

論文内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成13年度博士課程 進学
氏名 坪内 泰志
指導教員名 西山 真

論文題目

Thermus thermophilus におけるリジン生合成酵素遺伝子の 発現調節機構に関する研究

Thermus thermophilus は、70 °Cで至適に生育する高度好熱性の真正細菌であり、大腸菌と同様に遺伝子工学的手法が適用可能であるという利点から生化学或いは分子生物学の基礎研究領域において幅広く研究されている。さらに、高温域で生育する本菌の特徴を利用した酵素の耐熱化研究といった応用的研究にも広く利用されている。

必須アミノ酸であるリジンには2種類の生合成経路が知られている。1つは真正細菌や植物にみられる diaminopimelate (DAP)を経由する DAP 経路であり、他方は酵母やカビにおいてみられる α -aminoadipate (AAA)を経由する AAA 経路である。しかしながら、*T. thermophilus* は真正細菌に属するにもかかわらず、AAA を経てリジンを生合成していることが当研究室において見出された。加えて、全生合成遺伝子をクローニングした結果、AAA 以前のリジン生合成は酵母及びカビの生合成と同様にロイシン生合成及び TCA 回路の一部と類似していること、そして AAA 以降の生合成は酵母やカビで見られるようなサッカロピンを中間体とする生合成とは異なり、アルギニン生合成と類似していることが明らかとなり、本リジン生合成系が関連する生合成・代謝系進化を解明する鍵となるものと考えられる。

本菌のリジン生合成酵素遺伝子をクローニングし、その酵素特性を解析することで酵素レベルでの本リジン生合成の全体像が明らかになりつつあるが、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であると考えられる。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主要遺伝子クラスターを中心とした転写調

節機構の解析を行った。

I. リジン生合成主要遺伝子クラスターの転写単位解析及び転写開始点の決定

本菌のリジン生合成には 11 の遺伝子が関与すると考えられるが、そのうち 7 つはクラスター (Lys クラスター) を形成している。リジン生合成酵素遺伝子の大半を含むこのクラスターの発現制御メカニズムを明らかにすることにより、リジン生合成における遺伝子発現の主要な部分を明らかにすることが出来ると考えられることから、このクラスターの発現制御機構を解析することにした。まず、このクラスターに含まれる遺伝子の転写単位を解明するために RT-PCR を行った。最小培地で生育させた *T. thermophilus* から抽出した Total RNA を鋳型とした結果、全遺伝子の連結部位で増幅が観察された。この結果より、これらの遺伝子は polycistronic に発現していることが明らかになり、Lys クラスターの発現がその最上流に位置する homocitrate synthase 遺伝子 (*hcs*) の発現調節に依存することが示唆された。そこで S1-mapping により *hcs* の転写開始点(TSP) の解析を行ったところ、TSP は *hcs* 開始コドンの 111 bp 上流のアデニン残基であると決定された。また、その転写量は、リジン存在下で培養した条件では減少していたことから、リジンによる転写制御の存在が示唆された。

II. *T. thermophilus* を宿主とする reporter assay 系の構築とそれを用いた転写制御機構の解析

TSP から *hcs* 開始コドンまでの配列は、複雑な二次構造を取り得るのに加えて、Lys コドン tandem に有する leader peptide 様 ORF(*hcs*-leader)をコードする可能性が示唆され、これが転写制御を担っている可能性が考えられた。そこで *hcs*-leader 部分がリジンによる Lys クラスターの発現調節に関与するか否かを解析することにした。*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 系は存在していなかったため、まず reporter plasmid の構築を行った。 α -galactosidase をコードしている *agaT* を knockout した *T. thermophilus* OF1053GD 株を宿主として *Bacillus stearothermophilus* 由来の耐熱性 α -galactosidase をコードする *agaA* をレポーター遺伝子として有する plasmid を構築した。プロモーターを含む *hcs* 上流配列を構築したレポータープラスミドの *agaA* 上流に組み込み、 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 まで減少した。一方で、*hcs* プロモーターを含むものの *hcs*-leader 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。加えて、*hcs*-leader 内に存在する tandem なリジンコドンをグルタミンコドンに置換したものを用いた場合にはリジンによる活性の低下は観察されなくなる一方、グルタミンによる活性の低下が観察されるようになった。これらの結果より、*hcs*-leader が、そしてとりわけその内部に存在する 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。

III. *hcs*-leader の検出

転写調節メカニズムには activator/repressor 等の *trans* な因子によるもの他に、配列に依存する *cis* の調節メカニズムが存在する。後者の代表的なものに、大腸菌の *trp* operon で提唱された “classical” な attenuation mechanism と近年見出された riboswitch がある。riboswitch が mRNA の

5'-UT 領域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。これまでの結果より、本菌の Lys クラスタは翻訳と 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、TSP と *hcs*-leader peptide の推定開始コドンとの間は僅か 3 bp であり、SD 配列は見出されない。したがって、*hcs*-leader peptide が本当に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。このことを証明するために、*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。同形質転換体は α -galactosidase 活性を示し、その活性はリジンを添加することにより抑制されたことから、リジンによる制御が構築したプラスミドにおいても働くことが分かった。次いで、この fusion-AgaA を精製し、トリプシン処理後に TOF-MS で解析を行った。その結果、*hcs*-leader 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。以上の結果から、Lys クラスタの発現制御は“classical”な attenuation mechanism によるものであることが明らかになった。

IV. Lys クラスタ以外に属するリジン生合成酵素遺伝子の発現調節機構の解析

本菌のリジン生合成酵素遺伝子で Lys クラスタ内にコードされていない構造遺伝子は、*hicdh*, *lysN*, *lysJ* 及び *lysK* の 4 つである。とりわけ配列解析から *lysJ* と *lysK* はクラスタを形成している可能性が示唆されたため、このクラスタについても発現制御解析を行った。S1-mapping により *lysJ* の TSP 解析を行った結果、*lysJ* 開始コドンの 100 bp 上流のグアニン残基であると決定された。またその転写量は、*hcs* とは異なりリジンではなくアルギニン存在下で培養した条件で減少していたことから、アルギニンによる転写制御の存在が示唆された。Lys クラスタと同様に TSP から *lysJ* 開始コドンまでの配列がアルギニンを介した転写制御を担っている可能性が考えられる一方、*T. thermophilus* の細胞抽出液を用いたゲルシフトアッセイにより、プロモーター付近に結合するタンパク質の存在が示されたことから、*lysJ*-*lysK* クラスタは上述した Lys クラスタよりも複雑な転写制御を受けている可能性が考えられた。

V. 総括

本研究において、*T. thermophilus* のリジン生合成酵素遺伝子の発現制御機構の解析を行い、その大半を含む Lys クラスタが大腸菌の *trp* operon で提唱される“classical”な attenuation mechanism に類似した機構で転写調節されていることを示した。また本研究では、制御機構で鍵となる leader peptide の発現を証明することに成功したが、私が知る限りこれは同様な leader peptide を介した attenuation mechanism の中で、それを直接的に証明した初めての例といえる。本研究で作製した reporter assay 系を用いることで、他のリジン生合成の酵素遺伝子の解析が容易になるものと考えられ、まだ不明な点も多い AAA を介する *T. thermophilus* のリジン生合成の全貌が明らかにされるものと期待される。