枯草菌の孢子形成と蛋白質分泌遺伝子の機能に関する研究[†]

(1992 年度農芸化学奨励賞受賞)

吉 川 博 文

(東京大学応用微生物研究所)

はじめに

細胞は一般に、増殖期と休止期に分けられるが、増殖停止後の活動に関して、孢子形成のような明らかな形態変化を伴う場合ばかりでなく、大腸菌のように単に休止状態に入る場合においても、生残りのためのいろいろな活動が行われていることが最近明らかになってきた。このような増殖停止期の活動は、細胞分化や物質生産の機構の解析にとどまらず、種々の環境変化やストレスに应答する細胞の反応を総合的に理解するうえで、近年注目されてきている。枯草菌の孢子形成は、こうした意味から、その分子レベルでの機構が次第に明らかにされてきている非常に興味深い研究対象である。

枯草菌はグラム陽性の桿菌であり、通常は細胞分裂を繰り返して増殖しているが、栄養分が欠乏してくると分裂を止め、内生孢子を形成する。一方、枯草菌のもう1つの特徴は、アミラーゼやプロテアーゼ等の分泌性酵素を培地中に分泌することであり、古くから工業用微生物として有用物質の生産宿主に用いられてきた。しかし、その詳しい分泌機構に関しては、あまり研究されてきていない。孢子形成との関連については、分泌性酵素が一般に孢子形成期に入ってから生産されてくること、および孢子形成初期遺伝子の欠損株において分泌性酵素の生産が低下することなどから、これらの酵素の遺伝子発現が、孢子形成遺伝子の支配下にあることが、少数の例で示されているだけである。本研究は、孢子形成初期遺伝子群の発現調節機構の概要を明らかにするとともに、蛋白質分泌に関与する遺伝子が、その一員となってネットワークを形成していることを明らかにしたものである。

1. 孢子形成初期遺伝子群の発現調節ネットワーク

枯草菌の孢子形成遺伝子のうち、孢子形成開始の機構をつかさどる *spoO* と呼ばれる遺伝子群は、環境の変化を感知して増殖を止め、孢子形成へと向かう引き金（トリガー）としての機能を持ち、細胞分化の機構を解明するという点からもとくに関心が持たれている。*spoO* 遺伝子群のなかで、*spoOA* は、その変異が最も多面的な影響を及ぼすことから、中心的役割を果たしていると考えられてきた⁽¹⁾。また、*spoOF* とともに、シグナル伝達のいわゆる2コンポーネントシステムに属する興味深い遺伝子であることから⁽²⁻⁴⁾、この2つの遺伝子について *lacZ* との融合遺伝子を構築し、各種の *spoO* 変異株に導入して相互の影響を調べることにより、*spoO* 遺伝子群の階級構造を解析した。その結果、野生株においては、*spoOA* が孢子形成開始期から、そして、やや遅れて *spoOF* が、顕著に発現を増幅させる様子がみられた⁽⁵⁾ (図1)。また、*spoOF* の発現が増大する時期から *spoOA* の発現は低下した。そして、この発現増幅は、*spoOA*, *B*, *E*, *F*, *H* の各変異株ではみられなくなっていたが、*spoOJ* 変異株では影響を受けていなかった⁽⁵⁾ (図2)。一方 *sof-1* 変異は、*spoOA* 遺伝子内に起きたミスセンス変異で⁽⁶⁾、*spoOB*, *E*, *F*, *K* 変異を抑制して孢子形成を行えるようになった変異であるが⁽⁷⁾、興味深いことに、この変異を導入することによって *spoOB*, *E*, *F*, *K* 変異株で抑えられた *spoOA*, *spoOF* の発現増幅が回復した⁽⁵⁾。

また、*spoOF* 遺伝子を多コピーベクターで野生株に導入すると孢子形成を阻害することが知られていたが⁽⁸⁻¹⁰⁾、この現象も、*spoOA* の発現増幅を転写レベルで抑えていることを明らかにした。こうした実験結果をもとに、*spoO* 遺伝子群の発現調節ネットワークの概要が明らかになった (図3)。すなわち、*spoOB*, *E*, *F*, *H* 遺伝子産物は、何らかの環境の変化を感知して、最終的に *spo-*

[†] Studies on the *Bacillus subtilis* Genes for Protein Secretion: Involvement in the Regulation of Sporulation.

Hirofumi YOSHIKAWA (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo 113)

図 1 野生株における *spoOA* および *spoOF* の発現パターン

野生株 UOT-1100 に *spoOA-lacZ* および *spoOF-lacZ* 融合遺伝子を持つファージ $\phi 105$ を溶原化し、各培養時点での β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

図 2 各種 *spoO* 変異株における *spoOA* 遺伝子の発現パターン

JH642 系統の野生株および各種 *spoO* 変異株に、*spoOA-lacZ* 融合遺伝子を持つ $\phi 105$ を溶原化し β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

OA 遺伝子の発現を増幅させるネットワークを構成していると考えられた。現在、SpoOB, F は、膜蛋白質である SpoOK^(11,12) 等からの情報に基づき、リン酸を順次転移して最終的に SpoOA をリン酸化する“フォスフォリ

図 3 各 *spoO* 遺伝子間の相互発現制御に関する初期のモデル

Veg は栄養増殖期、Spo は胞子形成初期を示す。A, B, E, F, H は、それぞれ *spoOA*, *spoOB*, *spoOE*, *spoOF*, *spoOH* 遺伝子産物を示し、四角の大きさは発現量の増減を示す。

図 4 *spoOA* 遺伝子の発現に及ぼすグルコースの影響

spoOA-lacZ 融合遺伝子を持つ野生株 (UOT-1285) を 0.1% グルコース (-Glc), および 2% グルコース (+Glc) 存在下で培養し、 β -ガラクトシダーゼ活性を経時的に測定した。

レー”システムを構成しており、SpoOE は、このシステムを負に制御していることが明らかになっている⁽¹³⁾。

枯草菌の胞子形成がカタボライト抑制を受けることは古くから知られていたが、この現象も *spoOA* の胞子形成期からの発現増幅が抑制されることに起因していることを発見した⁽¹⁴⁾ (図 4)。また、グルコース存在下で胞子形成を行えるようになった主要シグマ因子遺伝子の変異 *sigA 47* (*crsA 47*) を持つ株では、やはり、この発現

増幅が回復していた⁽¹⁵⁾。その後、この *spoOA* のカタボライト抑制は転写レベルの調節であることが明らかとなった⁽¹⁶⁾。

ここで重要なことは、いろいろな環境変化を感知するセンサーとしての各種 *spoO* 遺伝子の変異が、何らかの抑制機構によって最終的に *spoOA* 遺伝子の発現増幅を引き起こすことができれば、孢子形成頻度が回復する、すなわち、孢子形成初期過程において、次の段階へ進む鍵になる過程が *spoOA* 遺伝子の発現増幅であるという点である。*spoOA* 遺伝子は、栄養増殖期には *Pv* と呼ぶプロモーターから弱く転写されており、孢子形成期に入ると *Ps* と呼ぶプロモーターからの転写が強く誘導される⁽¹⁶⁾ (図9)。上記の発現増幅は、すなわち、*Ps* プロモーターからの転写誘導が起こることを意味している。

2. 蛋白質分泌遺伝子の単離

枯草菌の蛋白質分泌機構を理解することは、その高い分泌生産性の点からも重要と思われるが、分泌装置そのものの研究はほとんどなされてこなかった。筆者は、大腸菌 *secY*, *secE* 遺伝子がリボソーム遺伝子クラスターの中あるいは近傍に位置すること^(19,23)、および、枯草菌と大腸菌で、リボソーム遺伝子の保存性が高いことに注目し、リボソーム遺伝子の変異マーカーを指標として、その領域をクローニングし、*secY*, *secE* 両遺伝子の単離を試みた。*secY* については、スペクチノマイシン耐性を与える *rpsE2* 変異、また *secE* については、チオスト

レプトン耐性を与える *rplK6* 変異を指標とし、それぞれの耐性菌から DNA を抽出し、 λ gt11 を用いてライブラリーを作成した。いくつかのサブグループに分けてブランクを作り、そこからふたたびファージ溶菌液を調製し、一部から DNA を抽出して枯草菌を形質転換し、活性のあるサブグループを検索した。この操作を4回繰り返すことによって単一の組換え体ファージを得た。この方法は、枯草菌の特色である高い組換え能を利用した非常に簡便で敏速な方法である。

各組換え体ファージ DNA の塩基配列を決定したところ、それぞれ指標とした薬剤耐性遺伝子が見つかった。*secY* については、*rpsE* の下流に、大腸菌 *secY* とアミノ酸レベルで 41% の相同性を持つフレームが見出され^(17,18)、膜貫通ドメインを 10 個持つ特徴的な構造などから枯草菌 *secY* 遺伝子であると結論した (図5)。現在まで4種の微生物から *secY* 相同遺伝子が報告されているが^(19~21)、とくに相同性の高い領域は、すべて膜貫通ドメインか細胞質側ドメインに集中しており、細胞表層側の相同性は低かった^(18,21,22)。

大腸菌 *secE* は *nusG* とオペロンを構成して *rplK* の上流に位置する⁽²³⁾。しかし、枯草菌では、*rplK* の上流に *nusG* に相当するフレームは確認されたが、その上流には *secE* と高い相同性を示すフレームが見出されなかった。しかし、59 アミノ酸からなる小さなフレームが存在した (*orfE*)。大腸菌 *SecE* は膜貫通ドメインを3個持つ蛋白質であるが、最近C末端側1個だけのドメインを持つ変異型 *SecE* が、正常な *SecE* として機能しようと

図5 SecY 蛋白質のトポロジー

黒の太線は大腸菌と枯草菌の *SecY* 蛋白質において、とくに相同性の高い領域を示す。*secY76* は、後述の HR71 株における変異点、他の変異点は、大腸菌 *secY(prlA)* で知られているものを示す。

図 6 大腸菌の変異型 SecE と枯草菌 OrfE のトポロジー
荷電を持つアミノ酸を太丸で示す。大腸菌 SecE は文献 (24) より転載。

図 7 OmpA 蛋白質のプロセッシング

大腸菌に各種プラスミドを導入して、OmpA 蛋白質のプロセッシングをウェスタンブロット法により解析した。1, *secEcs* 変異株 (プラスミドなし); 2, *secEcs* 変異株 (pTZ18R: ベクター); 3, *secEcs* 変異株 (pTE814: 枯草菌 *orfE*, *nusG* 領域を含む); 4, *secEcs* 変異株 (pTE86R: 枯草菌 *orfE* 領域のみを含む); 5, 野生株。

いう報告があった^(24,25)。OrfE は、この変異型 SecE と若干相同性を持ち、荷電を持つアミノ酸の分布等が似ているため (図 6)、大腸菌 *secE* 変異株に対する相補実験を行った。その結果、*orfE* 断片を持つプラスミドを導入したところ、大腸菌 *secEcs* 変異株の低温における増殖、および、外膜蛋白質 OmpA のプロセッシング (図 7) の両方とも相補することができた。したがって、*orfE* は枯草菌における *secE* 相当遺伝子であることが示唆された⁽²⁶⁾。

3. 蛋白質分泌遺伝子の変異による孢子形成欠損

secY 遺伝子領域をクローン化した λ フェージの溶原

菌を MNNG 処理し、全 DNA を抽出して枯草菌を形質転換した結果、孢子形成が温度感受性になった株 (HR 71) が得られた⁽²⁷⁾。この変異は、SecY 蛋白質の N 末端側から 2 番目の膜貫通ドメイン内に起こった変異で、45°C における孢子形成頻度が野生株の千分の一以下に落ちていた。45°C で培養したこの株を電子顕微鏡で観察したところ、孢子形成期特異的な非対称隔膜の形成がまったくみられず、*spoO* 変異株同様、第 0 期で停止していることがわかった。また培養温度のシフトアップシフトダウン実験により、HR 71 株が正常に孢子形成をするためには、 $T_{-0.5}$ (孢子形成開始 30 分前) から T_0 (同 5 時間後) まで許容温度にいたる必要があることが明らかになったが (図 8)、この時期は、孢子形成に向かうための情報が蓄積し、非対称隔膜の形成からフォアスポアの完成期までに相当し、SecY 蛋白質がフォアスポアの膜形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

始めに記したように、孢子形成の初期過程では、*spoO A* 遺伝子の発現増幅が鍵になる現象であるが、HR 71 株で調べたところ、Ps プロモーターからの転写誘導が、非許容温度で抑制されていた (図 9)。したがって複雑なネットワークを形成する *spoOA* 発現調節機構のどこかの過程に SecY が機能していることが明らかとなった。HR 71 株においては正常な孢子形成を行うために、 $T_{-0.5}$ から T_0 まで許容温度にいたる必要があることは先に記したが、いろいろな時期に 1 時間だけ非許容温度にさらす実験を行ったところ、 T_{-1} から T_0 までの 1 時間シフトした場合に最も顕著な孢子形成阻害現象がみられ

図 8 HR71 株の温度シフト後の孢子形成頻度
HR71 株を 37°C または 45°C で培養し、各時点で 37°C から 45°C へ、また 45°C から 37°C へシフトし、20 時間培養後の孢子形成頻度を測定した。頻度は孢子/生菌数で表わした。

図 9 HR71 株における *spoOA* 遺伝子のプロモータースイッチ

HR71 株を 37°C または 45°C で培養し、栄養増殖期 $T_{-0.5}$: V と表示), および孢子形成期 (T_2 : S と表示) の細胞から RNA を抽出し, *spoOA* 遺伝子のプローブ⁽¹⁶⁾を用いて S1 マッピングを行った. Pv および Ps プロモーターからの転写産物の位置を矢印で示す。

た (図 10). このことは, T_0 以降の SecY の役割は可逆的であり, 許容温度に戻ることによって進行できるが, T_{-1} から T_0 の期間は, 時期特異的な役割を持ち, この期間に非許容温度にいることが, その後の孢子形成

図 10 HR71 株の 1 時間シフト後の孢子形成頻度
37°C で培養している HR71 株を, 横棒で示した各 1 時間だけ 45°C にシフトし, ふたたび 37°C に戻して培養を続け, 20 時間後の孢子数を調べた。

図 11 HR71 株における 1 時間シフト後の *spoOA* 遺伝子の発現

T_{-1} から T_0 まで 45°C にシフトした後 37°C に戻し *spoOA-lacZ* 融合遺伝子由来の β -ガラクトシダーゼ活性の経時変化を測定した。

に重大な影響を与えていることを示している。また, この T_{-1} から T_0 までシフトした後の *spoOA* の発現が, 相当抑えられていることから (図 11), この期間の *secY* 変異の影響は *spoOA* の発現増幅にかかわる役割に対する影響と考えられる。したがって, この 1 時間シフト実験によって, *secY* の種々の役割のうち, *spoOA* の発現調節ネットワークを構成する部分だけの影響を見ること

表 1 種々の株における胞子形成頻度

Strains	Sporulation efficiencies		
	37°C	45°C	1 hr shift ^{a)}
UOT-1248 (wild type)	1.00	0.56	0.38
HR71 (<i>secY76</i>)	0.54	0.00017	0.0056
HR91 (<i>secY76 crsA47</i>)	NT	0.0013	0.0067
HR99 (<i>secY76 sof-1</i>)	NT	0.00038	0.0044
HR71+ESF ^{b)}	0.56	0.0019	0.23
HR98 (<i>secY76 ssy-1</i>)	0.67	0.044	0.61

a) T₋₁ から T₀ までの期間だけ 45°C で培養し, 37°C に戻して培養したときの胞子形成頻度. b) 野生株の T4 期培養上清. ESF, Extracellular Sporulating Factor.

ができる. この原理を用いて, 1時間シフトした後でも野生株レベルの胞子形成頻度を示すサプレッサー変異株を得ることができた(表1). この変異(*ssy-1*)を起こした遺伝子の同定ができれば, *spoOA* の発現増幅にかかわり, かつ, *secY* と相互作用する遺伝子が明らかになると考えられる.

1時間シフト実験における *spoOA* 遺伝子の発現抑制は, 野生株の T₄ 期培養上清を添加することによって回復し, 胞子形成頻度も上昇させた(表1). この上清には, 胞子形成を誘導することができる細胞外因子が含まれており, *spoOB*, *E*, *F*, *K* 変異株における *spoOA* の発現抑制を回復し, 胞子形成も回復させることが知られている⁽²⁸⁾. したがって, *secY* は, この細胞外因子の生産あるいは輸送に関与していることが考えられる. 一方, 同様の効果を持つ *sof-1* 変異や *crsA47* 変異を HR71 株に導入した場合には胞子形成を回復させなかった. こうした結果は, *spoOA* 発現調節ネットワークのなかで少なくとも *SpoOB*, *E*, *F* の関与するフォスホリレー系よりも下流, かつ, 上記の細胞外因子が作用する点よりも上流で, *SecY* が作用していることを示している. このことは, あるいは, フォスホリレーを介さない新しい環境変化感知システムの経路が存在することを示唆しているかもしれない.

以上, 胞子形成という細胞分化の分子機構が次第に明らかになるなかで, 蛋白質の分泌装置を構成する遺伝子産物が, 単に蛋白質の膜透過だけでなく, 非対称隔膜形成という胞子形成の最初の構造的変化を開始するために必要な細胞の条件を整える過程に重要な役割を果たしているという, 新しい局面を開くことができた. 最近, 細

胞分裂, 蛋白質分泌, 胞子形成等, 多面的な影響を及ぼす遺伝子として知られていた *div-341* 遺伝子が, 枯草菌 *secA* であるという報告もなされ⁽²⁹⁾, 分泌装置と細胞分裂, 細胞分化が密接な関係にあることが裏づけられてきた.

本研究を行うにあたり, 終始ご指導, ご鞭撻を賜りました. 東京大学名誉教授齋藤日向先生, 東京大学応用微生物研究所教授高橋秀夫先生, 同助教授河村富士夫先生, また, 留学中にご指導いただきました, アリゾナ大学教授伊藤純悦先生, カリフォルニア大学教授 Roy H. Doi 先生に深く感謝いたします. また, 多大なご援助をいただきました, 東京大学応用微生物研究所長水島昭二先生, 筑波大学生物科学系教授山根國男先生, 東京大学応用微生物研究所助手松山伸一博士, 平田愛子博士, 田中 寛博士に感謝いたします. また, 共同研究者の風見潤, 関 達也, 曾根秀隆, 山下伸也, 千葉桜拓, 鄭 相民の各氏をはじめ当研究室の卒業生, 在学生諸氏, ならびにスタッフの方々に厚く御礼申し上げます.

- (1) I. Smith : in "Regulation of prokaryotic development," American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1989, pp.185—210.
- (2) K. A. Trach, J. W. Chapman, P. J. Piggot, and J. A. Hoch : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7260—7264 (1985).
- (3) H. Yoshikawa, J. Kazami, S. Yamashita, T. Chibazakura, H. Sone, F. Kawamura, M. Oda,, M. Isaka, Y. Kobayashi, and H. Saito : *Nucleic Acids Res.*, **14**, 1063—1072 (1986).
- (4) J. B. Stock, A. M. Stock, and J. M. Mottonen : *Nature (London)*, **344**, 395—400 (1990).
- (5) S. Yamashita, H. Yoshikawa, F. Kawamura, H. Takahashi, T. Yamamoto, Y. Kobayashi, and H. Saito : *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 28—33 (1986).
- (6) J. A. Hoch, K. Trach, F. Kawamura, and H. Saito : *J. Bacteriol.*, **161**, 552—555 (1985).
- (7) F. Kawamura and H. Saito : *Mol. Gen. Genet.*, **192**, 330—334 (1983).
- (8) F. Kawamura, H. Shimotsu, H. Saito, H. Hirochika, and Y. Kobayashi : in "Spore VIII," American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1981, pp.109—113.
- (9) H. Yoshikawa, H. Sone, T. Seki, F. Kawamura, and H. Saito : in "Molecular Biology

- of Microbial Differentiation," American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1985, pp. 29—34.
- (10) H. Yoshikawa, J. Kazami, T. Seki, T. Chibazakura, S. Yamashita, F. Kawamura, and H. Saito : in "Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications," Academic Press, New York, 1986, pp. 171—182.
- (11) D. Z. Rudner, J. R. LeDeaux, K. Ireton, and A. D. Grossman : *J. Bacteriol.*, **173**, 1388—1398 (1991).
- (12) M. Perego, C. F. Higgins, S. R. Pearce, M. P. Gallagher, and J. A. Hoch : *Mol. Microbiol.*, **5**, 173—185 (1991).
- (13) D. Burbulys, K. Trach, and J. A. Hoch : *Cell*, **64**, 545—552 (1991).
- (14) H. Yoshikawa, S. Yamashita, J. Kazami, F. Kawamura, H. Takahashi, and H. Saito : in "Genetics and Biotechnology of Bacilli," vol. 2, Academic Press, New York, 1988, pp. 135—139.
- (15) S. Yamashita, F. Kawamura, H. Yoshikawa, H. Takahashi, and H. Saito : *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1335—1345 (1989).
- (16) T. Chibazakura, F. Kawamura, and H. Takahashi : *J. Bacteriol.*, **173**, 2625—2632 (1991).
- (17) H. Yoshikawa and R. H. Doi : *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1647 (1990).
- (18) K. Nakamura, A. Nakamura, H. Takamatsu, H. Yoshikawa, and K. Yamane : *J. Biochem. (Tokyo)*, **107**, 603—607 (1990).
- (19) D. P. Cerretti, D. Dean, G. R. Davis, M. Bedwell, and M. Nomura : *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2599—2615 (1983).
- (20) S. Ohkubo, A. Muto, Y. Kawauchi, F. Yamao, and S. Osawa : *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 314—322 (1987).
- (21) T. Koivula, I. Palva, and H. Hemilä : *FEBS Lett.*, **288**, 114—118 (1991).
- (22) J.-W. Suh, S. A. Boylan, S. M. Thomas, K. M. Dolan, D. B. Oliver, and C. W. Price : *Mol. Microbiol.*, **4**, 305—314 (1990).
- (23) W. L. Downing, S. L. Sullivan, M. E. Gottesman, and P. P. Dennis : *J. Bacteriol.*, **172**, 1621—1627 (1990).
- (24) P. J. Schatz, K. L. Bieker, K. M. Ottemann, T. J. Silhavy, and J. Beckwith : *EMBO J.*, **10**, 1749—1757 (1991).
- (25) K. Nishiyama, S. Mizushima, and H. Tokuda : *J. Biol. Chem.*, **267**, 7170—7176 (1992).
- (26) S.-M. Jeong, H. Yoshikawa, and H. Takahashi : 投稿中.
- (27) H. Yoshikawa, S.-M. Jeong, A. Hirata, R. H. Doi and H. Takahashi : *J. Bacteriol.*, 投稿中.
- (28) 平岡宏敏, 河村富士夫, 高橋秀夫 : 日本農芸化学会 1992 年度大会講演要旨集, 1992, p. 304.
- (29) Y. Sadaie, H. Takamatsu, K. Nakamura, and K. Yamane : *Gene*, **98**, 101—105 (1991).