

§ 1-4. Discussion

T. thermophilus HB27 株は真正細菌に属するにも関わらず、リジンを AAA を経由して生合成すること、そしてその経路も酵母やカビでみられる AAA 経路とは完全には一致せず、AAA 以降はアルギニン生合成に類似した反応により生合成されるという非常にユニークなものであることが当研究室において明らかにされた (Fig. 0-4)。このリジン生合成に関連する酵素遺伝子のクローニングが終了し [1, 2, 4, 5, 6, 7]、酵素学的な解析が行われた結果、経路の初発酵素である Hcs が生合成最終産物であるリジンによって **feedback inhibition** を受けることが明らかとなった (Fig. 1-1) [8]。こうした活性調節はアミノ酸生合成においてよく観察されるメカニズムであり、本リジン生合成も活性調節においては他の微生物でみられるアミノ酸生合成系と差異は認められなかった。しかしながら本リジン生合成に関わる各遺伝子の発現調節機構に関する研究は行われていなかったため、**feedback repression** に関しての知見は全く得られていなかった。

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不可欠であると考えられた。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 クラスターにはリジン生合成に関与する 11 つの酵素遺伝子のうち 7 つが含まれているが、塩基配列から判断すると幾つかの ORF は重複しており、そうでない箇所でも各構造遺伝子間にはプロモーター様配列は見出せなかった。そのためこれらの Lys クラスターは一本の mRNA として転写されるものと予想されたが、それを実際には証明してはいなかった。そこで RT-PCR によってこれら 7 つの ORF 間の転写の有無を調べた結果、各 ORF のコネクト部位で増幅シグナルが得られた (Fig. 1-9)。この結果から、Lys クラスターは **polycistronic** に転写されているものと推定した。従来から転写単位の設定には Northern hybridization が広く用いられているが、高 GC 含量をもつ DNA に対してはこの手法を利用出来ない場合が多い。本菌の DNA の GC 含量は 67.5 % と高く、筆者も何度となく試みてみたものの、明確な転写物のシグナルを見出すことは困難であった。従って本研究では転写単位を RT-PCR を用いて推定することとした。しかしながら RT-PCR においても高 GC 含量の DNA に対しては定量性の信憑性が他の通常の GC 含量を有する生物種を用いた同実験系と比較して低いと言わざるを得ない。従って本研究結果からは、**polycistronic** に転写されている分子が存在すると解釈の方がより正確であろう。

hcs に上流以外に転写を開始・終結させるような領域があるのかどうかは、多くの領域についての詳細な研究によって明らかになるものと期待される。

また、*lysV* は破壊株ではリジン要求性を示さないが (Table 0-1)、リジン合成に関連する可能性も考えられる。*lysV* がコードすると予想されるタンパク質のアミノ酸配列には Cys-X-X-Cys-Gly という motif が 4 回繰り返して存在している。この motif は真核生物の転写因子に見られる Zinc finger motif[26] と類似していることから、*lysV* が転写因子であり、Lys クラスターの転写制御を行っている可能性を必ずしも否定できない。

理化学研究所において *T. thermophilus* HB27 株の類縁菌である *T. thermophilus* HB8 株 [27] を用いた Transcriptome 解析が行われているが、Microarray の結果から *lysW* は Lys クラスターに配置される他の ORF と比較して mRNA としての発現量が高いというデータが得られている (畠山ら私信)。このことは *lysW* 上流、即ち *lysV* に発現調節に関与する *cis* 配列が存在する可能性を示唆している。また、本研究では解析を行っていないものの、塩基配列から *lysW*-*lysX* 間には複雑な二次構造を取り得る配列が存在し、この領域が termination/antitermination motif を形成する可能性も考えられる。本研究で対象としている HB27 株とは菌株が異なるため、必ずしも一致するとは限らないが、Lys クラスターに関しては塩基配列に殆ど差異が認められないため、今はこの点を考えながら実験を進めていく必要があると思われる。実験結果及び配列解析による考察を組み合わせると、Fig. 1-19 に示すような転写様式が考えられる。

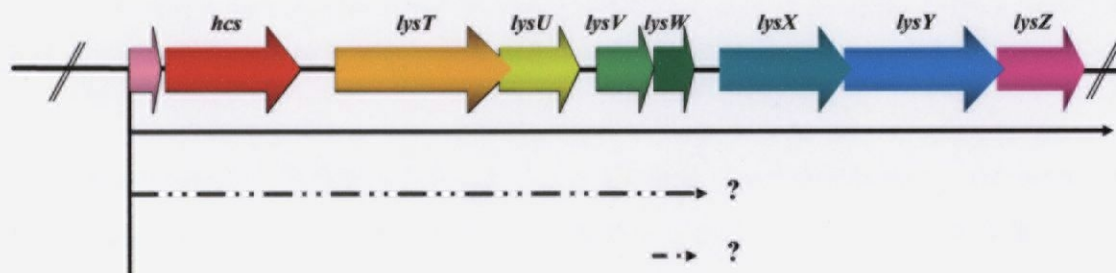


Figure 1-19. Lys クラスターの転写単位

実験結果から得られた転写単位は実線で、他の推測可能な転写単位は破線で示した。

生合成反応においても *hcs*, *lysT*, *lysU* は AAA 上流の、*lysX*, *lysY*, *lysZ* は AAA 以降の反応を触媒していることから、この遺伝子発現様式は、本菌の生育環境に応じて柔軟に対応し得るといふ観点で、非常に興味深いといえる。

全遺伝子の転写発現は基本的にはクラスターの最上流に位置する *hcs* プロモーターの発現調節に依存することが示唆されたため、その領域において S1-nuclease mapping を行い、転写開始点を同定した (Fig. 1-10)。その結果、転写開始点は *hcs* 開始コドンから 111 bp 上流であると決定され、そしてその転写量はリジン存在下で本菌を培養した場合には減少することが見出された (Fig. 1-10)。これらのことから本リジン生合成においても feedback repression による遺伝子の発現調節があるものと考えられた。また、アルギニンを培養液中に添加した場合に、転写物の増加が認められたが、これに関しては、第 4 章で取り上げることとする。

この 111 bp からなる配列は複雑な二次構造を取り得るのに加えて、リジンコドン tandem に有する leader peptide 様 ORF をコードする可能性が示唆されたことより転写制御を担っている可能性が考えられた (Fig. 1-11)。 *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、この配列の発現調節解析を行うに当たって先ずレポータープラスミドの構築を行った。プロモーターを含む *hcs* 上流配列を対象として 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 まで減少する一方で、リジンアナログである AEC や 6AC では活性の有意な減少は観察されなかった (Fig. 1-16)。この結果は、エフェクター分子の認識はその立体構造ではなく化学的な性質に基づいていることを示唆している。また、*hcs* プロモーターを含むものの *hcs*-leader 領域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 (Fig. 1-16)。この結果は、予想通りこの *hcs*-leader 領域が Lys クラスターの転写調節を担っていることを示すものであった。

さらに *hcs*-leader 内に変異導入することによって興味深い知見が得られた。*hcs*-leader 内に存在する tandem なリジンコドンを経グルタミンに置換した場合にはリジンによる影響が失われるのに対して (Fig. 1-17)、silent mutation、即ち塩基配列的には置換したがリジンコドン自体には変化変異の場合には、依然としてリジンによる影響を受けることが観察された (Fig. 1-18)。また前者の場合にはリジンによる影響が消失するのに加えて、グルタミンによる転写抑制が観察された (Fig. 1-17)。この結果は Lys クラスターの発現調節に決定的な要素は *hcs*-leader 内のリジンコドンであることを示しており、そのメカニズムは生育環境中に存在するリジンの量と細胞内の tRNA^{lys} の相互作用に依存する可能性を示唆するものであった (Fig. 1-20)。

幾つかのアミノ酸生合成において、tRNA と生合成最終産物のアミノ酸との複合体が発現調節機構に寄与していると報告されているため、本発現機構においても同様のメカニズムで制御されていると考えられる [28, 29, 30]

配列に依存する *cis* の調節メカニズムの代表的なものに、大腸菌の *trp* operon で提唱された classical な attenuation メカニズムと (Fig. 0-10)、近年見出された riboswitch がある (Table 0-3) [19]。

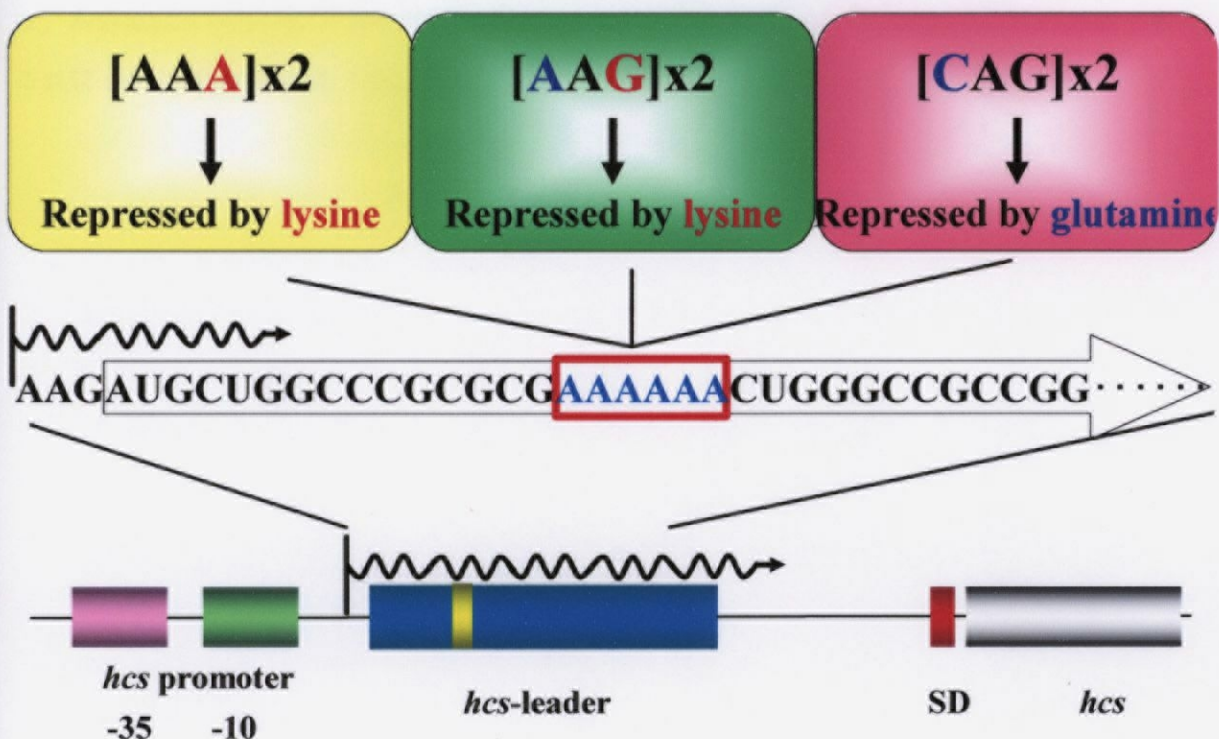


Figure 1-20. Reporter assay 結果から導かれた発現制御メカニズム

変異を施しても、リジンコドンであるならばリジン依存性であり、
リジンコドンでなくなる変異であれば、リジン依存性でなくなる。

この結果から、細胞内でリジンが charge された tRNA 量に依存したメカニズムが推測された。

これまでの実験結果からは、Lys クラスターの発現調節機構は classical な attenuation メカニズムに類似点が見出された。しかし mutant を用いた reporter assay の結果は、塩基置換によってエフェクター分子であるリジンを認識し得ないことに起因すると解釈することも可能であり、Lys クラスターの発現調節機構がどちらのメカニズムに基づくかを断定することは、ここまでのデータからは困難である。

riboswitch が mRNA の 5'-UTR 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。このことから Lys クラスターの発現調節機構がどちらのメカニズムに分類されるかを明らかにするためには、*hcs-leader peptide* が細胞内で実際に発現されているかを調べるのが最良の方法である。これについては次章で述べる。

§ 1- 5. References

1. Nishiyama, M., *et al.* (1995) *Microbiology*, **141**, 1211-1219.
2. Kobashi, N., *et al.* (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 1713-1718.
3. Cunin, R., *et al.* (1986) *Microbiol. Rev.*, **50(3)**, 314-352.
4. Miyazaki, J., *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1864-1871.
5. Miyazaki, T., *et al.* (2004) *Microbiology*, **150(Pt7)**, 2327-2334.
6. Miyazaki, J., *et al.* (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 5067-5073.
7. Miyazaki, J., *et al.* (2002) *FEBS Lett.*, **512**, 269-274.
8. Wulandari, AP., *et al.* (2002) *FEBS Lett.*, **522**, 35-40.
9. Koyama, Y., *et al.* (1986) *J. Bacteriol.*, **166**, 338-340.
10. Tanala, T., *et al.* (1981) *J. Biochem. (Tokyo)*, **89**, 677-682.
11. <http://www.nih.gov/>
12. Sambrook, J., *et al.* (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
13. Fridjonsson, O. and Mattes, R. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.*, **67(11)**, 5094-5099.
14. Fridjonsson, O., *et al.* (2002) *J. Bacteriol.*, **184(12)**, 3385-3391.
15. Hidaka, Y., *et al.* (1994) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1338-1339.
16. Lio, H., *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 576-580.
17. Maseda, H. and Hoshino, T. (1998) *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 121-124.
18. Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
19. Shimizu, Y., *et al.* (1973) *Proc. Natl. Sci. USA.*, **70(7)**, 1990-1994.
20. Vacher, J., *et al.* (1985) *EMBO J.*, **4(2)**, 509-513.
21. Lynn, SP., *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, **194(1)**, 59-69.
22. Wessler, SR. and Calvo, JM. (1981) *J. Mol. Biol.*, **149(4)**, 579-597.
23. Johnson, DL. and Somerville, RL. (1983) *J. Bacteriol.*, **155(1)**, 49-55.
24. Lynn, SP., *et al.* (1982) *J. Bacteriol.*, **152(1)**, 363-371.
25. Delente, J., *et al.* (1974) *Biotechnol. Bioeng.*, **16(9)**, 1227-1243.
26. Fairall, L., *et al.* (1993) *Nature*, **366(6454)**, 483-487.
27. Sakaki, Y. and Oshima, T. (1975) *J. Virol.*, **15(6)**, 1449-1453.

28. Mechulam, Y., *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, **197**(3), 453-470.
29. Chen, JW., *et al.* (1991) *J. Bacteriol.*, **173**(7), 2342-2353.
30. Boy, E., *et al.* (1976) *Biochimie.*, **58**(1-2), 213-218.