§ 2-4. Discussion

T. thermophilus のリジン生合成系は、反応経路、及びその反応を触媒する酵素が示す基質特異性において非常にユニークであることが当研究室において明らかとなっている。しかしながら本リジン生合成に関与する酵素遺伝子の発現調節機構については全く知見が得られていなかったため、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クラスターの転写調節機構の解析を行った。その結果、Lysクラスターの発現調節は、クラスター最上流に位置する *hcs* 遺伝子の発現制御に依存すること（Fig. 1-9~11）、そしてそのメカニズムはLysクラスターの転写開始点と *hcs* 開始コドン間の111塩基からなる配列に依存することが本研究で明らかとなった（Fig. 1-16~18）。

遺伝子の発現制御において配列に依存する *cis* なメカニズムの代表的なものとして、翻訳とcoupleしたleader peptideを介するclassicalなattenuationと、近年見出された、mRNAの5'-UTRが直接的にエフェクターと結合することによって転写制御を担うriboswitchが挙げられる。前者は *E. coli* のトリプトファンやロイシン、ヒスチジン、フェニルアラニン等のアミノ酸生合成において提唱されている[11, 12, 13, 14, 15, 16]。一方で、後者は *Bacillus* 属や *Clostridium* 属、*Deinococcus* 属、*Fusobacterium* 属等の多岐に渡る生物種において、FMNやTPP、cobalamin、purine等の様々な生合成を調節している（Table 0-3）。

Lysクラスターの制御様式は、reporter assay systemを用いた実験系から *E. coli* のアミノ酸生合成において提唱されている翻訳とcoupleしたleader peptideを介するattenuationに類似すると考えられた。判断要素として第一に、riboswitchによる制御機構であればアナログに対しても認識することが報告されているが[17, 18, 19, 20, 21]、プロモーターを含む *hcs* 上流を解析対象としたreporter gene assayを行った結果、リジン添加によって観察されたα-galactosidase発現量の減少がリジンアナログ添加の場合では観察されなかったことが挙げられる（Fig. 1-16）。この結果からエフェクターの認識はその立体構造ではなく化学的な性質から行われているものと解釈される。第二に、regulatoryコドンと推定されるリジンコドンをグルタミンコドンに置換した場合、それに応じてエフェクターも変換されたことが挙げられる（Fig. 1-17）。このmutantは計4塩基置換したものであるが、riboswitchのような機構ではmutationに起因したmRNAの構造変化によりエフェクターを認識しなくなる可能性はあるが、エフェクターそのものが変化する可能性は極めて低い。そして第三に、*E. coli* や *B. subtilis* の *lysC* における発現制御に必要なエレメント配列の差異である。[7, 20, 22]。*lysC* はAspartate kinase IIIをコードする遺伝子

であり [23]、同酵素は *E. coli* や *B. subtilis* 等の一般的なリジン生合成経路である DAP 経路の初発酵素である。*lysC* の発現制御は生合成最終産物であるリジンによって feedback repression を受け、最近になってそれが riboswitch によることが明らかになっている。この *lysC* mRNA5 末端には 273 塩基からなる非翻訳領域が存在し、環境中にリジンが存在する場合には、この領域がエフェクターリガンドとしてのリジンを結合する構造をとり、結果として ρ-factor 非依存性の termination motif が形成される。その一方、生育環境中にリジンが欠乏している場合にはエフェクターリガンドがない状態で最も安定な構造である antitermination motif を形成し、下流の遺伝子が発現される（Fig. 2-8）。

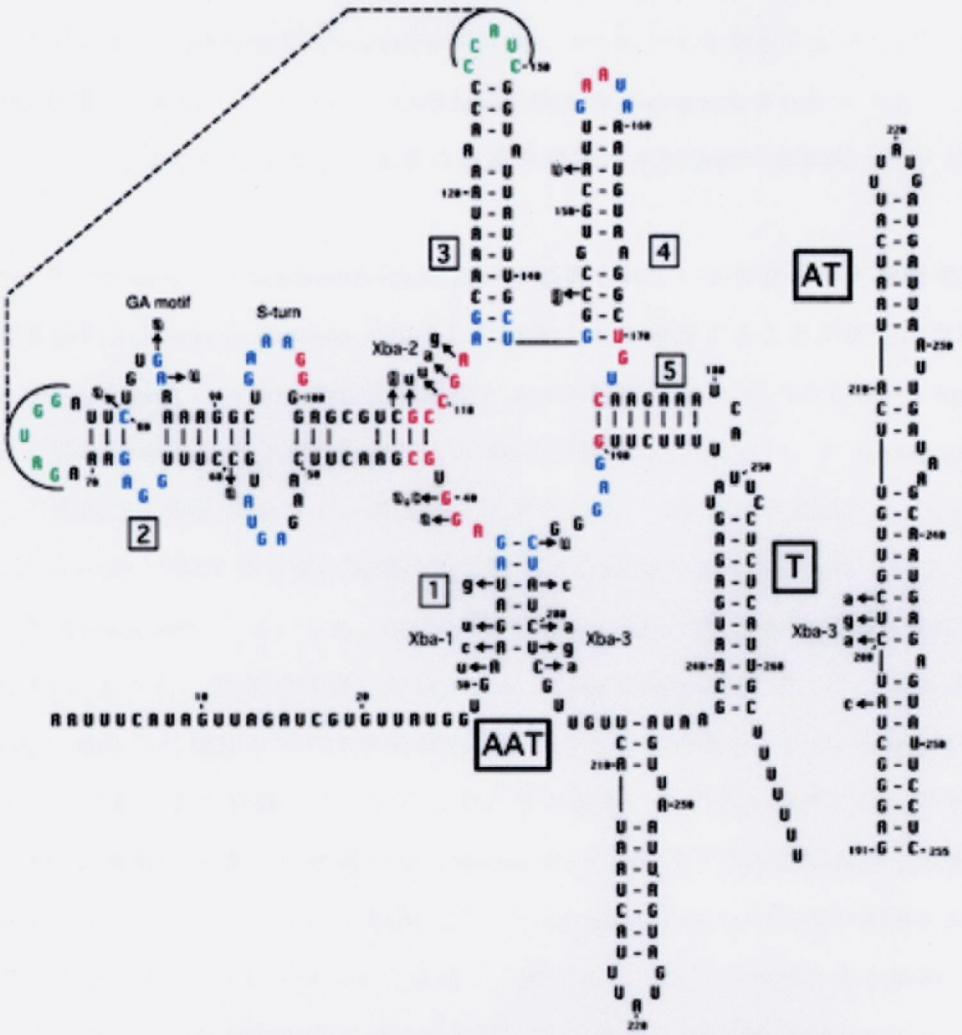

Figure 2-8.　Riboswitch による *lysC* の発現調節機構

lysC mRNA5' 領域は273塩基から構成されており、エフェクター分子であるリジンを包み込むような構造を形成すると、ρ-factor 非依存性の転写終結モチーフ（AAT）となり、リジンが欠乏状態にあると alternative な構造である antitermination モチーフ（AT）を形成する。

番号は本制御機構に特有な保存配列であるL-boxを示している。

[Frank, JG, *et al.* より抜粋]

この両者は生化学的に反応経路には差異があるにせよ、同じアミノ酸であるリジンを生合成する経路の発現調節を担う領域が初発酵素遺伝子の5' 上流領域にあるという類似点は見られる。しかしながら、両者の決定的な相違はmRNA5' 領域の長さ及び配列にある。*lysC* では273塩基からなる配列でリジンの濃度を感知して発現を調節している。様々な微生物のリジン抑制性遺伝子の上流配列を比較すると、保存性の高いモチーフが見出されている（Fig.2-8)。これはL-boxと呼ばれ、これがリジンとの相互作用に重要な役割をもっているものと考えられる。一方、本リジン生合成の場合は、*hcs*5' 上流配列は111塩基と短く、そこにはL-boxに共通した配列が存在しないため、同様の機構でリジンを直接結合することは考えにくい。他のriboswitchを見ても、制御対象となる遺伝子のmRNA5' 末端には200塩基近い長い領域が存在する。また、塩基配列からその発現制御機構がriboswitchによるものであるかを解析するプログラムriboswitch Finder[25]を用いて解析したが、*hcs*5'mRNAには既存のriboswitchが存在するという結果は得られなかったことも補足的ではあるが筆者の仮説を裏付ける間接的な証拠の1つとして挙げられる。

Lysクラスターがclassicalなattenuationによって制御されているのか否かを判断するためには、細胞内で実際に*hcs*-leader peptideが産生していることを確認することが決定的な要素となる。しかしながら、Lysクラスターの転写開始点と*hcs*の翻訳開始コドンには僅か3 bpしか存在せず、一般に翻訳開始に必要と考えられているSD配列は見出されない。*T. thermophilus* においても多くの遺伝子の翻訳開始コドンの上流に保存性の高いSD配列が見出されていることから、*hcs*-leader peptideの翻訳の有無に疑問が生じることも事実であった。その一方で、*E. coli* だけではなく *T. thermophilus* においても、SD配列を要しない遺伝子発現の例が報告されている（Fig. 2-9）[8, 9]ことから、前章で作製したreporter assay systemを応用して、*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産生を調べることにした。その結果、同形質転換体では、プロモーター配列を含む*hcs*上流配列を繋げた非融合α-galactosidaseを発現する形質転換体と比較してその比活性が低下しているものの、リジン添加によってα-galactosidaseの発現が抑制された（Fig. 2-4)。このことは、*hcs*-leader peptideが発現し、融合タンパク質の発現自体を制御していることを示唆している。この比活性の低下は、N末端に*hcs*-leader peptide及びそのジャンクション部位からなる32アミノ酸が付加されているために生じたものと解釈できる。*hcs*-leader peptideの発現を確証するべくこの融合タンパク質を精製し、N末端アミノ酸配列の解析を試みたが、有意なシグナルは得られなかった（Fig. 2-6)。

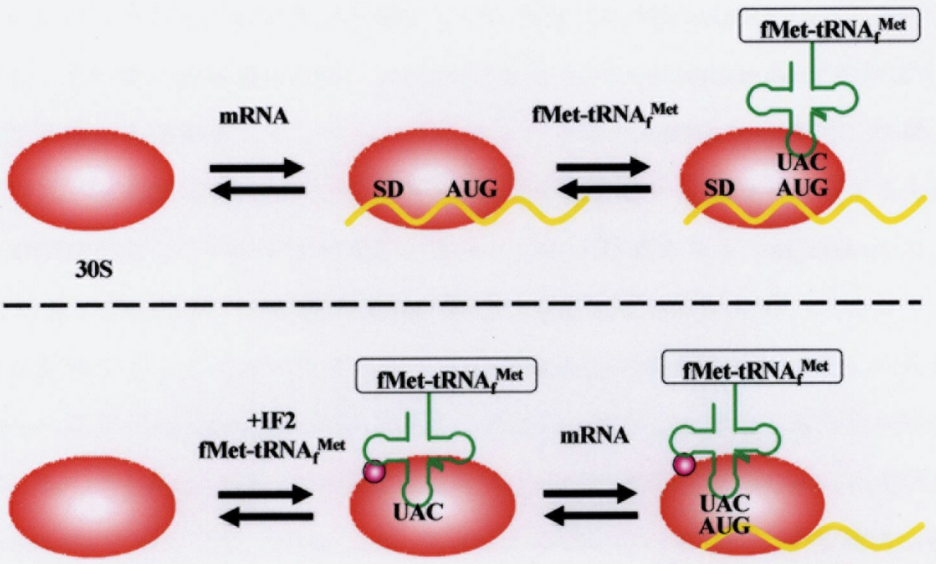

Figure 2-9.　SD配列が存在しない遺伝子の発現機構

SD配列が存在する遺伝子の発現機構を示したもの（上図）で、翻訳は30Sリボゾームが SD配列を先ず認識し、引き続いてfMetをチャージしたfMet-tRNA^{fMet}と会合する。
SD配列が存在しない遺伝子の発現機構を示したもの（下図）で、IF2とfMet-tRNA^{fMet}の会合が先行し、その後に30Sリボゾームと複合体を形成する。大腸菌等のグラム陰性細菌で報告されているメカニズムである[11, 12]。

解析が出来なかった原因としてN末端の修飾が考えられたため、脱ホルミル基、アセチル基デブロック、脱グルタミル基等様々な処理を施した後、再度N末端アミノ酸解析を試みたが、やはり有意なシグナルな得られなかった。精製融合タンパク質のN末端アミノ酸配列が何故決定出来なかったのかは現段階においても不明であるが、おそらくはN末端アミノ基に何らかの修飾が起こっているものと考えられる。リジン生合成遺伝子の発現調節機構の全貌に、さらにはN末端修飾に新たな知見をもたらす可能性があるものと考えられることから、現在、*hcs*-leader peptideのN末端の修飾基を決定しようとしているところである。

精製融合タンパク質を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後、TOF-MSで解析を行い、その結果として*hcs*-leader及びジャンクション部位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(Fig. 2-7)。以上の結果から、Lysクラスターの発現制御はclassicalなattenuationメカニズムによるものであることが明らかになった。それと同時にこの結果は、筆者の知る限り、実際に生合成を調節するleader peptideを検出した初めての事象である。

これまでの結果に基づいて、RNA二次構造予測プログラムであるMfold[26]を用いて、*hcs*5'配列が取り得る構造を予測した（Fig. 2-10）。

生育環境中にリジンが存在する場合は配列[CCGGCCCG]と配列[CGGGCCGG]が安定なstem-loop構造を形成し、その後にpoly-(U)が続くρ-factor非依存性のtermination motifを形成する。一方、リジンが欠乏状態にある場合はタンデムリジンコドン以降のmRNAとの間で二次構造を形成する結果、配列[CCGGCCCG]は巨大なstem中の配列[GCCGG]と塩基対を形成する方が安定となり、配列[CGGGCCGG]との塩基対形成が出来なくなると推測される。regulatoryコドンである（AAA）x 2は基本的にこの二次構造の直接の構造要素とはならないため、このコドンをグルタミンコドンに置換することによってグルタミンによる転写終結が生じたと考えられる。*E. coli*の*trp* operonの場合はregulatoryコドンである（TGG）x 2が二次構造の構成配列に含まれると予想されている。*T. thermophilus*にみられたLysクラスター発現のattenuationは基本的には、*E. coli*の*trp* operonに類似した“classical”なattenuationといえるが、二次構造の構成配列とregulatoryコドンの位置関係が異なっている。この位置関係が関係ないのであれば、この原理を応用することで、アミノ酸という安価なエフェクターを用いて発現のON/OFFが可能な遺伝子発現システムを構築することが可能かもしれない。

融合タンパク質の発現量は低く、培養液1 lあたり約2 μgの精製融合タンパク質しか得られない。これはα-galactosidaseとして約20 pmolに相当し、これまでに他のattenuationメカニズムでleader peptideが検出されなかったのは、その発現量の少なさに起因するものと考えられる。

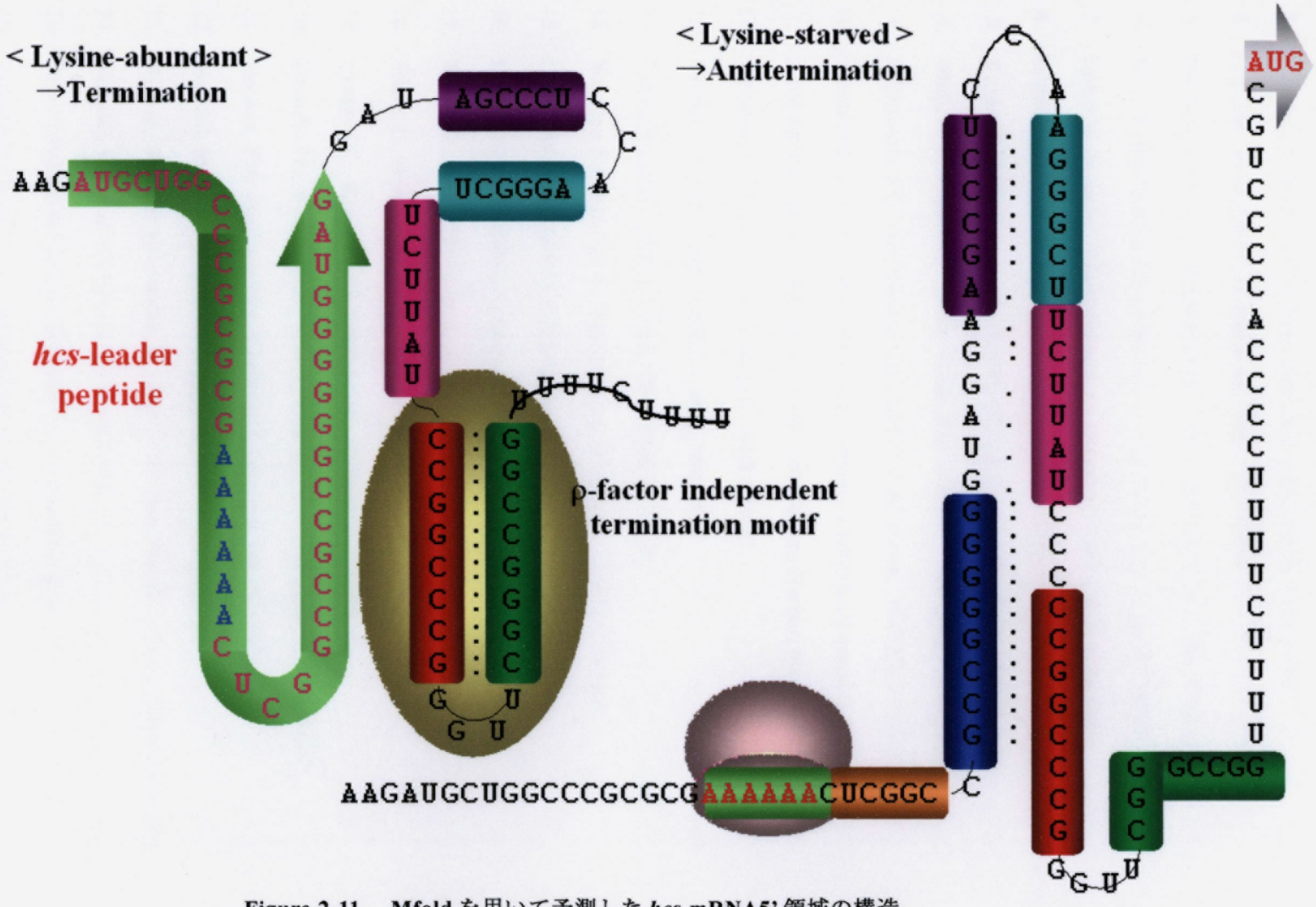

Figure 2-11.　Mfold を用いて予測した *hcs* mRNA5' 領域の構造

リジン存在下においては、リボゾームの stalling は生じないため、ρ-factor 非依存性の転写終結モチーフを形成する（Left）。一方、リジンが欠乏状態にあるとリボゾームの"stalling"が容易には解除されないため alternative な構造である antitermination モチーフを形成し、下流遺伝子の転写が伸長する。

§ 2–5. References

1. Shimizu, Y., *et al.* (1973) *Proc. Natl. Sci. USA.*, **70(7)**, 1990-1994.
2. Lee, JM., *et al.* (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 7371-7380.
3. Miranda-Rios, J., *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 9738-9741.
4. Nou, X. and Kadner, RJ. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 7190-7195.
5. Epshtein, V., *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 5052-5056.
6. Johansen, LE., *et al.* (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 5200-5209.
7. Kochhar, S. and Paulus, H. (1996) *Microbiology*, **142**, 1635-1639.
8. Moll, I., et al. (2004) *Nucleic Acids. Res.*, **32(11)**, 3354-3363.
9. O'Donnell, SM. and Janssen, GR. (2002) *J. Bacteriol.*, **184(23)**, 6730-6733.
10. Sambrook, J.,et al. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
11. Shimizu, N., *et al.* (1974) *FEBS Lett.*, **40(1)**, 80-83.
12. Vacher, J., *et al.* (1985) *EMBO J.*, **4(2)**, 509-513.
13. Lynn, SP., *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, **194(1)**, 59-69.
14. Wessler, SR. and Calvo, JM. (1981) *J. Mol. Biol.*, **149(4)**, 579-597.
15. Chen, JW., *et al.* (1991) *J. Bacteriol.*, **173(7)**, 2328-2340.
16. Lynn, SP., *et al.* (1982) *J. Bacteriol.*, **152(1)**, 363-371.
17. Wada, C., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 15908-15913.
18. Wade, C., et al. (2002) **Nature**, **419**, 952-956.
19. Lynge, CC., et al. (1997) *J. Bacteriol.*, **179(8)**, 2540-2550.
20. Grundy, FJ., et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 12057-12062.
21. Henkin, TM. and Yanofsky, C. (2002) Bioessays, 24, 700-707.
22. Mandal, M., *et al.* (2003) *Cell*, **113**, 577-588.
23. Biswas, DK. and Mazumder, R. (1966) *Biochim. Biophys. Acta.*, **130(2)**, 531-534.
24. Mandal, M., *et al.* (2003) *Cell*, **113**, 577-588.
25. http://riboswitch.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/
26. http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/