

所属 (主指導教官)	細胞遺伝学講座 (小笠原 直毅)		
氏名	川合 良和	提出	平成 15 年 1 月 7 日
題目	枯草菌 SOS レギュロンの研究：SOS 応答に伴う細胞分裂の抑制機構		

要旨

遺伝情報の担い手であるゲノム DNA は、生命が正常に営まれるために安定に維持されなければならない。しかし DNA は、紫外線などの環境中の変異原、あるいは細胞の代謝過程で生じる活性酸素などにより絶えず損傷を受けている。すべての生物はこうした状況に対処するため、これらの損傷を修復し DNA を安定に保つための多様な機構を備えている。

そのような防御機構の一つである SOS 制御系は、多くのバクテリアが共通に持つシステムであり、紫外線や電離放射線を照射されたり、ある種の抗生物質やアルキル化剤などの処理で DNA が損傷を受け、DNA の伸長が阻害を受けると誘導され、DNA 修復能の増加、細胞分裂の抑制、突然変異の増加やプロフェージの誘発など多様な現象を示す。これらの現象は大腸菌において特に詳しく研究が進められており、LexA (リプレッサー) により通常その発現が抑制されている SOS 遺伝子群の発現誘導を伴うことが知られている。近年では、その全ゲノム配列情報を基盤とした研究が可能となり、DNA アレイを用いた網羅的な解析から、lexA 変異株や紫外線照射に伴う SOS 誘導時の遺伝子発現プロファイルが作成され、新たに多くの遺伝子が SOS 応答により誘導されることが明らかになった。こうした研究により、大腸菌では 30 種類以上の SOS 遺伝子が見い出され、SOS 制御系は多くの反応からなる複雑なネットワークを形成することで、DNA 損傷に対する防御機構として機能していることが明らかになりつつある。

枯草菌でも DNA 損傷時に SOS 応答が誘導され、大腸菌と同様な現象を示す。その誘導機構も大腸菌と共通であり、いくつかの SOS 遺伝子は両者で共通に見い出されている。しかしながら、枯草菌ではアレイなどを用いた解析はまだ行われておらず、その全体像は不明であり、また、大腸菌 SOS 遺伝子で、損傷乗り越え修復や DNA 合成の抑制に関与する *umuD*、SOS 応答の抑制因子であると考えられている *dinI*、細胞分裂の抑制に関わる *sulA* などは、その機能の重要性に関わらず、相同遺伝子が見い出されない。特に、細胞分裂の抑制に関しては、枯草菌 *lexA* の破壊株で細胞の伸長が観察されることから、LexA の制御下に細胞分裂阻害因子が含まれていると予想された。このことは、大腸菌と枯草菌では、

異なる遺伝子が同様な SOS 機能を持つことを示唆しており興味深い。そこで本研究では、まず、枯草菌 SOS レギュロンに属する全遺伝子を同定することでその全体像を把握し、さらに細胞分裂阻害機構を解明することで枯草菌における SOS 制御系の特徴を明確にしたいと考えた。

初めに、DNA マクロアレイによる解析により、枯草菌全 SOS 遺伝子を同定することを目指し、*lexA* 破壊株で発現量の増加が認められる遺伝子を検索した。その結果、153 遺伝子において *lexA* 破壊株で有意な発現上昇が見られた。そのうち 38 遺伝子（これまでに同定された枯草菌 SOS 遺伝子を全て含む）についてはプロモーター領域に LexA の結合配列に類似した配列を含むことから、LexA による直接的な制御を受ける可能性が考えられた。

これらの遺伝子の中には機能を予測することが困難な遺伝子が約半数あり、細胞分裂阻害因子も含まれていると予想された。その候補として、*lexA* 破壊株で非常に高い発現上昇を示した *yneA* オペロン (*yneA*, *yneB*, *ynzC*) に注目し細胞分裂阻害への関与を検討した。まず、*yneA* オペロンと *lexA* との二重破壊株を作製し観察したところ、*lexA* 破壊株で見られた細胞の伸長は抑制され、野生株と同様な細胞長に戻った。次にこの細胞伸長の抑制が *yneA* オペロンを構成するどの遺伝子の欠失によるものかを確認するため、各遺伝子をそれぞれ二重破壊株に導入したところ、YneA を供給することで再び *lexA* 破壊株と同様な細胞の伸長が観察された。また、野生株で YneA を強制的に発現させることでも細胞の伸長は誘導された。さらに、*yneA* の欠失はマイトマイシン C による SOS 応答時の細胞伸長を減少させた。これらのことから、YneA は SOS 反応誘導時に細胞分裂阻害因子として機能することが明らかになった。続いて、YneA による細胞分裂阻害機構の解明を目指した。

FtsZ は細胞分裂の初期に分裂面で重合され、リング (Z-ring) を形成し、その後の収縮環形成を促す蛋白質である。大腸菌 SulA による細胞分裂の抑制は、FtsZ の重合を阻害するためであり、これまでの解析から、SulA の過剰発現により Z-ring は完全に消失すること、また、酵母 2 ハイブリッド法により SulA と FtsZ が相互作用することが報告されている。そこで、FtsZ 抗体を用いた免疫顕微鏡観察、および酵母 2 ハイブリッド法による解析を行った。*lexA* 破壊株や野生株での YneA 過剰発現では、分裂面での Z-ring 形成頻度の減少が観察された。しかしながら、両者の相互作用は検出されなかった。そこで、YneA が収縮環上での Z-ring の安定性に影響を与えている可能性を考え、他の細胞分裂蛋白質との酵母 2 ハイブリッド解析を試みたが相互作用は検出されなかった。また、YneA 抗体を用いたウエスタン解析から、YneA が膜蛋白質であることが示され、さらに、YneA-GFP 融合株を用いた細胞内局在の解析では、細胞の中央など分裂面に相当する位置において、主に強い YneA-GFP の蛍光が観察された。これらのことから、YneA は Z-ring が形成される前に分裂面を認識し、そこに局在することで、FtsZ の分裂面への局在を抑制している可能性が考えられた。

枯草菌 SOS レギュロンの研究
- SOS 応答に伴う細胞分裂の抑制機構 -

川合 良和
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞遺伝学講座
(小笠原 直毅 教授)

平成15年3月5日

目次

I 序論 5

I-1 はじめに 5

I-2 SOS 応答反応 5

I-2-1 大腸菌 SOS 反応系の機構と制御 5

I-2-2 大腸菌 SOS レギュロン 6

I-2-3 SOS 遺伝子の機能 8

I-2-4 SOS 反応系の保存性 9

I-2-5 枯草菌 SOS 制御系の特徴 12

I-3 SOS 応答と細胞分裂 13

I-4 本研究の目的 14

付録

II 枯草菌 SOS レギュロンの解析 16

II-1 はじめに 16

II-2 材料と方法 18

II-2-1 菌株とプラスドおよび使用したプライマー 18

II-2-2 *lexA* 破壊株の作製 18

II-2-3 使用した培地 19

II-2-4 塩基配列の決定 19

II-2-5 枯草菌の形質転換 19

II-2-6 DNA マクロアレイ 19

a 枯草菌 RNA の調製 19

b マクロアレイ用プローブの作製 20

c ハイブリダイゼーションとシグナルの検出 20

II-3 結果 21

II-3-1 *lexA* 破壊株の遺伝子発現プロファイルの作製 21

II-3-2 LexA-box の検索 23

II-4 考察 26

II-4-1 枯草菌 SOS レギュロンに属する遺伝子の探索 26

II-4-2 枯草菌 SOS 遺伝子の機能 27

付録

III	<i>yneA</i> オペロンの機能解析 -細胞分裂阻害因子の同定-	32
III-1	はじめに	32
III-2	材料と方法	33
III-2-1	菌株とプラスミドおよび使用したプライマー	33
III-2-2	枯草菌変異株の作製	34
a	<i>yneA</i> オペロン破壊株	34
b	<i>yneA</i> 発現制御株の作製	35
III-2-3	使用した培地	35
III-2-4	大腸菌の形質転換とプラスミド DNA の調製	35
III-2-5	塩基配列の決定	35
III-2-6	枯草菌の形質転換	35
III-2-7	生菌数 (CFU, colony-forming units) の測定	36
III-2-8	枯草菌 RNA の調製	36
III-2-9	ノーザンハイブリダイゼーション	36
III-2-10	蛍光顕微鏡による変異株の細胞形態および核様体の観察	36
III-3	結果	37
III-3-1	ノーザンハイブリダイゼーションによる <i>yneA</i> 、 <i>yneB</i> 、 <i>ynzC</i> の転写解析	37
III-3-2	<i>lexA</i> 破壊株の細胞形態	39
III-3-3	<i>yneA</i> オペロンの欠失が <i>lexA</i> 破壊株の細胞形態に及ぼす影響	39
III-3-4	細胞分裂阻害因子の同定	41
III-3-5	野生株における YneA 過剰発現の影響	43
III-3-6	DNA 損傷による SOS 応答時での YneA の役割	43
III-4	考察	47
IV	YneA による細胞分裂阻害機構の解明を目指して	49
IV-1	序論	49
IV-1-1	細胞分裂蛋白質とその分裂面への集合機構	49
IV-1-2	FtsZ と直接相互作用する蛋白質	50
IV-1-3	細胞分裂位置の決定機構	51
IV-1-4	研究の目的	52
IV-2	材料と方法	53
IV-2-1	菌株とプラスミドおよび使用したプライマー	54
IV-2-2	枯草菌変異株の作製	55

a	<i>yneA-gfp</i> 融合株	55
b	<i>gfp-ftsZ</i> 融合株	55
IV-2-3	使用した培地	56
IV-2-4	大腸菌の形質転換とプラスミド DNA の調製	56
IV-2-5	塩基配列の決定	56
IV-2-6	枯草菌の形質転換	56
IV-2-7	酵母の形質転換	56
IV-2-8	蛍光顕微鏡による変異株の細胞形態および核様体の観察	56
IV-2-9	膜蛋白質画分の調製	56
IV-2-10	ウエスタンブロッティング	56
a	使用した抗体	56
b	試料の調製	56
c	ウエスタンブロッティング	57
IV-2-11	免疫蛍光顕微鏡観察	57
a	試料の調製	57
b	抗体反応	57
c	蛍光顕微鏡による観察	58
IV-2-12	蛍光顕微鏡による GFP 融合蛋白質の局在観察	58
IV-3	結果	59
IV-3-1	YneA の発現が及ぼす Z-ring 形成への影響	59
a	免疫蛍光顕微鏡法による FtsZ の局在性の解析	59
b	GFP-FtsZ 融合蛋白質による解析	61
IV-3-2	酵母 2 ハイブリッド法による YneA と相互作用する蛋白質の探索	63
IV-3-3	YneA 蛋白質の細胞内分布	65
IV-3-4	YneA 蛋白質の局在観察	66
a	YneA-GFP 融合蛋白質の局在性の解析	66
b	免疫蛍光顕微鏡法による YneA の局在性の解析	68
IV-4	考察	70

V 本研究のまとめと今後の課題 73

VI 謝辞 75

VII 参考文献 76

I 序論

I-1 はじめに

遺伝情報の担い手であるゲノム DNA が安定に保持されることは種が存続するために必須である。しかしながら細胞内の DNA は放射線、紫外線、環境中の変異原といった外的な要因、あるいは代謝の過程で生じる活性酸素などの内的な要因によって常に損傷を受けていることも事実である。こうした損傷は DNA の複製や転写を阻害し、さらには細胞死や突然変異の原因となる。人を含むすべての生物はこうした状況に対処するため、これらの損傷を修復し DNA を安定に保つための多様な機構を備えている。

DNA 修復の研究は 1940 年代にバクテリオファージにおいてその機構が発見されたことに始まり、大腸菌などのバクテリアを材料に、「DNA 損傷に対する生体防御機構の解明」を目的とする基礎的な研究が盛んに行われてきた。一方で、「発癌の原因としての DNA 損傷に対する防御機構の解明」という目的から、他の研究分野に比べ早くからヒト培養細胞などを用いた応用的な研究も行われている。現在では DNA 修復に関わる遺伝子の欠損が、早期老化、発育遅滞、高発癌性、免疫異常など広範囲な病気をもたらすことが認められ、さらには、こうした病気の原因遺伝子により形成される DNA 修復機構も分子レベルで明らかになりつつある。また、個々の修復機構に対する解析だけではなく、複数の DNA 修復機構間での相互作用についての研究も進められている。近年では DNA 複製あるいは転写と共役して行なわれる修復機構の存在が明らかになり、さらには、細胞周期のチェックポイント機構との相互作用も認められている。このように DNA 損傷に対する防御機構は DNA 修復、転写、組み換え、複製、細胞周期などの様々な反応系からなる複雑なネットワークを形成しており、各反応間での相互作用を分子レベルで明らかにしていくことが重要な課題となっている。

I-2 SOS 応答反応

I-2-1 大腸菌 SOS 反応系の機構と制御

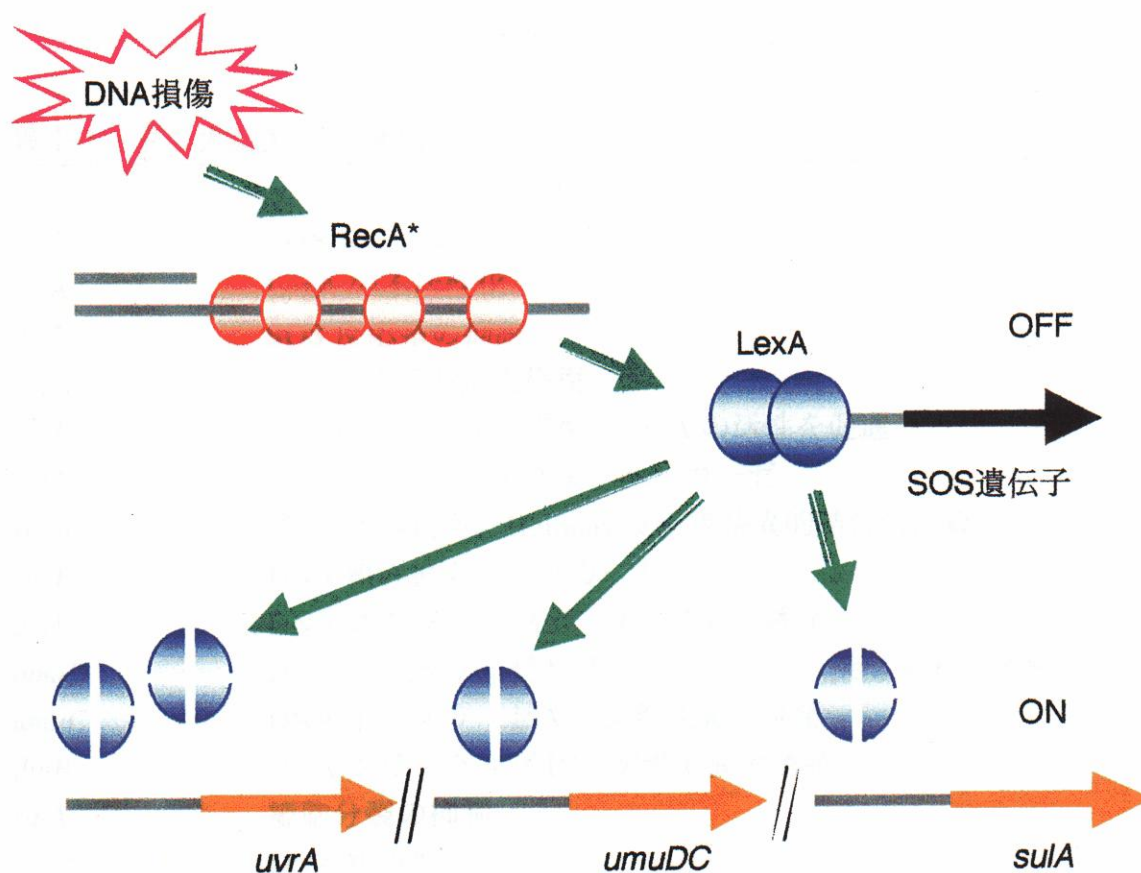
多くの真正細菌の間で保存されている DNA 損傷応答機構である SOS 反応系は、紫外線や電離放射線の照射、また、ある種の抗生物質やアルキル化剤などの処理で DNA が損傷を受け、DNA の伸長が阻害を受けると誘導され、DNA 修復能の増加、細胞分裂の抑制、突然変異頻度の上昇やプロファージの誘発など多様な現象を引き起こす (Little and Mount, 1982; Little, 1984; Friedberg *et al.*, 1995; Koch and Woodgate,

1998)。これは、大腸菌を用いた研究によりその存在が始めて明らかにされたものであり、「DNA 損傷が起こると大腸菌はそれを認識し、克服するために必要な蛋白質を誘導する」という考えから、SOS 遭難信号になぞらえ SOS 仮説として提唱された (Radman, 1974)。その後、種々の変異株を用いた解析から SOS 仮説についての具体的なモデルが生まれ、さらに様々な結果を総括し整理することで、SOS 修復や SOS 機能という考えと言葉が定着した (Gudas and Pardee, 1975; Witkin, 1976)。その当時のモデルでは、*lexA* 遺伝子の産物がリプレッサーとして、DNA 損傷の修復や突然変異の誘発、また細胞分裂阻害などの機能を持つ遺伝子の発現を通常は抑制しているが、DNA に損傷が起こると *recA* 遺伝子産物が活性化され、LexA の不活化を引き起こし、抑えられていた遺伝子が一斉に発現すると考えられていた (SOS レギュロン)。その後、実際にこの制御系の鍵を握る *recA* と *lexA* 遺伝子がクローニングされたことにより、遺伝学的な解析に加え、様々な生化学的解析も行われ、RecA と LexA 蛋白質の詳細な機能とその構造的な特徴が示され、SOS レギュロンの発現制御の分子機構が明らかにされていった (Freiedberg *et al.*, 1995)。

現在までに明らかにされている SOS レギュロンの発現制御の分子機構は、先に述べた当時のモデルと大筋で一致するものである。SOS レギュロンのリプレッサーである LexA は、SOS 遺伝子上流のプロモーター領域に共通に存在する SOS-box (LexA-box) と呼ばれるオペレーター配列 (5'-TACTGTATATATACAGTA-3') に結合することで、通常 SOS 制御系に属する遺伝子群の発現を抑制している (Brent and Ptashne, 1981; Little *et al.*, 1981)。DNA に損傷が起こると、それにより生じた一本鎖 DNA は RecA と相互作用することで複合体を形成し、RecA を活性化する。この活性型 RecA は LexA と相互作用し、LexA の持つ内在性のプロテアーゼ活性を誘導する。その結果、LexA は N 末端から 84 番目のアラニンと 85 番目のグリシンの間で自己分解を引き起こし、DNA 結合能を失い SOS 遺伝子群の発現が誘導される (図 I-1) (Sassanfar and Roberts, 1990; Freiedberg *et al.*, 1995; Koch and Woodgate, 1998)。

I-2-2 大腸菌 SOS レギュロン

現在までに大腸菌 SOS レギュロンは 30 種類以上の遺伝子から構成される DNA 損傷に対する応答機構であることが明らかになっている (Koch and Woodgate, 1998; Fernandez De Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001)。LexA により発現制御される遺伝子の同定は Kenyon と Walker により始めて行われた (Kenyon and Walker, 1980)。その方法は、プロモーターを含まない β -ガラクトシダーゼ遺伝子を DNA の端に持つ欠損 Mu フェージを大腸菌染色体にランダムに組み込み、マイトマイシン処理後に転写が誘導される遺伝子を同定するというものである。これらの遺伝子は DNA 損傷により特異的に誘導されることから *din* gene (damage-inducible gene) と呼ばれた(こ



図I-1 SOSレギュロンの発現制御機構

ここでは SOS 遺伝子とする)。その後、SOS 遺伝子の発現は LexA の制御下にあることが *lexA* 変異株を使った解析により示され、さらに *lexA* がクローニングされると、*lexA* や *recA* を含む SOS 遺伝子のプロモーター付近に精製した LexA が結合することが順次確かめられていった。多くの研究者による研究の結果、大腸菌では少なくとも 11 遺伝子について LexA による直接的な転写制御があると確認された (Freiedberg *et al.*, 1995; Koch and Woodgate, 1998)。また、近年ではその全塩基配列が明らかにされたことから、SOS 遺伝子のプロモーター付近に共通に存在する LexA-box を大腸菌ゲノム上で検索することにより、新たな SOS 遺伝子が同定され (Lewis *et al.*, 1994; Fernandez De Henestrosa *et al.*, 2000)、さらには DNA アレイを用いた網羅的な解析も行われ、*lexA* や *recA* の変異株、また紫外線照射などに伴う SOS 誘導時の遺伝子発現プロファイルが作成された (Courcelle *et al.*, 2001; Khil and Camerini-Otero, 2002)。このような解析により、現在では大腸菌 SOS レギュロンは 30 種類以上の遺伝子から構成される制御システムであることが確認され、また、いくつかの SOS 遺伝子に関しては機能が詳細に研究されている。

I-2-3 SOS 遺伝子の機能

主な大腸菌 SOS 遺伝子とその機能について表 I-1 に示した。

表 I-1 主な大腸菌 SOS 遺伝子

遺伝子	機能
<i>lexA</i>	SOS レギュロンのリプレッサー
<i>recA</i>	LexA の不活性化、DNA 組み換え
<i>dinI</i>	SOS 反応系の抑制
<i>uvrA</i>	ヌクレオチド除去修復
<i>uvrB</i>	ヌクレオチド除去修復、UvrA の活性を促進
<i>uvrD</i>	ヌクレオチド除去修復、ヘリカーゼ
<i>ruvA</i>	DNA 組み換え、Holliday 交叉点特異的結合蛋白質
<i>ruvB</i>	DNA 組み換え、ヘリカーゼ
<i>polB</i>	DNA ポリメラーゼ II、突然変異の誘発
<i>umuD</i>	DNA ポリメラーゼ V のサブユニット、突然変異の誘発
<i>umuC</i>	DNA ポリメラーゼ V、突然変異の誘発
<i>dinB</i>	DNA ポリメラーゼ IV、突然変異の誘発
<i>sulA</i>	細胞分裂の抑制
<i>recN</i>	DNA 組み換え
<i>ssb</i>	一本鎖 DNA 結合蛋白質
<i>hima</i>	λ ファージの組み込み、トランスポゾンの転移に必要な宿主因子

先に述べたように、SOS レギュロンの発現調節因子として機能する *lexA*、*recA* はそれら自身が SOS 遺伝子であり (Little and Mount, 1982; Little, 1984; Friedberg *et al.*, 1995)、また、RecA は DNA 相同組み換えにおいても中心的な役割を果たす多機能な蛋白質である (Koch and Woodgate, 1998)。*dinI* は RecA と相互作用し、活性型 RecA の形成を抑制することから、SOS 制御系の抑制因子、あるいは以下に述べる UmuD₂C ポリメラーゼによる損傷乗り越え修復の調節に関与すると考えられている (Yasuda *et al.*, 1998; Voloshin *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 2001)。*uvrA*、*uvrB*、*uvrD* はヌクレオチド除去修復に関与する SOS 遺伝子である。ヌクレオチド除去修復系は塩基のない AP 部位 (脱プリン、脱ピリミジン部位) から、シスプラチン付加物のような大きな障害までの広い範囲の DNA 障害を認識、除去することができ、この修復系は真核生物にまで保存されている (Friedberg *et al.*, 1995; Grossman *et al.*, 1998)。また、ヌクレオチド除去修復系は TRCF (transcription-repair coupling factor) と協調して機能することで、転写鎖上の障害を修復する転写共役修復系としても働いている (Selby and Sancar, 1991; Selby and Sancar, 1993)。*ruvA*、*ruvB* は DNA 組み換え反応の後期過程で、組み換え中間体 (Holliday 構造) の交叉の移動に関与する (Shinagawa and Iwasaki, 1996;

West, 1997)。突然変異の誘発に関与する因子としては *polB*、*umuDC*、*dinB* が知られている。これらはいずれも DNA 伸長反応の忠実度および継続度が低い損傷バイパス型の DNA ポリメラーゼである (Wagner *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999; Napolitano *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2001)。また、これらのポリメラーゼでは認識する損傷の種類や損傷をバイパスする過程で誘発される変異に違いがあると考えられている。UmuD に関しては、LexA と同様に活性型 RecA に依存した自己分解を受け、UmuD'₂C 複合体の形で DNA ポリメラーゼとして機能する。加えて、活性型 RecA による分解を受けていない UmuD₂C 複合体が DNA 合成の抑制に関与することも報告されており、これは DNA 複製の伸長を遅らせ、複製フォークが DNA 障害に衝突する前にヌクレオチド修復などにより損傷部位を取り除くためであると考えられている (Opperman *et al.*, 1999; Sutton and Walker, 2001; Sutton, *et al.*, 2001)。また、栄養飢餓状態において誘導され、同一塩基の連続した箇所での -1 のフレームシフト変異を多発する適応変異に、DinB が関与していることも報告されている (Kim *et al.*, 1997)。UmuC と DinB は同一のファミリーに属する DNA ポリメラーゼであり、このポリメラーゼはヒトを含む真核生物にまで高度に保存されており、ヒトではその欠損が細胞の癌化を導くことでも注目されている (Bridges, 1999; Gerlach *et al.*, 1999; Freidberg *et al.*, 2000)。*sulA* は細胞分裂の抑制に関与する遺伝子であり、細胞分裂過程で中心的な役割を果たす FtsZ と相互作用することで FtsZ の分裂面での重合を阻害し、細胞分裂を抑制している (Bi and Lutkenhaus, 1993; Trusca *et al.*, 1998)。この細胞分裂の抑制機構に関しては、本研究のテーマでもあり、後で詳しく述べたい。

このように、いくつかの SOS 遺伝子に関してはその詳細な機能が明らかにされている。しかしながら、まだ多くの機能がわかっていない SOS 遺伝子が存在していることも事実であり、今後の課題として、こうした SOS 遺伝子の機能解明が残っている。

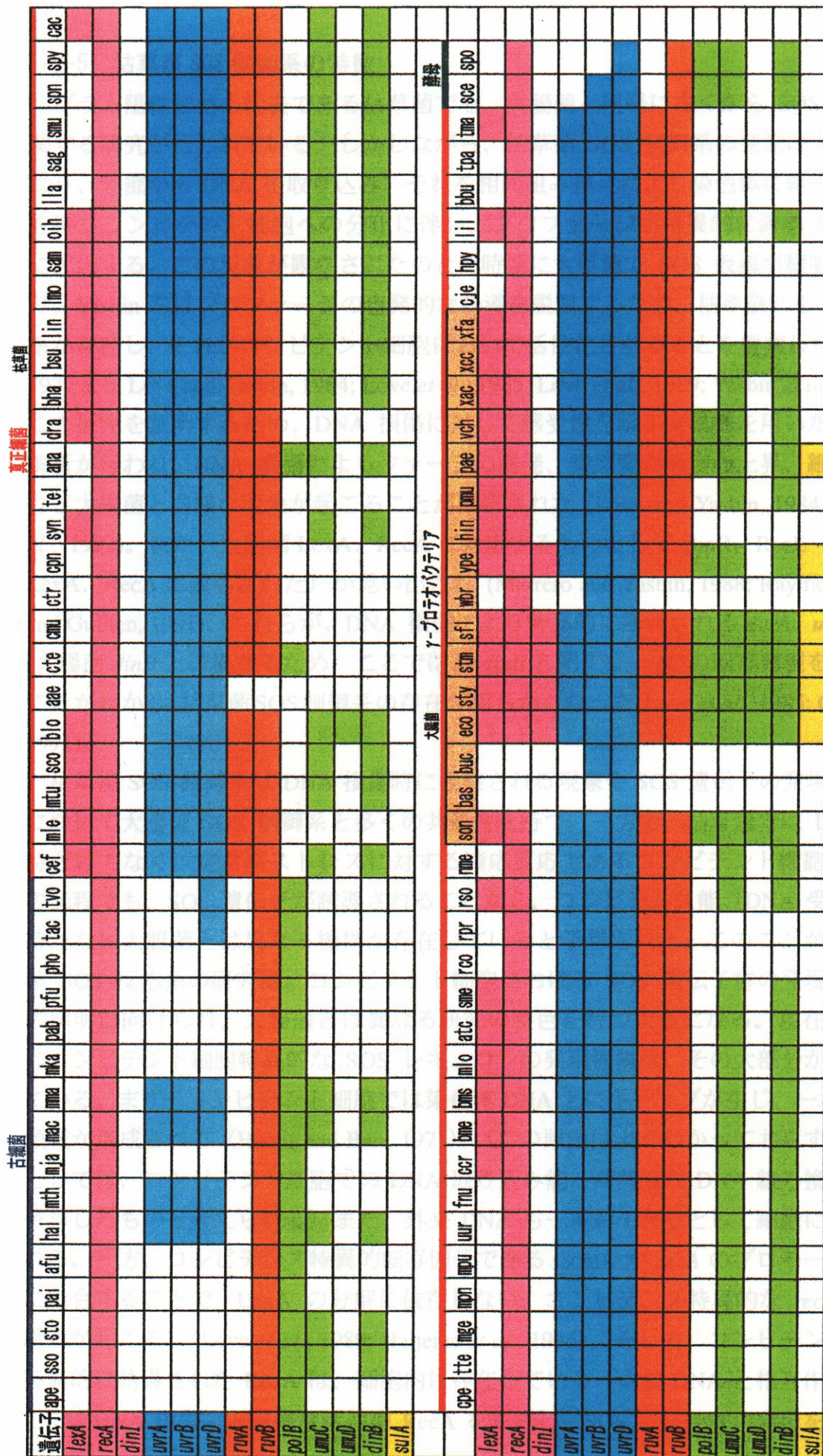
I-2-4 SOS 反応系の保存性

大腸菌での研究により明らかにされた SOS 反応系は、サルモネラ菌などいくつかのグラム陰性細菌においても同様に備わっていることが報告されている。Barbe らは大腸菌 *recA* のプロモーターから RecA-LacZ 融合蛋白質を発現させることができるプラスミドを 30 種のグラム陰性細菌に導入し、DNA に損傷を与えた細胞と与えていない細胞での β -ガラクトシダーゼ活性を比較することで、大腸菌以外のグラム陰性細菌でも *recA* の発現が DNA 損傷により特異的に誘導されることを見出した (Henestrosa *et al.*, 1991; Friedberg *et al.*, 1995)。さらに彼等は、サルモネラやシュードモナスなどの *lexA* 遺伝子のクローニングも行い、それらの LexA 蛋白質が大腸菌 LexA-box と結合すること、また大腸菌 RecA により分解されることを確認した (Calero

et al., 1991; Friedberg *et al.*, 1995)。また、グラム陰性細菌に限らず、グラム陽性細菌である枯草菌においても LexA/RecA による制御系とその支配下にあるレギュロンの存在が古くから知られている(Love *et al.*, 1985; Marrero and Yasbin, 1988; Cheo *et al.*, 1991; Raymond-Denise and Guillen, 1991)。近年では多くの生物種においてそのゲノム塩基配列が決定されたことから、大腸菌 RecA との相同蛋白質は細菌だけでなく真核生物にまで保存されていることが明らかになっている(図 I-2)。この真核生物型 RecA は、DNA 二重鎖切断の修復、有糸分裂や減数分裂での相同組み換えに必要であることが報告されている(Koch and Woodgate, 1998)。また、LexA と相同性を示す蛋白質は寄生性の病原性細菌を除く 30 種以上の真正細菌で保存されていることがわかり、光合成細菌である *Rhodobacter sphaeroides*、結核菌である *Mycobacterium tuberculosis*、放線菌である *Streptomyces lividans* などでは、実際に LexA の制御下にある遺伝子の同定が行われている(Dullabhan *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2002; Tapias *et al.*, 2002)。真核生物においても DNA 損傷により誘導される DNA 修復遺伝子、あるいは細胞周期の制御遺伝子は数多く存在しているが、SOS レギュロンのような包括的な転写調節は、まだ確認されていない。

また、前項で述べた主な大腸菌 SOS 遺伝子に関しても相同性解析を行ったところ、*uvrA*、*uvrB*、*uvrD*、*ruvA*、*ruvB*、*umuC*、*dinB* については、幅広い生物種においてその相同遺伝子が見い出された。これらの遺伝子機能はヌクレオチド除去修復、DNA 組み換え、損傷バイパス型 DNA ポリメラーゼであり、全てゲノム DNA の維持に関わる遺伝子である。一方で、SOS 制御系を負に制御する *dinI*、UmuC ポリメラーゼのサブユニットである *umuD*、細胞分裂阻害因子である *sulA* の相同遺伝子は大腸菌の近縁種である γ -プロテオバクテリアでしか見い出されない。特に酵母を含む多くの生物種で UmuC/DinB ファミリーに属するポリメラーゼは 2 つ以上保存されているにも関わらず、*umuD* は γ -プロテオバクテリアにしか保存されておらず興味深く思われた。さらに *polB* に関しては、古細菌や酵母にまで保存されているにも関わらず、真正細菌ではごく一部の生物種で保存されているだけで、枯草菌を含むその近縁種では見い出されなかった。

このように SOS 制御系は大腸菌だけではなく、多くのグラム陰性細菌、グラム陽性細菌である枯草菌、さらには光合成細菌、結核菌、放線菌にも備わっている。また、大腸菌 LexA と RecA の相同性解析により、これらの蛋白質が 30 種類以上の真正細菌で保存されていることが確認され、SOS 制御系は真正細菌の間で共通の DNA 損傷に対する応答機構であることが推測された。その一方で、*dinI*、*umuD*、*sulA*、*polB* はその機能の重要性に関わらず、一部の生物にしか保存されていない。このような生物特有の SOS 遺伝子の存在は興味深く、また SOS 制御系を理解する上で、特定の生物において研究を進めるだけでは不十分であることを示している。



図I-2 主な大腸菌SOS遺伝子の細菌における保存性

相同性解析はMicrobial Genome Database (<http://mbgd.genome.ad.jp/>)を用いて行った。生物名の表記はMicrobial Genome Database に従っており、正式な名称は付録として記載している。主な大腸菌SOS遺伝子を機能で分類し、色分けして示している。

SOS制御系の調節

ヌクレオチド除去修復

Holliday交叉点の移動

DNAポリメラーゼ

細胞分裂の抑制

I-2-5 枯草菌 SOS 制御系の特徴

グラム陽性細菌の代表である枯草菌でも、大腸菌と同様に古くから SOS 制御系に関する研究が行われている。しかしながら、枯草菌 SOS 制御系の発見は大腸菌と異なり、外部から DNA を取り込み、それを相同組み換えにより染色体に組み込む能力を持つコンピテント細胞への分化に伴い、プロファージが特異的に誘導されることに起因する。この現象が観察されたのと同時期に大腸菌で SOS 仮説が提唱されており、Yasbin らはプロファージの自発的な誘導を説明するため、枯草菌にも SOS 制御系が存在し、それがコンピテント細胞において活性化されることを提案した (Yasbin, 1977 a, b; Love and Yasbin, 1984; Love *et al.*, 1985; Love *et al.*, 1989; Yasbin *et al.*, 1988)。この仮説を証明するため、DNA 損傷に対して感受性を示す変異株を用いた遺伝学的解析が行われ、DNA 損傷によりファージの誘発、突然変異頻度の上昇、細胞の伸長など大腸菌と同様な現象が起こることが確認された (Love and Yasbin, 1984; Yasbin *et al.*, 1992)。また、大腸菌 LexA、RecA に対応するものとして DinR、RecE (現在では LexA、RecA に改名された) が見い出され (Marrero and Yasbin, 1988; Raymond-Denise and Guillen, 1991)、これらが、DNA 損傷により特異的に誘導される *uvrA*、*uvrB*、*dinB* (大腸菌 *dinB* とは異なるため、ここでは *BsdinB* と記す)、*tagC* の転写発現を調節することがわかり、枯草菌 SOS 制御系の存在が明らかになった (Love *et al.*, 1985; Cheo *et al.*, 1991)。

枯草菌 SOS 制御系は DNA 損傷時に観察される現象や SOS 遺伝子の発現制御機構において大腸菌 SOS 制御系と多くの共通性を持つ。一方で、枯草菌では DNA 損傷時だけでなく、定常期ストレスに対する適応反応であるコンピテント細胞への分化の過程でも、SOS 遺伝子が誘導されることから、コンピテンス能 (DNA 受容能) を持たない大腸菌とは異なる機構が存在していると予想された。このことから、枯草菌 SOS 反応系の研究は、コンピテント細胞における SOS 遺伝子群の発現制御機構の解明に向けられ、大腸菌とは異なる研究の特色を持つようになる。現在では、このコンピテント細胞特異的な SOS レギュロンの発現機構は、その大部分が説明されている。まず、コンピテント細胞では染色体 DNA 上にギャップが生じ、一本鎖 DNA 領域が形成される (Harris and Barr, 1971)。(この原因はよくわかっておらず、可能性としては、コンピテント細胞での DNA 取り込み能と高頻度な DNA 組み換え活性に依存したものと考えられる) また、外来 DNA も一本鎖 DNA として細胞に取り込まれる。一方、コンピテンス特異的転写因子である ComK が *recA* のプロモーター領域に結合することで、LexA の分解に依存しない、コンピテンス特異的な *recA* の発現誘導が起こる。(Love *et al.*, 1989; Haijema *et al.*, 1996)。そして、コンピテント細胞で特異的に誘導された RecA は、細胞内に存在している一本鎖 DNA と相互作用することで、DNA 損傷時と同様な活性型 RecA を形成し、SOS 遺伝子群の発現を誘導する

と考えられている (Yasbin *et al.*, 1992; Haijema *et al.*, 1996)。コンピテント細胞での SOS 応答は、外来 DNA を RecA に依存して染色体へ効率よく取り込むと同時に、染色体上の様々な箇所に突然変異を導入することで適応能力を高め、細胞が生存していくための手段として誘導されると考えられる。

このように、枯草菌 SOS 制御系の研究は、大腸菌にはない枯草菌特有な経路で誘導される SOS レギュロンの発現機構を明らかにしてきた。一方で、大腸菌で行われている DNA アレイなどを用いた、網羅的な解析はまだ行われておらず、報告されている SOS 遺伝子は先に述べた 6 遺伝子だけであり、その全体像は不明である。また、枯草菌 SOS 遺伝子である *tagC* (機能未知遺伝子) やヌクレアーゼ阻害因子と相同性を示す *BsdinB* との相同遺伝子は大腸菌では見い出されない。このことは、枯草菌においても特有な SOS 遺伝子が存在していることを示しており、SOS 反応系の多様性を知る上でも、その全体像を把握することが不可欠であると思われる。

I-3 SOS 応答と細胞分裂

DNA 損傷に伴い誘導される SOS 反応系は、DNA 修復に関与する遺伝子群を発現させる。さらに、正確なゲノム情報を子孫に伝えるため、修復する間、細胞分裂を抑えておく措置もとる。この細胞分裂の抑制因子として大腸菌では SulA が存在しており、SulA は細胞分裂蛋白質の一つである FtsZ と相互作用し、FtsZ の機能を阻害することで細胞分裂を抑制している。

FtsZ は現在までに報告されている細胞分裂蛋白質の中で、最も初めに分裂面に局在する蛋白質であり、多くの原核生物種において幅広く保存されている (Rothfield *et al.*, 1999; Margolin, 2000; Harry, 2001)。グラム陰性および陽性細菌からマイコプラズマ、古細菌にも存在し、細菌における細胞分裂の中心的な役割を担っている。この FtsZ は真核生物のチューブリンと、蛋白質全体としては高くないが、GTP 結合部位で部分的にアミノ酸配列の相同性がみられる。そして、その立体構造において両者が高い類似性を示すことから、バクテリア型のチューブリンと呼ばれている (Lowe and Amos, 1998; Nogales *et al.*, 1998)。これまでの研究から、FtsZ は細胞の中央部の分裂部位に特異的に局在化し、チューブリンと同様な GTP 加水分解能に依存した重合を行うことで、細胞分裂面に FtsZ 収縮環 (Z-ring) を形成することが明らかにされている (Harry, 2001; Scheffers and Driessen, 2002)。この Z-ring に FtsA などの細胞分裂に関与する蛋白質群が、次々と局在化していくことで、成熟した収縮環が形成される。その後、この収縮環の収縮が起こり、細胞は中央部でくびれながら隔膜を形成し二分分裂する。このように FtsZ は Z-ring へと重合されることで、隔膜が形成されるべき時機と位置を決定し、細胞分裂を誘導している。しかしながら、DNA 損傷により SOS 応答が誘導されると、SulA により Z-ring の形成は阻害され、その結果として

細胞分裂は抑制される。

sulA (*sfIA*) は、SOS 応答に伴う細胞の伸長を抑制する変異として同定され (George *et al.*, 1975)、その後の解析により、*sulA* が SOS 応答で特異的に発現すること、その発現が LexA/RecA に直接依存していることが明らかにされた (Huisman and D'Ari, 1981; Mizusawa *et al.*, 1983; Huisman *et al.*, 1984)。また、生化学的および遺伝学的解析から SulA による細胞分裂の抑制は、SulA が FtsZ と直接相互作用することで、FtsZ の持つ GTPase の活性を阻害し、分裂部位でのその重合を抑制するためであることが確認されている (Bi and Lutkenhaus, 1993; Trusca *et al.*, 1998)。

一方、枯草菌でも大腸菌と同様な SOS 応答に伴う細胞分裂の抑制が観察される (Love and Yasbin, 1984; Yasbin *et al.*, 1991)。しかしながら、その原因遺伝子である *sulA* の相同遺伝子は見い出されない。また、DNA 損傷時に SOS 応答が誘導されない *recA* 変異株を紫外線で照射しても細胞の伸長が観察されたため、枯草菌での細胞分裂の抑制は LexA/RecA に依存していないと考えられていたが、その機構は不明なままである。また、枯草菌の *lexA* 破壊株で特異的な細胞伸長が観察されるという報告もあり (Haijema *et al.*, 1996)、実際には LexA の制御下に細胞分裂阻害因子が存在している可能性も考えられた。

I-4 本研究の目的

DNA 損傷に対する防御機構である SOS 制御系は、大腸菌においてその研究が最も進められており、現在までに 30 種類以上の SOS 遺伝子から構成される反応系であることがわかっている。一方、枯草菌でもその研究は古くから行われており、SOS 機能やその誘導機構は基本的に大腸菌と同じであり、いくつかの SOS 遺伝子は両方で共通に見い出されている。しかしながら、枯草菌ではアレイなどを用いた網羅的な解析はまだ行われておらず、SOS レギュロンの全体像は不明である。また、大腸菌 SOS 遺伝子である *dinI*、*umuD*、*sulA* などはその機能の重要性にも関わらず、枯草菌では見い出されない。特に、細胞分裂の抑制に関しては、枯草菌 *lexA* の破壊株で細胞の伸長が観察されることから、LexA の制御下にも細胞分裂阻害因子が含まれていると予想された。そこで本研究では、枯草菌 SOS レギュロンの全体像を把握し、さらには細胞分裂阻害機構を解明することで枯草菌における SOS 制御系の特徴を明確にしたいと考えた。

まず、DNA マクロアレイによる解析により、*lexA* 破壊株で発現量の増加が認められる遺伝子を検索した。さらに、*lexA* 破壊株で有意な発現上昇を示した遺伝子について LexA-box の有無を確認することで、LexA による直接的な制御を受ける可能性を持つ 38 遺伝子 (これまでに報告されている枯草菌 SOS 遺伝子を全て含む) を見い出した。その中から *lexA* 破壊株で非常に高い発現上昇を示す *yneA* オペロン (*yneA*,

yneB, *ynzC*) の機能解析を行い、YneA が細胞分裂阻害因子として機能することを明らかにした。

さらに、YneA による細胞分裂阻害機構の解明を目指し、FtsZ 抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡観察により、*lexA* の欠失による YneA の発現と野生株 (*lexA*⁺) で的人為的な YneA の発現が Z-ring 形成へ及ぼす影響を調べた。また、YneA-GFP 融合蛋白質や YneA 抗体を用いた YneA の細胞内局在性を検討した。さらには、酵母 2 ハイブリッド法を用い YneA と細胞分裂蛋白質との相互作用の有無の解析を行った。その結果、YneA は分裂部位を含む細胞膜全体に存在することで FtsZ の分裂部位での重合化を抑制し、分裂面での Z-ring 形成を抑制している可能性が考えられた。

付録 図 I-2 に示した各生物の正式な名称を Microbial Genome Database (<http://mbgd.genome.ad.jp/>)に従い記した。

ape: *Aeropyrum pernix*, sso: *Sulfolobus solfataricus*, sto: *Sulfolobus tokodaii*, pai: *Pyrobaculum aerophilum*, afu: *Archaeoglobus fulgidus*, hal: *Halobacterium* sp. NRC-1, mth: *Methanobacterium thermoautotrophicum*, mja: *Methanococcus jannaschii*, mac: *Methanosarcina acetivorans*, mma: *Methanosarcina mazei*, mka: *Methanopyrus kandleri* pab: *Pyrococcus abyssi*, pfu: *Pyrococcus furiosus*, pho: *Pyrococcus horikoshii*, tac: *Thermoplasma acidophilum*, tvo: *Thermoplasma volcanium*, cef: *Corynebacterium efficiens*, mle: *Mycobacterium leprae*, mtu: *Mycobacterium tuberculosis*, sco: *Streptomyces coelicolor*, blo: *Bifidobacterium longum*, aae: *Aquifex aeolicus*, cte: *Chlorobium tepidum* TLS, cmu: *Chlamydia muridarum*, ctr: *Chlamydia trachomatis*, cpn: *Chlamydomydia pneumoniae*, syn: *Synechocystis* sp. PCC 6803, tel: *Thermosynechococcus elongates*, ana: *Nostoc* sp. PCC 7120, dra: *Deinococcus radiodurans*, bha: *Bacillus halodurans*, bsu: *Bacillus subtilis*, lin: *Listeria innocua*, lmo: *Listeria monocytogenes*, sam: *Staphylococcus aureus*, oih: *Oceanobacillus ihayensis*, lla: *Lactococcus lactis*, sag: *Streptococcus agalactiae*, smu: *Streptococcus mutans*, spn: *Streptococcus pneumoniae*, spy: *Streptococcus pyogenes*, cac: *Clostridium acetobutylicum*, cpe: *Clostridium perfringens*, tte: *Thermoanaerobacter tengcongensis*, mge: *Mycoplasma genitalium*, mpn: *Mycoplasma pneumoniae*, uur: *Ureaplasma urealyticum*, fnu: *Fusobacterium nucleatum*, ccr: *Caulobacter crescentus*, bme: *Brucella melitensis*, bms: *Brucella suis*, mlo: *Mesorhizobium loti*, atc: *Agrobacterium tumefaciens*, sme: *Sinorhizobium meliloti*, rco: *Rickettsia conorii*, rpr: *Rickettsia prowazekii*, rso: *Ralstonia solanacearum*, nme: *Neisseria meningitidis*, son: *Shewanella oneidensis*, bas: *Buchnera aphidicola*, buc: *Buchnera* sp. APS, eco: *Escherichia coli*, sty: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, stm: *Salmonella typhimurium*, sfl: *Shigella flexneri* 2a, wbr: *Wigglesworthia brevipalpis*, ype: *Yersinia pestis*, hin: *Haemophilus influenzae* Rd, pmu: *Pasteurella multocida*, pac: *Pseudomonas aeruginosa*, vch: *Vibrio cholerae*, xac: *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri, xcc: *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, xfa: *Xylella fastidiosa*, cje: *Campylobacter jejuni*, hpy: *Helicobacter pylori*, lil: *Leptospira interrogans* serovar lai, bbu: *Borrelia burgdorferi*, tpa: *Treponema pallidum*, tma: *Thermotoga maritima*, sce: *Saccharomyces cerevisiae*, spo: *Schizosaccharomyces pombe*

II 枯草菌 SOS レギュロンの解析

II-1 はじめに

SOS 制御系は多くの真正細菌の間で保存されている DNA 損傷に対する応答機構であり、一群の SOS 遺伝子により構成されている (SOS レギュロン)。SOS レギュロンの発現誘導は、DNA が損傷を受け、DNA の伸長が阻害を受けると起こり、DNA 修復能の増加、細胞分裂の抑制、突然変異頻度の上昇、またプロファージの誘発など様々な現象が観察されるようになる (Little and Mount, 1982; Little, 1984; Friedberg *et al.*, 1995; Koch and Woodgate, 1998)。こうした SOS 遺伝子の発現制御機構は大腸菌での研究により明らかにされており、SOS レギュロンのリプレッサーである LexA とその不活性化に必要な RecA の機能に依存している。通常 LexA は SOS 遺伝子上流のプロモーター領域に共通に存在する LexA-box (SOS-box) に結合することで SOS 遺伝子の発現を抑制している (Brent and Ptashne, 1981; Little *et al.*, 1981)。しかし、DNA に損傷が起これば、それにより生じた一本鎖 DNA と RecA が相互作用し複合体 (活性型 RecA) を形成する。この活性型 RecA は、LexA の持つ内在性のプロテアーゼ活性を誘導し、その結果として LexA の自己分解が起こり SOS 遺伝子群の発現が誘導される (Sassanfar and Roberts, 1990; Friedberg *et al.*, 1995; Koch and Woodgate, 1998)。大腸菌 SOS レギュロンはその研究の初期段階では 11 種類の SOS 遺伝子が同定されていた (Friedberg *et al.*, 1995; Koch and Woodgate, 1998)。近年、大腸菌や枯草菌を含む多くの生物種でゲノムの全塩基配列が明らかにされたことから、新たな研究が可能となった。大腸菌では、LexA-box をゲノム配列上で検索することにより、新たな SOS 遺伝子が同定され (Lewis *et al.*, 1994; Fernandez De Henestrosa *et al.*, 1994)、31 遺伝子が LexA に直接制御される SOS 遺伝子であることが明らかになり、さらには DNA アレイを用いた網羅的な解析も行われ (Courcelle *et al.*, 2001)、現在では大腸菌 SOS レギュロンは 50 種類以上の遺伝子から構成されると予想されている。

一方、他の細菌における SOS 制御系の研究はあまり進んでおらず、DNA アレイなどを用いた網羅的な解析はまだ行われていない。大腸菌と共に長い SOS 制御系の研究の歴史を持つ枯草菌においても、その研究の中心がコンピテント細胞への分化に伴う SOS 遺伝子の発現制御機構に向けられていたため、*lexA*、*recA*、*uvrA*、*uvrB*、*tagC*、*BsdinB* (大腸菌 *dinB* とは異なる) が SOS 遺伝子として報告されているにとどまっていた (Love *et al.*, 1985; Marrero and Yasbin, 1988; Cheo *et al.*, 1991; Raymond-Denise and Guillen, 1991)。そこで、我々は枯草菌ゲノム上で LexA-box と類似した配列を検索し、その下流に存在する遺伝子の発現を野生株と *lexA* 破壊株で比較することにより、*yhjD*、*aprX*、*xkdA*、*yorB*、*yopT*、*yolD*、*yqjW*、*yqjH* を枯草菌 SOS 遺伝子の候補として同定してきた (Kawai, 2000)。また、Lovett らは枯草菌ゲノム上で見い出された LexA-box と類似した配列をプローブとした、精製 LexA 蛋白質によるゲルシフトアッセイを行い、*ydgG*、*ydiO* などの SOS 遺伝子の候補を新たに見い出している (この SOS 遺伝子の候補については考察で詳しく説明する) (Dubnau and Lovett, 2002)。しかしながら、大腸菌と比べてまだその数は少なく、他にも多くの SOS 遺伝子が存在していると予想された。そこで本研究では、枯草菌ではまだ行われていない、DNA マクロアレイを用いた網羅的な解析を行うことで、枯草菌 SOS レギュロンに属する新たな遺伝子の同定を試みた。

II-2 材料と方法

II-2-1 菌株とプラスミドおよび使用したプライマー

DNA マクロアレイ解析で使用した菌株、および *lexA* 菌株の作製に使用したプラスミドと合成プライマーを表 II-1 に示した。

表 II-1 本研究に使用した菌株、プラスミドおよび合成プライマー

菌株	遺伝子型	菌株の由来と参考文献
<i>B. subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	Pasteur lab. stock
YK001	<i>trpC2 lexA::spec</i>	本研究 (II-2-2)
プラスミド	作製方法とプラスミドの説明	参考文献
pJ62	プロモーターを含むスペクチノマイシン耐性遺伝子の増幅に用いた	LeDeaux and Grossman (1995)
プライマー	配列 ^a	ゲノム上での位置 ^b
lexA-F1	CCACTGTTCCCATGTTGG	1918435~1918418
lexA-R1	ggagatccTTCGTCATTTTCGCACC	1917458~1917475
lexA-F2	gaagaatccTCCCTTACGGAGAGGGGG	1916810~1916793
lexA-R2	AAGGAATCAATCACTTGC	1915882~1915899
specF	gaagaatccCAAAAATTATATGGAGATCTGTATAAT	
specR	ggagatccCACTAAATTAAAGTAATAAAGCG	

a 配列中の下線は制限酵素の認識配列を表しており、*lexA-R1* と *specR* では *Bam*HI を、*lexA-F2* と *specF* では *Eco*RI をそれぞれ示している。

b 数字は SubtiList データベース (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/index.html>) に登録されている枯草菌 168 株のゲノム配列上での位置を示している。

II-2-2 *lexA* 破壊株の作製

まず、枯草菌 168 株のゲノム DNA を鋳型として、*lexA*F1-*lexA*R1 と *lexA*F2-*lexA*R2 プライマーセットを用いた PCR 反応により *lexA* 上流、下流の領域をそれぞれ約 500bp 増幅し、得られた PCR 産物を *Eco*RI、*Bam*HI でそれぞれ切断した。次に、pJ62 プラスミドを鋳型として、*specF*-*specR* プライマーセットを用いた PCR 反応を行い、*Staphylococcus aureus* 由来の、プロモーター領域を含むスペクチノマイシン耐性遺伝子を増幅し、*Eco*RI、*Bam*HI で切断した。調製した 3 つの DNA 断片を DNA リガーゼで結合した後、二重交差により枯草菌 168 株の染色体に導入し、スペクチノマイシン耐性の形質転換体を選択した。

II-2-3 使用した培地

枯草菌の培養には LB 培地 [10g/l Bacto Tryptone (Difco), 5g/l Bacto Yeast Extract (Difco), 5g/l NaCl] を用いた。寒天平板培地作製には、15g/l の agar を培地に加えた。

II-2-4 塩基配列の決定

目的とする配列を PCR により増幅し、それを鋳型に ABI 社の BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction を用いて反応を行い、310 型あるいは 3100 型シーケンサーで塩基配列を決定した。

II-2-5 枯草菌の形質転換

枯草菌の形質転換は Kunst らの方法 (Kunst *et al.*, 1994) に従い、形質転換体の選択はエリスロマイシン (0.5 µg/m) を含む LB 寒天培地で行った。

II-2-6 DNA マクロアレイ

a 枯草菌 RNA の調整

Igo and Losick の方法に従って枯草菌から全 RNA を抽出した (Igo and Losick, 1986)。まず、細胞を LB 培地で培養し、集菌した。その菌体に 0.55ml の LETS buffer [100 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% (w/v) SDS], 少量のガラスビーズ(直径 0.35~0.5 mm)、0.5ml の水飽和フェノールを加え、4 分間ボルテックスを用いて激しく攪拌し、細胞を破碎した。遠心後、上清に等量の phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)を加え攪拌し、遠心して水層を回収した。この溶液に 1/20 量の 4M LiCl、2.5 倍量のエタノールを加えて核酸を沈殿させ、遠心により集めた。風乾後、300 ml の 0.1% DEPC (diethylpyrocarbonate) 処理水に溶解し、3 倍量の 4M NaOAc (pH 6.0)を加え-20℃で 1 時間放置した後、遠心することにより RNA を回収し、滅菌水に溶解した。完全に DNA を除くため、調製した RNA を DNaseI (Amersham Pharmacia Biotech) 20 U で 37℃、15 分間処理した。その後、DNaseI を除くために、100mM EDTA 50µl と 10% SDS 2µl、さらに等量の水飽和フェノールを加え攪拌した。遠心後、上清に等量の phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)を加えて攪拌し、再度遠心して水層を回収した。水層に 2.5 倍容のエタノールと 1/10 容の 3M NaOAc を加え、RNA を沈殿させた。遠心により回収した RNA を 70%エタノールで洗浄後風乾し、10µl の滅菌水に溶解した後、260nm の吸収を測定して、その濃度を求めた。得られた RNA 2µg をアガロースゲル電気泳動で泳動し、エチジウムブロマイド染色することにより DNA が混在していないことを確認した。

b マクロアレイ用プローブの作成

調整した RNA 3 μ g と、枯草菌の全遺伝子に各々対応するプライマーの混合液 (*B.subtilis* cDNA Labeling primers, Sigma Genosis)を含む水溶液 15 μ l を 90°C で 2 分間処理した後、55°C で 20 分間放置して RNA とプライマーをアニーリングさせた。次に、あらかじめ 55°C で 5 分間暖めた逆転写反応溶液 15 μ l を加え、55°C で 2~3 時間反応させた。³³P でラベルされた cDNA を NICK Spin カラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。

逆転写反応溶液

1×Reverse Transcriptase Buffer	6 μ l
333 μ M dATP	1 μ l
333 μ M dGTP	1 μ l
333 μ M dTTP	1 μ l
[α - ³³ P] dCTP(2000-3000 Ci/mmol) (10Ci/ μ l)	2 μ l
Thermo Script TM MRT(GIBCO BRL) (15U/ μ l)	2 μ l
これらを混和し滅菌水で 15 μ l に合わせた。	

c ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

枯草菌全遺伝子がスポットされている DNA マクロアレイメンブレン (Panorama *B. subtilis* Gene Arrays, Sigma Genosys) をハイブリダイゼーションバッファー{5×SSPE [0.9 M NaCl, 50 mM sodium phosphate (pH 7.7), 5 mM EDTA], 2% SDS, 5×Denhardt's (0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% BSA), 100 μ g/ml denatured salmon testes DNA }5 ml に浸し、42°C で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは熱処理したプローブを混和した 3ml のハイブリダイゼーションバッファー中で、42°C 一晩行った。メンブレンを、室温、5 分間、洗浄液 (1×SSPE, 0.2% SDS) で 2 回処理した後、さらに、68°C で 20 分間、2 回洗浄した。フジイメージグプレートに室温で 1 時間および 2 時間露光し、フジ BAS-5000 でシグナルを検出した。

II-3 結果

DNA アレイはゲノム上にコードされている全遺伝子の発現を網羅的に解析できる手段である。これは、すでにゲノム配列が明らかにされている枯草菌においても利用可能となっている。そこで、枯草菌 168 株の全遺伝子のコード領域がナイロンメンブレン上にプロットされているパノラマアレイ (Sigma Genosys) を用いることで、枯草菌 SOS レギュロンに属する全遺伝子の同定を試みた。

II-3-1 *lexA* 破壊株の遺伝子発現プロファイルの作製

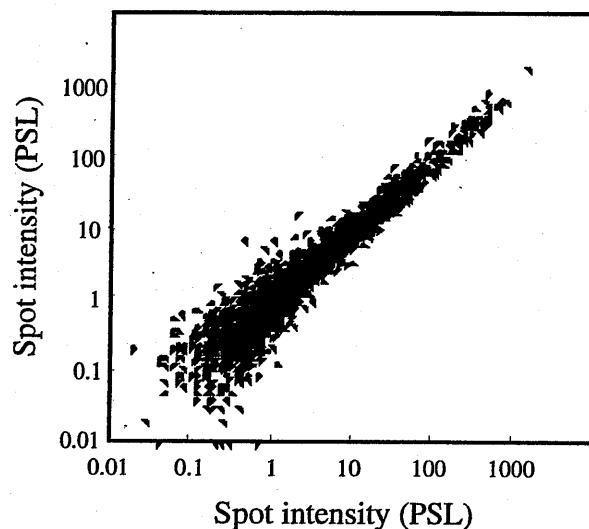
本研究では枯草菌の全 SOS 遺伝子を一挙に同定する方法として、SOS レギュロンのリプレッサーをコードする *lexA* 遺伝子をスペクチノマイシン耐性遺伝子と置き換えた *lexA* 破壊株を用いた。*lexA* 破壊株では恒常的に SOS 遺伝子の発現が誘導される。後に述べるように、作製した枯草菌 *lexA* 破壊株は LB 培地、37℃の条件下において野生株と同様な増殖速度を示した。

そこで、野生株および *lexA* 破壊株を LB 培地、37℃で $OD_{600}=0.4$ まで培養後、集菌し、その全 RNA をそれぞれ調製した。この RNA 3 μ g を鋳型として、枯草菌全遺伝子の mRNA を逆転写可能なプライマー混合液により、 $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dCTP}$ 存在下で逆転写反応を行い、 ^{33}P 標識 cDNA プローブを合成した。合成されたプローブとマクロアレイメンブレンとのハイブリダイゼーションを行い、BAS5000 システムによりシグナルを検出し、Array Gauge を用いて各スポット (遺伝子) のシグナル強度を定量した。2 種類のプローブ間における標識効率の補正は、メンブレン上にプロットされている枯草菌ゲノム DNA (全 12 スポット) のスポットの平均値が等しくなるように値を標準化した。Array Gauge ではスポットのシグナル強度を表す任意の単位として PSL を用いている。

まず、ハイブリダイゼーションに伴う測定値の振れを検討するため、野生株から作成した同一のプローブを用い、2 回マクロアレイ解析を行った。2 回の実験で得られた各遺伝子のシグナル強度を比較した対数グラフを図 II-1-A に示した。得られた結果から、1 回目の解析で $1 \pm 0.05\text{PSL}$ のシグナル強度を示した 50 遺伝子について、2 回目の解析結果に対するシグナル強度の比を算出し、その標準偏差を求めたところ、0.89 であった。これはシグナル強度が 1PSL 程度の遺伝子では 1.78 倍まで実験に測定値の振れが生ずることを示している。同様な解析を、シグナル強度が 2、3、4、5、10、50、100 PSL 程度の遺伝子について行ったところ、シグナル強度が 2 PSL 以下の遺伝子では約 2 倍までの振れが見られたが、4 PSL 以上の遺伝子では 1.3 倍以下におさまっていた (図 II-1-B)。この結果、シグナル強度が 4 PSL 以上の場合には、ハイブリダイゼーションに伴う測定値の振れが少なく、高い再現性を示すことが確

認できた。

A 168 vs. 168



B

測定値(PSL)	1	2	3	4	5	10	50	100
標準偏差	0.89	0.1	0.31	0.28	0.27	0.19	0.27	0.27

図II-1 ハイブリダイゼーションが測定値に及ぼす誤差範囲の検討

A 野生株での各遺伝子のシグナル強度の対数軸プロット

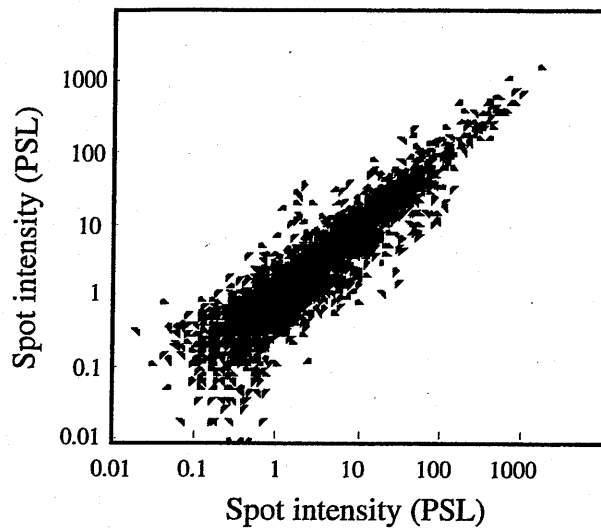
野生株から抽出したRNAよりcDNAプローブを合成し、同じプローブを用いて2回のマクロアレイ解析を行った。検出したスポットイメージをArray Gaugeを用いて数値化した後、2回の解析結果を標準化し、対数軸にプロットした。

B シグナル強度とその標準偏差

各測定値 (PSL) 付近における、50遺伝子のシグナル強度の比から算出した標準偏差

野生株および *lexA* 破壊株から作成したプローブを用いて、DNA マクロアレイ解析を行い、両株での各遺伝子の発現を、対数グラフにプロットし、比較した (図 II-2)。より正確な結果を得るため、野生株および *lexA* 破壊株の RNA から合成した cDNA プローブとメンブレンを新たに用意し、3 回解析を行った。3 回ともに *lexA* 破壊株でシグナル強度が 4 PSL 以上であり、かつ野生株と比較して 1.5 倍以上の変化がある遺伝子を検索したところ、270 遺伝子が見い出された。その内、153 遺伝子では *lexA* 破壊株で発現量の増加が見られ、117 遺伝子では発現量の減少が見られた。これらの遺伝子とその機能分類は付録として II-4 項の最後に付録として示した。117 遺伝子で発現量の減少が確認されたことから考えても、このように多くの遺伝子発現に変化が見られたのは、*lexA* の欠失による二次的な影響が含まれていると考えられた。

168 vs. *lexA*破壊株



図II-2 野生株と*lexA*破壊株でのシグナル強度の対数軸プロット

野生株と*lexA*破壊株から合成したcDNAプローブを用いマクロアレイ解析を行った。再現性を得るため、野生株および*lexA*破壊株のプローブ、メンブレン共に新しく用意し3回同様な解析を行った。

II-3-2 LexA-box の検索

通常の条件下で SOS 遺伝子の転写が抑制されているのは、遺伝子上流のプロモーター領域に存在するオペレーター配列 (LexA-box, 5' -CGAACATATGTTTCG -3') に LexA が結合しているためである (Cheo and Yasbin, 1991; Dubnau and Lovett, 2002)。そこで、LexA により直接的な転写制御を受けている遺伝子を同定するため、DNA マクロアレイによる解析から *lexA* 破壊株で発現量が増加していた遺伝子について、その上流の LexA-box の有無を確認した。Subtilist データベース (<http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/index.html>) を用い、5'-CGAACATATGTTTCG-3' をコンセンサス配列として、4 塩基までの違いを許した条件で検索を行ったところ、38 遺伝子のプロモーター領域に LexA-box として機能していると考えられる配列が存在しており (表 II-2)、これら 38 遺伝子の中にすでに報告されている枯草菌 SOS 遺伝子 (*lexA*、*recA*、*uvrA*、*uvrB*、*tagC*、*dinB*) が全て含まれていた (*lexA* は除く)。したがって、残る 33 遺伝子は本研究により新たに見い出された、枯草菌 SOS レギュロンに属する遺伝子の候補である。

この 33 遺伝子の中には、我々がこれまでに明らかにした SOS 遺伝子、*yhjD*、*xkdA*、*yorB* も含まれていた。一方、*aprX*、*yopT*、*yolD*、*yqjW*、*yqjH* は含まれていなかった。これに関しては考察でも述べるように、*lexA* 破壊株でのノーザンハイブリダイゼー

ションとこれらの遺伝子のプロモーター下流に *bgaB* 遺伝子(耐熱性菌由来の β -ガラクトシダーゼをコードしている)を組み込んだ株を用いた転写解析の結果から、*yhjD*、*xkdA*、*yorB* に比べて *aprX*、*yopT*、*yolD*、*yqjW*、*yqjH* ではプロモーターの活性が弱く、発現量も低いということが示されており DNA マクロアレイによる解析では検出されなかったと考えられる。さらに、これまでに報告されている SOS 遺伝子とその候補を整理すると、枯草菌 SOS レギュロンは 46 遺伝子からなると予想された。また、それらの機能は、ゲノム DNA の維持 (DNA 修復、組み換え、複製、修飾) に関与するもの、遺伝子の転写を制御するもの、蛋白質の合成あるいは修飾に関与するもの、細胞分裂の制御因子 (次章から説明するように、枯草菌では本研究で明らかになった)、アミノ酸・核酸などの小分子の合成と代謝に関与するもの、ファージやトランスポゾンに関係するものと様々であった (表 II-2)。また、機能解析が行われておらず、アミノ酸配列での相同性解析からも機能の推測が困難である遺伝子が 9 遺伝子含まれていた。さらに、ファージなどに関係する遺伝子の中にも、機能が不明であるものが 6 遺伝子含まれていた。

lexA 破壊株で特に高い発現上昇 (10 倍以上) を示した遺伝子として *dinB*、*yonB*、*yorB*、*yhjD*、*yneB*、*ynzC* が確認されたが、この中には機能解析が行われている遺伝はなく、*dinB* はヌクレアーゼ阻害因子と、*yneB* はトランスポゾンにコードされている転位触媒酵素と相同性を示すのみで、他の遺伝子に関しては何も特徴は見られなかった。

表II-2 DNA マクロアレイ解析によって同定された枯草菌SOS レギュロンに属する遺伝子の候補

遺伝子 ^a	発現上昇比 ^b	LexA-box ^c	機能あるいは予測される機能
<i>recA</i>	7.2	CGAATATgcGTTTCG	LexAの不活性下、DNA組み換え
<i>ruvA</i> (<i>ruvB</i>)	1.9 (2.3)	CGAACATATGTTTaa	Holliday 交叉点の移動
<i>ruvA</i> (<i>ruvB</i>)		CGAACATATGaaga	
<i>uvrB</i> (<i>uvrA</i>)	4.2 (7.0)	CGAACtTtaGTTTCG	ヌクレオチド除去修復
<i>uvrC</i>	1.8	aaAACAAaAcGTTTCG	ヌクレオチド除去修復
<i>yprA</i>	2.5	CaAACAAaATaTTCG	RNAヘリカーゼ
<i>topA</i>	4.3	aGAggATATtTTCG	DNAトポイソメラーゼ I型
<i>dinB</i>	11.0	aGAACtCtATGTTTCG	ヌクレアーゼ阻害因子
<i>hrcA</i>	2.1	CGAACAAataTTCG	Class I 熱ショック遺伝子の転写抑制因子
<i>ytzE</i>	8.9	CGAtCtTATGaTaG	DeoR ファミリーに属する転写制御因子
<i>rplK</i>	2.1	CGttaATATGTTtG	リボソーム蛋白質 L11
<i>rplS</i>	1.7	aGAgCATcTGTtGg	リボソーム蛋白質 L19
<i>rpsD</i>	2.2	CGAgCATATGaTaa	リボソーム蛋白質 S4
<i>prfA</i>	1.9	tGAACATATGaTtG	Peptidyl-tRNA の加水分解酵素
<i>prfA</i>		CaAgCtTATGTaCG	
<i>ykrL</i>	1.9	CGAtCAgATcTTtG	プロテアーゼ
<i>nifZ</i>	2.0	CGAACAAaATcTTat	aminotransferase
<i>fer</i>	3.1	CGAACATtTtgcCG	ferredoxin
<i>pssA</i>	2.0	CGgACATcTGTtTat	phosphatidylserine synthase
<i>yrhB</i>	6.9	CaAACAAaADaTaCG	cystathionine gamma lyase
<i>yrhP</i>	1.8	CtAACATATtTTCt	dihydrodipicolinate reductase
<i>yutJ</i>	2.8	CtCACATATGTcCa	NADH dehydrogenase
<i>xkdA</i>	1.9	aGAACAAcAcGTTTCG	PBSX prophage にコードされている
<i>xkdA</i>		tGAcgATATGTTcT	
<i>yocA</i>	7.4	CtAAaAcATGTTCa	transglycosylase
<i>yonB</i>	10.0	CaAAaAcTGTTCG	
<i>yorB</i> (<i>yorC</i>)	31.1 (7.2)	aGAACAAcTGTTCc	
<i>spolISB</i>	3.5	CGAgCATATGgatG	
<i>tagC</i>	6.2	aGAACAagTGTTcT	
<i>tagC</i>		CGAACgTATGTTtG	
<i>yetG</i>	2.0	CGAAgAcATcTTtG	
<i>yhjD</i>	28.0	aGAACAAcAcGTTTCc	
<i>yjbD</i>	7.3	aaAAaATATtTTCG	
<i>yneA</i> (<i>yneB</i> , <i>ynzC</i>)	6.2 (20.1, 17.4)	CGAACAAaAcaTTCc	<i>yneB</i> : 転位触媒酵素
<i>yneA</i> (<i>yneB</i> , <i>ynzC</i>)		gaAACgTtTGTTCG	
<i>yneA</i> (<i>yneB</i> , <i>ynzC</i>)		CaAACATAgGTTTCG	
<i>ypuD</i>	5.3	aGAACATAaaTTCG	
<i>ywmB</i>	3.7	CGAAgATtTtTaCG	
<i>yxaB</i>	2.1	CtAACtTATcTTCa	

a ()内はオペロンを形成していると予想される遺伝子。

b 野生株での各遺伝子の発現量 (PSL)と*lexA*破壊株での発現量の比を示している。

c LexA-boxは、5'-CGAACATATGTTTCG-3'をコンセンサス配列として、4塩基の違いまで許した条件で、Subtilistデータベース (<http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/index.html>) を用いて検索した。また、LexA-boxの検索は各遺伝子のコード領域の上流500bpの範囲で行った。

各遺伝子の機能分類は色分けして示している。

DNA修復などゲノムDNAの維持に関与	遺伝子の転写	蛋白質の合成と修飾	アミノ酸など小分子の合成と代謝
ファージなどに起因、関与する遺伝子	その他	機能不明	

II-4 考察

II-4-1 枯草菌 SOS レギュロンに属する遺伝子の探索

SOS 制御系の研究が最も盛んに行われてきた大腸菌では、30 種類以上の SOS 遺伝子がこれまでに報告されている。また、*Salmonella typhimurium* や *Pseudomonas aeruginosa* などのグラム陰性細菌や、光合成細菌である *Rhodobacter sphaeroides*、結核菌である *Mycobacterium tuberculosis* などでも、DNA 修復に関与するものを中心にいくつかの SOS 遺伝子が同定されている (Koch and Woodgate, 1998; Davidov *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2001; Vierling *et al.*, 2001; Ynang *et al.*, 2002; Tapias *et al.*, 2002; Dullaghan *et al.*, 2002)。しかしながら、大腸菌以外の生物では、まだ DNA アレイなどを用いた網羅的な解析は行われておらず、SOS レギュロンの全体像は見えていない。そこで本研究では、枯草菌 SOS レギュロンを明確にする目的で *lexA* 破壊株を用いた DNA マクロアレイ解析を行った。

その結果、153 遺伝子で *lexA* の欠失により発現の上昇が見られ、また 117 遺伝子では発現の減少が確認された (付録 表 1, 2)。この 153 遺伝子の中には、転写制御あるいは蛋白質の合成に関わる複数の遺伝子が含まれているため、それに依存した 2 次的な影響により、発現量に変化が起こった遺伝子も含まれると考えられる。今後、マイトマイシン C や紫外線により、野生株で SOS 応答を誘導させ、経時的に遺伝子発現プロファイルを解析し、*recA* 変異株などの SOS 応答が誘導されない株での遺伝子発現プロファイルと比較することで、LexA による制御カスケードとそれ以外の機構で誘導される遺伝子の関係が明確になるとと思われる。

LexA により直接制御される SOS 遺伝子を同定するため、*lexA* 破壊株で発現上昇を示した遺伝子の中から、そのプロモーター領域に LexA-box を持つ遺伝子を検索したところ、*lexA* を除く既知の SOS 遺伝子 (*recA*, *uvrA*, *uvrB*, *tagC*, *BsdinB*) 全てを含む 33 遺伝子が見い出された (表 II-2)。また、我々は DNA マクロアレイによる解析とは別に、枯草菌染色体上にある LexA-box と類似した配列を検索し、その下流に存在する遺伝子の発現を *lexA* 破壊株で確認するという方法から、*yorB*, *yhjD*, *xkdA*, *aprX*, *yopT*, *yolD*, *yqjW*, *yqjH* を SOS 遺伝子の候補としてこれまでに見い出している (Kawai 2000)。この内、*yorB*, *yhjD*, *xkdA* は DNA マクロアレイによる解析でも *lexA* 破壊株での発現上昇が確認された。一方、*aprX*, *yopT*, *yolD*, *yqjW*, *yqjH* の発現は DNA マクロアレイでは検出されなかった。*yhjD*, *xkdA*, *yorB* に比べて *aprX*, *yopT*, *yolD*, *yqjW*, *yqjH* ではプロモーターの活性が弱く、発現量も少ないという結果が得られており (Kawai, 2000)、そのことが原因であると考えられる。また、Lovett らは枯草菌

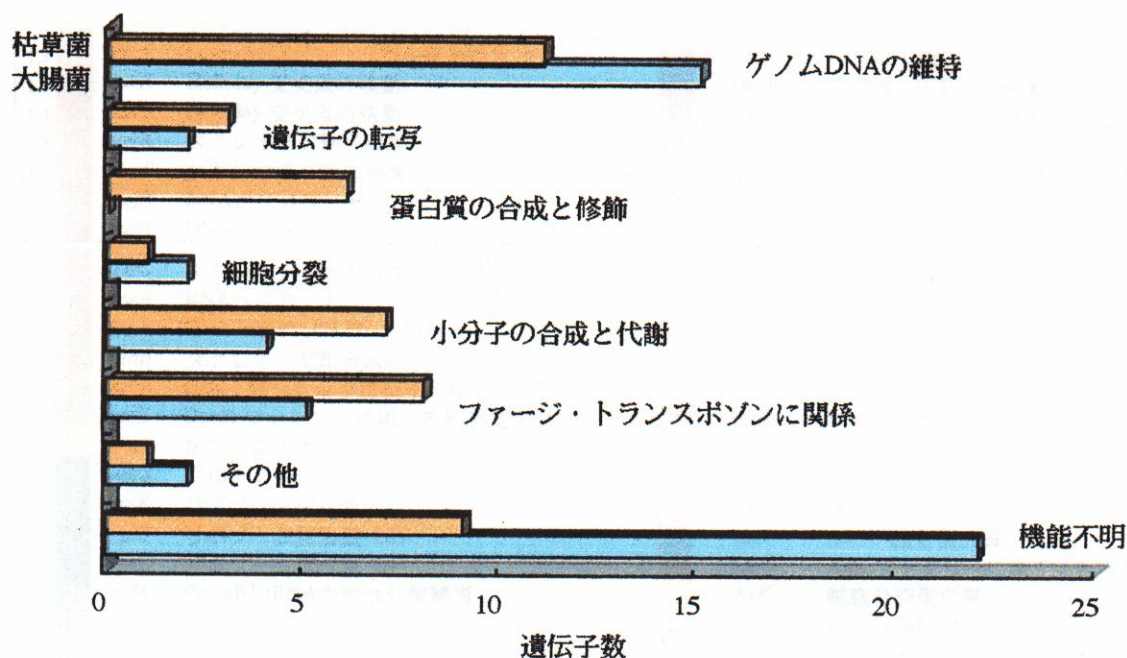
ゲノム上にある LexA-box と類似した配列をプローブとし、精製 LexA 蛋白質によるゲルシフトアッセイを行い、*ruvAB*、*ybaK*、*ydgG*、*ydiO*、*yhaO*、*yhjD*、*yhjE*、*ykvR*、*yneA*、*yolC*、*yolD*、*yoZL*、*yoZM*、*yqjW*、*yqzH* を SOS 遺伝子の新しい候補として見出している(Dubnau and Lovett, 2002)。しかしながら、これらの遺伝子の SOS 応答での発現誘導は確認されていなかった。我々がこれらの遺伝子について、*lexA* 破壊株での転写解析 (DNA マクロアレイ、ノーザンハイブリダイゼーション、LacZ アッセイのいずれかの実験による)を行った結果、*ybaK*、*ydgG*、*yhaO*、*yhjE*、*yolC*、*yoZL*、*yoZM*、*yqzH* の発現誘導は認められなかった。一方、*ruvAB*、*yhjD*、*yneA*、*yolD*、*yqjW*、においては *lexA* 破壊株での発現誘導が認められ、我々の結果と一致するものであった。また、*ydiO*、*ykvR* は、まだ確認できていない。

我々の研究によって見い出された SOS 遺伝子の候補に関しては、今後実際に DNA 損傷時における発現誘導の確認やプロモーター領域にある LexA-box と似た配列と LexA 蛋白質との結合の有無を確認する必要はあるが、本研究の結果とこれまでの知見を整理すると、枯草菌 SOS レギュロンは 46 遺伝子 (39 転写単位) からなることが予想され、これは大腸菌 SOS レギュロンと同程度の規模であることが明らかになった。

II-4-2 枯草菌 SOS 遺伝子の機能

これらの遺伝子をその機能 (予想される機能も含む) で大別したところ、ゲノム DNA の維持 (DNA 修復、組み換え、複製、修飾) に関与するものが 11 遺伝子、遺伝子の転写を制御するものが 3 遺伝子、蛋白質の合成あるいは修飾に関与するものが 6 遺伝子、細胞分裂の制御因子として 1 遺伝子 (次章から説明するように、枯草菌では本研究で明らかになった)、アミノ酸・核酸などの小分子の合成と代謝に関与するものが 7 遺伝子、ファージやトランスポゾンに関係するものが 8 遺伝子、機能が不明であるものが 9 遺伝子であった (図 II-2)。ファージなどに関係する遺伝子の中にも、機能が不明であるものは 6 遺伝子含まれていた。

また、大腸菌 SOS レギュロンとの比較を行い、両者の特徴と共通性についても検討した (図 II-2)。大腸菌 SOS レギュロンには以前から知られている 31 遺伝子に加え (Fernandez De Henestrosa *et al.*, 2000)、最近報告された野生株と *lexA1* 変異株 (*lexA1* は活性型 RecA による LexA の分解が起こらない変異であり、この変異株では SOS 遺伝子の DNA 損傷による発現誘導が起こらない) を用いた紫外線照射に伴う遺伝子発現プロファイルの比較で予想された SOS 遺伝子も含めた (Courcelle *et al.*, 2001)。合計で大腸菌 SOS レギュロンは 54 遺伝子 (表 II-3) となる。



図II-2 SOS機能の分類

枯草菌SOSレギュロンと大腸菌SOSレギュロンによるSOS機能を分類し、比較した。
枯草菌では46遺伝子、大腸菌では54遺伝子を解析の対象としている。

枯草菌 SOS レギュロンには、DNA 修復や組み換えなどのゲノム DNA の維持に関与する遺伝子が最も多く含まれており、これは大腸菌と同様である。また、枯草菌 SOS 遺伝子のアミノ酸配列による相同性解析を行ったところ、枯草菌と大腸菌で共通して SOS レギュロンに属していた遺伝子は、*lexA*、*recA*、*ruvA*、*ruvB*、*uvrA*、*uvrB*、*yqjH* (大腸菌 *umuD* あるいは *dinB*) および *yqjW* (大腸菌 *umuD* あるいは *dinB*) であり、*lexA* を除くすべての遺伝子が DNA 修復に関わる遺伝子であった。また、結核菌である *Mycobacterium tuberculosis* でも *ruvA* が LexA により直接制御される SOS 遺伝子であることが報告されている。これらの遺伝子は、DNA 組み換え、ヌクレオチド除去修復、損傷バイパス型の DNA ポリメラーゼとして機能しており、真核生物を含む多くの生物種で保存されている (図 I-2)。これらが SOS 制御系を持つ生物に共通した SOS 機能であると考えられる。また、枯草菌でも大腸菌と同様に UmuC/DinB ファミリーに属する SOS 遺伝子が 2 種類 (*yqjH*、*yqjW*) 見い出されているが、両者ともに大腸菌 DinB との相同性が高い。一方、大腸菌 UmuC ポリメラーゼのサブユニットをコードする *umuD* の相同遺伝子は枯草菌染色体上では見い出されない。また、大腸菌で損傷バイパス型の DNA ポリメラーゼとして機能する *polB* の相同遺伝子も枯草菌では見い出されない。枯草菌では YqjH、YqjW の解析はまだ行われておらず、

表II-3 枯草菌SOSレギュロンと大腸菌SOSレギュロン

枯草菌			大腸菌		
遺伝子	機能と予測される機能		遺伝子	機能と予測される機能	
3	<i>lexA</i>	SOSレギュロンのリプレッサー	<i>lexA</i>	SOSレギュロンのリプレッサー	
1,3	<i>recA</i>	LexAの不活性下、DNA 組み換え	<i>recA</i>	LexAの不活性下、DNA 組み換え	
1,3	<i>ruvA</i>	Holliday 交叉点の移動	<i>ruvA</i>	Holliday 交叉点の移動	
1,3	<i>ruvB</i>	Holliday 交叉点の移動	<i>ruvB</i>	Holliday 交叉点の移動	
1,3	<i>uvrA</i>	ヌクレオチド除去修復	<i>uvrA</i>	ヌクレオチド除去修復	
1,3	<i>uvrB</i>	ヌクレオチド除去修復、ヘリカーゼ	<i>uvrB</i>	ヌクレオチド除去修復、ヘリカーゼ	
2	<i>yqjH</i>	DNAポリメラーゼ	<i>dinB</i>	DNAポリメラーゼ	
1,2,3	<i>yqjW</i>	DNAポリメラーゼ	<i>umuC</i>	DNAポリメラーゼ	
1,3	<i>uvrC</i>	ヌクレオチド除去修復、ヌクレアーゼ	<i>uvrD</i>	ヌクレオチド除去修復、ヘリカーゼ	
1	<i>yprA</i>	RNAヘリカーゼ	<i>umuD</i>	UmuCのサブユニット	
1	<i>topA</i>	DNAトポイソメラーゼ I型	<i>polB</i>	DNAポリメラーゼ	
1,3	<i>dinB</i>	ヌクレアーゼ阻害因子	<i>dinI</i>	活性型RecAと相互作用	
1	<i>hrcA</i>	class I 熱ショック遺伝子の転写抑制因子	<i>recN</i>	DNA組み換え	
1	<i>ytzE</i>	DeoR ファミリーに属する転写制御因子	<i>himA</i>	DNA組み換え	
1,3	<i>yneA</i>	細胞分裂阻害因子	4	<i>dinG</i>	ヘリカーゼ
1	<i>aprX</i>	プロテアーゼ	<i>yocA</i>	ヘリカーゼ	
1	<i>rplK</i>	リボソーム蛋白質 L11	<i>ydiQ</i>	ヌクレアーゼ	
1	<i>rplS</i>	リボソーム蛋白質 L19	<i>ssb</i>	ssDNA結合蛋白質	
1	<i>rpsD</i>	リボソーム蛋白質 S4	4	<i>ydeO</i>	AraCファミリーに属する転写制御因子
1	<i>prfA</i>	Peptidyl-tRNAの加水分解酵素	<i>ftsK</i>	細胞分裂蛋白質	
1	<i>ykrL</i>	プロテアーゼ	<i>sulA</i>	細胞分裂阻害因子	
1	<i>fer</i>	ferredoxin	4	<i>arp</i>	acetyl CoA synthetase
1	<i>nifZ</i>	aminotransferase	4	<i>glvB</i>	carbohydrates
1	<i>ppsA</i>	phosphatidylserine synthase	4	<i>grxA</i>	glutaredoxin1 redox coenzyme
1	<i>yrhB</i>	cystathionine gamma lyase	4	<i>molR</i>	molybdate metabolism
1	<i>yrhP</i>	dihydrodipicolinate reductase	4	<i>borD</i>	
1	<i>yulJ</i>	NADH dehydrogenase	<i>dinS</i>		
1,2,3	<i>xkaA</i>	PBSX prophage にコードされている	4	<i>int</i>	
1	<i>yneB</i>	転位触媒酵素	4	<i>lit</i>	
1	<i>yocA</i>	transglycosylase	4	<i>ogrK</i>	
2,3	<i>yolD</i>	sp β c2ファージに コードされている	4	<i>ydeT</i>	
1	<i>yonB</i>		4	<i>ydeS</i>	
2	<i>yopT</i>		4	<i>arpB</i>	
1,2	<i>yorB</i>		4	<i>dinD</i>	
1	<i>yorC</i>		<i>dinF</i>		
1	<i>spoIISB</i>		<i>dinQ</i>		
1,2,3	<i>tagC</i>		4	<i>ibpA</i>	
3	<i>ydiO</i>		4	<i>ibpB</i>	
1	<i>yetG</i>		4	<i>ybfE</i>	
1,2,3	<i>yhjD</i>		4	<i>ybiN</i>	
1	<i>yjbD</i>		4	<i>yccF</i>	
3	<i>ykvR</i>		4	<i>yebG</i>	
1	<i>ynzC</i>		4	<i>yhiJ</i>	
1	<i>ypuD</i>		4	<i>yhiL</i>	
1	<i>ywmB</i>		4	<i>yigN</i>	
1	<i>yxaB</i>		4	<i>yjiW</i>	
			4	<i>ymfD</i>	
			4	<i>ymfH</i>	
			4	<i>ymfJ</i>	
			4	<i>ynmfE</i>	
			4	<i>ynmfG</i>	
			4	<i>yocB</i>	
			4	<i>yqgC</i>	
			4	<i>yqgD</i>	

枯草菌での数字はそれぞれ、1; *lexA*破壊株を用いたマクロアレイ(本研究), 2; *lexA*破壊株でのノーザンハイブリダイゼーション・LacZアッセイによる転写解析, 3; プロモーター周辺配列 (LexA-box) をプローブとしたLexA蛋白質でのゲルシフトアッセイが行われていることを示している。また、*lexA*, *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *tagC*, *dinB*ではDNA損傷時の発現誘導も確認されている。大腸菌に関しては、野生株と*lexA*変異株 (SOS応答が誘導されない株) を用いた紫外線照射時のマイクロアレイ解析によって、最近、見出されたSOS遺伝子の候補のみを4で示した。また、点線枠内には両生物で共通のSOS遺伝子を示した。

DNA修復などゲノムDNAの維持に関与

遺伝子の転写

細胞分裂

蛋白質の合成と修飾

アミノ酸など小分子の合成と代謝

ファージなどに起因、関与する遺伝子

その他

機能不明

今後の課題として残るが、大腸菌とは異なる DNA ポリメラーゼによる修復経路が予想され興味深い。ゲノム DNA の維持に関与する遺伝子の中で、枯草菌に特徴的なのが、*topA*、*yprA*、*BsdinB* (大腸菌 *dinB* とは異なる) である。TopA は DNA らせん構造の緩和酵素であるトポイソメラーゼ I 型であり、これはヌクレオチド除去修復や損傷バイパス型の DNA ポリメラーゼによる修復の効率を高めているのではないかと考えられる。YprA と BsDinB は相同性解析からそれぞれ、RNA ヘリカーゼ、ヌクレアーゼ阻害因子であると予想された。

転写制御に関わる遺伝子としては class I 熱ショック遺伝子 (*hrcA* オペロン、*groEL-groES* オペロン) の転写抑制因子である *hrcA* (Helmann *et al.*, 2001) と DeoR ファミリーに属する転写抑制因子と予想される *ytzE* が見い出された。大腸菌では SOS と熱ショック応答の間でも相互作用が報告されている。熱ショックレギュロンに属する *groEL* や *dnaK* は LexA による直接的な制御はないが、紫外線による DNA 損傷で誘導される。実際、Hsp60 (GroEL、GroES) と Hsp70 (DnaK、DnaJ、GrpE) シャペロン複合体が SOS レギュロンの一員である UmuC 蛋白質(損傷バイパス型 DNA ポリメラーゼ)のフォールディングを助けることが知られている (Donnelly and Walker, 1989, 1992; Koch and Woodgate, 1998)。しかしながら、本研究での解析からは、HrcA による転写制御を受ける遺伝子 (*hrcA* オペロン、*groEL-groES* オペロン) の発現誘導を確認することはできなかった。

次に、枯草菌では蛋白質の合成や修飾に関わる遺伝子が多く含まれており、大腸菌ではこれに類似する機能を持つ遺伝子は含まれていない。特に興味深く思われたのが、リボソーム蛋白質 S4、L11、L19 をそれぞれコードしている *rpsD*、*rplK*、*rplS* である。これまで SOS 応答とリボソーム蛋白質の関係は報告されていないが、枯草菌ではストレス応答により誘導される遺伝子群の転写制御因子であるシグマ B の活性化に L11 が関与していると報告されており (Zhang *et al.*, 2001)、また、大腸菌でも栄養が枯渇した条件下において L11 が RelA と相互作用し、環境への適応反応である緊縮応答 (ストリンジェントレスポンス) を誘導することが知られている (Cashel *et al.*, 1998)。こうしたことから、リボソーム蛋白質は細胞内ストレスに対するセンサーとして機能することで、必要に応じた遺伝子の発現を誘導し、細胞内環境の最適化に貢献していると考えられ、DNA 損傷に対する防御機構である SOS 応答にも関与しているのかもしれない。実際に、大腸菌での研究からリボソーム蛋白質が熱ショックや低温ショックのセンサーとして機能する可能性は示唆されている (Van Bogelen and Neidhardt, 1990)。

アミノ酸や核酸などの小分子の合成や代謝に関与するものは、遺伝子は同一では

ないが、枯草菌と大腸菌で共通に見られた。大腸菌では SOS 応答と細胞内での代謝反応との相互作用として、定常期における SOS 遺伝子の発現誘導(Baquero *et al.*, 1995)、また、寒天培地上で大腸菌を生育させると cAMP 濃度の上昇に依存して SOS 応答が誘導されることが報告されている (Taddei *et al.*, 1995)。制御の分子機構は不明であるが、SOS 応答は DNA 複製伸長の阻害に対してだけではなく、生育環境や状態にも依存して誘導される。小分子の合成や代謝に関与する遺伝子は細胞内・外の環境への適応のために必要とされているのかもしれない。

DNA マクロアレイ解析に用いた枯草菌株には PBSX ファージと SP β ファージが存在しており、これらのファージにコードされている 7 遺伝子が SOS レギュロンに含まれた。SOS 応答によりファージが誘発されることはすでに知られており、その現象と一致するものである。これらの遺伝子の中では、*yocA* がトランスグリコシラーゼをコードしていると予想されたが、他の 6 遺伝子の機能は不明であった。また、*yneB* はトランスポゾンにコードされている転位触媒酵素と高い相同性を示した。さらに、枯草菌 SOS レギュロンの中には、機能解析が行われておらず、アミノ酸配列での相同性解析からもその機能を予測するのが困難な遺伝子が、9 遺伝子（ファージにコードされている遺伝子も含めると 15 遺伝子）含まれていた。機能が不明な遺伝子の中には *yorB*、*yhjD* といった *lexA* の欠失で特に高い発現上昇を示す遺伝子が含まれており(表 II-2)、これら機能未知遺伝子の機能解明は今後の課題として挙げられる。

付録1-1 /exA 破壊株で発現上昇を示した遺伝子とその機能

Cell Envelope and Cellular Processes

Cell wall
mreB cell-shape determining protein [SP:Q01465]
mraA UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase [EC:2.5.1.7]
murC UDP-N-acetylglucosamine-6-phosphate-uridylyltransferase [EC:2.5.1.7]
murG UDP-N-acetylglucosamine-6-phosphate-uridylyltransferase [EC:2.5.1.7]
pbpA penicillin-binding protein 2A (spore outgrowth) [SP:P54488]
pbpB penicillin-binding protein 2B (cell-division septum) [SP:Q07868]
ponA penicillin-binding protein 1A/1B [SP:P39793]
tagC involved in polyglycerol phosphate teichoic acid biosynthesis
tagG teichoic acid translocation (permease) [SP:P42953]
tagH teichoic acid translocation (ATP-binding protein) [SP:P42954]
yocH unknown; similar to cell wall-binding protein

Transport/binding proteins and lipoproteins

opuD glycine betaine transporter [SP:P54417]
ycfF unknown; similar to di-tripeptide ABC transporter (membrane protein)
yhaU unknown; similar to Na⁺/H⁺ antiporter
yhcL unknown; similar to sodium-glutamate symporter [SP:P54596]
yusV unknown; similar to iron(III) dicitrate transport permease
yvfH unknown; similar to L-lactate permease [SP:P71067]
yvgK unknown; similar to molybdenum-binding protein

Membrane bioenergetics (electron transport chain and ATP synthase)

atpI ATP synthase (subunit i) [SP:P37816]
fer ferredoxin [SP:P50727]
yadJ unknown; similar to NADH dehydrogenase

Protein secretion

ffh signal recognition particle-like (SRP) component [SP:P37105]
slpS signal peptidase I [EC:3.4.21.89] [SP:P28628]
yadT unknown; similar to signal peptidase II [SP:P37541]

Cell division

fisZ cell-division initiation protein (septum formation) [SP:P17865]
yadO unknown; similar to cell-division protein

Sporulation

cotD spore coat protein (inner) [SP:P07791]
rapC response regulator aspartate phosphatase
spoIIS disruption blocks sporulation after septum formation
sspE small acid-soluble spore protein (major gamma-type SASP) [SP:P07784]

Intermediary Metabolism

Specific pathways

bglA 6-phospho-beta-glucosidase [EC:3.2.1.86] [SP:P42973]
fruB fructose 1-phosphate kinase [EC:2.7.1.56]
yheN unknown; similar to endo-1,4-beta-xylanase
yjfp UDP-glucose diacylglycerol glucosyltransferase [SP:P54166]
yutF unknown; similar to N-acetyl-glucosamine catabolism

Main glycolytic pathways

eno enolase [EC:4.2.1.11] [SP:P37869]
pycA pyruvate carboxylase [EC:6.4.1.1]

TCA cycle

yscJ unknown; similar to malate dehydrogenase

Metabolism of amino acids and related molecules

carB carbamoyl-phosphate transferase-arginine (subunit B) [EC:6.3.5.5]
metK S-adenosylmethionine synthetase [EC:2.5.1.6] [SP:P54419]
yrbA unknown; similar to cysteine synthase
yrbB unknown; similar to cystathionine gamma-synthase
yrbP unknown; similar to dihydrodipicolinate reductase

Metabolism of nucleotides and nucleic acids

apt adenine phosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.7]
drm phosphodeoxyribonutase [EC:5.4.2.7] [SP:P46353]
yaaF unknown; similar to deoxypurine kinase subunit [SP:P37529]
yhaM unknown; similar to CMP-binding factor
yrrU unknown; similar to purine nucleoside phosphorylase
ywaC unknown; similar to GTP-pyrophosphokinase [SP:P39583]

Metabolism of lipids

bfnBAB branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 subunit (2-phosphatidylserine synthase [EC:2.7.8.8] [SP:P39823]
pssA

Metabolism of coenzymes and prosthetic groups

dhaS aldehyde dehydrogenase
ydiG unknown; similar to molybdopterin precursor biosynthesis

付録1-2 *lexA* 破壊株で発現上昇を示した遺伝子とその機能

Information Pathways	
DNA replication	
<i>yerG</i>	unknown; similar to DNA ligase
DNA restriction/modification and repair	
<i>dinB</i>	nuclease inhibitor [SP:Q02886]
<i>uvrA</i>	excinuclease ABC (subunit A)
<i>uvrB</i>	excinuclease ABC (subunit B) [SP:P37954]
<i>uvrC</i>	excinuclease ABC (subunit C) [EC:4.1.99.3] [SP:P14951]
<i>ydiP</i>	unknown; similar to DNA-methyltransferase (cytosine-specific)
<i>yprA</i>	unknown; similar to ATP-dependent helicase [SP:P50830]
DNA recombination	
<i>recA</i>	multifunctional protein involved in homologous recombination and DNA
<i>ruvA</i>	Holliday junction DNA helicase
<i>ruvB</i>	Holliday junction DNA helicase
DNA packaging and segregation	
<i>topA</i>	DNA topoisomerase I [EC:5.99.1.2] [SP:P39814]
<i>topB</i>	DNA topoisomerase III [EC:5.99.1.2]
<i>yonN</i>	unknown; similar to HU-related DNA-binding protein
Initiation	
<i>sigV</i>	RNA polymerase ECF-type sigma factor
<i>sigW</i>	RNA polymerase ECF-type sigma factor
Regulation	
<i>fruR</i>	transcriptional repressor of the fructose operon
<i>gluR</i>	transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene
<i>gutR</i>	transcriptional activator of the sorbitol dehydrogenase gene
<i>hrcA</i>	transcriptional repressor of class I heat-shock genes [SP:P25499]
<i>spoOA</i>	two-component response regulator central for the initiation of
<i>ykoE</i>	unknown; similar to transcriptional regulator (MarK family)
<i>yzeE</i>	unknown; similar to transcriptional regulator (DeoR family)
<i>ywiF</i>	unknown; similar to transcriptional regulator
Ribosomal proteins	
<i>rplK</i>	ribosomal protein L11 (BL11) [SP:Q06796]
<i>rplS</i>	ribosomal protein L19
<i>rpsD</i>	ribosomal protein S4 (BS4) [SP:P21466]
Termination	
<i>prfA</i>	peptide chain release factor 1 [SP:P45872]
Other Functions	
Adaptation to atypical conditions	
<i>clpE</i>	ATP-dependent Clp protease-like (class III stress gene)
<i>ykrL</i>	unknown; similar to heat-shock protein
Detoxification	
<i>sodA</i>	superoxide dismutase [EC:1.15.1.1] [SP:P54375]
<i>yceD</i>	unknown; similar to tellurium resistance protein
Phage-related functions	
<i>xkdA</i>	PBSX prophage [SP:P39780]
<i>yomP</i>	unknown; similar to phage-related protein
Transposon and IS	
<i>yneB</i>	unknown; similar to resolvase
<i>yocA</i>	unknown; similar to transposon-related protein
Miscellaneous	
<i>nifZ</i>	NifS protein homolog
<i>yhdP</i>	unknown; similar to hemolysin
<i>yheG</i>	unknown; similar to calcium-binding protein
<i>yul</i>	unknown; similar to NifU protein homolog
Similar to Unknown Proteins	
<i>ybfQ</i>	No Similarity
<i>ydiJ</i>	<i>ybbM</i>
<i>yeeF</i>	<i>ycgG</i>
<i>yhaN</i>	<i>ydiH</i>
<i>yhcN</i>	<i>ydiL</i>
<i>yieE</i>	<i>ydiL</i>
<i>yil</i>	<i>yebC</i>
<i>yibD</i>	<i>yehH</i>
<i>yibG</i>	<i>yegG</i>
<i>ymdA</i>	<i>yelN</i>
<i>ygfV</i>	<i>yfhG</i>
<i>ygiT</i>	<i>yjiC</i>
<i>yglL</i>	<i>yhaS</i>
<i>yglI</i>	<i>yhaZ</i>
<i>yuiA</i>	<i>yhiD</i>
<i>yuaP</i>	<i>yibC</i>
<i>yxaA</i>	<i>yibD</i>
<i>yxaB</i>	<i>yiaA</i>
	<i>yiaN</i>
	<i>ybnN</i>
	<i>yneA</i>
	<i>yneJ</i>
	<i>ynzC</i>
	<i>yofF</i>
	<i>yofG</i>
	<i>yomF</i>
	<i>yomN</i>
	<i>yonB</i>
	<i>yonD</i>
	<i>yonH</i>
	<i>yonU</i>
	<i>yorB</i>
	<i>yorC</i>
	<i>yprR</i>
	<i>yprD</i>
	<i>yqfW</i>
	<i>yqkC</i>
	<i>yrrS</i>
	<i>yrrG</i>
	<i>yslB</i>
	<i>yicF</i>
	<i>yipB</i>
	<i>yuzA</i>
	<i>ywmB</i>

付録2-1 / *exA* 破壊株で発現が抑制された遺伝子とその機能

Cell Envelope and Cellular Processes

Cell wall

dacA penicillin-binding protein 5 (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase)
lyc N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (major autolysin) [EC:3.5.1.28]
wspA cell wall-associated protein precursor [SP:Q07833]
wprA cell wall-associated protein precursor [EC:3.4.21.-] [SP:P54423]
ypjH unknown; similar to lipopolysaccharide biosynthesis-related protein
ywiD unknown; similar to murein hydrolase

Transport/binding proteins and lipoproteins

feuA iron-uptake system (binding protein) [SP:P40409]
glpT glycerol-3-phosphate permease [SP:P37948]
oppD oligopeptide ABC transporter (ATP-binding protein) (initiation of
sutT subclacin 168 lantibiotic transporter
yckK unknown; similar to glutamine ABC transporter (glutamine-binding
yclQ unknown; similar to ferrichrome ABC transporter (binding protein)
yfiY unknown; similar to iron(III) dicitrate transporter (permease)
yfnC unknown; similar to ferrichrome ABC transporter (binding protein)
yfmD unknown; similar to ferrichrome ABC transporter (permease)
yurN unknown; similar to sugar permease
yvrC unknown; similar to iron-binding protein

Membrane bioenergetics (electron transport chain and ATP synthase)

qoxA cytochrome aa3 quinol oxidase (subunit II) [EC:1.9.3.-] [SP:P34957]
qoxB cytochrome aa3 quinol oxidase (subunit I) [EC:1.9.3.-] [SP:P34956]

Mobility and chemotaxis

cheD required for methylation of methyl-accepting chemotaxis proteins by
flgE flagellar hook protein [SP:P23446]
flgK flagellar hook-associated protein 1 (HAP1) [SP:P39810]
flgL flagellar hook-associated protein 3 (HAP3)
flhA flagella-associated protein [SP:P35620]
flhD flagellar hook-associated protein 2 (HAP2) [SP:P39738]
flhE flagellar hook-basal body protein [SP:P24502]
flhF flagellar basal-body M-ring protein [SP:P23447]
flhG flagellar motor switch protein [SP:P23448]
flhI flagellar-specific ATP synthase [EC:3.6.1.34] [SP:P23445]
flhJ flagellar protein required for formation of basal body [SP:P20487]
flhK flagellar hook-length control [SP:P23451]
flhL flagellar protein required for flagellar formation [SP:P23452]
flhM flagellar motor switch protein [SP:P23453]
flhR flagellar protein required for flagellar formation [SP:P35537]
flhS flagellar protein [SP:P39739]
flhT flagellar protein [SP:P39740]
flhY flagellar motor switch protein [SP:P24073]
flhZ flagellar protein required for flagellar formation [SP:P35536]
hag flagellin protein [SP:P02968]

yfmS unknown; similar to methyl-accepting chemotaxis protein
yhxG unknown; similar to flagellar hook assembly protein [SP:P23455]
yvfF unknown; similar to flagellar protein [SP:P39807]
yvgG unknown; similar to flagellar protein [SP:P39808]
yvzB unknown; similar to flagellin

Sporulation

phrE phosphatase (RapE) regulator

Transformation/competence

comS assembly link between regulatory components of the competence signal

Intermediary Metabolism

Metabolism of carbohydrates and related molecules

Specific pathways

xyxA endo-1,4-beta-xylanase [EC:3.2.1.8] [SP:P18429]
yvfV unknown; similar to glycolate oxidase

TCA cycle

citC isocitrate dehydrogenase [EC:1.1.1.42] [SP:P39126]
sucD succinyl-CoA synthetase (alpha subunit) [EC:6.2.1.5]

Metabolism of amino acids and related molecules

aroB 3-dehydroquinate synthase [EC:4.6.1.3] [SP:P31102]
glyA serine hydroxymethyltransferase [EC:2.1.2.1] [SP:P39148]
pheA prephenate dehydratase [EC:4.2.1.51] [SP:P21203]
proJ glutamate 5-kinase
serA phosphoglycerate dehydrogenase [EC:1.1.1.95] [SP:P35136]
serC phosphoserine aminotransferase [EC:2.6.1.52]
trpB tryptophan synthase (beta subunit) [EC:4.2.1.20] [SP:P07600]

Metabolism of nucleotides and nucleic acids

prs phosphoribosyl pyrophosphate synthetase [EC:2.7.6.1] [SP:P14193]
purC phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase

Metabolism of lipids

acpA acyl carrier protein [SP:P80643]
glpQ glycerophosphoryl diester phosphodiesterase [EC:3.1.4.46]
yusJ unknown; similar to butyryl-CoA dehydrogenase
ywiE unknown; similar to cardiolipin synthetase [SP:P45860]

Metabolism of coenzymes and prosthetic groups

moeB molybdopterin precursor biosynthesis
ribH riboflavin synthase (beta subunit) [SP:P11998]

付録2-2 / *exA* 破壊株で発現が抑制された遺伝子とその機能

Information Pathways		Similar to Unknown Proteins
DNA restriction/modification and repair		
<i>yjyB</i>	unknown; similar to mutator MufT protein	<i>ybbH</i>
Regulation		<i>yexA</i>
<i>ansR</i>	transcriptional repressor of the <i>ansAB</i> operon [SP:Q07683]	<i>yitC</i>
<i>gfpP</i>	transcriptional antiterminator and control of mRNA stability of <i>gfpD</i>	<i>ykgA</i>
<i>yxdJ</i>	unknown; similar to two-component response regulator [Yxdk]	<i>yokF</i>
Termination		<i>yqgZ</i>
<i>deuD</i>	ATP-dependent RNA helicase [SP:P42305]	<i>yusA</i>
Ribosomal proteins		<i>ybbX</i>
<i>rpsQ</i>	ribosomal protein S17 (BS16) [SP:P12874]	<i>ybdY</i>
Aminoacyl-tRNA synthetases		<i>yjyW</i>
<i>serS</i>	seryl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.11] [SP:P37464]	<i>yigV</i>
<i>ykrS</i>	unknown; similar to initiation factor eIF-2B (alpha subunit)	<i>yvrC</i>
Protein modification		<i>ywnC</i>
<i>yteI</i>	unknown; similar to protease IV	
Other Functions		No Similarity
Adaptation to atypical conditions		<i>ybyB</i>
<i>ctc</i>	general stress protein [SP:P14194]	<i>yhjA</i>
<i>dps</i>	stress- and starvation-induced gene controlled by sigma-B	<i>yjyA</i>
<i>gspA</i>	general stress protein [SP:P25148]	<i>ykiJ</i>
<i>rsbV</i>	positive regulator of sigma-B activity (anti-anti-sigma factor)	<i>yiaF</i>
<i>ydaG</i>	unknown; similar to general stress protein [SP:P80238]	<i>yiaB</i>
Phage-related functions		<i>yokE</i>
<i>xkdD</i>	PBSX prophage [SP:P39783]	<i>yqeZ</i>
<i>xkdG</i>	PBSX prophage [SP:P54327]	<i>yqgA</i>
<i>xkdH</i>	PBSX prophage [SP:P54328]	<i>ybdJ</i>
<i>xkdP</i>	PBSX prophage [SP:P54335]	<i>ydcC</i>
<i>xkdT</i>	PBSX prophage [SP:P54339]	<i>ywdA</i>
		<i>ywhO</i>
		<i>ywjC</i>
		<i>yxcC</i>
		<i>yxxG</i>
		<i>yxcC</i>
		<i>yxbM</i>
		<i>ydbB</i>

III *yneA* オペロンの機能解析 -細胞分裂阻害因子の同定-

III-1 はじめに

DNA 修復と共に重要な SOS 機能として細胞分裂の抑制が挙げられる。細胞は DNA 損傷を修復する間、細胞分裂を抑えておくことで、正確なゲノム情報を子孫に伝えることが可能となる。大腸菌では SOS レギュロンの一員である SulA 蛋白質が、細胞分裂の開始を制御する FtsZ 蛋白質と直接相互作用し、分裂部位への FtsZ の重合を阻害することで細胞分裂を抑制している。一方、枯草菌でも大腸菌と同様な SOS 応答に伴う細胞分裂の抑制が観察されるが、*sulA* とアミノ酸配列が相同な遺伝子は存在せず、RecA に依存しない細胞分裂抑制機構が提唱されていた (Love and Yasbin, 1984; Yasbin *et al.*, 1991)。しかし、枯草菌の *lexA* 破壊株で細胞伸長が観察されることから、LexA の制御下に細胞分裂阻害因子が存在しているとも考えられた (Haijema *et al.*, 1996)。我々が作製した *lexA* 破壊株でも細胞の伸長が確認された。しかしながら、本研究で明らかになった枯草菌 SOS レギュロンの中には、その配列から細胞分裂に影響を与えると推定できる遺伝子は含まれていなかった。一方、その中には機能解析が行われておらず、また、アミノ酸配列の相同性からの機能の予測が困難である遺伝子が 15 遺伝子も含まれていたことから、その中に、細胞分裂阻害因子として機能する遺伝子が存在している可能性が考えられた。そこで、*lexA* 破壊株で非常に高い発現上昇を示し、染色体上で *lexA* の隣に位置する *yneA-yneB-ynzC* オペロンに注目し、その機能解析を行ったところ、YneA 蛋白質が大腸菌 SulA と機能的に類似することが明らかになった。

III-2 材料と方法

III-2-1 菌株とプラスミドおよび使用したプライマー

本研究で使用した菌株、およびプラスミドと合成プライマーを表 III-1、III-2 III-3 に示した。

表 III-1 本研究に使用した菌株

菌株	遺伝子型	菌株の由来と参考文献
<i>B. subtilis</i>		
CRK6000	<i>purA16 metB5 hisA3 guaB</i>	Moriya <i>et al.</i> (1990)
YK002	CRK6000 <i>lexA::spec</i>	YK001→CRK6000
YK003	CRK6000 <i>yneA-yneB-ynzC::tet</i>	本研究 (III-2-2-a)
YK004	CRK6000 <i>lexA::spec yneA-yneB-ynzC::tet</i>	YK002→YK003
YK005	CRK6000 <i>amyE::Pspac-yneA</i>	本研究 (III-2-2-b)
YK006	CRK6000 <i>lexA::spec yneA-yneB-ynzC::tet amyE::Pspac-yneA</i>	YK004→YK005
YK007	CRK6000 <i>lexA::spec yneA-yneB-ynzC::tet amyE::Pspac-yneB</i>	本研究
YK008	CRK6000 <i>lexA::spec yneA-yneB-ynzC::tet amyE::Pspac-ynzC</i>	本研究
BG190	<i>trpC2 recA::cat</i>	Gassel and Alonso (1989)
YK009	CRK6000 <i>recA::cat</i>	BG190→CRK6000
YK010	CRK6000 <i>recA::cat yneA-yneB-ynzC::tet</i>	YK009→YK003
<i>E. coli</i>		
C600	<i>supE44 hsdR thi-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	研究室ストック
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ 80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1</i>	Takara

→; 矢印左側に示した枯草菌株のゲノム DNA を用いて、右側の枯草菌株を形質転換した。

表 III-2 本研究に使用したプラスミド

プラスミド	作製方法とプラスミドの説明	入手先と参考文献
pBEST307	プロモーターを含むテトラサイクリン耐性遺伝子の増幅に用いた	Itaya (1992)
pBR322	大腸菌で複製できる複製起点と、大腸菌での選択マーカーとして用いるアンピシリン耐性遺伝子 (<i>bla</i>) をコードしているプラスミド	研究室ストック
pDLT3	大腸菌で複製できる複製起点と、大腸菌での選択マーカーとして用いる <i>bla</i> 、枯草菌での選択マーカーとしてクロラムフェニコール耐性遺伝子 (<i>cat</i>)、また IPTG で制御できる <i>spac</i> プロモーターを含むプラスミド	Morimoto <i>et al.</i> (2002)
pBR322- <i>yneA</i>	<i>yneA</i> オペロン破壊株の作製に用いたプラスミド	本研究 (III-2-2-a)
pBR322- <i>yneA-tet</i>	pBR322- <i>yneA</i> の <i>XhoI</i> 部位にプロモーターを含むテトラサイクリン耐性遺伝子が挿入されている	本研究 (III-2-2-a)
pDLT3- <i>yneA</i>	<i>yneA</i> 発現制御株の作製に用いたプラスミド	本研究 (III-2-2-b)
pDLT3- <i>yneB</i>	<i>yneB</i> 発現制御株の作製に用いたプラスミド	本研究 (III-2-2-b)
pDLT3- <i>ynzC</i>	<i>ynzC</i> 発現制御株の作製に用いたプラスミド	本研究 (III-2-2-b)

表 II-3 本研究に使用したプライマー

プライマー	配列 ^a	枯草菌 168 株の染色体上での位置 ^b
枯草菌変異株作製用		
yneA-F1	<u>aagaagctt</u> TGCTCGTCTGGAGGAACC	1917116...1917133
yneA-R1	ctcctcgagGGATCCATCATAACCTCCAACAGG	1917619...1917602
yneA-F2	ctcctcgagGGCAATATCGTATTCCTC	1918916...1918933
yneA-R2	ggaggatccAGCAATTGCCATACCGAC	1919459...1919442
T3-yneA-F	<u>aagaagctt</u> GCGAACAACATTCTGTG	1917589...1917608
T3-yneA-R	ggaggatccTTCAATTTATCTCTCTTTCC	1917955...1917974
T3-yneB-F	<u>aagaagctt</u> CAACTGTAAGATAGAGAGGA	1917919...1917938
T3-yneB-R	ggaggatccACAACCTGATTCATCTGCAG	1918613...1918633
T3-ynzC-F	<u>aagaagctt</u> TGATCTAGTACTATATAGAC	1918625...1918644
T3-ynzC-R	ggaggatccACGATATTGCCGTATTCCTC	1918926...1918945
tetF	tccgctcgagCAGGTCGATATGAACAGC	
tetR	tccgctcgagCTCTCTCCCAAAGTTGATCCC	
ノーザンハイブリダイゼーションでのプローブ作製用		
yneA-no-F	GTCGGTCTGTTTACAGTG	1917645...1917662
yneA-T7	<u>taatacgactcactatagggcga</u> GGATCACTAACTCATCAC	1917882...1917865
yneB-no-F	CAAATAAAGAACAGCAGG	1917982...1917999
yneB-T7	<u>taatacgactcactatagggcga</u> CTCCAGTTACCTCTATG	1918277...1918260
ynzC-no-F	TGAACCTTGCTGCCAAAGC	1918700...1918717
ynzC-T7	<u>taatacgactcactatagggcga</u> CTGGTGTAACATCATTGC	1918860...1918843

a 配列中の下線は制限酵素の認識配列を表しており、yneA-F1、T3-yneA-F、T3-yneB-F、T3-ynzC-F では *Hind*III を、yneA-R1 と yneA-F2 では *Xho*I を、yneA-R2、T3-yneA-R、T3-yneB-R、T3-ynzC-R では *Bam*HI をそれぞれ示している。また、ノーザンハイブリダイゼーションでのプローブ作製用では T7RNA ポリメラーゼの認識配列を示している

b 数字は SubtiList データベース(<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/index.html>)に登録されている枯草菌 168 株のゲノム配列上での位置を示している。

III-2-2 枯草菌変異株の作製

a. yneA オペロン破壊株

枯草菌 CRK6000 株のゲノム DNA を鋳型として、yneAF1-yneAR1 と yneAF2-yneAR2 のプライマーセットを用いた PCR 反応により、yneA オペロンの上流、下流の領域をそれぞれ約 500bp 増幅した。得られた PCR 産物の両端を *Hind*III-*Xho*I、*Xho*I-*Bam*HI によりそれぞれ切断し、*Xho*I 部位で DNA リガーゼにより結合した後、pBR322 の *Hind*III-*Bam*HI 間に挿入した (pBR322-yneA)。次に、pBEST307 プラスミドを鋳型として、tetF-tetR プライマーセットを用いた PCR 反応を行い、プロモーター領域を含むテトラサイクリン耐性遺伝子を増幅し、得られた PCR 断片を *Xho*I で切断した。この PCR 断片を pBR322-yneA 中の yneA オペロン上流配列と下流配列の境界にある *Xho*I 部位に挿入することで、プラスミド pBR322-yneA-tet を作製した。得られたプラスミドを *Pst*I と *Sca*I で切断した後、相同組み換え (二重交差) により枯草菌 CRK6000 株の染色体に導入し、yneA オペロンをテトラサイクリン耐性遺伝子に置き換えた。形質転換体はテトラサイクリン耐性により選択した。

b. *yneA* 発現制御株の作成

yneA 発現制御株の作製には pDLT3 を用いた (Morimoto *et al.*, 2002, 図 III-4-A)。pDLT3 は、LacI リプレッサー遺伝子とそれによって制御される *spac* プロモーター (Pspac)、さらに枯草菌形質転換体の選択マーカーとしてのクロラムフェニコール耐性遺伝子が、枯草菌 *amyE* 遺伝子の内部に挿入された配列を持っている。CRK6000 株のゲノム DNA を鋳型として、T3-*yneA*F1 と T3-*yneA*R1 のプライマーセットを用いた PCR 反応を行い、SD 配列を含む *yneA* 遺伝子全長を増幅し、PCR 産物の両端を *Hind*III-*Bam*HI により切断した。この DNA 断片を pDLT3 の *Hind*III-*Bam*HI 部位に挿入することで、*spac* プロモーターの下流に *yneA* 遺伝子の融合プラスミドを作製した。このプラスミド上の *lacI*-Pspac-*yneA* の配列を、*amyE* 遺伝子上流部と下流部の配列での相同組み換えにより、枯草菌染色体上に導入し、クロラムフェニコール耐性の形質転換体を選択した。*yneB*、*ynzC* 発現制御株も同様に作製した。これらの発現制御株では、培地中に IPTG を添加することにより、*spac* プロモーターの下流に置いた遺伝子の発現を人為的に制御できる。

III-2-3 使用した培地

枯草菌の培養には PAB 培地 [17.5g/l Antibiotic medium3 (Difco)], また大腸菌の培養には LB 培地 [10g/l Bacto Tryptone (Difco), 5g/l Bacto Yeast Extract (Difco), 5g/l NaCl] を用いた。PAB 培地には CRK6000 由来の枯草菌株が要求するアミノ酸 (メチオニンとヒスチジン) 30 μ g/ml、塩基 (アデニンとグアニン) 50 μ g/ml を加えた。寒天平板培地作製には、15g/l の agar を培地に加えた。

III-2-4 大腸菌の形質転換とプラスミド DNA の調製

大腸菌の形質転換はエレクトロポレーション法により行い、抗生物質 (50 μ g/ml アンピシリン、50 μ g/ml カナマイシン) を含む LB 寒天培地で形質転換体を選択した。プラスミドの抽出には、大腸菌形質転換体を抗生物質を含む LB 培地で 1 晩培養し、アルカリ法 (Sambrook *et al.*, 1989) を用いた。

III-2-5 塩基配列の決定

II-2-4 と同様に行った。

III-2-6 枯草菌の形質転換

枯草菌の形質転換は Kunst らの方法 (Kunst *et al.*, 1994) に従い、形質転換体の選択は、クロラムフェニコール (5 μ g/ml)、スペクチノマイシン (100 μ g/ml)、あるいはテトラサイクリン (10 μ g/ml) を含む PAB 寒天培地で行った。

III-2-7 生菌数 (CFU, colony-forming units) の測定

枯草菌株を PAB 培地で培養した後、同じ培地で $10^3 \sim 10^9$ 倍に希釈した。希釈した菌液を PAB 寒天培地に塗布し、 37°C で一晚培養後、コロニー数を計測し、菌液 1 ml あたりのコロニー形成数を算出した。

III-2-8 枯草菌 RNA の調整

II-2-6 と同様に行った。

III-2-9 ノーザンハイブリダイゼーション

1%ホルムアミド変性ゲルを用いて $2\mu\text{g}$ の RNA を電気泳動により分離し、ナイロンメンブレン Hybond™ N+ (Amersham Pharmacia Biotech) にブロットした。紫外線照射により RNA をメンブレンに固定後、メチレンブルーでリボソーム RNA を染色し、泳動した RNA 量を確認した。プローブには、以下のように作製した DIG 標識した RNA プローブを用いた。まず、T7 RNA ポリメラーゼプロモーター配列を付加したプライマーを用いて、目的遺伝子のコード領域約 300bp を増幅し、アガロース電気泳動により精製した。この断片を鋳型とし、Boehringer Mannheim 社の DIG (digoxigenin) Labeling Kit (SP/T7) を用いて、DIG 標識した NTP を基質として T7 RNA ポリメラーゼによる転写を行い、DIG 標識の RNA プローブを作製した。

DIG 標識 RNA プローブとメンブレン上の RNA とのハイブリダイゼーションは Bohringer Mannheim 社の DIG Detection Kit のマニュアルに従った。RNA プローブのシグナルの検出は、AP (alkaline phosphatase) 標識された抗 DIG 抗体を結合させ、アルカリフォスファターゼの蛍光基質 CSPD ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClO}_7\text{PNa}_2$) からの蛍光を X 線フィルムに露光することによって行った。

III-2-10 蛍光顕微鏡による変異株の細胞形態および核様体の観察

枯草菌を LB 培地を用いて 37°C で培養し、 $\text{O.D.}_{600} = 0.3$ で集菌した。その細胞を 70% のエタノール中で 4°C 一晚処理し、固定した。固定した細胞を 10 mM Tris-HCl (pH7.5) で 3 回洗浄後、10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl_2 緩衝液に懸濁し、Poly-L-Lysine 処理したスライドガラス上に塗布した。乾燥後、DAPI で染色し、落射蛍光顕微鏡 (オリンパス BX50-FLA-PDH) で観察した。さらに、カラー冷却 CCD カメラ (C5810 Hamamatsu) を用いてコンピューターに取り込んだ。

III-3 結果

本研究により枯草菌 SOS レギュロンは 46 遺伝子により構成されることが明らかになった。その中には機能解析が行われておらず、また、そのアミノ酸配列での相同性解析からの機能の予測が困難である遺伝子（機能未知遺伝子）が、15 遺伝子も含まれていた。我々はこの機能未知遺伝子の中から、*lexA* 破壊株でのマクロアレイ解析で、非常に高い発現上昇を示した *yneA*、*yneB*、*ynzC* 遺伝子に注目し解析を行った（表 II-2）。これらの遺伝子は、*lexA* 遺伝子の隣に位置し、*lexA* と逆向きの転写方向を持つオペロンを形成していると予想される（図 III-2）。

DNA マクロアレイ解析から得られたこれらの遺伝子を含む領域の、アレイメンブレン上の像を図 III-1 に示した。野生株ではシグナルが検出されず（青枠）、*lexA* 破壊株で特異的にシグナルが検出されている（赤枠）。

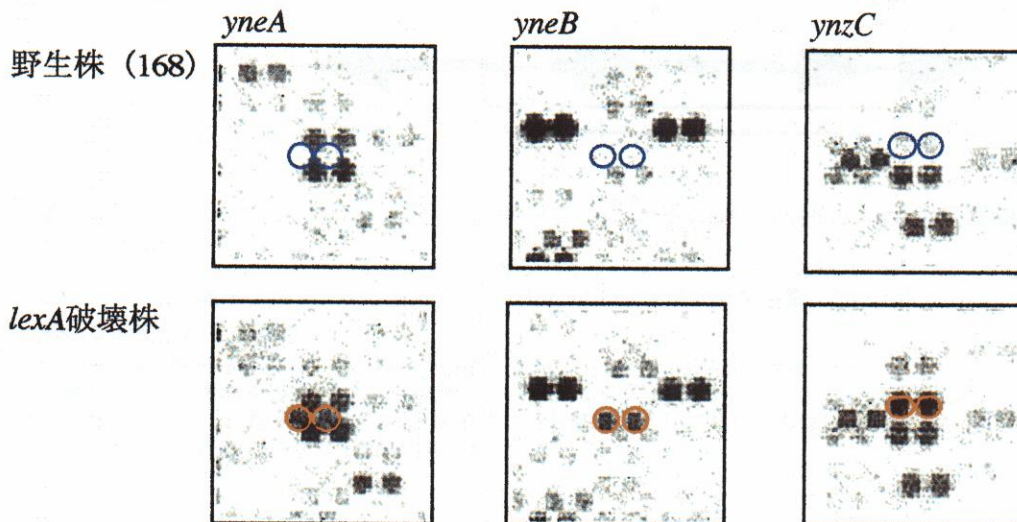


図 III-1 *yneA*、*yneB*、*ynzC*領域のスポット像

野生株および*lexA*破壊株から作成したcDNAプローブを用い、DNAマクロアレイ解析を行った後、得られた*yneA*、*yneB*、*ynzC*遺伝子を含む領域の像を示した。青枠は*yneA*、*yneB*、*ynzC*がプロットされているメンブレンの位置を示しており、野生株のプローブを用いた時は検出されていない。赤枠は*lexA*破壊株のプローブを用いた時の各遺伝子スポットを示している。また、各遺伝子は2スポットで示されている。

III-3-1 ノーザンハイブリダイゼーションによる *yneA*、*yneB*、*ynzC* の転写解析

DNA マクロアレイでの結果を確認するため、*yneA*、*yneB*、*ynzC* についてノーザンハイブリダイゼーションによる転写解析を行い、*lexA* 破壊株での転写誘導と転写単位の解析を行った。また、マイトマイシン C による SOS 応答時の転写誘導も同時に検討した。

図 III-2-A に示したように、野生株 (lane 1) では *yneA*、*yneB*、*ynzC*、いずれのプローブを用いても、その転写産物は検出されなかった。それに対して、*lexA* 破壊株

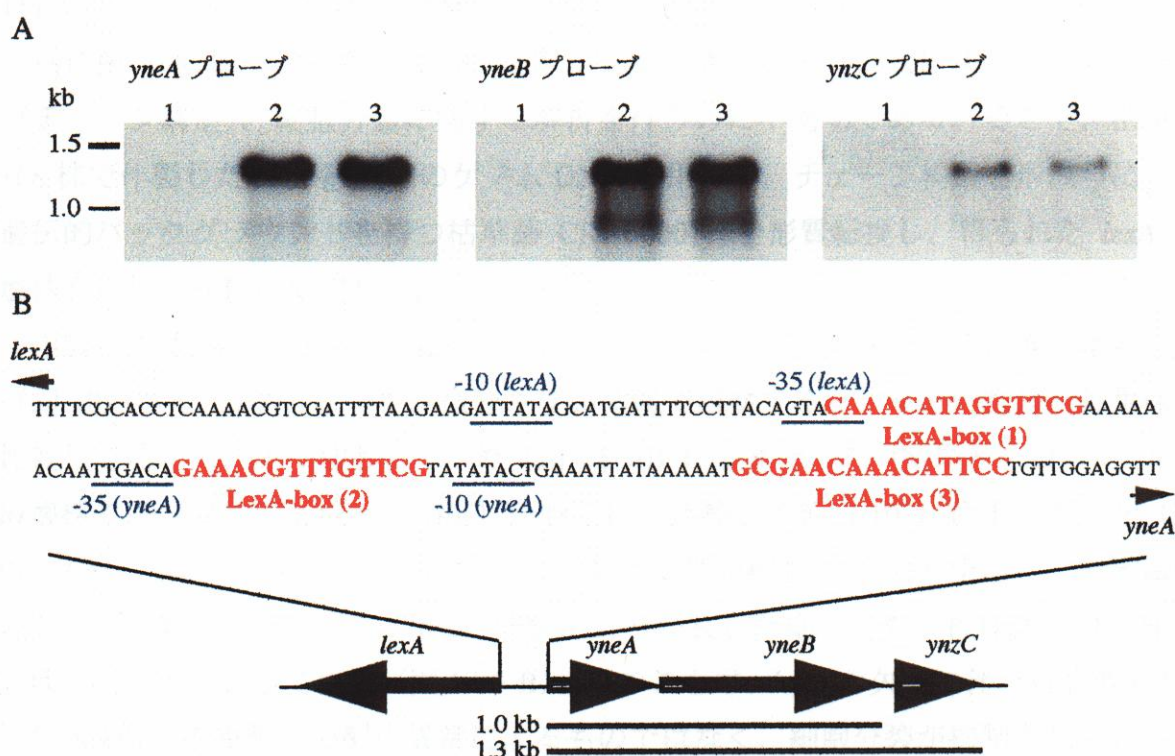


図 III-2 ノーザンハイブリダイゼーションによる $yneA$ 、 $yneB$ 、 $ynzC$ の転写単位の確認

A $yneA$ 、 $yneB$ 、 $ynzC$ プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションの結果を示した。各 laneは、野生株 (lane 1)、 $lexA$ 破壊株 (lane 2)、ミトマイシンC(1 μ g/ml)存在下で30分間培養した野生株 (lane 3)、から調製した RNA 2 μ gをそれぞれ含んでいる。

B $yneA$ 周辺領域の遺伝子とその構造を模式的に示しており、矢印の向きは、各遺伝子の転写方向を表している。また、ノーザンハイブリダイゼーションで使ったプローブの位置を白で示した。図中のDNA配列は $lexA$ と $yneA$ 間の非コード領域を示しており、赤はLexA-boxを、青は $lexA$ および $yneA$ のプロモーター配列 (シグマA認識配列) を示している。

(lane 2) では全てのプローブで約 1.3kb の転写産物が共通に検出された。このことから、 $yneA$ 、 $yneB$ 、 $ynzC$ はオペロンを形成しており、LexA によりその発現が抑制されていることが確認できた。また、 $yneB$ プローブでは約 1.0kb の転写産物が同時に観察されたが、これは 1.3kb の転写産物が分解されたものであると考えられる。さらに、1 μ g/ml のミトマイシン C により、SOS 応答を誘導させた野生株でもノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、 $lexA$ 破壊株で観察された約 1.3kb の転写産物と同じバンドが検出され、 $yneA$ - $yneB$ - $ynzC$ オペロンの転写は確かに SOS 応答により誘導されることが示された (lane 3)。 $lexA$ 上流の領域には、LexA 蛋白質と結合することが確認されている、3つの LexA-box があり (Winterling *et al.*, 1998; Dubnau and Lovett, 2002)、 $yneA$ オペロンのプロモーター (シグマ A 認識配列) と予想される配列が、2番目の LexA-box と重なって存在していた (図 III-2-B)。これらの結果は、 $yneA$ オペロンが LexA により直接制御される枯草菌 SOS レギュロンの一つであることを示している。

III-3-2 *lexA* 破壊株の細胞形態

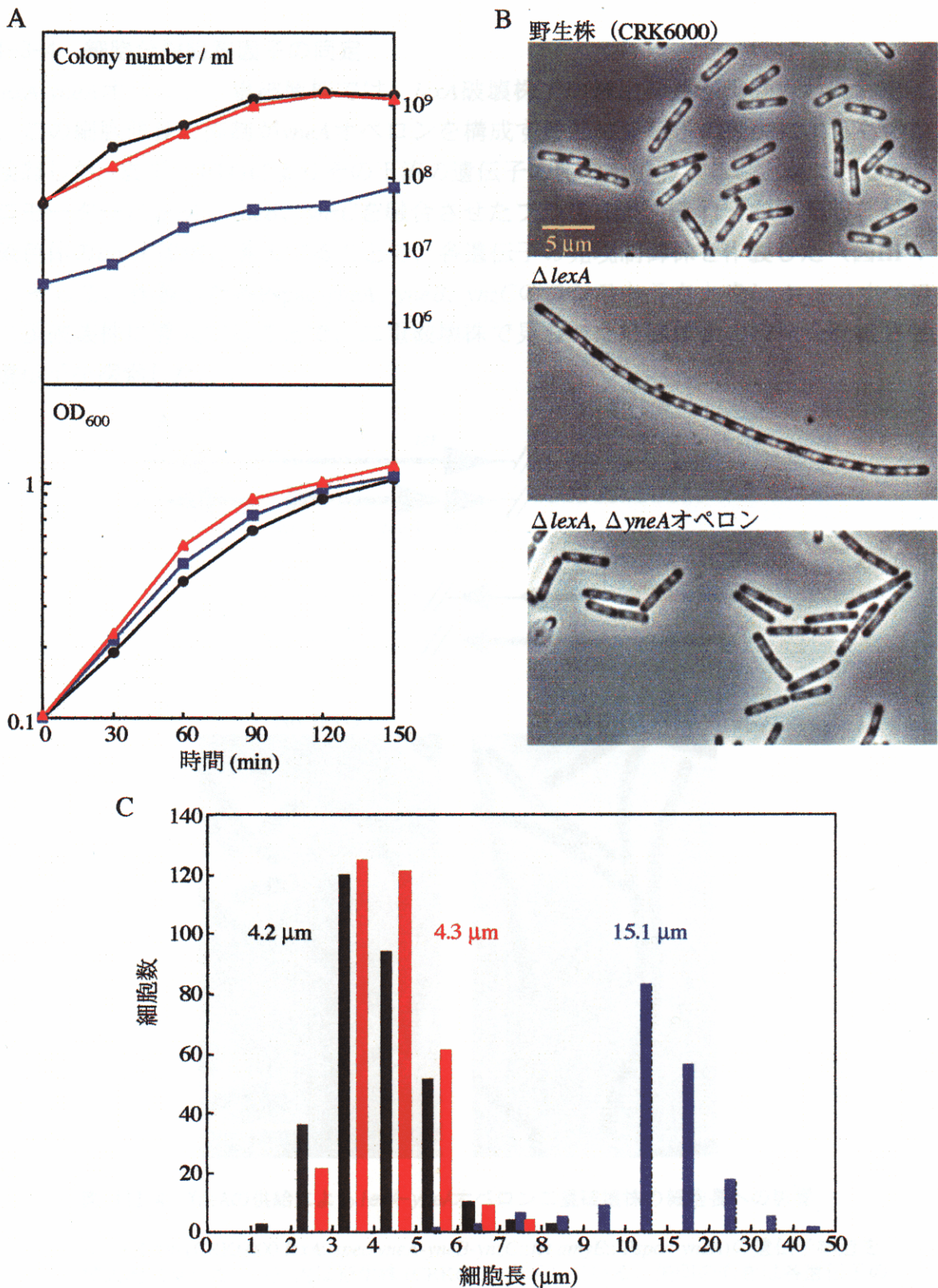
枯草菌 168 株は、細胞分裂後、細胞が分離せずにチェーン状に連なりやすいため（チェーン構造）、細胞分裂に関する解析を行うのに不適切である。そこで、枯草菌 168 株で作製した *lexA* 破壊株のゲノム DNA を用いて、チェーン構造を形成しにくい遺伝的バックグラウンドを持つ枯草菌 CRK6000 株を形質転換し、得られた *lexA* 破壊株を以後の解析に使用した。

作製した *lexA* 破壊株は、PAB 培地、37℃の条件下で野生株と同じ速度で増殖した（図 III-3-A）。しかしながら、微分干渉顕微鏡で観察すると、その細胞長は野生株と比較して約 4 倍にまで伸長していた（図 III-3-B, C）。また、この結果と一致して、*lexA* 破壊株ではコロニー形成率（CFU）が野生株と比較して約 1/10 に低下していた（図 III-3-C）。次に、エタノールで固定した対数増殖期の細胞を DAPI 染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、*lexA* 破壊により伸長した細胞でも、核様体は野生株と同様な間隔で分布していた（図 III-3-B）。このことは、*lexA* の欠失に伴う細胞伸長が、染色体 DNA の複製や分配の異常によるものではなく、細胞分裂が抑制されているためであることを示しており、LexA により制御される遺伝子の中に、細胞分裂阻害因子が含まれていることを示唆している。

III-3-3 *yneA* オペロンの欠失が *lexA* 破壊株の細胞形態に及ぼす影響

yneA オペロンの細胞分裂阻害への関与を調べるため、*yneA* オペロン欠失の細胞伸長に対する影響を解析した。まず、二重交差によりクロラムファンコール耐性遺伝子と置き換えた *yneA* オペロン破壊株を作製した。*yneA* オペロン単独の破壊株では増殖速度、細胞形態共に野生株と同様であった。次に、この *yneA* オペロン破壊株を *lexA* 破壊株のゲノム DNA により形質転換することで *lexA-yneA* オペロン二重破壊株を作製した。

得られた二重破壊株の増殖速度を測定したところ、PAB 培地、37℃の条件下では、野生株や *lexA* 破壊株と変わらなかった（図 III-3-A）。しかしながら、対数増殖期の細胞をエタノールで固定した後、顕微鏡観察を行うと、*lexA-yneA* オペロン二重破壊株では、*lexA* 破壊株で観察された細胞伸長が抑制され、野生株と同様な細胞長に戻っていた（図 III-3-B, C）。また、核様体の分布も野生株と同様であった（図 III-3-B）。さらに、この二重破壊株では *lexA* 破壊株で見られた CFU の低下も回復していた（図 III-3-A）。これらのことから、*yneA* オペロンの中には細胞分裂の抑制に関与している遺伝子が含まれていることが明らかとなった。



図III-3 *lexA*破壊株の増殖速度と細胞形態、および*yneA*オペロンの欠失による影響

- A PAB培地、37℃での増殖曲線とCFUの測定結果を示した。黒は野生株、青は*lexA*破壊株、赤は*lexA-yneA*オペロン二重破壊株を示している。
- B 対数増殖期の各枯草菌株におけるDAPI像を示している。
- C 各枯草菌株の細胞長を測定した結果を示しており、黒は野生株、青は*lexA*破壊株、赤は*lexA-yneA*オペロン二重破壊株を表している。細胞長の測定にはそれぞれ300以上の細胞を用いた。また、図中の数値は平均細胞長を示している。

III-3-4 細胞分裂阻害因子の同定

lexA-yneA オペロン二重破壊株では、*lexA* 破壊株での細胞伸長が抑制された。そこで、この細胞伸長の抑制が *yneA* オペロンを構成するどの遺伝子の欠失によるものかを検討した。まず、IPTG によりその下流の遺伝子の発現を誘導することができる *spac* プロモーターに *yneA*、*yneB*、*ynzC* を融合させたプラスミドをそれぞれ構築し、枯草菌染色体の *amyE* 領域に導入することで、各遺伝子の発現制御株を作製した（図 III-4-A）。そして、作製した各 *Pspac-yneA*、*yneB*、*ynzC* のコンストラクトを *lexA-yneA* オペロン二重破壊株に導入することで、二重破壊株で見られた細胞伸長の抑制を回復させる遺伝子を探索した。

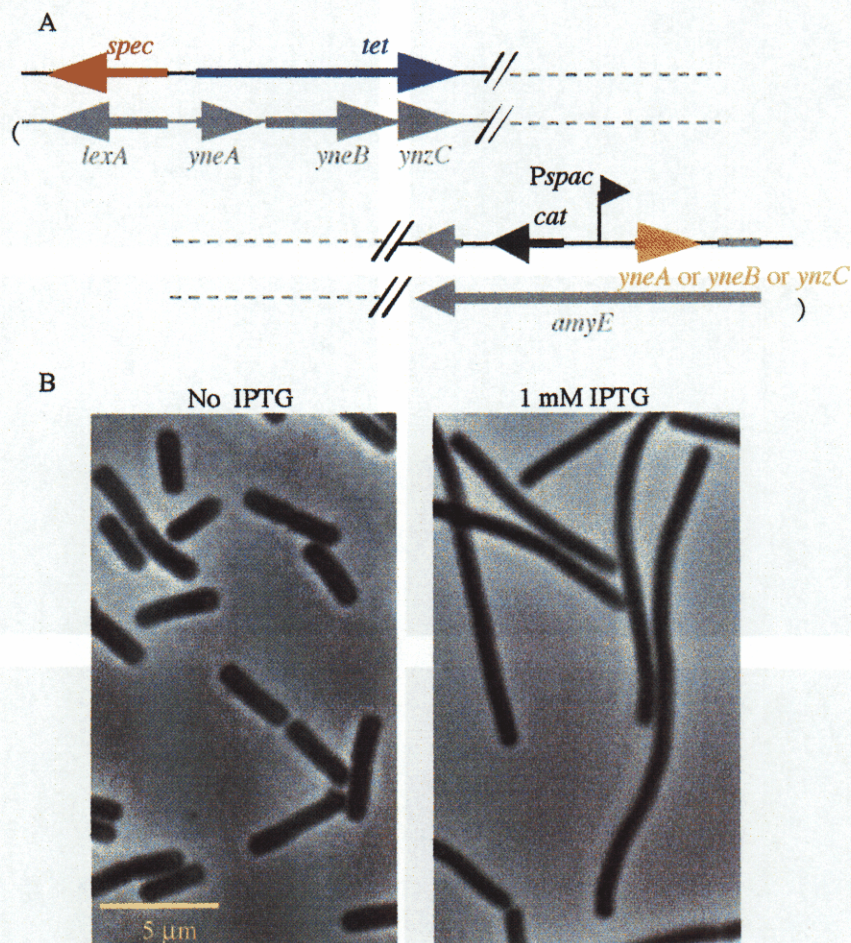


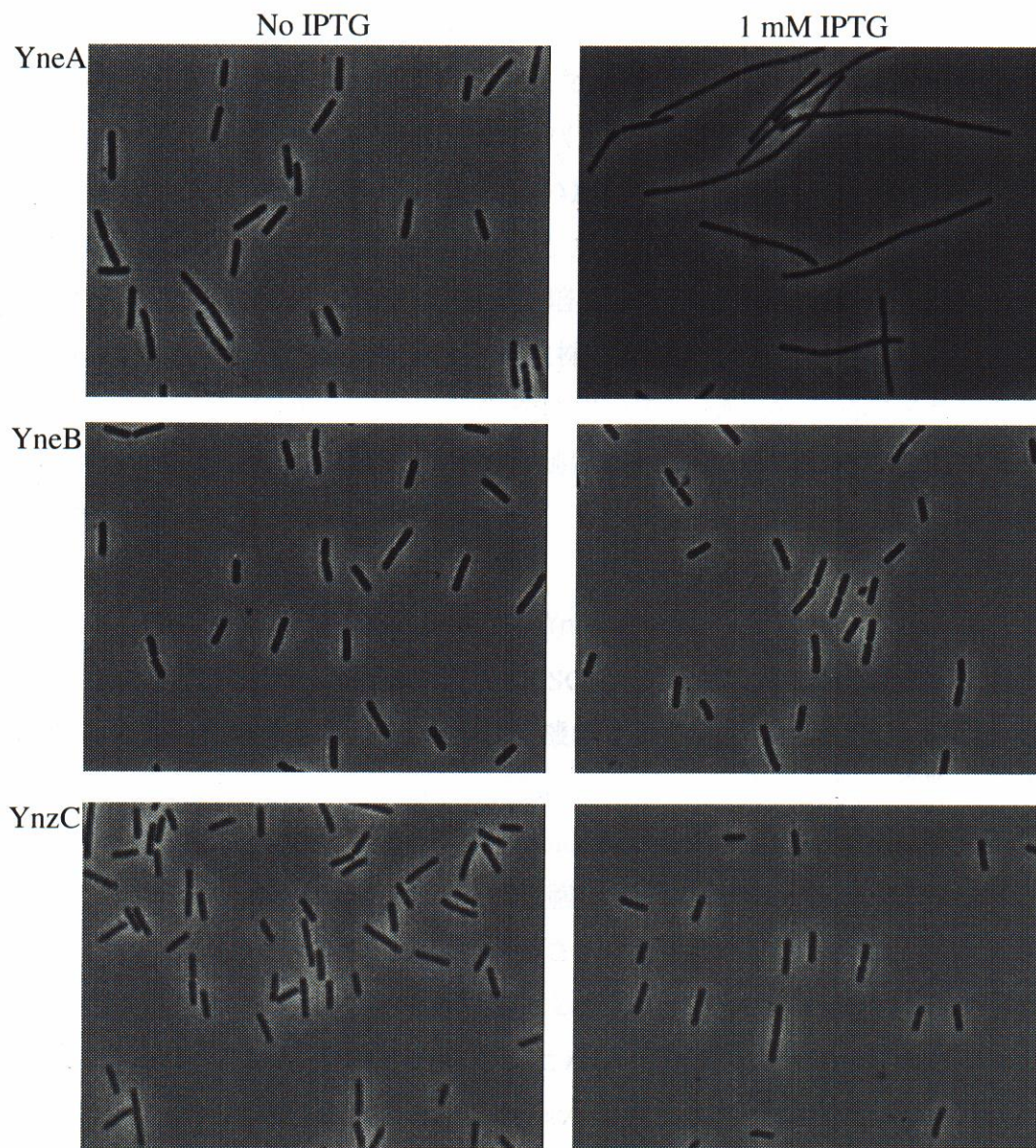
図 III-4 YneAの供給による *lexA-yneA* オペロン二重破壊株の細胞長への影響

A YK006 (CRK6000 *lexA::spec yneA-yneB-ynzC::tet amyE::Pspac-yneA*) の遺伝子構造を模式的に示した。() 内は野生株 (CRK6000) を示している。矢印の向きは各遺伝子の転写方向を表している。

B IPTG の存在下 (1 mM)、あるいは非存在で培養した (PAB 培地、37℃) YK006 の対数増殖期の細胞を顕微鏡により観察した。

1 mM の IPTG 存在下あるいは IPTG を含まない PAB 培地、37℃ の条件下で各枯草菌株を培養した後、対数増殖期の細胞を顕微鏡により観察した結果、*yneA* 発現制御株に

において、IPTG非存在下では細胞形態に影響が見られなかったのに対して、IPTGの添加により、*lexA*破壊株と同様な細胞伸長が再び観察されるようになった(図III-4-B)。一方、YneB、あるいはYnzCを*lexA-yneA*オペロン二重破壊株に供給しても、その細胞形態に影響は見られなかった(図III-5)。これらのことから、*lexA*の欠失に伴う細胞伸長はYneAの発現誘導に伴うことが明らかになった。



図III-5 各発現制御株の細胞形態

IPTGの存在下(1 mM)、あるいは非存在で培養した(PAB培地、37℃)
*yneA*オペロンを構成する各遺伝子の発現制御株を用い、対数増殖期の細胞
を顕微鏡で観察した。

III-3-5 野生株におけるYneA過剰発現の影響

次に、*amyE*領域に*Pspac-yneA*が導入された*yneA*発現制御株を用い、YneA過剰発現(*lexA*⁺)の細胞形態への影響を解析した。まず、YneAの発現がIPTGの添加により、特異的に誘導されることを確認するため、IPTG非存在下あるいは0.1 mM、0.5 mMのIPTG存在下で培養した対数増殖期の*yneA*発現制御株細胞からそれぞれRNAを調製し、*yneA*プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、IPTG非存在下 (lane 1) ではバンドは検出されなかったのに対して、0.1 mM (lane 2)、0.5 mM (lane 3) のIPTG存在下では約1.3 kbのバンドが検出され、その長さは*yneA-lacZ*'の転写産物の長さの計算値とよく一致していた。(図III-6-Ab)。これらの条件下での細胞形態を観察したところ、図III-6-Bに示したようにIPTGの添加に伴い細胞の伸長が誘導された。また、0.5mM IPTG存在下で培養した細胞の核様体の分布を、DAPI染色により観察したところ、*lexA*破壊株、野生株と同様に核様体は等間隔に並んでいた(図III-6-C、III-3-B)。このように、野生株においてYneAのみを発現させても細胞の伸長が誘導されたことから、細胞分裂の抑制はYneAが特異的に持つ機能であることがわかった。

III-3-6 DNA損傷によるSOS応答時でのYneAの役割

以上の実験により、本研究で新たに SOS レギュロンに属する遺伝子として同定された *yneA* は、細胞分裂阻害因子として機能することが明らかになった。一方で、*recA* 変異株を用いた解析から、SOS 応答時には、RecA に依存しない細胞分裂の抑制が観察されることも報告されている (Love and Yasbin, 1984; Yasbin *et al.*, 1991)。また、大腸菌においても、RecA に依存しない細胞分裂阻害機構の存在が認められている (Liu *et al.*, 2001)。そこで、DNA 損傷で誘導される細胞分裂の抑制に、*yneA* の欠失が及ぼす影響を解析し、YneA の役割を明確にした。そのために、*recA* のコード領域にクロラムフェニコール耐性遺伝子を挿入した *recA* 破壊変異を (Gassel and Alonso, 1989)、*yneA* オペロン破壊株に導入した。この *recA* 変異により、活性型 RecA に依存した LexA の分解が起こらなくなり、DNA 損傷に伴う SOS 遺伝子の発現は誘導されなくなる。

まず、野生株、*yneA* 破壊株、*recA* 変異株および *yneA-recA* 二重変異株を PAB 培地、37°Cの条件下で OD₆₀₀=0.1 まで培養した。その時点で、マイトマイシン C (1μg/ml) を加えて培養を続け、0 分、30 分、60 分、90 分後の細胞をそれぞれ集菌し、顕微鏡観察を行い、その細胞長を測定した。さらに培養を続けるとファージの誘発による細胞の溶解が起こり、解析ができなくなった。対照として、マイトマイシン C 非存在下でも培養を続け、経時的に細胞を集菌した。図 III-7-A に示したように、マイト

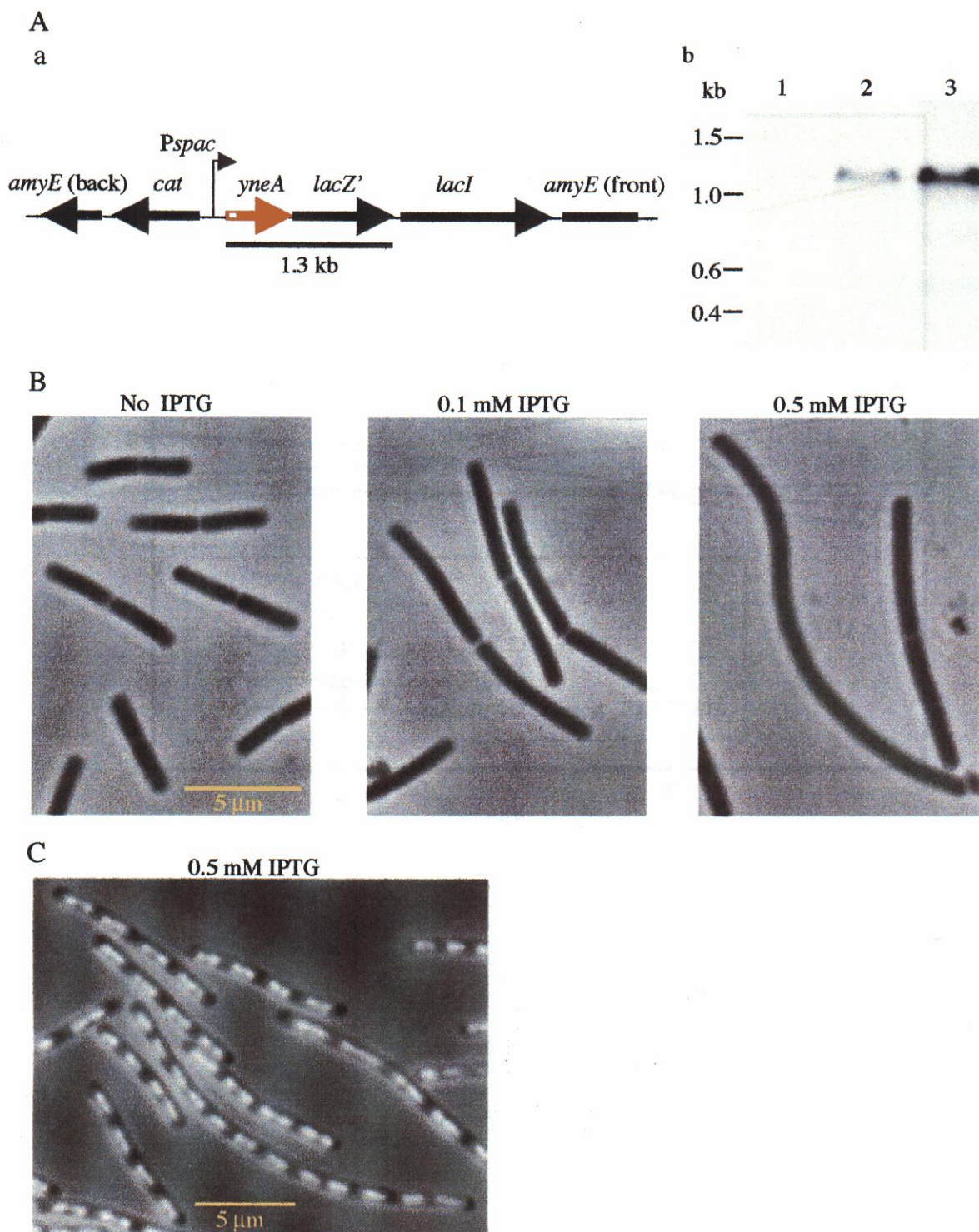
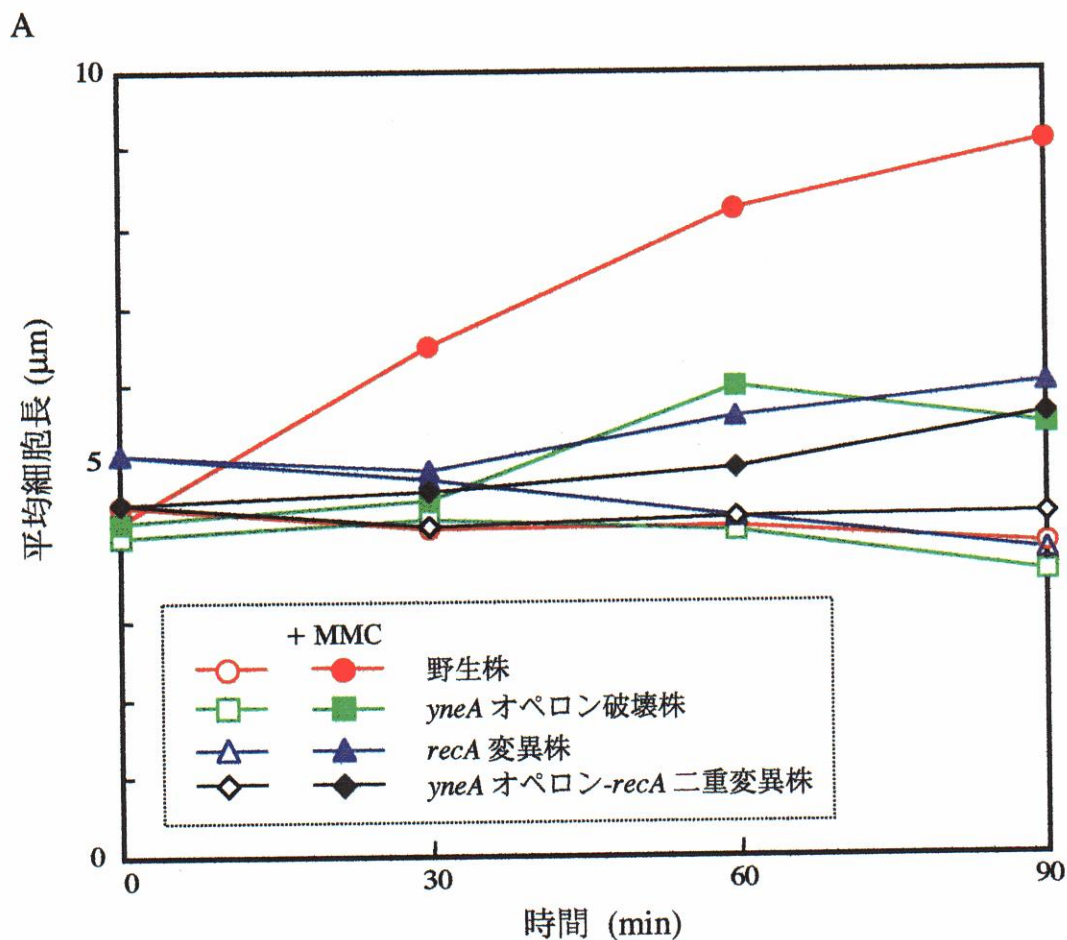


図 III-6 野生株におけるYneA過剰発現の細胞形態に及ぼす影響

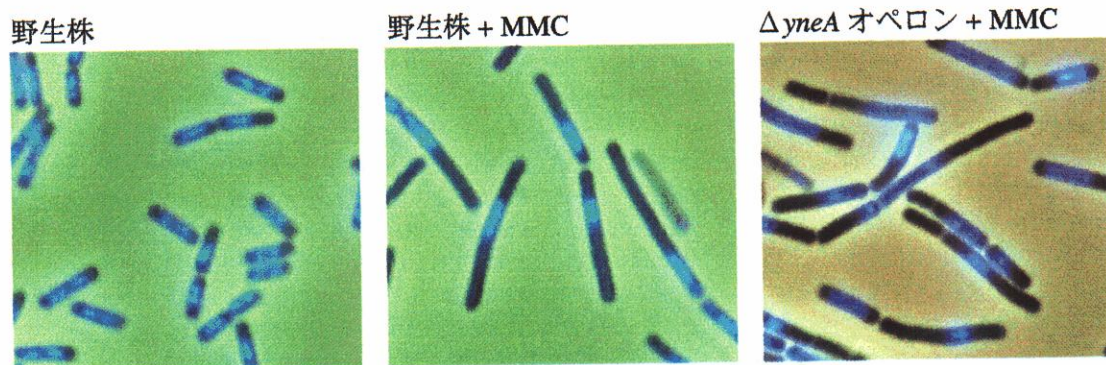
A (a) *yneA*発現制御株の*amyE*領域を模式的に示した。矢印は各遺伝子の転写方向を表し、白はノーザンハイブリダイゼーションに用いた*yneA*プローブの位置を示す。また*lacZ'*は大腸菌*lacZ*の一部を示している。(b) *yneA*発現制御株から調製したRNAと*yneA*プローブによるノーザンハイブリダイゼーション。各レーンはIPTG非存在下 (lane 1)あるいは0.1 mM (lane 2)、0.5 mM (lane 3) のIPTG存在下で $OD_{600}=0.3$ まで培養 (PAB培地、37℃) を行った後、調製した RNA 2μgを含んでいる。

B *yneA*発現制御株をIPTG存在下と非存在下で培養した後、対数増殖期の細胞を顕微鏡を用いて観察した。

C *yneA*発現制御株を0.5 mMのIPTG存在下で培養した、対数増殖期の細胞をエタノール固定した後、DAPI染色を行い蛍光顕微鏡により観察した。



B



図III-7 *yneA*オペロンの欠失によるSOS応答に伴う細胞伸長への影響

A 各枯草菌株をPAB培地、37℃で $OD_{600}=0.1$ まで培養した後、1 $\mu\text{g/ml}$ のマイトマイシンC (MMC)を添加した培養液と加えない培養液に分けて、さらに90分間培養を続けた。MMC添加後、0、30、60、90分後の細胞を顕微鏡で観察し、細胞長を計測した。縦軸は300細胞以上から測定した平均の細胞長を示している。図中の点線枠内には、各シンボル(色)に対応する枯草菌株をそれぞれ示した。

B MMC添加した後、90分後の細胞をDAPI染色し、蛍光顕微鏡により観察した。

マイシン C 存在下で 90 分間培養した野生株では、マイトマイシン C 非存在下の細胞と比較して、約 2 倍にまで細胞が伸長した。一方、*yneA* 破壊株では約 20% の伸長にとどまっていた。また、*recA* 変異株、あるいは *recA-yneA* 二重変異株においても細胞伸長の抑制が観察された。これらの細胞を DAPI 染色し、その核様体分布を観察したところ、マイトマイシン C 存在下で 90 分間培養した *yneA* 破壊株では、無核細胞や染色体の分断（ギロチン効果）が高頻度で観察された（図 III-7-B）。これらの結果は、RecA による LexA の不活性化（LexA の分解）を介した YneA の発現誘導が、SOS 応答による細胞分裂の抑制で中心的な役割を担っていることを示している。*yneA* 破壊株や *recA* 変異株でも若干の細胞伸長が観察されたことから、YneA に依存しない細胞分裂阻害機構が存在する可能性も完全には否定できないが、その役割はあまり大きくないと考えられる。

III-4 考察

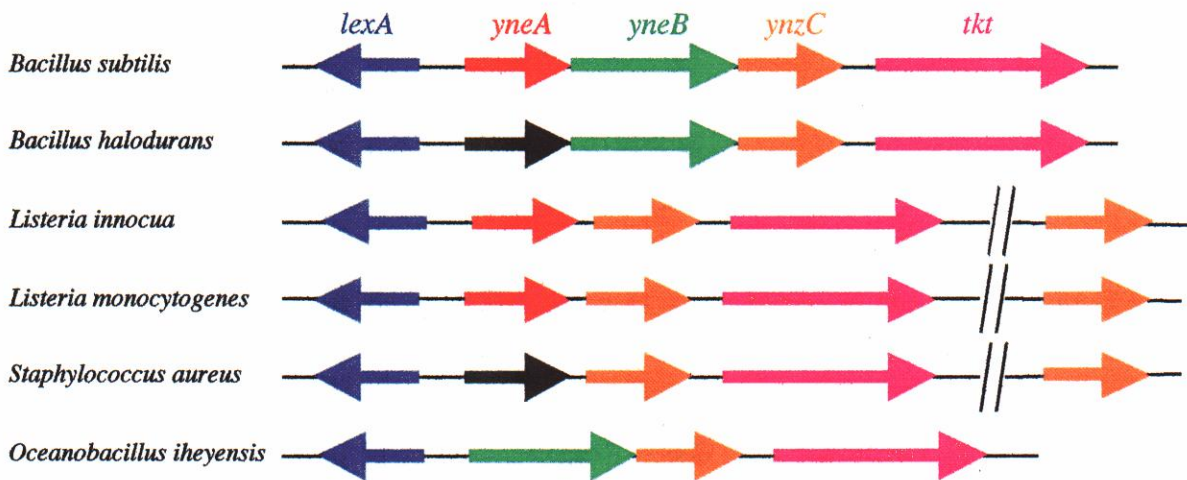
本研究では枯草菌で今まで不明であった、SOS 応答時の細胞分裂の抑制機構を明らかにしたいと考え、DNA マクロアレイ解析により SOS 遺伝子であることが新たに発見された、*yneA* オペロンに注目し細胞分裂阻害への関与を検討した。その結果、*lexA* 破壊株での細胞伸長は *yneA* オペロンの欠失により抑制され、*lexA-yneA* 二重破壊株に YneA を供給することにより再び細胞の伸長が誘導された。また、野生株で YneA を強制的に発現させることでも細胞伸長は観察された。さらに *yneA* 破壊株ではマイトマイシン C 処理による SOS 応答の誘導に伴う細胞伸長も抑制された。これらのことは、YneA が枯草菌の SOS 応答時における細胞分裂阻害因子として機能していることを明確に示している。YneA がどのようにして細胞分裂を抑制するか、その分子機構については次章で議論する。

枯草菌と大腸菌では SOS 応答時に RecA 非依存の経路で細胞分裂の抑制が起こることが報告されている。大腸菌ではそのゲノム配列上に、*mra* 領域と呼ばれる *ftsA*、*ftsZ* など細胞分裂に関わる多くの遺伝子がクラスターを形成している領域がある。DNA 損傷で DNA 複製伸長が阻害を受けると、この領域にある遺伝子群の転写が抑制され、その結果、細胞分裂も抑制されることがわかっている(Liu *et al.*, 2001)。枯草菌では、その分子機構は不明であるが、紫外線を照射した定常期の *recA* 変異株 (*recE4*, DNA 組み換え能と LexA の分解能が欠失している) で細胞の伸長が観察されている。本研究でのマイトマイシン C 処理による解析では対数増殖期の *recA* 変異株の細胞伸長は観察されなかった。枯草菌では、RecA 非依存の細胞分裂の抑制は培養条件や細胞の発達過程に依存した 2 次的な経路であると考えられる。

また、*yneB*、*ynzC* に関しては特にその機能解析を行わなかったが、*yneA* オペロン破壊株と野生株で、マイトマイシン C に対する感受性には違いが見られなかったもので、DNA 修復系に関与している可能性は低いと考えられる。

大腸菌 SOS 遺伝子であり、細胞分裂阻害因子として機能する *sulA* はグラム陰性細菌である γ -プロテオバクテリアの一部に保存されている (図 I-1)。YneA 蛋白質は N 末端側に膜貫通ドメインと予想される領域を、中央から C 末端側にかけてはペプチドグリカンとの結合配列と考えられている LysM モチーフを持つ。YneA の保存性を MBGD データベース (<http://mbgd.genome.ad.jp/>) を用いて、全ゲノム配列が決定されている細菌について調べたところ、枯草菌と同じ低 GC グラム陽性細菌である *Listeria innocua* と *Listeria monocytogenes* にのみ見い出され、ゲノム上の対応する位置に完全な形で保存されていた (図 III-8)。一方、他の細菌では *yneA* は見い出され

低GCグラム陽性細菌



図III-8 *yneA*遺伝子領域の保存性

*yneA*周辺領域の遺伝子とその構造を模式的に示した。
矢印の向きは転写方向を表している。

なかった。低 GC グラム陽性細菌において *lexA* から *tkt* の間のゲノム領域を比較すると、*Bacillus halodurans* では、枯草菌で *yneA* が存在する位置に他の機能未知遺伝子 (*Bacillus halodurans* に特有な遺伝子) が挿入されており、*Oceanobacillus iheyensis* では *yneA* だけが抜けた状態になっている。*Streptococcus aureus* では *yneA* と *yneB* が抜けており、他の機能未知遺伝子 (*Streptococcus* に特有な遺伝子) が 1 つ存在していた。

また、*yneB* の相同遺伝子は低 GC グラム陽性細菌だけではなく、結核菌である *Mycobacterium tuberculosis* や放線菌である *Streptomyces coelicolor* などでも保存されていたが、大腸菌近縁種では見い出されなかった。*ynzC* は *Bacillus halodurans*、*Listeria innocua*、*Staphylococcus aureus*、*Lactococcus lactis*、*Streptococcus agalactiae*、*Clostridium acetobutylicum* など多くのグラム陽性細菌に保存されていた。おもしろいことに *YneB* はトランスポゾンにコードされている転位を触媒する酵素と高い相同性を示す。これらのことから、*yneA-yneB-ynzC* は進化の過程で外から獲得されてきた遺伝子である可能性も考えられ、そのような遺伝子により重要な SOS 機能が担われていることは興味深い。

IV YneA による細胞分裂阻害機構の解明を目指して

IV-1 序論

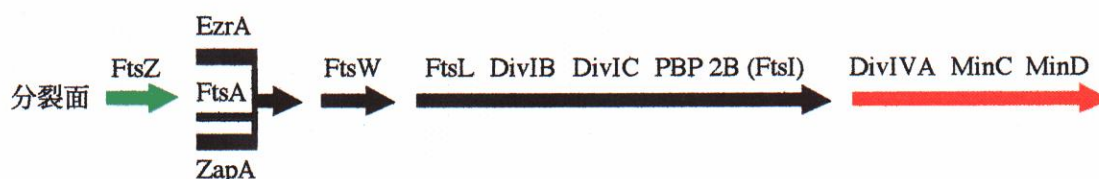
IV-1-1 細胞分裂蛋白質とその分裂面への集合機構

細胞周期の基本的な流れは全ての生物で共通であり、染色体複製の進行に伴い核様体が倍加し、それが分離、分配された後、細胞は 2 つの娘細胞へと 2 分裂する。細胞分裂の研究は、細胞分裂は阻害されるが DNA 合成は阻害されない *fts* (filamentation temperature sensitive) 変異株により行われてきた (de Boer and Rothfield, 1990; Lutkenhaus and Mukherjee, 1996)。 *fts* 変異株は、制限温度下で隔膜形成が正確に行われず、多核（分離、分配された核様体が多数連なった状態）を持つ長いフィラメント状の細胞を形成する。大腸菌、枯草菌などの桿菌を中心に、多くの *fts* 変異が同定され細胞分裂に関与する遺伝子が見い出されてきた。 *ftsZ* も同様な変異として同定された遺伝子である。

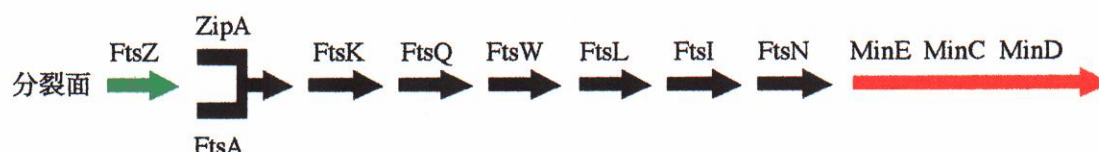
近年、細菌における細胞分裂の研究は、新しい実験技術が導入されたことにより急速に発展している。GFP 融合蛋白質や免疫蛍光顕微鏡法により、多くの細胞分裂に関わる蛋白質（細胞分裂蛋白質）の局在性が解析され、FtsZ 蛋白質が細胞分裂過程で細胞中央にリング状（Z-ring）に集合することが大腸菌、枯草菌で明らかにされた (Bi and Lutkenhaus, 1991; Wang and Lutkenhaus, 1993)。さらに、他の細胞分裂蛋白質が Z-ring を基盤として収縮環に局在することも明らかにされた。そして、枯草菌や大腸菌では、細胞分裂蛋白質の発現制御株や温度変異株を用いた解析により、細胞分裂蛋白質が分裂面へ局在化する順序も決められている。例えば大腸菌で FtsA 蛋白質を枯渇すると、FtsZ の局在は正常であるが、FtsW の局在は消失する。このことから、FtsA は FtsZ の局在には必要なく、FtsW が局在するには必須であると考えられる。こうした解析から、枯草菌と大腸菌では図 IV-1-A に示した順に、細胞分裂蛋白質は分裂面に局在化することが明らかになっている (Rothfield *et al.*, 1999; Margolin, 2000; Errington and Daniel, 2002)。まず、分裂面に遊離の FtsZ が重合しながら Z-ring が形成され、その後 FtsA などの蛋白質が順次局在し、成熟した収縮環となり最終的に隔膜が形成される。両生物間で共通しているのが、収縮環形成過程の最初期に FtsZ が分裂部位に局在化し Z-ring を形成し、次に FtsA が Z-ring に依存して分裂面に局在化することである。続いて、枯草菌では FtsA と同時期に Z-ring に依存して EzrA と ZapA が分裂面に局在するのに対して、大腸菌では FtsA と ZipA が同時期に分裂面へ局在する。この EzrA と ZapA は低 GC グラム陽性細菌に、ZipA は γ -プロテオバクテリアにおいて保存されている。その後分裂面に局在化する蛋白質では、FtsW、FtsL、PBP2B (FtsI) が枯草菌と大腸菌で相同な蛋白質であり、他は異なる。また、これらの分裂蛋白質が分裂面へ局在化する機構にも違いがあり、図 IV-1-A で示しているよう

A

枯草菌



大腸菌



B

枯草菌



大腸菌



図IV-1 枯草菌と大腸菌での細胞分裂装置

A 収縮環形成過程

B MinシステムによるZ-ring形成の抑制

赤はMin複合体を、緑はZ-ringをまた青は核様体を示している。

に、大腸菌では明確な順序があるのに対して、枯草菌では FtsL、DivIB、DivIC、PBP2B がお互いに協調して分裂面に局在する。これらの分裂蛋白質の機能は PBP2B (FtsI) がペプチドグリカンの合成に関与することを除いては、細胞分裂過程での正確な役割はまだ不明である。ただし、次項で述べるように、最近の研究から EzrA は Z-ring 形成の負の制御因子であると考えられており、また、ZapA は FtsZ フィラメント間を架橋していると予想されている。

IV-1-2 FtsZ と直接相互作用する蛋白質

細胞分裂の研究において、最も注目されているのが、「細胞質に存在する FtsZ が、どのようにして細胞膜上にある分裂部位に局在化し、Z-ring を形成するのか？」である。これまでのところ、この分裂部位での Z-ring 形成の制御機構は、不明であり、FtsZ より早く分裂部位を認識するような蛋白質は同定されていない。現在までに、FtsZ と直接相互作用すると予想される蛋白質として、枯草菌では FtsA、EzrA、ZapA

が、大腸菌では FtsA、ZipA が報告されている(Levin *et al.*, 1999; Rothfield *et al.*, 1999; Margolin, 2000; Errington and Daniel, 2002; Frederico *et al.*, 2002)。

FtsA は細菌の間で広く保存されており、ATP 結合ドメインを持つ。その立体構造において真核生物のアクチンと高い類似性を示し、FtsA も FtsZ 同様に自己重合化すると考えられている (Feucht, 2001)。また、既知の細胞分裂に関与する蛋白質の中で細胞質に存在しているのは FtsZ と FtsA だけであり、その他の細胞分裂蛋白質は全て膜蛋白質である(Rothfield *et al.*, 1999; Margolin, 2000; Errington and Daniel, 2002)。大腸菌では、FtsA の枯渇で Z-ring 形成頻度に若干の減少が観察されることから、Z-ring の安定性に影響していると考えられているが、FtsA の機能の詳細はまだ不明である (Addinall *et al.*, 1996)。大腸菌 ZipA に関しても同様に、その枯渇により Z-ring 形成頻度に若干の減少が見られることから、Z-ring の安定性に影響していると考えられている(Hale *et al.*, 1999)。また、FtsA と ZipA を同時に枯渇させると Z-ring が形成される位置に異常が起こり、Z-ring の形成頻度に大きな減少が見られることもわかっている。枯草菌の EzrA では、その枯渇により付加的な Z-ring が観察され、また、Z-ring 形成に必要とされる FtsZ 蛋白質濃度が下がることから、FtsZ の重合化を負に制御する因子であると考えられている (Levin *et al.*, 1999)。また、最近報告された ZapA は、単独で枯渇させても細胞分裂に影響は見られないが、EzrA を同時に枯渇させると急激に細胞分裂が抑制され、また、生化学的解析から、FtsZ フィラメント間を架橋することで Z-ring の安定化に関与している可能性が示されている (Frederico *et al.*, 2002)。

IV-1-3 細胞分裂位置の決定機構

細胞分裂の位置と時期は Z-ring の正確な細胞中央への局在化により制御されている。枯草菌や大腸菌のような桿菌では、細胞中央での分裂部位を決定するための主な機構として Min システムと Nucleoid occlusion モデル (核様体による Z-ring 形成の阻害) が知られている (Margolin, 2000; Regamey *et al.*, 2000; Harry, 2001; Migocki *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2002)。

Min システムは大腸菌では MinC、MinD、MinE、枯草菌では MinC、MinD、DivIVA によって構成されており、両生物間ではいくつかの違いがあるが、共に細胞極での Z-ring の形成を阻害することで、細胞分裂部位の特定に貢献している。遺伝学的な解析から、大腸菌や枯草菌では細胞の中心と両極付近の 3 カ所に分裂部位があると考えられているが、*min* 変異体 (*minE*、*divIVA* は除く) では、細胞の両極付近でも細胞分裂が行われ、高頻度でミニセル (通常より非常に小さい細胞) や無核細胞 (核様体を持たない細胞) が出現する。大腸菌、枯草菌で共に MinC が実際に細胞分裂を抑制する因子であり、この MinC は MinD により活性化される。しかしながら、MinCD を細胞極に誘導する機構は両細菌で異なっている。大腸菌 MinE は、Z-ring 形成前の細胞の中央に局在化しリングを形成し、また MinCD 複合体と相互作用する。MinE-ring は細胞の中央から極への移動を繰り返すことで、MinCD を両極へと集中させる。そ

の結果、細胞内での MinCD 量は両極付近では高く、細胞中央で最も低いといった濃度勾配が生じ、両極での Z-ring を抑制し、細胞中央での Z-ring 形成を促す (図 IV-1-B, 右)。一方、枯草菌における MinE の機能的ホモログ (配列の相同性は認められない) である DivIVA は、収縮環の形成に依存して細胞中央に局在化し、MinE のような動態は観察されない。その後、分裂が完了してもアンカーとしてそこにとどまり、両極に MinCD を引き寄せることで、そこでの Z-ring 形成を阻害する (図 IV-1-B, 左)。

Nucleoid occlusion は、核様体が細胞内の空間を占領することで、細胞分裂装置の形成を抑制するという機構であり、複製が終了した染色体が分離した後の間隙に隔膜が形成されることから、大腸菌で提唱された (Woldringh *et al.*, 1991)。また、同様な機構の存在は、枯草菌でも報告されている (Harry, 2001)。

このように、Min システム、Nucleoid occlusion による細胞分裂の阻害機構は細胞の中央以外での Z-ring 形成を抑制することで、細胞分裂の位置を規定している。

IV-1-4 研究の目的

我々は *yneA* が SOS 応答に伴う細胞分裂阻害因子として機能することを明らかにした。大腸菌での SOS 応答に伴う細胞分裂の抑制は、SOS レギュロンに属する *SulA* が *FtsZ* と直接相互作用することで、*FtsZ* の持つ GTPase の活性を阻害し、分裂部位での *FtsZ* の自己重合化を抑制するためであることが明らかになっている (Bi and Lutkenhaus, 1993; Trusca *et al.*, 1998)。*YneA* と *SulA* のアミノ酸配列では相同性は認められず、*YneA* はアミノ酸配列の N 末端側に膜貫通領域を持つことから、細胞膜に存在する蛋白質であると考えられ、細胞質に存在する *SulA* とは異なる細胞内局在性を示すことが予想された。また、枯草菌では *lexA* を欠失しても細胞の増殖速度には影響が見られなかったが、大腸菌では *lexA* の欠失は、*sulA* の発現誘導に伴う細胞伸長のために致死性を示すことが報告されている (Friedberg *et al.*, 1995; McKenzie *et al.*, 2000)。そのため、大腸菌では *sulA* に変異を導入し、その機能を抑制しなければ *lexA* 破壊株は作製できない。さらに、枯草菌と大腸菌では、細胞分裂に関与する蛋白質群とそれらの分裂面への集合機構にも違いがある。こうしたことから、*YneA* と *SulA* は異なる機構で細胞分裂を抑制している可能性が考えられた。

そこで、本研究では *YneA* による細胞分裂の阻害機構の解明を目指し、*lexA* の欠失による *YneA* の発現誘導と野生株での人為的な *YneA* の発現が Z-ring 形成へ及ぼす影響を *FtsZ* 抗体を用いた免疫顕微鏡観察により解析した。また、*YneA*-GFP 融合蛋白質や *YneA* 抗体を用いた *YneA* の細胞内局在性を検討した。さらには、酵母 2 ハイブリッド法を用い *YneA* と細胞分裂蛋白質との相互作用の有無も確認した。これらの解析により、*YneA* は分裂部位を含む細胞膜全体に存在することで *FtsZ* の分裂部位での重合を抑制し、Z-ring 形成を抑制している可能性が考えられた。

IV-2 材料と方法

IV-2-1 菌株とプラスミドおよび使用したプライマー

本研究で使用した菌株、およびプラスミドと合成プライマーを表 IV-1, IV-2, IV-3 に示した。

表 IV-1 本研究に使用した菌株

菌株	遺伝子型	菌株の由来と参考文献
<i>B. subtilis</i>		
CRK6000	<i>purA16 metB5 hisA3 guaB</i>	Moriya <i>et al.</i> (1990)
YK002	CRK6000 <i>lexA::spec</i>	YK001→CRK6000
YK003	CRK6000 <i>yneA-yneB-ynzC::tet</i>	本研究 (2-2-a-2)
YK004	CRK6000 <i>lexA::spec yneA-yneB-ynzC::tet</i>	YK002→YK003
YK005	CRK6000 <i>amyE::Pspac-yneA</i>	本研究 (2-2-a-3)
YK006	CRK6000 <i>lexA::spec yneA-yneB-ynzC::tet amyE::Pspac-yneA</i>	YK004→YK005
<i>gfp-ftsZ</i>	<i>trpC2 aprE::gfp-ftsZ (spec)</i>	研究室ストック (朝井)
YK011	CRK6000 <i>aprE::gfp-ftsZ (spec)</i>	<i>gfp-ftsZ</i> →CRK6000
YK012	CRK6000 <i>aprE::gfp-ftsZ (cat)</i>	本研究 (2-2-a-5)
YK013	CRK6000 <i>aprE::gfp-ftsZ (cat) lexA::spec</i>	YK002→YK012
YK014	CRK6000 <i>aprE::gfp-ftsZ (cat) yneA-yneB-ynzC::tet</i>	YK003→YK012
YK015	CRK6000 <i>aprE::gfp-ftsZ (cat) lexA::spec yneA-yneB-ynzC::tet</i>	YK013→YK014
YK016	CRK6000 <i>aprE::gfp-ftsZ (spec) amyE::Pspac-yneA</i>	YK005→YK011
YK017	CRK6000 <i>yneA-gfp</i>	本研究 (2-2-a-4)
YK018	CRK6000 <i>yneA-gfp lexA::spec</i>	YK002→YK017
YK019	CRK6000 <i>yneA-gfp yneA-yneB-ynzC::tet</i>	YK003→YK017
YK020	CRK6000 <i>yneA-gfp lexA::spec yneA-yneB-ynzC::tet</i>	YK002→YK019
<i>E. coli</i>		
C600	<i>supE44 hsdR thi-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	研究室ストック
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ 80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1</i>	Takara
<i>S. cerevisiae</i>		
PJ69-4 a	<i>MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ LYS2::GAL1-HIS GAL2-ADE met2::GAL7-lacZ</i>	Clontech
PJ69-4 α	<i>MA α trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ LYS2::GAL1-HIS GAL2-ADE met2::GAL7-lacZ</i>	Clontech

→; 矢印左側に示した枯草菌株のゲノム DNA を用いて、右側の枯草菌株を形質転換した。

表 IV-2 本研究に使用したプラスミド

プラスミド	作製方法とプラスミドの説明	入手先と参考文献
pBR322	大腸菌で複製できる複製起点と、大腸菌での選択マーカーとして用いるア ンピシリン耐性遺伝子 (<i>bla</i>) をコードしているプラスミド	Takara
pCP112	pBR322 由来のプラスミドで、枯草菌での選択マーカーとして (<i>cat</i>) を持つ	研究室ストック
pCP112- <i>gfp</i>	pCP112 に含まれている <i>EcoRI</i> 部位の下流に <i>gfp</i> をコードしている	研究室ストック
pCP112- <i>yneA-gfp</i>	<i>yneA-gfp</i> 融合株の作製に用いたプラスミド	本研究 (IV-2-2a)
酵母 2 ハイブリッド用プラスミド		
pGAD-424	酵母と大腸菌で複製可能な複製起点、また Gal4 活性化ドメインとロイシン合成系 遺伝子、大腸菌での選択マーカーとして <i>bla</i> をコードしているプラスミド	Clontech
pGBT-9	酵母と大腸菌で複製可能な複製起点、また Gal4DNA 結合ドメインとトリプトファ ン合成系遺伝子、大腸菌での選択マーカーとして <i>bla</i> をコードしているプラスミド	Clontech
pGBT-K	pGBT-9 にコードされている <i>bla</i> をカナマイシン耐性遺伝子に置き換えたプラスミド	Yoshimura (2001)
pGBT- <i>yneA</i>	pGBT-9 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>yneA</i> 全長が挿入されているプラスミド	本研究 (表 2-3)
pGBT- <i>yneA'</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に膜貫通領域を除く <i>yneA</i> が挿入されているプラスミド	本研究 (表 2-3)
pGBT- <i>zapA</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>zapA</i> 全長が挿入されているプラスミド	本研究 (表 2-3)
pGBT- <i>ftsZ</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>ftsZ</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>ftsA</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>ftsA</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>ftsW</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>ftsW</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>ftsL</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>ftsL</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>ftsL'</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に膜貫通領域を除く <i>ftsW</i> が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>divIB</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>Sall</i> 間に <i>divIB</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>divIB'</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>Sall</i> 間に膜貫通領域を除く <i>divIB</i> が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>divIC</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>divIC</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>divIC'</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に膜貫通領域を除く <i>divIC</i> が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>pbp2B</i>	pGBT-K の <i>BamHI</i> - <i>Sall</i> 間に <i>pbp2B</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>ezrA</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>ezrA</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>divIVA</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>Sall</i> 間に <i>divIVA</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>minC</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>minC</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGBT- <i>minD</i>	pGBT-K の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>minD</i> 全長が挿入されているプラスミド	Yoshimura <i>et al</i>
pGAD- <i>yneA</i>	pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>yneA</i> 全長が挿入されているプラスミド	本研究 (表 2-3)
pGAD- <i>yneA'</i>	pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に膜貫通領域を除く <i>yneA</i> が挿入されているプラスミド	本研究 (表 2-3)
pGAD- <i>zapA</i>	pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に <i>zapA</i> 全長が挿入されているプラスミド	本研究 (表 2-3)
pGAD- <i>ftsZ</i>	pGBT- <i>ftsZ</i> の <i>ftsZ</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>ftsA</i>	pGBT- <i>ftsA</i> の <i>ftsA</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>ftsW</i>	pGBT- <i>ftsW</i> の <i>ftsW</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>ftsL</i>	pGBT- <i>ftsL</i> の <i>ftsL</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>ftsL'</i>	pGBT- <i>ftsL'</i> の <i>ftsL'</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>divIB</i>	pGBT- <i>divIB</i> の <i>divIB</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>Sall</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>divIB'</i>	pGBT- <i>divIB'</i> の <i>divIB'</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>Sall</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>divIC</i>	pGBT- <i>divIC</i> の <i>divIC</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>divIC'</i>	pGBT- <i>divIC'</i> の <i>divIC'</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>pbp2B</i>	pGBT- <i>pbp2B</i> の <i>pbp2B</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>BamHI</i> - <i>Sall</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>ezrA</i>	pGBT- <i>ezrA</i> の <i>ezrA</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>divIVA</i>	pGBT- <i>divIVA</i> の <i>divIVA</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>Sall</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>minC</i>	pGBT- <i>minC</i> の <i>minC</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究
pGAD- <i>minD</i>	pGBT- <i>minD</i> の <i>minD</i> 断片を切り出し pGAD-424 の <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> 間に挿入したプラスミド	本研究

表 IV-3 本研究に使用したプライマー

プライマー	配列 ^a	枯草菌 168 株の染色体上での位置 ^b
yneA-gfp-F	<u>gaagaattc</u> TCGCACCTCAAAACGTCGAT	1917695...1917714
yneA-gfp-R	<u>gaagaattc</u> TCTTACAGTTGCTAATTCATATGC	1917787...1917806
酵母 2 ハイブリッド用プライマー		
AD-yneA-F	<u>gaagaattc</u> ATGATCATGAGTAAAGAATC	1917615...1917634
AD-yneA-R	<u>ggaggatcc</u> CTATCTTACAGTTGCTAATTCATATGC	1917932...1917958
AD-yneA'-F	<u>gaagaattc</u> GAGCTTAATCAGTATGTAAAATAGA	1917711...1917736
AD-zapA-F	<u>gaagaattc</u> TTGTCTGACGGCAAAAAAAC	2924965...2924946
AD-zapA-R	<u>ggaggatcc</u> ATCCTTTTCTTTAAGCTGAC	2924711...2924602

a 配列中の下線は制限酵素の認識配列を表しており、yneA-gfp-F、yneA-gfp-R、AD-yneA-F、AD-yneA'-F、AD-zapA-F では *EcoRI* を、AD-yneA-R と AD-zapA-R では *BamHI* をそれぞれ示している。

b 数字は SubtiList データベース(<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/index.html>)に登録されている枯草菌 168 株のゲノム配列上での位置を示している。

III-2-2 枯草菌変異株の作製

a. yneA-gfp 融合株

yneA-gfp 融合株の作製には、当研究室で作製されている pBR322 由来のプラスミドである pCP112-*gfp* (クロラムフェニコール耐性遺伝子が挿入されている) を用いた。CRK6000 株のゲノム DNA を鋳型として、yneA-gfpF と yneA-gfpR のプライマーセットを用いた PCR 反応により、プロモーター領域と *yneA* 遺伝子全長を増幅した。得られた PCR 産物の両端を *EcoRI* により切断し、この DNA 断片を pCP112-*gfp* にコードされている *gfp* 遺伝子上流の *EcoRI* 部位に DNA リガーゼにより挿入することで、プラスミド pCP112-*yneA-gfp* を作製した。このプラスミドを相同組み換え (一重交差) により枯草菌 CRK6000 株に導入し、*yneA-gfp* 融合株を作製した。形質転換体はクロラムフェニコール耐性により選択した。

b. gfp-ftsZ 融合株

当研究室の朝井により作製された *gfp-ftsZ* 融合株は枯草菌染色体上の *aprE* 領域に *ftsAZ* オペロンのプロモーター、SD 配列と *gfp-ftsZ* 融合遺伝子が挿入されている。また、*gfp-ftsZ* 融合株では本来の位置の *ftsZ* 遺伝子も残されている。この *gfp-ftsZ* 融合株は形質転換体の選択マーカーとして用いたスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spec*) が *amyE* 部位に導入されているが、それをクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) に置き換えた *gfp-ftsZ* 融合株を必要に応じて用いた。

IV-2-3 使用した培地

III-2-3 と同様に行った。

IV-2-4 大腸菌の形質転換とプラスミド DNA の調製

III-2-4 と同様に行った。

IV-2-5 塩基配列の決定

II-2-4 と同様に行った。

IV-2-6 枯草菌の形質転換

III-2-6 と同様に行った。

IV-2-7 酵母の形質転換

酵母の形質転換は Clontech の Yeast Protocols Handbook に従い行った。

IV-2-8 蛍光顕微鏡による変異株の細胞形態および核様体の観察

III-2-8 と同様に行った。

IV-2-9 膜蛋白質画分の調製

対数増殖期の培養液 50 ml から菌体を集め、4 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁した。以後すべての操作は氷上で行った。この細胞を超音波破碎機により破碎し、遠心 (6000 rpm, 10 min, 4°C) を行い、その上清を細胞抽出液とした。この細胞抽出液をさらに超遠心 (40,000 rpm, 30 min, 4°C) し、上澄み溶液 (可溶性画分) と沈澱物 (不溶性画分) に分画した。この可溶性画分を細胞質蛋白質画分、また不溶性画分を膜蛋白質画分とした。

IV-2-10 ウエスタンブロッティング

a. 使用した抗体

PET System (Novagen) により精製した FtsZ-His6 蛋白質を用いた FtsZ 抗体 (ウサギポリクローナル抗体) の作製は Takara に依頼した。

YneA ペプチド抗体の作製は Sigma Genosys に依頼した。抗原として YneA の C 末端領域に相当する 93~105 番目のアミノ酸領域 (KKHQDAYE LATVR) を用いた。得られたウサギ血清は、KLH カラム吸収後、非吸着画分を YneA ペプチド固相カラムを用いて精製した。

b. 試料の調製

対数増殖期の培養液 1 ml から菌体を集め、1 mg/ml のリゾチームを含む 10% sucrose, 50 mM Tris-HCl 溶液 48 μ l に懸濁し、37 $^{\circ}$ C で 5 分間処理した。その後、50 μ l の 2 x sample buffer (5% glycerol, 2% SDS, 0.01% BPB, 2 mM DTT) を加えて沸騰水浴中で 5 分間処理し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料とした。

c. ウェスタンブロッティング

調製した試料中の蛋白質を 10-20% の SDS-ポリアクリルアミドグラディエントゲルを用いて電気泳動し、分離した。Coomassie Brilliant Blue (G250) を用いて蛋白質を染色し、泳動した蛋白質の量を確認した。分離した蛋白質を PVDF 膜 HybondTMP (Amersham Pharmacia Biotech) にブロットし、ブロッキング溶液 (5% スキムミルク、30 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl) で処理した。その後、一次抗体、続いて二次抗体と反応させた。一次抗体は、枯草菌 FtsZ に対するウサギ抗体、あるいは YneA に対するウサギ抗体を使用し、二次抗体には HRP 標識抗ウサギ IgG-ヤギ抗体 (Bio-Rad) を用いた。また、シグナルの検出には ECL+Plus (Amersham Pharmacia Biotech) を使用した。

IV-2-11 免疫蛍光顕微鏡観察

a. 試料の調製

枯草菌株を PAB 培地、37 $^{\circ}$ C で培養した後、対数増殖期の培養液 1 ml を集菌し、PBS で洗浄した後、100 μ l の GTE (50 mM Glucose, 20 mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8.0) に懸濁した。この懸濁液に冷メタノール (DAPI 染色のための試料については 70% エタノールを用いた) を 1 ml 加え攪拌した後、-20 $^{\circ}$ C で 3 時間 (4 $^{\circ}$ C で一晩) 放置し、細胞を固定した。固定後、集菌し、PBS で洗浄した後、ポリ-L-リジンでコートしたスライドガラスに塗布し、一晩乾燥させた。1 mg/ml のリゾチームを含む GTE 溶液をスライドガラス上の細胞に重層し、室温で 20 秒間処理した。その後、アスピレーターで吸引しながら PBS を洗浄した。

b. 抗体反応

リゾチーム処理を行った細胞に、5% BSA を含む PBS (BSA-PBS) を重層し、室温で 1 時間放置した。PBS で洗浄した後、10,000 倍に希釈した FtsZ 抗体 (ウサギ血清) あるいは 3,000 倍に希釈した YneA 抗体 (ウサギ血清) を含む BSA-PBS を細胞に重層し、室温で 4 時間放置した。次に、PBS で洗浄後、3,000 倍に希釈した Cy2 (Amersham Pharmacia) で標識された抗ウサギ抗体を含む BSA-PBS を細胞に重層し、室温で 1 時間放置した (暗所)。その後、抗体を PBS で洗浄し、室温で乾燥させた。

c. 蛍光顕微鏡による観察

調製した細胞に、滅菌水を 2 μ l 重層し、カバーガラスを被せ、蛍光顕微鏡 (DMRE-HC; Leica) を用いて目的蛋白質の局在を観察した。コンピューターへの画像の取込みは CCD カメラ (1300Y; Roper Scientific) を使用し、画像処理は METAMORPH (Universal Imaging) を用いた。

IV-2-12 蛍光顕微鏡による GFP 融合蛋白質の局在観察

枯草菌株を PAB 培地、30℃ で培養し、対数増殖期の細胞 2 μ l をアガロースコートしたスライドガラスに塗布し、観察した。用いた顕微鏡等は IV-2-10-c と同様である。

IV-3 結果

IV-3-1 YneA の発現が及ぼす Z-ring 形成への影響

FtsZ は細胞分裂過程の最も初期に細胞の中央部に特異的に局在化し、チューブリンと同様な GTP 加水分解能に依存した自己重合を行うことで、細胞分裂面に FtsZ 収縮環 (Z-ring) を形成する (Harry, 2001)。大腸菌 SulA による細胞分裂の抑制はこの Z-ring 形成を阻害するためであり、FtsZ 抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡法による解析により、SulA の発現に伴い Z-ring が完全に消失することが報告されている (Mukherjee *et al.*, 1998)。枯草菌の細胞分裂阻害因子である YneA も SulA と同様に Z-ring 形成を抑制している可能性が考えられ、YneA の発現が及ぼす Z-ring 形成への影響を、a) FtsZ 抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡法と b) GFP-FtsZ 融合蛋白質を用いて解析した。

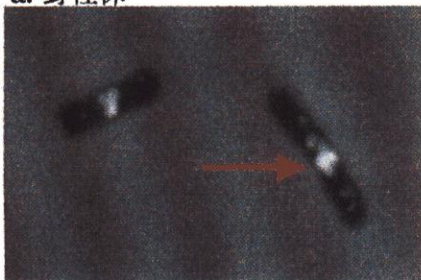
a. 免疫蛍光顕微鏡法による FtsZ の局在性の解析

PAB 培地、37°C で培養した、対数増殖期の *lexA* 破壊株と *yneA* 発現制御株の細胞をメタノールで固定した後、免疫蛍光顕微鏡法による解析を行った。*yneA* 発現制御株では、YneA を人為的に発現させるため培地中に 0.5 mM の IPTG を加えて培養した。図 IV-2-A-a に示したように、野生株では細胞の中央で特異的に Z-ring が観察される。一方、*lexA* 破壊株では野生株と比較して Z-ring 形成頻度に減少が見られた (図 IV-2-A-b)。*lexA* 破壊株で Z-ring の減少が見られた原因として、*lexA* 破壊株では FtsZ 蛋白質量が減少している可能性が考えられたので、FtsZ 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。その結果、*lexA* 破壊株と野生株で FtsZ 蛋白質量には差がないことがわかり、*lexA* 破壊株で見られた Z-ring の減少が FtsZ 蛋白質量の変化によるものではないことが示された (図 IV-2-B)。また、*lexA* 破壊株での Z-ring 形成の異常は *yneA* オペロンの欠失により抑制され、野生株と同様に細胞中央で特異的に Z-ring が観察された (図 IV-2-A-c)。さらに、IPTG の添加による野生株での人為的な YneA の供給でも、*lexA* 破壊株と同様に Z-ring の形成が抑制された (図 IV-2-A-d)。

このように、FtsZ の蛋白質量には変化が見られないにもかかわらず、YneA の発現に依存して、Z-ring 形成頻度の減少が観察されたことから、大腸菌 SulA と同様に YneA も FtsZ に作用している可能性が考えられた。一方で、大腸菌 SulA について報告されているような Z-ring 形成の完全な抑制は見られず、YneA は Z-ring の安定性に影響を与えていることも考えられる。

A

a. 野性株



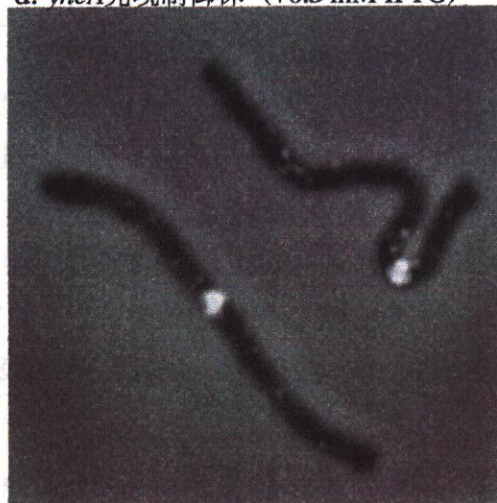
c. *lexA-yneA* オペロン二重破壊株



b. *lexA* 破壊株



d. *yneA* 発現制御株 (+0.5 mM IPTG)



B



図IV-2 免疫蛍光顕微鏡法によるFtsZの局在観察

A PAB培地、37℃で培養した対数増殖期の細胞でFtsZの局在を免疫顕微鏡法により観察した。赤矢印はZ-ringを示している。

B FtsZ抗体を用いたウエスタンブロッティング lane1; 野性株、lane2; *lexA*破壊株

b. GFP-FtsZ 融合蛋白質による解析

当研究室で、*ftsZ* のプロモーターと融合した *gfp-ftsZ* を枯草菌染色体上の *aprE* 領域に組み込んだ、*gfp-ftsZ* 融合株が作製されている。そこで、*gfp-ftsZ* 融合株に、*lexA* 破壊株、*yneA* 発現制御株、*lexA-yneA* 二重変異株のゲノム DNA を導入し、YneA の発現による Z-ring 形成に対する影響を、GFP 融合蛋白質によっても解析した。PAB 培地、30℃で培養した対数増殖期の細胞を蛍光顕微鏡により観察しところ、図 IV-3-a に示したように野生株では細胞の中央で Z-ring が観察された。次に、*lexA* 破壊株の Z-ring の局在を観察したところ、予想に反して Z-ring の形成に影響はほとんど見られず、野生株と同様な局在性を示した (図 IV-3-b)。そこで、細胞長を計測したところ、平均細胞長が野生株では 4.2μm であり、*lexA* 破壊株では 9μm と 2 倍以上の伸長が起こっているのに対して、GFP-FtsZ を持つ *lexA* 破壊株では 6.3μm と細胞の伸長も抑制されていた。この現象については考察で議論するが、*gfp-ftsZ* 融合株では本来の *ftsZ* 遺伝子も機能しており、GFP-FtsZ 融合蛋白質の発現の結果、FtsZ 蛋白質量が増加したためと考えられる。また、*lexA-yneA* 二重破壊株では、細胞中央で特異的な Z-ring が観察された (図 IV-3-c)。一方、*yneA* 発現制御株では IPTG を含まない培地では、野生株と同様な Z-ring が観察されたのに対して、1 mM IPTG 存在下で培養すると、免疫蛍光顕微鏡法による解析結果と一致して、Z-ring の形成頻度に減少が見られた (図 IV-3-d)。

lexA 破壊株では GFP-FtsZ が供給されることで、Z-ring の形成異常が抑制され野生株と同様な Z-ring の局在が観察されたが、野生株で人為的に YneA を供給した時には免疫蛍光顕微鏡法による結果と一致して Z-ring の形成頻度に減少が見られた。従って、GFP-FtsZ 融合蛋白質による解析からも、YneA の発現は Z-ring の形成、あるいは安定性に影響を与えているという結論が支持された。

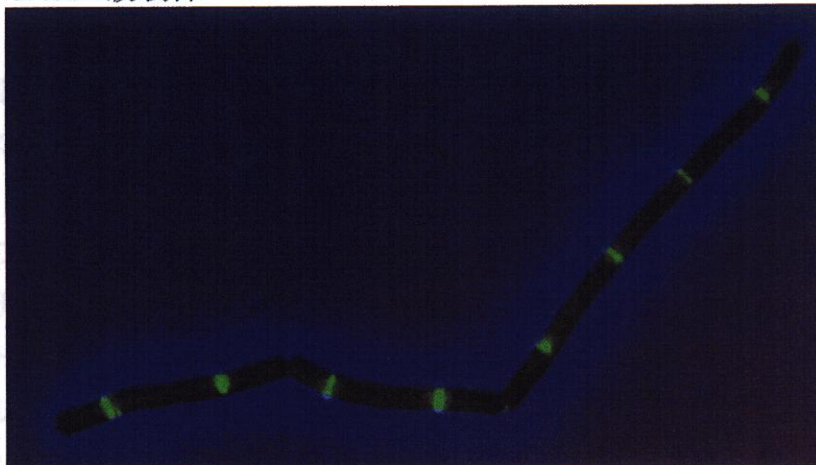
IV-3-2 酵母 2 ハイブリッド法による YneA と相互作用する蛋白質の探索

YneA の発現により Z-ring の形成頻度に減少が見られたことから、YneA は FtsZ と相互作用し、細胞分裂を抑制している可能性が考えられた。また、大腸菌 SulA では酵母 2 ハイブリッド法によっても、FtsZ との相互作用が確認されている (Bi and Lutkenhaus, 1993; Trusca *et al.*, 1998)。そこで、YneA と FtsZ の相互作用の有無を酵母 2 ハイブリッド法により解析した。また、YneA が他の細胞分裂蛋白質 (Z-ring 形成後、分裂面に局在する蛋白質 ; FtsA, FtsL, FtsW, DivIB, DivIC, PbpB, EzrA, ZapA、および Z-ring の局在性に影響を及ぼす蛋白質 ; DivIVA, MinC, MinD) と相互作用することで、Z-ring の安定性や局在性に影響している可能性も考えられたため、同時にこれらの蛋白質と YneA の相互作用も解析した。

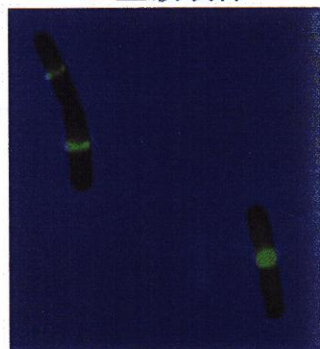
a. 野生株



b. *lexA*破壊株



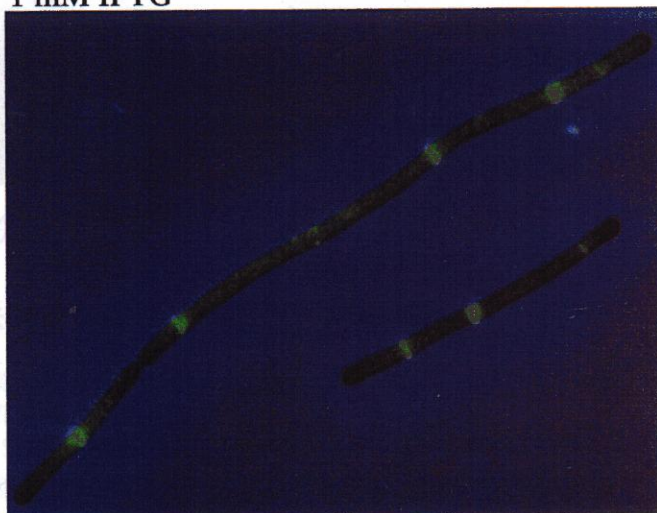
c. *lexA-yneA*オペロン
二重破壊株



d. *yneA*発現制御株
No IPTG



1 mM IPTG



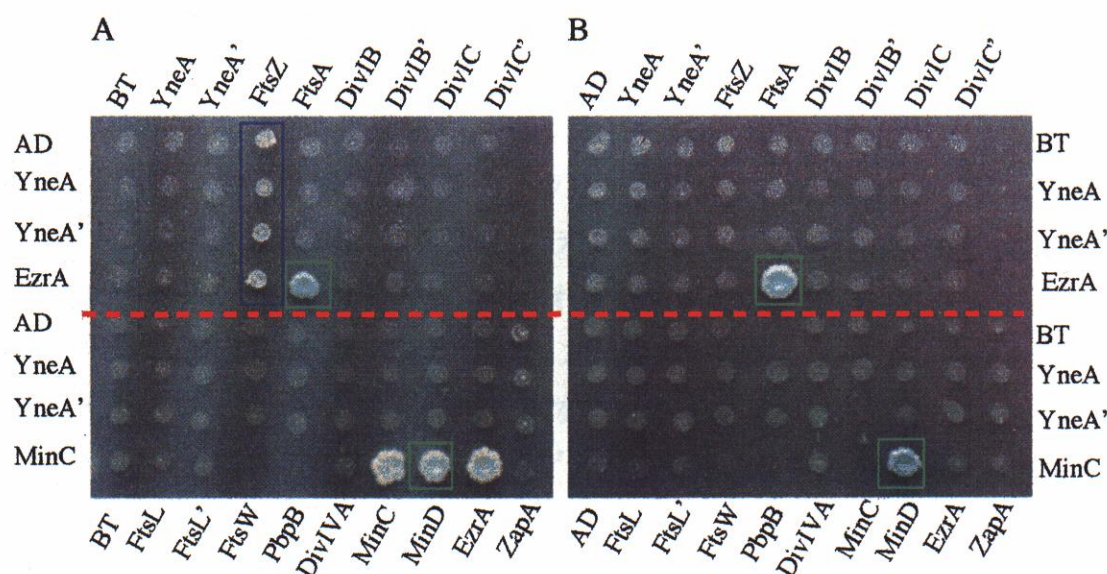
	平均細胞長 (μm)
野生株	4.0 ± 0.9
<i>lexA</i> 破壊株	9.3 ± 4.7
<i>gfp-ftsZ</i> , 野生株	4.2 ± 1.0
<i>gfp-ftsZ</i> , <i>lexA</i> 破壊株	6.0 ± 1.7

図IV-3 GFP-FtsZ融合蛋白質の局在観察

PAB培地、30℃で培養した対数増殖期の細胞からFtsZ-GFPの局在を観察した。
また、各枯草菌株の平均細胞長を表に示した。

まず、各蛋白質をコードしている遺伝子を pGAD424 (Gal4 転写活性化ドメインと選択マーカーとしてロイシン合成系の遺伝子を持つ) および pGBT9 (Gal4 DNA 結合ドメインと選択マーカーとしてトリプトファン合成系の遺伝子を持つ) にクローニングした。次に作成した pGAD424 由来のプラスミドを酵母 PJ69-4a 株 (a type) に、pGBT9 由来のプラスミドを酵母 PJ69-4 α 株 (α type) にそれぞれ形質転換した。得られた酵母株を用い、*yneA* 遺伝子を含む株と細胞分裂遺伝子を含む株の接合 (Mating) を行い、トリプトファンとロイシンを含まない SD 寒天培地で、形質転換体を選択した。得られた形質転換体を、1 mM の 3AT (ヒスチジンの競合阻害剤) と X- α -gal を加えたトリプトファン、ロイシン、ヒスチジンを含まない SD 寒天培地で培養し、その増殖能 (His レポーターの発現) と X- α -gal の分解による青色の呈色 (LacZ レポーターの発現) を指標に蛋白質間の相互作用を評価した。また、コントロールとして、酵母 2 ハイブリッド法による相互作用の検出が報告されている MinC-MinD と FtsA-EzrA も実験に加えた (Marston *et al.*, 1998; Yoshimura, unpublish) (図 IV-4)。

-Trp, -Leu, -His, +1 mM 3AT, +X- α -gal



図IV-4 酵母2ハイブリッド法による蛋白質間相互作用の解析

A AD-YneAと各BT-細胞分裂蛋白質の相互作用

B BT-YneAと各AD-細胞分裂蛋白質の相互作用

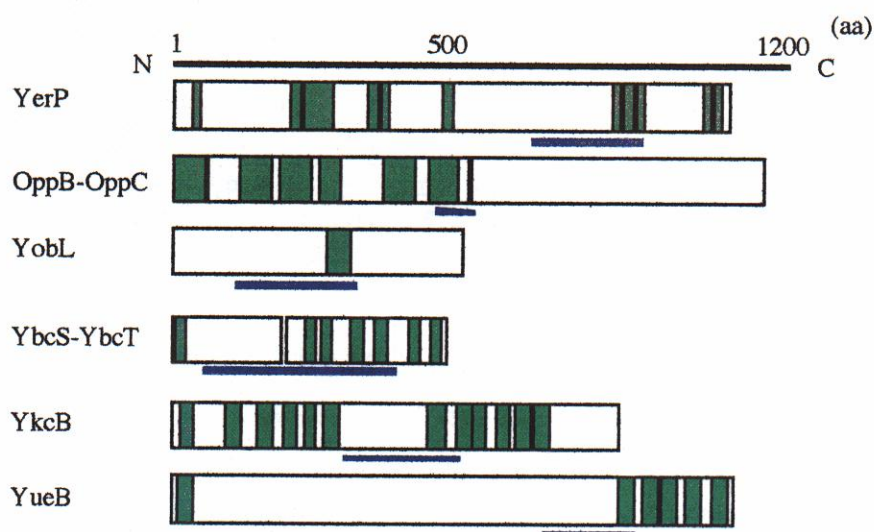
写真は各組み合わせの形質転換体をSD寒天培地 (上; -Trp, -Leu, -His, +1 mM 3AT, +X- α -gal、下; -Trp, -Leu)、30℃で10日間培養したコロニーを示している。ADはGal4転写活性化ドメイン、BTはDNA結合を表している。緑枠はすでに相互作用が検出されている蛋白質であり、コントロールとして用いた。また、YneA', DivIB', DivIC', FtsL'は膜貫通領域を除いた蛋白質である。

培養を開始して 10 日後のプレートを観察したところ、まず、MinC-MinD と FtsA-EzrA では、融合する Gal4 ドメインの組み合わせに関わらず、確かにコロニーが形成され、青く呈色していた (図 IV-4-A, B 赤枠)。また、DNA 結合ドメインと融合させた FtsZ では、転写活性化ドメインと融合させた YneA および YneA' (N 末端側の膜貫通ドメインと予想される領域を除いた蛋白質) との組み合わせで小さいコロニーが形成されたが、コントロールとして用いたインサートを含まないプラスミドとの組み合わせでも同様なコロニーが形成された (図 IV-4-A, B 青枠)。さらに、より選択性の強いトリプトファン、ロイシン、ヒスチジン、アデニンを含まない SD 寒天培地ではコロニーが形成されなかったことから、これはバックグラウンドであると判断した。また、他の蛋白質においても、YneA あるいは YneA' との相互作用は検出されなかった (図 IV-4-A, B)。このように、酵母 2 ハイブリッド法による解析では、YneA はこれまでに報告されている全ての細胞分裂蛋白質との相互作用は検出されなかった。

YneA と既知の細胞分裂蛋白質の相互作用は確認されなかったが、やはり相互作用する蛋白質の同定が、YneA の機能理解への重要な鍵となる。まだ知られていない未知の細胞分裂に関わる蛋白質と相互作用する可能性も十分に考えられたので、枯草菌ゲノム DNA をランダムに切断し、その断片を Gal4 転写活性化ドメインと融合させることで作製した枯草菌ゲノムライブラリーを用いて、酵母 2 ハイブリッド法によるスクリーニングも試みた。このライブラリーを酵母 PJ69-4a 株に、また pGBT-YneA を酵母 PJ69-4 α 株にそれぞれ導入し、得られた形質転換体を接合させた。その後、X- α -gal を加えた、トリプトファン、ロイシン、ヒスチジン、アデニンを含まない SD 寒天培地で培養し、YneA と相互作用を示すコロニーを選択した。その結果、得られた 48 個のコロニーに含まれていた枯草菌ゲノムの断片の塩基配列を決定したところ、9 種類の遺伝子を同定することができた (図 IV-5-A)。しかしながら、各遺伝子破壊株の細胞形態を顕微鏡により観察したが、全て野生株と同様な細胞長を示し、これらの遺伝子の細胞分裂への関与は否定的であると思われた。

このように、細胞分裂に関与する蛋白質との相互作用解析および枯草菌ゲノムライブラリーを用いたスクリーニングからは、YneA による Z-ring 形成の抑制を説明できる因子を見い出すことはできなかった。なお、YneA は N 末端側に膜貫通ドメインと推定される領域を持つことから、膜蛋白質であることが予想される。ゲノムライブラリーのスクリーニングで同定された DNA 断片のほとんどが、膜貫通ドメインをコードしている部分であり (図 IV-5-B)、YneA はこのような疎水性の領域に結合する傾向が見られた。

遺伝子	予想される機能
<i>yerP</i>	similar to acriflavin resistance protein
<i>oppB</i>	oligopeptide ABC transporter (permease)
<i>yobL</i>	unknown
<i>ybcS</i>	unknown
<i>yccH</i>	similar to two-component response regulator
<i>nasB</i>	assimilatory nitrate reductase (electron transfer subunit)
<i>yflS</i>	similar to 2-oxoglutarate/malate translocator
<i>ykcB</i>	unknown
<i>yueB</i>	phage infection protein homolog



図IV-5 枯草菌ゲノムライブラリーを用いたスクリーニング

上 YneAとの相互作用が認められた遺伝子とその機能

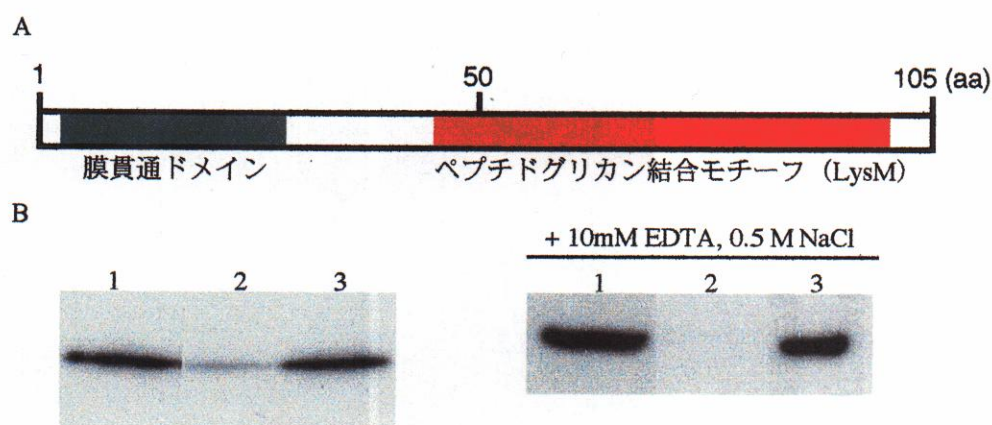
下 相互作用を示した各遺伝子のアミノ酸構造

緑枠は疎水性の領域を表しており、膜貫通ドメインと予想される。
また、青線はYneAとの相互作用が認められた位置を示している。

IV-3-3 YneA 蛋白質の細胞内分布

YneA は 105 アミノ酸から構成される約 12 kDa の蛋白質であり、その特徴としては、N 末端側に膜貫通ドメインと予想される領域を持ち、また中央から C 末端側にかけては、細胞壁分解酵素で確認されるペプチドグリカンとの結合に関与すると考えられている LysM モチーフを持つ (図 IV-6-A)。これらのことから YneA は細胞膜あるいは細胞壁に存在していることが予想された。そこで、YneA ペプチド抗体 (Sigma Genosis) を用い、YneA 蛋白質の細胞内分布を解析した。

PAB 培地、37℃で培養した対数増殖期の *lexA* 破壊株を集菌し、超音波破砕により細胞抽出液を調製した。この抽出液から細胞質画分および膜画分を調整し、ウエスタンブロッティングによる解析を行った結果、予想した通り YneA は膜画分で検出された (図 IV-6-B 左, lane 3)。また、細胞膜との結合の強さを確認するため、



図IV-6 YneAの細胞内分布

A YneAのアミノ酸構造を示した。

B YneAペプチド抗体を用いた、ウエスタンブロッティングを行った。

右はTris-HCl溶液中に10 mM EDTA, 0.5 M NaClを加えて調製した。

lane 1, 細胞抽出液、lane 2, 細胞質画分、lane 3, 膜画分

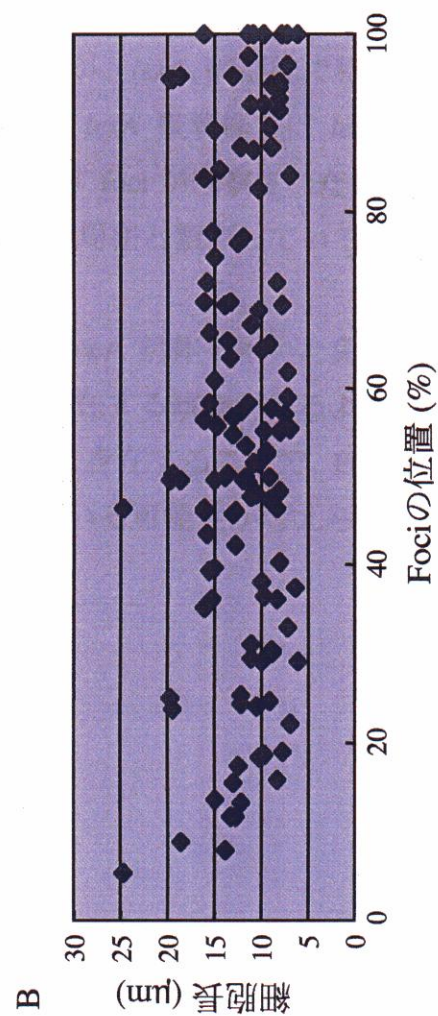
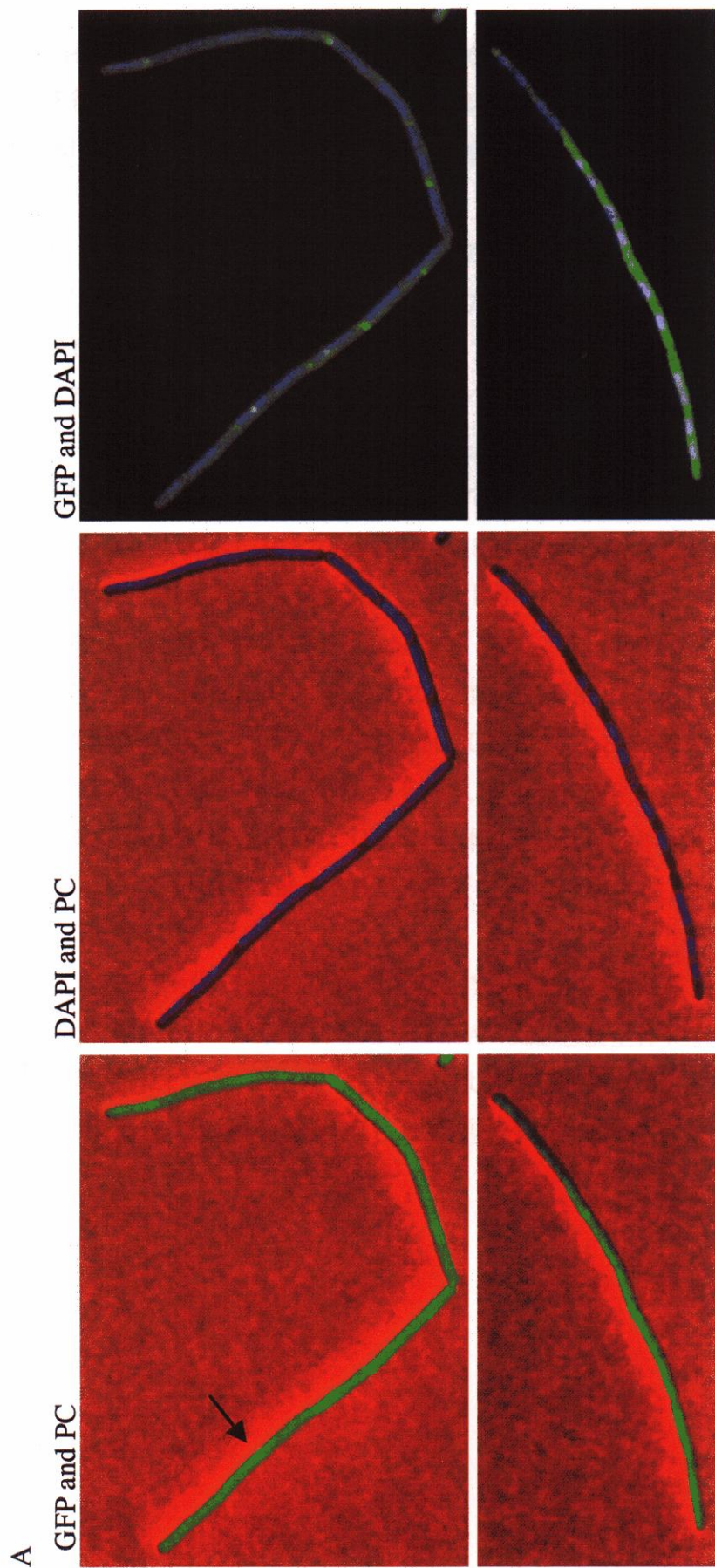
10 mM EDTA と 0.5 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 溶液中で調製した細胞抽出液を用いて、同様な解析を行った。その結果、この条件でも YneA は膜画分で検出されたので (図 IV-6-B 右, lane 3)、YneA は細胞膜に強く結合し、細胞膜に挿入されていることが示唆された。また、細胞表層に YneA が存在している可能性も考えられたので、細胞を 4% SDS を含む溶液中で 10 分間煮沸し、遠心することで得られた上澄み液を用いて、ウエスタンブロッティングを行ったが、YneA は検出されなかった。

IV-3-4 YneA 蛋白質の局在観察

YneA が膜蛋白質であることが示唆されたので、次に細胞膜全体に存在するのか、あるいは分裂面など特徴的な位置に局在するのかを、a) YneA-GFP 融合蛋白質、b) YneA 抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡法により解析した。

a. YneA-GFP 融合蛋白質の局在解析

yneA の C 末端側に *gfp* 遺伝子を融合させた *yneA-gfp* 融合株を作製し、この *gfp* 融合株に *lexA* 破壊株のゲノム DNA を形質転換することで得られた枯草菌株を、PAB 培地、30℃で培養し、対数増殖期の細胞を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、コントロールとして用いた *yneA-gfp* 融合遺伝子を持たない *lexA* 破壊株では蛍光が見られなかったのに対して、YneA-GFP が発現している *lexA* 破壊株では、細胞全体にわたって蛍光が見られ (YneA が膜蛋白質であることから細胞膜上の蛍光であると思われる)、また、多くの細胞で強い蛍光を示す foci が観察された (図 IV-7-A)。この foci は YneA-GFP の局在を示していると考えられたので、その細胞内位置を 100 個の細



図IV-7 YneA-GFP融合蛋白質の局在

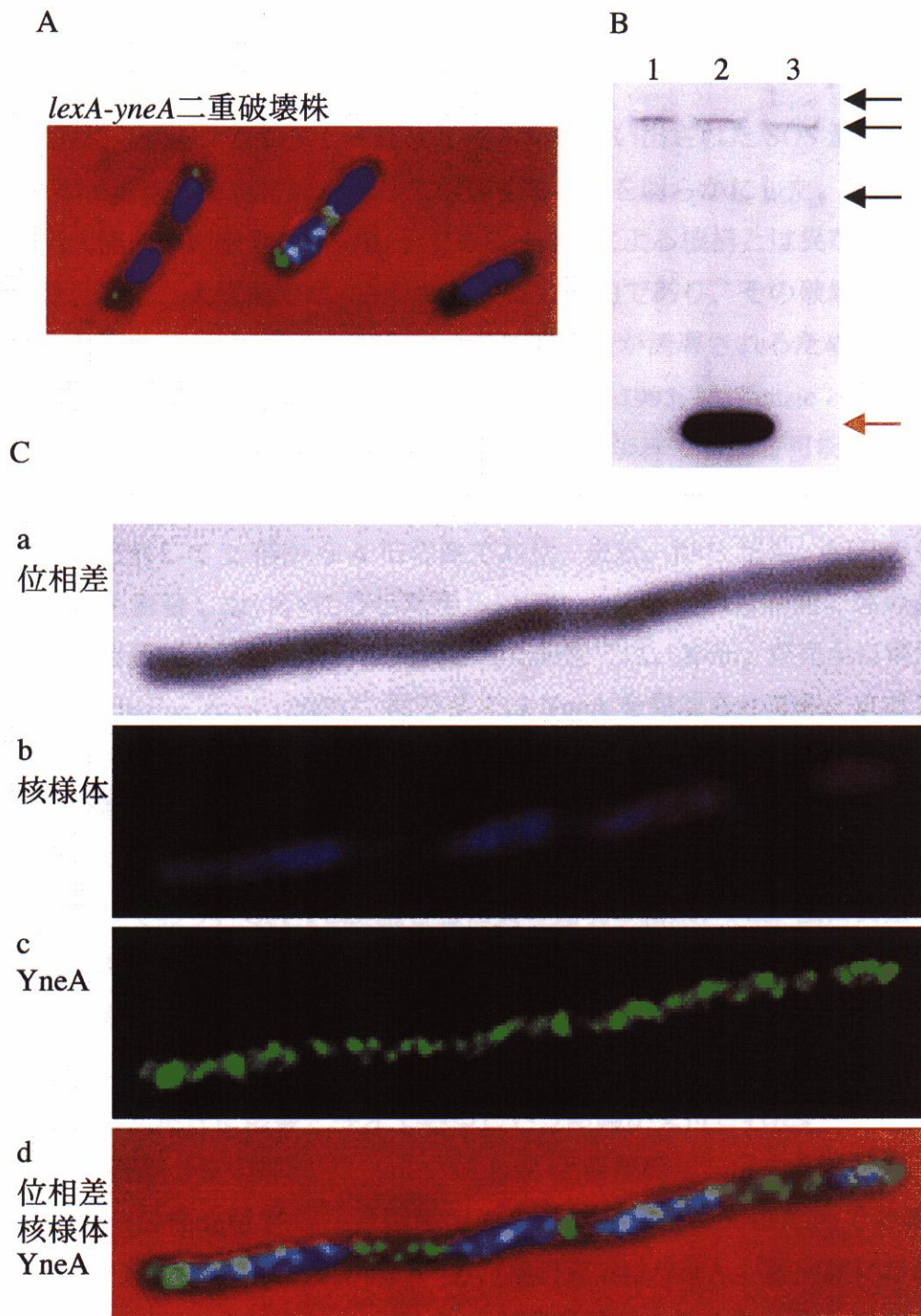
A PAB培地、30℃で培養した対数増殖期の*lexA*破壊株におけるYneA-GFPを顕微鏡を用いて観察した。
 B 図中Aの矢印で示したような強い蛍光を持つfociの細胞内位置を表している。横軸の0%が一方の端に、100%は他方の端に相当する。

胞から詳しく調べると、やはり細胞全体で局在化が認められたが、細胞中央および両極付近において局在化する傾向が見られた (図 IV-7-B)。また、同時に DAPI 染色を行い、核様体との位置関係についても解析したところ、YneA-GFP の foci は核様体間あるいは核様体の端で多く観察された。

b. 免疫蛍光顕微鏡法による YneA の局在解析

次に YneA ペプチド抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡法による解析を行った。37℃、PAB 培地で $OD_{600}=0.3$ まで培養し、70%エタノールで固定した細胞を用いて観察した。まず、*lexA-yneA* 二重破壊株をコントロールとして観察したところ、いくつかの細胞で、細胞中央および両極付近に foci が見られた (図 IV-8-A)。これは、YneA 抗体と非特異的に反応する蛋白質の蛍光であると考えられたので、ウエスタンブロッティングにより確認したところ、図 IV-8-B に示したように *lexA* 破壊株で YneA と考えられる分子量約 12kDa の顕著なバンドが検出されたのに加えて、分子量 50kDa 付近に複数のバンドが検出され (lane 2)、また、このバンドは *lexA-yneA* 二重破壊株でも検出された (lane 3)。そのため、本研究で使用している YneA ペプチド抗体は免疫蛍光顕微鏡法による解析には適していないことも考えられたが、*lexA* 破壊株で特徴的な蛍光が観察される可能性を考え解析を進めた。その結果、*lexA* 破壊株では *lexA-yneA* 二重破壊株とは異なり細胞全体にわたって強い蛍光を示す foci が観察された (図 IV-8-c)。これは、YneA-GFP 融合蛋白質で観察された YneA の局在と類似しているように思われる。

YneA が膜蛋白質であることと、YneA-GFP 融合蛋白質と YneA 抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡法による解析から、YneA は細胞膜全体に渡って存在する傾向があるように思われた。このことから、YneA は分裂部位も含めた細胞膜に存在することで、FtsZ の分裂部位での重合を阻害し、細胞分裂の抑制をもたらしている可能性が考えられた。



図IV-8 免疫蛍光顕微鏡法によるYneAの局在

A *lexA-yneA*二重破壊株での免疫蛍光顕微鏡解析

B YneA抗体を用いたウエスタンブロッティング

赤矢印はYneAを、黒矢印は非特異的に検出されたとと思われるバンドの位置を示している。lane 1, 野生株、lane 2, *lexA*破壊株、lane 3, *lexA-yneA*二重破壊株

C PAB培地、37℃で培養した対数増殖期の*lexA*破壊株での解析

dは位相差、核様体、YneAのfociを全て重ねあわせた像

IV-4 考察

本研究では、DNA マクロアレイによる解析から見い出された SOS 遺伝子の 1 つである *yneA* が、細胞分裂阻害因子として機能することを明らかにした。しかしながら、その機構は大腸菌の細胞分裂阻害因子である SulA による機構とは異なっているように思われた。まず、大腸菌では *lexA* の欠失は致命的であり、その破壊株を作成することはできない。これは *sulA* の発現により細胞伸長が誘導されるためであり、*lexA-sulA* 二重変異株では生育可能となる (Friedberg *et al.*, 1995; McKenzie *et al.*, 2000)。一方、本研究で示したように枯草菌では *lexA* 単独の破壊株でも生育可能であり、YneA が発現しても細胞分裂は完全に停止することはない。枯草菌 *lexA* 破壊株での細胞伸長は、野生株に対して 2 倍から 4 倍程度であり、また、PAB 培地、37°C の条件下では生育速度にも影響しない。こうした現象は、Z-ring 形成の抑制能の違いとも一致しており、大腸菌 SulA を強制的に発現させた細胞では、Z-ring が完全に消失するのに対して (Mukherjee *et al.*, 2000)、枯草菌では YneA を発現させても、まだ Z-ring は部分的に形成される。

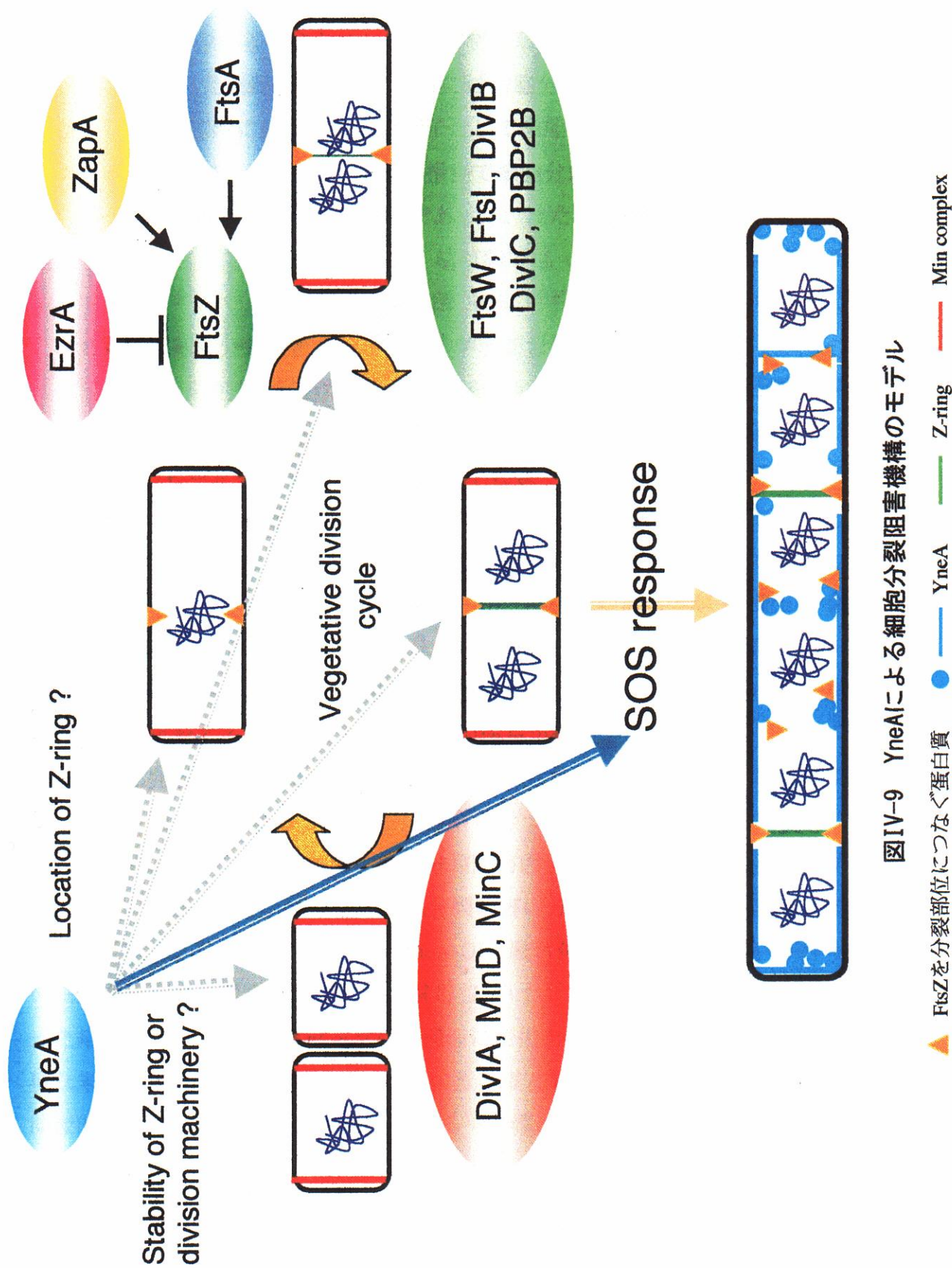
免疫蛍光顕微鏡解析で見られた *lexA* 破壊株での Z-ring 形成頻度の減少が、GFP-FtsZ 融合蛋白質を持つ *lexA* 破壊株では抑制されたが、これは *gfp-ftsZ* 融合株では本来の *ftsZ* 遺伝子も機能しており、GFP-FtsZ 融合蛋白質の発現の結果、FtsZ 蛋白質量が増加しているためであると思われる。今後 FtsZ を人為的に発現制御できる株を用い証明する必要はあるが、野生株で人為的に YneA を供給した時には免疫蛍光顕微鏡法による結果と一致して Z-ring の形成頻度に減少が見られており、YneA の発現は Z-ring の形成、あるいは安定性に影響を与えているという結論が支持された。

SulA による細胞分裂の抑制は、SulA が FtsZ と直接相互作用することで、FtsZ の持つ GTPase の活性を阻害し、分裂面での自己重合化を抑えるためである (Bi and Lutkenhaus, 1993; Trusca *et al.*, 1998)。一方、本研究では YneA が細胞膜に特異的に存在していることが明らかになった。FtsZ は膜貫通領域を持たないことを考えると、YneA が細胞質蛋白質である SulA と同様な機構で細胞分裂を抑制しているとは考えにくい。実際、酵母 2 ハイブリッド法による解析で SulA と FtsZ の相互作用が確認されているのに対して (Bi and Lutkenhaus, 1993; Trusca *et al.*, 1998)、YneA と FtsZ の間では認められなかった。今後、免疫沈降法などにより枯草菌内で YneA と FtsZ の相互作用の有無や YneA による FtsZ の GTPase 活性への影響を検討する必要はあるが、YneA による細胞分裂の抑制は、SulA とは異なるように思われる。また、他の細胞分裂蛋白質との相互作用を介した Z-ring の安定性に影響を与えている可能性も、

酵母2ハイブリッド法で相互作用が確認されなかったため現在のところ考えにくい。そこで、YneA が膜蛋白質であることから、分裂部位への関与について検討した。

現在までに、細胞中央での分裂部位を決定するための機構として Min システムと Nucleoid occlusion (核様体による Z-ring 形成の阻害)が提唱されている(Woldringh *et al.*, 1991; Margolin, 2000; Regamey *et al.*, 2000; Harry, 2001; Migocki *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2002)。しかし、これらの機構は細胞の両極での分裂を抑制するものであり、細胞中央での正確な Z-ring 形成を説明することはできず、Z-ring を細胞中央の分裂部位へと局在化させる蛋白質あるいは構造が存在していると考えられる。YneA がこうした蛋白質や構造に作用して Z-ring の形成を抑制している可能性は十分にある。YneA は膜蛋白質であり、細胞全体に渡って分布する。さらに、特定の蛋白質との相互作用が見られない。一方で、膜貫通ドメインをコードしている領域との親和性が高いことから考えると、YneA は分裂部位を含む膜構造に変化を与えることで、FtsZ の局在化に必要な未知の蛋白質に影響を及ぼし、この蛋白質と FtsZ との相互作用を弱めることで、間接的に Z-ring の重合化を抑制している可能性が考えられる。これは、YneA の発現で、Z-ring が局在する位置には特に影響は見られず、Z-ring の形成頻度にのみ減少が見られた結果と一致するものである(図 IV-2、IV-3)。

これらのことから予想された、YneA による細胞分裂阻害機構のモデルを図 IV-9 に示した。通常、FtsZ は細胞膜上の分裂部位に局在し、GTPase 活性に依存した自己重合を繰り返すことで Z-ring を形成し、細胞分裂を誘導している。しかしながら、DNA に損傷が起こると SOS 応答が誘導され、*yneA* の発現も誘導される。この YneA は細胞全体に渡って細胞膜上に存在することで、分裂部位を含む膜構造に変化を与える。その結果、FtsZ と FtsZ を分裂部位へとつなぐ蛋白質との相互作用が弱まり、FtsZ の Z-ring への重合は阻害され、細胞分裂も抑制される。



図IV-9 YneAによる細胞分裂阻害機構のモデル

V 本研究のまとめと今後の課題

多くの真正細菌に保存されている SOS 制御系は、DNA 損傷により誘導され、DNA 修復能の増加、突然変異の誘発、さらには細胞分裂の抑制をもたらす。大腸菌では *SulA* が SOS 応答時に細胞分裂阻害因子として機能する。枯草菌においてもこの SOS 制御系の存在は知られており、DNA 損傷で細胞分裂の抑制が観察される。しかしながら、その分子機構はこれまで不明であった。また、大腸菌では 30 種類以上の SOS 遺伝子が報告されているのに対して、枯草菌では 6 遺伝子が報告されているにとどまっていた。そこで、本研究では枯草菌 SOS レギュロンの全体像を明らかにすると、さらには細胞分裂阻害の分子機構の解明を目的に研究を行った。

まず、*lexA* 破壊株を用いたアレイ解析を行い、*lexA* の欠失により発現誘導される遺伝子を網羅的に解析した。また、*lexA* 破壊株で発現上昇を示した遺伝子について LexA-box の有無を確認することで、LexA により直接制御されると予想される遺伝子を検索した。その結果、これまでに報告されている SOS 遺伝子を加えると、枯草菌 SOS レギュロンは 46 遺伝子からなることが予想された。これらの中には、細胞分裂に関与しているものは含まれていないが、機能未知遺伝子が 15 遺伝子含まれていた。我々はその中の 1 つ、*yneA* について細胞分裂阻害への関与を検討した。*lexA* 破壊株での細胞伸長は *yneA* オペロンの欠失により抑制され、*lexA-yneA* 二重破壊株に YneA を供給することにより再び細胞の伸長が観察された。また、野生株で YneA を強制的に発現させることでも細胞伸長は誘導された。さらに *yneA* 破壊株ではマイトマイシン C 処理による SOS 応答の誘導に伴う細胞伸長も抑制された。これらのことから、YneA が SOS 応答時の細胞分裂阻害因子として機能していることが明らかになった。さらに、YneA による細胞分裂阻害の分子機構の解明を目指し、YneA の発現が及ぼす Z-ring 形成への影響、YneA-GFP 融合蛋白質や YneA 抗体を用いた YneA の細胞内局在性の観察、さらには、酵母 2 ハイブリッド法による相互作用解析を行った結果、YneA は分裂部位を含む膜構造に変化を与えることで、FtsZ の局在化に必要な未知の蛋白質に影響を及ぼし、この蛋白質と FtsZ との相互作用を弱めることで、間接的に Z-ring の重合化を抑制している可能性が考えられた。今後、FtsZ を分裂部位へと導く蛋白質の発見が期待される。

SOS 制御系を持つ生物に普遍的な機能と考えられる細胞分裂の抑制が、枯草菌と大腸菌では、異なる遺伝子により、別の機構で誘導されるのは興味深い。大腸菌 *sulA*

の相同遺伝子はグラム陰性細菌である γ -プロテオバクテリアの一部に、また枯草菌 *yneA* の相同遺伝子はグラム陽性細菌であるリステリアにのみ保存されている。これら以外の生物種における、SOS 応答時の細胞分裂の制御はどのようにして行われているのであろうか？その機構の解明が期待される。

大腸菌で重要な機能を持つ SOS 遺伝子 *umuD*、*polB*、*dinI* は、*sulA* と同様に枯草菌には保存されていない。UmuD は UmuC ポリメラーゼのサブユニットであり、PolB は DNA ポリメラーゼとして DNA 損傷乗り越え修復系に関与している。また、DinI は活性型 RecA と相互作用することで、LexA の不活性化と UmuC ポリメラーゼの制御に関わると考えられている。枯草菌 SOS レギュロンでは、YqjH と YqjW が UmuC/DinB ファミリーに属する蛋白質として含まれているが、両蛋白質は共に大腸菌 DinB との相同性が高い。これらのことから、枯草菌と大腸菌では損傷バイパス型の DNA ポリメラーゼによる修復経路に違いがあると考えられる。また、枯草菌ではリボソーム蛋白質をコードする遺伝子が SOS レギュロンに含まれている。今後、DNA 損傷時における発現誘導の確認や、精製 LexA 蛋白質を用いたゲルシフトアッセイなどにより、LexA による直接的な制御の有無を確認する必要があるが、枯草菌にはリボソーム蛋白質による SOS 機能が備わっている可能性が考えられる。

このように枯草菌の SOS 制御系には、大腸菌とは異なる興味深い機構が備わっているようであり、その機構解明は今後の課題として挙げられる。また、機能が不明な SOS 遺伝子も多く残っており、その機能を解明することも、まだ知られていない新しい SOS 機能の発見につながるかもしれない。

VI 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さいました小笠原直毅教授に心より感謝申し上げます。

守家成紀助教授には、実験を行うにあたり多くの有益な御指導、御鞭撻を頂き心より感謝致します。

小林和夫博士、石川周博士、茨木大学、笠原康弘博士、埼玉大学、朝井計博士には平素より有益な御助言、御助力を頂き深く感謝致します。

プラスミドの分与をして頂いた東京農業大学、吉村美香さんに感謝致します。

ここまで支援してくれた母に感謝致します。

また、日々、楽しく研究することができたのは細胞遺伝学講座の先輩ならびに在校生の皆様のサポートのおかげです。ありがとうございました。

平成 15 年 1 月 31 日 川合 良和

VII 参考文献

- Addinall, S.G., Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1996) FtsZ ring formation in *fts* mutants. *J Bacteriol.* **178**: 3877-3884.
- Asai, K., Baik, S.H., Kasahara, Y., Moriya, S., and Ogasawara, N. (2000) Regulation of the transport system for C4-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**: 263-271.
- Baquero, M.R., Bouzon, M., Varea, J., and Moreno, F. (1995) *sbmC*, a stationary-phase induced SOS *Escherichia coli* gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Mol Microbiol.* **18**: 301-11.
- Bi, E.F., and Lutkenhaus, J. (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature.* **354**: 161-164.
- Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1993) Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *J Bacteriol* **175**: 1118-1125.
- de Boer, P.A., Cook, W.R., and Rothfield, L.I. (1990) Bacterial cell division. *Annu Rev Genet.* **24**: 249-74.
- Brent, R., and Ptashne, M. (1981) Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4204-4208.
- Bridges, B.A. (1999) DNA repair: Polymerases for passing lesions. *Curr Biol.* **9**: 475-477.
- Cheo, D.L., Bayles, K.W., and Yasbin, R.E. (1991) Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**: 1696-1703.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O., and Hanawalt, P.C. (2001) Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**: 41-64.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., and Errington, J. (2000) Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **35**: 299-311.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., Katis, V.L., Wake, R.G., and Errington, J. (1998) Characterization of the essential cell division gene *ftsL* (*yldD*) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol Microbiol* **35**: 593-604.

- Davis, E.O., Dullaghan, E.M., and Rand, L. (2002) Definition of the mycobacterial SOS box and use to identify LexA-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* **184**: 3287-3295.
- Donnelly, C.E., and Walker, G.C. (1992) Coexpression of UmuD' with UmuC suppresses the UV mutagenesis deficiency of *groE* mutants. *J Bacteriol* **174**: 3133-3139.
- Donnelly, C.E., and Walker, G.C. (1989) *groE* mutants of *Escherichia coli* are defective in umuDC-dependent UV mutagenesis. *J Bacteriol* **171**: 6117-6125.
- Dubnau, D., and Lovett, C.M., Jr. (2002) Transformation and Recombination. In *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: *From Genes To Cells*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 453-471.
- Dullaghan, E.M., Brooks, P.C., and Davis, E.O. (2002) The role of multiple SOS boxes upstream of the *Mycobacterium tuberculosis* *lexA* gene--identification of a novel DNA-damage-inducible gene. *Microbiology*. **148**: 3609-3615.
- Errington, J., and Daniel, R.A. (2002) Cell Division during Growth and Sporulation. In *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: *From Genes To Cells*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 97-109.
- Fernandez De Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., and Woodgate, R. (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**: 1560-1572.
- Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M.D., and Errington, J. (2001) Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **40**: 115-25.
- Frederico, Gueiros-Filho, F.J., and Losick, R. (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* **16**: 2544-2556.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., and Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Gassel, M., and Alonso, J.C. (1989) Expression of the *recE* gene during induction of the SOS response in *Bacillus subtilis* recombination-deficient strains. *Mol Microbiol* **3**: 1269-1276.

- George, J., Castellazzi, M., and Buttin, G. (1975) Prophage induction and cell division in *E. coli*. III. Mutations *sfiA* and *sfiB* restore division in *tif* and *lon* strains and permit the expression of mutator properties of *tif*. *Mol Gen Genet.* **140**: 309-332.
- Gerlach VL, Aravind L, Gotway G, Schultz RA, Koonin EV, Friedberg EC. (1999). Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11922-11927
- Gottesman, S., Halpern, E., and Trisler P. (1981) Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by *lon* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **148**: 265-273.
- Gueiros-Filho, F.J., and Losick, R. (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev* **16**: 2544-2556.
- Haijema, B.J., van Sinderen, D., Winterling, K., Kooistra, J., Venema, G., and Hamoen, L.W. (1996) Regulated expression of the *dinR* and *recA* genes during competence development and SOS induction in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **22**: 75-85.
- Harris WJ, Barr GC. (1971) Structural features of DNA in competent *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet.* **113**: 316-330.
- Harry, E.J. (2001) Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol Microbiol* **40**: 795-803.
- Hassan, A.K.M., Moriya, S., Ogura, T., Tanaka, T., Kawamura, F., and Ogasawara, N. (1997) Suppression of initiation defects of chromosome replication in *Bacillus subtilis* *dnaA* and *oriC*-deleted mutants by integration of a plasmid replicon into the chromosomes. *J Bacteriol* **179**: 2494-2502.
- Helmann, J.D., Wu, M.F., Kobel, P.A., Gamo, F.J., Wilson, M., Morshedi, M.M., Navre, M., and Paddon, C. (2001) Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. **183**: 7318-7328.
- de Henestrosa, A.R., and Barbe, J. (1991) Induction of the *alkA* gene of *Escherichia coli* in gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* **173**: 7736-7740.
- Huisman, O., and D'Ari, R. (1981) An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature* **290**: 797-799.
- Huisman, O., D'Ari, R., and George, J. (1980) Further characterization of *sfiA* and *sfiB* mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**: 185-191.

- Huisman, O., D'Ari, R., and Gottesman, S. (1984) Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4490-4494.
- Igo, M., and Losick, R. (1986) Regulation of a promoter that is utilized by minor forms of RNA polymerase holoenzyme in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **191**: 615-624.
- Itaya, M. (1992) Construction of a novel tetracycline resistance gene cassette useful as a marker on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Biosci Biotechnol* **56**: 685-686.
- Iwasaki H, Takahagi M, Nakata A, Shinagawa H. (1991). *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins specifically interact with Holliday junctions and promote branch migration. *Genes Dev.* **6**: 2214-2220.
- Katis, V.L., Wake, R.G., and Harry, E.J. (2000) Septal localization of the membrane-bound division proteins of *Bacillus subtilis* DivIB and DivIC is codependent only at high temperatures and requires FtsZ. *J Bacteriol* **182**: 3607-3611.
- Kawai, Y. (2000) 修士論文
- Kenyon, C.J., and Walker, G.C. (1980) DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **77**: 2819-2823.
- Khil, P.P., and Camerini-Otero, R.D. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **44**: 89-105.
- Kim, S.R., Maenhaut-Michel, G., Yamada, M., Yamamoto, Y., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T., and Ohmori, H. (1997) Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 13792-13797.
- Koch, W.H., and Woodgate, R. (1998) DNA damage and Repair, vol1, DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukaryotes, The SOS Response. *Humana Press Inc* 107-134
- LeDeaux, J.R., and Grossman, A.D. (1995) Isolation and characterization of *kinC*, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* **177**: 166-175.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., and Grossman, A.D. (1999) Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9642-9647.

- Levin, P.A., and Losick, R. (1996) Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **35**: 478-488.
- Levin, P.A., Losick, R., Stragier, P., and Arigoni, F. (1997) Localization of the sporulation protein SpoIIE in *Bacillus subtilis* is dependent upon the cell division protein FtsZ. *Mol Microbiol* **25**: 839-846.
- Lewis, L.K., Harlow, G.R., Gregg-Jolly, L.A., and Mount, D.W. (1994) Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **241**: 507-523.
- Little, J.W. (1984) Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1375-1379.
- Little, J.W., and Mount, D.W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**: 11-22.
- Little, J.W., Mount, D.W., and Yanisch-Perron, C.R. (1981) Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4199-4203.
- Liu, G., Begg, K., Geddes, A., and Donachie, W.D. (2001) Transcription of essential cell division genes is linked to chromosome replication in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **40**: 909-916.
- Love, P.E., and Yasbin, R.E. (1984) Genetic characterization of the inducible SOS-like system of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **160**: 910-920.
- Love, P.E., Lyle, M.J., and Yasbin, R.E. (1985) DNA-damage-inducible (*din*) loci are transcriptionally activated in competent *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6201-6205.
- Lovett, C.M., Cho, K.C., and O' Gara, T.M. (1993) Purification of an SOS repressor from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **175**: 6842-6849.
- Lovett, C.M., and Roberts, J.W. (1985) Purification of a RecA protein analogue from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **260**: 3305-3313.
- Lowe, J., and Amos, L.A. (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*. **391**: 203-6.
- Lutkenhaus, J., and Mukherjee, A. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cell division. Washington, DC: American Society for Microbiology Press 1615-1639
- Margolin, W. (2000) Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev*. **24**: 531-548.

- McKenzie, G.J., Harris, R.S., Lee, P.L., and Rosenberg, S.M. (2000) The SOS response regulates adaptive mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6646-6651.
- Marrero, R., and Yasbin, R.E. (1988) Cloning of the *Bacillus subtilis* *recE*⁺ gene and functional expression of *recE*⁺ in *B. subtilis*. *J Bacteriol* **170**: 335-344.
- Migocki, M.D., Freeman, M.K., Wake, R.G., and Harry, E.J. (2002) The Min system is not required for precise placement of the midcell Z ring in *Bacillus subtilis*. *EMBO Rep.* **3**:1163-1167.
- Miller, M.C., Resnick, J.B., Smith, B.T. and Lovett, C.M., Jr. (1996) The *bacillus subtilis* *dinR* gene codes for the analogue of *Escherichia coli* LexA. Purification and characterization of the DinR protein. *J Biol Chem* **271**: 33502-33508.
- Mizusawa, S., Court, D., and Gottesman, S. (1983) Transcription of the *sulA* gene and repression by LexA. *J Mol Biol* **171**: 337-343.
- Morimoto, T., Chin, L.P., Hirai, T., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S., and Ogasawara, N. (2002) Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**: 3539-3552
- Moriya, S., Kato, K., Yoshikawa, H., and Ogasawara, N. (1990) Isolation of a *dnaA* mutant of *Bacillus subtilis* defective in initiation of replication: amount of DnaA protein determines cells' initiation potential. *EMBO J* **9**: 2905-2910.
- Moriya, S., Tsujikawa, E., Hassan, A.K., Asai, K., Kodama, T., and Ogasawara, N. (1998) A *Bacillus subtilis* gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. *Mol Microbiol* **29**: 179-187.
- Mukherjee, A., Cao, C., and Lutkenhaus, J. (1998) Inhibition of FtsZ polymerization by Sula, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2885-2890.
- Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., and Fuchs, R.P. (2000) All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J* **19**: 6259-6265.
- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A., and Lowe, J. (1998) Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol.* **5**: 451-458.
- Ogura, M., Yamaguchi, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Fujita, Y., and Tanaka, T. (2002) Whole-genome analysis of genes regulated by the *Bacillus subtilis* competence transcription factor ComK. *J Bacteriol* **184**: 2344-2351.
- Ohmori, H., Hatada, E., Qiao, Y., Tsuji, M., and Fukuda, R. (1995) *dinP*, a new gene in *Escherichia coli*, whose product shows similarities to UmuC and its homologues. *Mutat Res* **347**: 1-7.

- Opperman, T., Murli, S., Smith, B.T., and Walker, G.C. (1999) A model for a *umuDC*-dependent prokaryotic DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 9218-9223.
- Parsons CA, Tsaneva I, Lloyd RG, West SC. (1992). Interaction of *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins with synthetic Holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**: 5452-5456.
- Pham, P., Rangarajan, S., Woodgate, R., and Goodman, M.F. (2001) Roles of DNA polymerases V and II in SOS-induced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 8350-8354.
- Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J* **21**: 685-693.
- Radman, M. (1974) Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis. In *Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis*. Prakash, L., Sherman, F., Miller, M., Lawrence, C.W., and Tabor, H.W. (eds). Springfield, IL: Charles C. Thomas, pp. 128-142.
- Raymond-Denise, A., and Guillen, N. (1991) Identification of *dinR*, a DNA damage-inducible regulator gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**: 7084-7091.
- Regamey, A., Harry, E.J., and Wake, R.G. (2000) Mid-cell Z ring assembly in the absence of entry into the elongation phase of the round of replication in bacteria: coordinating chromosome replication with cell division. *Mol Microbiol*. **38**: 423-434.
- Rothfield L, Justice S, Garcia-Lara J. (1999) Bacterial cell division. *Annu Rev Genet*. **33**: 423-448.
- Sancar A. (1996). DNA excision repair. *Annu Rev Biochem*. **65**: 43-81.
- Sapiro, I., McAdams, H.A., and Losick, R. (2002) Generating and Exploiting Polarity in Bacteria *Science* **298**: 1942-1946.
- Sassanfar, M., and Roberts, J.W. (1990) Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol* **212**: 79-96.
- Scheffers DJ, Driessen AJ. (2002) Immediate GTP hydrolysis upon FtsZ polymerization. *Mol Microbiol*. **43**: 1517-1521.
- Selby, C.P., and Sancar, A. (1991) Gene- and strand-specific repair in vitro: partial purification of a transcription-repair coupling factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 8232-8236.
- Selby, C.P., and Sancar, A. (1993) Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science*. **260**: 53-58.

- Shiba T, Iwasaki H, Nakata A, Shinagawa H. (1991). SOS-inducible DNA repair proteins, RuvA and RuvB, of *Escherichia coli*: functional interactions between RuvA and RuvB for ATP hydrolysis and renaturation of the cruciform structure in supercoiled DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 8445-8449.
- Shinagawa, H, and Iwasaki, H. (1996) Processing the holliday junction in homologous recombination. *Trends Biochem Sci*. **21**: 107-111.
- Smith, B.T., and Walker, G.C. (1998) Mutagenesis and more: umuDC and the *Escherichia coli* SOS response. *Genetics*. **148**: 1599-15610.
- Sommer S, Knezevic J, Bailone A, Devoret R. (1993). Induction of only one SOS operon, *umuDC*, is required for SOS mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*. **239**: 137-144.
- Sutton, M.D., and Walker, G.C. (2001) *umuDC*-mediated cold sensitivity is a manifestation of functions of the UmuD(2)C complex involved in a DNA damage checkpoint control. *J Bacteriol*. **183**: 1215-1224.
- Sutton, M.D., Smith, B.T., Godoy, V.G., and Walker, G.C. (2000) The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu Rev Genet*. **34**: 479-497.
- Taddei F, Matic I, Radman M. (1995) cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**:11736-11740.
- Tang M, Shen X, Frank EG, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman M. (1999). UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8919-8924
- Tang, M., Pham, P., Shen, X., Taylor, J.S., O'Donnell, M., Woodgate R, Goodman and M.F. (2000) Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature* **404**: 1014-1018.
- Tapias, A., Fernandez, S., Alonso, J.C., and Barbe, J. (2002) *Rhodobacter sphaeroides* LexA has dual activity: optimising and repressing *recA* gene transcription. *Nucleic Acids Res*. **30**: 1539-46.
- Teleman, A.A., Graumann, P.L., Lin, D.C.-H., Grossman, A.D., and Losick, R. (1998) Chromosome arrangement within a bacterium. *Curr Biol* **8**: 1102-1109.
- Trusca, D., Scott, S., Thompson, C., and Bramhill, D. (1998) Bacterial SOS checkpoint protein Sula inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *J Bacteriol* **180**: 3946-3953.

- Van Bogelen, R.A., and Neidhardt, F.C. (1990) Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5589-5593.
- Voloshin, O.N, Wang, L, and Camerini-Otero, R.D. (2000) The homologous pairing domain of RecA also mediates the allosteric regulation of DNA binding and ATP hydrolysis: a remarkable concentration of functional residues. *J Mol Biol.* **303**: 709-20.
- Wagner, J., Gruz P, Kim, S.R., Yamada ,M., Matsui , K, Fuchs, R.P., and Nohmi ,T. (1999) The dinB gene encodes a novel E. coli DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell.* **4**: 281-286.
- Walker, G. C. (1996) The SOS Response of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press. 1400-1416
- Wang, X., and Lutkenhaus, J. (1993) The FtsZ protein of *Bacillus subtilis* is localized at the division site and has GTPase activity that is dependent upon FtsZ concentration. *Mol Microbiol.* **9**: 435-442.
- West, S.C. (1997) Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu Rev Genet.* **31**: 213-244.
- Winterling, K.W., Levine, A.S., Yasbin, R.E., and Woodgate, R. (1997) Characterization of DinR, the *Bacillus subtilis* SOS repressor. *J Bacteriol* **179**: 1698-1703.
- Woldringh, C.L., Mulder, E., Huls, P.G., and Vischer, N. (1991) Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res Microbiol.* **142**: 309-320.
- ^aYasbin, R.E. (1997) DNA repair in *Bacillus subtilis*. I. The presence of an inducible system. *Mol Gen Genet.* **153**: 211-8.
- ^bYasbin, R.E. (1977) DNA repair in *Bacillus subtilis*. II. Activation of the inducible system in competent bacteria. *Mol Gen Genet.* **153**: 219-225.
- Yasbin, R.E., Cheo, D., and Bayles, K.W. (1991) The SOB system of *Bacillus subtilis*: a global regulon involved in DNA repair and differentiation. *Res Microbiol.* **142**: 885-892.
- Yasuda, T, Morimatsu K, Horii T, Nagata T, and Ohmori, H. (1998). Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease activities by DinI. *EMBO* **17**: 3207-16
- Zhang, S., Scott, J.M., Haldenwang, W.G. (2001) Loss of ribosomal protein L11 blocks stress activation of the *Bacillus subtilis* transcription factor sigma(B). *J Bacteriol.* **183**: 2316-2321.