

## § 2-3. Results

S1-nuclease mapping 及び様々な変異を導入した reporter gene assay 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。しかしながら、転写開始点と *hcs*-leader peptide の推定開始コドンとの間は僅か3塩基しか存在せず、SD 配列は見出されない。SD 配列がないことはこの仮定を否定するものではないが、leader 領域に翻訳される short peptide が存在するの否かは制御メカニズムを決定付けるうえで大変重要である。したがって本仮定を立証するためには、*hcs*-leader peptide が細胞内で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。そこで、*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。構築したプラスミド pTthcs-plpf1 を用いて得られた形質転換体 Tthcs-plpf1 の細胞粗抽出液から His-tag 融合タンパク質を精製し (Fig. 2-2)、その N 末端アミノ酸解析を試みた (Fig. 2-3)。

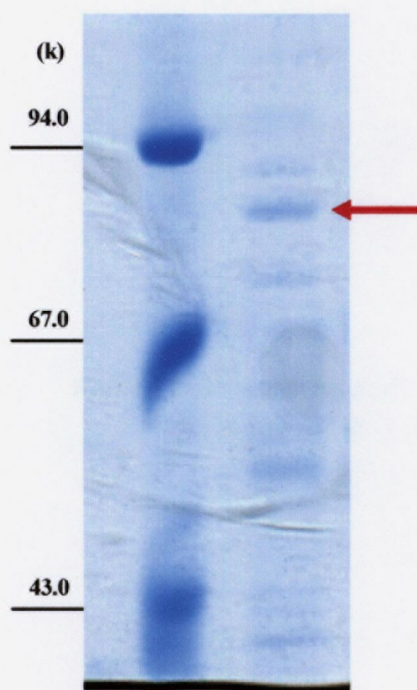


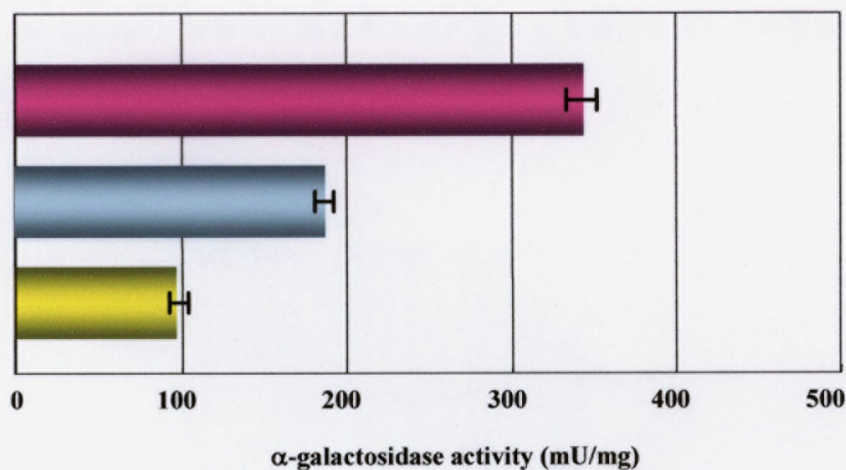
Figure 2-2. 精製した pTthcs-plpf1 由来の His-tag 融合タンパク質

1, Molecular size marker; 2, 精製 His-tag 融合タンパク質  
精製画分は  $\alpha$ -galactosidase 活性が検出された。  
SDS-PAGE 後に PVDF 膜に転写し、N 末端アミノ酸配列解析に供した。



精製した pTthcs-plpf1 由来の融合タンパク質を N 末端アミノ酸解析に供した結果、Ser-Val-Ala-Tyr-Asn-Pro-Gln... であることが判明した (Fig. 2-3)。この配列は融合タンパク質のものでなく、 $\alpha$ -galactosidase の 2 番目以降の配列であった。この結果は、hcs-leader と hcs 開始コードの間に残っていた hcs の本来の SD 配列が  $\alpha$ -galactosidase の翻訳に効率よく利用されてしまい、その結果として、SD 配列をもたない少量の hcs-leader peptide の翻訳が検出されなかったものと解釈できる。そのため、引き続き実験では hcs 上流の SD 配列を欠失させた融合プラスミド、pTthcs-plpf2 を構築し同様の研究を行った。

構築し直したプラスミド pTthcs-plpf2 を用いて得られた形質転換体は弱いながらも  $\alpha$ -galactosidase 活性を示し、且つその活性は pTthcs-plp を有する *T. thermophilus* OF1053GD と同様にリジン存在下では低下した (Fig. 2-4)。



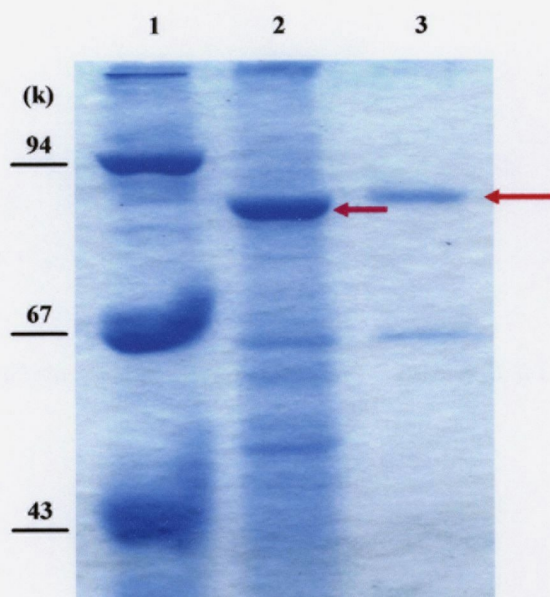
**Figure 2-4. pTthcs-plpf2 を保持する *T. thermophilus* OF1053GD 細胞粗抽出液の  $\alpha$ -galactosidase 活性**

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。

Pink, MM medium; Blue, MM + 1 mM lysine; Yellow, MM + 10 mM lysine

次いで同形質転換体の細胞粗抽出液を2回 Ni-resin chromatography に供し、イミダゾールの linear gradient をかけて溶出した。活性を確認し、透析でバッファー交換した後にさらに2回 Talon cobalt-resin chromatography に供した。同様にイミダゾールの linear gradient をかけて結合タンパク質を溶出し、結果として pTthcs-plpf2 由来の融合タンパク質を主成分とするサンプルを調製することに成功した。同様に調製した pTtslpA-P 由来の  $\alpha$ -galactosidase と比較して SDS-PAGE 上で N 末端の融合ペプチドに相当する程度移動度が小さくなったことから (Fig. 2-5)、hcs-leader が融合している、即ち hcs-leader が *Thermus* 菌体内で発現している可能性が示唆された。しかしながら発現量は非常に低く、部分精製されたタンパク質量は培養液 1 l あたり約 2  $\mu$ g であった。hcs-leader が融合することでその分子量がモノマーで 87.5 k 算出されることから、この発現量は約 20 pmol に相当する。

hcs-leader の発現を裏付けるために、精製した pTthcs-plpf2 由来の融合タンパク質を N 末端アミノ酸解析に供したが、そのシグナルは得られなかった (Fig. 2-6)。コントロールとして 3 pmol の BSA を同様にアミノ酸解析に供したところ、その N 末端配列に一致するシグナルが得られたことから (data not shown)、精製した融合タンパク質の N 末端には何らかの修飾が施されている可能性が示唆された。



**Figure 2-5. 精製した pTthcs-plpf2 由来の His-tag 融合タンパク質**

1, Molecular size marker; 2, 精製 His-tag  $\alpha$ -galactosidase; 3, 精製 His-tag 融合タンパク質  $\alpha$ -galactosidase の分子量は 84 k であるのに対し (ピンク矢印)、hcs-leader 融合  $\alpha$ -galactosidase の分子量は約 87.5 k と算出される (赤矢印)。精製された His-tag 融合タンパク質を SDS-PAGE 後に PVDF 膜に転写し、N 末端アミノ酸解析に供した。

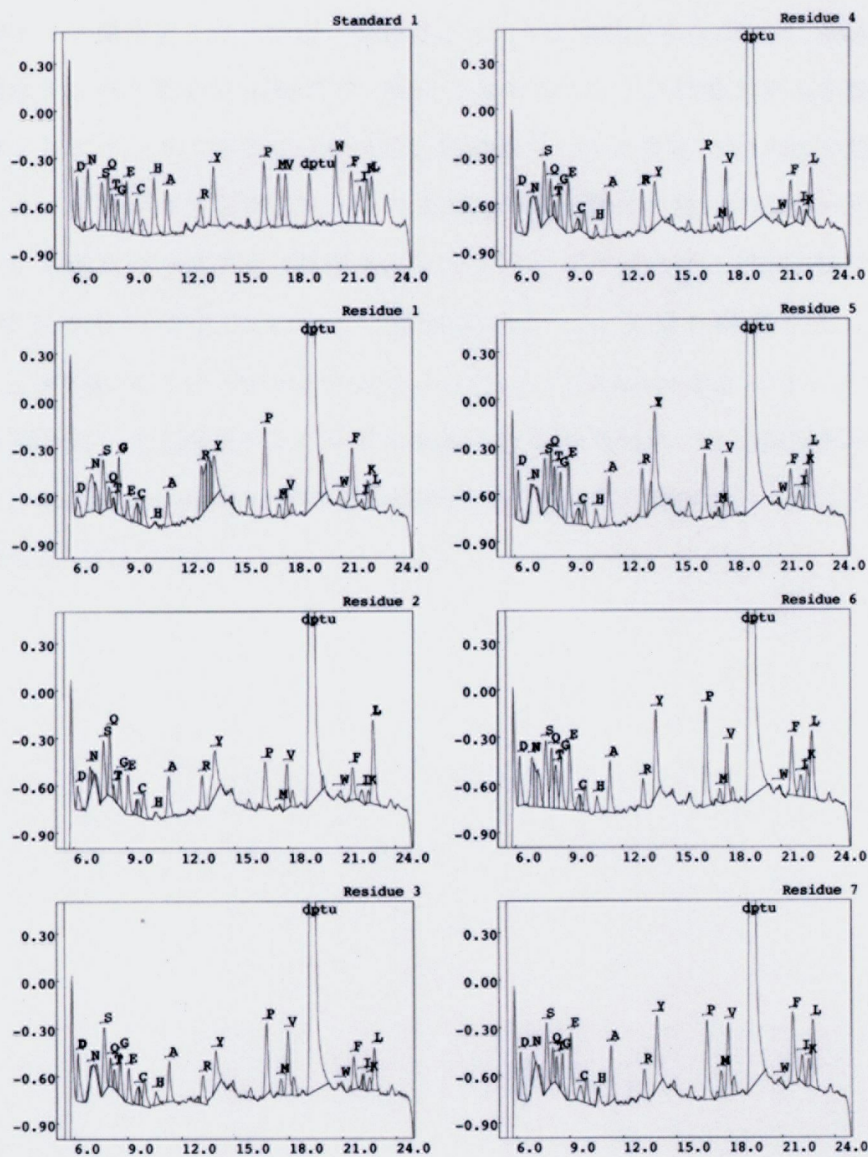


Figure 2-6. pTthcs-plpf2 由来融合タンパク質の N 末端アミノ酸解析結果

そこで脱ホルミル基処理後、TFAを用いたアセチル基のデブロック処理後、脱グルタミル基処理後にN末端アミノ酸解析を行ったが、有意なシグナルは検出されなかった (data not shown)。

精製した融合タンパク質をN末端アミノ酸から解析することは困難であると判断し、トリプシン消化及びリジルエンドペプチダーゼ消化した融合タンパク質をTOF-MSを用いて質量分析することにした。液体クロマトグラフィーで分画した消化断片の幾つかのピークを解析した結果、トリプシン分解物で219アミノ酸残基、リジルエンドペプチダーゼ分解物で220アミノ酸残基、重複部分を除いて全768アミノ酸残基中、353残基を同定した。その中には、LGRRGVG.....VYWGKという配列が含まれていた。これは *hcs-leader*/ジャンクション部位/ $\alpha$ -galactosidase 部分からなる融合タンパク質の8番目から69番目のアミノ酸配列に相当する。以上の結果から、*hcs-leader peptide* が自身の翻訳開始コドンから翻訳され、産生されていることが明らかとなった (Fig. 2-7)。

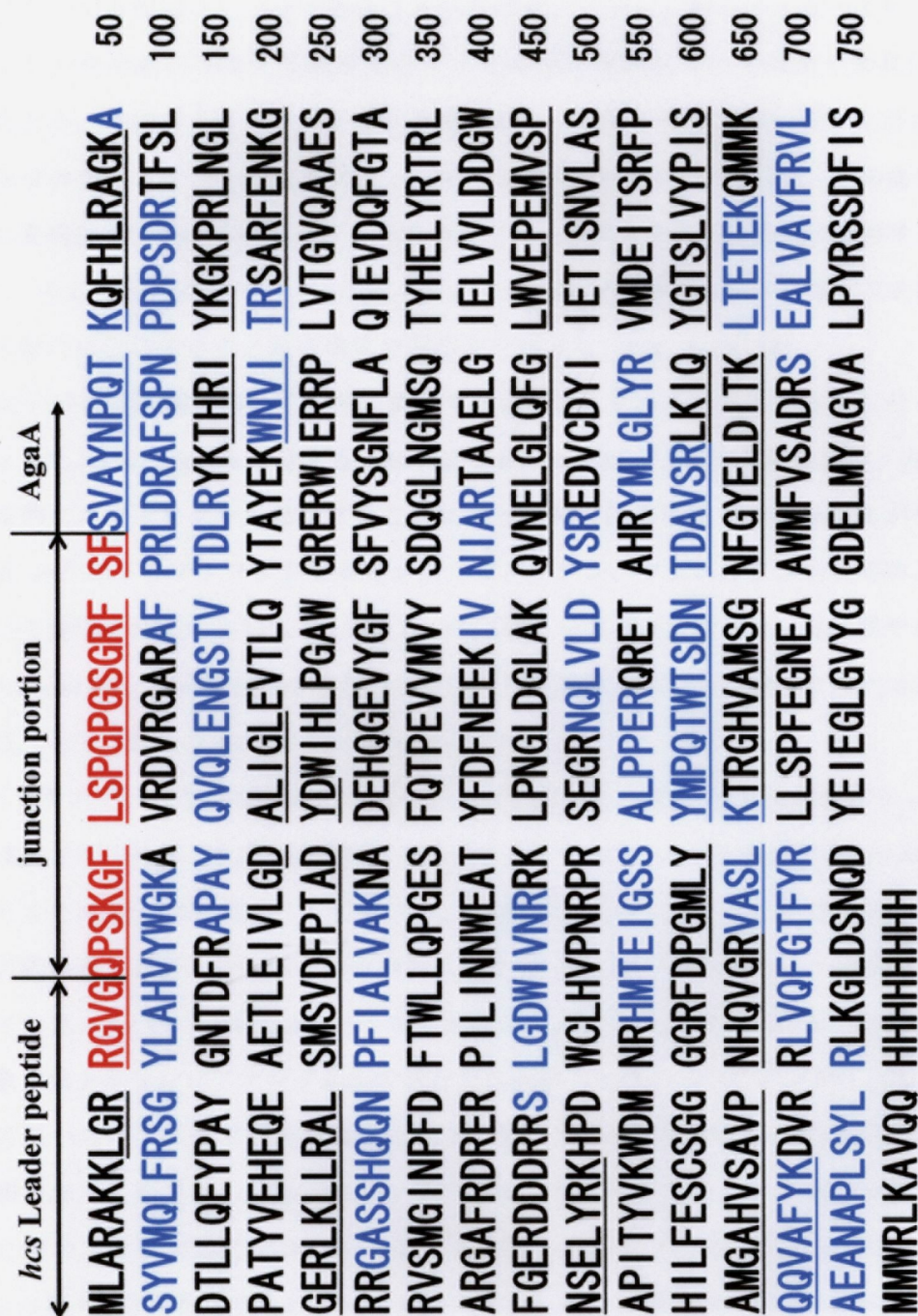


Figure 2-7. *hcs*-leader fusion  $\alpha$ -galactosidase の配列及び TOF-MS で検出された断片  
ペプチダダーゼ処理後に TOF-MS に供し、得られたピークを分析した。トリブシン分解物、リジルエンドペプチ  
ダーゼ分解物から同定された部分はそれぞれ赤、及び下線で示した。