# 第2章　*Thermus* 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

## §2–1. Introduction

転写調節メカニズムには配列に依存する *cis* の調節メカニズムが存在する。代表的なものに、大腸菌のトリプトファン、ロイシン、ヒスチジン等の生合成に関する酵素遺伝子の operon で提唱されている attenuation メカニズム [1] と近年 *Bacillus* 属や *Clostridium* 属、*Deinococcus* 属、*Fusobacterium* 属等多岐に渡る生物種で見出された riboswitch がある [2, 3, 4, 5, 6, 7]。前者が leader 領域にコードされる short peptide の翻訳を介するメカニズムであり、後者は mRNA の 5'-UTR が直接的にエフェクターを認識・結合するメカニズムである。この2つのメカニズムで決定的に異なる点は、leader 領域内に翻訳され得る short peptide が存在するか否かである。

前章で行った実験結果から、リジン存在下では *hcs* の転写が抑制されることが示された（Fig. 1-10）。転写開始点から *hcs* 開始コドンまでの 111 塩基からなる配列が、複雑な二次構造を取り得るのに加えて、リジンコドンを tandem に有する *hcs*-leader peptide をコードする可能性が示唆されたことより（Fig. 1-11）、リジン存在下での *hcs* の転写抑制はこの配列に起因するものだと推測された。本実験で構築した *T. thermophilus* での reporter assay を用いた実験結果からも、リジンによる転写物の減少が示されたのに加えて、構築した様々な mutant を用いた結果からは、*hcs*-leader 領域が、そしてとりわけそこにコードされる *hcs*-leader peptide の 6, 7 番目の 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（Fig. 1-16~18）。この結果から、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、転写開始点と *hcs*-leader peptide の推定開始コドンとの間は僅か 3 塩基であり、通常の翻訳に必要とされるリボソーム結合配列である Shine-Dalgarno（SD）配列は見出されないことから、この leader peptide の産生及び同 leader peptide を介する転写調節機構を確定的に述べることができない。しかしながら、SD 配列を必要としない翻訳開始の例が報告されており [8, 9]、Lys クラスターにおける転写開始点と *hcs*-leader peptide の翻訳開始点が近く、SD 配列が存在しないという問題は、必ずしも筆者の仮説を否定するものではない。したがって、この short peptide の翻訳の有無を明らかにすることが、本研究におけるリジン生合成酵素遺伝子の発現調節機構の解明に重要な意味をもつものと考えられた。

そこで本章では、前章で作製したreporter assay系を応用し、*agaA*との融合タンパク質発現系を構築することで、*hcs*-leader peptideが産生されているか否かを調べることを目的とした。

## §2–2. Materials and Methods

### §2-2-1. *hcs*-leader 融合 α-galactosidase 生産系の構築及びそのアミノ酸配列解析

(a) pTthcs-plpf1 の構築

遺伝子の基本的な操作は文献[10]に従って行った。*T. thermophilus* のゲノム DNA を鋳型として、合成オリゴヌクレオチド Tthcs-plpfF1/Tthcs-plpR1、Tthcs-plpfF2/Tthcs-plpR2 の組合せで PCR を行い、*hcs*-leader 前半及び後半部位を増幅した。この 2 増幅断片を鋳型として合成オリゴヌクレオチド Tthcs-plpfF1/Tthcs-plpR2 の組合せでさらに PCR を行い、*hcs*-leader の終始コドンをグルタミンコドンに置換させた断片を得た。pT7blue vector に連結し、シーケンス解析で変異が導入されていることを確認した後、*Not*I 及び *Nde*I で消化し、アガロース電気泳動後に目的断片を精製した。

また、pOF5714[11, 12]を鋳型として合成オリゴヌクレオチド agaA(Fw)及び agaA His+を primer とした PCR によって AgaA の C 末端に 8 つのヒスチジン残基を導入した。PCR によって得られた断片を pT7blue vector に連結しシーケンスで確認を取った後、*Nde*I 及び *Eco*RI で消化、目的断片を精製した。前章で作製したプラスミド p18Nd(-)-S' を予め *Not*I 及び *Eco*RI で消化しておき、目的断片を再連結することで、*agaA*(his)$_8$ と fusion する発現系プラスミドを構築した。得られたプラスミドは pTthcs-plpf1 と名付けた。尚、PCR に使用した合成オリゴヌクレオチドは Table 2-1 に示した。

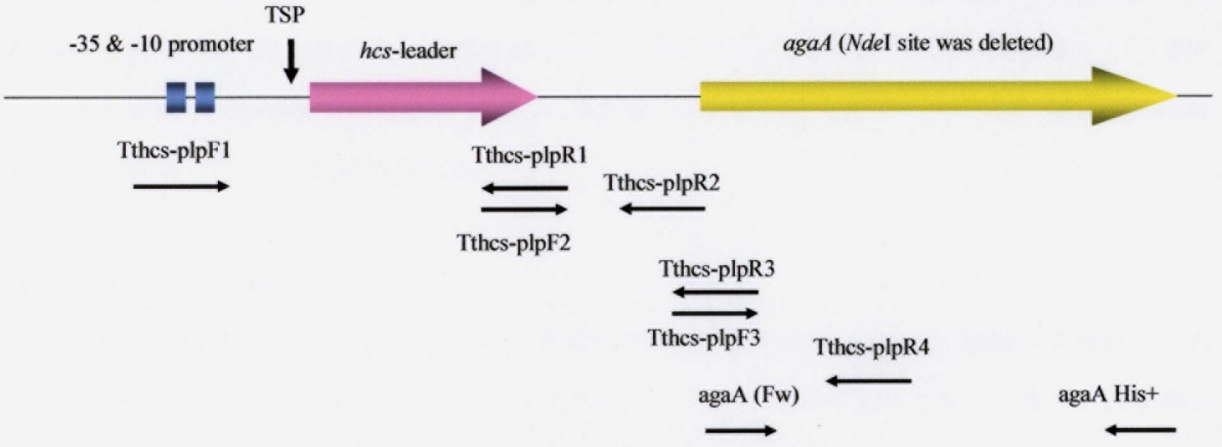


**Figure 2–1. *hcs*-leader 融合 α-galactosidase の発現系構築に用いた primer 配置**
pTthcs-plpf1 は *hcs* 上流に存在する SD 配列を有し、pTthcs-plpf2 はその SD 配列を除去した。

Table 2-1. 融合タンパク発現プラスミド構築に使用した合成オリゴヌクレオチド

| Primer Name | Sequence |
|---|---|
| Tthcs-plpfF1 | 5'- GCGCGGCCGCGAGGAGCTACCAGGCCCGGGAG -3' |
| Tthcs-plpfF2 | 5'-GCCGGGGGGTAGGACAGCCCTCCAAGGGCT-3' |
| Tthcs-plpfF3 | 5'-GTTGAAGCTGCTGCGCGCGCTCAGT-3' |
| Tthcs-plpfR1 | 5'- AGCCCTTGGAGGGCTGTCCTACCCCCCGGC -3' |
| Tthcs-plpfR2 | 5'-GGAATTCATATGGCACCCCTCCCCAAAAGA-3' |
| Tthcs-plpfR3 | 5'-TGCAACTGAAAAAGAAAACCGGCCCGAACC-3' |
| Tthcs-plpfR4 | 5'-CTGAGCGCGCGCAGCAGCTTCAAC-3' |
| agaA(Fw) | 5'-CCAATTCCATATGTCAGTTGCATACAATCC-3' |
| agaA His+ | 5'-GGAATTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGTTGTTGAACA GCTTTCAATCGCCACAT-3' |

(b) pTthcs-plpf1 産物の精製

pTthcs-plpf1 を用いて *T. thermophilus* OF1053GD 株を形質転換し、形質転換体を 50 μg/ml のカナマイシンを含む TM 培地で一夜培養した。集菌後に MM 培地で菌体を洗浄し、終濃度 1 % になるように 50 μg/ml のカナマイシンを含む新しい MM 培地に植菌し、60 ℃で 24 時間培養した。集菌後得られた菌体を精製バッファー（20 mM Tris, pH7.5）で懸濁し、超音波処理で破砕した。40,000 x *g*、4 ℃、20 分間の遠心分離で得られた上清を精製バッファーに対して透析した。透析サンプルを Ni-NTA resin（Novagen）に供し、0.2 M→0.5 M のイミダゾールによる linear gradient によって吸着タンパクを溶出させた。

(c) N 末端アミノ酸解析

Ni-NTA resin で精製した pTthcs-plpf1 由来のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析するために、SDS-PAGE 後、PVDF 膜にエレクトロブロットした。エレクトロブロット後の PVDF 膜から目的バンドを切り出し、アミノ酸シーケンサーに供して解析した。

## § 2-2-2. 新たな *hcs*-leader 融合 α-galactosidase 生産系の構築及びそのアミノ酸配列解析

(a) pTthcs-plpf2 の構築

pTthcs-plpf1 を鋳型として、合成オリゴヌクレオチド Tthcs-plpfF1/Tthcs-plpfR3 及び Tthcs-plpfF3/Tthcs-plpfR4 の組合せで PCR を行い、*hcs*-leader 及びそのジャンクション部位を増幅した。この 2 増幅断片を鋳型として合成オリゴヌクレオチド Tthcs-plpfF1/Tthcs-plpR4 の組合せでさらに PCR を行い、*hcs*-leader/agaA 開始コドン間に存在する SD 配列及び AgaA 開始コドンを除去した断片を得た。pT7blue vector に連結し、シーケンス解析で変異が導入されていることを確認した後、*Not*I 及び *Mlu*I で消化し、予め同処理をしておいた pTthcs-plpf1 に再連結することでプラスミド pTthcs-plpf2 を作製し、同プラスミドで *T. thermophilus* OF1053GD 株を形質転換し、以降の融合タンパク質の発現・精製に用いた。本プラスミドの構築に要した合成オリゴヌクレオチドは Table 2-1 に示した。

(b) pTthcs-plpf2 産物の精製

pTthcs-plpf2 を用いて *T. thermophilus* OF1053GD 株を形質転換し、得られた形質転換体を 50 μg/ml のカナマイシンを含む TM 培地で一夜培養した。集菌後に MelMM（0.4 % melibiose, 0.075 % $K_2HPO_4$, 0.025 % $KH_2PO_4$, 0.2 % NaCl, 0.25 % $(NH_4)_2SO_4$）培地で菌体を洗浄し、終濃度 1 %になるように 50 μg/ml のカナマイシンを含む新しい MelMM 培地に植菌し、60 ℃で 24 時間培養した。集菌後得られた菌体を精製バッファー（20 mM Tris, pH7.5）で懸濁し、超音波処理で破砕した。40,000 x g、4 ℃、20 分間の遠心分離で得られた上清を精製バッファーに対して透析した。透析サンプルを Ni-NTA resin に供し、0.2 M → 0.5 M のイミダゾールによる linear gradient によって吸着タンパクを溶出させた。活性溶出画分を精製バッファーに対して透析し、再度 Ni-NTA resin 精製を行い、0.3 M → 0.4 M のイミダゾールによる linear gradient によって吸着タンパクを溶出させた。さらに活性溶出画分を精製バッファーに対して透析し、Talon-cobalt resion（BD=Bioscience CLONTEC）に吸着させ、0 M → 0.5 M のイミダゾールによる linear gradient によって吸着タンパクを溶出させた。さらに活性溶出画分を精製バッファーに対して透析し、再度 Talon-cobalt resin 精製を行い、0.1 M → 0.2 M のイミダゾールによる linear gradient によって吸着タンパクを溶出させ、最終的に精製タンパク質とした。

(c) N 末端アミノ酸解析に向けた脱ホルミル化

Ni-NTA resin 及び Talon-cobalt resin で精製した pTthcs-plpf2 由来のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析するために、SDS-PAGE 後、PVDF 膜にエレクトロブロットした。エレクトロブロット後の PVDF 膜を 0.6 N HCl 溶液に浸し、25 ℃で 16 時間処理した。塩酸処理した PVDF 膜から目的バンドを切り出し、アミノ酸シーケンサーに供して解析した。

(d) TOF-MS 解析

Ni-NTA resin で精製した pTthcs-plpf2 由来のタンパク質のアミノ酸配列を解析するために、SDS-PAGE 後、トリプシン消化或いはリジルエンドペプチダーゼ消化したサンプルを TOF-MS に供した。Mightsvl RPC18（φ;3 μm, 0.2 x 50 mm）カラムを用いて、Solution A（0.1 % HCOOH）と Solution B（0.1 % HCOOH/90 % $CH_3CN$）で分画した。プロテアーゼ処理サンプルは Solution B 5 % から 95 % 迄の linear gradient で 45 分間かけて分画を行った後、引き続き MS に供した。尚、この実験は、共同実験先の順天堂大学研究基盤センターで行われた。