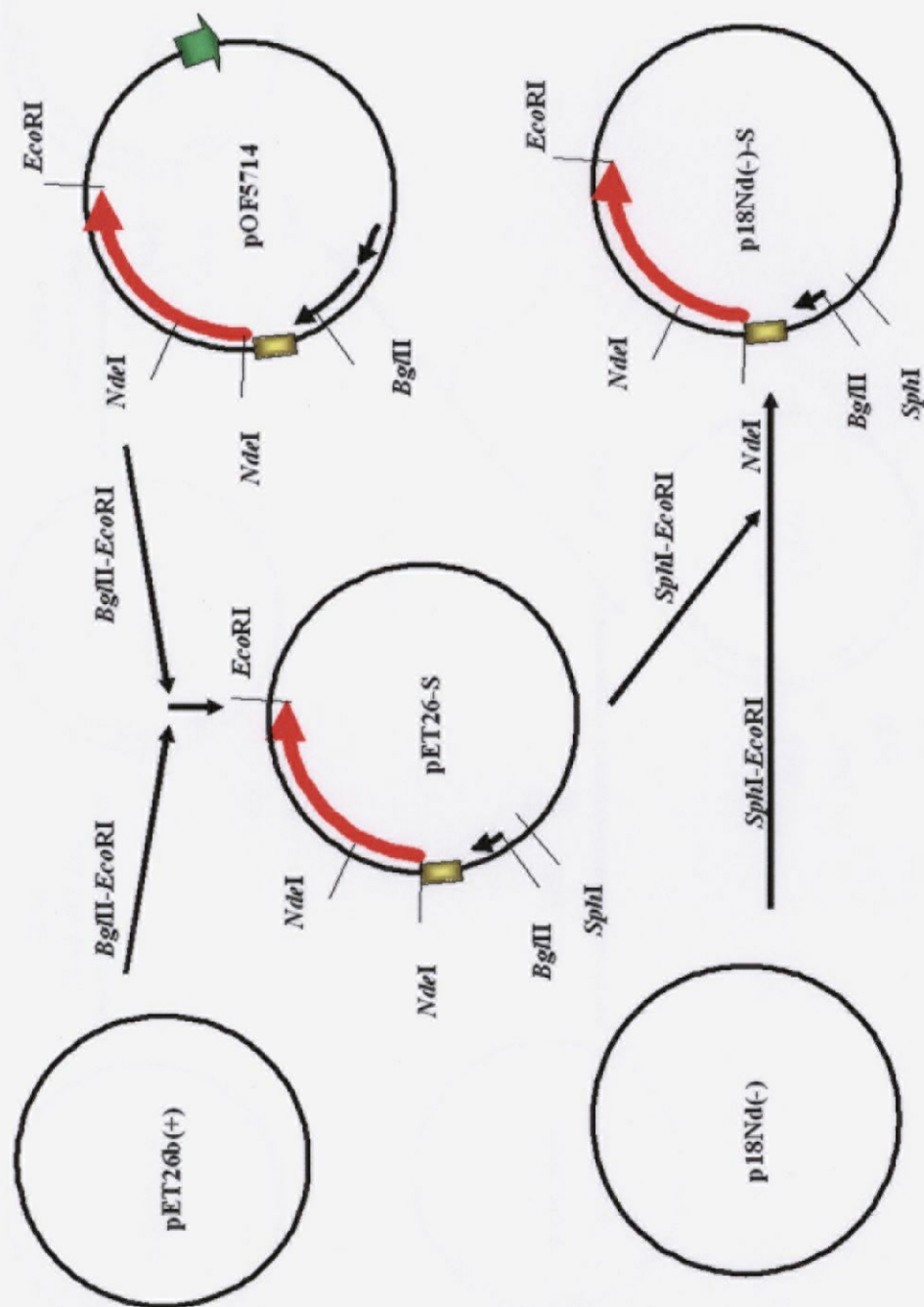


Figure 1-4. レポータープラスミド構築 1

SDMを施す前段階として、*agaA*を含む領域をp18Nd(-)に連結した。

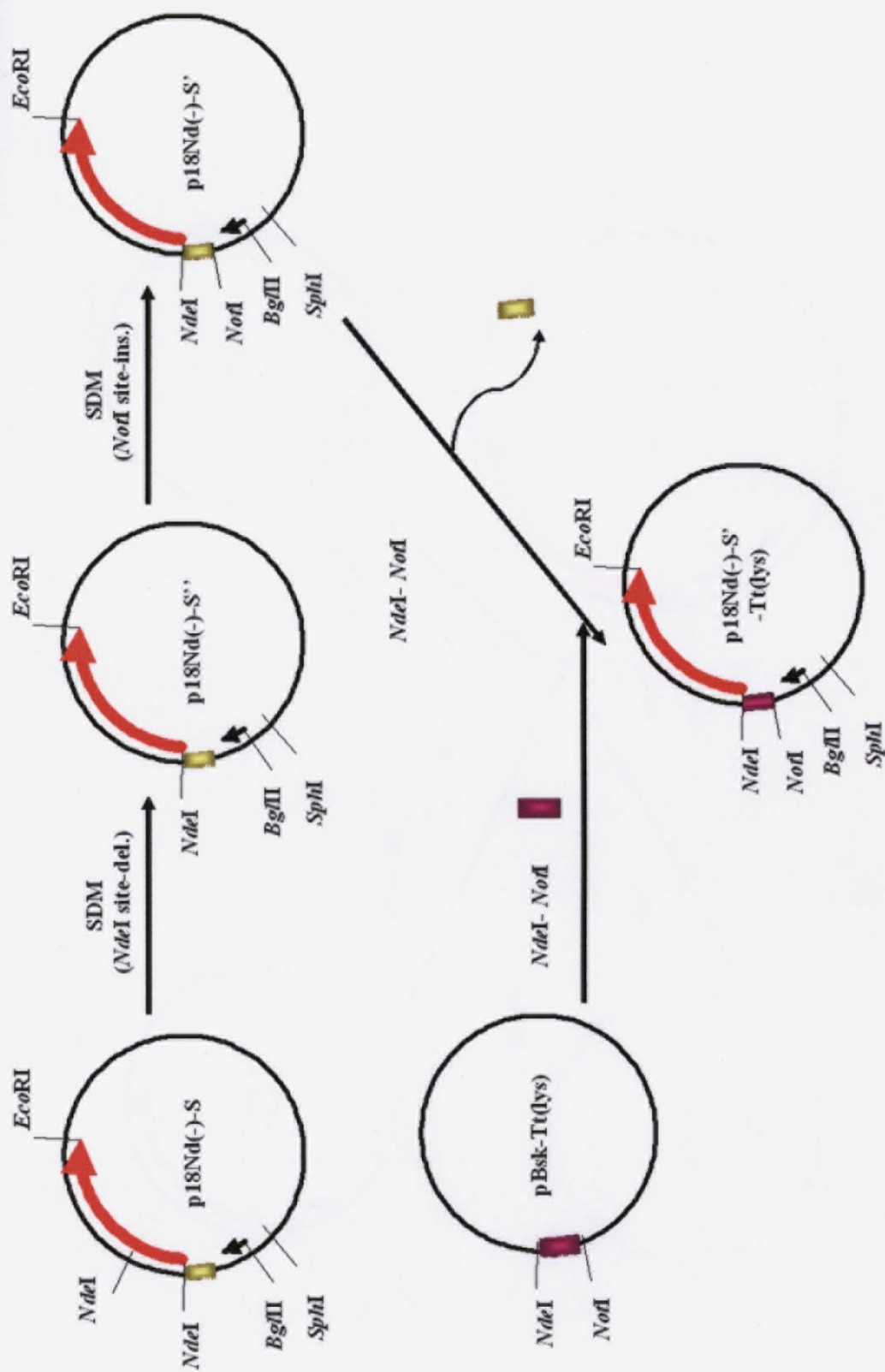


Figure 1-5. レポータープラスミド構築 2

SDMによって *agaA* 内部の *NdeI* site を欠失、そして *slpA* promoter 上流に *NodI* site を導入した。

この処理によって *NodI*-*NdeI* site を設けた解析断片が挿入可能となり、容易にプラスミドを再構築することが出来るようになる。

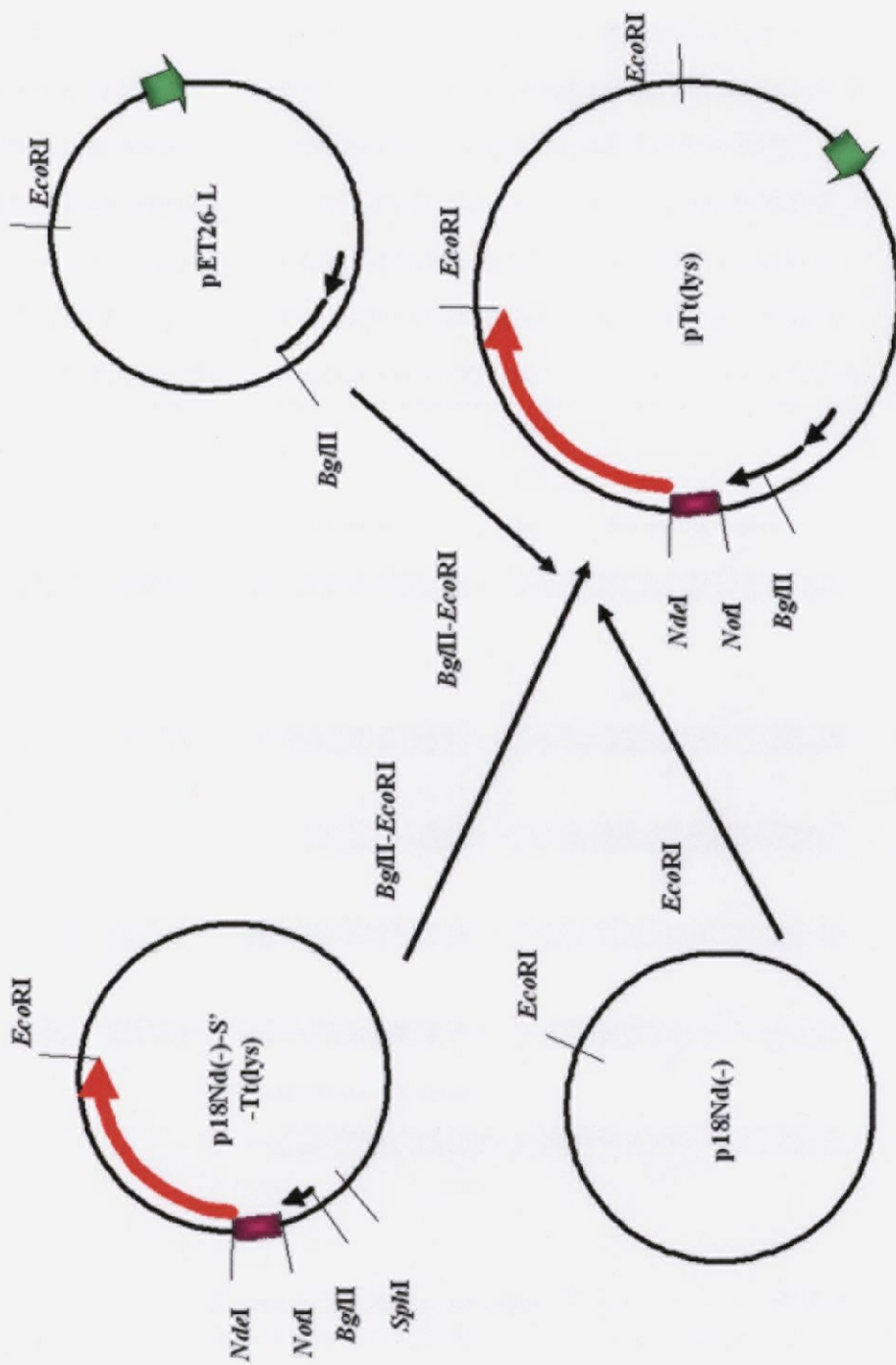


Figure 1-6. レポータープラスミド構築 3

目的断片を挿入したプラスミドから pOF5714-S 断片を切り出し、pOF5714-L 及び p18Nd(-) と連結し、レポータープラスミドを構築する。

Table 1-3. サブクローニングに用いた primer 一覧表

Primer Name	Sequence
pTthcs-plp (Fw)	5'-AAGGAAAAGCGGCCGCGAGGAGCTACCAGGCC-3'
pTthcs-plp (Rv)	5'-GGAATTCCATATGCACCCCTCCAAAAGAAAAC-3'
pTthcs-p Δ lp (Fw)	5'-AAGGGGGAGGGGTGCATATGGAATTCC-3'
pTthcs-p Δ lp (Rv1)	5'-CCTCCCCCTTGCCCGTAAGGGTATACGAAAC-3'
pTthcs-p Δ lp (Rv2)	5'-GGAATTCCATATGCACCCCTCCCCCTT-3'
pTthcs[K ₂ /Q ₂]-plp (Fw)	5'-CTGGCCCGCGCGCAGCAGCTCGGCCGCCGG-3'
pTthcs[K ₂ /Q ₂]-plp (Rv)	5'-CCGGCGGCCGAGCTGCTGCGCGCGGGCCAG-3'
pTthcs[K ₂ /K ₂]-plp (Fw)	5'-CTGGCCCGCGCGAAGAAGCTCGGCCGCCGG-3'
pTthcs[K ₂ /K ₂]-plp (Rv)	5'-CCGGCGGCCGAGCTTCTTCGCGCGGGCCAG-3'

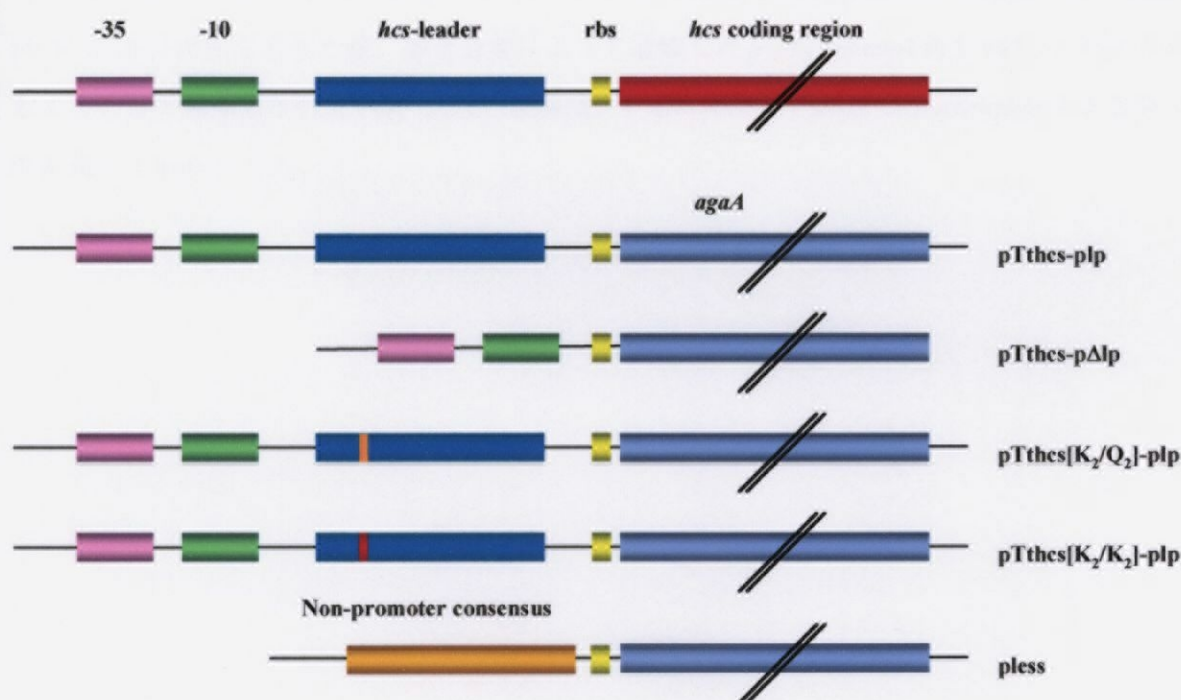


Figure 1-7. Reporter assay 解析用プラスミドの構造

agaA 上流にプロモーター配列を含む *hcs* 上流を挿入した。さらに *hcs*-leader を欠失した配列、*hcs*-leader 内のリジンコドンに SDM を施した配列、そして negative control として、プロモーター配列を含まない配列を挿入した。

Table 1-4. Reporter assay に用いたプラスミド及びその特徴

プラスミド名	<i>agaA</i> の前に挿入した配列の特徴
pTtspA-p	S-layer protein A promoter 配列
pless	promoter consensus を含まず
pTthcs-plp	<i>hcs</i> -leader 及びその上流 promoter 配列
pTthcs-pΔlp	pTthcs-plp から <i>hcs</i> -leader 部位を欠失
pTthcs[K ₂ /Q ₂]-plp	<i>hcs</i> -leader 内の[AAAAAA]配列を[CAGCAG]に置換
pTthcs[K ₂ /K ₂]-plp	<i>hcs</i> -leader 内の[AAAAAA]配列を[AAGAAG]に置換

(e) α-galactosidase 活性測定

α-galactosidase 活性は、10 μl の 1 mg/ml の菌体粗抽出液を予め 60 °C で 5 分間インキュベートした assay buffer (0.1 M HEPES, pH7.5, 10 mM 4-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside) 中に添加し、60 °C で 10 分間反応させた後、加水分解によって遊離した *p*-nitrophenol 量を 405 nm の波長を測定することで算出した [13, 14]。活性の定義は、1 分間あたり 1 μmol の *p*-nitrophenol を遊離する酵素量を 1 unit とした。

§ 1-3. Results

§ 1-3-1. RT-PCR における最適増幅回数の決定

PCR サイクル数と増幅効率の関連性を表した結果を Fig. 1-8 に示した。この結果から 20 サイクルを最適サイクル数として適用した。

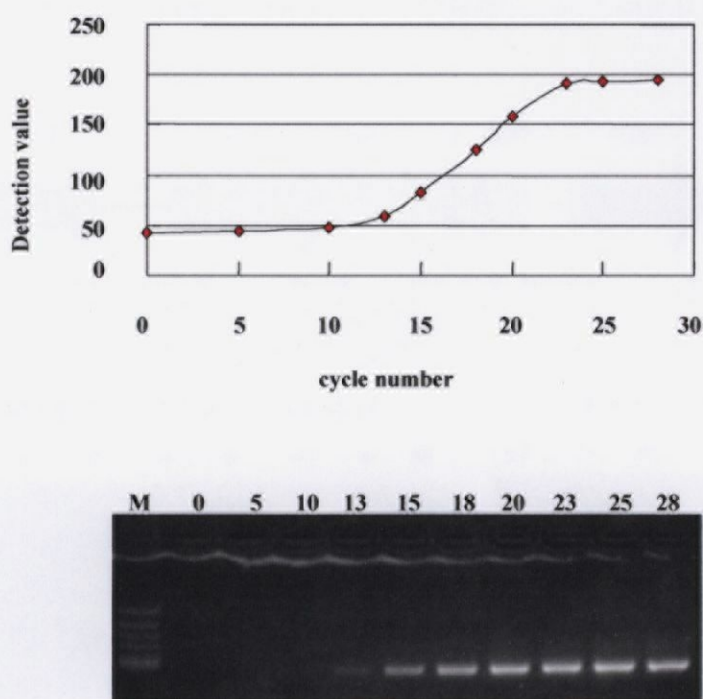


Figure 1-8. RT-PCR におけるサイクル数の条件検討

恒常的に発現している 16S rDNA の内部配列でプライマーを設計し、サイクル数の条件検討を行った。

アガロースゲル電気泳動後、NIH のソフトウェアである Image J で増幅効率を算出した。

§ 1-3-2. Lys クラスターにおける転写単位の解析

RT-PCR の結果を Fig. 1-9 に示す。 *hcs-lysT*, *lysT-lysU*, *lysU-lysV*, *lysV-lysW*, *lysW-lysX*, *lysX-lysY*, *lysY-lysZ* それぞれの ORF 間の全てのコネク特部分において、DNA 増幅断片が検出された。逆転写反応を行っていない negative control においてはそのような増幅断片が検出されていないため、先の DNA 増幅断片は mRNA に由来すると判断した。この結果は本リジン生合成関連酵素遺伝子のクラスターは polycistronic に転写されていることを示しているのと同時に、*hcs* の上流に存在するプロモーターに依存して、リジン生合成関連酵素遺伝子の発現が調節されることを示している。そのため、*hcs* のプロモーターの制御について引き続き解析を行った。

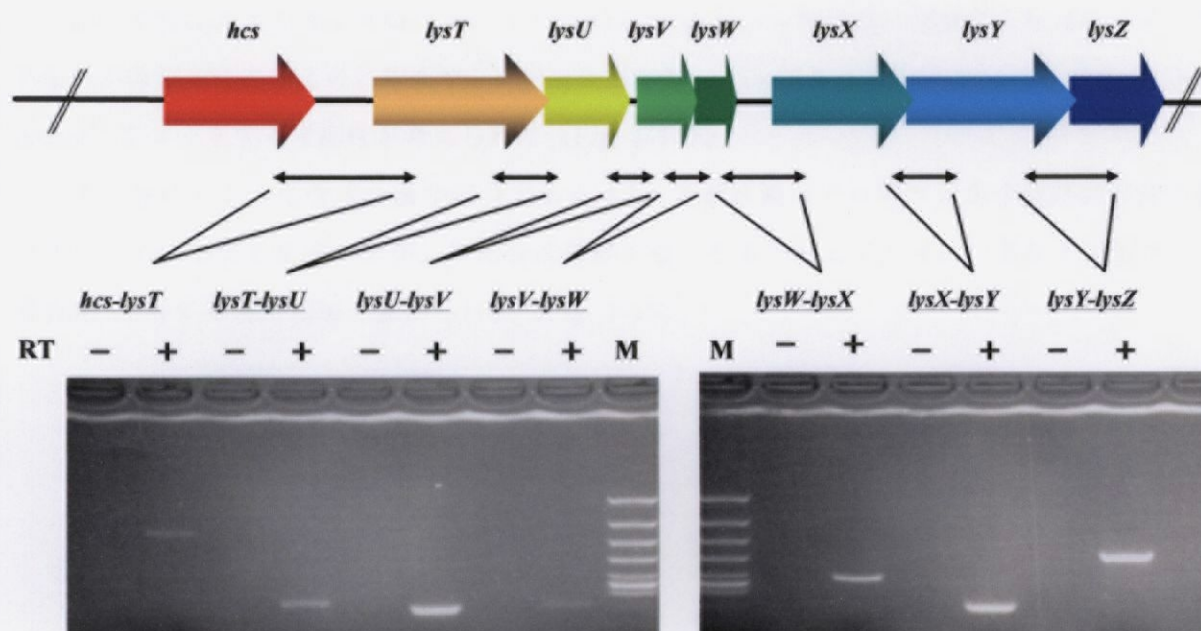


Figure 1-9. 転写単位の解析

最小培地で培養した *T. thermophilus* から抽出した Total RNA を鋳型として RT-PCR を行い、Lys クラスター内に含まれる 7 つの構造遺伝子の転写単位解析を行った。

-, without reverse transcriptase; +, with reverse transcriptase

§ II-3-3. S1-nuclease mapping による *hcs* 転写開始点の解析

hcs に対する S1-nuclease mapping の結果を Fig. 1-10 に示す。共に泳動した sequence ladder から、*hcs* の転写開始点はアデ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アデニン残基は、*hcs* 翻訳開始点の 111 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, TACCCT) が見出された (Fig. 1-11)。また、その転写量は、リジン存在下で培養した条件では顕著に減少していたことから、本菌のリジン生合成も他のアミノ酸生合成等 [19, 20, 21, 22, 23] に見られるような、最終代謝産物による転写制御である feedback repression の機構が存在するものと考えられる。

この転写開始点から *hcs* 開始コドンまでの 111 bp からなる配列は、複雑な二次構造を取り得る配列が数箇所存在するのに加えて、リジンコドン tandem に有する leader peptide 様 ORF (*hcs*-leader) をコードする可能性が考えられた (Fig. 1-11)。

一方、先にリジン生合成の後半部分である AAA 下流経路はアルギニン生合成経路の前半部と類似していることを述べたが、同姓合成経路の最終産物であるアルギニン存在下で培養した場合に、*hcs* 転写量の増加が認められた (Fig. 1-10)。

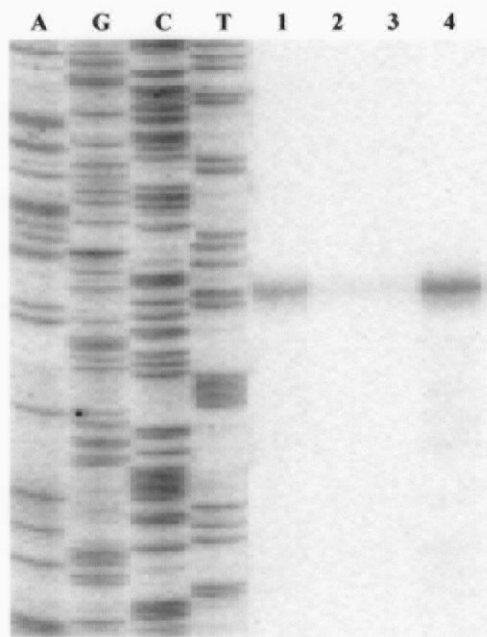


Figure 1-10. S1-nuclease mapping による *hcs* 転写開始点の同定
A, G, C, T; ssDNA を鋳型として作製した sequence ladder, 数字はサンプルとして用いた
Total RNA を抽出した *T. thermophilus* の培養条件。
1, MM medium; 2, MM + 1 mM lysine; 3, MM + 5 mM lysine; 4, MM + 5 mM arginine

GGGAGAGGCGGTTTGGGCGTTGACAACTCGCGGCGTTTCGTATACCCTTACGGGC

TSP

AAGAUGCUGGCCCCGCGCGAAAAAACUCGGCCGCCGGGGGGGUAGGAUAGCCCUCCA

MetLeuAlaArgAlaLysLysLeuGlyArgArgGlyValGlytrm

AGGGCUUCUUAUCCCCCGGGCCCGGGUUCGGGCCGGUUUUCUUUUGGGGAGGGG

hcs

TGCATG



Figure 1-11. *hcs* 上流の塩基配列

-35, -10推定プロモーター配列は下線で、同定されたTSPであるアデニン残基は青色で示した。

また様々な色のボックスで囲んだ配列は、複雑な二次構造を取り得る配列である。

さらに、*hcs*-leaderは矢印で、その内部に位置する推定 regulatory codon であるリジンコドンは赤色で示した。

§ 1-3-4. *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

(a) reporter assay 用宿主 *T. thermophilus* OF1053GD 株 (Aga^T, Gal⁺, Km^s) について

Lys クラスターの発現調節機構に対する *hcs*-leader 部位の関連性を解析するためには、reporter assay が最適な手法であると考えられる。しかしながら *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 系は開発されていなかったため、assay 系そのものを構築する必要があった。Assay 系を構築する上で重要な要素としてレポーターの選択がある。本菌の assay 系に要求されるレポーターの条件は、測定が簡便であることに加えて、何よりも耐熱性を有さなければならない。この条件を満たすレポーターとして、近年耐熱性酵素として応用研究がなされていた、 α -galactosidase を採用した (Fig. 1-12) [25]。

reporter assay を行うにあたり、内在性 α -galactosidase を欠失した株、*T. thermophilus* OF1053GD 株を Dr. Fridjonsson、Dr. Mattes より頂いた。この欠失株 OF1053GD は *T. thermophilus* HB27 株を親株とするその誘導体 *T. thermophilus* TH125 を基に作られたもので、 α -galactosidase 活性を有さず (Fig. 1-14)、且つ α -galactosidase 構造遺伝子である *agaT* をノックアウトした際に利用したカナマイシン耐性遺伝子 (*kut*) をもダブルノックアウトで潰してあるため、50 μ g/ml のカナマイシンを含む TM 培地では生育しないことが示された (Fig. 1-13)。

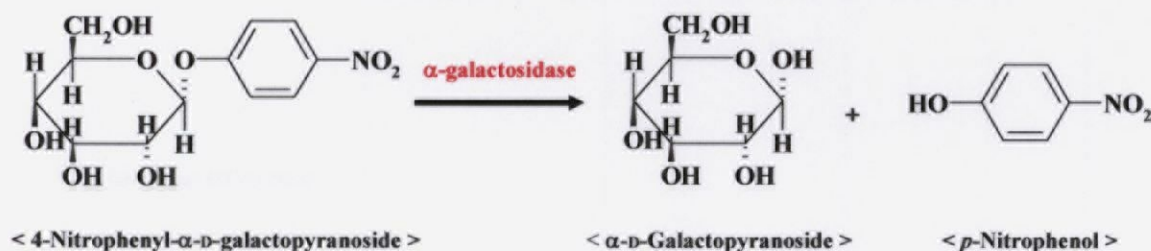


Figure 1-12. α -galactosidase 反応

p-Nitrophenol の吸光波長 405 nm で遊離された *p*-Nitrophenol 量を測定する。

本実験で用いた *B. stearothermophilus* 由来 α -galactosidase の至適温度は 60 °C である。

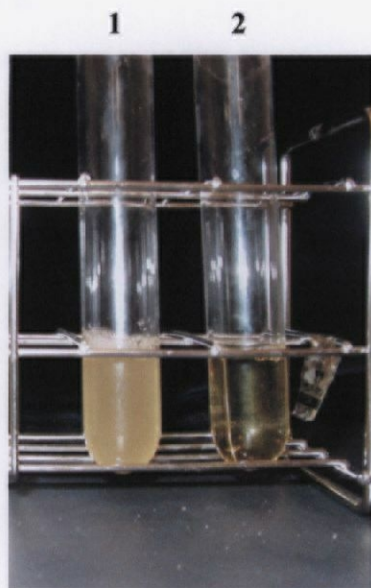


Figure 1-13. *T. thermophilus* OF1053GD 株の生育確認

1, *T. thermophilus* OF1053GD 株 (TM 培地) ; 2, *T. thermophilus* OF1053GD 株 (TM + 50 µg/ml Km)
OF1053株はカナマイシン耐性を消失したことが示される。

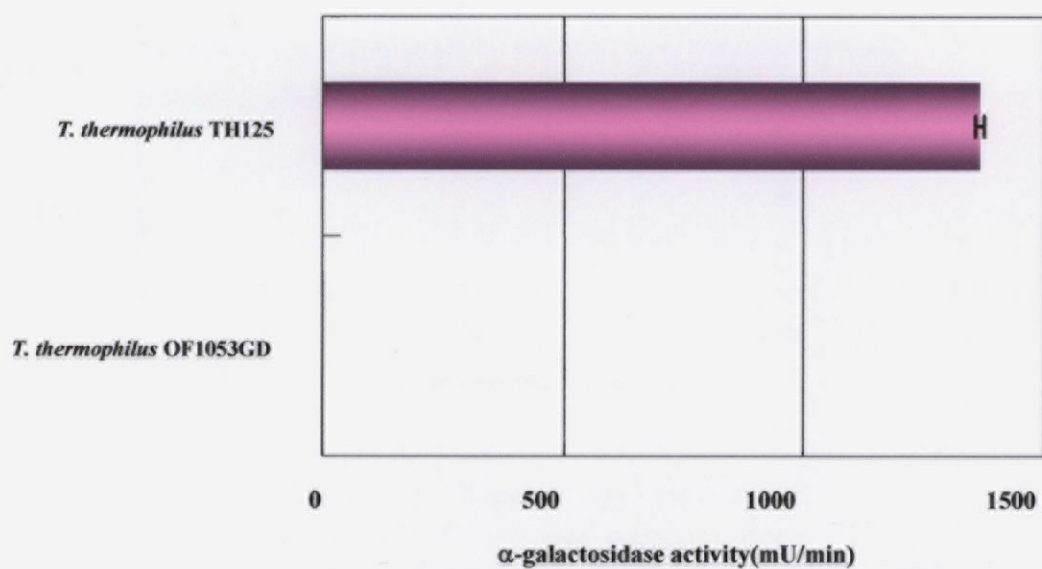


Figure 1-14. *T. thermophilus* TH125 株及び OF1053GD 株の α -galactosidase 活性

TH125 株は α -galactosidase 活性を有しているが、ダブルノックアウトした OF1053GD 株は、活性を示さない。

(b) レポータープラスミドの構築

当初は、Dr. Fridjonsson、Dr. Mattes に供与頂いた *Thermus* 内で複製可能なプラスミド pOF5714[13, 14] を用いる予定であったが、使用出来る制限酵素等の関係でそのまま用いることは困難であるため、利用し易いプラスミドを構築した (Fig. 1-4~6)。このレポータープラスミドを保持しない株、OF1053GD 及び *agaA* 上流にプロモーター配列を有さない配列 (*rpoZ* の構造遺伝子内部の約 100 bp) を組み込んだレポータープラスミドである pless を保持する形質転換体では、 α -galactosidase 活性が検出されない一方で、強力なプロモーター能を有する *slpA* プロモーターを含む配列を *agaA* 上流に組み込んだレポータープラスミド pTt*slpA*-p を保持する形質転換体では α -galactosidase 活性が検出された。この結果から、この reporter assay system は有効に機能することが示された (Fig. 1-15)。

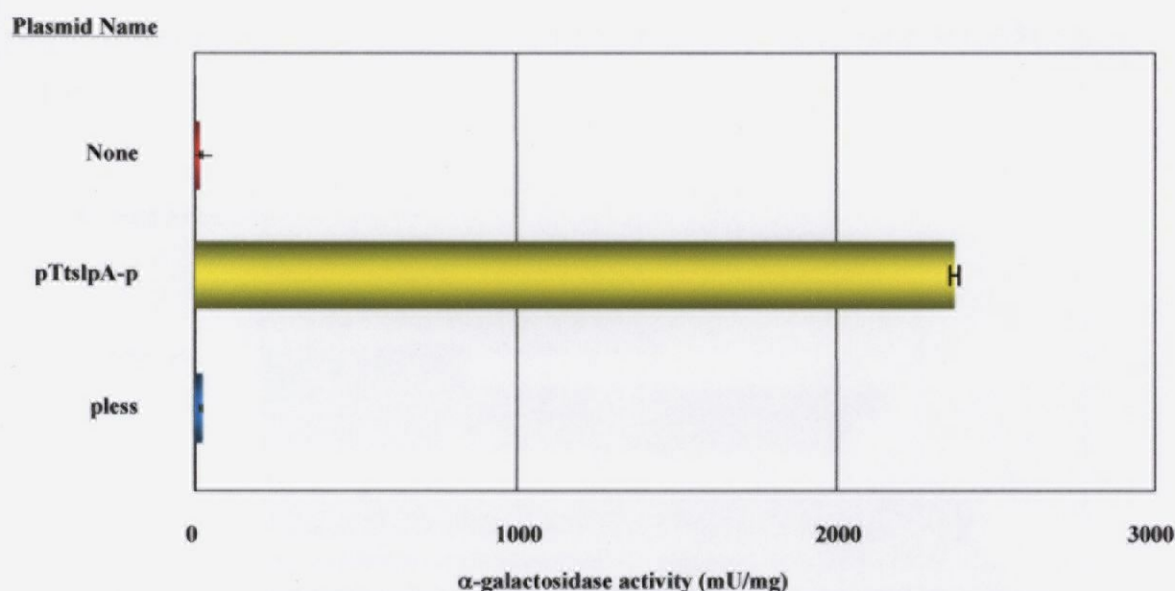


Figure 1-15. Reporter assay system の確認

slpA promoter を挿入した pTt*slpA*-P を positive control として、
プロモーター配列を含まない配列を挿入した pless を negative control として測定した。

(c) 転写制御機構の解析

プロモーターを含む *hcs* 上流配列を *agaA* 上流に組み込んだレポータープラスミド、pTthcs-plp を保持する形質転換体の α -galactosidase 活性を調べた結果、有意な活性が検出された (Fig. 1-16)。また、この α -galactosidase 活性は、培養液中にリジンが存在することで減少することも見出された (Fig. 1-16)。リジン自体は α -galactosidase の活性に影響を与えないことから、この活性の減少は細胞粗抽出液中に存在する α -galactosidase の絶対量の低下に依存するものと考えられた。そしてこの結果は、先の S1-nuclease mapping における結果とも一致した。さらにこの α -galactosidase 活性の減少は、培養液中にリジンアナログである *S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine (AEC) や 6-aminocaproate (6AC) を添加した場合には活性の減少は認められなかった (Fig. 1-16)。一方で、*hcs* プロモーターを含むものの *hcs*-leader を除去したレポータープラスミド pTthcs-p Δ lp を保持する形質転換体の菌体粗抽出液では、pTthcs-plp を保持する形質転換体においてリジン添加時に特異的に認められた α -galactosidase 活性の低下は観察されなかった (Fig. 1-16)。この結果から、Lys クラスターの発現調節機構には、*hcs*-leader 領域が必須であることが示された。

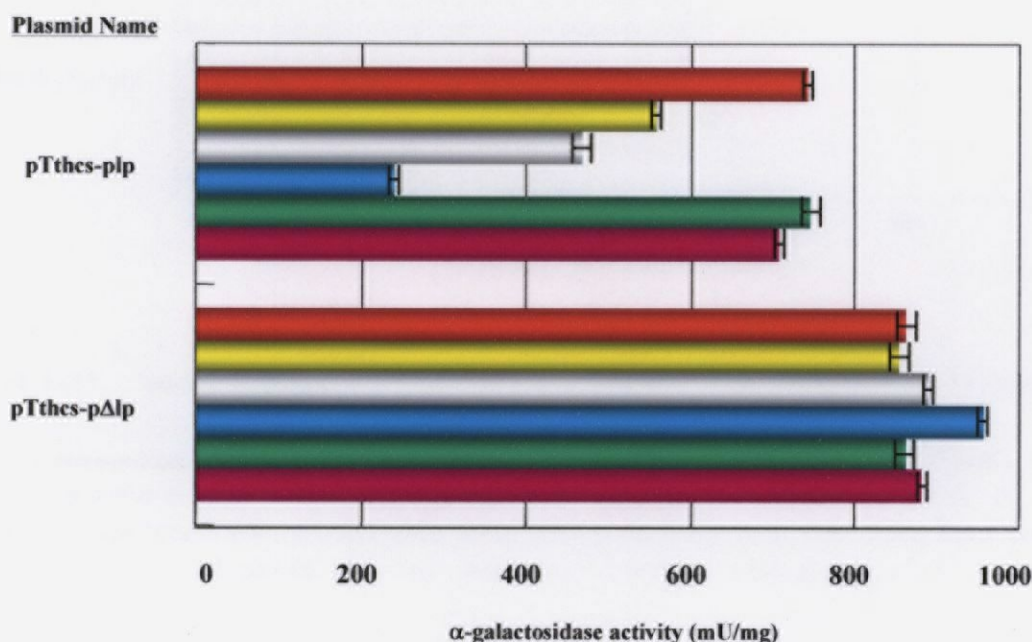


Figure 1-16. pTthcs-plp 及び pTthcs-p Δ lp を保持する *T. thermophilus* OF1053GD における α -galactosidase 活性

サンプルとして用いた細胞粗抽出液を調製した形質転換体の培養条件を以下に示した。

Red, MM medium; Yellow, MM + 0.1 mM lysine; White, MM + 1 mM lysine; Blue, MM + 5 mM lysine; Green, MM + 10 μ M AEC; Pink, MM + 1 mM 6AC

また、*hcs*-leader 領域にコードされる leader peptide 内に存在する tandem なリジンコドンがグルタミンコドンに置換したレポータープラスミド pTthcs[K₂/Q₂]-plp を保持する形質転換体の場合においても、培地にリジンを足しても α -galactosidase 活性の低下は観察されなかった。しかしその一方で、大変興味深いことに同形質転換体ではグルタミン添加による活性の低下が観察されるようになった (Fig. 1-17)。

加えて、*hcs*-leader 内に存在する tandem なリジンコドンに silent mutation を施したレポータープラスミド pTthcs[K₂/K₂]-plp を保持する形質転換体の場合には、依然としてリジンによる α -galactosidase 活性の低下が観察された (Fig. 1-18)。

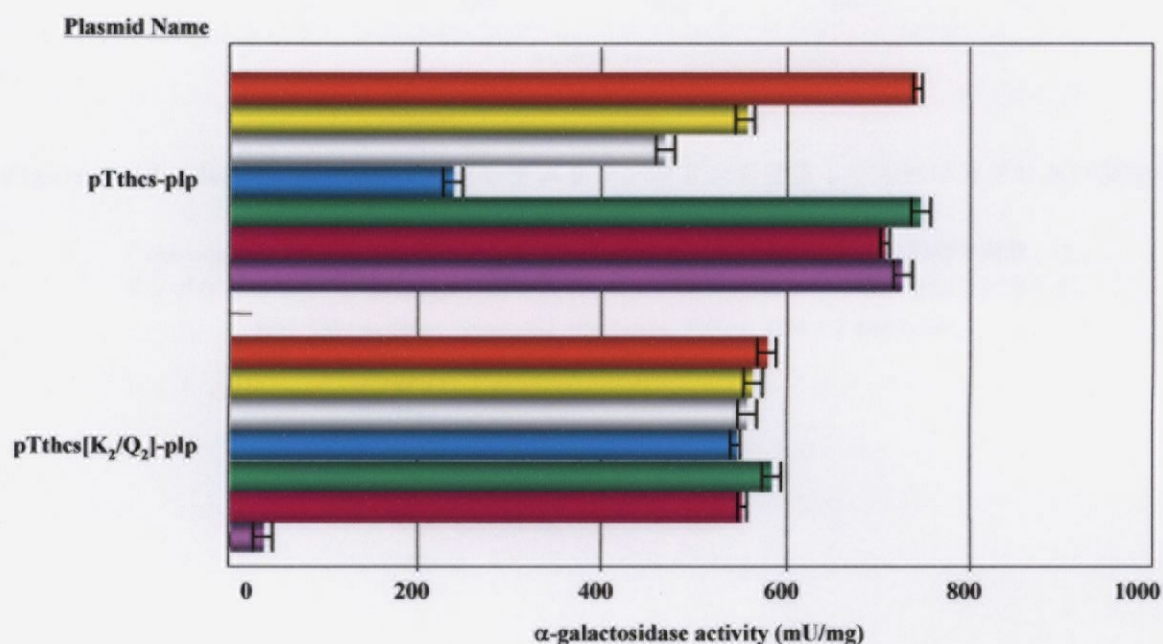


Figure 1-17. leader peptide 中のタンデムリジンコドンを置換した場合のリジン及び類縁体の α -galactosidase 活性への影響

T. thermophilus OF1053GD (pTthcs[K₂/Q₂]-plp) を対象としてグルタミンによる影響を観察した。

サンプルとして用いた細胞粗抽出液を調製した *T. thermophilus* の培養条件を以下に示した。

Red, MM medium; Yellow, MM + 0.1 mM lysine; White, MM + 1 mM lysine; Blue, MM + 5 mM lysine; Green, MM + 10 μ M AEC; Pink, MM + 1mM 6AC; Purple, MM + 1 mM glutamine

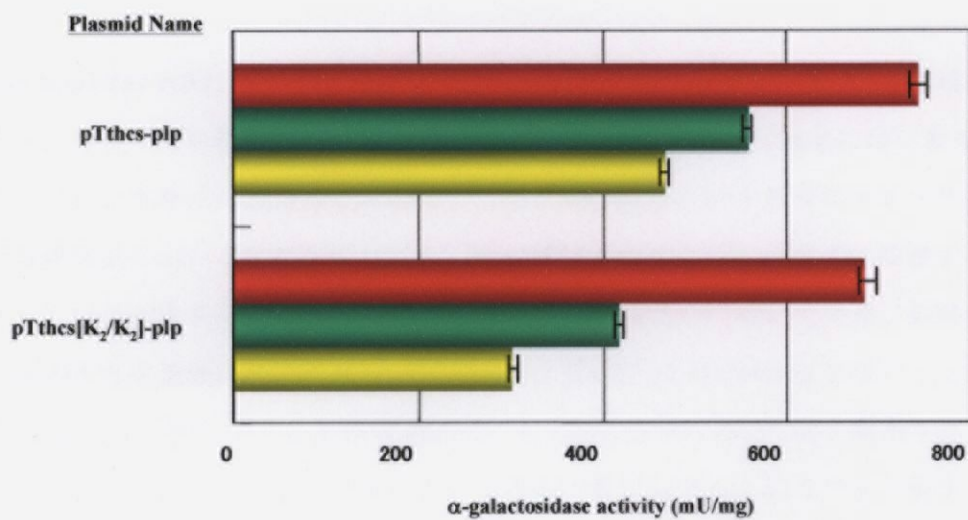


Figure 1-18. leader peptide 中のタンデムリジンコドンを置換した場合のリジン及び類縁体の α-galactosidase 活性への影響

T. thermophilus OF1053GD (Tthcs[K₂/K₂]-plp) を対象としてリジンによる影響を観察した。
サンプルとして用いた細胞粗抽出液を調製した *T. thermophilus* の培養条件を以下に示した。

Red, MM medium; Green, 0.1 mM lysine; Yellow, MM + 1 mM lysine