

第4章 *T. thermophilus* HB27株の転写因子、*argR*遺伝子のクローニング

§ 4-1. Introduction

当研究室において行われてきた研究から、*T. thermophilus* HB27株は真正細菌に属するにもかかわらず、酵母やカビが行うように必須アミノ酸であるリジンを、AAAを經由して生合成していることを示してきた。また、Lysクラスターにコードされる幾つかの生合成関連酵素はアルギニン生合成関連酵素と高い相同性を有することを示すことから、これらの酵素はその反応機序においてもアルギニン生合成酵素に類似しているものと考えられる。さらに近年精力的に行われてきた研究により、同定されていなかった第3, 4, 8, 9番目の反応を触媒する酵素をコードする遺伝子 (*hicdh*, *lysN*, *lysJ*, *lysK*) のクローニングに成功したが [1, 2, 3, 4]、この第8番目の反応を触媒する酵素 *lysJ* (*N*-acetyllysine aminotransferase) が、本来の基質よりもアルギニン生合成における類似反応の基質 (*N*-acetylornithine) に対して16倍も高く触媒することが示された [3]。このことから本菌のリジン生合成はアルギニン生合成と生理的にも非常に密接した関連性があるものと考えられる。

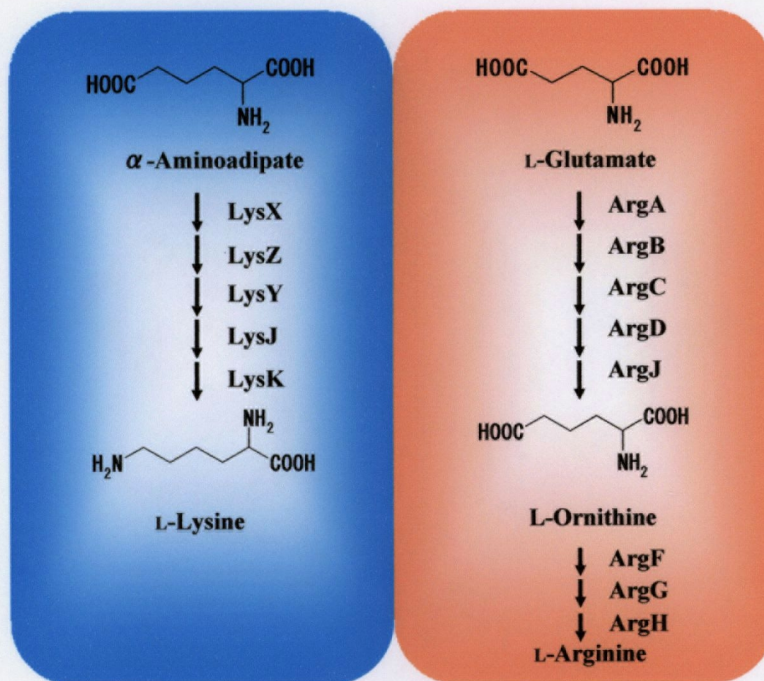


Figure 4-1. AAA 以降の生合成相関

AAA経路は基質となるAAAがアルギニン生合成経路の基質であるグルタミン酸と比較してメチレン基が1つ多い点以外は非常に類似している。また、*lysJ*, *lysK*の動力学的解析から、それぞれ本来の基質よりもアルギニン生合成経路において相当する基質がより高い活性を呈した。

さらに、遺伝子の発現調節機構において、興味深い現象が観察されている。本リジン生合成の第1番目の反応、2-oxoglutarate から homocitrate への変換を行う酵素の *hcs* 遺伝子上流に存在するプロモーターは、アルギニン存在下で若干ではあるものの活性化される (Fig. 1-10) これまでに示してきたリジンによる classical な attenuation メカニズムではこのアルギニンによる転写活性化の説明が困難であることから、リジンによる発現調節とは異なる別の調節機構が存在している可能性が考えられた。

また、本リジン生合成の第8番目の反応、*N*-acetyl- α -aminoadipate semialdehyde<putative> から *N*-acetyllysine<putative> への変換を触媒する酵素をコードしている *lysJ* の転写はアルギニン存在下で抑制されることが示されている。この発現調節はまだ解析の端緒についたばかりの段階なので断定することはできないが、アルギニンをエフェクターとした *trans* な転写因子による制御メカニズムである可能性が高いと考えている。

これらの結果は、本リジン生合成の各酵素が *in vitro* における機能面だけではなく、生理的な面においてもアルギニン生合成と関連があることを示唆するものと考えられる。

アルギニンを介した発現調節では、多くの生物種において ArgR による調節機構が良く知られている[5, 6, 7, 8, 9]。

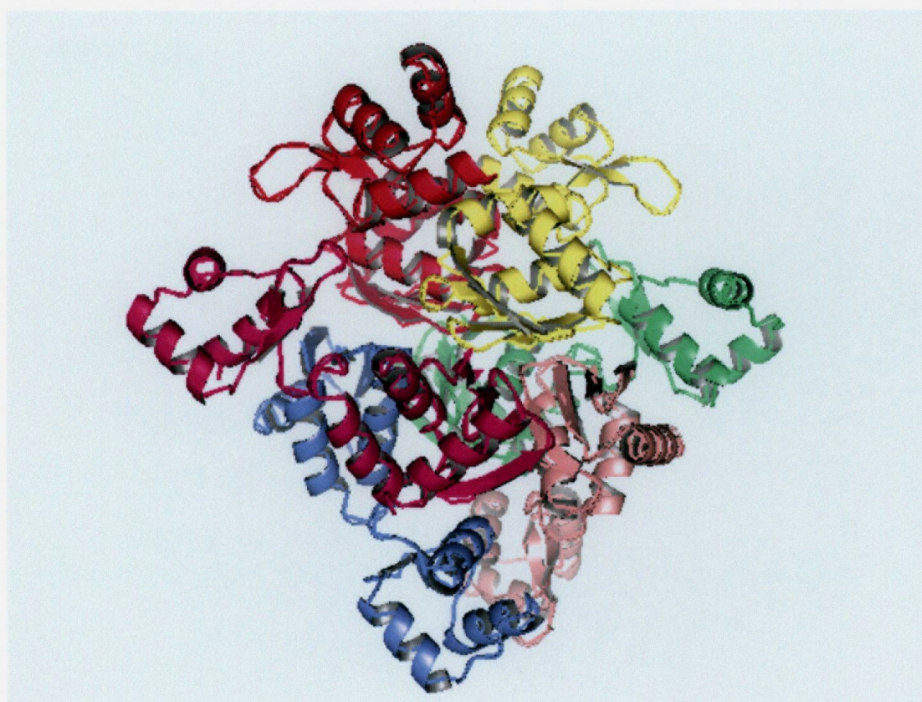


Figure 4-2. *B. stearothermophilus* 由来 ArgR の立体構造 (PDB No, 1B4A)

N末端にDNA結合モチーフであるwinged Helix-Turn-Helix (wHTH)を、そしてC末端にはアルギニン結合ドメインを有する。基本単位は三量体で、殆どの生物種では三量体分子が2つ会合した六量体で生理活性を有する。

ArgR は N 末端に winged Helix-Turn-Helix(wHTH) という DNA 結合モチーフを、そして C 末端にアルギニン結合ドメインを有しており (Fig. 4-2)、アルギニン代謝に関わる AhrC と共にファミリーを構成している [10, 11, 12, 13]。アルギニンと結合することにより、DNA 結合活性を持つようになった ArgR は、ARG-box と呼ばれる保存性の低い不完全な回文配列を認識する [14, 15, 16, 17]。ArgR は *E. coli* や *B. subtilis*, *Lactococcus lactis* において Acetyl-L-ornithine から L-ornithine へ変換する反応を触媒する酵素 ArgE や引き続く反応である L-ornithine carbamoylphosphate から citrulline へ変換する反応を触媒する酵素、ArgF (ornithine carbamoyltransferase) 等のアルギニン生合成やアルギニン transporter に関わる遺伝子の発現調節を行うことが報告されている [18, 19, 20]。この他にも幾つかのオペロンを制御することが報告されており [21, 22, 23]、activator/repressor 双方として機能し、一般にアルギニン生合成に対しては repressor として、アルギニン関連の代謝・分解に対しては activator として機能すると考えられているがその詳細は良く分かっていない

以上のように、ArgR は研究対象として非常に興味深いものであるが、筆者が研究を行っている時点では本菌から *argR* 遺伝子のクローニング及びその機構解析はなされていなかった。そこで本研究では、リジン生合成関連酵素遺伝子の発現制御に関与する可能性のある転写制御因子の 1 つとして、*T. thermophilus* HB27 由来の転写調節因子 ArgR homolog をコードする遺伝子のクローニングを行った。

§ 4-2. Materials and Methods

§ 4-2-1. *T. thermophilus* からのゲノム抽出

T. thermophilus HB27 株は、文献 [24, 25, 26] 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。

§ 4-2-2. Molecular cloning and sequence

遺伝子の基本的な操作は文献 [27] に従って行った。先ず現在までに database 上に公開されている種々の生物からの ArgR のアミノ酸配列に関してアライメントを行い (Fig. 4-3)、その保存領域に基づいて ArgFw1、ArgFw2、ArgRv1、ArgRv2 と命名した 4 つのオリゴヌクレオチド (Table 4-1) を設計し、degenerate primer として PCR で用いた。

Table 4-1. ArgR homolog をクローニングするために用いた合成オリゴヌクレオチド

Primer Name	Sequence
ArgFw1	5'-CAGAAGCG(G/C)ATCCAGGACATCATC-3'
ArgFw2	5'-CAGGC(G/C)AC(G/C)GT(G/C)TCCCG(G/C)GACATCAACGAG-3'
ArgRv1	5'-GTC(G/C)GC(G/C)GT(G/C)CGGAT(G/C)AC (G/C)AGGATGTTCTC-3'
ArgRv2	5'-GTCCGC(G/C)CC(G/C)GC(G/C)AG(G/C)GT(G/C)CC(G/C)ACGATGTCGTC-3'
argRfw	5'-GCTGTAGAAAGGAGGTGCATATGGGCAACAAGGCGGAACGGCACCGC-3'
argR(his) ₈ Rv	5'-CCCAAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGAACCGGAAAG CGCCCGCCGCAG-3'

T. thermophilus HB27株のゲノムDNAを鋳型とし、ArgFw1/ ArgRv1、ArgFw1/ ArgRv2、ArgFw2/ ArgRv1、ArgFw2/ ArgRv2 というプライマーの組合せにより、以下のプログラムにより PCR を行った。

94 °C, 5 min → (94 °C, 1 min → 65 °C, 1min → 72 °C, 1 min) × 30 cycle → 72 °C, 7 min → 4 °C, ∞
ArgFw1/ ArgRv2 の組合せで増幅された約 360 bp の断片を Perfectly blunt cloning kit (Novagen) を用いて、平滑化及びリン酸化を行い pT7blue vector に連結した。Sequence によって同断片が *argR* homolog 断片であることを確認後、このプラスミドの *Hind*III-*Eco*RI 断片をプローブとして Southern hybridization に用いた。Southern hybridization は Random primer fluorescein labeling kit (New England Nuclear, Co.) を用い、各制限酵素 (*Apa*I、*Bam*HI、*Bgl*II、*Hinc*II、*Hind*III、*Kpn*I、*Nco*I、*Nde*I、*Not*I、*Pst*I、*Sac*I、*Sac*II、*Stu*I、*Xba*I、*Xho*I、*Bam*HI-*Hind*III) で消化した *T. thermophilus* HB27 株のゲノム DNA に対して行った。Hybridization の温度等の条件は New England Nuclear の指示通りである。Southern hybridization において検出された約 4.0 kb の *Bgl*II 断片を予め *Bam*HI 及び calf intestine alkaline phosphatase で処理した pUC19 に連結し、*E. coli* DH5α を形質転換した。Colony hybridization を Southern hybridization と同様の条件で行い、得られた positive clone から単離したプラスミドを pArgRBgl4.0 と名付けた。pArgRBgl4.0 の塩基配列解析は Fig. 4-4 に示したように行った。

§ 4-2-3. *T. thermophilus* 由来 ArgR homolog の系統樹作製

系統樹は最充法及び近隣接合法を用いることによって構築した。配列データは Genbank から取得し、アミノ酸のアライメントは DDBJ 上の CLASTAL W[28] を用いて行った。このアライメントしたデータを系統樹作製プログラム Mega 2[29] によって計算させ、その系統樹を作成した。

§ 4-2-4. *T. thermophilus* HB27 由来 ArgR homolog の大腸菌大量発現系の構築

pArgRBgl4.0 を鋳型として合成オリゴヌクレオチドである argRFw 及び argR(his)₈Rv (Table 4-1) をプライマーとした PCR によって *Nde*I site 及び *Eco*RI site を *argR* homolog の開始コドン及び終始コドンの直前に導入した。PCR は以下の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) × 30 cycle → 72 °C, 7 min → 4 °C, ∞

PCR によって増幅された断片を *Nde*I 及び *Eco*RI で消化し、予め *Nde*I 及び *Eco*RI で消化しておいた pET26b(+) vector に連結した。得られたプラスミドを pETTAArgRhis と名付け、以降の発現プラスミドとして用いた。

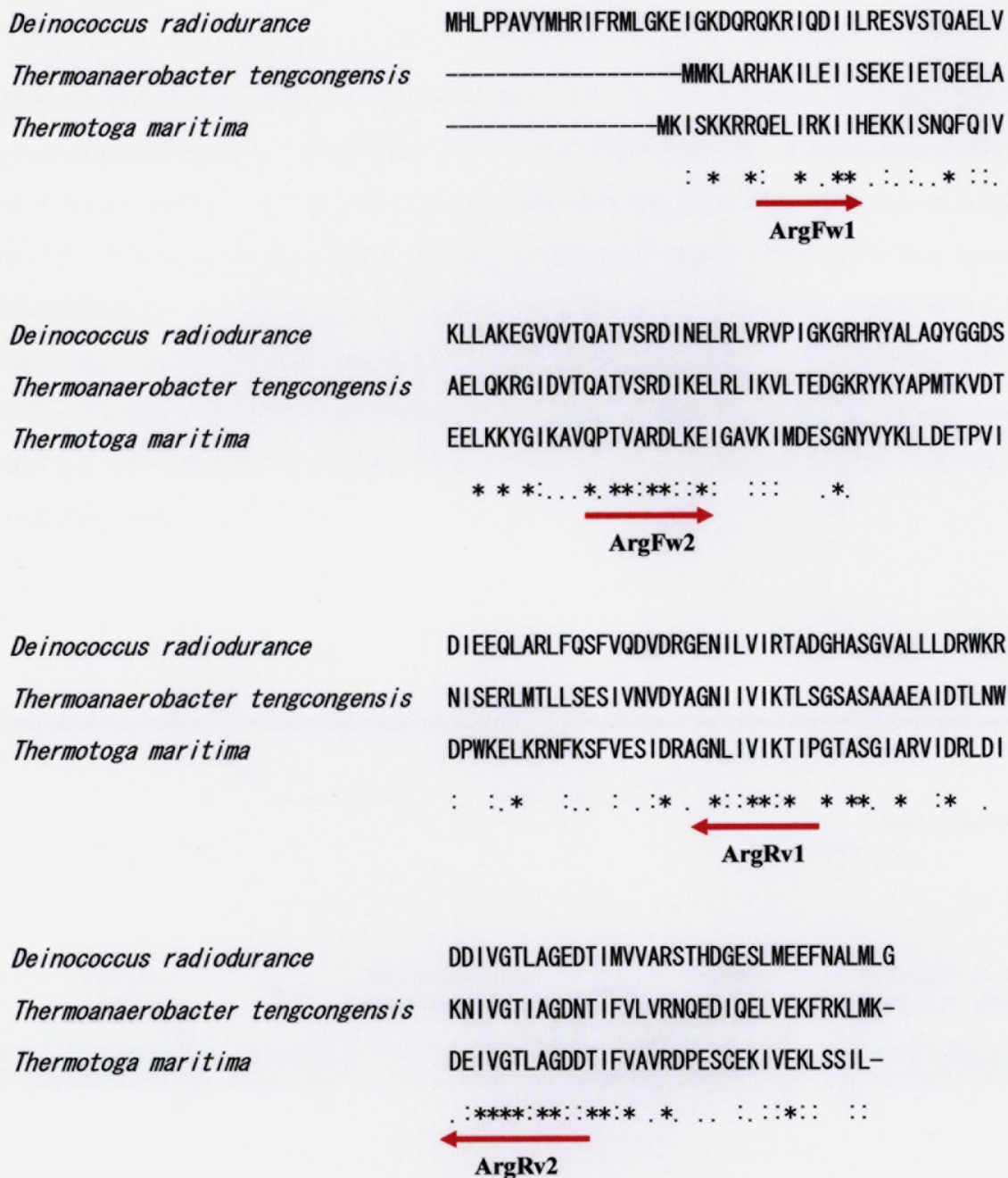


Figure 4 -3. 種々の生物種由来する ArgR のアライメント及び degenerate プライマーの設計

§ 4-3. Results

種々の生物からの *ArgR* のアミノ酸配列に関してアライメントを行い、その保存領域から degenerate primer を設計し、相同性を利用してクローニングを行った。*T. thermophilus* HB27 株のゲノム DNA を鋳型として ArgFw1/ ArgRv2 の組合せで増幅された断片 (363 bp) は sequence 解析によって *argR* homolog の断片であることが分かった。同断片をプローブとした Southern hybridization によって 4.0 kb *Bgl*III 断片が検出されたことから、この 4.0 kb の *Bgl*III 断片を予め *Bam*HI、calf intestine alkaline phosphatase で処理した pUC19 に連結し、*E. coli* DH5 α を形質転換した。その結果、完全長の *argR* homolog を含む 4.0 kb の *Bgl*III 断片を有する positive clone を単離することに成功した。この clone が有するプラスミドを pArgRBgl4.0 と名付け、配列解析を行った (Fig. 4-4)。

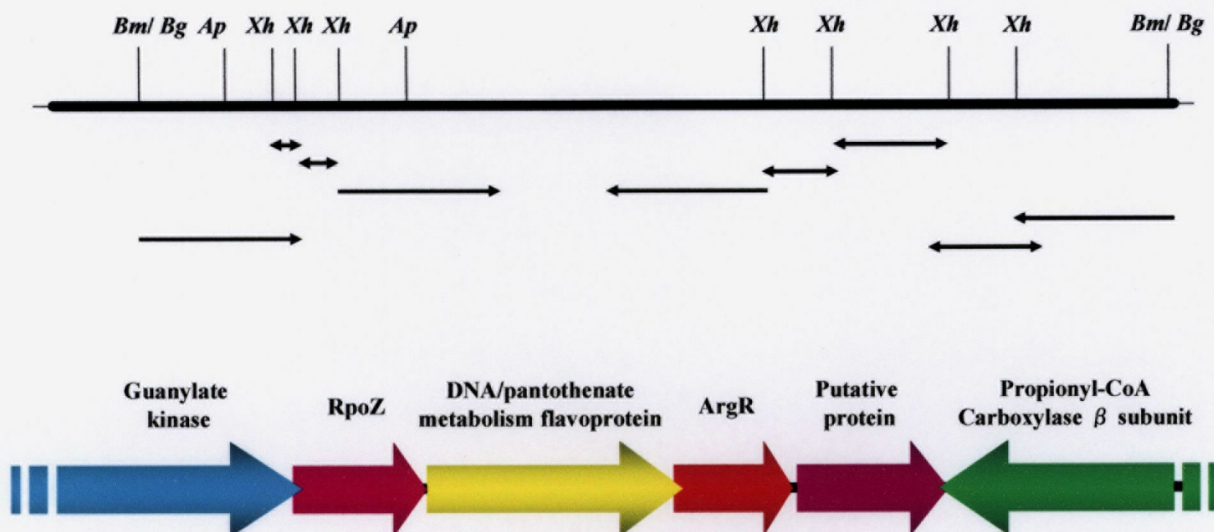


Figure 4-4. *argR* homolog 遺伝子の物理的地図
southern analysis で取得した positive clone、pArgBgl4.0 に対して行った配列解析結果を示した。
Ap, *Apa*I; *Bm*, *Bam*HI; *Bg*, *Bgl*III; *Xh*, *Xho*I

この pArgRBgl4.0 には、*argR* homolog を含む 6 つの open reading frame (ORF) が存在していた (Fig. 4-4)。*argR* homolog は 492 bp で構成され、164 残基のアミノ酸残基からなる、分子量約 19 k からなるタンパク質であった (Fig. 4-5; Accession No. AB117617)。他の 5 つの ORF の内 4 つは、現在までに公表されている database 解析から、guanylate kinase、RpoZ、DNA/pantothenate metabolism flavoprotein、propionyl-coA carboxylase β subunit と相同性を示した。ArgR homolog の推定開始コドン ATG の上流には保存性のあるプロモーター及びリボソーム結合部位 (RBS) と推定される配列が見出せなかった。従って、*argR* homolog は上流の ORF である DNA/pantothenate metabolism flavoprotein、ないしはさらに上流に位置する ORF と共に polycistronic に転写されている可能性が示された (Fig. 4-5)。

この ArgR homolog はそのアミノ酸配列から、DNA 結合 motif である winged Helix-Turn-Helix を 1 unit 有しており、その推定アミノ酸配列は放射線耐性菌 *Deinococcus radiodurans* の ArgR homolog である DR0742 遺伝子産物 [30] と非常に高い相同性を有していた。(Fig. 4-6) これは分類学上 *T. thermophilus* が *D. radiodurans* と近縁種であることと一致した結果であった。

ATGGAGACCC GGGAGGGCCT GGAGCGGGCC CGGGGAAGC TCGCCGCAA GAACCTGGAC	60
CTGATCGCCT TGAACACGT GGGGCGGGAG GGGGTGGGCT TCGGGAGCCC CGAGAACGAG	120
GTGACCCTGA TCCTGCGAGA CGGCCGGGTG GTGGAGCTTC CCCGGCTTTC CAAGCGGGAG	180
GTGGCCCACC GTATACTGGA TTTCGTCAAG GAGCTCTGGA AGCGATAGGA GCCGCGTATG	240
	M 1
GGCAACAAGG CGGAACGGCA CCGCGCCATC CAGGAGATCG TCCGCCGGGA GGAGATCGGC	300
G N K A E R H R A I Q E I V R R E E I G	21
ACCCAGAAGG AGCTGGTGGG GAGGCTGCGC CAGCTGGGGT TTGAGGTGAC CCAGGCCACG	360
T Q K E L V E S V R Q L G F E V T Q A T	41
GTGAGCCGGG ACATCGCCGA GCTGGGCCCTG GCCCGCATCG CCTTGGGCAA GGGGCGGCAC	420
V S R D I A E L G L A R I A L G K G R H	61
CGGTACGTCC TCCCGGCCGC GGACCTTCCC GAGAACGCCT ACGAGGAGCT CAAGCGCCAG	480
R Y V L P A A D L P E N A Y E E L K R Q	81
TTCGGCCTCT TCGTGCGGGA CGTGACCGG GGAGGGAACC TCCTCGTGGT GAAGACGGCG	540
F G L F V R D V D R G G N L L V V K T A	101
GAGGGGACG CCTCCGGCAT CGCCTACCTC CTGGACCGCC TCCGCCGGGA CGAGATCGTG	600
E G H A S G I A Y L L D R L R R D E I V	121
GGCACCTTGG CCGGGGACGA CACCATCTC GTGGTGGCCC GAACCGAGGA GCGGCCCCAG	660
G T L A G D D T I L V V A R T E E A A Q	141
GCCCTCGAGG ACGAGTTCGC GGGCCTGCTC GTGGAGGGAA GGGCCCTGCG GCGGGCGCTT	720
A L E D E F A G L L V E G R A L R R A L	161
TCCGGTTCCT AGAGTCTGG AGCTCTTCT CAAGTCCTC CTGACCCTCT TCGTGGTCAT	780
S G S *	164
GGACCCGGTG GGGCTCGTCC CCGTCTTCGT GGCCTTGGCG GGGGACCGCC CCCACCGGAC	840
CCAGGTCCTC ATCGCCCGCA AGGCGGTCCT GGTGGCGGGG GGGCTGCTCA CTTCTTCTA	900
CTTTTTCGGG CGGGAGCTTC TGGGGCACCT CGGGATCTCC CTCGAGGCC TCGCATCGC	960

Figure 4-5. *argR* homolog 遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列
推定SD配列を下線で示した。ArgRの開始コドン（ATG）を赤で示し、
また、上流のORF終始コドン（AGAGTCTGG）及び下流のORF開始コドン（AGCTCTTCT）をそれぞれピンク、青で示した。
[DDBJ accettion number. AB117617]

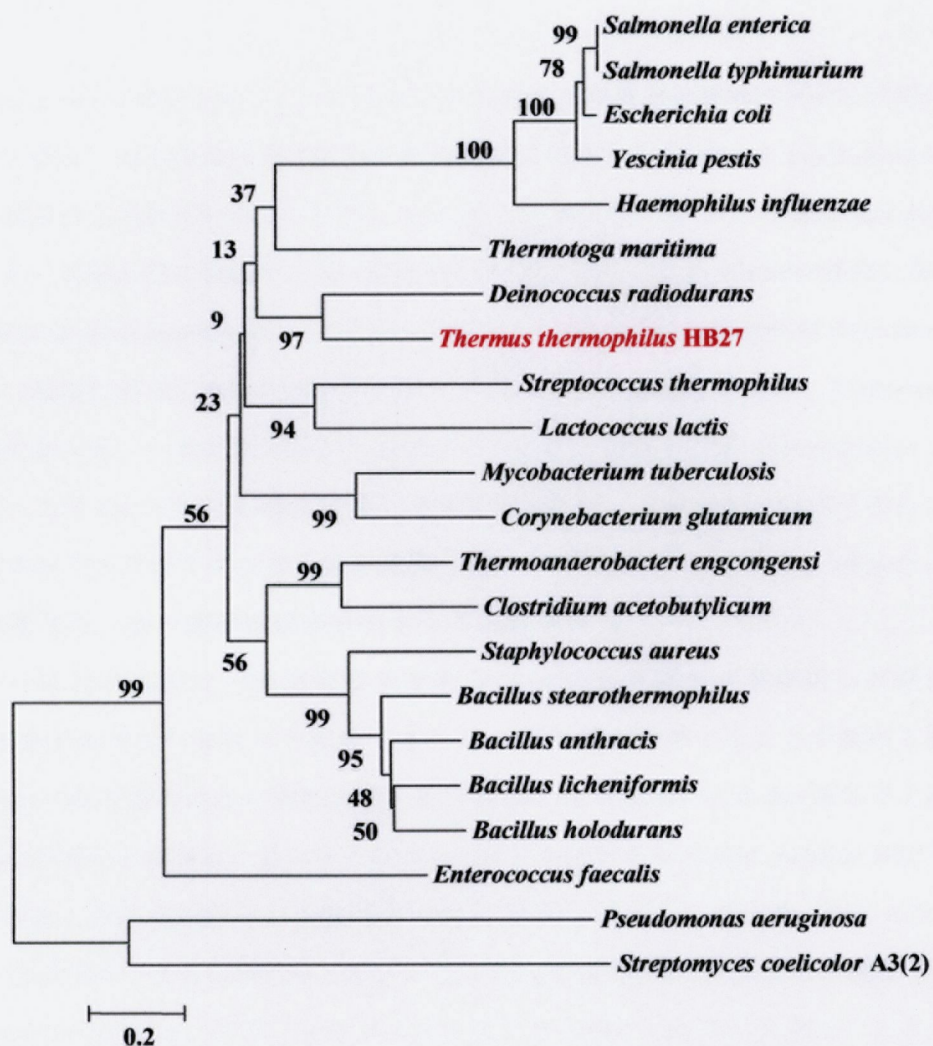


Figure 4-6. ArgR homolog の系統樹

最充法及び近隣接合法を用いて、プログラム Mega 2 で作製した。

数字は Bootstrap 値を示す。解析に必要な配列データは Genbank から取得し、アライメントは DDBJ 上の ClustalW を用いて行った。

§ 4-4. Discussion

T. thermophilus HB27 株の Lys メジャークラスターの転写発現調節機構の解析を目的として研究を行ってきた結果、本生合成の最終産物であるリジンを介する feedback repression によって生合成の流量調節がなされていることが明らかになった (Fig. 1-10)。この feedback repression は Lys クラスターの最上流に位置する *hcs* 遺伝子上流に存在する *hcs*-leader 領域に依存する。*hcs*-leader 領域には short peptide がコードされており、この peptide の翻訳時の ribosome stalling の有無によって転写の終結 / 伸長が決定される、大腸菌の *trp* operon と類似した attenuation による調節機構であった。しかしながら、一方で、アルギニン存在下で *T. thermophilus* HB27 株を培養すると、この *hcs* の転写が増大することが観察された。これまでの研究で明らかにした attenuation メカニズムだけではこの現象を説明することができないことから、同 attenuation メカニズムとは異なる、別の調節機構が存在する可能性がある。

Lys クラスターには含まれない構造遺伝子である *lysJ* の転写開始点を解析した際にも、*T. thermophilus* をアルギニン存在下で培養すると *lysJ* 転写量が激減することが観察されている (Fig. 3-4)。*lysJ* の転写開始点から開始コドンまでの 100 bp の領域内には *hcs* 遺伝子上流に存在する *hcs*-leader の場合と同様に、2 つのアルギニンコドンを有する leader peptide 様配列と複数の二次構造を形成し得る可能性のある配列或いは回文配列が見出されている (Fig. 3-5)。また、本菌のリジン生合成が AAA 以降はアルギニン生合成と類似性を示すことも考慮すると、S1-nuclease mapping の結果は、本リジン生合成の発現調節機構にアルギニンがエフェクターとして関連性を有することを示唆しており、アミノ酸生合成の進化的及び生理的側面からも興味深い現象であると考えられる。このアルギニンによる発現調節機構を解析する上で、これまでの結果から *hcs* 遺伝子の発現調節と同様に leader peptide を介するメカニズムとアルギニンをエフェクターとする転写因子を介するメカニズムの両方が存在する可能性が考えられる。*lysJ* 上流にコードされている可能性のある short peptide は僅か 7 アミノ酸残基で構成されていることになり、加えてその内部に存在するアルギニンコドンは連続して配置されていない等、典型的な attenuation leader peptide と構造が異なっている。まだ詳細な解析を行っていないので断定できないが、この *lysJ*-*lysK* クラスターは leader peptide を介するメカニズムである可能性よりは、アルギニンをエフェクターとする *trans* な転写因子を介するメカニズムによって制御されている可能性が高いと考えている。

アルギニンを介した発現調節では、ArgR による調節機構が最も良く研究されているが、本菌からはクローニングされていない。そのため、本菌のリジン生合成における転写制御機構を解析する一環として、*argR* 遺伝子のクローニングを行った。本菌の ArgR homolog は 164 アミノ酸から構成され、他の微生物由来の ArgR と同様に DNA 結合 motif である winged Helix-Turn-Helix を 1 unit 有していた。この ArgR homolog の推定アミノ酸配列は放射線耐性菌 *Deinococcus radiodurans* の ArgR homolog である DR0742 遺伝子産物 [30] と 50 % の相同性を有していた。本 ArgR がリジン及びアルギニンに対してどのように応答するかは興味深い問題である。本 ArgR homolog が *hcs* 上流に作用する activator として機能するのであれば、或いは *lysJ* の上流に結合する *trans* な因子であるならば、類似生合成の最終産物による feedback repression という新規な発現調節が行われていることになる。

ArgR の機能解析は、当研究室の藤原が発現・精製系を構築し、同遺伝子破壊株の作製、各種遺伝子の転写制御領域への結合能の有無等の確認を行っており、近い将来アルギニン生合成酵素遺伝子制御における役割やリジン生合成酵素遺伝子発現調節機構への関わり等が明らかになるものと期待される。

§ 4-5. References

1. Miyazaki, J., *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1864-1871
2. Miyazaki, T., *et al.* (2004) *Microbiology*, **150(Pt7)**, 2327-2334.
3. Miyazaki, J., *et al.* (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 5067-5073.
4. Miyazaki, J., *et al.* (2002) *FEBS Lett.*, **512**, 269-274.
5. Udaka, S. (1970) *Nature*, **228(5269)**, 336-338.
6. Delforge, J., *et al.* (1975) *Eur. J. Biochem.*, **57(1)**, 231-239.
7. Gardner, MM., *et al.* (1983) *Mol. Gen. Genet.*, **189(3)**, 458-462.
8. Poolman, B., *et al.* (1987) *J. Bacteriol.*, **169(2)**, 5597-5604.
9. Dion, M., *et al.* (1997) *Mol. Microbiol.*, **25(2)**, 385-398.
10. Ni, J., *et al.* (1999) *Nat. Struct. Biol.*, **6(5)**, 427-432..
11. Grandori, R., *et al.* (1995) *J. Mol. Biol.*, **254(2)**, 150-162.
12. Van Duyne, GD., *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.*, **256(2)**, 377-391.
13. Sunnerhagen, M., *et al.* (1997) *Nat. Struct. Biol.*, **4(10)**, 819-826.
14. Miller, CM., *et al.* (1997) *Mol. Microbiol.*, **26(1)**, 37-48.
15. Klingel, U., *et al.* (1995) *Mol. Gen. Genet.*, **248(3)**, 329-340.
16. Lustig, B. and Jernigan, RL. (1995) *Nucleic Acids. Res.*, **23(22)**, 4707-4711.
17. Rodriguez-Garcia, A., *et al.* (1997) *Mol. Microbiol.*, **25(2)**, 219-228.
18. Lu, CD., *et al.* (1999) *J. Bacteriol.*, **181(8)**, 2459-2464.
19. Song, H., *et al.* (2002) *J. Mol. Biol.*, **315(3)**, 255-274.
20. Larsen, R., *et al.* (2004) *J. Bacteriol.*, **186(4)**, 1147-1157.
21. Park, SM., *et al.* (1997) *J. Bacteriol.*, **179(17)**, 5309-5317.
22. Kiupakis, AK. and Reitzer, L. (2002) *J. Bacteriol.*, **184(11)**, 2940-2950.
23. Devroede, N., *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.*, **336(1)**, 25-42.
24. Kobashi, N., *et al.* (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 1713-1718.
25. Koyama, Y., *et al.* (1986) *J. Bacteriol.*, **166**, 338-340.
26. Tanaka, T., *et al.* (1981) *J. Biochem.(Tokyo)*, **89**, 677-682.
27. Sambrook, J., *et al.* (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

28. <http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>
29. Kumer, S., *et al.* (1993) MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, version 1.01. Pennsylvania State University Park, PA.
30. Masarova, KS., *et al.* (2001) *Genome. Biol.*, **2(4)**, RESEARCH0013