

細胞増殖に必須な枯草菌 2 成分制御系遺伝子の解析

福地 圭介
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 1 3 年 2 月 2 日提出

所 属 (主指導教官)	細胞遺伝学講座 (小笠原 直毅)		
氏 名	福地 圭介	提 出	平成 13年 1月 9日
題 目	細胞増殖に必須な枯草菌 2 成分制御系遺伝子の解析		
要旨 我々は、ゲノム配列決定によって見いだされた枯草菌新規遺伝子の破壊変異株バンク作成中に、新規 2 成分制御系 YycFG が細胞の増殖に必須であることを見いだした。YycFG は、<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i> などの病原性を示すグラム陽性菌にも保存され、同様に細胞の増殖に必須であることが示されており、グラム陽性菌に広く保存している重要な制御系である。本研究においては、yycFG 2 成分制御系遺伝子が制御する遺伝子群を明らかにすることにより、その細胞増殖の調節機能を詳細に解析することを目的とした。 2 成分制御系遺伝子 yycFG は、枯草菌の複製開始点から 60 kb 離れた位置にあり、レギュレーター遺伝子 (yycF)、センサー遺伝子 (yycG) に加えて 4 個の遺伝子 (yycH, I, J, および yyxA) がオペロンを形成していると推定された。センサー蛋白質 YycG は、N 末端部分に 2 回の膜貫通部位を含んだ外界シグナルを感知するドメインを有し、C 末端側は 2 成分制御系センサー蛋白質に高度に保存されるヒスチジンキナーゼであると推定された。レギュレーター蛋白質 YycF は、2 成分制御系レギュレーターに高度に保存されたリン酸基の受容部位を N 末端側に、DNA 結合部位を C 末端側に持ち、転写因子として働くと考えられた。 この yycFG 遺伝子の発現時期とオペロン構造の解析のため、枯草菌全 RNA を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、yycFGHIJ および yyxA 遺伝子は 1 つのオペロンを形成し、対数増殖期に発現することがわかった。機能解析のため、各遺伝子の破壊変異株の作成を試みたところ、オペロン下流に位置する yycH, I, J 及び yyxA の 4 遺伝子については容易に破壊変異株が得られたが、2 成分制御系遺伝子である yycFG 両遺伝子については破壊変異株を得ることができなかった。そのため yycF、yycG 遺伝子のプロモーターを LacI 蛋白質により制御可能な Pspac プロモーターの支配下においた条件破壊変異株を作成した。 yycF 条件破壊変異株、yycG 条件破壊変異株は、Pspac プロモーターが誘導される IPTG 存在下の条件でのみ野生株と同様の生育を示した。IPTG 無添加の条件では、センサー遺伝子 yycG 条件破壊変異株では生菌数の低下が見られた。yycG の上流に位置するレギュレーター遺伝子 yycF の条件破壊変異株では、IPTG 無添加の条件では培養開始 2 時間で菌体濁度の増加が停止し、その後生菌数が急激に減少するといったより顕著な生育阻害が観察された。さらに、細胞を DAPI 染色した後、顕微鏡による観察を行ったところ、IPTG 無添加の条件では、yycF および yycG 遺伝子の両条件破壊変異株で、染色体および細胞質の失われた細胞が観察された。プロトプラスト培養培地においても同様の細胞が観察されたため、単純な細胞壁合成阻害等による増殖停止ではなく、細胞増殖サイクルの基本的な過程に障害が生じていると考えられた。yycF 遺伝子全長を組み込んだマルチコピープラスミドを導入した YycF 蛋白質過剰発現株についても顕微鏡観察を行ったところ、細胞の極での分裂により生じた mini cell が野生株に比べ 40 倍の頻度で観察された。さらに、YycF 蛋白質過剰発現株では平均細胞長が短くなり、小さな細胞の分布が増加していることが明らかになり、過剰な細胞分裂が起きていると考えられた。これらの結果は、YycF 蛋白質が細			

胞分裂を正に制御する制御因子として働くことを示唆している。

この為、YycF 蛋白質の発現が細胞分裂遺伝子の発現制御に関与している可能性を考え、その発現量により細胞分裂の頻度が規定され、細胞増殖に必要な細胞分裂遺伝子 *ftsAZ* の転写に対する YycF 蛋白質過剰発現の影響を調べた。*ftsAZ* 上流には、対数増殖増殖期の主要なシグマ因子である σ A 依存性の P1 および P3 プロモーターと胞子形成の初期過程の転写制御を担う σ H 依存性の P2 プロモーターの計 3 つのプロモーターが同定されている。これらのプロモーターからの転写量を測定するために、それぞれのプロモーター配列を *lacZ* レポーター遺伝子に結合し、枯草菌 *amyE* 遺伝子部位に挿入した株を作製し、YycF 蛋白質を過剰発現させた条件での β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、P2 および P3 プロモーター活性は、YycF 蛋白質の過剰発現によって変化は見られなかったのに対し、P1 プロモーター活性については、YycF 過剰発現により野生株の 4 倍以上の増加が見られた。このことから、YycF 蛋白質が P1 プロモーターの制御を介し、細胞分裂遺伝子 *ftsAZ* の発現を促していることが示唆された。この制御が YycF 蛋白質の直接の制御であるかを調べるために YycF 蛋白質を精製し、*ftsAZ* のプロモーター領域に対する結合能をゲルシフトアッセイおよび DNaseI フットプリントにより解析したところ、YycF 蛋白質は *ftsAZ* P1 上流領域(-102~-34 bp)に特異的に結合することがわかった。この *ftsAZ* P1 プロモーターの機能を調べるために、*ftsAZ* P1 欠失変異株を作成したところ、正常な細胞分裂周期が失われ細胞の伸長が見れたが、細胞増殖速度への影響は見られなかった。このため、YycFG が他の細胞の増殖に必須である遺伝子の転写制御に関与する可能性が示唆された。

そこで、マクロアレイを用いた全転写産物の解析を行い、YycFG 制御ネットワークの解明を試みた。その結果、YycF 蛋白質の過剰発現により、D-リボースリン酸化酵素をコードする *rbsK*, Surfactin 生産酵素群をコードする *srf* オペロン, ABC 輸送蛋白をコードする *ftsE* および *lplC* 遺伝子など 8 遺伝子のシグナル強度の増加、細胞壁合成に必要な遺伝子と予想される D-alanine:D-alanine ligase をコードする *ddlA* など 2 遺伝子のシグナル低下が検出された。*rbsK* および *ftsE* 遺伝子については、その制御領域に YycF 蛋白質が、結合することを確認した。そして、*ftsAZ* P1, *rbsK*, *ftsE* 遺伝子および *srf* オペロン制御領域から、YycF 蛋白質の認識配列と予想される 6 塩基からなる繰り返し配列を見いだした。

srf オペロン内にコードされる ComS 蛋白質は、MecA-ClpC 複合体の分解を介して細胞の運動性を負に制御していることから、YycF 蛋白質過剰発現株の細胞の運動性を調べた。その結果、YycF 蛋白質過剰発現株では、細胞の運動性が著しく低下することがわかった。これより、YycFG は *comS* 遺伝子の誘導を介して、細胞の運動性を負に制御する可能性が示唆された。一方で、YycFG により転写が誘導される *rbs* オペロン、*srf* オペロンおよび *ftsE* 遺伝子は、いずれも破壊可能な遺伝子である。また、YycFG により誘導される *ftsZ*, *rbs* オペロン, *srf* オペロンおよび *ftsE* 遺伝子の機能には、細胞膜表層機能に関係するという一般的な共通性がみられるだけであり、YycFG が細胞においてどのような役割を担っているか、その全体像は今後の研究課題として残された。マクロアレイの解析では、約 2000 の遺伝子のシグナルは検出されず、この中に YycFG が転写制御を行う必須遺伝子が存在する可能性も考えられる。枯草菌では、配列特異性の低い DNA 結合蛋白質である AbrB やヒストン様蛋白質 Hbsu が、対数増殖期の転写制御においても重要な役割を持っている。YycFG も AbrB や Hbsu と同様に、特定の増殖に必要な遺伝子の発現を制御するのではなく、グローバルな転写制御因子として機能している可能性も推測された。今後、本研究により同定された YycF 結合配列に基づいたゲノム上のすべての YycF 結合配列の同定により、YycFG による細胞機能制御の全容が明らかにされたいと考えている。

目次

1. 序論	8
1.1. 2成分制御系の普遍性と多様性	8
1.2. YycFGオペロンの構成とその保存性	10
1.3. 本研究の目的	14
2. 材料と方法	16
2.1. 枯草菌使用菌株	16
2.2. 使用したプラスミド	16
2.3. PCR ligationによる変異導入	22
2.4. 使用培地	23
2.5. 大腸菌の形質転換およびプラスミド DNAの調製	25
2.6. 塩基配列の決定	25
2.7. 枯草菌の形質転換	25
2.8. 枯草菌染色体DNAの調整	26
2.9. サザンハイブリダイゼーション	26
2.10. ノーザンハイブリダイゼーション	27
2.10.1. RNAの抽出	
2.10.2. 電気泳動とメンブレンへのブロット	
2.10.3. デイゴキシゲニン標識RNAプローブの作製	
2.10.4. ハイブリダイゼーションとシグナルの検出	
2.11. 生菌数および胞子形成率の測定	28
2.11.1. 生菌数の測定	
2.11.2. 胞子形成率の測定	
2.12. 蛍光顕微鏡による変異株の染色体の観察	28
2.12.1. 試料の調整	

- 2.12.2. 蛍光顕微鏡観察
- 2.13. β ガラクトシダーゼ活性の測定__29
 - 2.13.1. 試料の調整
 - 2.13.2. 酵素反応
 - 2.13.3. 4MUの測定
 - 2.13.4. 蛋白質濃度の測定
 - 2.13.5. 耐熱性 β ガラクトシダーゼ (BgaB) 活性の測定
- 2.14. 蛋白質二次元ゲル電気泳動法__30
 - 2.14.1. 試料の調整
 - 2.14.2. 蛋白質二次元電気泳動
 - 2.14.3. 蛋白質スポットの検出
 - 2.14.4. 蛋白質スポットの同定
- 2.15. YycF 蛋白質の精製__31
- 2.16. ゲルシフトアッセイ__31
- 2.17. マクロアレイによる全転写産物の解析__32
 - 2.17.1. 全RNAの抽出
 - 2.17.2. DNaseI処理
 - 2.17.3. ^{32}P 標識cDNAの合成
 - 2.17.4. ハイブリダイゼーション反応
 - 2.17.5. マクロアレイスポットの検出
 - 2.17.6. マクロアレイスポットの解析
- 2.18. DNaseI フットプリント__34
 - 2.18.1. T4 Polynucleotide Kinaseによる合成プライマーの ^{32}P 標識
 - 2.18.2. PCR反応によるプローブDNAの作成

2.18.3. サイクルシーケンス反応によるシーケンスラダーの作成

2.18.4. YycF-DNA結合反応およびDNaseI部分分解反応

3. 結果__36

3.1. 遺伝子破壊による *yycFG* オペロンの機能解析の試み__36

3.1.1. *yycFGHIJ* および *yyxA* 遺伝子のオペロン構造および発現時期の解析

3.1.2. 遺伝子破壊変異株の作成

3.1.3. *yycH*, *yycI*, *yycJ* 及び *yyxA* 遺伝子破壊による増殖への影響

3.1.4. *yyxA* 遺伝子の発現を促すシグマ因子の同定

3.2. 条件致死変異株の作成による *yycFG* 遺伝子の機能解析__44

3.2.1. *yycF*, *yycG* 条件致死変異株の作成と必須遺伝子の確認

3.2.2. 条件致死変異株の IPTG に依存した生育

3.2.3. 遺伝子破壊による細胞形態および染色体への影響

3.3. レギュレータ蛋白質 YycF 過剰発現株の作成とその解析__54

3.3.1. 活性型 YycF 蛋白質過剰発現株の作成

3.3.2. 蛋白質 2 次元電気泳動による YycF および YycFD54H 蛋白質の過剰発現の確認

3.3.3. YycF による *yycF* オペロンの自己制御の検討

3.3.4. YycF および YycFD54H 蛋白質過剰発現による細胞形態への影響

3.3.5. YycF 蛋白質過剰発現株における *ftsAZ* 遺伝子のプロモーター活性の測定

3.3.6. 精製 YycF 蛋白質の *ftsAZ* P1 プロモーターへの結合能

3.3.7. DNaseI フットプリントによる YycF 結合配列の同定

3.3.8. *ftsAZ* P1 プロモーター上流領域部分欠失による YycF 過剰発現に

よる転写の活性化に必要な領域の同定

3.3.9. *ftsAZP1* プロモーター欠失による細胞分裂への影響

3.4. 枯草菌マクロアレイを用いた全転写産物の解析による YycFG 制御ネットワーク全容解明の試み__70

3.4.1. 枯草菌マクロアレイを用いた全転写産物の解析

3.4.2. LacZ アッセイによるマクロアレイ解析結果の確認

3.4.3. ゲルシフトアッセイによる rbs オペロンおよび *ftsE* 遺伝子制御領域への YycF 蛋白質結合能の解析

3.4.4. YycF 蛋白質認識配列の同定

3.4.5. 遺伝子破壊による *ftsE* 遺伝子の機能解析

3.4.6. YycF 過剰発現による細胞の運動性への影響

4. 考察__83

4.1. *yycFG* は細胞増殖に必須な 2 成分制御系遺伝子である。__83

4.2. *yycHIJ* および *yyxA* 遺伝子の機能について__84

4.3. YycFG は *ftsAZ* 遺伝子の転写誘導を介し細胞分裂を正に制御する__85

4.4. 枯草菌 *ftsE* 遺伝子の機能と YycFG__86

4.5. YycFG は *comS* 遺伝子の転写誘導を介して σ^D を不活化する__86

4.6. YycFG による他の遺伝子の転写制御__87

4.7. YycFG 機能の全体像__88

5. 謝辞__91

6. 参考文献__92

1. 序論

1.1. 2成分制御系の普遍性と多様性

現存するすべての生物は、絶え間なく変化する過酷な環境の中で、その変化に対応しながら生存している。この環境応答は生体膜を介した情報の伝達機構により行われている。この情報伝達機構の一つとして細菌に広く保存されている2成分制御系 (Two-Component Signal Transduction System) が知られている (Parkinson *et al.*, 1992)。2成分制御系はセンサー蛋白質とレギュレーター蛋白質から構成され、センサー蛋白質は、外界あるいは細胞内のシグナルを受け自己リン酸化した活性型となり、特異的にレギュレーター蛋白質をリン酸化する。レギュレーター蛋白質は、リン酸化により立体構造が変化することで活性型蛋白質となり、その多くは特異的なDNA配列への結合能を変化させ、一群の遺伝子の転写を直接に正あるいは負に制御する (図1)。

グラム陰性細菌としてよく研究されている大腸菌には、その全ゲノム配列から32のレギュレーター遺伝子と23のセンサー遺伝子が存在することが明らかにされている (Mizuno, 1997)。その代表的なものとしては、浸透圧の変化を感知しポリン蛋白の発現制御を行う EnvZ/OmpR (Aiba *et al.*, 1990)、リン酸の欠乏条件でアルカリホスファターゼの発現を誘導する PhoR/PhoB (Wanner, 1995)、嫌気性と好気性の遺伝子発現のスイッチングを行う ArcB/ArcC (Iuchi *et al.*, 1995) などが知られている。また近年、グラム陰性の有柄細菌である *Caulobacter crescentus* では、レギュレーター

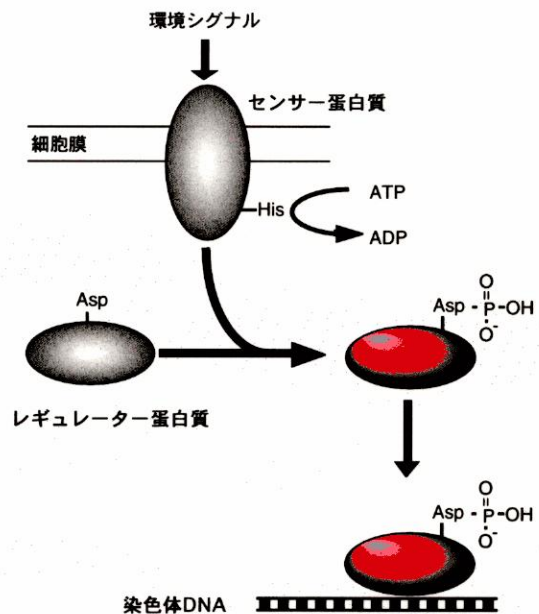


図1. 2成分制御系によるシグナル伝達

蛋白質 CtrAとセンサーキナーゼ CckA が細胞の増殖に必須であり、細胞周期の制御において中心的な役割をもつことが明らかにされつつある (Domian *et al.*, 1997, Jacobs *et al.*, 1999)。さらに、2成分制御系は細菌にとどまらず、酵母やカビ、植物などの真核生物にも存在することが見いだされている。酵母ではセンサー蛋白質SLN1が、浸透圧応答と関連した情報伝達系で機能している (Ota *et al.*, 1993)。シロイヌナズナで

は、センサー蛋白質ETR11がエチレン応答情報伝達系において機能している(Chang *et al.*, 1993)。このように、二成分制御系は多くの生物に共通の制御機構であり、種を超えて多面的な環境応答機構として保存されていることが明らかにされている。

本研究で対象とするグラム陽性細菌の枯草菌では、2成分制御系を中心としたリン酸転位反応が、細胞分化の原型といわれる孢子形成の初期過程を制御していることが知られている(Errington, 1993)。さらに、その全ゲノムの塩基配列の決定により、38の2成分制御系センサー遺伝子と34のレギュレーター遺伝子が同定されたが、その8割(センサー遺伝子: 30/38, レギュレーター遺伝子: 26/34)は実験的解析がなされておらず機能未知であった(Kunst *et al.*, 1997)。

我々はゲノム機能解析プロジェクトの一環として、枯草菌複製開始点近傍の機能未知遺伝子の破壊変異株バンクの作成中、新規2成分制御系をコードすると考えられる *yycF* および *yycG* 遺伝子が、対数増殖期に発現し、細胞の増殖に必須であることを見出した(K. Fukuchi, Y. Kasahara & N. Ogasawara, International Conference on Bacilli, Japan, July, 1998, Fukuchi *et al.*, 2000)。同様の報告は、すべての枯草菌2成分制御系遺伝子破壊株作成を試みたFabretらのグループによっても行われた(Fabret *et al.*, 1998, Fabret *et al.*, 1999)。最近、PatricらおよびJohnらのグループにより、*yycFG* 遺伝子は、*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*などの病原性を示すグラム陽性菌にも保存され(図2)、同様に細胞の増殖に必須であることが示されており、グラム陽性菌に広く保存された重要な制御系であると考えられている(Patric K. M. *et al.*, 1999; John, P. T. *et al.*, 2000)。しかしながら、YycFGによる具体的な細胞制御の

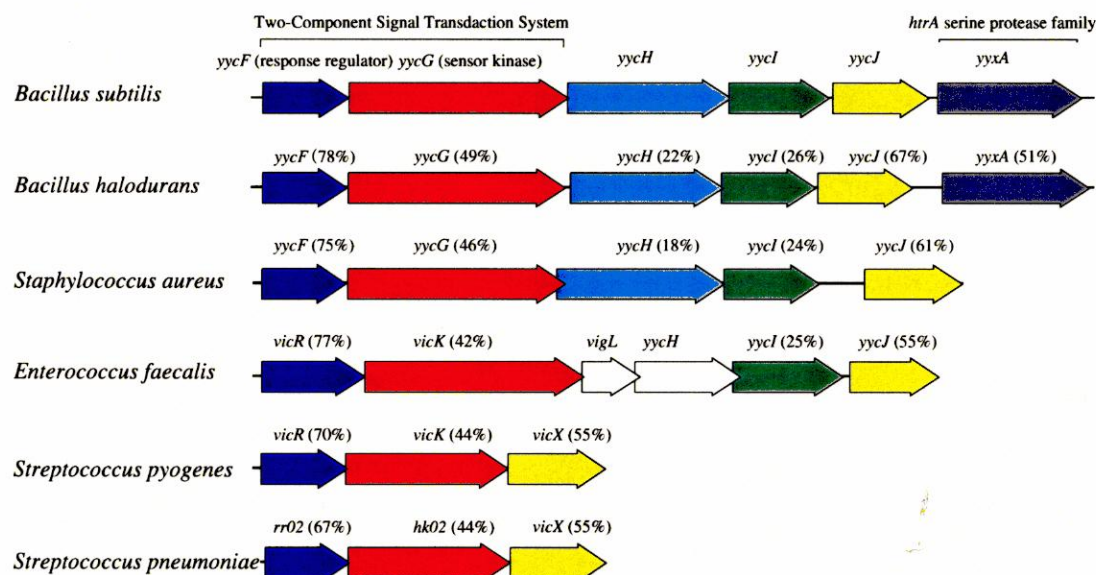


図2. *yycFG* オペロン構造の比較 数字はアミノ酸配列の同一性を示している。

機構については未知のままである。本研究では、このゲノム配列から新たに同定された2成分制御系遺伝子を含むオペロンの機能解析を行った。

1.2. YycFGオペロンの構成とその保存性

yycFG遺伝子は、枯草菌の複製開始点から60 kb離れた位置にあり、レギュレーター蛋白質(YycF, 237 aa)、センサー蛋白質(YycG, 611 aa)に加えて3つの機能未知蛋白質(YycH, 455 aa; YycI, 280 aa; YycJ, 268 aa)とセリンプロテアーゼ(YyxA, 400 aa)をコードする6遺伝子がオペロンを形成していると予想された(図2)。この2成分制御系遺伝子yycFGを先頭とするオペロン構造は、ゲノム配列解析が進行中あるいは報告された6種のグラム陽性細菌で保存されている(図2)。

YycFは、枯草菌のゲノム上に見いだされた14個のOmpRファミリーに属するレギュレーター蛋白質であり、N末端部分には、センサー蛋白質からリン酸基転位反応を受けるアスパラギン酸残基を中心としたレシーバードメインが保存されている。ま

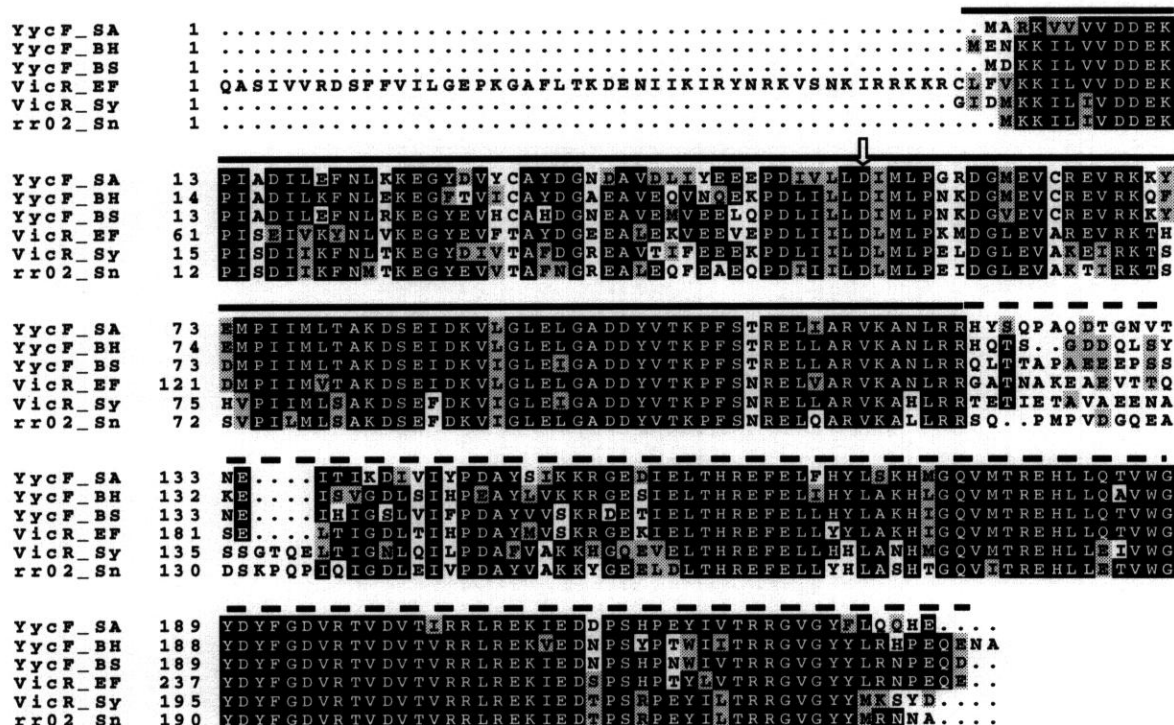


図3. レギュレーター蛋白質YycFのアミノ酸配列の比較 3つの蛋白質で同一のアミノ酸配列を黒で示した。同じ極性のアミノ酸配列を灰色で示した。アミノ酸配列の比較は、アミノ酸配列解析プログラム: CLUSTALW(<http://clustalw.genome.ad.jp/>)により行った(Thompson, J. D., et al., 1994)。傍線部と破線部は、既知のレギュレーター蛋白質との比較から推測されるレシーバードメインとDNA結合ドメインをそれぞれ示している。矢印は、すべての2成分制御系レギュレーター蛋白質に保存され、センサー蛋白質によりリン酸基転移を受けるアスパラギン酸残基を示している。SA; *Staphylococcus aureus*, BS; *Bacillus subtilis*, BH; *Bacillus halodurans*, EF; *Enterococcus faecalis*, Sy; *Streptococcus pyogenes*, Sn; *Streptococcus pneumoniae*

た、そのC末端側にはHTHモチーフDNA結合ドメインが保存されている（図3）。

センサー蛋白質YycGは、そのアミノ酸配列から、N末端側に疎水性アミノ酸に富む2つの膜貫通領域を持つと予測された（図4）。この YycG の2回の膜貫領域は *Bacillus halodurans*, *Staphylococcus aureus* および *Enterococcus faecalis* でも保存されている。一方で、*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* の YycG と考えられる VicK および Hk02 では、膜貫通領域はN末端側に1ヶ所のみ予測された。興味深いことに *Streptococcus pneumoniae* では、レギュレーターをコードする *rr02* 遺伝子のみが細胞の増殖に必須であり、センサー蛋白質をコードする *hk02* 遺伝子は破壊可能で細胞の増殖に影響しないことが報告されており、シグナル感知の領域と予想されるN末端構造の変化と何らかの関係があるとも考えられる（John, P. T. et al., 2000）。既知の蛋白質との比較において枯草菌のYycGは、枯草菌2成分制御系センサー蛋白質

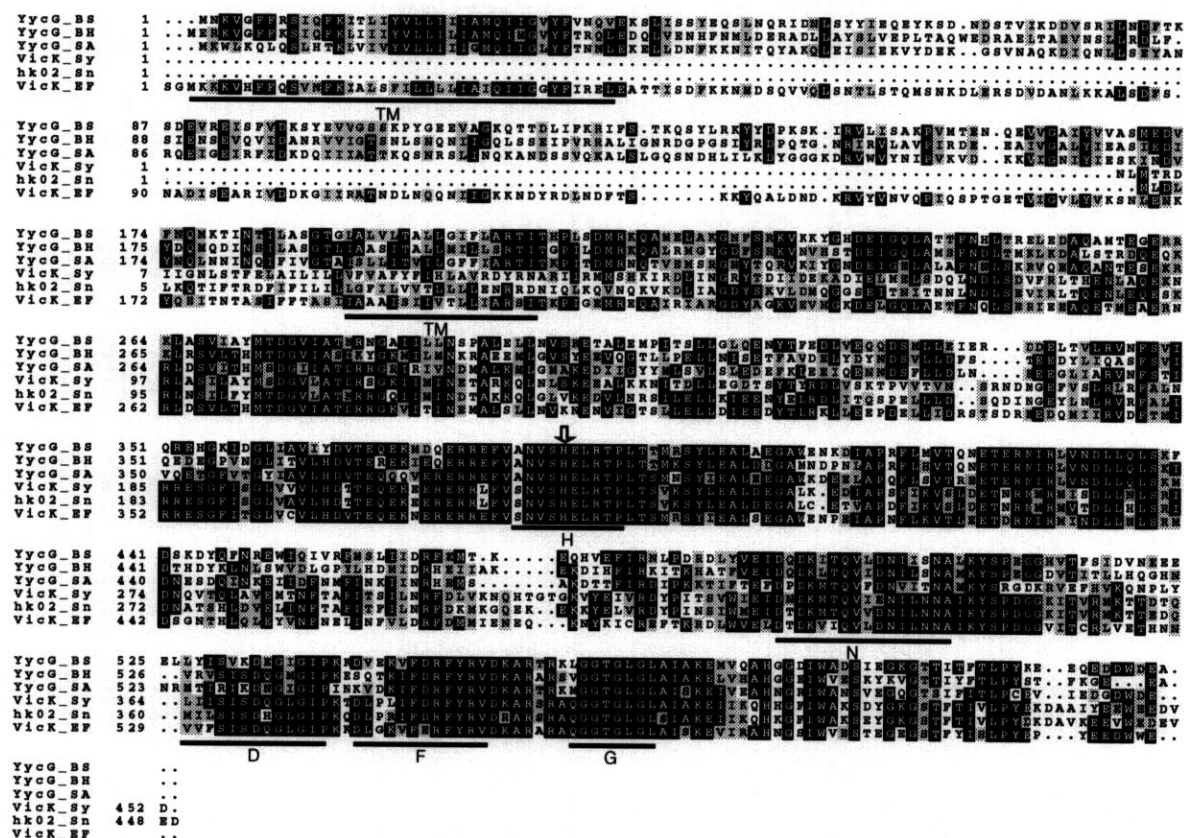


図4. センサー蛋白質YycGのアミノ酸配列の比較 3つの蛋白質で同一のアミノ酸配列を黒で、同じ極性のアミノ酸配列を灰色で示した。アミノ酸配列の比較は、アミノ酸配列解析プログラム：CLUSTALW(<http://clustalw.genome.ad.jp/>)により行った（Thompson, J. D., et al., 1994）。TMは、アミノ酸配列解析プログラム：TMPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) によって予測された疎水性領域を示している(Hofmann K. & Stoffel W.,1993)。H, N, D, F, Gで示した領域は、大部分のセンサー蛋白質に保存されているアミノ酸配列で、リン酸基転位反応において必須な領域を示している。矢印は、自己リン酸化される His 残基を示している。

```

YycG 1 ...MKFVNSVVGKWFILSLVLTVEFILTLLLEFENYHVEEAENDTQLANKVAVILENHEDQALAR
ResE 1 MNRVGCGRSISIQFKTLIYVLIIIAAQIGVYFVQVVEKSLISSYEQSLNQRIDNLSYYIEQYKSDNDS

YycG 68 SITWELADNLTSAIIQDERNNWYSPNDRN...RLSSITVEQIQHDKDLNKALEHKKVSKRTGLSDTD
ResE 71 TVIKDDVSRILNDFTKSDERREISFVDRSIEVVGSSKPYGEVAGKQTDLIFRIFSTKQSYLRKYD

YycG 134 TDN...ERLIVGVVPEKDGK...KGMVYLSQSLLAVKDTTKHTTRYFLAAGIAAVLTFFAFPLSSRVTP
ResE 140 PKSKIRVLISAKPVMTEHQEVVCAIYVVASMEDVFNQMKTINTILASGTGIAVLTALLGIFLARTTHP

YycG 200 LRKMRGCAQDLAKGKEDTKIPILTQDEIGELATAFNMGRLNPHINALNQEKESMILSSMADGVITI
ResE 210 LSDMRKQAMELAKGMSRKVKKYGHDEIGQLATFNEHLELEDAQAMTEGERRKASVIAYMTDGVLAT

YycG 270 NIDCTILVTNPPAERFLCAWYEQNMNIKEGDNLPPEAKELFQNAVSTEKEQMIETLQG.RWVLMSP
ResE 280 NNRGAILLNSPALELEWVSR.ETATEMPITSLGLQENYTFEDLEQQDSMLLEERDDELTVIRVNF

YycG 339 LYAESH...VRCAVAVLRMTERRRLKLRDFIANVSHELRTPISMEOGYSEAVEDIASSENDRKEIAQ
ResE 349 VIQREHGRIDGLIAVYIVTEQEKMQERREFVANVSHELRTPLETFMRSYLEALAGAWENKDIAPFLM

YycG 407 IYDESLRMGRLVNDLEELARMESGHTGLHYEKIIVNFELEKIIRFSCVAKENKALDDISLTREEFM
ResE 419 VTQNEERMRIRLVNDLEQLSKFDSKDYQFNREWIQVRFMSLIIDRE.MTKEQVHEFIRNIPDRGLYE

YycG 477 FDEDKMEQVFTNIDNALRHTSAGGSVSIHVSVKDG...LKIDIKKSGSCIPEDLPFFIFRFYKADKAR
ResE 488 IDQDKETQVLDNINNALRYSPESGQVTFSDVNEHEELLYISVKDEGIGIPKKDVEKVFPRFYVDKAR

YycG 545 TRGRAGTGLGLAIVKNIVEAHNGSITVHSRIDKGTTFSPFYPTKR.....
ResE 558 TRKLGTGLGLAIAKENVQAHGSDIWDASIECKGTITFTTPYKEQEDDWDDEA

```

図5. センサー蛋白質YycGとResEのアミノ酸配列の比較 同一のアミノ酸配列を黒で、同じ極性のアミノ酸配列を灰色で示した。アミノ酸配列の比較は、アミノ酸配列解析プログラム：CLUSTALW(<http://clustalw.genome.ad.jp/>)により行った (Thompson, J. D., *et al.*, 1994)。

ResE (枯草菌YycGとのアミノ酸配列の同一性；30%)と外部シグナルを関知すると考えられるN末端側のレシーバードメインを含めて高い相同性を示す (図5)。センサー蛋白質ResEを活性化するの直接のシグナルはわかっていないが、シトクローム蛋白質をコードする*ctaA* (Sun *et al.*, 1996) および*ctaB*遺伝子 (Liu & Taber, 1998)、嫌気条件下で機能する転写因子をコードしている*fmr*遺伝子 (Cruz Ramos *et al.*, 1995)、亜硝酸還元酵素をコードする*nasD*遺伝子 (Ogawa *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1998) などの好気および嫌気条件下での呼吸に関与する遺伝子群の発現制御を行っている (Nakano, M. M. *et al.*, 2000)。YycGのC末端部分には、2成分制御系センサー蛋白質特有のリン酸基供与を行うトランスミッタードメイン (別称；ヒスチジンキナーゼドメイン、図4; HNDFG box) が保存されている (Wharam *et al.*, 1995; Strauch *et al.*, 1992)。

YycH, YycI および YycJ は、機能既知の蛋白質とは有意な相同性は見られず、機能の予測は困難である。YycJについては2成分制御系YycFGが保存されている6種のグラム陽性細菌すべてで*yycFG*遺伝子下流にコードされ、非常に高いアミノ酸配列の保存性を示すことから (図2)、その機能が細胞増殖に必須であるYycFG制御系との強い相関性があるとも考えられる。一方で、YycJは、YycFGが見いだされていないグラム陰性細菌の*Chlamydia trachomatis* や古細菌の*Thermoplasma acidophilum*にも保存されており、重要な機能が種を超えて保持されている可能性もある (図6;

YycJ-SA	1	RERMSRLIRM	SVLASGSGTGNATFVENEKGSLLV	VGLGKKH	EF	SQ	DN	NIQ	DL	NG	LVT
VicX-Sn	1	RERMSRLIRM	SVLASGSGTGNATFVENEKGSLLV	VGLGKKH	EF	SQ	DN	NIQ	DL	NG	LVT
YycJ-BS	1	MSLQ	FSVLASGSGTGNATFVENEKGSLLV	VGLGKKH	EF	SQ	DN	NIQ	DL	NG	LVT
VicX-Sy	1	MSLQ	FSVLASGSGTGNATFVENEKGSLLV	VGLGKKH	EF	SQ	DN	NIQ	DL	NG	LVT
YycJ-BH	1	MSLQ	FSVLASGSGTGNATFVENEKGSLLV	VGLGKKH	EF	SQ	DN	NIQ	DL	NG	LVT
YycJ-EF	1	MDSEF	FAPNIVLASGSGTGNATFVENEKGSLLV	VGLGKKH	EF	SQ	DN	NIQ	DL	NG	LVT
PA1012	1	MR	FVLGSGSRGNSALVSSDTRI	IC	FP	LR	RI	KL	AR	GL	SPAC
YycJ-CP	1	MQG	FVLGSGSRGNSALVSSDTRI	IC	FP	LR	RI	KL	AR	GL	SPAC
TA1474	1	MSAGKIDVHGFEKETL	FKNIASGSKGN	CTLWDSTDL	IV	LG	IT	M	K	FR	DS
YycJ-SA	63	HEHIDHIKGLGV	LARKYQLPIYANEKTW	CAIEK	KDS	RIP	MO	KFI	EN	PYET	KSI
VicX-Sn	63	HEHIDHIKGLGV	LARKYQLPIYANEKTW	CAIEK	KDS	RIP	MO	KFI	EN	PYET	KSI
YycJ-BS	58	HEHSDHIKGLGV	LARKYQLPIYANEKTW	KAMEN	Q	IG	KID	TQ	KF	V	P
VicX-Sy	58	HEHSDHIKGLGV	LARKYQLPIYANEKTW	KAMEN	Q	IG	KID	TQ	KF	V	P
YycJ-BH	58	HEHSDHIKGLGV	LARKYQLPIYANEKTW	KAMEN	Q	IG	KID	TQ	KF	V	P
YycJ-EF	62	HEHSDHIKGLGV	LARKYQLPIYANEKTW	KAMEN	Q	IG	KID	TQ	KF	V	P
PA1012	56	HEHSDHIKGLGV	LARKYQLPIYANEKTW	KAMEN	Q	IG	KID	TQ	KF	V	P
YycJ-CP	57	HEHSDHIKGLGV	LARKYQLPIYANEKTW	KAMEN	Q	IG	KID	TQ	KF	V	P
TA1474	70	HEHSDHIKGLGV	LARKYQLPIYANEKTW	KAMEN	Q	IG	KID	TQ	KF	V	P
YycJ-SA	133	PQFYIFHNNYK	FTILTDTGYVSDRM	KGMIE	GS	DA	IF	FES	NHD	V	D
VicX-Sn	133	PQFYIFHNNYK	FTILTDTGYVSDRM	KGMIE	GS	DA	IF	FES	NHD	V	D
YycJ-BS	128	PQFYIFHNNYK	FTILTDTGYVSDRM	KGMIE	GS	DA	IF	FES	NHD	V	D
VicX-Sy	128	PQFYIFHNNYK	FTILTDTGYVSDRM	KGMIE	GS	DA	IF	FES	NHD	V	D
YycJ-BH	128	PQFYIFHNNYK	FTILTDTGYVSDRM	KGMIE	GS	DA	IF	FES	NHD	V	D
YycJ-EF	132	PQFYIFHNNYK	FTILTDTGYVSDRM	KGMIE	GS	DA	IF	FES	NHD	V	D
PA1012	121	PQFYIFHNNYK	FTILTDTGYVSDRM	KGMIE	GS	DA	IF	FES	NHD	V	D
YycJ-CP	125	PQFYIFHNNYK	FTILTDTGYVSDRM	KGMIE	GS	DA	IF	FES	NHD	V	D
TA1474	130	PQFYIFHNNYK	FTILTDTGYVSDRM	KGMIE	GS	DA	IF	FES	NHD	V	D
YycJ-SA	203	DAAHAM	DVITGNT	KRIYLSHL	SDQNNMKDL	ARM	SV	GV	NEED	..	EDTEKEVLC
VicX-Sn	203	DAAHAM	DVITGNT	KRIYLSHL	SDQNNMKDL	ARM	SV	GV	NEED	..	EDTEKEVLC
YycJ-BS	198	DAALAM	DVIGDET	TSRIYLAHL	SDQNNMKDL	ARM	SV	GV	NEED	..	EDTEKEVLC
VicX-Sy	198	DAALAM	DVIGDET	TSRIYLAHL	SDQNNMKDL	ARM	SV	GV	NEED	..	EDTEKEVLC
YycJ-BH	198	DAALAM	DVIGDET	TSRIYLAHL	SDQNNMKDL	ARM	SV	GV	NEED	..	EDTEKEVLC
YycJ-EF	202	DAALAM	DVIGDET	TSRIYLAHL	SDQNNMKDL	ARM	SV	GV	NEED	..	EDTEKEVLC
PA1012	191	QSAELV	KQLDWGRM	QHLVLAHL	SKNN	SP	LA	RQ	TFVD	LG	CDPW
YycJ-CP	195	CGQL	LQKTPK	LKLYLAHL	TE	CNT	AE	AL	STV	S	SIASIT
TA1474	200	QSAELV	KQLDWGRM	QHLVLAHL	SKNN	SP	LA	RQ	TFVD	LG	CDPW
YycJ-SA	269	I....									
VicX-Sn	269	I....									
YycJ-BS	264	YNFSM									
VicX-Sy	264	YNFSM									
YycJ-BH	264	V....									
YycJ-EF											
PA1012											
YycJ-CP	262	ACPR									
TA1474											

図6. 枯草菌 YycJ とその相同蛋白質とのアミノ酸配列の比較

5つの蛋白質で同一のアミノ酸配列を黒で、同じ極性のアミノ酸配列を灰色でしめた。SA; *Staphylococcus aureus*, BS; *Bacillus subtilis*, BH; *Bacillus halodurans*, EF; *Enterococcus faecalis*, Sy; *Streptococcus pyogenes*, Sn; *Streptococcus pneumoniae*, CP; *Chlamydia pneumoniae* PA1012は *Pseudomonas aeruginosa* PA01、TA1474は *Thermoplasma acidophilum* のそれぞれのゲノム上から見いだされた機能未知蛋白質。

Stephens, R. S. et al., 1998; Ruepp, A., et al., 2000)。

YyxAは、細菌から人まで広く保存されているセリンプロテアーゼ HtrA ファミリーに属する (Pallen, M. J. & Ponting, C. R. 1997)。HtrA ファミリーセリンプロテアーゼは、ミスホールドした蛋白質の分解に関与し、分子シャペロンとしての機能があることが報告されている。枯草菌ゲノム上にはYyxA と高い相同性を示す2つのHtrA ファミリーセリンプロテアーゼ、HtrA および YkdA、が同定されている。そのうち、YkdA はヒートショックにより誘導されることが報告されているが、セリンプロテアーゼとしての具体的な機能についてはわかっていない (Noone, D. et al., 2000)。

1.3. 本研究の目的

本研究では、機能未知 2 成分制御系 YycFG による細胞機能制御ネットワークの全容を明らかにすることを目的とした。まず、(1)全 RNA を用いたノーザンハイブリダイゼーションにより、*ycfF*, *ycfG*, *ycfH*, *ycfI*, *ycfJ* および *yyxA* 遺伝子のオペロン構造および発現時期の解析を行った。(2)各遺伝子の破壊変異株の作成を行い、これらの遺伝子が枯草菌の増殖に必須であるか検討した。(3) 遺伝子が破壊可能の場合、その影響について調べるために、各変異株の生育、孢子形成能、蛍光顕微鏡を用いた細胞形態及び核様体の分布の観察を行った。(4) 破壊変異株が得られず、枯草菌の細胞増殖に必須であることが明らかになった 2 成分制御系遺伝子 *ycfFG* については、その発現を IPTG により誘導可能な *Pspac* プロモーターの制御下においた条件破壊株を作成し、*ycfFG* 遺伝子の発現が抑制された場合に起こる生育、生菌数および細胞の形態の変化を調べた。(5) 2 成分制御系 YycFG は、細胞の増殖に必須な遺伝子の転写制御を行っていると考えられ、その制御下にある遺伝子を同定を試みた。このため、野生型 YycF 蛋白質および常時活性型 YycF 蛋白質の過剰発現株を作製した。(6) YycF 蛋白質過剰発現による細胞形態への影響を顕微鏡観察により調べたところ、細胞長の減少が観察されたことから、2 成分制御系 YycFG は細胞分裂遺伝子の発現を制御していることが予想された。このため、枯草菌の細胞分裂の中心的な役割を担っている *ftsAZ* 遺伝子の転写制御における 2 成分制御系 YycFG の関わりを詳細に解析した。(7) YycFG による転写制御の全容を明らかにするために YycF 過剰発現株の全転写産物を全遺伝子を対象とした枯草菌マクロアレイを用いて解析した。

これより以下のことが明らかになった。1) 6 つの遺伝子 (*ycfFGHIJ* および *yyxA*) には、3 つの転写単位があり、その一つは 6 遺伝子をオペロンとして転写し、対数増殖期初期に発現する。加えて 2 成分制御系 *ycfFG* 遺伝子は、対数増殖期初期から対数増殖期後期まで独自に転写される。オペロン最後尾の *yyxA* 遺伝子はシグマ因子 σ^F により、孢子形成期にも単独で転写される。2) 2 成分制御系遺伝子 *ycfFGI* は、枯草菌の細胞増殖に必須の遺伝子であり、両遺伝子の発現が抑制されることによって細胞の増殖は停止し、急激な菌体濁度および生菌数の低下が引き起こされる。3) 枯草菌細胞分裂遺伝子 *ftsAZ* の上流に同定されている 3 つのプロモーターの内、対数増殖期の発現を担っている P1 プロモーターの発現は YycF 蛋白質の過剰発現により 4 倍に増加した。さらに、精製 YycF 蛋白質を用いたゲルシフトアッセイおよび DNaseI フットプリントによって YycF 蛋白質が *ftsAZ* 遺伝子 P1 プロモーター上流 (P1 プロモーター転写開始点上流 -102~-34 bp) に直接結合することが確認された。4) 枯草菌マクロアレイを用いた解析では、8 遺伝子 (*srfAB*, *ftsE*, *srfAA*, *srfAD*, *yheJ*, *xkdI*, *lplC*, *rbsK*) のシグナル強度が 2 倍以上に増加し、2 遺伝子 (*yyxG*, *ddlA*) のシグナル強度が半減す

ることがわかった。この枯草菌マクロアレイの解析結果に基づき、*srf*オペロン、*rbs*オペロンおよび*ftsE*遺伝子について、プロモーター配列と*lacZ*遺伝子の融合した配列を*amyE*遺伝子部位に導入した株、あるいはプロモーター下流に*lacZ*遺伝子を組み込んだ株を用いて転写解析を行い、YycFGによって転写を正に制御されることを確認した。さらにDNaseIフットプリント解析により*ftsE*遺伝子および*rbs*オペロンの制御領域のYycFの結合領域を決定したところ、両オペロンの制御領域には*ftsAZP1*プロモーター領域および*srf*オペロンの制御領域にも存在する繰り返し配列（TGAAAA-n(5-6)-TGAAAA）が見いだされた。

ComS蛋白質は、YycFの過剰発現によって誘導される*srf*オペロン内にコードされ、MecA-ClpC複合体の分解を介して細胞の運動性を負に制御していることから、YycF蛋白質過剰発現による細胞の運動性への影響を調べた。その結果、YycF蛋白質過剰発現株では、細胞の運動性が著しく低下することがわかった。これより、YycFは、*comS*遺伝子の誘導を介して、細胞の運動性を負に制御することも明らかになった。

本研究によりYycFGは、対数増殖期に複数の遺伝子の転写制御に関与しており、その転写制御を介して細胞分裂、細胞の運動性の制御に関与していることが明らかになった。しかし、YycFGによって転写制御を受ける*ftsE*、*rbs*オペロンおよび*srf*オペロンは、いずれも破壊可能な遺伝子であった。さらに、*ftsAZP1*プロモーターについても欠失株が作成可能であることから、YycFGの下流にある必須遺伝子は見いだされていない。また、YycFGによって転写制御を受けることが明らかになった*ftsAZ*オペロン、*rbs*オペロン、*ftsE*遺伝子および*srf*オペロンについては、細胞膜表層機能に関係するという一般的な機能の共通性があるだけであり、YycFGが細胞内でどのような役割を担っているのか、その全体像は今後の研究課題として残された。マクロアレイでは対数増殖期の細胞において約2000の遺伝子のシグナルは検出されず、この中にYycFGが転写制御を行う必須遺伝子が存在する可能性も考えられる。一方、配列特異性が低いDNA結合蛋白質であるAbrBやヒストン様蛋白質Hbsuが、枯草菌の対数増殖期の転写制御においても重要な役割を持っている。YycFGも、AbrBやHbsuと同様に、増殖に必須な特定遺伝子の発現を制御するのではなく、グローバルな転写制御因子として機能している可能性も、興味深いモデルとして考えられる。今後、本研究で同定したYycFの結合配列に基づき、全ゲノム上のYycFの結合部位を同定することでYycFGによる細胞機能制御の全容が明らかにされると考えられる。

2. 材料と方法

2.1. 枯草菌使用菌株

本研究に用いた枯草菌株および大腸菌株を表1に示した。UOT-1850は、朝井計博士（埼玉大学）より頂いた。MO179, MO179, MO718および MO1027は Stragier博士（Institut de Biologie Physico-Chimique）より頂いた。*sigD-lacZ*株は小倉光雄博士（東海大学）より頂いた。LAB295株は、Zuber博士(オレゴン大学院)より頂いた。

2.2. 使用したプラスミド

本研究に用いたプラスミドを表2に示した。また、プラスミドに組み込むDNA断片の増幅に用いた合成DNAプライマーの配列を表3に示した。

・ pMutinT3（Vagner, V, 1998; 図7）

pMutinT3は枯草菌染色体組込み型プラスミドであり、ファージ SPO 1 由来のプロモーターに大腸菌 LacI 蛋白質の結合配列を付加した *spac* プロモーターと、それを制御するために枯草菌で発現するように N末端の配列を改変した大腸菌 *lacI* 遺伝子、同様にN末端の配列を改変した対象遺伝子の発現量の測定のためのβ-ガラクトシダーゼをコードする大腸菌 *lacZ* 遺伝子、プラスミドが枯草菌染色体上に組み込まれた際、*spac* プロモーターへの余分な転写の流れ込みを押さえるためのλファージ由来のターミネーターT0および大腸菌 *rrnB* 由来のターミネーター T1および T2、枯草菌での選択マーカーとしてエリスロマイシン耐性遺伝子、大腸菌での選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子をそれぞれ持っている。

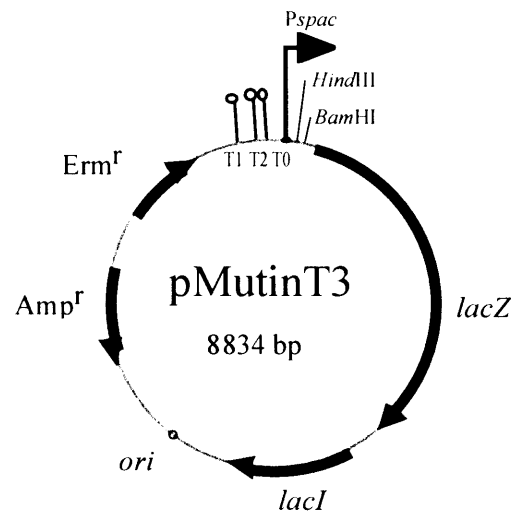


図7. 枯草菌染色体組込み型プラスミドpMutinT3の構造

Pspac: *spac*プロモーター、*lacZ*: βガラクトシダーゼ遺伝子、*lacI*: 大腸菌由来lac オペロンのDNA結合型抑制蛋白質をコードする*lacI* 遺伝子、*ori*: pBR322由来複製開始点(Sutcliffe, J. G. 1979)、*Amp^r*: β-ラクタマーゼをコードしているアンピシリン耐性遺伝子、*Erm^r*: エリスロマイシン耐性遺伝子、T0: ラムダファージ由来ターミネーター (Szybalski et al., 1979)、T1, T2: 大腸菌*rrnB*遺伝子由来ターミネーター(Brosius et al., 1980)

表1. 使用した菌株

株の名前	遺伝型と説明	作成方法又は文献*
<i>B. subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	Pasteur lab. stock
NIS8033	<i>trpC2 yycF</i> ::pKF011(Pspac- <i>yycFG erm</i>)	pKF011→168
NIS8032	<i>trpC2 yycG</i> ::pKF012(Pspac- <i>yycG erm</i>)	pKF012→168
NIS8031	<i>trpC2 yycH</i> ::pKF003(Δ <i>yycH erm</i>)	pKF003→168
NIS8030	<i>trpC2 yycI</i> ::pKF004(Δ <i>yycI erm</i>)	pKF004→168
NIS8029	<i>trpC2 yycJ</i> ::pKF005(Δ <i>yycJ erm</i>)	pKF005→168
NIS8028	<i>trpC2 yyyA</i> ::pKF006(Δ <i>yyxA erm</i>)	pKF006→168
NIS5000	<i>trpC2 yycH-yyxA</i> ::pKF007(Δ <i>yycHIJ ΔyyxA, erm</i>)	pKF007→168
UOT-1850	<i>trpC2 spo0H ΔHB lysA1 pheA1 aprE Δ3 nprE18 nprR2</i>	Asai, <i>et al.</i> , 1995
MO179	<i>trpC2 pheA1 spoIIAC</i> :: <i>kan</i>	Shazand, <i>et al.</i> , 1995
MO1781	<i>trpC2 pheA1 spoIIIGAB</i> :: <i>kan</i>	Shazand, <i>et al.</i> , 1995
MO718	<i>trpC2 pheA1 spoIIIG</i> :: <i>kan</i>	Sun, <i>et al.</i> , 1989
MO1027	<i>trpC2 pheA1 spoIVVB</i> :: <i>erm</i>	Kunkel, 1990
NIS5101	<i>trpC2 spo0H ΔHB</i>	168+UOT-1850
NIS5102	<i>trpC2 spoIIAC</i> :: <i>kan</i>	168+MO179
NIS5103	<i>trpC2 spoIIIGAB</i> :: <i>kan</i>	168+MO1781
NIS5104	<i>trpC2 spoIIIG</i> :: <i>kan</i>	168+MO718
NIS5105	<i>trpC2 spoIVB</i> :: <i>erm</i>	168+MO1027
MO566	<i>trpC2 pheA1 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1-lacZ cat</i>	Stragier
MO685	<i>trpC2 pheA1 amyE</i> :: <i>ftsAZ P2-lacZ cat</i>	Stragier
MO531	<i>trpC2 pheA1 amyE</i> :: <i>ftsAZ P3-lacZ cat</i>	Stragier
MO1097	<i>trpC2 pheA1 amyE</i> :: <i>ftsAZ P123-lacZ cat</i>	Stragier
NIS5001	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1-lacZ cat</i>	168+MO566
NIS5002	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P2-lacZ cat</i>	168+MO685
NIS5003	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P3-lacZ cat</i>	168+MO531
NIS5004	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P123-lacZ cat</i>	168+MO1097
NIS5005	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1(-138 to +30)-lacZ cat</i>	pKF101→168
NIS5006	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1(-130 to +30)-lacZ cat</i>	pKF102→168
NIS5007	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1(-118 to +30)-lacZ cat</i>	pKF103→168
NIS5008	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1(-108 to +30)-lacZ cat</i>	pKF104→168
NIS5009	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1(-92 to +30)-lacZ cat</i>	pKF105→168
NIS5010	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1(-77 to +30)-lacZ cat</i>	pKF106→168
NIS5011	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1(-59 to +30)-lacZ cat</i>	pKF107→168
NIS5012	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>ftsAZ P1(-45 to +30)-lacZ cat</i>	pKF108→168
NIS5013	<i>trpC2 ftsA</i> ::pKF040(Δ <i>ftsA P1 erm</i>)	pKF040→168
NIS5014	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>PpycF-bgaB cat</i>	pKF109→168
<i>sigD</i> - <i>lacZ</i>	<i>trpC2 sigD</i> ::pMutinT3- <i>sigD</i> 3'(<i>sigD-lacZ erm</i>)	Ogura, M.
NIS5015	<i>trpC2 sigD</i> ::pMutinT3- <i>sigD</i> 3'(<i>sigD-lacZ erm</i>)	168+ <i>sigD-lacZ</i>
NIS5016	<i>trpC2 amyE</i> :: <i>rbsR P(-159 to +71)-lacZ cat</i>	pKF044→168
NIS5017	<i>trpC2 ftsE</i> ::pKF043(Pspac- <i>ftsE erm</i>)	pKF043→168
NIS5018	<i>trpC2 ftsE</i> ::pKF041(Δ <i>ftsE erm</i>)	pKF041→168
NIS5019	<i>trpC2 ftsX</i> ::pKF042(Δ <i>ftsX erm</i>)	pKF042→168
LAB295	<i>pheA1 sfp srfA</i> ::Tn917- <i>lacZ</i> (<i>srfA-lacZ erm</i>)	Nakano <i>et al.</i> , 1991
NIS5020	<i>trpC2 sfp srfA</i> ::Tn917- <i>lacZ</i> (<i>srfA-lacZ erm</i>)	168+LAB295
<i>E. coli</i>		
c600	<i>supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	laboratory stock
DH5 α	<i>supE44 Δlac U169(ϕ 80lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 glrA96 thi-1 relA1</i>	Takara
BL21(DE3)pLysS	F' <i>ompT hsdS_B (r_B m_B) gal dcm Δ(srl-recA)306</i> ::Tn10 (DE3) pLysS	Novagen

*→はプラスミドを用いた枯草菌野生株の形質転換を行い株を作成したことを示している。+は変異株より抽出した染色体を用いた枯草菌野生株の形質転換を行い株を作成したことを示している。

表2. 使用したプラスミド

プラスミド名	説明	文献
pMutinT3	枯草菌遺伝子変異株作成用のプラスミド	Vagner <i>et al.</i> (1998)
pKF001	FKF001 - FKR001 プライマーにより増幅した <i>yycF</i> 遺伝子の内部配列234 bp(24~257) をpMutin3 の <i>Bam</i> HI部 本研究 位に組み込んだプラスミド。	
pKF002	FKF002 - FKR002 プライマーにより増幅した <i>yycG</i> 遺伝子の内部配列487 bp(24~510) をpMutin3 の <i>Bam</i> HI部 本研究 位に組み込んだプラスミド。	
pKF003	FKF003 - FKR003 プライマーにより増幅した <i>yycH</i> 遺伝子の内部配列425 bp(23~447) をpMutin3 の <i>Bam</i> HI部 本研究 位に組み込んだプラスミド。	
pKF004	FKF004 - FKR004 プライマーにより増幅した <i>yycI</i> 遺伝子の内部配列349 bp(23~371) をpMutin3 の <i>Bam</i> HI部 本研究 位に組み込んだプラスミド。	
pKF005	FKF005 - FKR005 プライマーにより増幅した <i>yycJ</i> 遺伝子の内部配列360 bp(17~377) をpMutin3 の <i>Bam</i> HI部 本研究 位に組み込んだプラスミド。	
pKF006	FKF006 - FKR006 プライマーにより増幅した <i>yyxA</i> 遺伝子の内部配列526 bp(10~555) をpMutin3 の <i>Bam</i> HI 本研究 部位に組み込んだプラスミド。	
pKF007	FKF007 - FKR007およびFKF008 - FKR008 プライマーにより増幅した <i>yycH</i> 遺伝子上流 583 bp および <i>yyxA</i> 本研究 遺伝子下流570 bp をpMutin3 の <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF011	FKF011 - FKR001 プライマーにより増幅したSD配列および <i>yycF</i> 遺伝子の5'側配列337 bp(-80~257) を 本研究 pMutin3 の <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF012	FKF012 - FKR002 プライマーにより増幅したSD配列および <i>yycG</i> 遺伝子の5'側配列539 bp(-29~510) を 本研究 pMutin3 の <i>Bam</i> HI部位に組み込んだプラスミド。	
pRB373	pBR322 およびpUB110由来のシャトルベクター	Bruckner (1992)
pRBYycF	FKF021 - FKF022 プライマーにより増幅した <i>yycF</i> 遺伝子全長とその上流の制御領域1046bp(-330~711)を 本研究 pRB373の <i>Bam</i> HI部位に組み込んだプラスミド。	
pRBYycFD54H	<i>YycF</i> 蛋白質の54番目のアスパラギン酸をヒスチジンに置換する塩基置換変位を導入した <i>yycF</i> 遺伝子を 本研究 pRB373の <i>Bam</i> HI部位に導入したプラスミド。	
pDL2	pBR322 に大腸菌由来の <i>lacZ</i> 遺伝子と枯草菌の <i>amyE</i> 遺伝子の5'側および3'側の配列の一部を組み込んだプ 本研究 ラスミド。	
pDL'	pBR322 に <i>Bacillus stearothermophilus</i> 由来の耐熱性 β ガラクツシダーゼをコードする <i>bgaB</i> 遺伝子と枯草菌 本研究 の <i>amyE</i> 遺伝子の5'側および3'側の配列の一部を組み込んだプラスミド。	Yuan <i>et al.</i> (1995)
pKF100	FKF100-FKR100 プライマーにより増幅した <i>yycF</i> 遺伝子上流の制御領域321bpをpDL'の <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI部位に 本研究 組み込んだプラスミド。	
pKF101	FKF101-FKR101 プライマーにより増幅した <i>ftsAZ</i> のP1 プロモーター領域 (-138~+30)をpDL2の <i>Bam</i> HI- 本研究 <i>Eco</i> RI 部位に組み込んだプラスミド。	
pKF102	FKF102-FKR101 プライマーにより増幅した <i>ftsAZ</i> のP1 プロモーター領域 (-130~+30)をpDL2の <i>Bam</i> HI- 本研究 <i>Eco</i> RI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF103	FKF103-FKR101 プライマーにより増幅した <i>ftsAZ</i> のP1 プロモーター領域 (-118~+30)をpDL2の <i>Bam</i> HI- 本研究 <i>Eco</i> RI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF104	FKF104-FKR101 プライマーにより増幅した <i>ftsAZ</i> のP1 プロモーター領域 (-108~+30)をpDL2の <i>Bam</i> HI- 本研究 <i>Eco</i> RI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF105	FKF105-FKR101 プライマーにより増幅した <i>ftsAZ</i> のP1 プロモーター領域 (-92~+30)をpDL2の <i>Bam</i> HI- 本研究 <i>Eco</i> RI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF106	FKF106-FKR101 プライマーにより増幅した <i>ftsAZ</i> のP1 プロモーター領域 (-77~+30)をpDL2の <i>Bam</i> HI- 本研究 <i>Eco</i> RI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF107	FKF107-FKR101 プライマーにより増幅した <i>ftsAZ</i> のP1 プロモーター領域 (-59~+30)をpDL2の <i>Bam</i> HI- 本研究 <i>Eco</i> RI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF108	FKF108-FKR101 プライマーにより増幅した <i>ftsAZ</i> のP1 プロモーター領域 (-45~+30)をpDL2の <i>Bam</i> HI- 本研究 <i>Eco</i> RI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF040	FKF128 - FKR128およびFKF129 - FKR129 プライマーにより増幅した <i>ftsAZ</i> P1上流 209 bp (-319~-110) お 本研究 よび下流223 bp(+2~+224) をpMutin3 の <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI部位に組み込んだプラスミド。	
pET15b	大腸菌細胞内での蛋白質過剰発現用ベクター。	Novagen
pETYycF	FKF301 および FKR301 プライマーにより増幅した <i>yycF</i> 遺伝子全長 713 bp (1 to 711)をpET15bの <i>Nde</i> I- <i>Xho</i> I 本研究 部位に組み込んだ。	
pNO41	pBR322 およびpUB110由来のシャトルベクター	Moriya <i>et al.</i> (1988)
pNOYycF	FKF023 - FKR023 プライマーにより増幅した <i>yycF</i> 遺伝子全長796bpをpNO41の <i>Bam</i> HI部位に組み込んだプ 本研究 ラスミド	
pKF041	FKF110 - FKR111 プライマーにより増幅した <i>ftsE</i> 遺伝子の5'側配列とそのSD配列240 bp(-61~179) を 本研究 pMutin3 の <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF042	FKF112 - FKR112 プライマーにより増幅した <i>ftsE</i> 遺伝子の内部配列178 bp(2~179) をpMutin3 の <i>Hind</i> III- 本研究 <i>Bam</i> HI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF043	FKF113 - FKR113 プライマーにより増幅した <i>ftsX</i> 遺伝子の内部配列219 bp(4~223) をpMutin3 の <i>Hind</i> III- 本研究 <i>Bam</i> HI部位に組み込んだプラスミド。	
pKF044	FKF115-FKR115 プライマーにより増幅した <i>rbs</i> オペロンのプロモーター領域 (-159~+71)をpDL2の <i>Bam</i> HI- 本研究 <i>Eco</i> RI部位に組み込んだプラスミド。	

表3. 使用した合成DNAプライマー

プライマー名	配列*	枯草菌染色体上の位置**
FKF001	cgaggcagatctAGTAGATGATGAAAAACC	4153590...4153573
FKR001	cgaggcagatctgaattcTCTGAATCCTTAGCCGTC	4153357...4153374
FKF002	cgaggcagatctGTCGATCCAATTTAAGATTAC	4152872...4152852
FKR002	cgaggcagatctgaattcCATACTCGCGACAACGTAG	4152386...4152404
FKF003	cgaggcagatctCGATATTACTTACGGTAC	4151048...4151031
FKR003	cgaggcagatctgaattcGTATTCAAACGACTGATTAG	4150624...4150643
FKF004	cgaggcagatctCAATCTTCATCGTTGCC	4149694...4149678
FKR004	cgaggcagatctgaattcCAAGTGCCTGAGCATCG	4149346...4149363
FKF005	cgaggcagatctCGTACTTGGAGCGGGAG	4148835...4148818
FKR005	cgaggcagatctgaattcGCCGATCGTGGGAAACG	4148476...4148493
FKF006	cgaggcagatctACGAACGTGAGGAAGAAC	4147967...4147950
FKR006	cgaggcagatctgaattcCCCAGACTTCACTTTATCTGA	4147423...4147443
FKF007	caggaacagctatgacctcagGAGCGTATGATCCGGCTTG	4151623...4151605
FKR007	ccccgcgatccGACGACGAGTACCGTAAG	4151023...4151040
FKF008	aagccgaagcttCTCCGACAGCAATTAGG	4146799...4146782
FKR008	caggaacagctatgacctcagGTGTTAAGAAACACGGCC	4146230...4146248
FKF011	cgaggcagatctCCATTCTTTACATGGGCC	4153693...4153676
FKF012	cgaggcagatctGAGAAACCCAGAACAGGAC	4152924...4152906
FKF021	tgtaaaacgacggccagtaggatccGGCAAACATGAGGAGTG	4153943...4153927
FKR021	cgaggcagatctGGGCATTAGTCTGTTCTG	4152898...4152916
FKR022	CCGTCTTTATTTGGGAGCATAATATGTAAAGAATTAATCAGGC	4153429...4153473
FKF022	GCCTGATTTAATTTCTTTACATATTATGCTCCCAAATAAGACGG	4153473...4153429
FKF100	tgtaaaacgacggccagtaggatccGGCAAACATGAGGAGTG	4153943...4153927
FKR100	caggaacagctatgacctcagCCGAATGACTTCATTTC	4153629...4153646
FKF101	tttcggtgagaattcAGCCACATTCATTGTATTGTTGTTCC	1595797...1595822
FKF102	tttcggtgagaattcTTACACACTTGTAAAGCCACATTCATTGTATTGTTGTTCC	1595783...1595822
FKF103	cggtagaattcTCTGTTGTTATTTTTTGTACACAC	1595766...1595790
FKF104	cggtagaattcAAGCACATAAAATATTCTGTTG	1595750...1595772
FKF105	cggtagaattcAAACATAAAATGTGAAAGCAC	1595734...1595755
FKF106	cggtagaattcTTTTCAATAAACATAAAATGTGAAAGAC	1595726...1595753
FKF107	cggtagaattcGGATATAACGAATATTTTCAATAAAC	1595712...1595737
FKF108	cggtagaattcTATACATAGGATATAACGAATATTTC	1595704...1595730
FKR101	cgaggcagatctCATTCTATGGCACCTCCTC	1595872...1595854
FKF201	AAAAAATGTGATATAAAAGAGG	1595680...1595702
FKR201	AATGAATGTGGCTTTACAAG	1595809...1595790
FKF203	GAAATGGTATTTGTTCCGG	1595493...1595512
FKR203	AAATACAAGTCTACACCAAG	1595565...1595584
FKF128	ccgccgaagcttATATTATATTGGCAATAAGTTTAGC	1595524...1595548
FKR128	cggtagaattcATTGAAAATATTCGTTATATCC	1595733...1595712
FKF129	cggtagaattcATCGAAATGTGAGGAGGTG	1595844...1595862
FKR129	ccccgcgatccCTTTCAGCTTGGTCAAACG	1596066...1596048
FKF023	cgaggcagatctCCATTCTTTACATGGGCC	4153693...4153676
FKR023	cgaggcagatctGGGCATTAGTCTGTTCTG	4152898...4152916
T3F	TGTAAAACGACGGCCAGTTTGTGAGCGGATAACAATTA	(pMutinT3)
T3T7R	CAGGAACAGCTATGACCTAATACGACTACTATAGGGCGAGTGTATCAACAAGCTGGGGATC	(pMutinT3)
FKF301	tgtaaaacgacggccagtagatATGGATAAAAGATCCCTTGATG	4153610...4153589
FKR301	caggaacagctatgacctcagCATTAGTCTGTTCTGGG	4152901...4152918
pDLF	tgtaaaacgacggccagtCTTGATAATAAGGGTAAC	(pDL', pDL2)
FKF204	CTTGCCGAGTGCTGGCAAGG	3624788...3624769
FKR204	CGACAATTTATGACCCATTC	3624629...3624648
FKF111	cggtagaattcCTTGCCGAGTGCTGGCAAGGATGTTTTATGC	3624788...3624757
FKR111	ccccgcgatccGCTTTATATACTTCCTTCATC	3624539...3624559
FKF110	gccgaagcttAATGCATTGGAAGAGTATG	3624628...3624610
FKF112	gccgccgaagcttTGATAGAGATGAAGGAAG	3624566...3624549
FKR112	ccccgcgatccGTAGATTTACCTGCTCCGC	3624440...3624458
FKF113	gccgccgaagcttATTAATAATCTCGGGCGCC	3623885...3623867
FKR113	ccccgcgatccGTCTGTGCTTCTGATC	3623667...3623684
FKF114	TGTTCAAGAAATCTTCATCC	3700287...3700306
FKR114	TCCGAAGTTAGCAATAAAATATC	3700413...3700390
FKF115	cggtagaattcTGTTCAAGAAATCTTCATCCATATTG	3700287...3700313
FKR115	ccccgcgatccAACGCCCCGCGCTCCGGCG	3700506...3700488

*下線部は制限酵素の認識配列 (Bgl II : AGATCT, Eco RI : GAATTC, Xho I : CTCGAG, Hind III : AAGCTT, Bam HI : GGATCC) を示している。太字は人為的に導入した塩基置換変異配列を示している。**数字は枯草菌ゲノムデータベース上の配列番号を示している (<http://bacillus.tokyo-center.genome.ad.jp/>)。

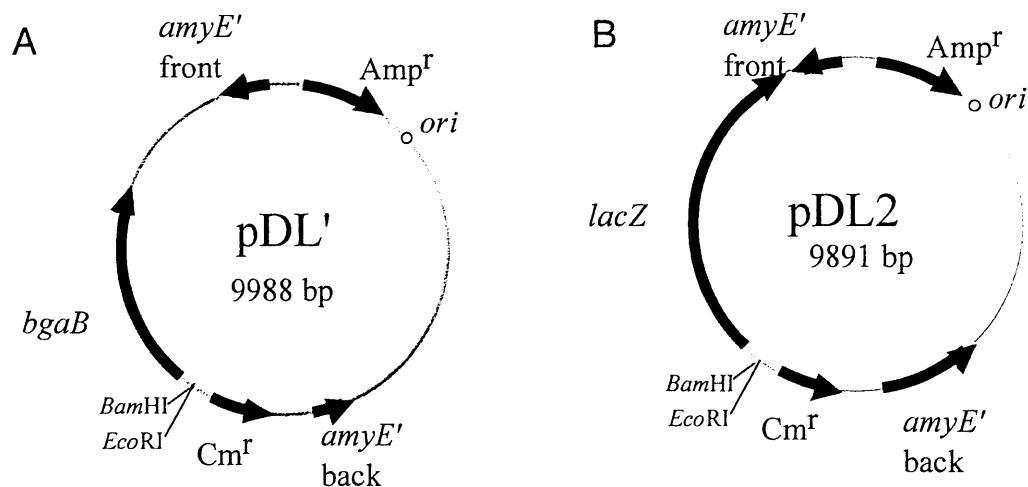


図8. 枯草菌*amyE*遺伝子部位組み込み用プラスミドpDL'およびpDL2の構造

A pDL', *bgaB*: 耐熱性バチルス *Bacillus stearothermophilus* の β ガラクトシダーゼをコードするレポーター遺伝子、*amyE front*: 枯草菌 α -アミラーゼ遺伝子の5'側518 bp、*amyE back*: 枯草菌 α -アミラーゼ遺伝子の3'側1016 bp、*ori*: pBR322由来複製開始点(Sutcliffe, J. G. 1979)、*Amp^r*: β -ラクタマーゼをコードしているアンピシリン耐性遺伝子、*Cm^r*: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードするクロラムフェニコール耐性遺伝子。

B pDL2', *lacZ*: 大腸菌由来 β ガラクトシダーゼ遺伝子。

・ pDL' (Yuan, G. & Wong, S.L., 1995; 図8.A)

pDL'は枯草菌 *amyE*遺伝子部位組み込み用プラスミドであり、耐熱性バチルス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来の β -ガラクトシダーゼをコードする *bgaB*遺伝子をプロモーター活性測定のためのレポーター遺伝子として持っている。また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、大腸菌での選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を持っている。

・ pDL2 (Fukuchi, K *et al.*, 2000; 図8.B)

pDL2は*lacZ*遺伝子を含むpMutinT3の*Bam*HI-*Sac*I断片をpDL'の*Bam*HI-*Sac*I制限酵素認識部位に挿入した*amyE*遺伝子部位組み込み用プラスミドである。

・ pRB373 (Bruckner, R. *et al.*, 1992; 図9. A)

pRB373は *Staphylococcus aureus* のマルチコピープラスミドpUB110とpBR322の融合プラスミドであり、枯草菌内でのコピー数は50 copy/genome である。枯草菌での選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子、大腸菌での選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を持っている。

・ pNO41(Moriya, S. *et al.*, 1988; 図9. B)

pNO41も *Staphylococcus aureus*のマルチコピープラスミドpUB110とpBR322の融合プラスミドであり、枯草菌細胞内でのコピー数は染色体当たり50 copyである。枯草菌での選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子、大腸菌での選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子を持っている。

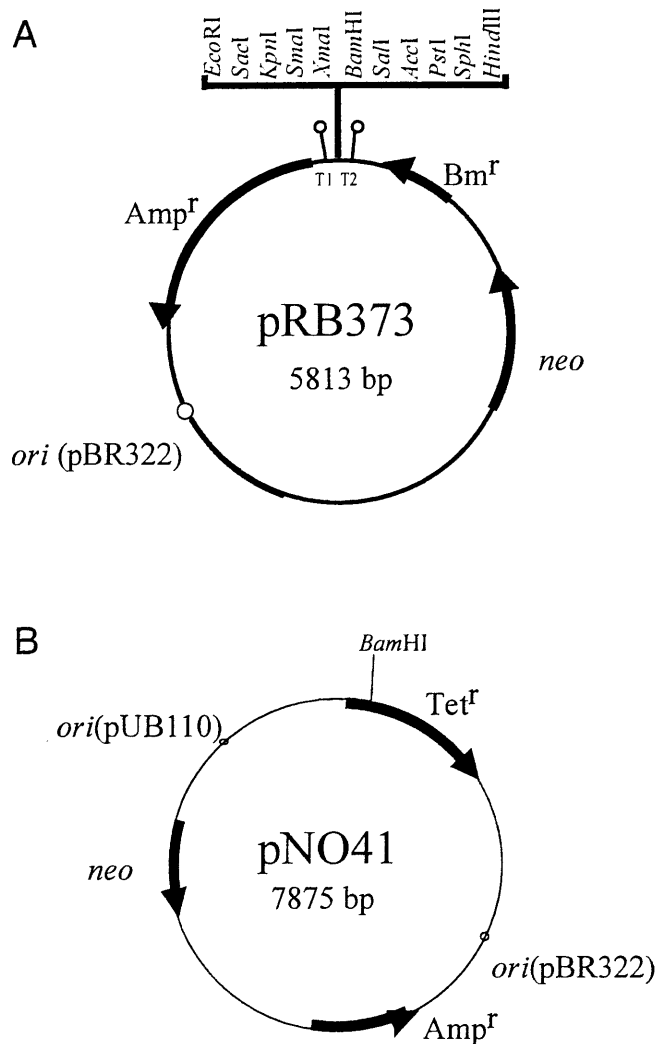


図9. 枯草菌マルチコピープラスミドpRB373およびpNO41の構造

A pRB373, *neo*: ネオマイシンおよびカナマイシン耐性遺伝子、*Bm^r*:ブレオマイシン耐性遺伝子、*ori*(pBR322): pBR322由来複製領域(Sutcliffe, J. G. 1979)、*ori*(pUB110): pUB110(Gryczan TJ, *et al.* (1978)由来複製領域、*Amp^r*: β -ラクタマーゼをコードしているアンピシリン耐性遺伝子、T0, T2: ラムダファージ由来ターミネーター(Szybalski *et al.*, 1979)

B pNO41, *Tet^r*: テトラサイクリン耐性遺伝子

2.3. PCR ligationによる変異導入

YycF蛋白質リン酸基受容部位への変異導入（54番目のアスパラギン酸をヒスチジンに置換）は、塩基置換変異(GAT→CAT)を導入したプライマー FKF022およびFKR022を用い、PCRライゲーション法(Bruce *et al.*, 1993)により行った（図10）。まず、枯草菌168株の染色体DNAを鋳型とし、プライマー FKF021およびFKR022を用いてPCRを行った（図10, PCR1）。別のチューブでプライマー FKF022およびFKR021を用いて同様にPCRを行った（図10, PCR2）。得られた2つのDNA断片をTaKaRa Recotip(TaKaRa)を用いて精製後、これを鋳型として、再度プライマー FKF021およびFKR021を用いてPCRによるライゲーションを行った（図10, PCRライゲーション）。

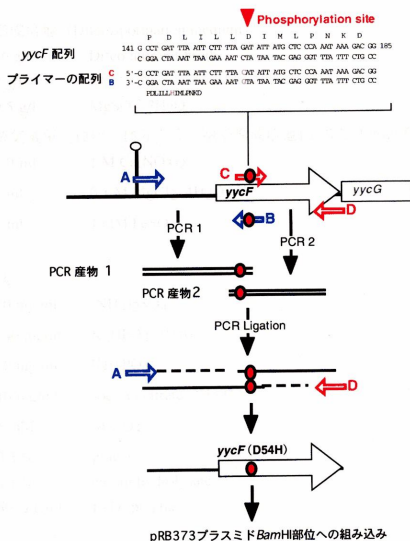


図10. PCRライゲーションによる変異導入

プライマー A: FKF021, B: FKR022, C: FKF022, D: FKR021

2.4. 使用培地

実験に使用した培地を下記に示した。また、必要に応じて、高圧蒸気滅菌（121℃, 15分）後の培地にエリスロマイシン 0.5 μ g/ml、カナマイシン 1 μ g/mlあるいは0.1～1 mM IPTGを添加して実験に用いた。

・ LB培地

10 g/l	Bacto Tryptone (Difco)
5 g/l	Bacto Yeast Extract (Difco)
5 g/l	NaCl

寒天プレート培地を作成するには、15 g/l の agar を加えた。

・ 孢子形成培地 (Difco sporulation medium)

16 g/l	Difco nutrient broth
2 g/l	KCl
0.5 g/l	MgSO ₄ ·7H ₂ O

高圧蒸気滅菌（121℃, 15分）後、孢子形成培地1 L当たり下記の溶液を添加した。

1.0 ml	1 M Ca(NO ₃) ₂
1 ml	0.1 M MgCl ₂ ·4H ₂ O
1 ml	1 mM FeSO ₄

・ CI培地

20 mg/ml	(NH ₄) ₂ SO ₄
140 mg/ml	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O
60 mg/ml	KH ₂ PO ₄
10 mg/ml	sodium citrate·2H ₂ O
5 mM	MgSO ₄
0.5 %	glucose
0.1 %	casein hydrolysate
50 μ g/ml	L-Tryptophan

・ CII 培地

20 mg/ml	(NH ₄)SO ₄
140 mg/ml	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O
60 mg/ml	KH ₂ PO ₄
10 mg/ml	sodium citrate·2H ₂ O
5 mM	MgSO ₄
0.5 %	glucose
0.03 %	casein hydrolysate
10 μg/ml	L-Tryptophan

・ グルコース-グルタミン合成培地 (1 L 当たり)

200 ml	5 x Minimal salt solution (autoclaved)
20 ml	20 % glucose (autoclaved)
5 ml	1 % L-tryptophane (filtration)
50 ml	4 % L-glutamine (filtration)
2 ml	FeCl ₃ 2 mg/ml (filtration)
2 ml	MgSO ₄ 0.1 Mg/ml (filtration)
10 ml	100 x trace element (autoclaved)

プレートを作成するには、15 g/l の agar を加えた。

・ 5 x Minimal salt solution

57 mM	K ₂ SO ₄
310 mM	K ₂ HPO ₄ ·5H ₂ O
220 mM	KH ₂ PO ₄
17 mM	Na-citrate·7H ₂ O
4 mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O

10 N NaOH を用いて pH 7 に調整した。

・ 100 x trace element

0.55 g/ml	CaCl ₂
0.17 g/ml	ZnCl ₂
0.043 g/ml	CuCl ₂ ·2H ₂ O

0.06 g/ml $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.06 g/ml $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

・ SMMP 培地

2 x SMM と 4 x PAB を等量混合した。

・ 2 x SMM

342 g/l sucrose

8.12 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

4.72 g/l NaCl

1N NaOH 溶液の添加により pH 6.5 に調整した。

・ 4 x PAB

7 g/100 ml Bacto penassay broth (Difco antibiotic medium no.3)

・ 0.7% TBAB

0.7 g/100 ml TBAB(Difco)

2.5. 大腸菌の形質転換およびプラスミド DNA の調製

プラスミド DNA はエレクトロポレーションにより、大腸菌 C600, DH5 α あるいは BL21(DE3)pLysS 株に導入した。形質転換体は、アンピシリン ($50 \mu\text{g/ml}$) を含む寒天平板上で選択した。組換え体プラスミド DNA はアルカリ溶菌方法 (Sambrook *et al.*, 1989a) で抽出した。

2.6. 塩基配列の決定

プラスミド中の挿入 DNA に変異がないことを確認するため、塩基配列の決定を行った。まず、ABI 蛍光プライマーの配列を 5' 末端に付加したプライマーによりプラスミドに挿入された DNA 断片を PCR により増幅し、PEG 沈殿 (Dunn & Blattner, 1987) により精製した。得られた DNA 断片を鋳型として ABI PRISM Dye Primer Cycle sequencing Ready Reaction Kit FS (Perkin ELmer) を用いて Cycle Sequencing 反応を行い、ABI 373S 型シーケンサーで塩基配列を決定した。

2.7. 枯草菌の形質転換

枯草菌の形質転換は Anagnostopoulos らの方法に従って行った (Anagnostopoulos &

Spizizen, 1961)。形質転換には約 1 μ g の DNA あるいは 100 ng の枯草菌染色体を用いた。形質転換体は抗生物質を添加した LB プレートで選択した。

・ 枯草菌の形質転換は以下の手順で行った。

枯草菌株を LB プレート上で、30 $^{\circ}$ C で一晩前培養を行う。

5 ml CI 培地に細胞を懸濁し、定常期まで 37 $^{\circ}$ C で振とう培養を行う。

集菌後、2 倍量の CII 培地に懸濁し、30 min 振とう培養を行う。

培養液 200 μ l に DNA 1 μ g または 100 ng を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振とう培養を行う。

適当な抗生物質を含む LB プレートにて一晩培養を行う。

抗生物質は以下の濃度で用いた。

エリスロマイシン	0.5 μ g/ml
クロラムフェニコール	0.5 μ g/ml
カナマイシン	5 μ g/ml

また、必要な場合には、0.1~1 mM IPTG を添加した。

2.8. 枯草菌染色体 DNA の調整

Marmur の方法(1961)に従い、枯草菌細胞から染色体 DNA を抽出した。枯草菌を LB 培地にて 37 $^{\circ}$ C で振とう培養し、OD(600)が 1.0 の時点で集菌した。得られた菌体をリゾチーム処理した後、フェノール-クロロフォルム抽出を行った。染色体 DNA を含む水相にエタノールを加え、界面に析出した染色体 DNA をガラス棒に巻き付けて回収した。回収した DNA はエタノールで洗浄後、TE 緩衝液に溶解し、DyNA Quant 200 (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて DNA 濃度を測定した。

2.9. サザンハイブリダイゼーション (Southern, 1975)

枯草菌染色体 DNA 500 ng を制限酵素で消化後、エチジウムブロマイドを含む 1xTAE, 1 % アガロースゲルを用いて電気泳動し、DNA 断片を分離した。分離した DNA 断片は変性・中和処理後、ナイロンメンブレン Hybond N+(Amersham Pharmacia Biotech)にトランスファーした後(Maniatis, *et al.*, 1989-c)、80 $^{\circ}$ C, 3 時間加温し、DNA をメンブレンに固定した。ハイブリダイゼーション、プローブの標識及びシグナルの検出は、ECL direct nucleic acid labelling and detection systems (Amersham Pharmacia Biotech)のマニュアルに従い行った。

2.10. ノーザンハイブリダイゼーション

2.10.1. RNAの抽出

枯草菌株を孢子形成培地でOD(600)=0.01から培養し、経時的に 20 OD(600) 量の菌体を集菌し、-80°Cで保存した。得られた枯草菌細胞から Igo & Losick の方法 (1986) に従い全 RNAを抽出した。凍結した菌体を 0.55 ml の LETS buffer (0.1 M LiCl, 10 mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % SDS) に懸濁した後、0.5 ml のガラスビーズ (井内盛栄堂 BZ-04) および 0.5 ml の水飽和 phenolを加え、4分間攪拌を行い、9000 rpm で5 分間遠心した。上層 0.4 ml に、0.4ml のphenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)を加え、2 分間攪拌した。遠心後、上層を 0.3 ml とり、別のチューブに移し、4M LiCl を 15 μ l、2.5 倍量のEthanol を加え、14500 rpm , 10 分間遠心した。沈殿を1 ml の70 % ethanol で洗浄後、遠心 (14500 rpm , 5 分間) し、沈殿を真空乾燥した後、300 μ l の 0.1 % DEPC 水に溶解し、3 倍量の4 M NaOAc (pH 6.0)を加えた。試料を -20°Cで 1 時間以上放置した後、遠心し、沈殿を 70 % ethanol で洗浄した後、100 μ l の 0.1 % DEPC 水に溶解した。回収したRNA はTE 緩衝液に溶解した後、260 nmにおける吸光度を測定し RNA 濃度を求めた。

2.10.2. 電気泳動およびメンブレンへのブロット

1 %ホルムアルデヒド・1%アガロースゲルを用いて10 μ gの全RNAを電気泳動により分離した(Sambrook *et al.*, 1989-c)。電気泳動により分離した全RNAは、10xSSC溶液 (1.5 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0) 中でナイロンメンブレン Hybond N+(Amersham Pharmacia Biotech)にブロットした(Maniatis, *et al.*, 1989-c)。UVクロスリッサーUV Stratalinker 1800 (STRATAGENE) を用いてメンブレンにRNAを固定した。

2.10.3. ディ ゴキシゲニン標識RNAプローブの作製

ディ ゴキシゲニン標識RNAプローブおよびシグナルの検出の作製は、DIG Labeling Kit (SP6/T7) (Roche) のマニュアルに従った。目的遺伝子の内部配列を組み込んだ pMutinT3プラスミド (pKF001~006) を鋳型としてT3F-T3T7Rプライマーを用いてPCR反応を行い、得られたPCR産物を鋳型として T7RNA RNA ポリメラーゼを用いて逆転写反応を行い、ディ ゴキシゲニン標識RNAプローブの作製した。

2.10.4. ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出は、DIG化学発光検出キット (Roche) に付属のマニュアルに従って行った。ハイブリダイゼーション溶液 {5xSSC, 0.1 % ラウロイルサルコシン・ナトリウム, 0.02% SDS, 2%ブロッキング試薬 (Roche) , 50%ホルムアミド} 中, 70℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。シグナルの検出にはDIG化学発光検出キット (Roche) を用いた。

2.11. 生菌数および孢子形成率の測定

2.11.1. 生菌数の測定

細胞をLB培地あるいは孢子形成培地 (Difco)で培養を行った後、同じ培地で $10^3 \sim 10^9$ 倍に希釈し、必要に応じて抗生物質およびIPTGを添加したLBプレートに植菌し37℃で一晩培養後、得られたコロニー数を生菌数とした。

2.11.2. 孢子形成率 (耐熱性孢子数/生菌数) の測定

細胞を孢子形成培地 (Difco)で培養を行い、その培養液を80℃で10分間加熱処理した後、孢子形成培地 (Difco)で $10^3 \sim 10^9$ 倍に希釈し、抗生物質および必要に応じてIPTGを添加したLBプレートに植菌し37℃で一晩培養した。得られたコロニー数を耐熱性孢子数とした。

2.12. 蛍光顕微鏡による細胞形態および染色体の観察

2.12.1. 試料の調整

前培養した菌株を抗生物質及び必要に応じてIPTGを添加したLB培地にO.D600=0.01になるよう植菌し、37℃で振とう培養し、O.D600=0.4に達した時点で、10倍希釈し培養を続けた。対数増殖期(O.D600=0.4)の培養液 500 μ lから集菌し、10 mM Tris-HCl (pH 7.3)で洗浄した後、100 μ lの 10 mM Tris-HCl (pH 7.3) で再懸濁し、77 %のエタノールを1 ml加え4℃で一晩固定処理した。

2.12.2. 蛍光顕微鏡観察

固定後の細胞 100 μ lを集菌し、20 μ lの10mM Tris-HCl (pH 7.3)に再懸濁した後、Poly-Lysine 処理したスライドガラス上に塗布し、DAPI (1 μ g/ml in 50% glycerol, 150 mM NaCl)で染色した。細胞の形態および染色体の観察には位相差装置付き落射蛍光

顕微鏡BX50-FLA-PDH（オリンパス）を使用した。顕微鏡画像の取り込みはCCDカメラCCD5810（浜松ホトニクス）を用いた。細胞長の測定には、顕微鏡画像解析ソフトウェアMacSCOPE ver. 2.58（MITANI）を用いた。

2.13. β ガラクトシダーゼ活性の測定

Yangmanらの方法（Youngman, P., *et al.*, 1985）に従い細胞内の β ガラクトシダーゼ活性の測定を行った。

2.13.1. 菌体の調製

LB培地あるいは孢子形成培地で培養した細胞を集菌した後、液体窒素で凍結し、 -30°C で保存した。

2.13.2. 酵素反応

4-メチルウンベリフェリル- β -ガラクトシド（MUG; sigma）を β -ガラクトシダーゼの活性測定の基質として用いた。MUG は β ガラクトシダーゼにより加水分解され、4-メチルウンベリフェロン（4MU）を生産する。凍結保存された細胞を $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ DNaseIおよび $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 卵白リゾチーム（SEIKAGAKU CORPORATION）を含む $0.3\sim 1\text{ ml}$ Z buffer ($60\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $40\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl , $1\text{ mM MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM DTT)に懸濁した後、 37°C 、20分間の加温を行い溶菌した。遠心分離（ 14000 rpm , 15分間）を行い、得られた上清 $50\text{ }\mu\text{l}$ に $10\text{ }\mu\text{l}$ の 0.4 mg/ml MUGを加え攪拌した後、 28°C で5～50分間反応させた。 95°C 、5分間の加温により反応を停止した。4MU濃度は、Labsystems Fluoroskan II（大日本製薬株式会社）を用いて測定した。このアッセイ法では、菌体蛋白量 1 mg を用いた時、1分間で 1 pmol の MUGを加水分解する β ガラクトシダーゼの酵素活性を1単位とした。蛋白質濃度の測定には、Protein Assay Reagent（Bio Rad）を用いた。標準蛋白質として牛アルブミン蛋白質（SIGMA）を用いた。

2.13.3. 耐熱性 β ガラクトシダーゼ (BgaB) 活性の測定

耐熱性 β ガラクトシダーゼ BgaB 活性の測定は、酵素反応温度 63°C 、反応停止温度 0°C （氷上）の条件で行った。他の操作については β -ガラクトシダーゼの活性測定と同様に行った。

2.14. 蛋白質二次元ゲル電気泳動法

2.14.1 試料の調整

pRB373, pRBYycFあるいはpRBYycFD54Hプラスミドを導入した枯草菌を $10\mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含むLBプレート培地に植菌し 30°C で一晩前培養した。 $1\mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含む 10 ml の孢子形成培地 (Difco) に $\text{O.D600}=0.01$ となるように植菌した。 37°C で振とう培養を行い、 O.D600 が 0.2 に達した時点で $1\mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含む孢子形成培地に 10 倍希釈し、再び O.D600 が 0.2 まで培養した。この培養液 10 ml を集菌し、 10 mM Tris-HCl ($\text{pH } 8.0$)に再懸濁し、 $10\mu\text{ l}$ の 10 mg/ml リゾチームを加え 37°C で 10 分間加温した後、 $90\mu\text{ l}$ の可溶化バッファー(9 M Urea, 2.2% Triton X-100, 2.2% 2-ME, 0.9% Pharmalyte($\text{pH } 3-10$): (Pharmacia), 0.9 mM PMSF)を混和し、遠心後、上清を二次元電気泳動用の試料とした。蛋白質濃度の測定は、Protein Assay Reagent (Bio Rad) を用いて行った。また、試料は -80°C で保存した。

2.14.2. 蛋白質二次元電気泳動

$10\mu\text{ g}$ の試料を蛋白質二次元電気泳動に用いた。二次元電気泳動はAmersham Pharmacia Biotech のMultiphor II-Dシステムを用いて行い、一次元目の等電点電気泳動は、immobiline DryStripゲル ($\text{pH } 4-7$) (Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。電気泳動は、 300 V , 0.1 mA , 5 W で 3 時間、次に 300 V , 1 mA , 5 W から 5 時間かけて 2000 V , 1 mA , 5 W に電圧を上げた後、さらに 8 時間行った。二次元目の電気泳動は、ExcelGel XL SDS 12-14 (Amersham Pharmacia Biotech)を用い、電気泳動はstep 1 (1000 V , 20 mA , 40 W , 35 分間), step 2 (1000 V , 40 mA , 40 W , 5 分間)およびstep 3 (1000 V , 40 mA , 40 W , $120\sim 160$ 分間)の条件で行った。電気泳動終了後、Silver staining kit (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて銀染色反応を行い蛋白質を検出した。

2.14.4. 蛋白質スポットの同定

1.8 mg の試料を用い蛋白質二次元電気泳動を行った後、セミドライブロットティング装置 (Nova Blot キット; Amersham Pharmacia Biotech) を用いてPVDF膜 (Trans-Blot Transfer Medium; BIO RAD) にエレクトロブロットした。CBB染色キットPhastGel Blue R (Amersham Pharmacia Biotech) で染色し、蛋白質スポットを検出した。メンブレンからスポットを切り出し、アミノ酸シーケンシングシステム 610A (ABI) により N 末端アミノ酸配列を決定した。なお、蛋白質のアミノ酸配列決定は、宮崎医科大学の中山建男教授、西 良子 氏に委託した。蛋白質の同定には、枯草菌全蛋白質のデータベース (BSORF: <http://bacillus.tokyo-center.genome.ad.jp:8008/BSORF-DB.html>) を用

いた。

2.15. PET SYSTEM(Novagen)によるYycF蛋白質の精製

大腸菌BL21(DE3)pLysS株に、*yycF*遺伝子の全長を組み込んだプラスミドpETYycFを導入し、アンピシリン (50 µg/ml) を含むLB培地100 ml 中で30℃, 280 rpmの条件で培養した。OD(600)が0.6に達した時点で終濃度1 mMとなるようIPTGを添加した後、3時間後に集菌した。PET SYSTEM(Novagen)のマニュアルに従い、得られた細胞からHis₆-YycF蛋白質を精製した。まず、細胞をbinding buffer (0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, 20 mM Tris/HCl pH 7.9) で洗浄した後、25 ml binding bufferに懸濁し、氷上で超音波による細胞破碎を行った。得られた細胞破碎液を4℃, 39000g 30分遠心し、その上清についてHis-Bind resin(Novagen)を充填したカラムによりHis₆-YycF蛋白質の精製を行った。カラムは10 ml binding buffer, 10ml washing buffer (0.5 M NaCl, 60 mM imidazole, 20mM Tris/HCl pH 7.9) で洗浄した後、0.1～1 M Imidazoleを含むbinding bufferで目的蛋白質を溶出した。得られた精製蛋白質を含む画分は終濃度10 %となるようグリセロールを加え、-80℃で保存した。試料中の蛋白質濃度の測定は、Protein Assay Reagent (Bio Rad) を用いて行った。

2.16. ゲルシフトアッセイ

プローブの作成とシグナルの検出はGel shift assay kit (Roche)のマニュアルに従って行った。ゲルシフトアッセイに用いたDNAプローブおよびその作成に用いたプライマーを表4に示した。PCRにより増幅した各DNAプローブは、TaKaRa RECOTIP

(Takara)にて精製後、末端をDIG Labeling Kit (Roche)によりディゴキシゲニン標識した。ゲルシフト反応は10µlの反応液中で行い、20 fmol プローブDNAを0～24 pmol 精製YycF蛋白質、0.5 µg Poly(dI-dC), 50 mM PIPES (pH 6.1), 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 4 mM DTT, 0.5 % Tween 20 および 10 % グリセロール存在下で25℃, 30分間加温した。反応終了後、2 µl のloading dye (0.1 % キシレンシアノール、40 % グ

表4.ゲルシフトアッセイに用いたプローブ

遺伝子と プロモータの名称	作成に用いた プライマー	size (bp)	転写開始点 からの位置	文献
<i>ftsA</i> P1	FKF201-FKR201	134	-168...-35	Gonzy-Treboul <i>et al.</i> ,1992
<i>ftsA</i> P3	FKF203-FKR203	93	-92...+1	Gonzy-Treboul <i>et al.</i> ,1992
<i>rbsR</i>	FKF114-FKR114	127	-149...-23	O'Reilly M., <i>et al.</i> ,1994
<i>ftsE</i>	FKF204-FKR204	150	不明	

リセロール、22.25 mM Tris, 20 mM ホウ酸、0.5 mM EDTA)を加え、0.5 x TBE, 5 % ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動は、70 V, 4℃で4 時間行った。電気泳動終了後、10xSSC溶液中でナイロンメンブレン Hybond N+(Amersham Pharmacia Biotech)にブロットした(Maniatis, *et al.*, 1989-c)。UVクロスリンカーUV Stratalinker 1800 (STRATAGENE) を用いて、メンブレンにDNAを固定した。シグナルの検出は、Gel shift assay kit (Roche)を用いて行った。

2.17. マクロアレイによる全転写産物の解析

YycFの制御下にある遺伝子群を明らかにするために、YycF過剰発現株の全RNAを鋳型としてcDNAプローブを作成し、枯草菌マクロアレイを用いて全遺伝子の転写解析を行った。対象として、ベクターのみを挿入した野生株[168(pNO41)]から抽出した全RNAを用いて同様の実験を行い、個々の遺伝子の転写量を比較した。

枯草菌のマクロアレイメンブレンは、シグマジェノシスのPanoramaTM *B. subtilis* Gene Arraysを用いた。PanoramaTM *B. subtilis* Gene Arraysは、枯草菌168株のゲノム上に見いだされた4107の全遺伝子のコード領域（2kbを上限とする）をPCRにより増幅し、その産物 5 ngを12x24 cmのナイロンメンブレン上にスポットし、紫外線により固定した枯草菌遺伝子DNAメンブレンである。

2.17.1. 全RNAの抽出

枯草菌株を 10 ml LB培地, 37℃浸透培養でOD(600)が 0.01から培養し、OD(600)が 0.4の時点で 37℃で予備加温した 400 ml のLBに全量を植菌し、37℃, 280 rpmで振とう培養した。OD 0.4の時点で 40 mlの培養液から集菌した後、10 mM Tris-HCl pH 7.5の緩衝液で細胞を洗浄し培地成分を完全に除いた。得られた細胞より、ノーザン解析と同様に、Igo & Losick の方法 (1986)に従い全 RNAを抽出した。得られた全 RNA 溶液から DNA を除くために、DNaseI による DNA の分解を行った。全 RNA 10 µg を 1x DNaseI buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂)中で 20 Uの DNaseI 10 U/µl(Amersham Pharmacia Biotech) を加え、37℃, 10分間加温後、フェノール-クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿により全RNAを回収した。

2.17.2. ³³P標識cDNAの合成

DNaseI 処理全RNAを鋳型としたcDNAの合成には、枯草菌全遺伝子のコード領域 3'末端に特異的なプライマーセット、*B. subtilis* cDNA labeling primer (SIGMA GENOSYS)、を用い、逆転写酵素としてTHERMOSCRIPTTMRT-PCR System (GIBCO)に含まれる熱安定性の逆転写酵素THERMOSCRIPTTMRT (GIBCO)を用いた。

3 µg 全RNAに4 µl *B. subtilis* cDNA labeling primer (SIGMA GENOSYS)を加え、全量15 µlとし、ヒートブロック上で90℃、2分間加温し、熱変性させた後、55℃まで徐々に温度を下げさらに20分間保温した。55℃で予備加温した反応液 {2 x cDNA Synthesis Buffer (50 mM Tris acetate pH 8.4, 375 mM potassium acetate, 40 mM magnesium acetate, stabilizer) 中に 22.2 mM dATP, 22.2 mM dGTP, 22.2 mM dTTP, 20 µCi[α - ^{33}P]dCTP (2000 Ci/mmol), 2 UのTHERMOSCRIPTTMMRTを含む} を加え、さらに55℃で加温した。反応液添加後から一時間後に、2 Uの THERMOSCRIPTTMMRTを添加し、さらに55℃で1時間反応した。その後、合成されたcDNAをNICK Spin Columns (Amersham Pharmacia Biotech)を用い未反応の基質を除いた後、 ^{33}P 標識cDNAプローブとして用いた。

2.17.3. ハイブリダイゼーション反応

ハイブリダイゼーションは、PanoramaTM *B. subtilis* Gene Arrays (SIGMA GENOSYS)に付属のマニュアルに従って行った。

枯草菌マクロアレイメンブレンPanoramaTM *B. subtilis* Gene Arrays (SIGMA GENOSYS)をハイブリダイゼーションボトル70φX300MM (ハイベイド) 中にて2xSSPE (0.36 M NaCl, 20 mM sodiumphosphate pH 7.7, 2 mM EDTA)によりリンスした後、65℃で予備加温した40ml HYBRIDIZATION SOLUTION (5 x SSPE, 2% SDS, 5x DENHARDT'S REAGENT*, 100 µg/ml sonicated, denatured salmon testes DNA)を加え、シェイク&スタックオープン (ハイベイド) 中で毎分6回転、65℃でプレハイブリダイゼーションを行った。1時間後、ボトル中の溶液を熱変性させた ^{33}P 標識cDNAプローブを含む10 ml HYBRIDIZATION SOLUTIONに交換し、約18時間ハイブリダイゼーションを行った。

*1xDENHARDT'S REAGENT (0.02% Ficoll, 0.02 % polyvinylpyrrolidone, 0.02 % BSA)

2.17.4. マクロアレイスポットの検出

ハイブリボトル中のHYBRIDIZATION SOLUTIONを捨て、マクロアレイメンブレンを40 ml WASH SOLUTION (0.5 x SSPE, 0.2 % SDS)により室温で3分間、2回洗浄した。その後、65℃で予備加温した100 ml WASH SOLUTIONにより65℃20分間、2回洗浄した後、バイオ・イメージングアナライザーBAS-5000(富士フィルム)によりマクロアレイスポットの検出を行った。

2.17.5. マクロアレイスポットの解析

マクロアレイスポットの解析はマクロアレイ解析ソフトウェア ArrayGauge Ver.

1.1(富士フィルム) により行った。得られたマクロアレイスポット画像をArrayGaugeにより数値化し、全スポット数値の総計に基づきその数値を標準化した。

2.18. DNaseI フットプリント

精製YycF蛋白質を用い *ftsA*, *rbsR*あるいは*srfAA*遺伝子上流の制御領域のDNaseIフットプリントを行った。プローブとして用いたDNA断片とその作成に用いたプライマーを表5に示した。

2.18.1. T4 Polynucleotide Kinaseによる合成プライマーの³²P標識

ftsA, *rbsR*あるいは*srfAA*遺伝子上流制御領域の前後に作成したフォワードあるいはリバースプライマー 10 pmoleについて、1 x Phosphorylation Buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT) 中で T4 Polynucleotide Kinase(10 U/μl) 1 μl (TaKaRa)により5'-末端を³²P標識した。基質として[γ-³²P] ATP (222 TBq, 6000 Ci/mmol, 0.37 MBq/μl) 5 μlを加え、10 μlの反応液中で37℃, 30分間反応を行った。その後、90℃、2分間の加熱により反応を停止した。

2.18.2. PCR反応によるプローブDNAの作成

5'-³²P標識プライマーと非標識のプライマーのペアを用いてPCR反応を行い、その産物をNICK Spin Columns (Amersham Pharmacia Biotech) により精製した後、DNaseI footprinting のプローブとして用いた。

表5. DNaseIフットプリントに用いたプローブ

遺伝子名	作成に用いた プライマー	size (bp)	転写開始点 からの位置	文献
<i>ftsA</i>	FKF101-FKR108	198	-138...+30	Gonzy-Treboul <i>et al.</i> ,1992
<i>rbsR</i>	FKF115-FKR115	294	-149...+121	O'Reilly M., <i>et al.</i> ,1994
<i>ftsE</i>	FKF111-FKR111	274	不明	

2.18.3. サイクルシーケンス反応によるシーケンスラダーの作成

5'-³²P標識プライマー1 pmole を用い、非標識のPCR産物をテンプレートとしてサイクルシーケンス反応を行い、シーケンスラダーを作成した。サイクルシーケンス反応には、TaKaRa TaqTM Cycle Sequence Kit (TaKaRa)を用いた。

2.18.4. YycF-DNA結合反応およびDNaseI部分分解反応

YycF-DNA結合反応は50 μ lの反応液中で行った。100 fmol, 約30000 cpm プローブDNAを0~24 pmol 精製YycF蛋白質、0.5 μ g Poly(dI-dC), 50 mM PIPES (pH 6.1), 200 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 4 mM DTT, 0.5 % Tween 20 および 10 % グリセロール存在下で25℃, 30分間加温した。反応終了後、2 UのDNaseI(FPLC精製、Pharmacia Biotech)を加え25℃、1分間反応させた後、100 μ lの20 mM EDTAを加えDNaseIを失活させた。さらに、フェーノール-クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によりプローブDNAを回収した。

2.18.5. 電気泳動とゲルイメージの検出

反応産物を5 μ l ホルムアミド色素液 (95 % 脱イオン化ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.05 % BPB, 0.05 % キシレンシアノール) に溶解した後、8M Urea- 6 % ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。電気泳動は、2500V, 25mA, 45Wの条件で2時間行った。泳動終了後、ゲルを3M濾紙上に置き、ゲルドライヤーで乾燥させた後、BAS-2500 IPプレートに一晩感光した。翌日、バイオ・イメージングアナライザーBAS-2500(富士フィルム)によるゲルイメージの検出を行った。

3. 結果

3.1. 遺伝子破壊による *yycFG* オペロンの機能解析の試み

新規 2 成分制御系をコードすると予想される *yycFG* とその下流の 4 遺伝子 *yycH*, *yycI*, *yycJ* および *yyxA* 遺伝子の機能解析を行うために、オペロン構造および発現時期の解析をノーザンハイブリダイゼーションにより行った。さらに、6 遺伝子すべてについて、破壊変異株作成を試みた。破壊株の得られた遺伝子については、遺伝子破壊変異株の孢子形成培地、LB 培地およびグルコース-グルタミン合成培地における生育を調べた。また耐熱性孢子形成率についても測定を行った。

3.1.1. *yycFGHIJ* および *yyxA* 遺伝子のオペロン構造および発現時期の解析

yycFGHIJ および *yyxA* 遺伝子のオペロン構造および発現時期を明らかにするために、ノーザンハイブリダイゼーションによる転写産物の解析を行った。まず、孢子形成培地で好氣的に培養した枯草菌 168 株を経時的に集菌し、得られた細胞より全 RNA を調整した。全 RNA は、アガロースゲル変性電気泳動により分離し、ナイロンメンブレンにブロットした後、*yycF*, *G*, *H*, *J* および *yyxA* 遺伝子の一部の配列をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った (図 11)。

プローブとして *yycF* および *yycG* 遺伝子の配列を用いた場合、約 7.4 kb と約 2.4 kb の転写産物が検出された (図 11; B, C)。約 7.4 kb の転写産物は対数増殖期初期に検出され (図 11; B, C 赤矢印)、約 2.4 kb の転写産物は対数増殖期から定常期初期にかけて検出された (図 11; B, C 緑矢印)。約 2.4 kb の転写産物は、*yycF*, *G* 遺伝子の合計のサイズ 2.5 kb より、若干小さい。このため、*yycG* 遺伝子の 3' 末端の配列をプローブとして同様にノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、約 7.4 kb の転写産物は検出されたが、約 2.4 kb の転写産物は検出されなかった (データは記載しない)。このことから、約 2.4 kb の転写産物は、*yycG* 遺伝子の C 末端近くで終結しており、転写の途中終結が起こっているか、オペロン全長が転写された後に修飾を受け切断されていることが示された。

yycH および *yycJ* 遺伝子のプローブを用いた場合では、対数増殖期に約 7.4 kb の転写産物のみが検出された (図 11; D, E)。*yyxA* 遺伝子のプローブを用いた場合では、対数増殖期の約 7.4 kb の転写産物に加え (図 11, F 赤矢印)、定常期後期に約 1.4 kb の転写産物が検出された (図 11, F 青矢印)。

以上の結果から、*yycFGHIJ* および *yyxA* 遺伝子は、一つのオペロンであり、対数

増殖期に発現することがわかった。また、*yyxA* 遺伝子は、定常期（孢子形成開始時期をT0とした場合T4）にも単独で発現することが明らかになった。

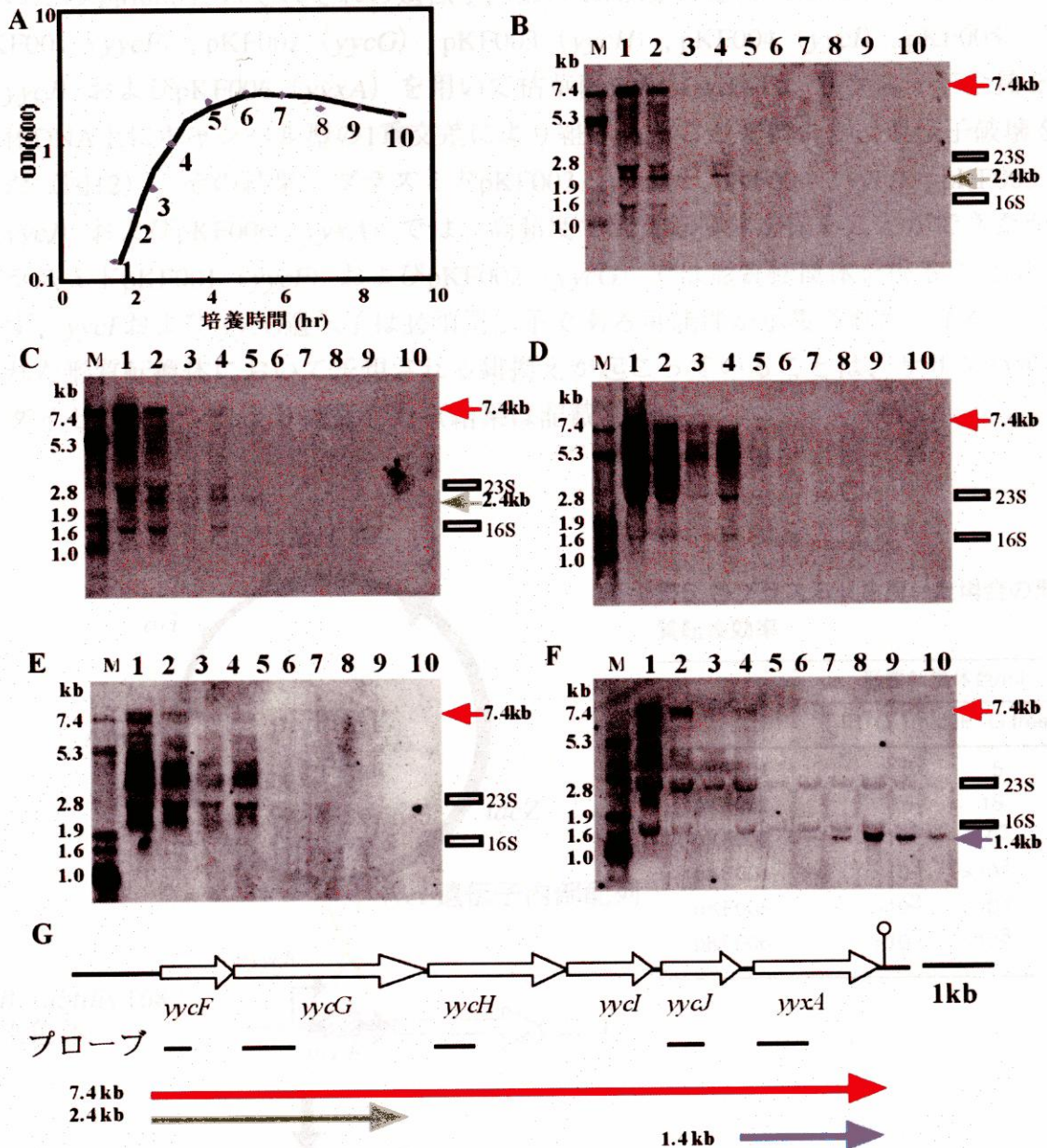


図11. *yycFG* オペロンの転写単位と発現時期の解析結果

A枯草菌168株の孢子形成培地での生育曲線。培養は、37℃浸透培養で行った。数字は、枯草菌168株からのRNAのサンプリング時期を示している。BCDEFノーザンハイブリダイゼーションの結果、レーンM:マーカー、レーン1から10はAの数字で示した時期のRNAを各10μgを1%アガロースゲル変性電気泳動した。矢印は確認されたバンドを示している。Bプローブ: *yycF*, Cプローブ: *yycG*, Dプローブ: *yycH*, Eプローブ: *yycJ*, Fプローブ: *yyxA*
Gノーザンハイブリダイゼーションによる転写解析により明らかになった転写単位を *yycFG* オペロンの図下に矢印で示した。プローブとして用いた配列部位を傍線で示した。

3.1.2. 遺伝子破壊変異株の作成

対数増殖期に発現が見られた *yycF*, *yycG*, *yycH*, *yycI*, *yycJ* および *yyxA* 遺伝子が枯草菌の増殖に必須であるかどうかを調べるために、これらの遺伝子の破壊を試みた。そのため pMutinT3 にそれぞれの遺伝子内部の DNA 断片を挿入したプラスミド pKF001 (*yycF*), pKF002 (*yycG*), pKF003 (*yycH*), pKF004 (*yycI*), pKF005 (*yycJ*) および pKF006 (*yyxA*) を用いて枯草菌を形質転換し、プラスミド全長を染色体 DNA 上にキャンベル型の 1 重交差により組み込むことをにより、遺伝子破壊を試みた (図 12)。その結果、プラスミド pKF003 (*yycH*), pKF004 (*yycI*), pKF005 (*yycJ*) および pKF006 (*yyxA*) では、高頻度で形質転換体を得ることができたが、プラスミド pKF001 (*yycF*) および pKF002 (*yycG*) では形質転換体を得ることができず、*yycF* および *yycG* 遺伝子は必須遺伝子である可能性が示唆された (表 6)。得られた形質転換体において予想される組換えが起こっていることは、サザンハイブリダイゼーションにより確認した (結果は記載しない)。

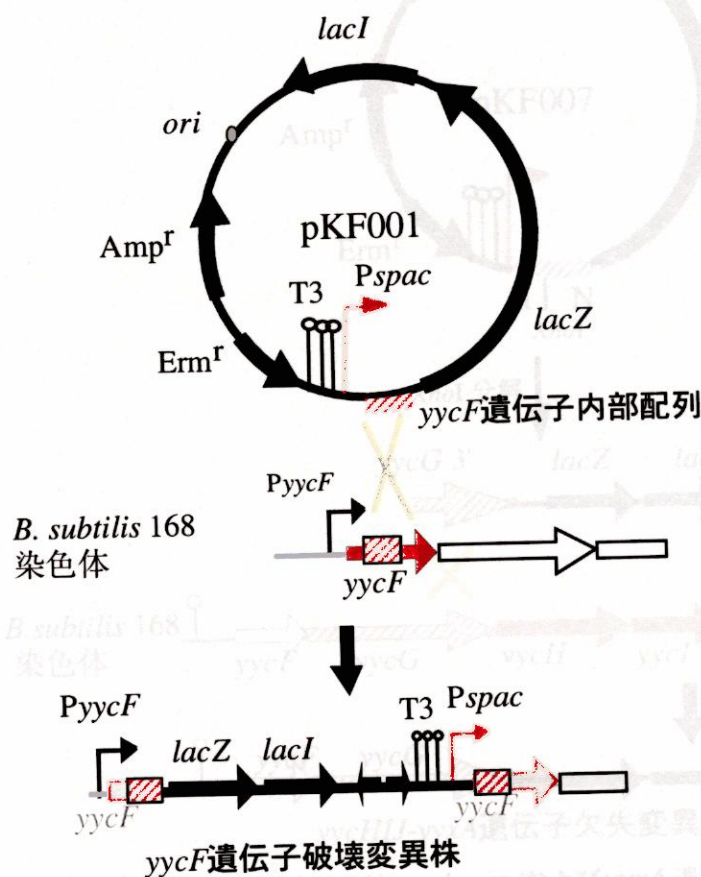


表 6. 各プラスミドを用いた場合の形質転換効率

Plasmid	形質転換体数/ml	
	IPTG 1mM	IPTG free
pKF001	5	5
pKF002	15	15
pKF003	>10 ³	>10 ³
pKF004	>10 ³	>10 ³
pKF005	>10 ³	>10 ³
pKF006	>10 ³	>10 ³

図 12. pMutinT3 を用いた遺伝子破壊変異株の作製

標的遺伝子の内部配列の一部を pMutinT3 に挿入し、得られたプラスミドを用いて枯草菌を形質転換し、相同組換えにより標的遺伝子内にプラスミドを挿入した。形質転換体は、0.5 μg/ml エリスロマイシンを含む LB プレートで培養を行い選択した。

yycH, *yycI*, *yycJ*, *yyxA* 遺伝子それぞれについての破壊変異株を得たが、これらの遺伝子を同時に欠失させた場合の影響を調べるために、*yycH*, *yycI*, *yycJ* および *yyxA* 遺伝子すべてを欠失した株の作成を行った (図13)。 *yycH* の上流配列と *yyxA* 下流の配列を組み込んだプラスミド pKF007 を *XhoI* で処理し、直鎖状にした DNA を用いて、枯草菌を形質転換したところ13の形質転換体を得た。得られた形質転換体の内4株について、ベクターをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、4株すべてにプラスミドの挿入が確認された (結果は記載しない)。 *yycH*, *yycI*, *yycJ* および *yyxA* 遺伝子の欠失を確認するために、得られた形質転換体の染色体 DNA を鋳型とし、各遺伝子内のプライマーを用いて PCR 反応を行い生成物を 1% アガロースゲルで電気泳動した。その結果、4株中の1株において *yycH*, *yycI*, *yycJ* および *yyxA* 遺伝子同時欠失が確認された (結果は記載しない)。残りの形質転換体に

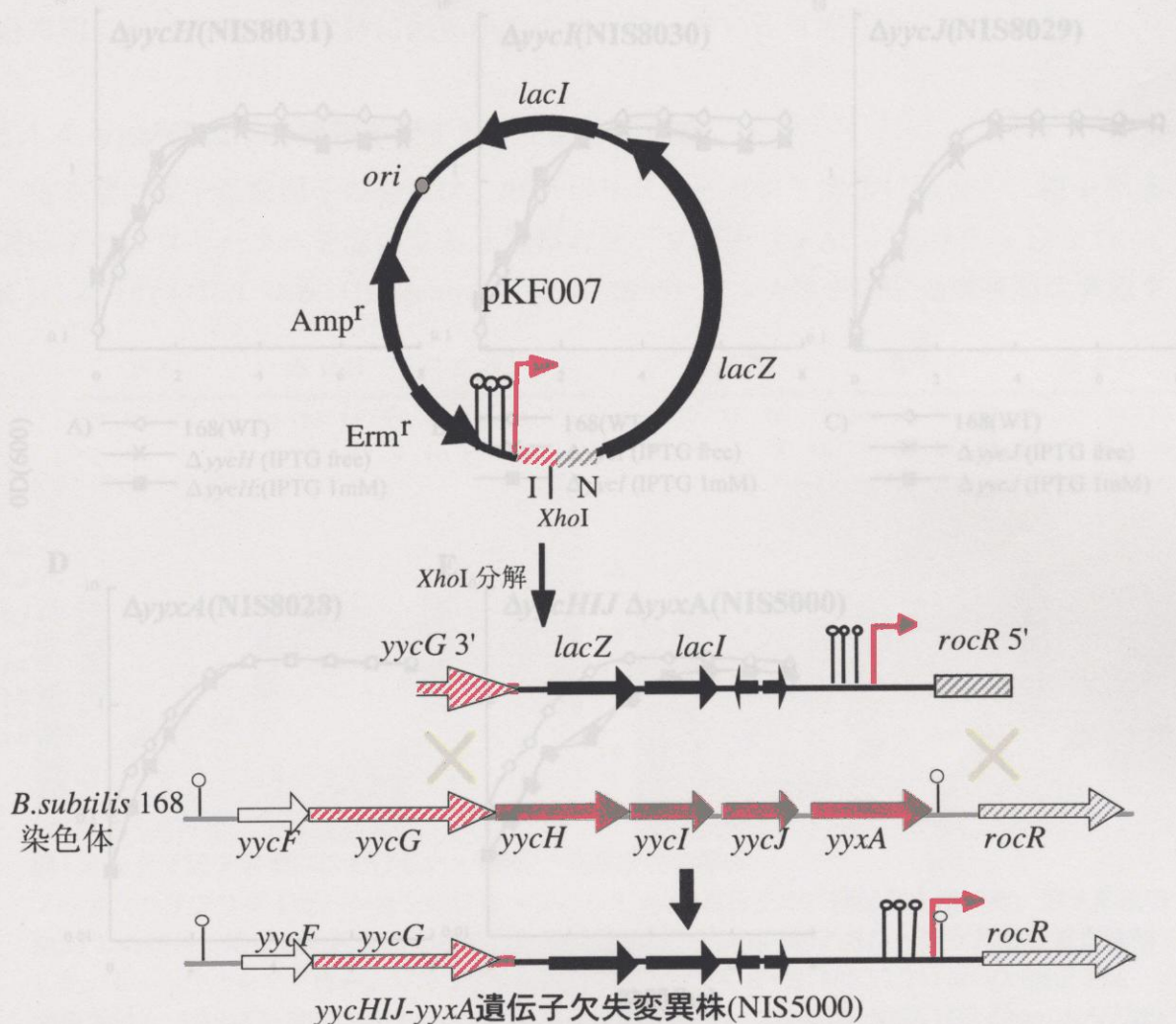


図13. pMutinT3を用いた *yycH*, *yycI*, *yycJ* および *yyxA* 遺伝子同時欠失株の作成

yycG 遺伝子の3'末端配列と *rocR* 遺伝子5'末端上流配列を pMutinT3 に挿入し、得られたプラスミド pKF007 を *XhoI* 処理し直鎖状にした。このDNA断片を用いて枯草菌を形質転換した。2重相同組換えにより *yycHII* および *yyxA* 遺伝子が欠損した変異株を得た。

については、プラスミドの挿入が確認されたものの *yycHII*, *yyxA* 遺伝子が存在していた。これらの形質転換体では、枯草菌染色体上に環状のままのプラスミドが一重交差により組み込まれたためと考えられる。以上の結果より、*yycFG* オペロン下流の4遺伝子は細胞の増殖に必須でないことが明らかになった。

3.1.3. *yycH*, *yycI*, *yycJ* および *yyxA* 遺伝子破壊による増殖への影響

yycH, *yycI*, *yycJ* および *yyxA* 遺伝子破壊による生育への影響を調べるために、各遺伝子の破壊変異株の孢子形成培地、LB培地およびグルコース-グルタミン合成培地に

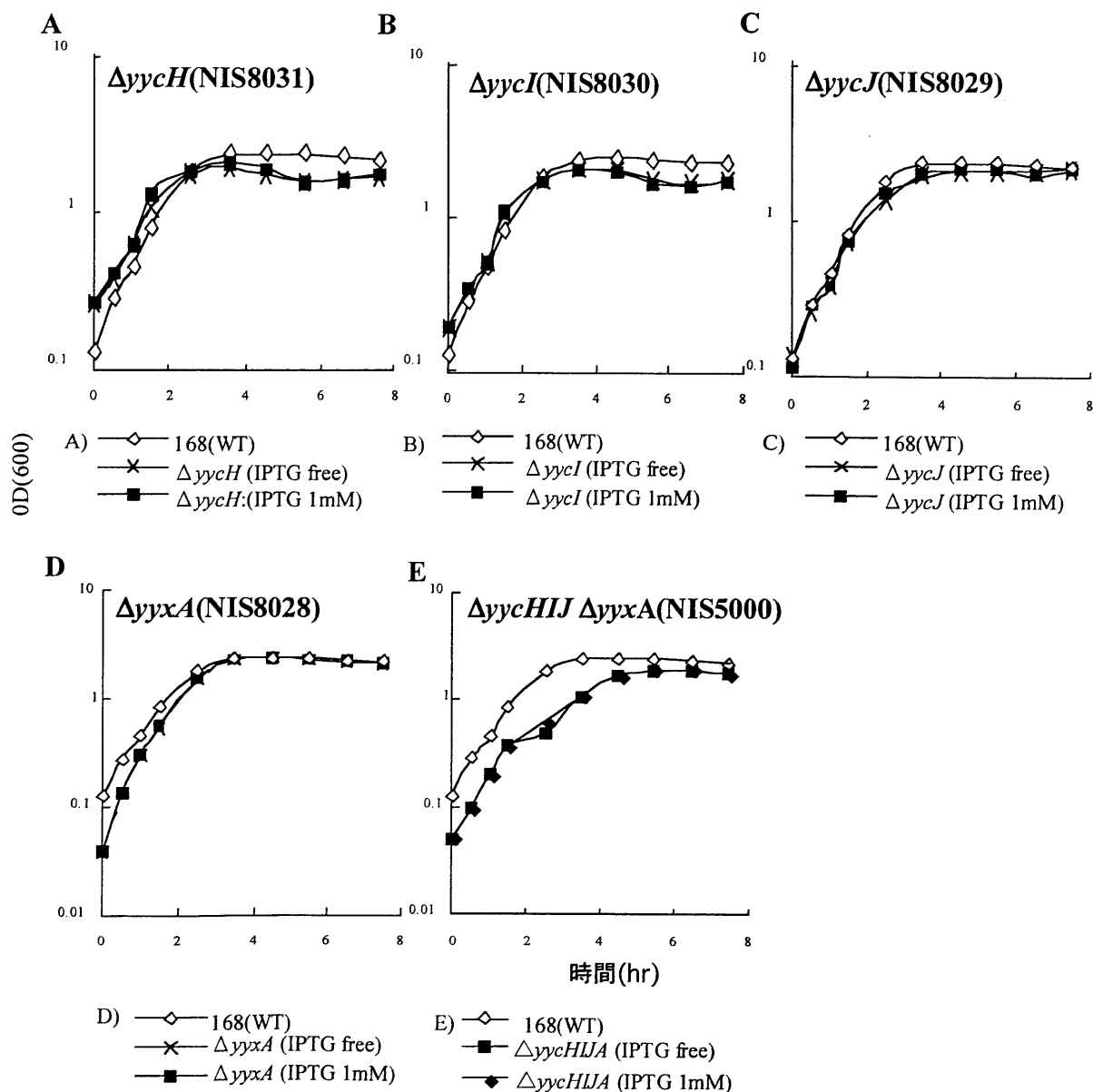


図14. 孢子形成培地における各変異株の成長曲線 孢子形成培地での各変異株の菌体濁度: OD(600)の経時変化を示した。培養は、37℃好気条件で行った。

おける生育を調べた。また、これらpMutinT3プラスミドの挿入により作成した破壊変異株では、プラスミドの挿入位置より下流の遺伝子の転写が抑制されるため、1mM IPTG 存在下でプラスミド上の *spac* プロモーターにより下流遺伝子の発現を促した条件での生育も併せて調べた。

その結果、すべての遺伝子破壊変異株は、いずれの培地条件でも野生株とほとんど変わらない生育速度を示し、IPTGの有無による影響も見られなかった(図14; LB 培地およびグルコース-グルタミン合成培地における結果は記載しない)。これより、*yycFG* オペロン下流の4遺伝子の欠失は、対数増殖期における細胞の増殖速度には影響しないことがわかった。一方、定常期において *yycH*, *yycI* 破壊変異株 (NIS8031, NIS8030) および *yycHIJ yyyxA* 破壊変異株 (NIS5000) は、IPTGの有無によらず野生株に比べ2割程度低い菌体濁度を示した(図14.ABE)。*yycH* および *yycI* 遺伝子は定常期における細胞の維持に何らかの機能を持っている可能性が示唆された。

3.1.4. *yyxA* 遺伝子の発現を促すシグマ因子の同定

枯草菌の胞子形成因子の発現は、RNAポリメラーゼコア酵素に結合し、胞子形成遺伝子のプロモーターを認識する6種類のシグマ因子 (σA , σH , σF , σE , σG , σK) により行われている (Haldenwang, W.G. 1995)。 σA は主に栄養増殖期に機能す

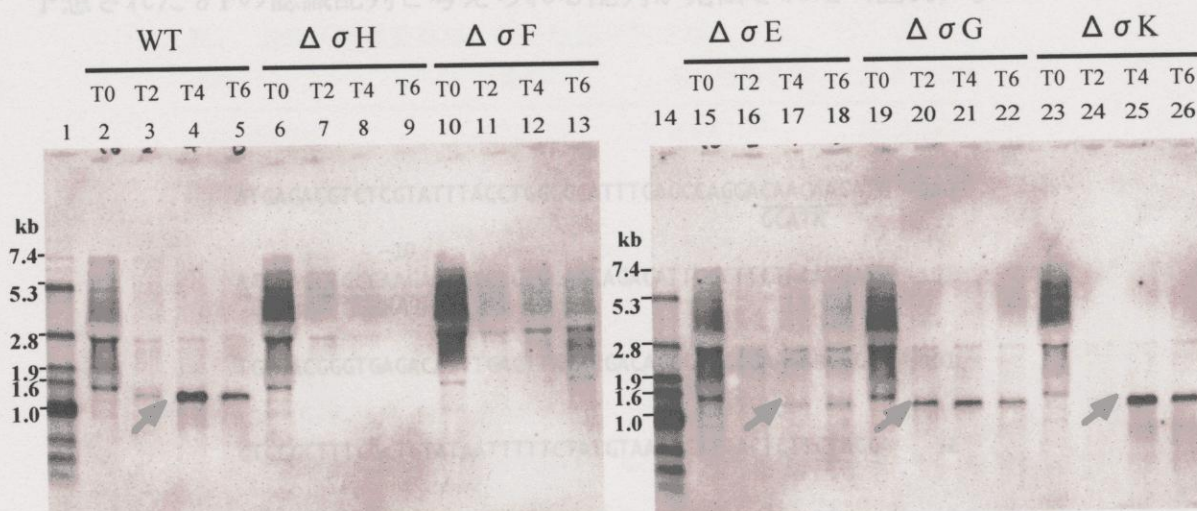


図15. シグマ因子欠損株における *yyxA* 遺伝子転写産物の解析

ノーザンハイブリダイゼーションのプロンプとして *yyxA* 遺伝子の内部配列を用いた。胞子形成培地37℃の条件で培養した細胞より抽出したRNA各レーン5μgを1%アガロースゲル変性電気泳動した。レーン1,14:マーカー、レーン2~5:WT(168*trpC2*)、6~9: NIS5101(*spo0H*遺伝子破壊変異株)、10~13: NIS5102(*spoIIAC*遺伝子破壊変異株)、15~18: NIS5103(*spoIIIGAB*遺伝子破壊変異株)、19~22: NIS5104(*spoIIIG*遺伝子破壊変異株)、23~26: NIS5105(*spoIVVB*遺伝子破壊変異株)、レーン2, 6, 10, 15, 19, 23:胞子形成の開始をT0とし、T0時期の細胞より抽出したRNA、レーン3, 7, 11, 16, 20, 24:T2時期のRNA、レーン4, 8, 12, 17, 21, 25:T4時期のRNA、レーン5, 8, 13, 18, 22, 26:T6時期のRNA、矢印は *yyxA* 遺伝子の転写産物を示している。

るシグマ因子であるが、胞子形成期にも、*spoIIIE*, *spoIIIG*等の胞子形成遺伝子の転写に関与する。胞子形成開始期では、まず σH が発現し、ホスホリレー系遺伝子の発現を活性化した後、胞子細胞では σF , σG の順に発現が起こる。一方、母細胞では胞子細胞での各々のシグマ因子の発現を認識して、 σE , σK の順に発現が起こる。この際、母細胞側の σE , σK は不活性型のpro-シグマ因子として翻訳され、それぞれSpoIIIGA SpoIVFB プロテアーゼによるプロセッシングにより活性化される。また胞子細胞の σF は、SpoIIAB (anti- σF) とSpoIIAA (anti-anti- σF) により翻訳後の制御を受けている。そこで、胞子形成期の $yyxA$ 遺伝子の転写誘導に関与するシグマ因子の同定を試みた。胞子形成期のシグマ因子 σH , σF , σE , σG および σK をコードする*spo0H*, *spoIIAC*, *spoIIIGAB*, *spoIIIG*, *spoIVCB*遺伝子の破壊変異株について、胞子形成培地で培養した定常期の細胞（胞子形成開始期をT0とした場合、T0, T2, T4, T6）より抽出した全RNAを用い、 $yyxA$ 遺伝子のコード領域の一部をプローブとして、ノーザンハイブリダイゼーションを行った（図15）。その結果、 $yyxA$ 遺伝子を含む約1.4 kbの転写産物は、野性株、 σE , σG および σK 欠失株において検出されたが、 σH および σF 欠失株では検出されなかった。 σH は σF をコードする*spoIIAC*遺伝子の発現を促すため、 σH 変異株では σF 蛋白質は生産されない。このため、 $yyxA$ 遺伝子は胞子形成期に σF により転写されることが示された。実際、 $yyxA$ 遺伝子上流には予想された σF の認識配列と考えられる配列が見出された（図16）。

表7. 遺伝子破壊変異株の耐熱性胞子形成率

菌株	生菌数	耐熱性胞子数	胞子形成率
<i>B. subtilis</i> 168	4.5×10^8	2.8×10^8	62.2 %
<i>ΔyyxA</i>			-35
ATGAGACGTCTCGTATTTACCTGGCGCATTTGAGCCAGGACAACAACATG -200			GCATR
<i>ΔyyxI</i> (NIS8030)	2.4×10^8	2.0×10^8	83.3 %
AAGGAGCTGGCAAGAATGTCTGTGCAGCAGACATTGGCTTCTAAAGGATT -151			15 bp
GGHRARHTX			70.8 %
TGTGACGGGTGAGACATTTGACTTATACGACACCGATCCGAAGAAGGCCA -101			
<i>ΔyyxH</i> <i>ΔyyxA</i> (NIS500)	2.6×10^8	1.6×10^8	98.1 %
CTCCGCTTTGGCTGTATAATTTTCTATGTAAATCATGACTATTCTAGGA -51			
GTTTCTAACCACAAATATAACCATATTAACGTTCTTGGAAAGGATGGAAT -1			SD配列
ATGGTGGATTACGAACGTGAGGAAGAACATACTACTCCTGAACAGCCAAA +50			
MetValAspTyrGluArgGluGluGluHisThrThrProGluGlnProly			
<i>yyxA</i> codon start			

図16. $yyxA$ 遺伝子上流の配列

数字は $yyxA$ のコード開始点(+1)からの距離(bp)を示している。下線部は σF の認識配列と予想される領域を示している。 σF の認識配列を併せて示した。破線部はスペーサー領域を示している。H: AあるいはC, R: AあるいはG, X: TあるいはG

セリンプロテアーゼをコードする *yyxA* 遺伝子は、孢子形成期に σF に依存したプロモーターにより発現するため、*yyxA* 遺伝子の破壊変異株の耐熱性孢子形成率を測定した。同時に *yyxA* 遺伝子上流に位置し、対数増殖期にのみ発現が見られた3遺伝子 (*yycHIJ*) の破壊変異株についても同様の測定を行った。各菌株は、孢子形成培地 (Difco) にて26時間培養した後、80℃、10分間加熱処理後、LBプレート培地に植菌し一晚培養し、出現したコロニーを測定することにより、孢子数を計測した。また、コントロールとして非加熱のサンプルについて同様の操作を行い、生菌数として、耐熱性孢子形成率 (孢子数/生菌数) を求めた。孢子形成能については、いずれの変異株も野生株と同様に $10^8/\text{ml}$ の孢子を形成し、孢子形成率は、57~96%であった (表7)。これより、対数増殖期に発現する *yycH*, *yycI*, *yycJ* および 孢子形成期に単独の転写が確認された *yyxA* 遺伝子は、孢子形成に影響しないことがわかった。なお、生菌数は、いずれの変異株も野生株と比べ5割から8割と低かった。このことは、*yycH*, *yycI* 破壊変異株が、定常期に低い菌体濁度を示すことと関係していると考えられる。*yycH*, *yycI* 遺伝子だけでなく、*yycJ* および *yyxA* 遺伝子も定常期の細胞の維持に何らかの機能を持っている可能性が示唆された。

表7. 遺伝子破壊変異株の耐熱性孢子形成率

菌株	生菌数	耐熱性孢子数	孢子形成率
<i>B. subtilis</i> 168	4.5×10^8	2.8×10^8	62.2 %
$\Delta yycH$ (NIS8031)	3.0×10^8	1.7×10^8	56.7 %
$\Delta yycI$ (NIS8030)	2.4×10^8	2.0×10^8	83.3 %
$\Delta yycJ$ (NIS8029)	2.4×10^8	1.7×10^8	70.8 %
$\Delta yyxA$ (NIS8028)	2.9×10^8	2.1×10^8	72.4 %
$\Delta yycHIJ \Delta yyxA$ (NIS5000)	2.6×10^8	1.6×10^8	96.1 %

生菌数：細胞を孢子形成培地で26時間振とう培養を行い、その培養液をLB培地に植菌し一晚培養を行い、得られた培養液1mlあたりのコロニー数を示している。耐熱性孢子数：生菌数の測定に用いた同様の培養液を80℃10分間加熱した後、LB培地に植菌して一晚培養し得られた培養液1mlあたりのコロニー数を示している。孢子形成率：生菌数/耐熱性孢子数

3.2. 条件致死変異株の作成による *yycFG* 遺伝子の機能解析

yycF レギュレーターおよび *yycG* センサー遺伝子については、破壊変異株が得られなかったために、両遺伝子が必須遺伝子である可能性が示された。このため、両遺伝子を *LacI* 蛋白質に制御されるプロモータ (*Pspac*) の制御下においた条件致死変異株の作成を行った。

3.2.1. *yycFG* および *yycG* 条件致死変異株の作成と必須遺伝子の確認

pMutinT3 に *yycF* および *yycG* 遺伝子の SD 配列を含む遺伝子断片を挿入したプラスミド pKF011 および pKF012 を作製した。これらのプラスミドで枯草菌を形質転換した場合 (図17)、*yycF* および *yycG* が必須遺伝子であるならば、得られた形質転換体の生育は IPTG 依存性となる。予想通り、形質転換体は IPTG 無添加の条件では得られず、1 mM IPTG を添加したときのみ $10^3/\text{ml}$ 以上の頻度で得ることができた。得られた形質転換体において予想する組換えが起こっていることは、サザンハイブ

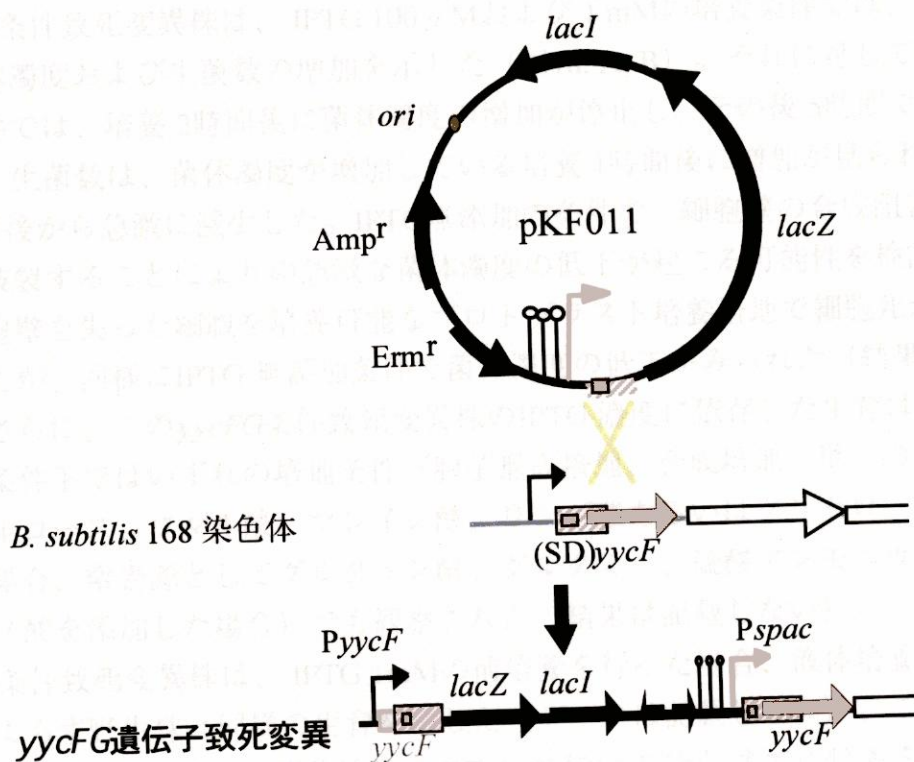


図17. *yycFG* 遺伝子条件致死変異株の作製

yycF 遺伝子の SD 配列と 5' 末端配列の一部を pMutinT3 プラスミドの *Bam*HI 部位に挿入したプラスミド pKF011 を用いて枯草菌を形質転換し、*yycF* 遺伝子を IPTG により誘導可能な *spac* プロモータ制御下においた条件破壊株を作成した。

リダイゼーション法により確認した（結果は記載しない）。*yycG*条件致死変異株が、IPTGの存在に依存して得られたことにより、*yycG*遺伝子が必須遺伝子であることが確認された。一方、*yycF*の上流にプラスミドを挿入した*yycFG*条件致死変異株では、*yycFG*遺伝子が同時に抑制されるため、レギュレーター遺伝子*yycF*が単独で細胞の増殖に必須であることは証明出来ていない。しかしながら、Fabretらは、*yycF*遺伝子の塩基置換変異（アミノ酸配列置換（H215P）を引き起こす）の導入により温度感受性変異株を単離することに成功している(Fabret *et al.*,1998)。この*yycF*温度感受性変異株は、42℃で致死性を示すことから、*yycF*遺伝子も細胞の増殖に必須である。

3.2.2. 条件致死変異株の IPTG に依存した生育

細胞の増殖に必須であることがわかった*yycF*および*yycG*遺伝子産物の枯渇が細胞の増殖へ与える影響を調べるために、両遺伝子の発現をIPTGにより誘導可能な *spac* プロモーター制御下においた*yycFG*条件致死変異株（NIS8033）および*yycG*条件致死変異株（NIS8032）についてIPTGを除いた場合に生じる菌体濁度および生菌数の変化を経時的に測定した。

*yycFG*条件致死変異株は、IPTG 100 μ Mおよび 1 mMの培養条件では、野生株と同様の菌体濁度および生菌数の増加を示した（図18. A, B）。それに対してIPTG 無添加の条件では、培養 2時間後に菌体濁度の増加が停止し、その後 5時間で 0.2まで低下した。生菌数は、菌体濁度が増加している培養 1時間後に増加が見られなくなり培養 2時間後から急激に減少した。IPTG無添加の条件で、細胞壁の合成阻害が起こり細胞が破裂することよりの急激な菌体濁度の低下が起こる可能性を検討するために、細胞壁を失った細胞を培養可能なプロトプラスト培養培地で細胞死が起こるかを調べたが、同様にIPTG 無添加条件で菌体濁度の低下がみられた（結果は記載しない）。さらに、この*yycFG*条件致死変異株のIPTG 濃度に依存した生育は、30~37℃の好気条件下ではいずれの培地条件（孢子形成培地、合成培地：単一の炭素源として、グルコース、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸あるいはグリセロールのみを添加した場合、窒素源としてグルタミン酸、グルタミン、硫酸アンモニウムあるいはカザミノ酸を添加した場合）でも観察された（結果は記載しない）。

*yycG*条件致死変異株は、IPTG 1mMの前培養を行った場合、液体培養ではIPTGの有無によらず野生株と同様の生育を示した（データは記載しない）。このため、前培養として IPTG 無添加の液体培地で OD(600)が0.4の時点 までの培養を行ったところ、IPTGの有無による生育の変化が見られるようになったが（図18. C, D）、*yycFG*条件致死変異株で見られた急激な菌体濁度および生菌数の低下は起こらなかった。*yycFG*および*yycG*遺伝子の発現制御に用いた*Pspac*プロモーターは、LacI蛋白質によ

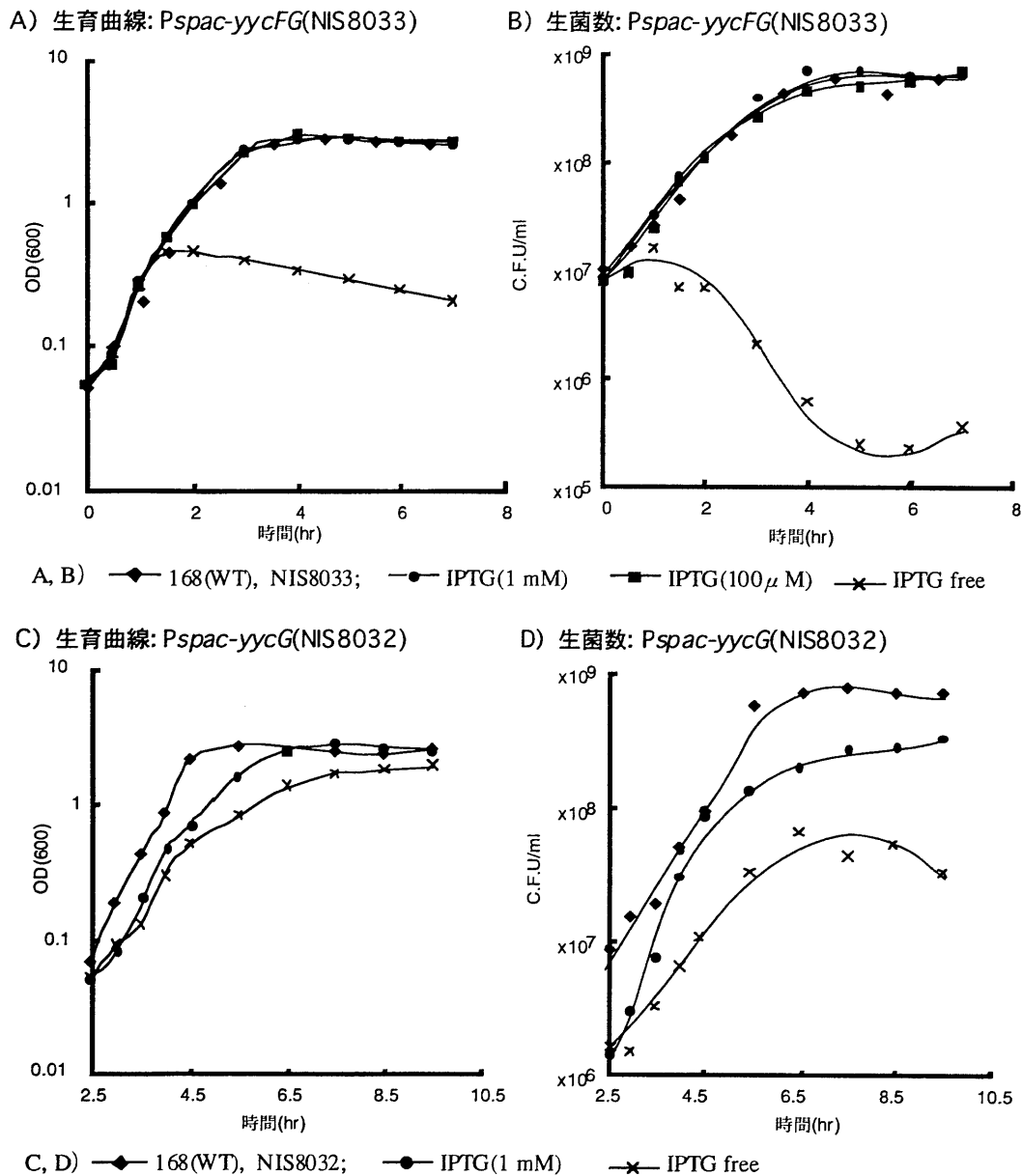


図18. *yycFG*条件致死変異株のIPTGに依存した生育

細胞は、IPTG 1 mMを含むLB培地でOD600=0.4まで培養を行った後、0~1 mM IPTGを含むLB培地 37℃の条件で浸とう培養した。AC:生育曲線, BD:生菌数:C. F. U./ml(培養液1 mlあたりのコロニー形成数)の経時変化。時間はIPTG無添加の条件での細胞の培養時間を示している。

る抑制が完全ではなく IPTG 無添加の条件でもわずかな転写があることが知られている。このため、*yycG*条件致死変異株は、IPTG 無添加の条件でも細胞内でわずかに起こる転写により発現したYycG蛋白質が機能することで、生育すると思われる。一方で、*yycG*条件致死変異株は、1 mM IPTG添加条件でも、生菌数が野生株の2割程度ま

でしか増加しなかった。このことはIPTG無添加の条件での前培養が細胞の生菌数に影響を及ぼしていることに加え、レギュレーター蛋白質YycFを伴わないPspacプロモーターによるセンサー蛋白質YycGの恒常的な発現が細胞の生育や維持に阻害的に働くことが考えられる。

3.2.3. 遺伝子破壊による細胞形態および染色体への影響

染色体の複製や分配あるいは細胞分裂に関与する遺伝子への変異は、無核細胞の放出や染色体分配、細胞形態等の異常を引き起こす。(Rowland, *et al.*, 1997; Hiraga, *et al.*, 1989; Medhat, *et al.*, 1997) また、染色体の複製や細胞分裂に関与するいくつかの遺伝子は細胞増殖に必須であることが知られている (Beall, B. & Lutkenhaus, J., 1989; Moriya, S., *et al.*, 1990)。細胞の増殖に必須である2成分制御系YycFGは、転写制御を介して染色体の複製や分配あるいは細胞分裂に関与する可能性も考えられる。そこで、*ycyFGHIJ*および*yyxA*遺伝子の変異株による細胞の形態および染色体の分布への影響を調べた。顕微鏡観察には、LB液体培地で培養した対数増殖期 [OD(600)が0.4の時点]の細胞を用いた。

*ycyFG*条件致死変異株 (NIS8033) は、IPTG 添加の条件では (図19. Pspac-*ycyFG* IPTG 1 mM)、細胞の形態や染色体も野生株 (図20. 168) と同様だったが、培地からIPTGを除去すると、染色体を失っている細胞や細胞質が抜け落ちた細胞が多く見られた (図19. Pspac-*ycyFG* IPTG free; 白矢印)。IPTGを除いた場合の菌体濁度および生菌数の急激な減少は、これらの細胞の増加を反映していると考えられる。さらに、染色体が保持されている細胞の中には、野生株にはみられない奇数個 (3つ以上) の染色体を持つ細胞もあり、DNAの複製に何らかの異常が生じていることも予想される (図19. Pspac-*ycyFG* IPTG free; 黒矢印)。

*ycyG*条件致死変異株 (NIS8032) でも、IPTG 無添加の条件で、染色体を失っている細胞が低頻度で観察された (図19. Pspac-*ycyG* IPTG free; 白矢印)。このことから、センサー遺伝子*ycyG*は、その上流に位置するレギュレーター遺伝子*ycyF*と対になって機能していることが推測された。また一部の細胞で、細胞内での染色体位置の偏りが観察された。

同時に、先に作成した*ycyHIJ*, *yyxA*遺伝子の破壊株変異株についても解析を行ったところ、*ycyFG*オペロン下流の4遺伝子を同時に欠失させた変異株 (NIS5000) では、染色体を持たない細胞や染色体の位置が偏った細胞が見られた (図20. Δ *ycyHIJ* Δ *yyxA* 白矢印)。この染色体の位置の異常は、*ycyH*破壊変異株 (NIS8031) ではIPTG無添加の条件で、*ycyI*および*ycyJ*破壊変異株 (NIS8030, NIS8029) ではIPTG無

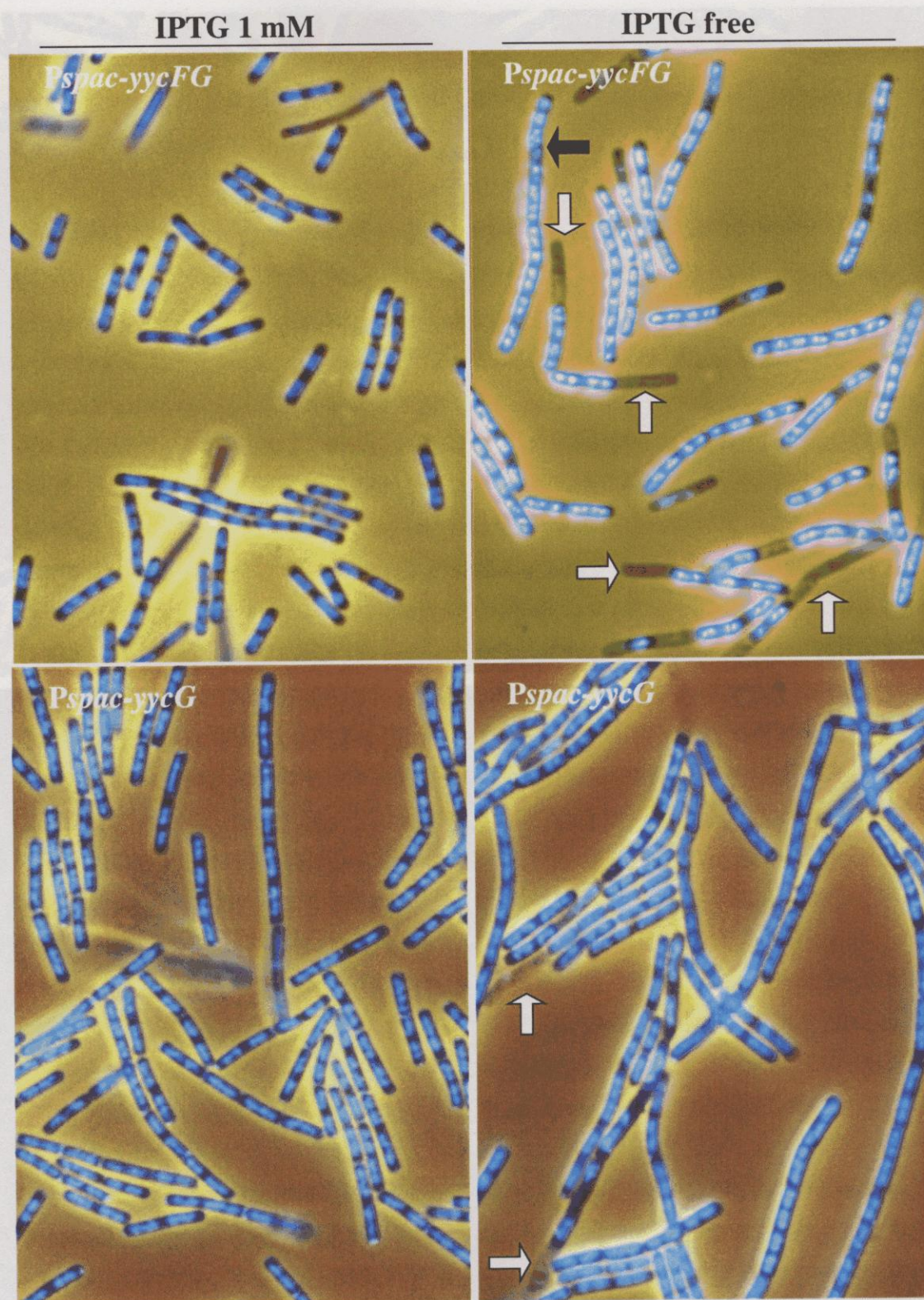


図19. *yycFG*遺伝子条件破壊による細胞形態及び核様体分布への影響

IPTG 1mMを含むLB液体培地で前培養した細胞を菌体濁度: OD(600)が0.4の時点で、IPTG添加 (1 mM) あるいはIPTG無添加のLB液体培地に希釈し、2時間培養した後、集菌しエタノール固定後、蛍光顕微鏡により観察した。核様体を失った細胞を矢印で示した。奇数個の染色体をもつ細胞を黒矢印で示した。 *Pspac-yycF*: NIS8033, *Pspac-yycG*: NIS8032

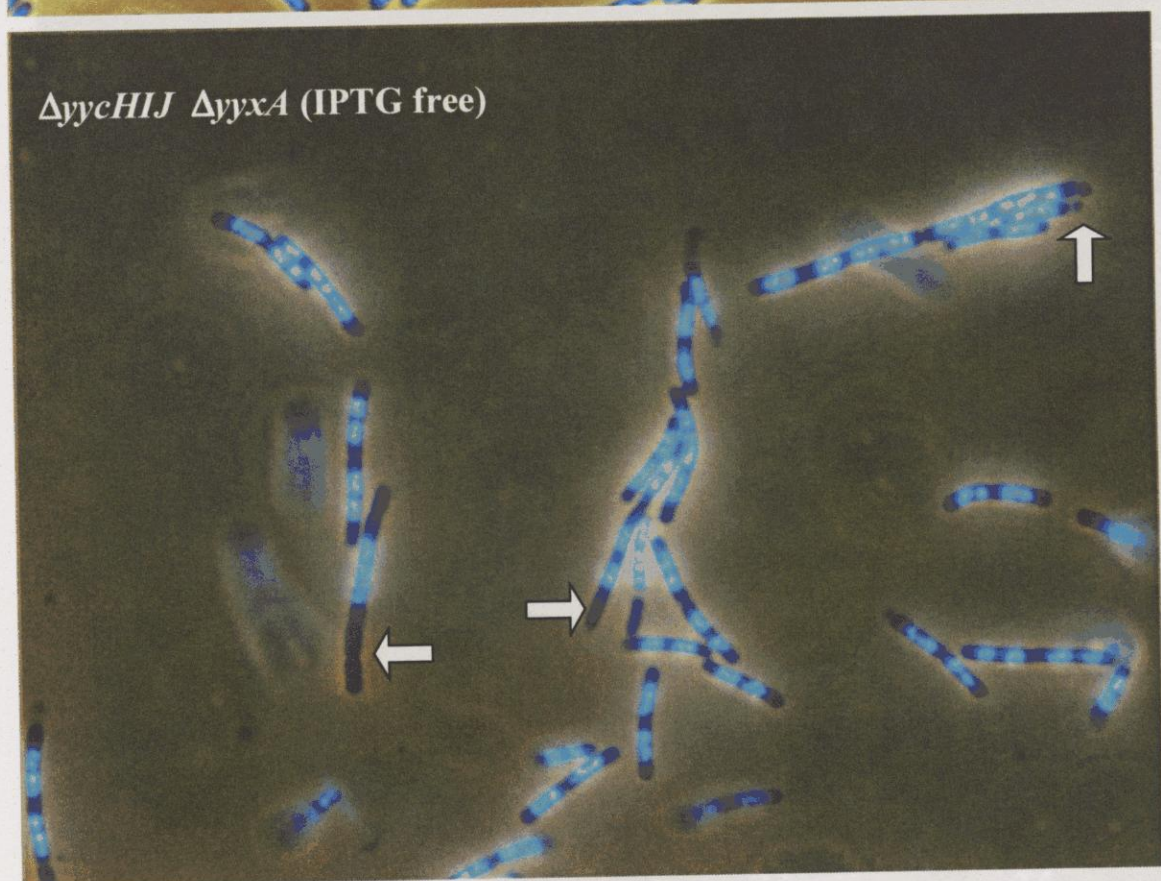
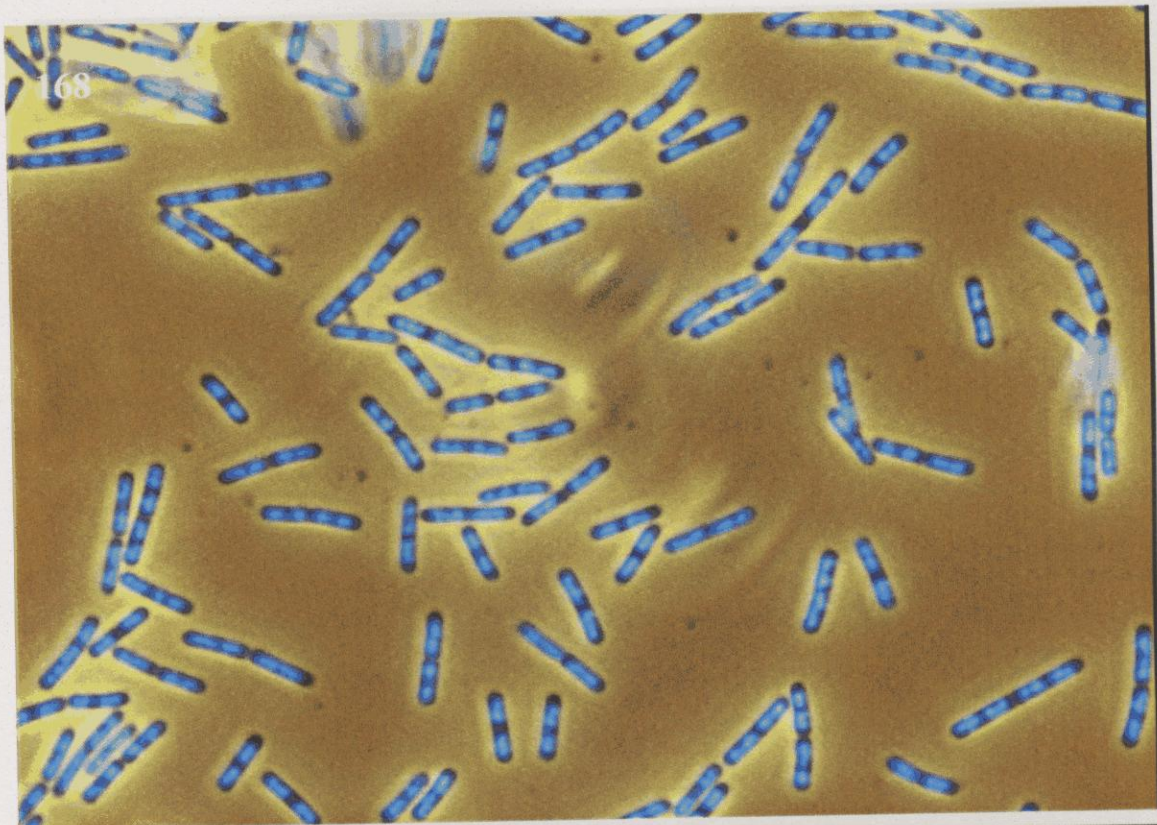


図20. 遺伝子破壊による細胞形態および核様体分布への影響 (1)

図20. 遺伝子破壊による細胞形態および核様体分布への影響 (2)

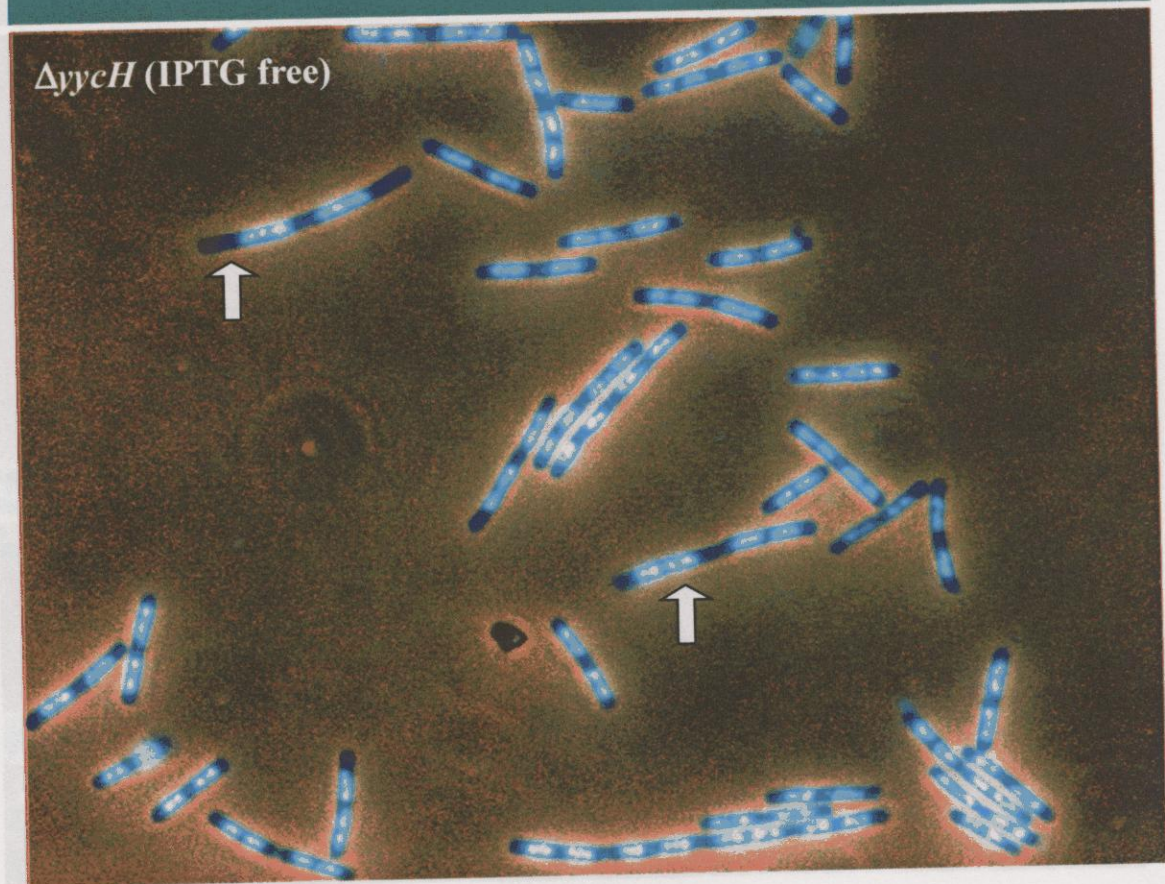
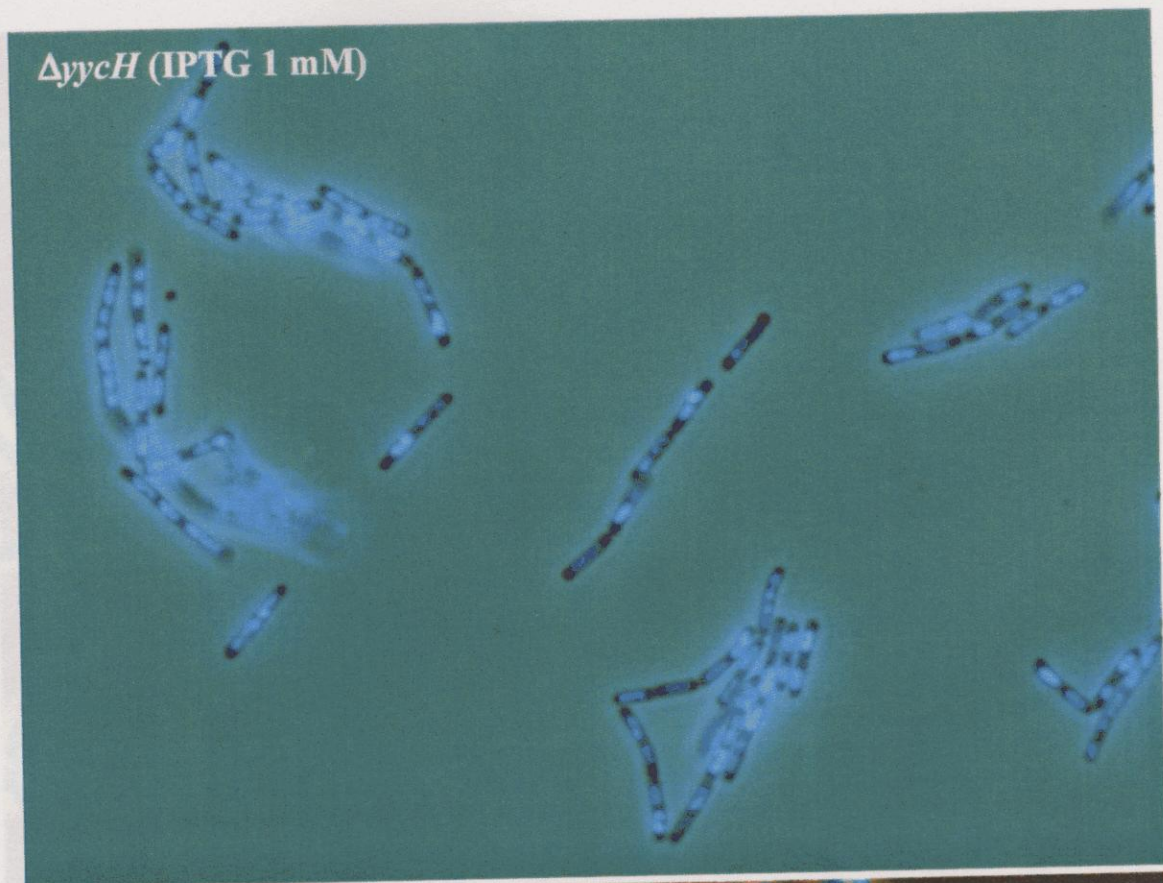


図20. 遺伝子破壊による細胞形態および核様体分布への影響 (2)

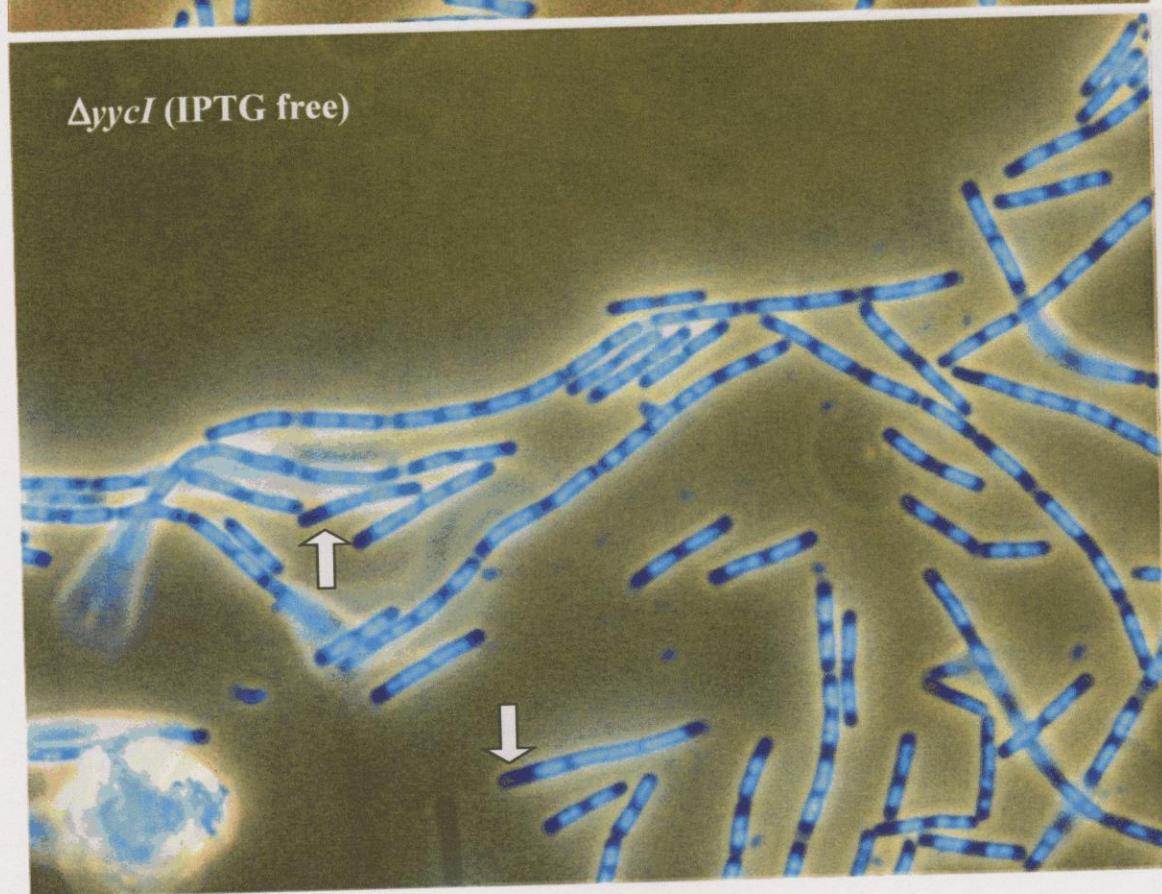


図20. 遺伝子破壊による細胞形態および核様体分布への影響 (3)

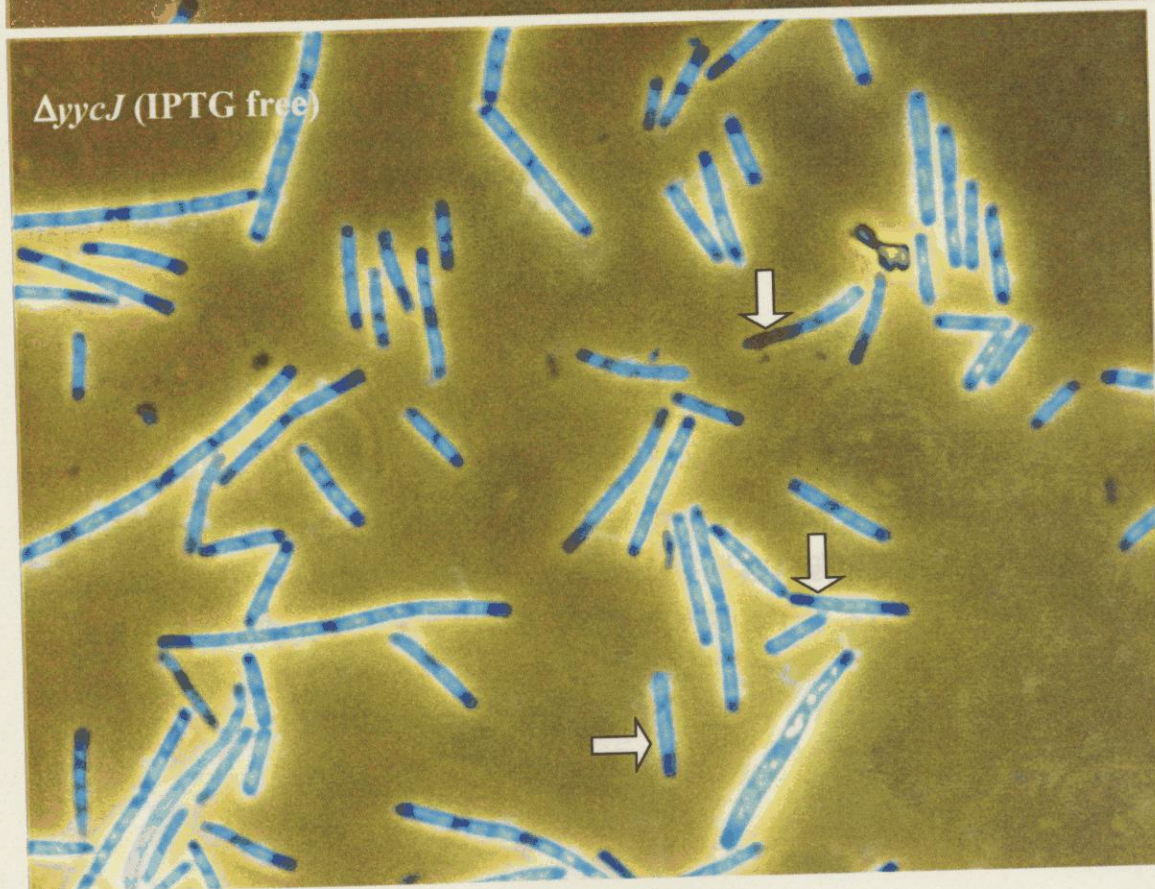
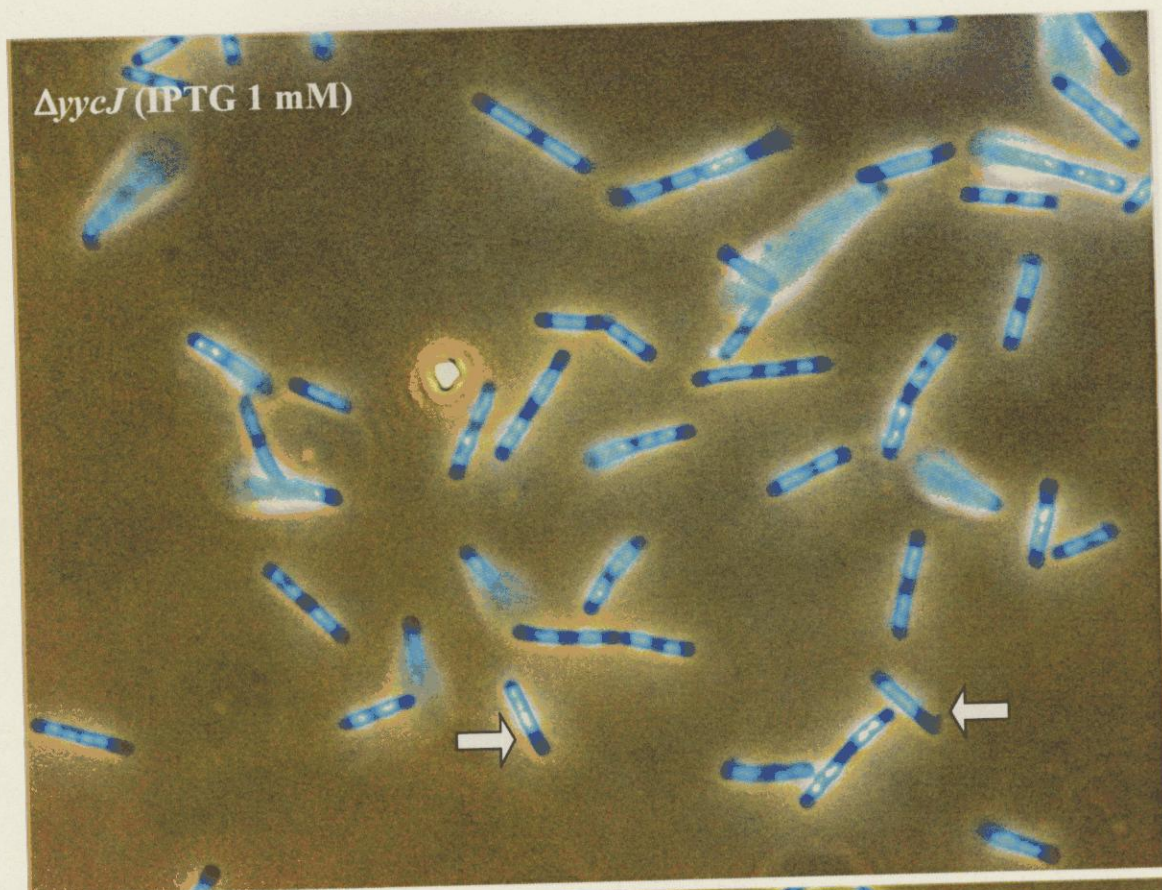


図20. 遺伝子破壊による細胞形態および核様体分布への影響 (4)

$\Delta yycA$ (IPTG free)

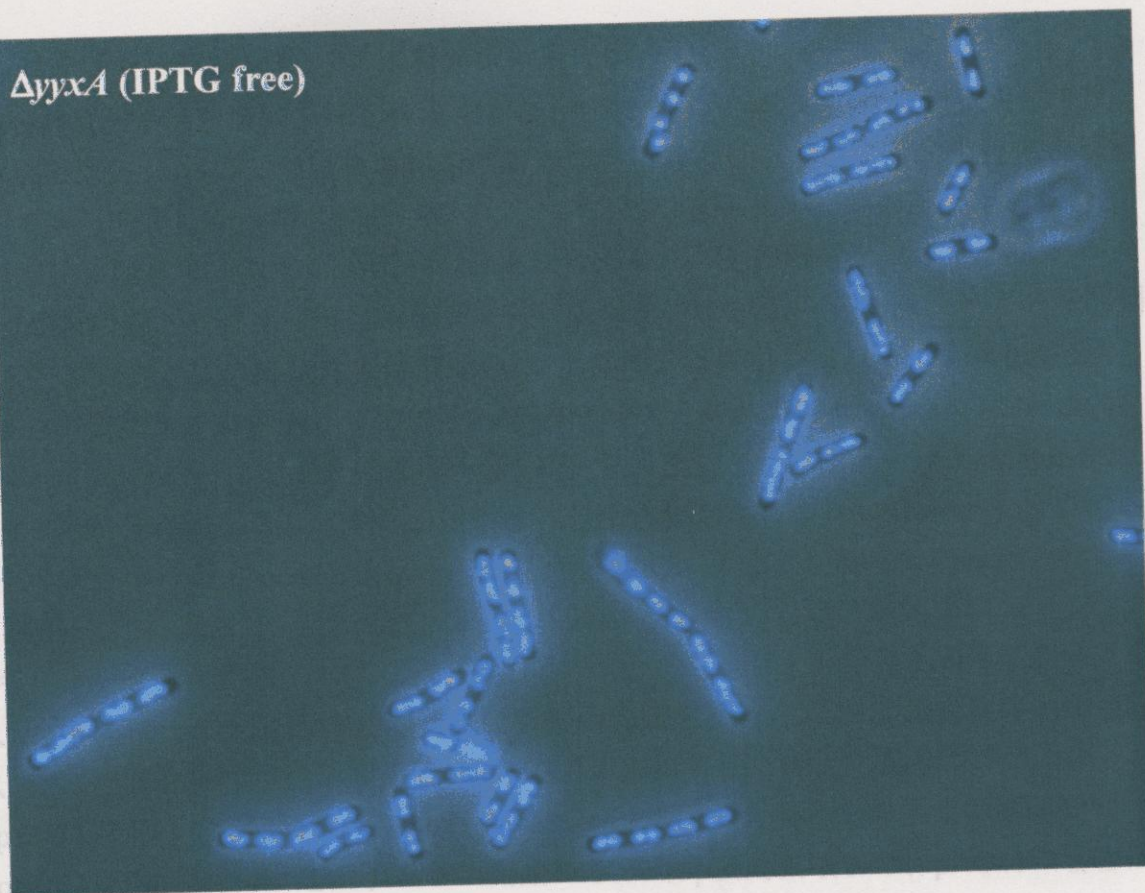


図20. 遺伝子破壊による細胞形態および核様体分布への影響 (5)

LB液体培地37℃で振とう培養した細胞をODが0.4の時点で集菌し、エタノール固定した後、DAPI染色し、顕微鏡観察を行った。培養はIPTG 1mMあるいはIPTG無添加の条件で行った。168: *B. subtilis* 168, $\Delta yycHIJ$ $\Delta yycA$: NIS5000, $\Delta yycH$: NIS8031, $\Delta yycI$: NIS8030, $\Delta yycJ$: NIS8029, $\Delta yycA$: NIS8028

添加の条件だけでなくIPTG 1 mM存在下でも観察された (図20. $\Delta yycH$, $\Delta yycI$, $\Delta yycJ$ 白矢印)。このため、染色体の細胞内の位置の異常は、*yycIJ*遺伝子の欠失や発現抑制により生じると推測された。*yycHIJ*, *yyxA*同時欠失変異株で観察された染色体を持たない細胞は、*yycHIJ*, *yyxA*遺伝子単独の破壊変異株では観察されず、4遺伝子の同時欠失により失われる機能があると予想される。

3.3. レギュレータ蛋白質YycF過剰発現株の作成

*yycFG*遺伝子は破壊変異株を作成することができず、*yycFG*条件致死変異株では、IPTG無添加の条件で、急激な菌体濁度および生菌数の低下が起こり、染色体及び細胞質を失った細胞が観察される。このため、2成分制御系YycFGの制御下には、細胞の増殖に関与する重要な遺伝子があると考えられ、その解析を試みた。

YycF蛋白質と高い相同性を示す大腸菌レギュレーター蛋白質TorR（アミノ酸配列の同一性 37 %）は、嫌気性条件下で*c*型シトクローム蛋白質をコードする*torCAD*オペロンの発現を正に制御している（Iobbi-Nivol, C., *et al.*, 1994; Mejean, V., *et al.*, 1994）。このレギュレーター遺伝子*torR*は、マルチコピープラスミドに組み込み細胞内で過剰発現することにより、通常転写の活性化が起こらない好気条件下でもTorRの制御下にある*torACD*遺伝子の発現が恒常的に誘導されることが報告されている（Simon G., *et al.*, 1995; Jourlin C., *et al.*, 1996）。枯草菌YycFGの制御系においても、レギュレーター蛋白質YycFの過剰発現によって下流遺伝子の発現が誘導されと考え、レギュレータ蛋白質YycFの過剰発現株の作製を行った。YycF蛋白質の過剰発現は、枯草菌細胞内で自己複製するpUB110プラスミドとpBR322の融合プラスミド（pRB373あるいはpNO41）の*Bam*HI部位に*yycF*遺伝子全長とその上流の制御配列（pRB373の場合は*yycF*遺伝子コドン開始より 300 bp上流領域まで、pNO41の場合は上流領域 80bpまで）を組み込み、枯草菌細胞に導入した。

一方で、プラスミドの導入によりレギュレーター蛋白質が過剰に供給されても、その制御下の遺伝子の誘導には、リン酸化が必要である可能性も考えられた。このため、レギュレータ蛋白質YycFに対し、センサー蛋白質YycGに依存せず、常時活性型となる変異の導入を試みた。

3.3.1. 活性型YycF蛋白質過剰発現株の作成

レギュレーター蛋白質にはN末端部分にセンサー蛋白質からのリン酸基転位を受ける特定のアスパラギン酸残基が存在し、このアスパラギン残基のリン酸化により、特異的DNA配列への結合能が高まる（Parkinson, 1992; Volz, 1993）。このアスパラギン酸部位に変異を加えることにより、センサー蛋白質に依存しない常時活性型レギュレーター蛋白質を作成することが可能であると考えた。実際、2成分制御系レギュレーターOmpRでは、このアスパラギン酸残基（酸性アミノ酸）をグルタミン（中性アミノ酸）に置換する変異を導入することで、センサー蛋白質に依存しない活性型として振る舞うことが報告されている（Kanamaru K & Mizuno T, 1992）。一方、グルタミン酸（酸性アミノ酸）の変異の導入は、センサー蛋白質によってリン酸化されず、常時不活性型となることも報告されている（Kanamaru K & Mizuno T,

1992; Quon K. C., *et al.*,1996)。筆者は、このアミノ置換変異によって起こると予想される蛋白質の2次構造の変化に、置換されたアミノ酸の荷電が重要であると予想した。このため、YycF蛋白質のリン酸基転移を受けると予想される54番目のアスパラギン酸を、極性の異なる塩基性アミノ酸、ヒスチジン、に置換した変異型 YycF 蛋白質（YycFD54H）発現株の作成を行った。塩基置換変異を導入したプライマーを用いてPCRライゲーション（材料と方法、図10.参照）を行い、得られた断片をpRB373のBamHI部位に組み込み、プラスミドpRBYycFD54Hを得た。

枯草菌細胞内で発現した変異型 YycF 蛋白質（YycFD54H）がセンサー蛋白質に依存しない活性型として機能しているかを調べるために、その存在下でセンサー遺伝子yycGの破壊変異株の作成が可能であるかを調べた。このため、yycG遺伝子内部配列を組み込んだプラスミドpKF002を用いて、pRBYycFD54Hを導入した枯草菌細胞を形質転換した。対照として、野生株および枯草菌マルチコピープラスミドpRB373, pRBYycFを導入した細胞についても同様の形質転換を行った。その結果、pRBYycFD54Hを導入した株のみで、高頻度で形質転換体を得られた（表8）。得られた形質転換体で、染色体上のyycG遺伝子部位にプラスミドが挿入されたことはPCRによって確認した。これより、

アミノ酸置換変異を導入した YycFD54H蛋白質は、センサー遺伝子yycGの破壊変異を相補し、センサー蛋白質に依存しない活性型 YycF蛋白質として機能することが示された。

OmpR蛋白質をはじめ多くのレギュレーター蛋白質は、リン酸化した活性型はダイマーを形成しDNAに結合する（Harrison-McMonagle *et al.*, 2000）。細胞内で YycFD54H蛋白質が野生型のYycF蛋白質とヘテロのダイマーを形成し、活性型として機能する可能性が考えられた。このためYycFD54H蛋白質が、野生型YycF蛋白質に依存せず単独でYycFGの機能を相補するかを調べるためにyycFG条件致死変異株（NIS8033）に

表8. pKF002 プラスミドによる形質転換

菌株名（導入したプラスミド）	形質転換体数 (CFU/ml)
168trpC2	5
168trpC2 (pRB373)	2
168trpC2 (pRBYycF)	0
168trpC2 (pRBYycFD54H)	1.2X10 ²

yycG遺伝子の内部配列を組み込んだ pKF002 プラスミド 1 μg を用い形質転換した場合に得られた形質転換体数（培養液1ml 当たり）を示した。

表9. YycFD54H過剰発現によるPspac-yycFG (NIS8033)株の表現型の変化

菌株(導入したプラスミド)	LB プレート上での生育	
	IPTG 1mM	IPTG free
NIS8033	+	-
NIS8033(pRB373)	+	-
NIS8033(pRBYycF)	+	-
NIS8033(pRBYycFD54H)	+	+

pRBYycFD54Hを導入し増殖のIPTG依存性を調べた。対象としてpRB373あるいはpRBYycFを導入した場合には細胞は、野生株と同様にIPTGに依存した生育を示したが、pRBYycFD54Hを導入した場合にはIPTGに依存しない生育を示した。(表9)。すなわち、YycFD54H蛋白質は野生型のYycF蛋白質に依存せず、活性型レギュレーター蛋白質として機能すること明らかになった。また、野生型YycF蛋白質の過剰発現によってセンサー遺伝子yycGの欠失を相補できないことから、細胞の増殖には、センサー蛋白質YycGによるYycFの活性化が必要であることが証明された。

3.3.2. 蛋白質2次元電気泳動によるYycFおよびYycFD54H蛋白質の過剰発現の確認

細胞内で過剰発現したYycFおよびYycFD54Hを蛋白質2次元電気泳動により分離し、アミノ酸配列の決定を行うことで両蛋白質の過剰発現を確認した。

全可溶性蛋白質を2次元電気泳動で分離したところ、YycF過剰発現株では、YycF蛋白質の分子量(27.4 kDa)および等電点(pI 5.06)から予想される泳動位置に蛋白質の増加が確認された(図21. YycF)。この蛋白質のN末端アミノ酸配列12残基を決定したところYycFのN末端配列(MMDKKILVVDDE)と一致した。過剰発現したYycF蛋白質がリン酸化されているかを調べるために、YycFスポットを切り出し、飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF/MS)により解析したがシグナルが得られず、結論は得られていない。YycFD54H蛋白質は、アミノ酸置換により等電点pI 5.06からpI 5.19に変化すると計算できる。YycFD54H過剰発現株では予想された泳動位置に蛋白質の増加が確認された(図21. YycFD54H)。この蛋白質についても、N末端アミノ酸配列12残基を決定したところ、YycFのN末端配列と一致した。YycFD54H蛋白質のN末端から54番目に位置するアミノ酸置換変異は、直接確認していないが、等電点

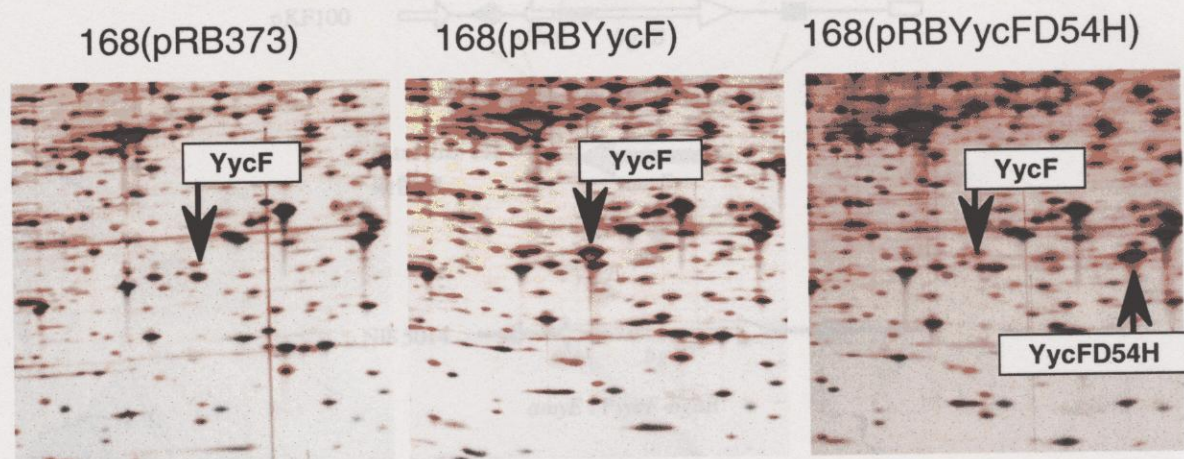


図21. 蛋白質2次元電気泳動によるYycF蛋白質の過剰発現の確認

LB培地37℃で培養した対数増殖期[OD(600)=0.4]の細胞の9Mウレア可溶性画分10 µgを2次元電気泳動により展開した後、Silver staining kit (Amersham Pharmacia Biotech)により銀染色反応を行い蛋白質を検出した。

の変化からYycFD54D蛋白質であると考えられる。そのため、*yycF*上流の制御領域の下流にレポーター遺伝子として発熱性βガラクトシダーゼ遺伝子 (*bgaB*) を

3.3.3 YycFによる*yycF*オペロンの自己制御の検討

ResD, Spo0A等の一部のレギュレーター蛋白質は、リン酸化され活性型の状態で自己の転写制御に関与することが知られている (Hulett, M., 1995; Strauch, et al., 1992-b)。YycFが自己の転写を制御している場合には、YycFD54H 蛋白質の過剰発現によりYycF 蛋白質の発現量が変化すると予想される。このため、プラスミドのみを挿入した野生株とYycFD54H 過剰発現株の蛋白質2次元電気泳動におけるYycF 蛋白質の比較定量を行った。2次元電気泳動ゲル上の蛋白質のスポットの定量には、数値解析用プログラム Image Master 2D Elite (Pharmacia Biotech) を用いた。YycFD54H 過剰発現株での野生型 YycF 蛋白質は、マルチコピープラスミド pRB373 のみを導入した野生株に比べ、1.1 倍とほとんど変化はみられなかった (図21, YycF)。

また、転写レベルでの発現制御を調べるために、野生型 YycF および YycFD54H 過

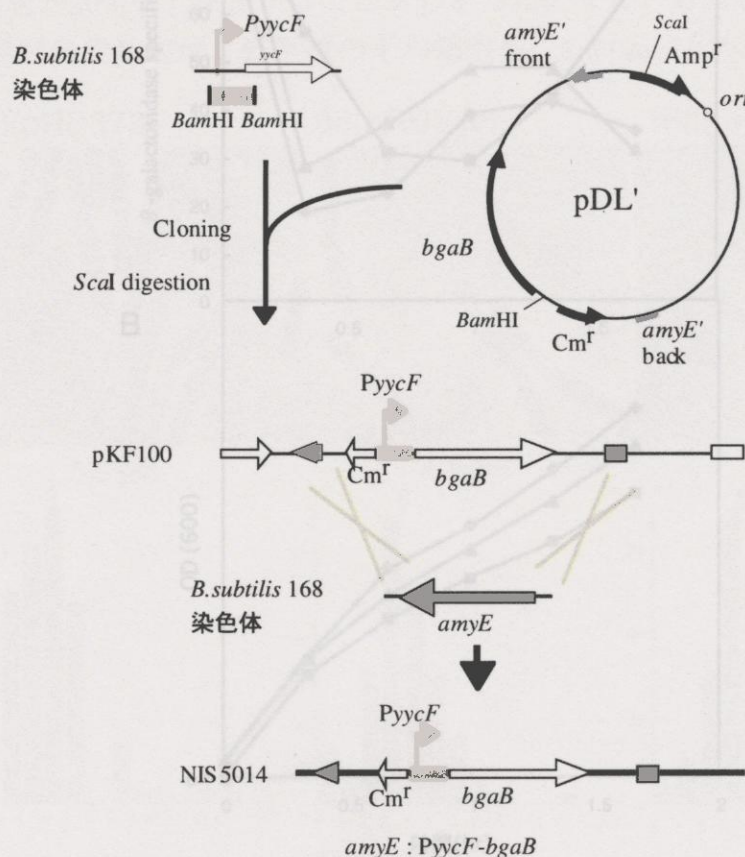


図22. *yycF*プロモータ活性測定株 (P *yycF*-*bgaB*) 作製

*yycF*遺伝子上流の制御領域324 bpをpDL'プラスミドの*Bam*HI部位に挿入し、得られたプラスミドpKF100を、*Scal*で切断し直鎖状にした後、相同組換えにより枯草菌 *amyE* 遺伝子部位に組み込んだ。

剰発現株における *ycfF* プロモータ活性の測定を行った。そのため、*ycfF* 上流の制御領域の下流にレポーター遺伝子として耐熱性 β ガラクトシダーゼ遺伝子 (*bgaB*) を融合した配列 (pKF100由来) を枯草菌 *amyE* 遺伝子部位に組み込んだ株, NIS5014(*amyE*: *PycfF*-*bgaB*), を作成した (図22)。このNIS5014株に pRBYycF, pRBYycFD54Hを導入した株を孢子形成培地、37℃の条件で培養し、細胞内の耐熱性 β ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、*ycfF* プロモータ活性は、いずれの株でも対数期初期に高く、後期には減衰する同じ傾向を示し、YycF, YycFD54H蛋白質の過剰発現による変化はみられなかった (図23. A)。したがって、YycF 蛋白質は、自己の発現制御には関与していないと考えられる。

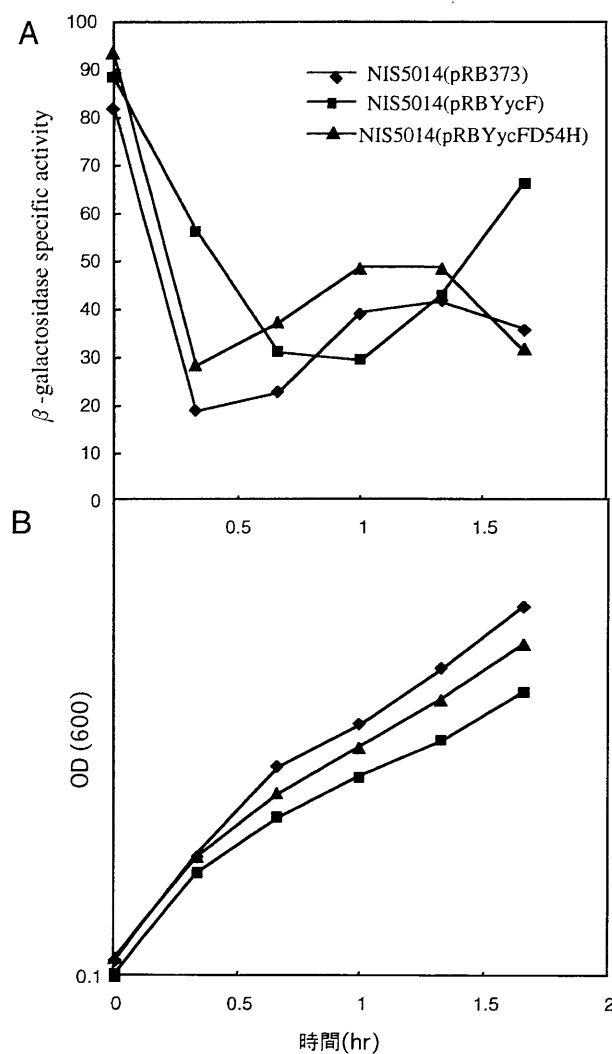


図23. YycF過剰発現による *ycfF* プロモータ活性への影響

A *ycfF* プロモータ活性 孢子形成培地 37℃で振とう培養した細胞内の耐熱性 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。B: その際の生育曲線を併せて示した。

3.3.4. YycFおよびYycFD54H蛋白質過剰発現による細胞形態への影響

YycF および YycFD54H 過剰発現による細胞への影響を調べるために、蛍光顕微鏡による細胞形態の観察を行った。顕微鏡観察には、*yycF* 遺伝子が発現している対数期の細胞 (OD₆₀₀= 0.4) の細胞を用いた。

顕微鏡観察では、野生型 YycF および YycFD54H 過剰発現株において、ミニセル (1.5 μ m以下の細胞) が観察された (図24. A, 矢印)。ミニセルの頻度は、野生型 YycF過剰発現株では4.8 % (細胞1020個あたりミニセル49個)、YycFD54H蛋白質過剰発現株では2.9%(細胞1080個あたりミニセル31個)であった。マルチコピープラスミド pRB373 のみを導入した野生株では、ミニセル放出頻度は0.2% (細胞1074個あたりミニセル2個)であることから、YycF およびYycFD54H蛋白質の過剰発現によりミニセルの放出頻度が、それぞれ24倍、15倍に上昇することが明らかになった。さらに、顕微鏡写真を基に100個の細胞長を測定し、細胞長の分布および平均を求めたところ、野生型 YycF および YycFD54H 過剰発現株では、野生株では見られない3 μ m 以下の細胞が20%以上存在することがわかった。また、野生型 YycF および YycFD54H 過剰発現株では、野生株の平均細胞長：5.6 μ mに比べ4.1 μ mであり、細胞

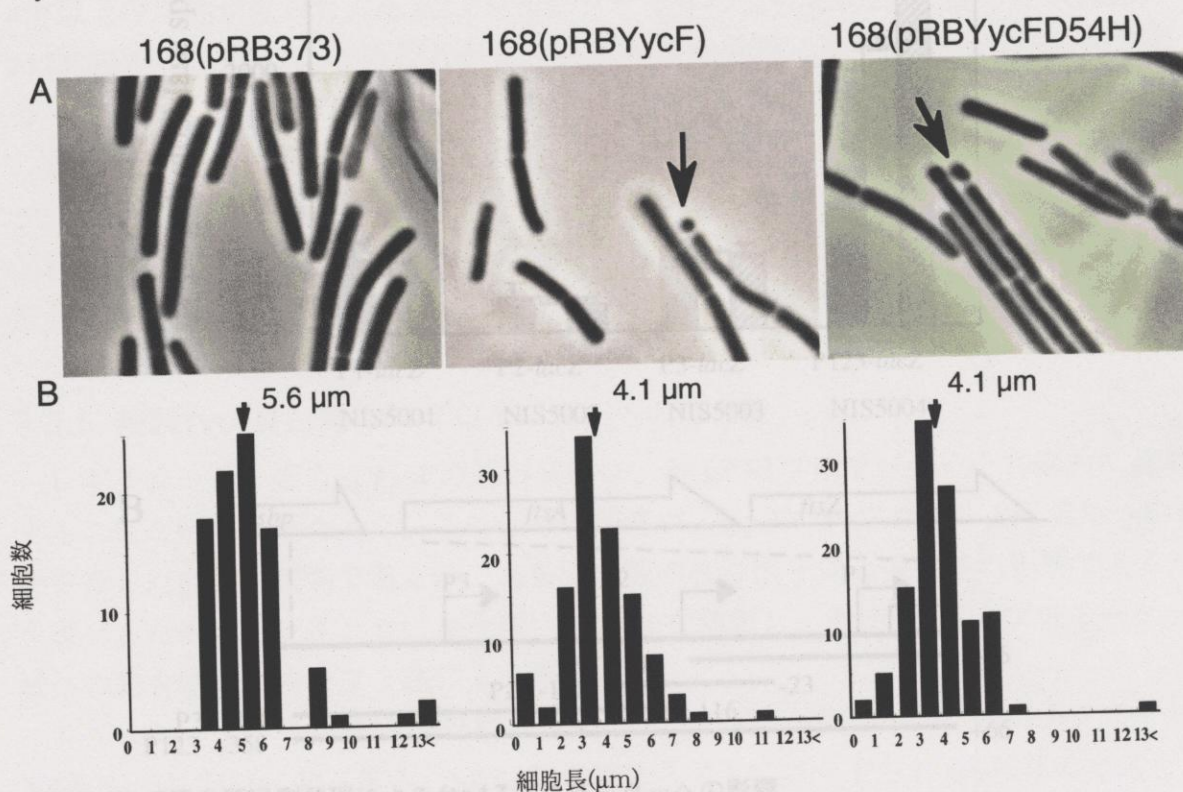


図24. YycF蛋白質の過剰発現による細胞長への影響

A顕微鏡の写真 LB培地37℃で培養した対数増殖期[OD(600)=0.4]の細胞を集菌し、エタノール固定後、顕微鏡で観察した。ミニセルを矢印で示した。
B細胞長の分布, 100個の細胞の長さを測定しヒストグラムで示した。細胞長の平均を矢印で示した。

が全体に短くなっていた（図24. B）。

3.3.5. YycF蛋白質過剰発現株における *ftsAZ* 遺伝子のプロモーター活性の測定

YycF蛋白質過剰発現により、ミニセルの頻度が上昇し細胞長が短くなることがわかった。ミニセルの頻度は、細胞分裂の正の因子であるFtsZ蛋白質の過剰発現発現（Ward JE Jr & Lutkenhaus J., 1985）や細胞分裂の負の制御因子である *minCD* 遺伝子の欠失によって上昇する（Bi E. & Lutkenhaus J., 1990）。このため、レギュレーター蛋

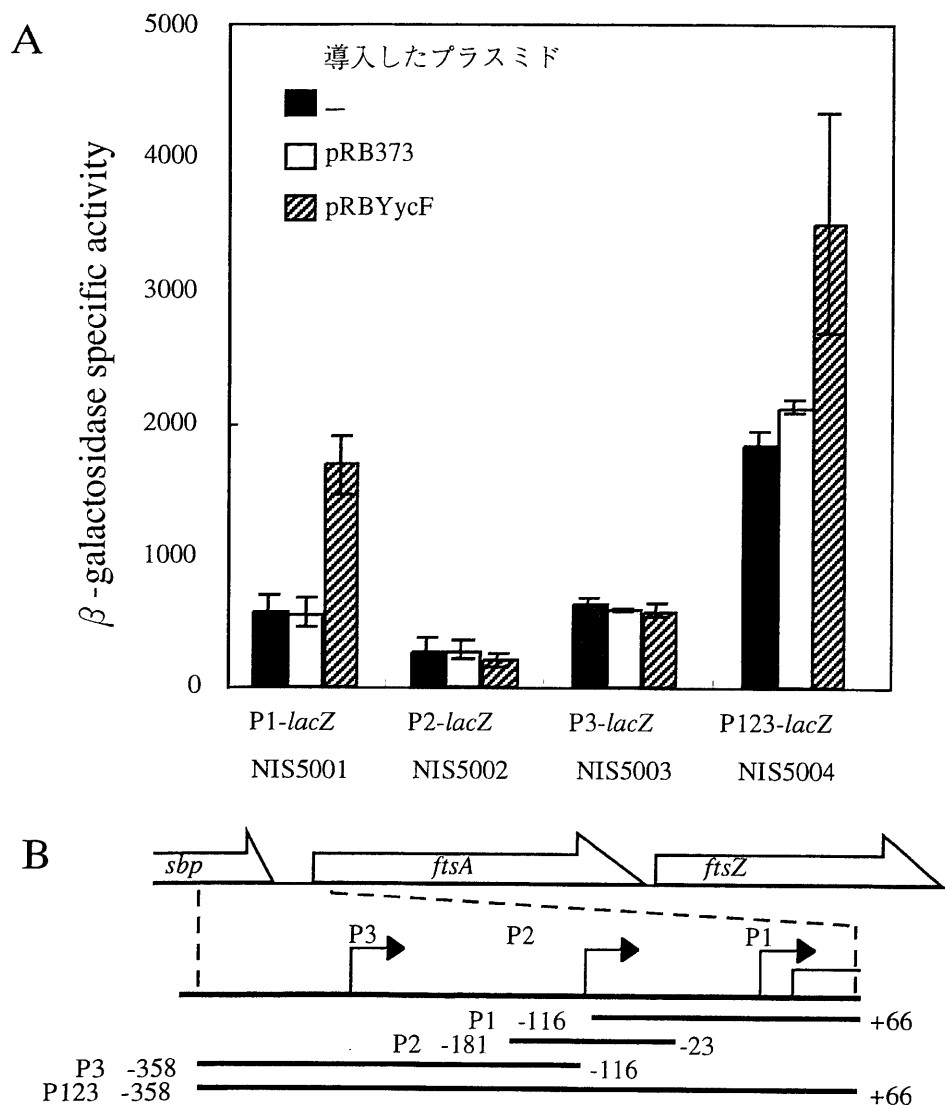


図25. YycF蛋白質過剰発現による *ftsAZ* プロモーターへの影響

A *ftsAZ* プロモーター活性、LB培地37℃で培養した対数増殖期 [OD(600)=0.4] の細胞の β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。3回の測定を行いその平均値を棒グラフで示した。併せて標準誤差を示した。

B *ftsAZ* オペロンの模式図とLacZアッセイに用いた各プロモーター領域を併せて示した。数字は *ftsAZ* P1 プロモーターの転写開始点 (+1) からの距離 (bp) を示している。

白質YycFの発現量が細胞分裂遺伝子の転写に影響する可能性が考えられた。そこで、細胞分裂において中心的役割を担っており（Harry E.J. & Wake R. G., 1989）、細胞の増殖に必須な因子でもある *ftsAZ* 遺伝子の転写に対するYycF蛋白質過剰発現の影響を調べた。

*ftsA*遺伝子上流には、対数増殖増殖期の主要なシグマ因子である σ^A 依存性のP1およびP3プロモーターと胞子形成の初期過程の転写制御を担う σ^H 依存性のP2プロモーターの計3つのプロモーターが同定されている（図25. B; Gonzy-Treboul *et al.*, 1992）。これらのプロモーターP1, P2およびP3からの転写量を測定するために、*ftsA* 遺伝子プロモーター配列を*lacZ*遺伝子と融合した配列を *amyE* 遺伝子部位に挿入した株を用いて、YycF蛋白質を過剰発現させた場合の細胞内 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。 β -ガラクトシダーゼ活性の測定は、LB培地で培養した対数増殖期 [OD(600)=0.4] の細胞を用いて行った。

その結果、*ftsAZ* P2およびP3プロモーター活性（図25, P2-*lacZ* NIS5002, P3-*lacZ* NIS5003）は、YycF蛋白質の過剰発現によって変化は見られなかったのに対し、P1プロモーター活性（図25. P1-*lacZ* NIS5001）は、YycF過剰発現により野生株に比べて4倍以上の増加が見られ、*ftsAZ*プロモーター全体の活性も約2倍上昇した（図25, P123-*lacZ* NIS5004）。このことから、YycFの過剰発現により*ftsAZ*遺伝子のP1プロモーターの発現が、特異的に誘導されることが明らかになった。

YycFD54H過剰発現株でも同様に、P1およびプロモーター全体の活性が上昇したが、活性型の変異をもたない野生型のYycFの過剰発現株と同程度であった（結果は記載しない）。これは、ミニセルの頻度や細胞長の変化も同程度であったことと一致している。

3.3.6. 精製YycF蛋白質のP1プロモーターへの結合能

レギュレーター蛋白質YycFの過剰発現は、*ftsAZ* P1プロモーターを特異的に誘導することが明らかになった。この転写の誘導が、YycFのP1プロモーター領域への結合を介した直接の制御であるか、あるいは他の転写因子による間接の影響であるかを調べるために、レギュレーター蛋白質YycFを精製し、その*ftsAZ* p1プロモーター領域への結合能をゲルシフト法により解析した。

レギュレーター蛋白質YycF精製のために、*yycF* 遺伝子全長をpET15bプラスミドの *NdeI*-*Bam*HI 部位に組み込み、pET15bプラスミド上にコードされる6残基のヒスチジンをN末端側に融合させた。得られたプラスミドpETYycFを大腸菌BL21pLysS株に導入し、LB培地で培養を行った。OD600=0.6の時点で、1 mM IPTGを添加しHis6-YycF蛋白質の発現を誘導した。3時間後に細胞を集菌し、超音波により破碎した後、遠心

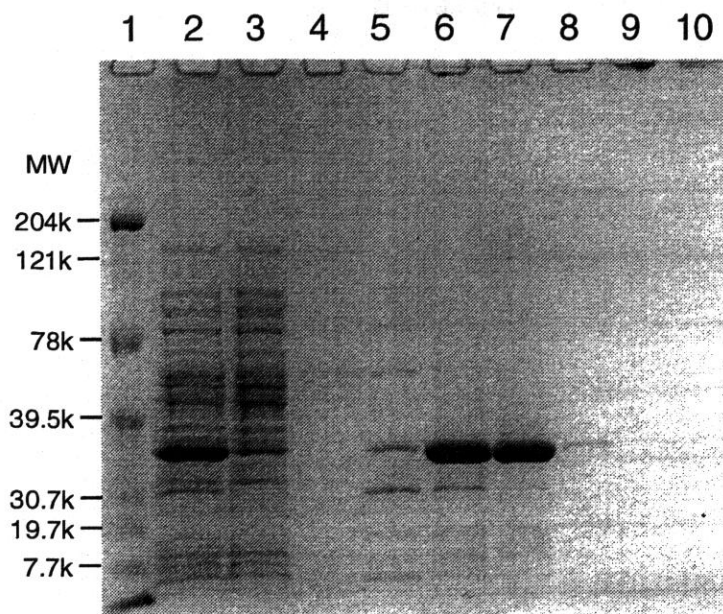


図26. His6-YycF蛋白質の精製における各画分のSDS-PAGE

精製における各画分は15%アクリルアミドゲルで展開し、CBB染色した。レーン：1、マーカー蛋白質（Bio-Rad）2、超音波破碎後の遠心分離により分画した上清、3、フォロースルー画分、4、1 mMイミダゾール洗浄画分、5、30 mM イミダゾール洗浄画分、6、100 mMイミダゾール溶出画分、7、200 mMイミダゾール溶出画分、8、300 mMイミダゾール溶出画分、10、1 Mイミダゾール溶出画分、100 mMイミダゾール溶出画分（レーン6）を精製YycF蛋白質画分としてゲルシフトアッセイおよびDNaseIフットプリントアッセイに用いた。

分離により得られた可溶性画分から、ニッケルカラムを用いてHis6-YycF蛋白質を精製した（図26）。ニッケルカラムからのHis6YycF蛋白質の溶出は100～1000 mMイミダゾールにより行った。ゲルシフトアッセイには、精製YycF蛋白質として100 mMイミダゾール溶出画分（図26.レーン6）を用いた。

ゲルシフトアッセイのプロープには、*ftsAZP1*プロモーター-163～-35 領域をPCR反応により増幅し、3'末端をジゴキシゲニン標識して用いた（図27. B プロープP1）。また、*ftsAZp3*プロモーター上流部分を対照のプロープとして用いた（図27. B プロープP3）。

その結果、12 pmole 以上のYycF蛋白質存在下で、*ftsAZP1*プロモーター領域のDNA断片との複合体が検出された（図27. A 複合体）。*ftsAZp3*プロモーター上流DNA断片は、24 pmole YycF 存在下でも変化は見られず複合体を形成しなかった。このことから、*ftsAZ*遺伝子P1プロモータには、YycF蛋白質が直接結合して転写の誘導が起きると考えられる。

しかし、精製His6-YycF蛋白質は*ftsAZ*遺伝子P1プロモータ領域との複合体の形成に1000倍もの分子数が必要であり、そのDNA結合能は比較的低いこともわかった。こ

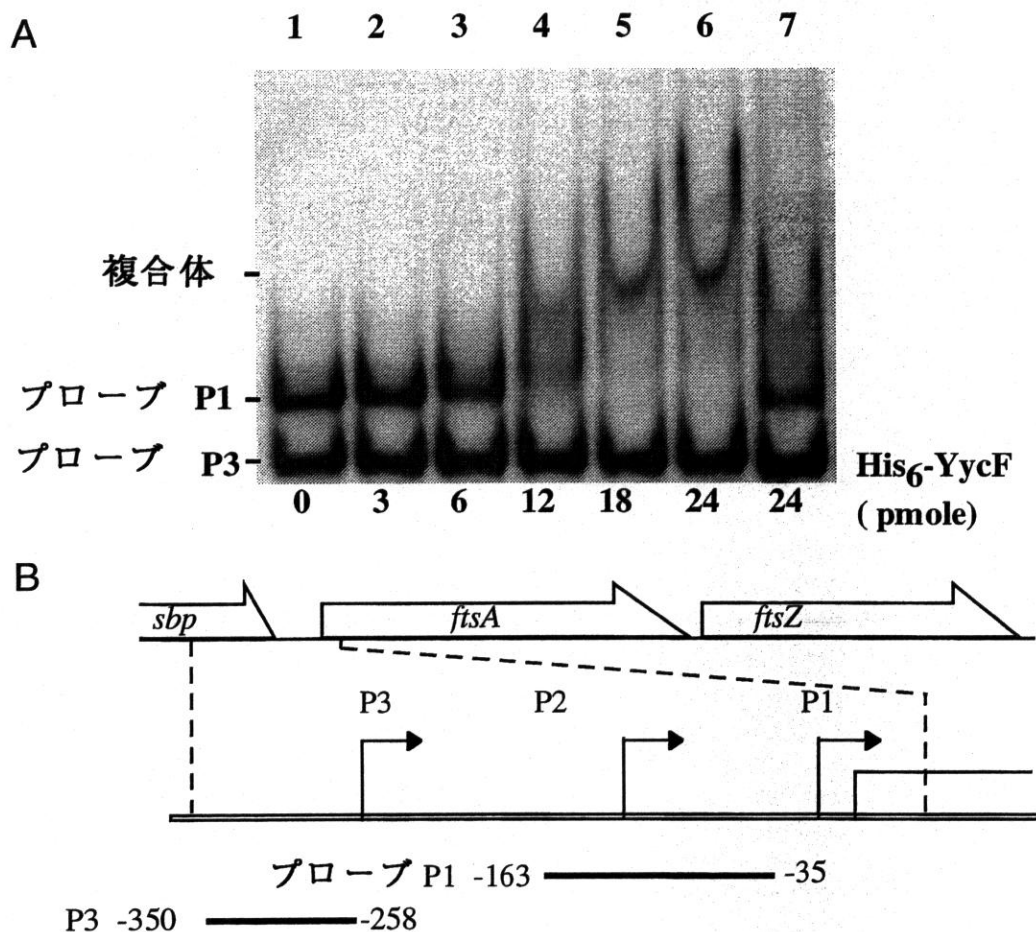


図27. *ftsAZ* P1プロモーター領域へのYycFの結合能

A 精製YycF蛋白質を用いた*ftsAZ*制御領域に対するゲルシフトアッセイ

ディゴキシゲニン標識した各プローブ20 fmoleを 0 pmole (レーン1), 3 pmole (レーン2), 6 pmole (レーン3), 12 pmole (レーン4), 18 pmole (レーン5), 24 pmole (レーン6, 7) の精製YycF蛋白質とともに加温した。レーン7の反応液には20 pmoleの非標識のP1プローブを加えた。試料は5%非変性アクリルアミドゲルで展開し、DIG Gel Shift Assay Kit (Roche)を用いてシグナルを検出した。

B *ftsAZ* オペロン構造 *ftsAZ* オペロンの模式図とゲルシフトアッセイのプローブとして用いたプロモーター領域を併せて示した。数字は *ftsAZ* P1プロモーターの転写開始点 (+1) からの距離 (bp) を示している。

れは、大腸菌内で精製したYycF蛋白質がYycGによりリン酸基転移反応を受けていない非活性型であるためと考えられる。このため、センサー蛋白質YycGの精製を行い、リン酸基転移反応によるYycF蛋白質の活性化を試みたが、精製したYycG蛋白質はリン酸基転移活性を示さなかった (結果は記載しない)。また、活性型変異を導入したYycFD54H蛋白質の精製を試みたが、可溶性のYycFD54H蛋白質を得ることが出来ず、解析に用いることが出来なかった。

多くの精製レギュレーター蛋白質は、アセチルフォスフェイトの存在下で自己リン酸化し、DNAへの結合能が上昇する（McCleary W.R., 1996; Cheng, H.P. & Walker, G. C., 1998; Yamamoto H, *et al.*, 2000）。このため、アセチルフォスフェイトを添加した条件でのゲルシフトアッセイを行ったが、精製His6-YycF蛋白質のP1プロモーターへの結合能に変化は見られなかった（結果は記載しない）。この結果は、YycF蛋白質と高い相同性をしめすPhoR蛋白質が、アセチルフォスフェイトの存在下で自己リン酸化されないというHulettらによる報告と一致している（Liu, W. & Hulett, F. M., 1997）。

3.3.7. DNaseIフットプリントによるYycF結合配列の同定

P1プロモーター領域のYycF 蛋白質認識配列の同定を試みた。このために、精製YycF蛋白質を用いて *ftsAZP1* プロモーター領域のDNaseIフットプリント解析を行った。プローブとしては、Coding鎖あるいはNoncoding鎖の5' 末端を³²P標識した *ftsAZP1* プロモーター領域を含むDNA断片を用いた。³²P標識した *ftsAZP1* プロモーター領域を含むDNA断片 100 fmole を精製YycF蛋白質 30~90 pmole 存在下で加温した後、DNaseIを添加し部分分解を行った。反応産物を、アクリルアミドゲルで展開した後、BAS5000でシグナルを検出した。その結果、YycF蛋白質の添加により、30 pmole YycF存在下では、Coding鎖とNoncoding鎖で共通の領域（-68~-34 bp）がDNaseI分解反応から保護された。さらに、Coding鎖では、60 pmole YycF存在下で-102~-98 bp, -95~-93 bpおよび-84~-75 bp 領域がDNaseI分解反応から保護され、P1プロモーターには、親和性の異なる複数のYycF結合配列が存在することが明らかになった（図28）。また、ゲルシフトアッセイでは複合体形成にプローブDNAの1000倍のYycF分子を必要であったのに対し、DNaseIフットプリントでは300倍のYycF 存在下でDNAへの特異的な結合が確認された。これは、ゲルシフトアッセイでは、電気泳動によって分離する途中に、YycF-DNA複合体の崩壊が起こっている可能性が考えられる。

3.3.8. *ftsAZP1* プロモーター上流領域部分欠失によるYycF過剰発現による転写の活性化に必要な領域の同定

P1プロモーター領域は、複数のYycF認識配列を含んでいることがわかった。YycFによるP1プロモーターの誘導には、これらのYycF認識配列が必要とされるはずである。このため、P1プロモーター上流の制御領域を上流から部分的に欠失させた配列との *lacZ*-fusionを作成し、*amyE* 遺伝子部位に挿入した株（NIS5012: P1-138-*lacZ*, NIS5011: P1-130-*lacZ*, NIS5010: P1-116-*lacZ*, NIS5009: P1-108-*lacZ*, NIS5008: P1-92-

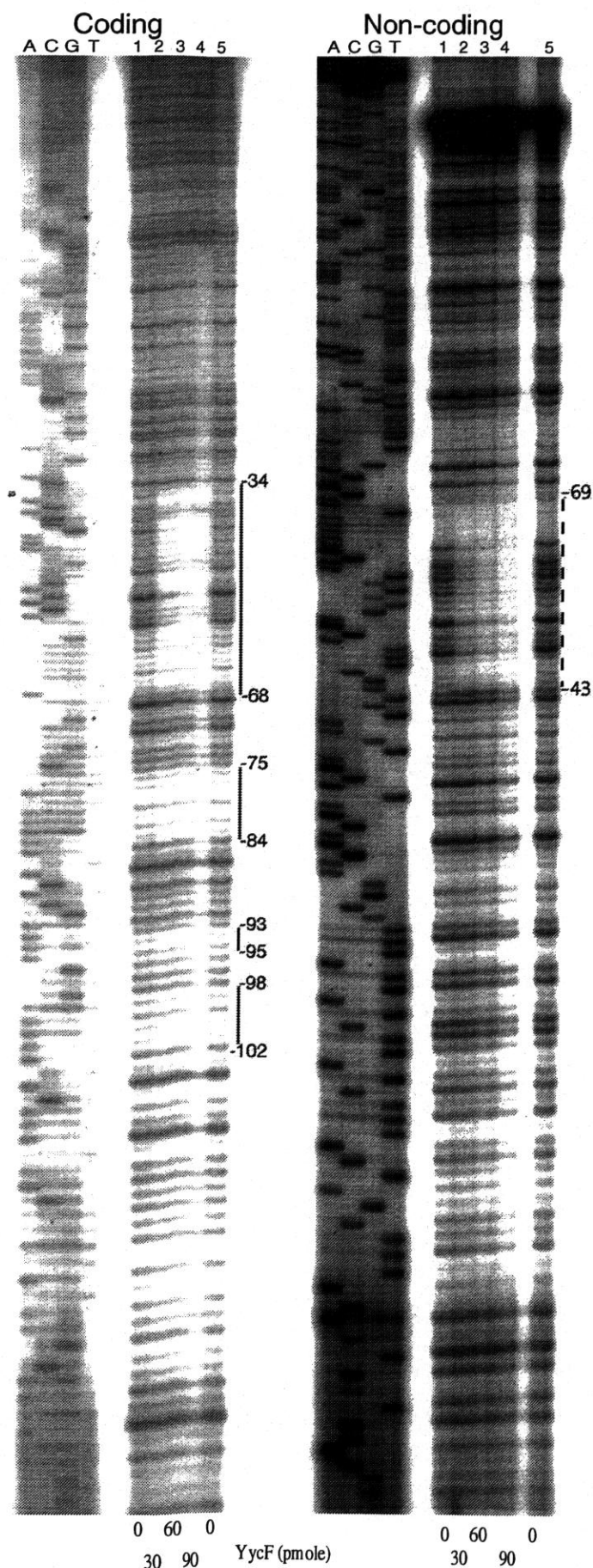


図28. YycFによる *ftsAZ* 制御領域のDNaseI フットプリント

ftsAZ P1プロモーター上流を含むDNA断片 (198bp) のCoding鎖あるいはNoncoding鎖の5'末端を³²P標識したプローブとして用いた。各プローブ100 fmoleを0 pmole (レーン1, 5), 30 pmole (レーン2), 60 pmole (レーン3), 90 pmole (レーン4) の精製YycF蛋白質とともに加温した後、2 UのDNaseIを加えDNA断片の部分分解を行った。反応産物は5%アクリルアミドゲルで展開し、BAS2500システムによりシグナルを検出した。数字は *ftsAZ* P1プロモーターの転写開始点からの距離(bp)を示している (図29.B参照)。レーンACGT: ダイデオキシ法により作成したプローブDNAのシーケンスラダー

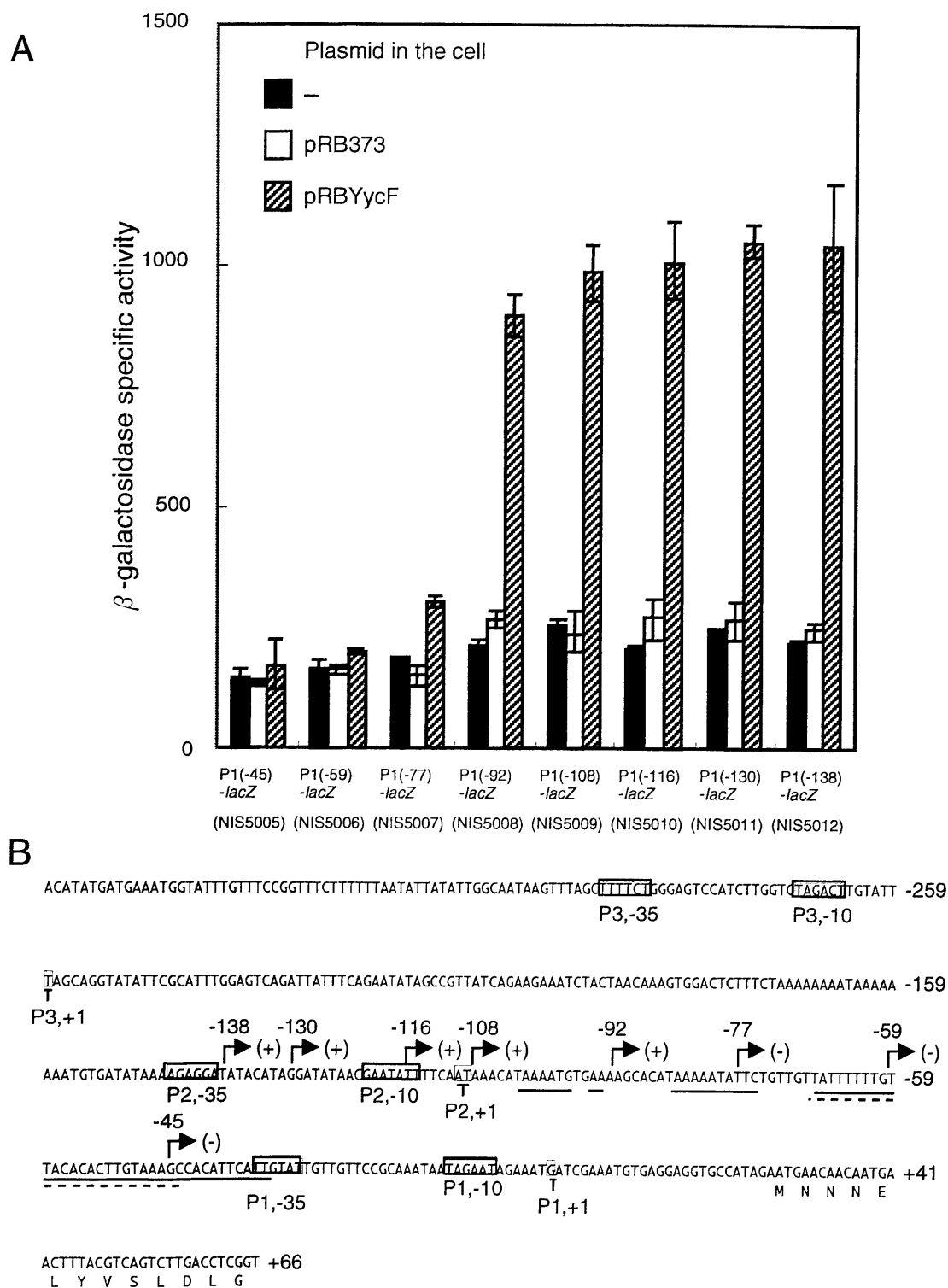


図29. YycF による転写誘導に必要な領域の同定

A 各P1プロモーター領域-lacZ融合株のLacZ活性

LB培地37℃で培養した対数増殖期 [OD(600)=0.4] の細胞のβ-ガラクトシダーゼ活性を示した。測定は3回行いその平均値を棒グラフで示した。併せて標準誤差を示した。

B *ftsAZ* 制御領域の配列

LacZアッセイに用いた各プロモーター領域を併せて示した。数字は *ftsAZ* P1プロモーターの転写開始点 (+1) からの距離 (bp) を示している。DNaseIフットプリント (図28) により明らかになったYycF蛋白質の結合領域を傍線 (Coding鎖) と破線 (Noncoding鎖) で示した。

lacZ, NIS5007: P1-77-*lacZ*, NIS5006: P1-59-*lacZ*, NIS5005: P1-45-*lacZ*, 図29.B) を作成した。これらの *ftsAZ* P1プロモーター-*lacZ*融合株に *ycfF* 遺伝子全長を組み込んだ枯草菌マルチコピープラスミド pRBYycF を導入し、YycF蛋白質の過剰発現による転写の活性化を調べた。

その結果、YycF過剰発現による4倍程度の転写の活性化は、P1プロモーター上流 -92 bp (転写開始点を+1とする) までの領域を欠失した株 (図29.A, NIS5012: P1-138-*lacZ*, NIS5011: P1-130-*lacZ*, NIS5010: P1-116-*lacZ*, NIS5009: P1-108-*lacZ*, NIS5008: P1-92-*lacZ*) で確認された。P1プロモーター上流 -77 bpまで欠失した株 (図29. A, NIS5007: P1-77-*lacZ*) では、YycF過剰発現による転写の活性化は2倍弱まで低下した。このYycF過剰発現による転写の活性化は、それ以上の欠失した株 (図29. A, NIS5006: P1-59-*lacZ*, NIS5005: P1-45-*lacZ*) では、ほとんど見られなくなった。以上の結果から、YycF蛋白質による転写の活性化には、*ftsAZ* P1プロモーター上流 -92 bp から-77 bp領域が必要であることがわかった。この領域は、DNaseIフットプリント解析により明らかになったYycF 結合領域の一部 (P1-84~-75 bp) を含んでいる。この領域へのYycF蛋白質の親和性は、P1-68~-34 bp部分に比べて低いが、YycF蛋白質による転写の活性化には重要な部分であることが示された。転写の活性化には、複数の領域に結合したレギュレーター蛋白質同士は相互作用し、それに伴って生じるDNAの立体構造が必要である (Carmona, M., et al., 1997) 。P1-84~-75 bp領域は、この相互作用に必要であると予想される。さらに、P1プロモーター上流 -35 bpまで欠失した株では、プロモーターの活性は検出されなかった (結果は記載しない) 。

3.3.9. *ftsAZ* P1プロモーター欠失による細胞分裂への影響

YycF蛋白質は*ftsAZ*遺伝子のP1プロモーター上流に結合し、正の転写制御を行っていることが明らかになった。細胞の増殖に必須である*ftsZ*遺伝子上流には、P1プロモーター以外にも、対数増殖期に誘導されるP3プロモーターと胞子形成期初期過程に σ^H により誘導されるP2プロモーターが同定されており、P1プロモーターのみに限定されるYycFGによる*ftsAZ*遺伝子の転写制御が細胞の増殖に与える影響は未知であった。そこで、*ftsAZ* P1プロモーターの役割を明らかにするために、*ftsAZ*のP1プロモーターの欠失株を作成し、生育および細胞形態への影響を調べた。

pMutinT3プラスミドの*Bam*HI部位にP1プロモーター領域（-109～+1）を欠失した*ftsAZ*遺伝子制御領域（-319～+224）を組み込んだプラスミドpKF040を作成した（図30.A pKF040）。このプラスミドpKF040を用いて枯草菌の形質転換を行い、相同組み換えによりpKF040を枯草菌*ftsAZ*遺伝子制御領域に組み込んだ（図30.A NIS5013株）。NIS5013株では、IPTG無添加の条件では、P3およびP2プロモーターからの転写によってのみ*ftsAZ*遺伝子が転写される。作成した*ftsAZ*遺伝子P1プロモーターの欠失株は、IPTGの添加無添加によらず、野生株と同様の生育を示した（結果は記載しない）。これより、*ftsAZ* P1プロモーターの欠失は、細胞の増殖速度に影響しないことがわかった。この結果は、Gonzy-Treboulらによる結果と一致している（Gonzy-Treboul *et al.*, 1992）。しかし、顕微鏡による細胞形態の観察を行ったところ、NIS5013株はIPTG無添加の条件で細胞の伸長が観察された（図30.C）。平均の細胞長から、*ftsAZ* P1プロモーターの欠失により、細胞が2倍に伸長することが明らかになった。また、細胞長が10 mm以上に異常伸長した細胞も2割程度観察された。

P1プロモーターからの転写は、細胞が正常な分裂周期を保つために重要であることが示された。しかし、P1プロモーター欠失株は作成可能であり、YycFGが細胞の増殖に必須である説明には至らなかった。これより、YycFGの制御系が、他の必須遺伝子の転写制御にも関与している可能性が考えられた。

3.4. 枯草菌マクロアレイを用いた全転写産物の解析によるYycFG制御ネットワークの全容解明の試み

ゲノムプロジェクトにより全ゲノム配列が明らかになった枯草菌では、近年その配列情報を基に作成されたマイクロアレイ、マクロアレイが利用可能となった。これらアレイシステムにより、ゲノム上のすべての遺伝子の発現を網羅的に解析することができる。我々は、2成分制御系YycFGによる転写制御ネットワークの全容を明らかにするためにマクロアレイシステムを用いた全転写産物の解析を行った。枯草菌のマクロアレイは、枯草菌168株の4109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たシグマジェノシスのパノラマアレイを用いた。

3.4.1. 枯草菌マクロアレイを用いた全転写産物の解析

*yycF*遺伝子全長を組み込んだ枯草菌マルチコピープラスミドpNOYycFを持つ菌株168(pNOYycF)を、LB培地37℃で培養しOD600が0.4の時点で集菌し、得られた細胞より全RNAを抽出した。この全RNAを鋳型として、逆転写酵素によって³³P標識cDNAの合成を行いマクロアレイのプローブとして用いた。プローブをマクロアレイメンブレンへハイブリダイゼーションを行った後、BAS5000システム（富士フイルム）にてシグナルを検出した。スポットイメージを図31.Aに示した。比較の対象であるpNO41を導入した野生株の結果とシグナル強度の総和が等しくなるように値の標準化し、得られた値を対数グラフに示した（図31.B）。また、マクロアレイの再現性を調べるために枯草菌168株より抽出した全RNAを用いてプローブを作成し、2回のマクロアレイ解析を行ったところ、シグナルの検出された上位2050スポットの95%が1.5倍の誤差範囲に収まった。さらに、全スポット4109の99%以上も、2倍以内の誤差に収まったことから、マクロアレイの結果に高い再現性があることを確認した。

シグナル強度が12以上であり、その誤差が1.5倍以下と考えられる2050遺伝子の中で、YycFの過剰発現によりシグナル強度が2倍以上変化した遺伝子を表10に示した。YycF蛋白質の過剰発現により、8つの遺伝子(*srfAB*, *ftsE*, *srfAA*, *srfAD*, *yheJ*, *xkdI*, *lplC*, *rbsK*)のシグナル強度が2倍以上に増加していることが確認された。

シグナル強度の増加が確認された3遺伝子*srfAA*, *srfAB*および*srfAD*は、抗生物質サーファクチンの合成酵素をコードしており、26kbpの巨大な*srf*オペロンとして転写されている。*ftsE*遺伝子は大腸菌をはじめ多くのバクテリアで保存されているABCトランスポータと予想される膜蛋白質をコードしているが、枯草菌において実験的な解析はなされていない。大腸菌ではFtsE蛋白質が細胞の分裂に必須であり、カリウムイオンポンプ蛋白質の膜への局在に関与していることが報告されている

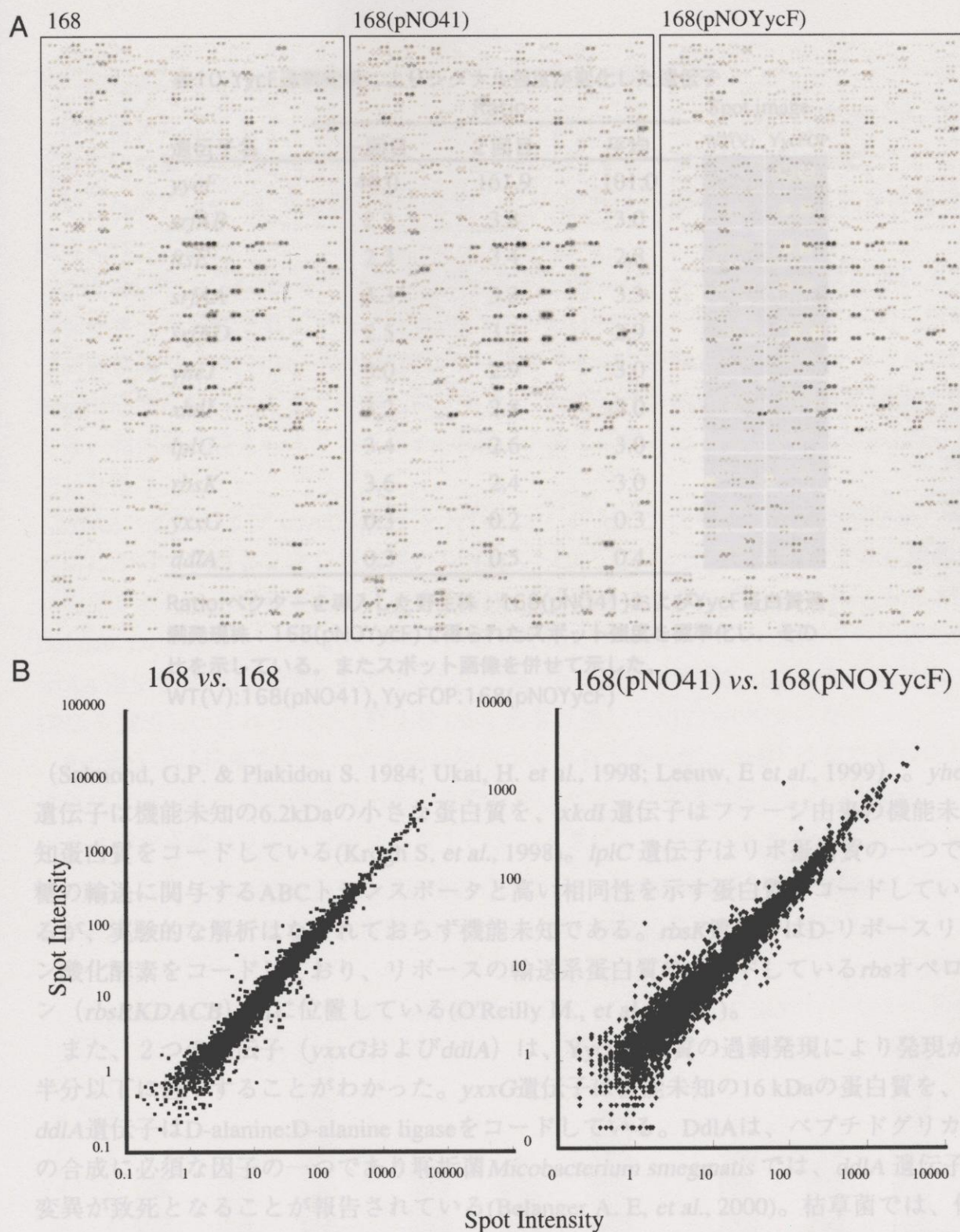


図31. 枯草菌のマクロアレイを用いた全転写産物の解析

A 枯草菌のマクロアレイイメージ

LB培地37度で培養した細胞より抽出した全RNAを鋳型として³²P標識cDNAを合成し、枯草菌マクロアレイにハイブリダイゼーションを行い、シグナルをBAS5000(富士フイルム)で検出した。

B スポット強度の対数軸プロット

検出したスポットイメージをマクロアレイ解析ソフトウェアArrayGauge(富士フイルム)を用いて数値化した後、バックグラウンドを除いたスポット強度の総計が、野生株の結果と等しくなるように値を標準化し、対数軸にプロットした。

表10. YycF過剰発現によりシグナル強度が変化した遺伝子

遺伝子名	Ratio			Spot image	
	一回目	2回目	平均	WT(V)	YycFOP
<i>yycF</i>	40.0	161.9	101.0		
<i>srfAB</i>	2.2	3.8	3.0		
<i>ftsE</i>	2.3	3.4	2.8		
<i>srfAA</i>	3.3	3.3	3.3		
<i>srfAD</i>	2.5	3.2	2.9		
<i>yheJ</i>	3.0	2.9	3.0		
<i>xkdI</i>	3.2	2.8	3.0		
<i>lplC</i>	3.4	2.6	3.0		
<i>rbsK</i>	3.6	2.4	3.0		
<i>yxxG</i>	0.3	0.2	0.3		
<i>ddlA</i>	0.3	0.5	0.4		

Ratio:ベクターを導入した野生株:168(pNO41)およびYycF蛋白質過剰発現株:168(pNOYycF)で得られたスポット強度を標準化し、その比を示している。またスポット画像を併せて示した。
WT(V):168(pNO41), YycFOP:168(pNOYycF)

(Salmond, G.P. & Plakidou S. 1984; Ukai, H. *et al.*, 1998; Leeuw, E *et al.*, 1999)。 *yheJ* 遺伝子は機能未知の6.2kDaの小さな蛋白質を、 *xkdI* 遺伝子はフェージ由来の機能未知蛋白質をコードしている(Krogh S, *et al.*, 1998)。 *lplC* 遺伝子はリポ蛋白質の一つで糖の輸送に参与するABCトランスポータと高い相同性を示す蛋白質をコードしているが、実験的な解析はなされておらず機能未知である。 *rbsK* 遺伝子はD-リボースリン酸化酵素をコードしており、リボースの輸送系蛋白質のコードしている *rbs* オペロン (*rbsRKDACB*) 内に位置している(O'Reilly M., *et al.*, 1994,)。

また、2つの遺伝子 (*yxxG* および *ddlA*) は、YycF蛋白質の過剰発現により発現が半分以下に低下することがわかった。 *yxxG* 遺伝子は機能未知の16 kDaの蛋白質を、 *ddlA* 遺伝子はD-alanine:D-alanine ligaseをコードしている。DdlAは、ペプチドグリカンの合成に必須な因子の一つであり恥垢菌 *Micobacterium smegmatis* では、 *ddlA* 遺伝子の変異が致死となることが報告されている(Belanger A. E, *et al.*, 2000)。枯草菌では、他にD-alanine:D-alanine ligaseをコードする遺伝子は見いだされていないため、必須遺伝子の一つであると予想される。

図32. LacZアッセイによるYycF蛋白質過剰発現による転写誘導の確認

枯草菌菌株 (NIS5016, NIS5020およびNIS5017) にプラスミドpNO41あるいはpNOYycFを導入し、対数増殖期(OD(600)=0.4)の細胞のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。3回の測定を行い平均値を棒グラフで示し、標準誤差を併せて示した。

3.4.2. LacZアッセイによるマクロアレイ解析結果の確認

枯草菌マクロアレイを用いた全転写産物の解析において、YycF蛋白質過剰発現により変化の見られた遺伝子の中で、*rbsK*, *ftsE*, *srfAA*, *srfAB*および *srfAD*遺伝子について、*lacZ*アッセイによる転写解析を行い、YycF蛋白質過剰発現による転写誘導の確認を行った。

*rbsK*遺伝子を含む*rbs* オペロンの上流の制御領域には、対数増殖期に誘導されるプロモーターが同定されている (O'Reilly M., et al.,1994)。この*rbs* プロモーターを含む制御領域 (-159~+71) を、レポーター遺伝子*lacZ*を持つpDL2プラスミドの*EcoRI*-*Bam*HI部位に組み込んだ。得られたプラスミドpKF044を *Sca*I処理により直鎖状にした後、相同組み替えにより枯草菌*amyE*遺伝子部位に組み込みNIS5016(*PrbsR*-159~+71)を得た。

srfAA, *srfAB*および *srfAD*遺伝子を含む*srf*オペロンの上流には、対数増殖期から定常期にかけて発現し2成分制御系のレギュレーターComA蛋白質によって転写誘導されるプロモーターが同定されている (Nakano, M. M. & Zuber, P., 1991; Roggiani, M. & Dubnau, D., 1993)。この*srf*オペロンの転写を測定するために、Nakanoらの作成した*srfAA* 遺伝子部位にトランスポゾンTn917-*lacZ*を組み込んだ株LAB295 から染色体DNAを抽出し、これを用いて野生株168を形質転換してNIS5020株を得た。

*ftsE*遺伝子は枯草菌において実験的解析がなされておらず、*ftsE*上流制御領域におけるプロモーターは未同定である。このため、ゲノム上の*ftsE*遺伝子部位にpMutinT3プラスミドを組み込み、プラスミド上にコードされるβ-ガラクトシダーゼの活性を測定することで*ftsE*遺伝子の発現量を調べた。そのため、*ftsE*遺伝子のSD配列を含む5'末端配列をプラスミドpMutinT3の*Hind*III-*Bam*HI部位に組み込んだプラスミド

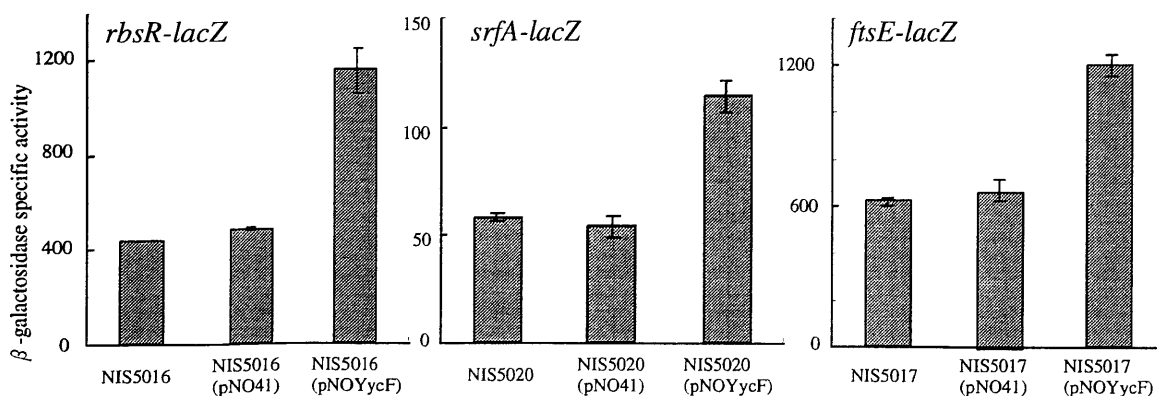


図32. LacZアッセイによるYycF蛋白質過剰発現による転写誘導の確認

枯草菌菌株 (NIS5016, NIS5020およびNIS5017) にプラスミドpNO41あるいはpNOYycFを導入し、対数増殖期[OD(600)=0.4]の細胞のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。3回の測定を行い平均値を棒グラフで示し、標準誤差を併せて示した。

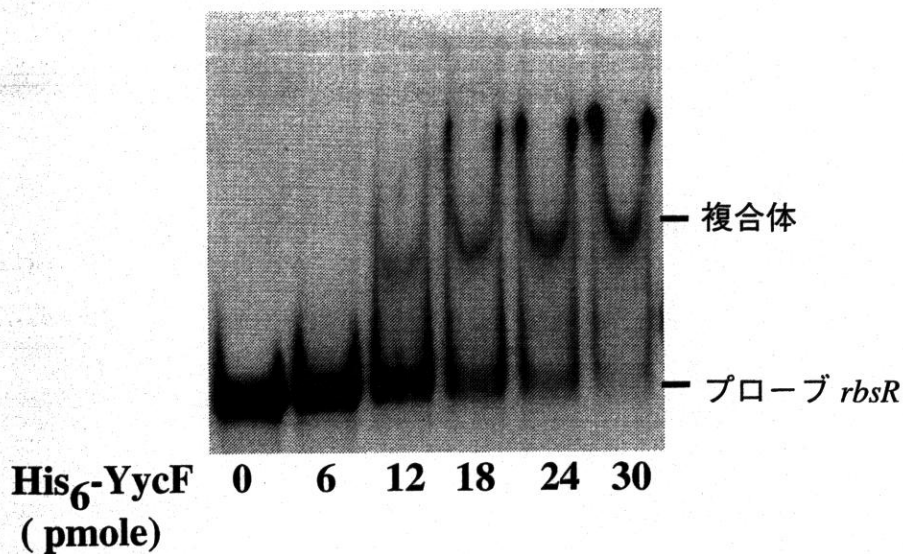
pKF043を作成し、枯草菌の相同組み替えにより *ftsE* 遺伝子部位に pKF043 を組み込みこんだ株 NIS5017 を作成した。この NIS5017 株では、プラスミドの挿入により本来の *ftsE* 遺伝子への転写が妨げられるため、培養は IPTG 1mM を添加した条件で行い *Pspac* プロモータからの転写によって *ftsE* 遺伝子の発現を誘導した。

この 3 株 (NIS5016、NIS5020 および NIS5017) に pNOYycF を導入し、対数増殖期 (OD₆₀₀=0.4) の細胞内 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、YycF 蛋白質の過剰発現によって、*rbs* オペロンのプロモーター活性は約 3 倍に誘導され、*srf* オペロンおよび *ftsE* 遺伝子の転写は約 2 倍に誘導された (図 32)。これより、マクロアレイで検出された転写の誘導が、実際に細胞内で起こっていることが確認された。

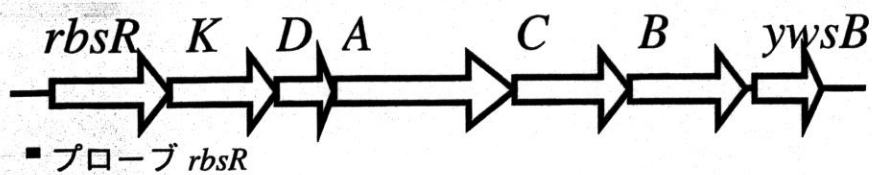
3.4.3. ゲルシフトアッセイによる *rbs* オペロンおよび *ftsE* 遺伝子制御領域への YycF 蛋白質結合能の解析

LacZ アッセイにより確認された YycF 蛋白質の過剰発現による転写の誘導が、DNA への結合を介した直接の制御であるかを確認するために、*rbs* オペロンおよび *ftsE* 遺伝子上流の制御領域をプローブとして、精製 YycF 蛋白質によるゲルシフトアッセイを行った。精製 YycF 蛋白質として、*ftsAZP1* プロモーターの解析に用いた同じ画分を用いた (図 26. レーン 6)。プローブとして用いた領域を図 33.BD に模式図で示した。その結果、His₆-YycF 蛋白質は、*rbs* オペロンおよび *ftsE* 遺伝子上流の制御領域と複合体を形成することが確認され (図 33.BD 複合体)、*rbs* オペロンおよび *ftsE* 遺伝子は、*ftsAZ* 遺伝子と同様に、2 成分制御系 YycFG の直接の制御下にあることが示された。また、反応液中の 20 fmole DNA プローブすべてが YycF 蛋白質と複合体を形成するために必要な YycF 蛋白質量は、*ftsE* 遺伝子制御領域に対し 18 pmole、*rbs* オペロン制御領域に対して 30 pmole であった。*ftsAZP1* 領域に対しては 18 pmole であったことから (図 27.A)、YycF 蛋白質は、*rbs* オペロン制御領域よりも、*ftsE* 遺伝子制御領域および *ftsAZP1* プロモーター領域に親和性の高いことがわかった。

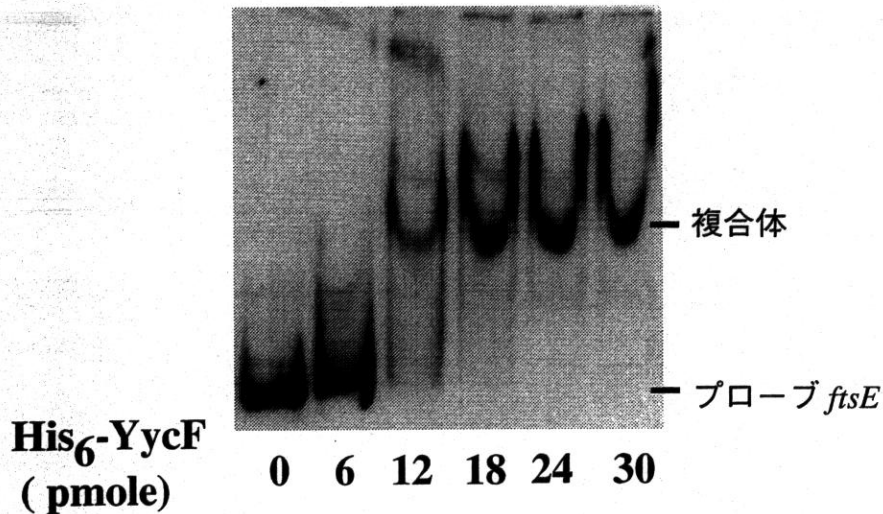
A



B



C



D

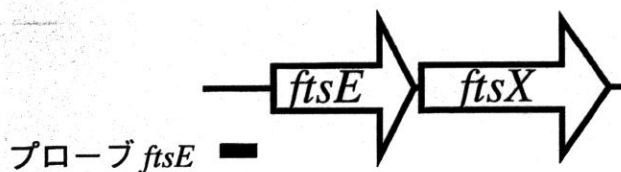


図33. ゲルシフトアッセイによる*rbs*オペロン、*ftsE*遺伝子制御領域に対するYycF蛋白質の結合能の解析
A, C ゲルシフトアッセイの結果

ディゴキシゲニン標識した*rbsR*遺伝子上流の制御領域127 bp(-149 ~ -23)；Aあるいは*ftsE*遺伝子上流の制御領域150 bp；Cを含むDNA断片20 fmoleをプローブとして、0 pmole (レーン1)，6 pmole (レーン2)，12 pmole (レーン3)，18 pmole (レーン4)，24 pmole (レーン5)，30 pmole (レーン6)の精製YycF蛋白質とともに加温した。試料は5%非変性アクリルアミドゲルで展開し、DIG Gel Shift Assay Kit (Roche)を用いてシグナルを検出した。BD ゲルシフトアッセイのプローブとして用いた領域を傍線で示した。

B *rbs*オペロンの模式図

D *ftsEX*遺伝子のオペロンの模式図

3.4.4. YycF蛋白質認識配列の推定

YycF蛋白質と高い相同性を示す枯草菌2成分制御系レギュレーター蛋白質ResDは、9塩基の繰り返し配列が複数のResD結合領域より見いだされている(Nakano, M. M. *et al.*, 2000)。また、YycFおよびResDが属するOmpRファミリーの代表的なレギュレーター蛋白質であるOmpRやPhoB蛋白質は、活性型が2量体を形成し、約4塩基のスペースを挟んだ6塩基の繰り返し配列に結合する(Harrison-McMonagle *et al.*, 1999)。YycF蛋白質が結合する領域には、同様の繰り返し配列が存在すると予想される。このため、YycF蛋白質が結合することが確認された*rbs*オペロンおよび*ftsE*遺伝子の制御領域に対してDNaseIフットプリント解析を行った。

*rbs*オペロン制御領域294bp (-149~+121)をPCRによって増幅し、Coding鎖の5'末端を³²P標識したDNA断片をDNaseIフットプリントのプロープとして用いた。同様にして、*ftsE*遺伝子制御領域274bpを含むDNA断片のCoding鎖あるいはNoncoding鎖の5'末端を³²P標識しDNaseIフットプリントのプロープとして用いた。その結果、*rbs*オペロンのCoding鎖では、プロモーター開始点から-88~-74, -69~-41 bpが30 pmole YycF存在下で、-120~-32 bpの広い領域が60 pmole YycF存在下でDNaseI部分分解より保護された(図34)。このため、*rbs*オペロン制御領域には、YycFと親和性の高い2カ所の領域を中心にYycFが広い範囲に結合することが予想される。対照的に、*ftsE*遺伝子上流の制御領域では、狭い領域(Coding鎖36 bp, Noncoding鎖27 bp)にYycF蛋白質が結合し、YycFの添加量の増加による変化も見られなかった(図35)。これらのYycF結合領域が、YycF蛋白質による転写の誘導に必須であることを調べるために、現在、LacZアッセイによりYycF結合領域の部分欠失による転写活性への影響を解析している。

DNaseIフットプリントにより明らかになった3つのYycF蛋白質結合領域の比較をしたところ、3つの領域すべてに5~6bpの間隔を保つ6 bpからなる繰り返し配列(TGAAAA-n(5-6)-TGAAAA)が見いだされた(図36)。さらに、LacZアッセイによる転写解析のみを行った*srf*オペロンの制御領域にも、同様の繰り返し配列が見いだされた(図36)。このことから、この繰り返し配列がYycF蛋白質の認識配列であると考えられる。

A Coding

ACGT 1 2 3 4 5

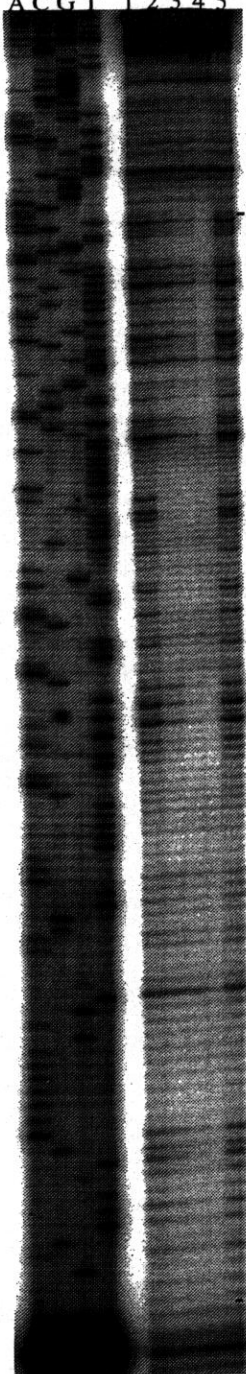


図34. YycFによる *rrs* オペロン制御領域のDNaseI フットプリント
 A *rrs* オペロン制御領域を含むDNA断片 (294bp) のCoding鎖5'末端を³²P標識しプローブとして用いた。プローブ100 fmoleを 0 pmole (レーン1, 5), 30 pmole (レーン2), 60 pmole (レーン3), 90 pmole (レーン4) の精製YycF蛋白質とともに加温した後、2 U DNaseIを加えDNA断並の部分分解を行った。試料は5%非変性アクリルアミドゲルで展開し、BAS2500システムによりシグナルを検出した。レーンACGT: ダイデオキシ法により作成したプローブDNAのシーケンスラダー
 B *rrs* オペロン制御領域の配列、数字は転写開始点(+1)からの距離 (bp)を示している。
 A, B YycFの添加により、DNaseIの部分分解反応から保護された領域を傍線で示した。

His₆-YycF 0 60 0
 (pmole) 30 90

B

TGTTCAAGAAATCTTCATCCATATTTGTGAAGACTTTGTCAAAAAAGAGTGAAAACCTTAAATTTTCAATTATATATACAATTTACAATTAGATTTCT -50
 -120 -88 -74 -69

TTTGATATTTTATTTGCTAACTTCGGATTGTTTCATGATAATCTATCTATGTAAACGGTTACATAACAAGGAGGAGCTGTTTGGCTACAATTAAAGATG +51
 -41 -35-32 -10 +1
 LeuAlaThrIleLysAspV
 →
rrsR codon start

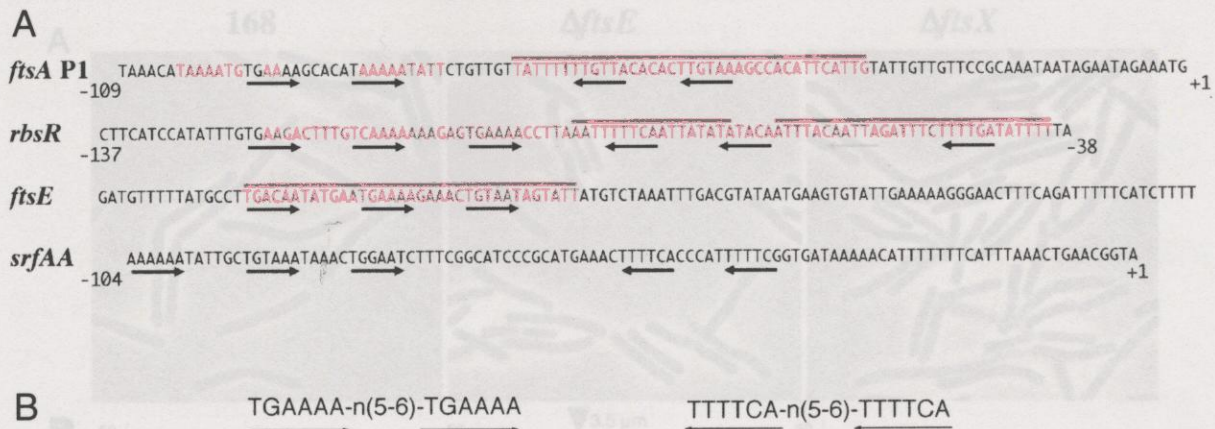


図36. YycF結合領域の比較

ADNaseIフットプリントによって明らかになったYycF結合領域を赤字で示した。赤線部分は、YycF蛋白質が低濃度で結合する領域を示している。数字は報告されているプロモーター開始点(+1)からの距離 (bp)を示している。YycF結合領域に見いだされた6塩基の繰り返し配列Bを矢印で示した。

3.4.5. 遺伝子破壊による *ftsE* 遺伝子の機能解析

YycFG制御下の遺伝子であることが明らかになった枯草菌 *ftsE* 遺伝子は、実験的な解析がなされておらず、機能未知であった。枯草菌FtsE蛋白質と高い相同性 (%) を示す大腸菌FtsE蛋白質は、FtsX蛋白質と相互作用しカリウムイオンポンプ蛋白質の細胞膜への局在に必要なABC輸送蛋白質であり、Na存在下、低カリウム濃度、低塩濃度の条件では細胞の生存に必須であることがわかっている (de Leeuw, E. et al. 1999, Ukai, H. et al. 1998)。 *ftsE* 遺伝子が、枯草菌で必須遺伝子であるかを調べるために、 *ftsE* 遺伝子の破壊変異株の作成を試みた。さらにオペロンを形成していると予想される *ftsX* 遺伝子についても同様の解析を行った。

ftsE あるいは *ftsX* 遺伝子の内部配列を組み込んだpMutinT3プラスミド (pKF042, pKF043) を用いて、枯草菌168株を形質転換したところ、どちらのプラスミドを用いた場合でも 10^3 /ml以上の形質転換体を得られた。この形質転換体より抽出した染色体を用いてPCRにより確認を行ったところ、 *ftsE* あるいは *ftsX* 遺伝子部位へのプラスミドの挿入が確認された。得られた *ftsE* および *ftsX* 遺伝子破壊変異株 (NIS5018, NIS5019) は、LB培地および塩を含まないLB培地において野生株と同様の生育を示した (結果は記載しない)。よって、枯草菌 *ftsE* および *ftsX* 遺伝子は、破壊可能であることが明らかになり、また、その破壊は細胞の増殖、低塩濃度での生存に影響しないことがわかった。

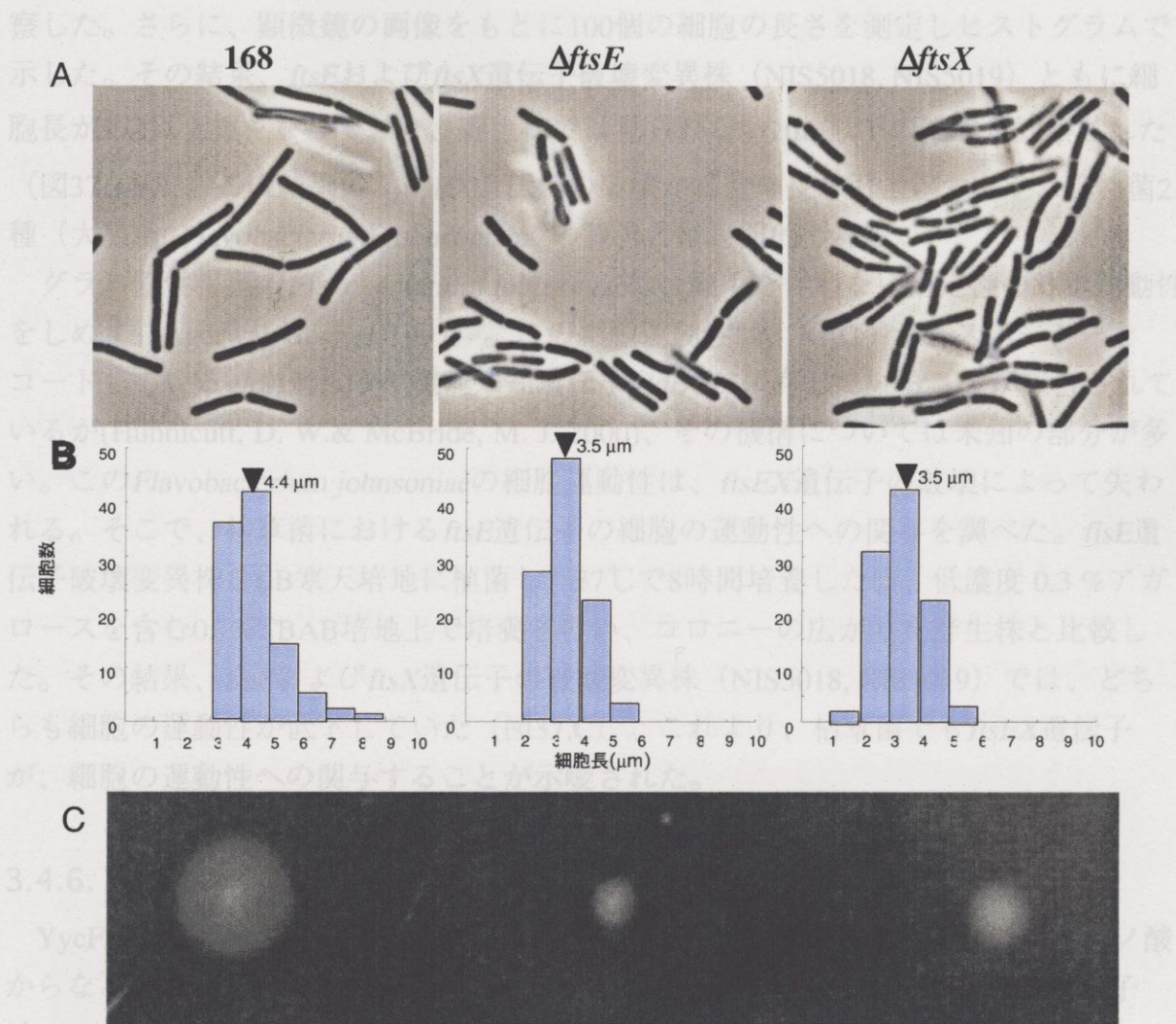


図37. *ftsEX*遺伝子破壊による細胞形態および運動性への影響

A 顕微鏡写真

LB培地37℃で培養した対数増殖期[OD(600)=0.4]の細胞を集菌し、エタノール固定後、顕微鏡で観察した。

B ヒストグラム

100個の細胞長を測定し、ヒストグラムで示した。矢印は平均細胞長(μm)を示している。

$\Delta ftsE$: NIS5018, $\Delta ftsX$: NIS5019

C コロニーの写真

37℃8時間LB寒天培地で前培養した細胞を0.7%TBABプレート培地(0.3%アガー)上にスポットし、37℃で9時間培養した。 $\Delta ftsE$: NIS5018, $\Delta ftsX$: NIS5019

大腸菌およびグラム陰性桿菌である *Flavobacterium johnsoniae* では、FtsE蛋白質の欠失によって細胞の伸長が起こる(Kempf M. J. & McBride M. J., 2000)。また、グラム陰性球菌の *Neisseria gonorrhoeae* では、正常な細胞分裂が阻害され、細胞形態の異常が観察される(Bernatchez S., et al. 2000)そこで、枯草菌 *ftsE* 遺伝子破壊による細胞形態への影響を調べるために、対数増殖期(OD600=0.4)の細胞形態を顕微鏡により観

察した。さらに、顕微鏡の画像をもとに100個の細胞の長さを測定しヒストグラムで示した。その結果、*ftsE*および*ftsX*遺伝子破壊変異株 (NIS5018, NIS5019) とともに細胞長が2割以上短くなっており、野生株では見られない2 μ m以下の細胞が観察された (図37.AB)。この結果は、*ftsEX*遺伝子の破壊が細胞伸長を引き起すグラム陰性菌2種 (大腸菌, *Flavobacterium johnsoniae*) の報告とは対照的である。

グラム陰性桿菌の*Flavobacterium johnsoniae*は、鞭毛を伴わない滑走性の細胞運動性をしめす (Agarwal, S, et al. 1997)。この細胞運動性は、ABCトランスポーターをコードしている *gldA* 遺伝子や機能未知遺伝子 *gldBC* に依存していることが報告されているが (Hunnicut, D. W. & McBride, M. J. 2000)、その機構については未知の部分が多い。この*Flavobacterium johnsoniae*の細胞運動性は、*ftsEX*遺伝子の破壊によって失われる。そこで、枯草菌における*ftsE*遺伝子の細胞の運動性への関与を調べた。*ftsE*遺伝子破壊変異株をLB寒天培地に植菌し、37℃で8時間培養した後、低濃度 0.3 % アガロースを含む0.7%TBAB培地上で培養を行い、コロニーの広がり野生株と比較した。その結果、*ftsE*および*ftsX*遺伝子の破壊変異株 (NIS5018, NIS5019) では、どちらも細胞の運動性が低下していた (図37.C)。これより、枯草菌でも*ftsEX*遺伝子が、細胞の運動性への関与することが示唆された。

3.4.6. YycF過剰発現による σ Dの発現に対する影響

YycFの制御下にあると予想される *srf* オペロンの *srfAB* 遺伝子内部には、46アミノ酸からなる小さな蛋白質をコードしている *comS* 遺伝子が存在する。この *comS* 遺伝子は、*srf* オペロン上流のプロモーターからの転写によって転写されることから

(D'Souza, C., 1994)、YycF蛋白質の過剰発現株では、*srf* オペロンの転写の誘導に伴いComS蛋白質の発現も誘導されると予想される。このComS蛋白質は、ClpCプロテアーゼとMecA蛋白質の複合体に結合し、MecA蛋白質の分解を促す (Turgay, K., et al., 1998)。MecAはグラム陽性菌に広く保存されている蛋白質で、枯草菌ではコンピテンス能の負の制御因子として働く一方で、 σ Dの活性化に必要であることから鞭毛の形成を正に制御する (Rashid, M.H., et al., 1996)。このため、MecAを失った細胞では、 σ Dに依存したプロモーターの活性化が起こらず、細胞は運動性を失う

(Liu J. and Zuber P., 1998)。そこで、YycFGが、*srf* オペロンの転写制御を介して σ Dの発現を抑制し、その結果、細胞運動性を負に制御している可能性も考えられ、YycF過剰発現による細胞の運動性への影響を調べた。

pRB_{YycF}を導入した枯草菌細胞をLB寒天培地上で37℃で8時間培養した後、低濃度 0.3 % アガロースを含む0.7%TBAB培地上に植菌した。37℃で9時間培養を行った後、コロニーの広がりpRB373を導入した野生株と比較した。その結果、YycF 過剰発現

株では、野生株に比べ顕著に細胞の運動性が低下していることがわかった（図38. A）。

YycF 蛋白質過剰発現による細胞運動性の低下は、ComSの発現を介した σ Dの不活性によるものと予想されることから、*sigD*遺伝子発現に対するYycF蛋白質過剰発現の影響を調べた。まず、マクロアレイの結果を参照したが、*sigD*遺伝子のシグナルは検出されておらず、比較出来なかった。このため、東海大学の小倉光雄博士より分与された*sigD-lacZ*融合株より染色体DNAを抽出し、そのDNAを用いて枯草菌168株を形質転換し、NIS5015 (*sigD-lacZ*)を得た。このNIS5015株にpRBYycFを導入し、対数増殖期の細胞内 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した（図38. B）。その結果、YycF過剰発現株では、確かに*sigD*遺伝子の発現が20%以下に低下していることがわかった。これより、YycFGによりComS蛋白質の発現が誘導され、 σ Dの抑制が起こり、その結果、 σ Dに依存した転写により促される鞭毛形成が低下すると考えられる。一方で、YycFGによって転写が誘導される*ftsE*遺伝子は、鞭毛構成成分の膜への輸送に関与していると考えられる。細胞の運動性の低下は、 σ Dの抑制により鞭毛構成成分の発現が押さえられることにより起こったと予想される。細胞運動性においてYycFGが、なぜ正と負の両方の因子の発現に関与しているのかは不明である。

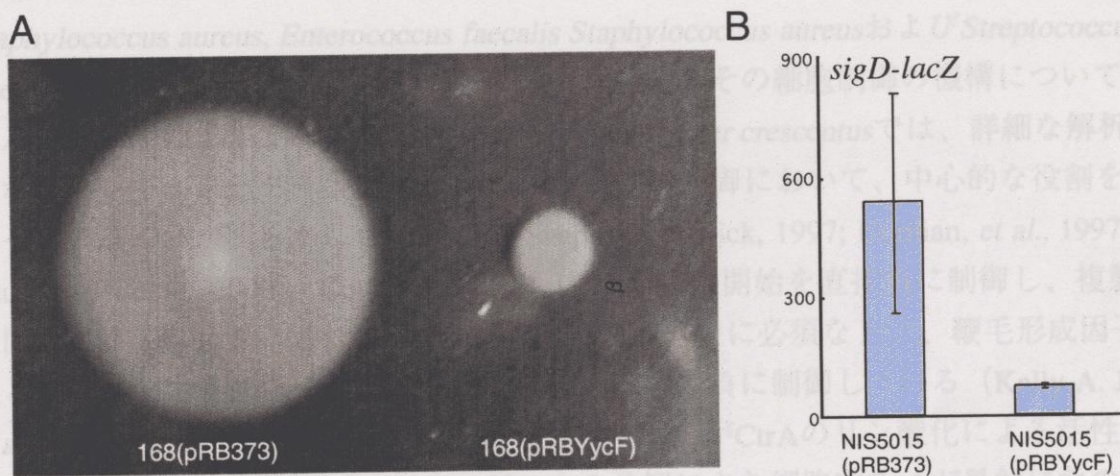


図38. YycF過剰発現による細胞の運動性への影響

A YycF過剰発現株の細胞の運動性 0.7%TBABプレート培地（0.3%アガー）上に細胞をスポットし、37℃、10時間培養した。

B *sigD*遺伝子の発現 プラスミドpRB373あるいはpRBYycFを導入したNIS5015株（*sigD-lacZ*）の対数増殖期[OD(600)=0.4]の細胞の β -ガラクトシダーゼを測定した。測定は3回行いその平均値と標準誤差を併せて示した。

4. 考察

4.1. *yycFG*は細胞増殖に必須な2成分制御系遺伝子である。

研究開始当初、センサー蛋白質とレギュレーター蛋白質からなる2成分制御系は特定の環境応答に特化した細胞制御の機構であると考えられていた。このため、グラム陽性の内孢子性桿菌である枯草菌に細胞増殖に必須である制御系 YycF/YycG が存在することは非常に興味深い発見であった。近年、多くの細菌ゲノム配列の解読がなされ、網羅的な遺伝子機能の解析が驚くべき早さで進められている。2成分制御系に関しても同様であり、一つの細菌ゲノム上にコードされるすべての2成分制御系遺伝子の破壊変異株を試みることで、細胞増殖に必須である2成分制御系がグラム陽性陰性を問わず、普遍的に見られることが明らかになった。これまでに細胞増殖に必須な2成分制御系が見いだされた細菌としては、グラム陰性細菌の有柄細菌 *Caulobacter crescentus* (Quon, et al., 1996)、根粒細菌 *Rhizobium mliloti* (Osteras, et al., 1995)、ピロリ菌 *Helicobacter pylori* (Beier, D. & Frank, R. 2000)、グラム陽性細菌の結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* (Zahrt, T. C. & Dretic, V. 2000)、そして YycFG が保存されている6種グラム陽性細菌 (*Bacillus Subtilis*, *Bacillus halodurans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* *Staphylococcus aureus* および *Streptococcus pneumoniae*) が報告されている。しかし、現在でもその細胞制御の機構についてはほとんどは未知のままである。その中で唯一 *Caulobacter crescentus* では、詳細な解析が行われ、レギュレーター蛋白質 CtrA が細胞周期の制御において、中心的な役割を担っていることが明らかにされている (Shapiro & Losick, 1997; Domian, et al., 1997; Laub, M. T. et al., 2000)。CtrA は、染色体 DNA の複製開始を直接負に制御し、複製の開始と終了に必要とされる DNA メチレース、分裂に必須な FtsZ、鞭毛形成因子などをコードする遺伝子群の転写を直接正あるいは負に制御している (Kelly A. J. et al., 1998)。2つのセンサー蛋白質 (CckA, DivL) が CtrA のリン酸化による活性型に関与しており、さらにプロテアーゼによる分解により細胞内 CtrA が量的に負の制御を受ける。さらに CtrA を中心とした細胞周期制御には、もう一つの必須な2成分制御系 DivKJ が関与している (Wu, J. et al., 1998)。CtrA 温度感受性変異株は非許容温度で細胞周期制御が失われ、生菌数の増加が停止し、細胞分裂が阻害され伸長した細胞が観察されるが (Quon, et al., 1996)、*yycF* 条件致死変異株の致死条件下で観察されたような、急激な菌体濁度および生菌数の低下は起こらない。一方、YycFG は、多分岐複製が起こる対数増殖期の細胞において、*ftsAZ* の転写を介し細胞の分裂を正に制御することが明らかになった。また、*comS* 遺伝子の誘導を介し

て σ Dの活性化を押さえ、鞭毛の形成等を負に制御している可能性が示された。このことは、CtrA蛋白質がDNAの複製が起こらない遊走細胞にて、DNA複製と*ftsZ*遺伝子の転写を負に、鞭毛形成の初期過程を正に制御するのとは対照的である。

また、既知の枯草菌2成分制御系との比較においてもその新規性は際立っている。これまでの研究により、枯草菌では細胞が対数増殖を終了し、定常期に入ると様々な2成分制御系によって細胞が生き残るための細胞制御がなされていることがわかっている。すなわち、定常期の細胞では、孢子形成、形質転換能の獲得、鞭毛運動、細胞外分泌酵素の生産、呼吸およびリン酸基の供給などが、2成分制御系によって制御されている。一方で、本研究で明らかになった*yycFG*オペロンの転写は、対数増殖初期に誘導され、定常期には減衰する。この*yycFG*オペロンの転写時期は細胞の増殖に必須であることと一致しており、既知の2成分制御系とは細胞機能制御の時期が異なる。一方で、YycFGによって転写誘導される*srf*オペロンのプロモーターには、枯草菌の形質転換能を制御するレギュレーター蛋白質ComAが結合し、転写の誘導を行うことが報告されている (Roggiani M & Dubnau D., 1993)。また、*rbs*オペロンの転写は、レギュレーター蛋白質Spo0Aによって負に制御される (O'Reilly M., et al., 1994)。これらのことから、対数増殖期から定常期にかけて複数の2成分制御系が状況に応じて絶え間なく細胞機能制御を行っていることが伺い知ることができる。

4.2. *yycHIJ*および*yyxA*遺伝子の機能について

*yycFG*オペロンに含まれる*yycHIJ* および*yyxA*遺伝子は、破壊可能であり、枯草菌の増殖に必須でないことがわかった。しかしながら、これら4遺伝子が細胞の増殖に関与していることを示すいくつかの結果が得られた。*yycHIJ*, *yyxA*遺伝子の破壊株では、定常期に生菌数の低下が見られた。また、*yycIJ*が発現しないことにより、染色体の位置の異変が観察された。YycJ蛋白質は、2成分制御系YycFGが保存されているグラム陽性細菌のすべてにおいて、高度に保存されている。興味深いことに*yycJ*遺伝子は、配列の相同性からは*yycFGHI*遺伝子が見いだされない古細菌やグラム陰性細菌の一部でも保存されている (Ruepp, A., et al., 2000; Stover, C.K., et al., 2000)。また、*yycJ*が保存されているバクテリアの中で、グラム陽性細菌である*Chlamydia pneumoniae*および*Chlamydia trachomatis*では、*ftsK*相同遺伝子とオペロン構造を構成している (Kalman, S. et al., 1999; Stephens, R. S. et al., 1998)。*ftsK*遺伝子は大腸菌でよく研究されてる細胞増殖に必須な遺伝子のひとつである。FtsK蛋白質は、N末端側が細胞分裂因子として機能し、C末端側にはDNA結合ドメインをもち、染色体の位置決定と分離にも関与する (Begg, K. J. et al., 1995; Liu, G. et al.,

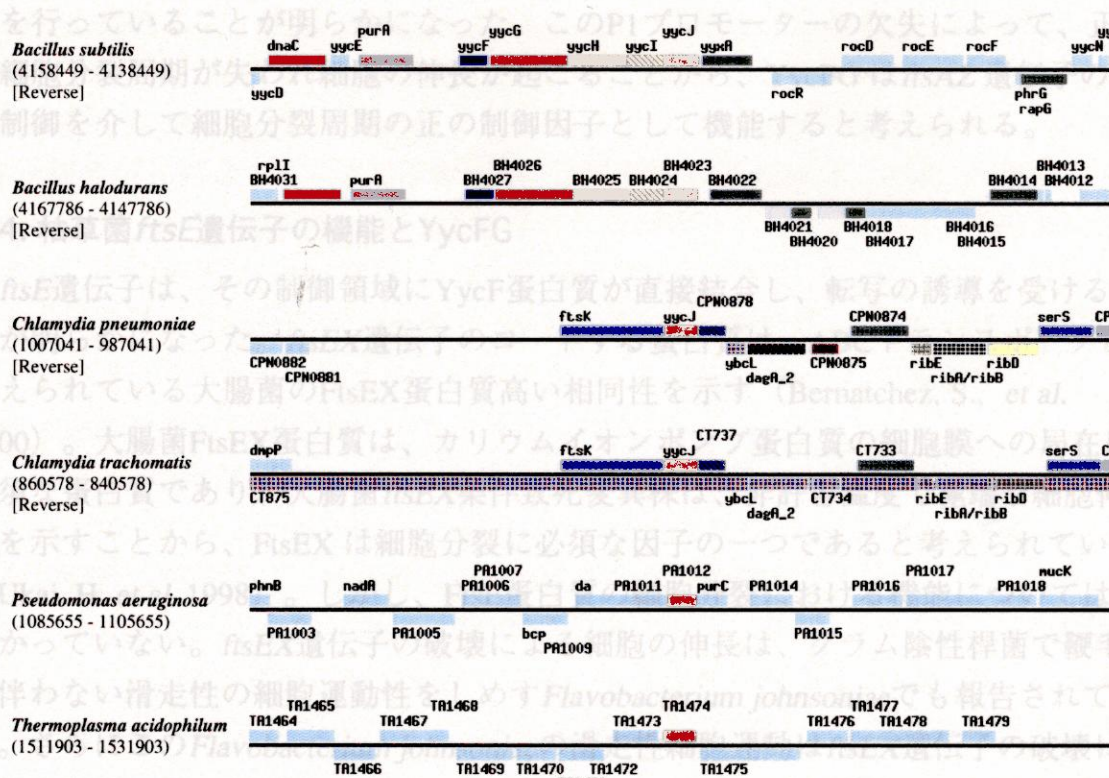


図39. *yycJ*遺伝子と周辺遺伝子の比較

数字はデータベース上の配列番号と一致している(<http://mbgd.genome.ad.jp/>)。

1998)。枯草菌では、*ftsK*の相同遺伝子である*spoIIIE*が孢子形成期の染色体の移動を担っている(Bath, J., et al., 2000)。枯草菌では、対数増殖期においてYycJはYycIと相互作用し、染色体の位置決定や分離を担っている可能性も考えられる。

*yyxA*遺伝子は、*yycFG*オペロンとして対数増殖期に発現することに加えて、孢子形成期に σ^F により独自に発現することが明らかになった。おそらくセリンプロテアーゼとしてミスホールドした蛋白質の分解などの機能を持っていると予想されるが、耐熱性孢子形成への*yyxA*遺伝子破壊の影響は見られなかった。ゲノム上に残り2つのセリンプロテアーゼが存在することに着目し、多重破壊変異株を用いての解析を行う必要がある。

4.3. YycFGは*ftsAZ*遺伝子の転写誘導を介し細胞分裂を正に制御する

大腸菌では*ftsZ*遺伝子の転写は少なくとも6個のプロモーターによって制御されていることがわかっている。さらに、2つの転写因子(SdiA, RcsB)が*ftsZ*の転写調節に関与している(Vicente et al., 1999)。一方、枯草菌の*ftsAZ*遺伝子にはこれまで、シグマ因子以外の転写制御因子は報告されていなかった。本研究により、2成分制御系YycFGが対数増殖期の主なプロモーターである*ftsAZ* P1プロモーターの制

御を行っていることが明らかになった。このP1プロモーターの欠失によって、正常な細胞分裂周期が失われ細胞の伸長が起こることから、YycFGは*ftsAZ*遺伝子の転写制御を介して細胞分裂周期の正の制御因子として機能すると考えられる。

4.4. 枯草菌*ftsE*遺伝子の機能とYycFG

*ftsE*遺伝子は、その制御領域にYycF蛋白質が直接結合し、転写の誘導を受けることが明らかになった。*ftsEX*遺伝子のコードする蛋白質は、ABCトランスポータと考えられている大腸菌のFtsEX蛋白質高い相同性を示す (Bernatchez, S., *et al.* 2000)。大腸菌FtsEX蛋白質は、カリウムイオンポンプ蛋白質の細胞膜への局在に必須な蛋白質であり、大腸菌*ftsEX*条件致死変異株は、非許容温度で極端な細胞伸長を示すことから、FtsEXは細胞分裂に必須な因子の一つであると考えられている (Ukai, H. *et al.* 1998)。しかし、FtsE蛋白質の細胞分裂における機能については、わかっていない。*ftsEX*遺伝子の破壊による細胞の伸長は、グラム陰性桿菌で鞭毛を伴わない滑走性の細胞運動性をしめす*Flavobacterium johnsoniae*でも報告されている。さらにこの*Flavobacterium johnsoniae*の滑走性細胞運動は*ftsEX*遺伝子の破壊により失われる (Kempf, M. J. & McBride, M. J., 2000)。淋病の病原菌として知られているグラム陰性球菌の*Neisseria gonorrhoeae*では、*ftsEX*遺伝子の破壊により不等割な細胞分裂や隔壁合成阻害を引き起こす (Bernatchez, S., *et al.* 2000)。本研究より、枯草菌*ftsEX*遺伝子の破壊は、大腸菌や*Flavobacterium johnsoniae*とは対照的に、細胞長の減少を引き起こすことが明らかになった。また、枯草菌*ftsEX*遺伝子破壊変異株は、無塩条件下で野生株と変わらない生育を示すことから、大腸菌*ftsEX*遺伝子とは機能的に異なることがわかった。これは、枯草菌のカリウムイオンポンプ蛋白質が、大腸菌FtsEXが輸送に関与するとされるカリウムイオンポンプ蛋白質とは相同性示さないことと一致する。さらに、枯草菌*ftsEX*遺伝子破壊変異株は細胞の運動性が低下することがわかった。これらの結果から、枯草菌FtsEX蛋白質は、細胞分裂、細胞壁合成および運動性などに関与する蛋白質の細胞膜への輸送を担っている可能性が考えられる。

4.5. YycFGは*comS*遺伝子の転写誘導を介して σD を不活化する

細胞の運動性を制御する σD の活性は、アンチシグマ因子であるFliMやATP依存性プロテアーゼClpCを中心とするMecA-ComS-ComK蛋白質分解系によって制御されている (Ogura, M. *et al.*, 1999)。MecAはグラム陽性菌に広く保存されている蛋白質で、枯草菌ではコンピテンス能形成の負の制御因子として働き、 σD の活性化を介し鞭毛の形成を正に制御する (Rashid, M.H., *et al.*, 1996)。このため、MecA

を失った細胞では、 σD に依存したプロモーターの活性化が起こらず、細胞は運動性を失う (Liu, J. & Zuber, P., 1998)。MecAはN末端側がComSおよびComKに結合し、C末端側がClpCと結合能を示すが (Persuh, M., *et al.*, 1999)、ComSはこのClpC-MecA複合体に結合することで、MecAの分解を促す (Turgay, K., *et al.*, 1998)。このComSは、YycFの過剰発現によって誘導される *srf* オペロンの *srfAB* 遺伝子内部にコードされ、その転写は *srf* オペロン上流の制御領域に存在するプロモーターからの転写に依存している (D'Souza, C., 1994)。YycFの過剰発現株では、細胞の運動性が低下し、*sigD* 遺伝子の転写も抑制されることから、YycFGはComSの発現制御を介して細胞の運動性を負に制御していると考えられる。

σD は細胞壁溶解酵素CwlB, CwlEの発現を誘導することが報告されている (Rashid, M. H. *et al.*, 1995; Rashid, M. H. *et al.*, 1996; Tokunaga T, *et al.*, 1994)。これらの細胞壁溶解酵素は、嫌気条件や低温条件で細胞の溶解を引き起こす。YycFGは σD の不活性化を介して、細胞壁溶解酵素の発現を負に制御していると予想されることから、*yycFG*が抑制された条件の急速な菌体濁度の低下は、 σD によって誘導される細胞壁溶解酵素CwlB, CwlEによって起こっているのかもしれない。

4.6. YycFGによる他の遺伝子の転写制御

YycFが正の転写制御因子として働くためには、 σ 因子との相互作用が必要であると予想され、その相互作用のために転写開始点からの厳密な距離に認識配列が必要であると予測される (Matsuyama S. & Mizushima S., 1987)。実際に、YycFの結合領域は、YycFによって転写の誘導が確認された *ftsAZP1*, *rbs* オペロン、*srf* オペロンの転写開始点より上流-100~-34 bp付近に限定されていた。この枯草菌 *rbs* オペロンは、大腸菌のリボースの取り込みに関与する遺伝子群と高い相同性を示すことから、リボースの取り込みに関与する蛋白質をコードしていると考えられている (O'Reilly, M., *et al.*, 1994)。

Schumannらのグループにより、熱ショックにより誘導される *htpG* 遺伝子の転写制御にYycFが関与するとの報告があり、*htpG* 制御領域には本研究により予測されたYycF結合配列と同様の繰り返し配列が存在し、その一部がYycF蛋白質の結合に必要であることが明らかにされた (図40; Saskai Versteeg & Wolfgang Schumann, 枯草菌国際シンポジウム, 立教大学, 2001年1月)。熱ショック条件下でのYycFGの機能についてはわかっていないが、転写開始点の前後にYycFの結合配列が存在することから、筆者は、YycFGは*htpG* 遺伝子の転写を負に制御し、熱ショックによりその制御が失われ、転写の活性化が起こると考えている。また、転写の誘導については、他の未知の転写因子によって起こると予想される。

ATGAGAATGAGTGAGAAAAAGAGTGAAAACAAATCCAATAATGTAAAT
 TTACATATATATGCATCTATCAATCTAAATTGACAATTGTCATCTTATGTG
 -35
 AATAAATAGATGCTGAAAAGGGTTTACATAATGGTAAAGGAGCGATCAAGA
 -10 +1 SD
 GTGGCGAAAAAGAGTTTAAAGCAGAGTCTAAACGCTTGCTGGATATGAT
 ValAlaLysLysGluPheLysAlaGluSerLysArgLeuLeuAspMetMe

図40. *htpG* 遺伝子の制御領域

Schumannらが主張するYycFの結合に必要とされる領域を黒で示した。YycF蛋白質認識配列と予想される繰り返し配列、TGAAAA-n(5-6)-TGAAAA、を矢印で示した。

マクロアレイの解析から、YycF過剰発現によってシグナル強度の増加が見られた *lplC* 遺伝子は糖の取り込みに関与するABCトランスポーターと高い相同性を示す機能未知蛋白質をコードしている。また、YycFの過剰発現により *ddlA* 遺伝子と *yxxG* 遺伝子のシグナル強度が低下した。DdlA は、D-alanine:D-alanine ligaseと高い相同性を示し、ペプチドグリカンの前駆体であるUDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-*meso*-diaminopimelyl-D-alanyl-alanineの合成を行っていると考えられる (van Heijenoort, J., 1996)。結核菌の類縁菌である恥垢菌 *Micobacterium smegmatis* では、*ddlA* 遺伝子の変異が致死性を示すことが報告されている (Belanger, A. E., et al., 2000)。この致死性は、蔗糖や塩化ナトリウムの存在する浸透圧の高い条件では回復することから、細胞壁の合成阻害によって引き起こされ则认为られている。枯草菌ゲノム上には、他にD-alanine:D-alanine ligaseをコードする遺伝子は見いだされていないことから、枯草菌 *ddlA* 遺伝子は、*Micobacterium smegmatis*と同様にペプチドグリカンの合成に必須であると想定される。2成分制御系YycFGによる *ddlA* 遺伝子の負の発現制御が起こっているのであれば、YycFGが壁の合成にも関与している可能性が考えられる。

4.7. YycFGの機能の全体像

2成分制御系YycFGは転写制御を介して細胞分裂、細胞の運動性を制御することが示唆され、マクロアレイの解析結果から、細胞壁合成、炭素源の取り込みなど対数増殖期における幅広い転写制御に関わっている可能性も示された。しかしながら、YycFGが細胞増殖に必須である説明には至らなかった。YycFGが転写制御を行っていると思される対数増殖期の細胞では、染色体DNAの複製や分配、細胞分裂、細胞壁の合成、蛋白質の合成、転写およびエネルギーの生産などが連続して協調的に起こっている。これらの細胞機能を担っている遺伝子の転写を調節するDNA結合性の蛋白質が数多く存在する。このDNA結合性の蛋白質には、機能的に大きく

2 つグループに分類することが出来る。一つは、ある特定認識配列に結合し遺伝子の調節を行う蛋白質であり、HTH制御蛋白質でグルコン酸解糖系 *gnt* オペロンの負の制御因子 GntR や、特定の環境シグナルに応答して遺伝子の発現を行う既知の2成分制御系レギュレーター蛋白質も含まれる。もう一方は、DNA対数増殖期に必須な遺伝子であるヒストン様蛋白質 HBsu や、対数増殖期の負の制御因子として知られる AbrB などの配列の特異性が弱く非特異的にDNAに結合する蛋白質である。枯草菌ではこの2つの蛋白質が、転写制御因子としても重要な役割を担っている

(Fernandez, S. & Alonso, J. C., 1999; Strauch, M. A., 1993; Tapias, A. *et al.*, 2000)。そこで、YycFG も AbrB や Hbsu と同様に、増殖に必須な特定遺伝子の発現を制御するのではなく、グローバルな転写制御因子として機能している可能性も、興味深いモデルとして考えられる。今後、本研究で同定した YycF の結合配列に基づき、全ゲノム上の YycF の結合部位を同定することで YycFG による細胞機能制御の全容が明らかにされると考えられる。

それでは、YycF 蛋白質のリン酸化に必須であるセンサー蛋白質 YycG は、どのようなシグナルによって自己リン酸化し、レギュレーター蛋白質を活性化しているのだろうか？ 本研究においては、この YycG の関知するシグナルの同定に関する実験は行っていないが、そのアミノ配列と他のグループの報告より、シグナルを推測することが出来る。YycG 蛋白質には2回の膜貫通領域と自己リン酸化に必要な386番目のヒスチジン残基の間にPASドメインと呼ばれる領域が存在する (Lange, R., *et al.*, 1999、図41.)。PASドメインとは、様々な細胞内信号伝達蛋白質に保存されており、光、酸化還元電位、酸素、リガンドおよび細胞内エネルギーレベルなどを関知

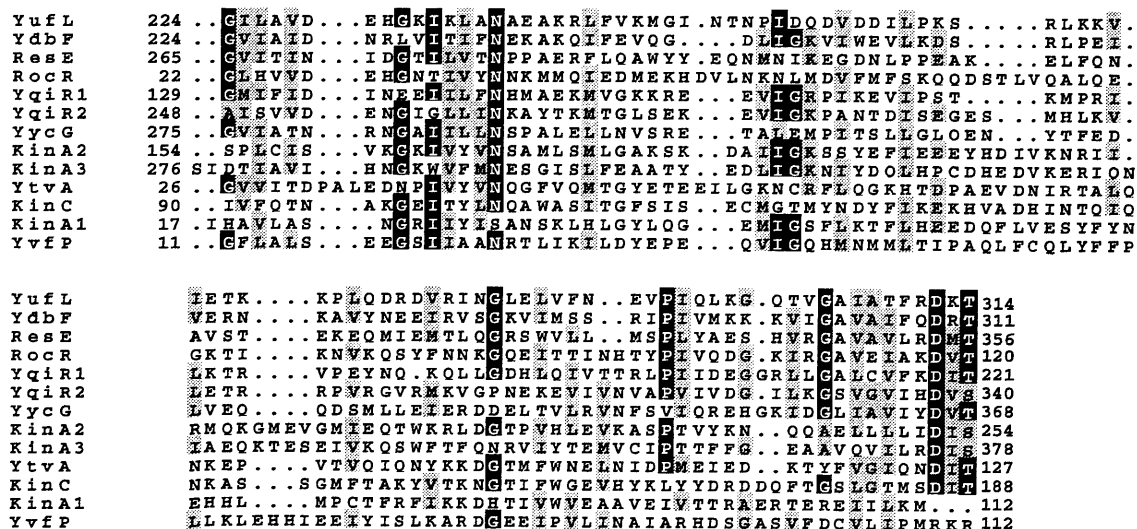


図41. 枯草菌蛋白質のPASドメインのアミノ酸配列の比較 同一のアミノ酸配列を黒で、同じ極性のアミノ酸配列を灰色で示した。アミノ酸配列の比較は、アミノ酸配列解析プログラム：CLUSTALW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>)により行った (Thompson, J. D., *et al.*, 1994)

するドメインと考えられている (Taylor B. L., *et al.* 1999, Taylor B.L. & Zhulin I.B. 1999)。これまでのところ、PASドメインに会合する4つの補因子 (4-hydroxycinnamoyl, heme B, FAD, および 2Fe-2S) が見つかっている (Zhulin I.B. *et al.*, 1997)。おそらくこれらの補因子に似た分子がYycGのPAS ドメインにも会合し、直接のシグナルとして、あるいはシグナル感知の補助的な因子として機能すると考えられる。YycG蛋白質は、嫌気条件で変化する細胞内外の因子を感知すると予想されるセンサー蛋白質ResEと高い相同性を示し、さらに、*Staphylococcus aureus* の *yycF* 温度感受性変異株は、致死条件下 (41℃) でも、嫌気条件下においては細胞の生育が部分的に回復することからも (Patric K. M., 1999)、好気条件下で存在する酸素や酸化還元電位などを感知しているのではないかと予想される。

5. 謝辞

あらゆる面で懇切丁寧なご指導、ご鞭撻をいただきました奈良先端科学技術大学院大学細胞遺伝学講座、小笠原直毅教授、守家成紀助教授、笠原康祐博士、小林和夫博士、埼玉大学理学部、朝井計博士に心から感謝申し上げます。

アミノ酸配列同定にあたり、協力いただいた宮崎医科大学中山建男教授、西 良子女史、奈良先端科学技術大学院大学、塚本潤子女史に深く感謝いたします。

菌株の分与ならびに適切なアドバイスを頂いた東海大学海洋学部、小倉光雄博士、筑波大学生物科学系、中村 幸治博士、埼玉大学理学部、松本幸次教授に深く感謝いたします。

日々、適切なアドバイス、激励などを頂いた摂南大学薬学部、渡部一仁教授、高松宏治博士、福山大学工学部、吉田健一博士、海洋技術センター、高見博士ハイテック株式会社、児玉 武子女史ならびに石郷岡大介氏、奈良先端大、川野光興氏ならびに世界の枯草菌研究者の皆様に深く感謝します。

また、日々、ご協力、ご助言いただきました細胞遺伝学講座の諸氏に深く感謝いたします。

何の心配もなく研究に打ち込むことが出来たのは、妻と両親が研究に理解を示し、全面的にサポートしてくれたからです。心から、感謝します。これからはちゃんと働くので安心してください。

6.参考文献

- Agarwal, S, Hunnicutt D. W., McBride, M. J. (1997) Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* (*Cytophaga johnsonae*) gliding motility gene, *gldA*. Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 28;94(22):12139-44.
- Aiba H. and Mizuno T. (1990) Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, stimulates the transcription of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 261: 19-22
- Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- Anagnostopoulos C. and Spizizen J. (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 81: 741-6
- Asai K., Kawamura F., Yoshikawa H. and Takahashi H.(1995) Expression of *kinA* and accumulation of sigma H at the onset of sporulation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 177: 6679-83
- Bath, J., Wu, L. J., Errington, J. and Wang, J. C. (2000) Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum. Science. Nov 3;290(5493):995-7.
- Beall, B. & Lutkenhaus, J. (1989) Nucleotide sequence and insertional inactivation of a *Bacillus subtilis* gene that affects cell division, sporulation, and temperature sensitivity. J Bacteriol Dec;171(12):6821-34
- Begg KJ, Dewar SJ, Donachie WD (1995) A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. J Bacteriol Nov;177(21):6211-22
- Beier D, Frank R. (2000) Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol. Apr;182(8):2068-76.
- Belanger A. E., Porter J. C., Hatfull G. F. (2000) Genetic analysis of peptidoglycan biosynthesis in mycobacteria: characterization of a *ddlA* mutant of *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol Dec;182(23):6854-6

- Bell A. W., Buckel S. D., Groarke J. M., Hope J. N., Kingsley D. H. and Hermodson M. A. (1986) The nucleotide sequences of the *rbsD*, *rbsA*, and *rbsC* genes of *Escherichia coli* K12. J. Biol. Chem. 261: 7652-8
- Bernatchez S., Francis F.M., Salimnia H., Beveridge T.J., Li H., Dillon J.A. (2000) Genomic, transcriptional and phenotypic analysis of *ftsE* and *ftsX* of *Neisseria gonorrhoeae*. DNA Res. Apr 28;7(2):75-81.
- Bi E., Lutkenhaus J. (1990) Interaction between the min locus and *ftsZ*. J Bacteriol Oct;172(10):5610-6
- Brosius J., Dull T. J., Noller H. F. (1980) Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. : roc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 201-4
- Bruce A. White : PCR Protocols (1993) Methods in Molecular Biology 15. University of Connecticut Health Center, Farmington, CT, 229-239
- Bruckner R. : A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* 1992 Dec 1;122(1):187-192
- Carmona M, Claverie-Martin F, Magasanik B (1997) DNA bending and the initiation of transcription at sigma54-dependent bacterial promoters. Proc Natl Acad Sci U S A Sep 2;94(18):9568-72
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B. and Meyerowitz, E. M. (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. Science 262: 539-44
- Chang, C. and Meyerowitz, E. M. (1994) Eukaryotes have "two-component" signal transducers. Res. Microbiol. 145: 481-6
- Cheng, H.P., Walker, G. C. (1998) Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. J Bacteriol. Jan;180(1):20-6.
- Cruz Ramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A., Glaser, P. (1995) Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. EMBO J. Dec 1;14(23):5984-94.
- Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Studier, F. W. (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 2035-9

de Leeuw, E., Graham, B, Phillips G.J., ten Hagen-Jongman CM, Oudega B, Luirink J. (1999) Molecular characterization of *Escherichia coli* FtsE and FtsX. Mol Microbiol. Feb;31(3):983-93.

Domian, I. J., Quon, K. C. and Shapiro, L. (1997) Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. Cell 90: 415-24

Dunn I. S. and Blattner F. R.(1987) Charons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. Nucleic Acids Res. Mar 25;15(6):2677-98.

Errington J. (1993) *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. Microbiol. Rev. 57: 1-33

Fabret C. and Hoch J. A. (1998) A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. J Bacteriol. Dec;180(23):6375-83.

Fabret C, Feher VA, Hoch J. A. (1999) Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. J. Bacteriol. Apr;181(7):1975-83. Review.

Fernandez S & Alonso JC. (1999) *Bacillus subtilis* sequence-independent DNA-binding and DNA-bending protein Hbsu negatively controls its own synthesis. Gene. Apr 29;231(1-2):187-93.

Fukuchi K, Kasahara Y, Asai K, Kobayashi K, Moriya S, Ogasawara N. (2000) The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. Microbiology. Jul;146 (Pt 7):1573-83.

Gonzy-Treboul G., Karmazyn-Campelli C., Stragier P. (1992) Developmental regulation of transcription of the *Bacillus subtilis* *ftsAZ* operon. J Mol Biol. Apr 20;224(4):967-79.

Grossman, Annu. Rev. Genetics 29. 478-508 1995)

Gryczan T. J., Contente S. and Dubnau D. (1978) Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. , 134, 318-29

Haldenwang WG. (1995) The sigma factors of *Bacillus subtilis*. Microbiol Rev. Mar;59(1):1-30. Review.

- Harrison-McMonagle P, Denissova N, Martinez-Hackert E, Ebright RH and Stock, A. M. (1999) Orientation of OmpR monomers within an OmpR:DNA complex determined by DNA affinity cleaving. *J Mol Biol.* Jan 15;285(2):555-66.
- Harry E.J., Wake R. G. (1989) Cloning and expression of a *Bacillus subtilis* division initiation gene for which a homolog has not been identified in another organism. *J Bacteriol* Dec;171(12):6835-9
- Harwood C. R., Simon. M. C. (1990), *Molecular Biological Methods for Bacillus.*; 150, 394
- Hiraga S., Niki H., Ogura T., Ichinose C., Mori H., Ezaki B., and Jaffe A. (1989) Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells, *J. Bacteriol.*, 171, 1496-1505.
- Hoch J. A. and Silhavy T. J. (1995) Two-component signal transduction, (Washington, D. C.: ASM Press), pp 25-51
- Hofmann K. and Stoffel W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 347,166
- Hulett, M. (1995) Two-component signal transduction. Signal transduction in the arc system for control of operons encoding aerobic respiratory enzymes., Hoch J. A. and Silhavy T. J. ed. (American society for Microbiology, washington, DC) pp289-302
- Hunnicut, D.W., McBride, M.J. (2000) Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* gliding-motility genes *gldB* and *gldC*. *J Bacteriol.* Feb;182(4):911-8.
- Igo M. 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, 615-24
- Iobbi-Nivol C., Crooke H., Griffiths L., Grove J., Hussain H., Pommier J., Mejean V., Cole J.A. (1994) A reassessment of the range of c-type cytochromes synthesized by *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett.* Jun 1;119(1-2):89-94.
- Iuchi S. and Lin E. C. C. (1995) Two-component signal transduction. Signal transduction in the Arc system for control of operons encoding aerobic respiratory enzymes, Hoch J. A. and Silhavy T. J. ed. (American society for Microbiology, washington, DC) pp223-231
- Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1999). Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* 97, 111-120.

- John P. Throup, Kristin K. Koretke, Alexander P. Bryant, Karen A. Ingraham, Alison F. Chalker, Yigong Ge, Andrea Marra, Nicola G. Wallis, James R. Brown, David J. Holmes, Martin Rosenberg and Martin K. R. Burnham (2000) , A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 35(3), 566-576
- Jourlin C., Simon G., Pommier J., Chippaux M., Mejean V. (1996) The periplasmic TorT protein is required for trimethylamine N-oxide reductase gene induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* Feb;178(4):1219-23.
- Kanamaru K & Mizuno T (1992) Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*: a novel mutant of the positive regulator, OmpR, that functions in a phosphorylation-independent manner. *J Biochem (Tokyo)* Apr;111(4):425-30
- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R. W., Olinger, L., Grimwood, J. Davis, R. W. and Stephens, R. S. (1999) Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat. Genet.* 21 (4), 385-389
- Kempf M. J., McBride M. J. (2000) Transposon insertions in the *Flavobacterium johnsoniae* *ftsX* gene disrupt gliding motility and cell division. *J Bacteriol.* Mar;182(6):1671-9.
- Kelly A. J., Sackett M. J., Din N., Quardokus E., Brun Y. V. (1998) Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*. *Genes Dev* Mar 15;12(6):880-93
- Kohri, K., Nomura, S., Kitamura, Y., Nagata, T., Yoshida, K., Iguchi, M., Yamane, T., Umekawa T., Suzuki, Y., Shinohara, H. and Kurita, T. (1993) Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *J. Biol. Chem.*, 268, 15180-15184
- Kolmar H., Waller P. R. and Sauer R. T. (1996) The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J. Bacteriol.* 178: 5925-9
- Krogh S, Jorgensen ST, Devine KM (1998) Lysis genes of the *Bacillus subtilis* defective prophage PBSX. *J Bacteriol* Apr;180(8):2110-7
- Kunkel B., Losick R. and Stragier P. (1990) The *Bacillus subtilis* gene for the development transcription factor sigma K is generated by excision of a dispensable DNA element containing a sporulation recombinase gene. *Genes Dev.* 4: 525-35
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M. G.,

Bessieres P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S. C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C. V., Caldwell B., Capuano V., Carter N. M., Choi S. K., Codani J. J., Connerton I. F., Danchin A., et al., (1997)., The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390: 249-56.

Lange, R., Wagner, C., de Saizieu, A., Flint, N., Molnos, J., Stieger, M., Caspers, P., Kamber, M., Keck, W. and Amrein, K.E. (1999) Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. Gene 237 (1), 223-234

Laub MT, McAdams HH, Feldblyum T, Fraser CM, Shapiro L (2000) Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. Science. Dec 15;290(5499):2144-8.

Lee P. J. and Stock A. M. (1996) Characterization of the genes and proteins of a two-component system from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. J. Bacteriol. 178: 5579-85

Lipinska B., Sharma S. and Georgopoulos C. (1988) Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. Nucleic Acids Res. 16: 10053-67

Lipinska B., Zylicz M. and Georgopoulos C. (1990) The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. J. Bacteriol. 172: 1791-7

Liu G, Draper GC, Donachie WD. (1998) FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. Aug;29(3):893-903.

Liu J. and Zuber P. (1998) A molecular switch controlling competence and motility: competence regulatory factors ComS, MecA, and ComK control sigmaD-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. Aug;180(16):4243-51.

Liu W, Hulett FM. (1997) *Bacillus subtilis* PhoP binds to the *phoB* tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. J Bacteriol. Oct;179(20):6302-10.

Liu X, Taber H. W. (1998) Catabolite regulation of the *Bacillus subtilis* *ctaBCDEF* gene cluster. J Bacteriol. Dec;180(23):6154-63.

Marmur J. A (1961) procedure for the isolation of DNA from microorganismis. J. mol. Biol., 3, 208-218

- Matsuyama S. & Mizushima S. (1987) Novel *rpoA* mutation that interferes with the function of OmpR and EnvZ, positive regulators of the *ompF* and *ompC* genes that code for outer-membrane proteins in *Escherichia coli* K12. J Mol Biol. Jun 20;195(4):847-53.
- McCleary W.R. (1996) The activation of PhoB by acetylphosphate. Mol Microbiol. Jun;20(6):1155-63.
- Medhat M. K., Stephen G. A., Kristina H. S., David S. B., Joe. L. and William D. D. (1997) Two polypeptide products of the *Escherichia coli* cell division gene *ftsW* and a possible role for FtsW in FtsZ function, J. Bacteriol., 179, 3, 784-793
- Mejean V., Iobbi-Nivol C., Lepelletier M., Giordano G., Chippaux M., Pascal M. C. (1994) TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the *tor* operon. Mol Microbiol. Mar;11(6):1169-79.
- Mizuno T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. DNA Res. 4: 161-8
- Moriya S., Fukuoka T., Ogasawara N., Yoshikawa H.. (1988) Regulation of initiation of the chromosomal replication by DnaA-boxes in the origin region of the *Bacillus subtilis* chromosome. EMBO J. Sep;7(9):2911-7.
- Moriya, S., Kato, K, Yoshikawa, H., 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 Sep;9(9):2905-10
- Nakano, M. M., and Zuber, P. (1991). The primary role of ComA in establishment of the competent state in *Bacillus subtilis* is to activate expression of *srfA*.. J. Bacteriol., 173, 3, 7274-7269
- Nakano M. M., Hoffmann T, Zhu Y, Jahn D. (1998) Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. J Bacteriol. Oct;180(20):5344-50.
- Nakano M. M. , Zhu Y, Lacelle M, Zhang X, Hulett FM. (2000) Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. Sep;37(5):1198-207.
- Nakashima K. (1991) Osmoregulatory expression of the porin genes in *Escherichia coli*: evidence for signal titration in the signal transduction through EnvZ-OmpR phosphotransfer.

- Nakashima K. (1991) Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. A novel type of mutation in the phosphorylation domain of the activator protein, OmpR, results in a defect in its phosphorylation-dependent DNA binding. J Biol Chem 266(17), 10775-10780
- Noone,D., Howell,A. and Devine,K.M.(2000) Expression of *ykdA*, encoding a *Bacillus subtilis* homologue of HtrA,is heat shock inducible and negatively autoregulated. J. Bacteriol. 182 (6), 1592-1599
- Ogasawara,N., Nakai,S. and Yoshikawa,H.(1994) Systematic sequencing of the 180 kilobase region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing the replication origin. DNA Res. 1 (1), 1-14
- Ogawa K, Akagawa E, Yamane K, Sun ZW, LaCelle M, Zuber P, Nakano M. M. (1995) The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. Mar;177(5):1409-13.
- Ogura M, Liu L, Lacelle M, Nakano MM, Zuber P. (1999) Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. May;32(4):799-812.
- O'Connell-Motherway M., Fitzgerald G. F. and Van Sinderen D. (1997) Cloning and sequence analysis of putative histidine protein kinases isolated from *Lactococcus lactis* MG1363. Appl.Environ.Microbiol., 63(6),2454-2459
- O'Reilly M., Woodson K, Dowds BC, Devine KM. (1994) The citrulline biosynthetic operon, argC-F, and a ribose transport operon, rbs, from *Bacillus subtilis* are negatively regulated by Spo0A. Mol. Microbiol. Jan;11(1):87-98.
- Osteras M., Stanley. J. and Finan T. M. (1995) Identification of Rhizobium-specific intergenic mosaic elements within an essential two-component regulatory system of *Rhizobium* species. J. Bacteriol 177: 5485-94
- Ota I. M. Varshavsky A. (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. Science 262: 566-9
- Pallen MJ, Wren BW. (1997) The HtrA family of serine proteases. Mol Microbiol. Oct;26(2):209-21. Review.
- Parkinson J. S. and Kofoed E. C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. Annu Rev Genet 26: 71-112

- Patric K. Martin, Tong Li, Dongxu Sun, Donald P. Biek and Molly B. Schmid. (1999) Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol 181: 3666-3673
- Perego, M., Cole S. P., Burbulys D., Trach K. and Hoch J. A. (1989) Characterization of the gene for protein kinases which phosphorylates the sporulation -regulatory proteins Spo0A and Spo0F of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 171: 6187-96
- Persuh M, Turgay K, Mandic-Mulec I, Dubnau D. (1999) The N- and C-terminal domains of MecA recognize different partners in the competence molecular switch. Mol Microbiol. Aug;33(4):886-94.
- Quon K. C., Marczynski G. T. and Shapiro L. (1996) Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. Cell 84: 83-93
- Rashid MH, Nakano, S., Sekiguchi J. (1996) Analysis of the minor autolysins of *Bacillus subtilis* during vegetative growth by zymography. FEBS Microbiology Letter 132, 131-137
- Rashid MH, Tamakoshi A, Sekiguchi J. (1996) Effects of *mecA* and *mecB* (*clpC*) mutations on expression of *sigD*, which encodes an alternative sigma factor, and autolysin operons and on flagellin synthesis in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. Aug;178(16):4861-9.
- Roggiani M, Dubnau D. (1993) ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. J Bacteriol May;175(10):3182-7
- Rowland S. L., Katis V. L., Partridge S. R. and Wake, R. G. (1997). DivIB, FtsZ and cell division in *Bacillus subtilis* . 23(2), 295-302.
- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N. and Baumeister, W. (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. Nature 407 (6803), 508-513
- Salmond GP, Plakidou S. (1984) Genetic analysis of essential genes in the *ftsE* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new cell division gene, *ftsS*. Mol Gen Genet.;197(2):304-8.
- Sambrook J., Fritsh E. F., and Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. vol.1, 1.21-1.39(a), 1.40-1.41 (b), 7.31-7.52 (c)
- Shapiro L and Losick R (1997) Protein localization and cell fate in bacteria. Science 276, 712-

- Shazand K., Frandsen N. and Stragier P. (1995) Cell-type specificity during development in *Bacillus subtilis*: the molecular and morphological requirements for sigma E activation. *EMBO J.* 14: 1439-45
- Simon G., Mejean V., Jourlin C., Chippaux M., Pascal M. C. (1995) The *torR* gene of *Escherichia coli* encodes a response regulator protein involved in the expression of the trimethylamine N-oxide reductase genes. *J Bacteriol* 1994 Sep;176(18):5601-6
- Smith I., Mandic-Mulec, Gaur, N., (1991).The role of negative control in sporulation. 142, 831-839.
- Southern E. M.(1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. M. Biol.* 98: 503
- Stephens,R.S., Kalman,S., Lammel,C.J., Fan,J., Marathe,R.,Aravind,L., Mitchell,W.P., Olinger,L., Tatusov,R.L., Zhao,Q.,Koonin,E.V. and Davis,R.W.(1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282 (5389), 754-759
- Strauch. M. A., D. de Mendoza and J. A. Hoch. (1992) *cis*-Unsaturated fatty acid specifically inhibit a signal-transducing protein kinase required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. : *Mol. Microbiol.*, 6, 2909-2917.
- Strauch MA, Trach KA, Day J and Hoch JA. (1992) Spo0A activates and represses its own synthesis by binding at its dual promoters. *Biochimie.* Jul-Aug;74(7-8): 619-26.
- Strauch MA. (1993) Regulation of *Bacillus subtilis* gene expression during the transition from exponential growth to stationary phase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* ;46:121-53. Review.
- Strauch M. A. (1995) AbrB modulates expression and catabolite repression of a *Bacillus subtilis* ribose transport operon. *J Bacteriol* Dec;177(23):6727-31
- Stover,C.K., Pham,X.Q., Erwin,A.L., Mizoguchi,S.D., Warrenner,P., Hickey,M.J., Brinkman,F.S., Hufnagle,W.O., Kowalik,D.J., Lagrou,M., Garber,R.L., Goltry,L., Tolentino,E., Westbrook-Wadman,S., Yuan,Y., Brody,L.L., Coulter,S.N., Folger,K.R., Kas,A., Larbig,K., Lim,R., Smith,K., Spencer,D., Wong,G.K., Wu,Z. and Paulsen,I.T.(2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406 (6799), 959-964

- Sun D. X., Stragier P. and Setlow P. (1989) Identification of a new sigma-factor involved in compartmentalized gene expression during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 3: 141-9
- Sun G., Sharkova E., Chesnut R., Birkey S., Duggan M. F., Sorokin A., Pujic P., Ehrlich S. D. and Hulett F. M. (1996) Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178: 1374-85
- Sutcliffe, J.G. (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 43 Pt 1, 77-90
- Szybalski E. H., Szybalski W. (1979) A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene*, 7, 217-70
- Takami, H., Masui, N., Nakasone, K. and Horikoshi, K. (1999) Replication origin region of the chromosome of alkaliphilic *Bacillus halodurans* C-125. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (6), 1134-1137
- Tapias A, Lopez G, Ayora S. (2000) *Bacillus subtilis* LrpC is a sequence-independent DNA-binding and DNA-bending protein which bridges DNA. *Nucleic Acids Res* Jan 15;28(2):552-9
- Taylor BL, Zhulin IB, Johnson MS. (1999) Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu Rev Microbiol.*;53:103-28. Review.
- Taylor BL, Zhulin IB. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* Jun;63(2):479-506. Review.
- Thompson, J. D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Tokunaga T, Rashid MH, Kuroda A, Sekiguchi J. (1994) Effect of *degS-degU* mutations on the expression of *sigD*, encoding an alternative sigma factor, and autolysin operon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* Aug;176(16):5177-80.
- Turgay K, Hahn J, Burghoorn J, Dubnau D. (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J.* Nov 16;17(22):6730-8.
- Ukai H, Matsuzawa H, Ito K, Yamada M, Nishimura A. (1998) *ftsE*(Ts) affects translocation of

- K⁺-pump proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J Bacteriol. Jul;180(14):3663-70.
- Vagner, V., Dervyn, E., Ehrlich, S.D. (1998) A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. Microbiology. Nov;144 (Pt 11):3097-104.
- van Heijenoort, J., (1996) Murein synthesis, In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Mgasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Shaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.p. 1025-1034.
- Vicente, M., Chater, K. F. & De Lorenzo, V. (1999). Bacterial transcription factors involved in global regulation. Mol Microbiol 33, 8-17.
- Volz K.(1993) Structural conservation in the CheY superfamily. Biochemistry. Nov 9;32(44):11741-53. Review.
- Waller P. R. and Sauer R. T. (1996) Characterization of *degQ* and *degS*, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease. J. Bacteriol. 178: 1146-53
- Wharam. S. D., V. Mulholland. and G. P. C. Salmond. (1995) Conserved virulence factor regulation and secretion systems in bacterial pathogens of plants and animals. : Eur. J. Plant Pathol. 101, 1-13
- Wanner (1995) Two-component signal transduction. Signal transduction and cross regulation in the *Escherichia coli* phosphate regulation by PhoR, CreC and acetyl phosphate . Hoch, J. A. and Silhavy T. J. ed. (American society for Microbiology, washington, DC) pp203-219
- Ward JE Jr, Lutkenhaus J. (1985) Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*. Cell Oct;42(3):941-9
- William G. H.(1995)The sigma factors of *Bacillus subtilis* . Microbiol rev., Mar. vol.59 p. 1-30
- Wu J, Ohta N, Newton A. (1998) An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in Caulobacter. Proc Natl Acad Sci U S A. Feb 17;95(4):1443-8.
- Yamada M., Makino K., Amemura M., Shinagawa H. and Nakata A. (1989) Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes. J. Bacteriol. 171: 5601-6
- Yamamoto H, Murata M, Sekiguchi J. (2000) The CitST two-component system regulates the

expression of the Mg-citrate transporter in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. Aug;37(4):898-912.

Youngman P., P. Perkins J. B. and Sandman K.(1985) Use of Tn917-mediated transcriptional gene fusions to *lacZ* and *cat-86* for the identification and study of regulated genes in the *Bacillus subtilis* chromosome. In Molecular Biology of Microbial Differentiation. ,Hoch J. A. and Setlow P., eds. (American Society for Microbiology Washington DC., pp. 47-54.)

Yuan G. and Wong S. (1995) Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis* : the involvement of the σ A-like promoter and roles of the inverted repeat sequence. J.Bacteriol., 177, 5427-5433

Zahrt T.C., Deretic V. (2000) An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. Jul;182(13):3832-8.

Zhulin IB, Taylor BL, Dixon R. (1997) PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. Trends Biochem Sci. Sep;22(9):331-3.