

枯草菌の *sigY* オペロンの構成と発現

東條 繁郎

枯草菌シグマ因子の ECF ファミリーの一つである *sigY* オペロンの構成と発現について研究を行った。*sigY* オペロンは、6 つ (*sigY*, *yx1C*, *D*, *E*, *F*, *G*) の遺伝子から構成され、窒素源飢餓条件により誘導された。その転写産物は、*sigY* 遺伝子の 31 bp 上流から *yx1H* までの 4.2 kp であった。*sigY* オペロンの発現は、 σ^Y により正の制御を受けていた。プライマー伸長法による転写開始点の同定と *sigY* プロモーター領域の欠失解析により、*sigY* プロモーターの “-10”、“-35” 領域は、それぞれ “CGTC”、“TGAACG” であった。後者の配列は、 σ^W , σ^X , σ^M が認識する -35 領域配列とは区別された。*sigY* オペロンの転写は、Yx1D により負に制御された。このことは、Yx1D が、アンチ σ^Y であることを示唆した。*sigY* 破壊は、窒素源飢餓条件下での孢子形成に影響を及ぼした。しかし、窒素源飢餓による *sigY* 誘導に、孢子形成は関与しなかった。*sigY* オペロンの構成と機能は、厳しい環境で生育する幾つかの微生物で、明確に保存されていた。

キーワード：細胞外機能，負の制御，窒素源飢餓，正のオート制御，シグマ因子，孢子形成，転写，*Bacillus subtilis*

土壌細菌の枯草菌 *Bacillus subtilis* は、様々な環境上の変化に対して特有のゲノム発現のパターンをとる事によって適合し生存している。シグマ因子は、環境の変化に応じて遺伝子の発現を変化させる手段の一つである。これまで、研究の進んでいるシグマ因子の内、 σ^H , σ^E , σ^F , σ^G および σ^K は、孢子形成プロセス、 σ^B は一般ストレス、 σ^D は走性・自己分解等に関与していることが解っている¹⁾。1994年には、Lonettoらが、最初にシグマ因子の sigma-70 ファミリーのサブファミリーとして、extracytoplasmic function (ECF) ファミリーを提案した²⁾。*B. subtilis* のゲノムの配列を決定したところ、新規の ECF シグマ因子 (σ^X , σ^W , σ^M , σ^Y , σ^V , σ^Z および σ^{Y1aC}) が特定された³⁾。多数のバクテリアのゲノム配列が決定されたことにより、この ECF ファミリーのメンバー数は急激に増加した。ECF σ 因子の典型的な機能は、分泌、ポリサッカライドの合成、イオン輸送のような細胞の膜上での機能を制御する^{4,5)}。枯草菌 ECF σ 因子の中で機能まで解明されているのは、 $\sigma^{X(6,7)}$, $\sigma^{W(6-10)}$, $\sigma^{M(10-12)}$ であり、その機能は、抗生物質の不活性化、排出、細胞表面に関する遺伝子を誘導して細胞維持に関与する。一方、 σ^Y を含む他の4つの ECF σ 因子については、ほとんど解析が行われていない。最近、枯草菌の ECF σ 因子の標的遺伝子候補が、DNA マイクロアレイ解析で抽出された¹³⁾。

〒729-0292 福山市学園町1番地三蔵 福山大学生命工学部生物工学科。

*Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2459, E-mail: stojo@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

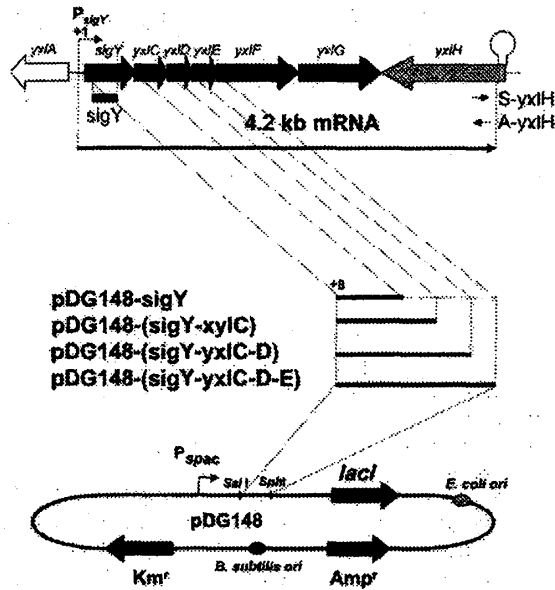


Fig. 1. Organization and transcription of the *sigY* operon, and structures of derivatives of plasmid pDG148 carrying *sigY* and its downstream genes. The gene organization of the *sigY* region was cited from the literature (3). The *sigY* operon, consisting of six genes (*sigY*, *yxlC*, *D*, *E*, *F*, and *G*), was transcribed from the 31st base upstream of the translation start base of *sigY* as a 4.2-kb mRNA extending into a convergent gene, *yxlH*, as described below. Derivatives of plasmid pDG148 carried a series of *sigY* regions from nucleotide +8 (+1 is the *sigY* transcription initiation base) to the stop codon of each gene of the *sigY* operon. These regions were placed downstream of *Pspac* in plasmid pDG148 using the *SalI* and *SphI* sites. The *spac* promoter is negatively regulated by *LacI* so that IPTG addition induces the genes cloned. The locations of the probes (*sigY*, S-*yxlH*, and A-*yxlH*) used for Northern analysis are also shown.

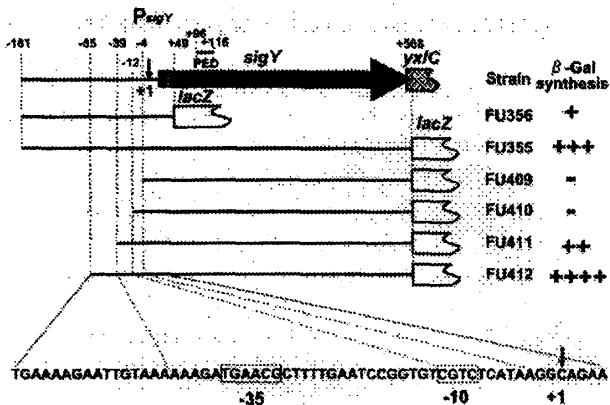


Fig. 2. The promoter region of the *sigY* operon, and its deletion analysis. The *B. subtilis* strains carried a series of *lacZ* fusions in the *amyE* locus, in which the *sigY* promoter regions indicated by bold lines were transcriptionally fused with *lacZ*. The relative level of β -Gal synthesis induced upon nitrogen starvation in the cells of each strain is shown. The location of the primer (PED) used for primer extension analysis to identify the 3'-end of the *sigY* transcript is also indicated. In the lower part of the figure, the nucleotide sequence of the *sigY* promoter is shown, where the *sigY* transcription initiation base (+1), and the "-10" and "-35" regions of the promoter are indicated.

ECF σ 因子は、幾つかの共通した特徴がある。多くの場合、ECF σ 因子は、細胞外センサードメインと細胞内不活性化ドメインを持つ膜貫通型のアンチ σ 因子と共に転写される。ECF σ 因子をコードするオペロンのプロモーターを自身の σ 因子が認識することが多い。最近のマイクロアレイ解析の結果から *sigZ* を除く枯草菌 ECF σ 因子が、自身のプロモーターを認識することを明らかにした¹³⁾。本研究では、これまで研究が行われてこなかった ECF σ 因子の一つである *sigY* オペロンについて、その構成と発現に焦点を合わせた (Fig. 1)。

この論文では、*sigY* オペロンが、6つの遺伝子 (*sigY*, *yxlC*, *D*, *E*, *F*, *G*) からなり、窒素源飢餓条件により誘導されること、*sigY* オペロンの転写は、 σ^Y 自身によって開始され、下流にある *YxlD* によって負に制御されること、プライマー伸長法とプロモーター領域の欠失解析により σ^Y が認識する配列を決定したことについて報告する。

実験方法

プラスミド及び菌株 Table 1 に使用菌株とプラスミドを示した。FU355, FU356, FU409, FU410, FU411, FU412 株では、いろいろな長さの *sigY* 領域 (-181/+568, -181/+49, -4/+568, -12/+568, -39/+568, -55/+568; +1 は *sigY* オペロンの転写開始点である) を *lacZ* 遺伝子と連結し、*amyE* 座に挿入した (Fig.)。 *sigY* の各領域は、Table 2 に示したプライマーペア SU/SD2, SU/SD1, F09U/SD2, F10U/SD2, F11U/SD2, F12U/SD2 で 168 株の DNA を鋳型として増幅した。PCR 産物には、それぞれ両端に *XbaI* と *BamHI* サイトがあり、これら 2 つの酵素で処理した。プラスミド pCRE-TEST2¹⁹⁾ も同様に *XbaI* と *BamHI* で処理し、結合した。結合したプラスミドを大腸菌 DH5 α 株に形質転換し、50 μ g/ml アンピシリンを含

枯草菌の *sigY* オペロンの構成と発現

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this work.

Strain or plasmid	Genotype or description	Source
Strain		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>susE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	15
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gryA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lac^s lacZ ΔM15]</i>	15
C600	<i>supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	15
<i>B. subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	16
ASK431	<i>trpC2 yxlC::pMUTINΔlacZ (Pspac-yxlC-D-E-F-G)</i>	This work
ASK432	<i>trpC2 yxlD::pMUTINΔlacZ (Pspac-yxlD-E-F-G)</i>	This work
ASK433	<i>trpC2 yxlE::pMUTINΔlacZ (Pspac-yxlE-F-G)</i>	This work
YF316(=SIGYp)	<i>trpC2 sigY::pMUTIN (Pspac-sigY-yxlC-D-E-F-G)</i>	This work
YF316 (=SIGYd)	<i>trpC2 sigY::pMUTIN</i>	16
YXLHd	<i>trpC2 yxlH::pMUTIN</i>	16
FU355	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY (-181/+568)-lacZ]</i>	This work
FU356	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY' (-181/+49)-lacZ]</i>	This work
ASK201	<i>trpC2 spo0H::erm</i>	17
ASK202	<i>trpC2 spoIIAC::kan</i>	17
ASK203	<i>trpC2 spoIIIGAB::kan</i>	17
ASK204	<i>trpC2 spoIIIG::kan</i>	17
ASK205	<i>trpC2 spoIVCB::erm</i>	17
FU357	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY (-181/+568)-lacZ] spo0H::erm</i>	This work
FU358	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY (-181/+568)-lacZ] spoIIAC::kan</i>	This work
FU359	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY (-181/+568)-lacZ] spoIIIGAB::kan</i>	This work
FU360	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY (-181/+568)-lacZ] spoIIIG::kan</i>	This work
FU361	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY (-181/+568)-lacZ] spoIVCB::erm</i>	This work
FU409	<i>trpC2 amyE::[cat ΔPsigY-sigY (-4/+568)-lacZ]</i>	This work
FU410	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY (-12/+568)-lacZ]</i>	This work
FU411	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY (-39/+568)-lacZ]</i>	This work
FU412	<i>trpC2 amyE::[cat PsigY-sigY (-55/+568)-lacZ]</i>	This work
ASK450	<i>trpC2 ΔPsigY-yxlC-D-E-F-G::erm amyE::[cat PsigY-sigY' (-181/+49)-lacZ]</i>	This work
Plasmid		
pMUTIN	<i>Em' lacI Pspac lacZ</i>	18
pMUTIN Δ lacZ	<i>Em' lacI Pspac</i>	This work
pCRE-test2	<i>Cm' lacZ 'amyE amyE'</i>	19
pDG148	<i>Km' lacI Pspac</i>	20
pDG148-sigY	<i>pDG148 carrying Pspac sigY (+8/+568)</i>	This work
pDG148-(sigY-yxlC)	<i>pDG148 carrying Pspac sigY-yxlC (+8/+890)</i>	This work
pDG148-(sigY-yxlC-D)	<i>pDG148 carrying Pspac sigY-yxlC-D (+8/+1096)</i>	This work
pDG148-(sigY-yxlC-D-E)	<i>pDG148 carrying Pspac sigY-yxlC-D-E (+8/+1271)</i>	This work
pMUTIN-yxlH	<i>pMUTIN carrying part of yxlH used for construction of strain YXLHd.</i>	16

ひ Luria-Bertani (LB) 寒天培地¹⁵⁾で選択した。プラスミドの挿入配列をシーケンスで確認後、プラスミドを *Pst*I で消化し直線化して枯草菌 168 株に形質転換し、5 μ g/ml クロラムフェニコールを含む tryptose blood agar base (Difco) に 10 mM グルコースを加えた寒天培地 (TBAGB) で選択した。

ASK450 株は、*sigY* オペロン [*PsigY-sigY-yxlC-D-E-F-G::erm*] が欠失し、*[PsigY (sigY promoter)-sigY (-181/+49)-lacZ]* が *amyE* 座に挿入された株であり、次のように構築した。まず、*sigY* 上流と *yxlG* 下流を各々増幅させるプライマーペア (YuU/YuD, GdU/GdD; Table 2) と 168 株の DNA を鋳型に用いて増幅した。次に、プラスミド pMUTIN¹⁸⁾ にコードされているエリスロマイシン耐性遺伝子 (*erm*) を増幅するプライマーペア EmU/EmD (Table 2) で、YF316 株の DNA を鋳型に用いて PCR で増幅した。これら 3 つの PCR 産物を混ぜて PCR²¹⁾ し *sigY* 上流、エリスロマイシン耐性遺伝子、*yxlG* 下流を 1 つの PCR 産物にしようとしたが、うまくいかず 2 つずつ混ぜて PCR を行い連結した。出来た PCR 産物を用いて FU356 株 [*PsigY (sigY promoter)-sigY' (-181/+49)-lacZ*] を形質転換し、0.3 μ g/ml エリスロマイシンを含む TBAGB 寒天培地で選択した。FU356 株からの

Table 2. Oligonucleotides used in this work.

Name	Sequence ^a
SU	5'-AGTCGCTAG <u>TCTAGATGCATCGTCC</u> ATATT-3'
F09U	5'-AGTCGCTAG <u>TCTAGAAAGGCAGAAAA</u> CAAAAA-3'
F10U	5'-AGTCGCTAG <u>TCTAGACGTCTCATAAGGCAGAAA</u> -3'
F11U	5'-AGTCGCTAG <u>TCTAGAAAAGATGAAACGCTTTTGA</u> -3'
F12U	5'-AGTCGCTAG <u>TCTAGATGAAAAGAATTGTA</u> AAAA-3'
SD1	5'-CATGGTGGCGGAT <u>CCCTTATTC</u> TGTGTATCCAA-3'
SD2	5'-TTAGATCGCGGAT <u>CCCTTATTC</u> CATCATCCCACTC-3'
EmU	5'-CTTAAGAGTGTGTTGATAGTGC
EmD	5'-CTAGGGACCTCTTTAGCTCC
YuU	5'-GCCACTAGGAAAATTGGCAG
YuD	5'-TTTTAAGATACTGCACTATCAACACACTCTTAAGGCCATTGACAGATCAGGC
GdU	5'-CAGCTTCCAAGGAGCTAAAGAGGTCCCTAGGCTATTAATTGATCATGTTACG
GdD	5'-CATTTAGGGAGGCAGGTTCC
PEU	5'-ATGCATATTAGCCCCGAACC-3'
PED	5'-AGTGATAGTGGAAAAGGGCTG-3'
NU	5'-AAACGACGAGGCGTTTACAG-3'
ND	5'-CCCACTCCTTTCTGATTTGC-3'
SP6-F	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATACGTGTGGAATTGTGAGCGG-3'
T7-R	5'-TAATACCACTCACTATAGGGCGAAGTGTATCAACAAGCTGG-3'
UY	5'-ATTCTACATCGCGTCGACACAAAAAAGGGGGGATCAC-3'
DY	5'-GTTTGACCCG <u>FAGCATGC</u> TTATTCATCATCCCACTC-3'
UY1	5'-GTCGTCGACACAAAAAAGGGGGGATCAC-3'
DC	5'-GCAGCATGCTGTTTGTGTTCATCCGCG-3'
DD	5'-GCAGCATGCCCAAGAAATATTCATTGC-3'
DE	5'-GCAGCATGCTTACCTTTGCTTTCTGC-3'
A1U	5'-GAAGAATTCCAGCAAATCAGAAAAGGAG-3'
A1D	5'-GGAGGATCCCTTGAAGAAGTTTTTTCTGTATTC-3'
A2U	5'-AAGAAGCTTGGCAATGCGAGGTGAAAC-3'
A2D	5'-GGAGGATCCGACAATCCCCCAAAC-3'
A3U	5'-AAGAAGCTTAGGCCGGATCGGAAGA-3'
A3D	5'-GGAGGATCCACTTTGGCCCGTTC-3'

^aThe underlined sequences are the sites for restriction enzymes used for cloning of the resulting PCR products.

sigY オペロンの欠失を PCR とシーケンシングで確認した。

Fig. 1に示した、pDG148-*sigY*, pDG148-(*sigY-yx1C*), pDG148-(*sigY-yx1C-D*), pDG148-(*sigY-yx1C-D-E*) は、各々 *sigY* オペロンの各遺伝子を含み、それらの発現が、*Pspac*によって支配されている。各々のクローン化した領域は、Table. 2に示したUY/DY, UY1/DC, UY1/DD, UY1/DEのプライマーペアと168株のDNAを鋳型に用いてPCRで増幅した。このPCR産物を *Sa*IIと *Sph*Iで処理し、同様に処理したプラスミドpDG148²⁰と連結させた。この連結させたDNAで大腸菌C600を形質転換し、アンピシリン耐性で選択した。クローン化した *sigY* オペロン領域は、シーケンシングで確認を行った。得られた各々のプラスミドを枯草菌ASK450株に形質転換し、10μg/ml カナマイシン存在下で選択した。pMUTINA *lacZ*を作成するためにpMUTIN2を *Cla*Iと *Sac*Iで消化し、付着末端をT4 DNA Polymeraseで平滑末端化し自己結合した。ASK431, ASK432, ASK433株の構築は、Yoshida¹⁶の方法に従った。すなわち、pMUTINA *lacZ*にそれぞれ *yx1C*, *D*, *E*をクローン化し、形質転換することにより、*yx1C-D-E-F-G*, *yx1D-E-F-G*, *yx1E-F-G*を各々 *Pspac*制御下においた株である。pMUTINA *lacZ*への挿入断片は、それぞれA1U/A1D, A2U/A2D, A3U/A3Dのプライマーペア (Table 2)でPCRを用いて増幅し、*Eco*RIもしくは *Hind*IIIと *Bam*HIで消化して連結した。出来たプラスミドを168株に形質転換し、標的遺伝子と一回交叉で組換えた。選択には、1 mM イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) と 0.3 μg/ml エリスロマイシンを含む

枯草菌の *sigY* オペロンの構成と発現

むTBABG寒天培地を用いた。

FU357, FU358, FU359, FU360, FU361株は、ASK201, ASK202, ASK203, ASK204, ASK205株からDNAを抽出し、FU355株を形質転換をすることで作成した。これらの株は、*PsigY-sigY* (-181/+568)-*lacZ*を含み、孢子形成に必須な σ 因子が、それぞれ破壊されている。これらの株の選択には、5 μ g/mlクロラムフェニコールと0.3 μ g/ml エリスロマイシンもしくは10 μ g/mlカナマイシンを含むTBABG寒天培地を使用した。

培養と β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)アッセイ 枯草菌を前培養としてTBABG寒天培地に必要な抗生物質を添加し、一晚30°Cで培養した。本培養としてNSMP²²⁾とMM培地¹⁶⁾50mlにそれぞれに50 μ g/mlトリプトファンを添加し、37°Cで培養した。窒素源飢餓を引き起こすために、MM培地中のグルタミンを0.02%に減らした。 β -Galアッセイは、Yoshidaの方法¹⁶⁾に従った。

各*sigY*オペロン領域をクローン化したpDG148を持つ枯草菌をLB培地で培養を行った。そして、対数増殖期に入った [optical density at 600 nm (OD₆₀₀) = 0.2] ところで、培地を2つに分け一方には、最終濃度が1 mMになるようにIPTGを添加して1時間培養を行った。 β -Galアッセイは、前述の通り行った。

DNA マイクロアレイ解析 枯草菌からの RNA の単離については Yoshida の方法²³⁾に従った。cDNA への蛍光標識の方法は Ogura の方法²⁴⁾に従った。ハイブリダイゼーションとマイクロアレイ解析は、従来の方法²⁵⁾に従った。

ノザン解析およびプライマー伸長法 RNAの抽出と精製は、前述の通り行った。ノザン解析のグリオキサールゲルでの電気泳動、Hybond-N膜(Amersham)へのプロテイングは、Sambrookの方法¹⁵⁾に従った。*sigY*転写産物を確認するために、NU/NDのプライマーペア(Table 2)と168株のDNAを鋳型に増幅し、BcaBEST labeling kit(TaKaRa)と[⁻³²P]dC_P(Amersham)で標識した。ハイブリダイゼーションは、Sambrookの方法¹⁵⁾に従った。*sigY*転写産物が、*yx1H*まで及んでいたため、その転写方向を確認するためにsenseとanti-sense RNAプローブ(S-*yx1H*とA-*yx1H*)を作成した。その方法は、Table 2に示したプライマーペア(SP6-F/T7-R)で、YXLd株¹⁶⁾の構築の際に作成したpMUTIN-*yx1H*のプラスミドDNAを鋳型に使用し、増幅した。その際、両端にそれぞれSP6およびT7 RNA polymerase プロモーター配列が、付加する。そして、PCR産物を鋳型にして、SP6およびT7 RNA polymeraseを用いて*in vitro*の転写を行いdigoxigenin(DIG)で標識されたRNAプローブ(S-*yx1H*とA-*yx1H*)を得た¹⁷⁾。ハイブリダイゼーションの後、DIG luminescence detection kit (Poche Diagnostics)を用いて*sigY*転写産物を検出した。

プライマー伸長法は、Yoshida²⁶⁾の方法に従った。+96~+116のプライマーPED(Fig. 2とTable 2)の5'末端を[⁻³²P]ATPとMegalabel kit(Takara Shuzou)を用いて標識した後、逆転写に用いた。シーケンスラダーの作成には、Table. 2に示したプライマーペアPEU/PEDと168株のDNAを鋳型に増幅した断片と標識したプライマーPEDを用いた。

結果

***sigY* 破壊による表現型および *sigY* 発現の制御** 当研究室は、日本とヨーロッパの国際プロジェクトThe

functional analysis of project in Japan and Europe'に参画し、*sigY* 遺伝子を含む *gntZ-ywaA* 領域 125 遺伝子について pMUTIN プラスミド^{16, 18)}を用いた破壊株の作成(*sigY* 破壊株、YF315 を含む)を行った。さらに、作成した株を用いて炭素源代謝、孢子形成、運動性について分析を行った。約半数の破壊株が、野生株 168 株と比較して何らかの表現型の変化を示したが、YF315 株は、はっきりとした表現型の変化を示さなかった。これらの結果は、Japan Functional Analysis Network for *B. subtilis* [JAFAN (<http://bacillus.genome.ad.jp/>)]において公開している。

最近報告されたように¹³⁾ *sigY* オペロンも自身の産物である σ^Y によって制御されている。さらに、詳しく *sigY* の発現を検討するために、FU355 および FU356 株を作成した。これらの株には、それぞれ *amyE* 座に *PsigY-sigY-lacZ* および *PsigY-lacZ* が挿入されている (Fig. 2)。この2種の株を NSMP 培地²²⁾で培養し、孢子形成テスト、 β -Gal アッセイを行った (Fig. 3)。FU355 株を用いた結果、対数増殖期の解糖から糖新生へ切り替わる場所で多少活性の増加があった。また、T5 期 (対数増殖期から定常期へ移行した時間を T0 とする) から劇的に増加した。その時期は、耐熱孢子形成された時期と一致した。また、FU356 株では、 β -Gal の活性は、わずかではあるが明らかに T5 期から増加していた。これらの結果は、 σ^Y による正のオート制御だけでなく、孢子形成にも依存している可能性を示唆した。FU356 株に本来ある *sigY* 遺伝子は、T5 期からの高い β -Gal 活性が無いことから、あまり発現していないと思われた。このように、*sigY* の低発現は、何か別の負の制御因子の存在を示唆した。

FU355 (*PsigY-sigY-lacZ*) 株での *sigY* 発現は、T5 期 (耐熱孢子的現れ始めた) から劇的に増加した (Fig. 3)。そこで、野生株と YF316 株 (*sigY::pMUTIN*) で、NSMP を用いて孢子形成テストを行った。その結果、T8 期でそれぞれ 94%、34% 標準偏差 15%、18% という結果になった。

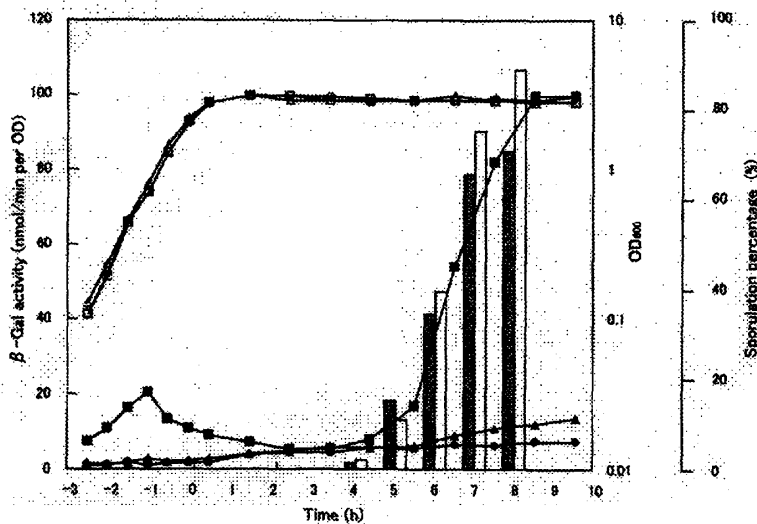


Fig. 3. Expression of *sigY* during growth and sporulation. Cells of strains 168 (wild-type) (circles), FU355 (*PsigY-sigY-lacZ*) (squares), and FU356 (*PsigY-lacZ*) (triangles) were grown and sporulated in NSMP medium (22), and OD₆₀₀ (open symbols) and β -Gal synthesis (closed symbols) were monitored. The β -Gal assay was performed as described in the text. The heat-resistant spore formation by strains FU355 (open bars) and FU356 (grey bars) was also examined.

枯草菌の *sigY* オペロンの構成と発現

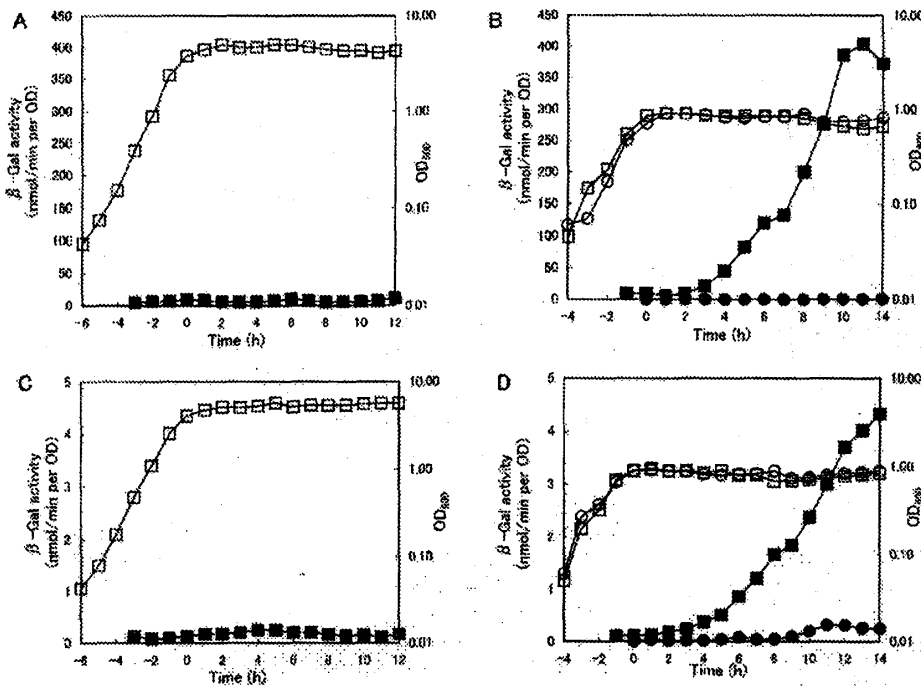


Fig. 4. Induction of *sigY* upon nitrogen starvation. Cells of strains FU355 (*PsigY-sigY-lacZ*) (A, B) and FU356 (*PsigY-lacZ*) (C, D) (squares) were grown in MM medium (16), the nitrogen source in which was 0.2% (A, C) or 0.02% (B, D) glutamine. The cells suffered from nitrogen starvation after the growth on 0.02% glutamine had reached approximately $OD_{600} = 1$. Cells of strain 168 (circles) were also grown in MM medium containing 0.02% glutamine (B, D). β -Gal was assayed as described in the text. Open and closed symbols denote OD_{600} and β -Gal activity, respectively.

σ^Y による *sigY* 発現の正のオート制御および *YxlD* による負の制御 *sigY* オペロンが、*sigY* 遺伝子の産物である σ^Y によって正に制御され、下流の遺伝子産物によって負に制御される。この仮説を検討するために、*PsigY-sigY* を備え *sigY* 遺伝子下流の遺伝子群を *amyE* 座に挿入した株を構築した。しかし、いくつかの試みにもかかわらず未知の理由のためにこれらを構築することが出来なかった。さらに、*yx1C*, *D* それぞれの pMUTIN を用いた破壊株の構築も出来なかった。

そこで、*sigY* 下流に負の制御因子があることを確かめるために、プラスミド pDG-148 に *sigY*, *sigY-yx1C*, *sigY-yx1C-D*, *sigY-yx1C-D-E* をクローン化し、*Pspac* の制御下に置いた。これらプラスミドを ASK450 株に形質転換した。

Table 3. *lacZ* expression driven from the *sigY* promoter upon induction of *sigY* and its downstream genes. Cells of strain ASK450 bearing each plasmid were incubated for 1 h with and without IPTG, and then β -Gal assaying was performed, as described in the text.

Plasmid ^a	IPTG addition	β -Gal activity (nmol/min per OD)
pDG148- <i>sigY</i>	+	147.1
	-	21.3
pDG148-(<i>sigY-yx1C</i>)	+	116.8
	-	19.8
pDG148-(<i>sigY-yx1C-D</i>)	+	0.15
	-	0.10
pDG148-(<i>sigY-yx1C-D-E</i>)	+	0.10
	-	0.13
pDG148	+	0.09
	-	0.12

^aThe copy number of each plasmid in the cells was roughly determined by means of agarose gel electrophoresis, which indicated that it did not significantly vary under the experimental conditions adopted.

(ASK450 株は、*sigY* から *yx1G* までの領域が欠失しており、²¹⁾ *amyE* 座に *PsigY-lacZ* を持つ)。そして、構築株を対数増殖期まで培養し、IPTG を添加したものと添加しなかったものと 2 分し、一時間培養し、 β -Gal の活性を測定した (Table 3)。その結果、*sigY* のみをクローン化したものでは、かなり高い活性が観察されたので σ^Y が *sigY* の正のオート制御を行っていることが分かった。さらに、*yx1C* までのものでは、*sigY* のみのものと比べて 79.4% と高い活性を示すので、*YxlC* は負の制御因子では無いと思われた。しかしながら、pDG148-(*sigY-yx1C-D*) と

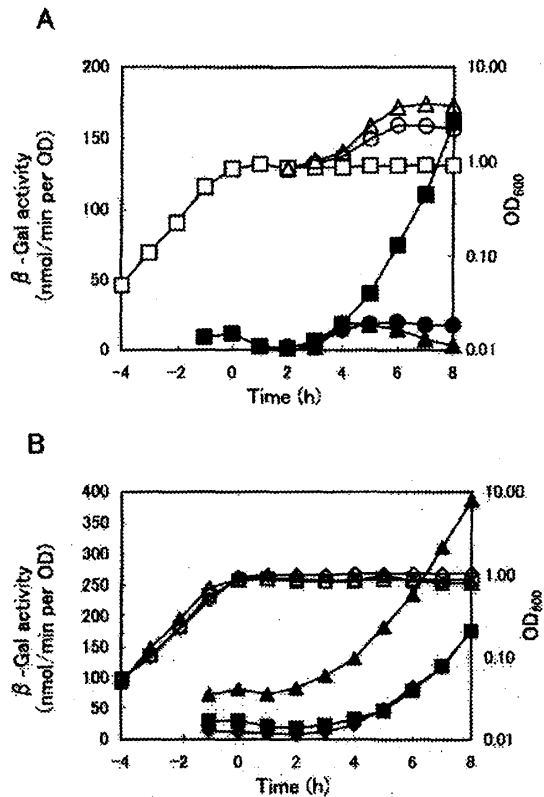


Fig. 5. Characterization of *sigY* induction upon nitrogen starvation. (A) Suppression of *sigY* induction on the addition of a nitrogen source. Cells of strain FU355 (*PsigY-sigY-lacZ*) were grown and subjected to nitrogen starvation in MM medium (0.02% glutamine). The culture was divided into three portions at T2, to which nothing (squares), and 5 mM glutamine (triangles) or ammonium chloride (circles) was added, respectively. (B). No effect of *spoOH::erm* and *spoIIIGAB::kan* on *sigY* induction upon nitrogen starvation. Cells of strains FU355 (*spo⁺*) (squares), FU357 (*spoOH::erm*) (triangles), and FU359 (*spoIIIGAB::kan*) (diamonds) were grown and subjected to nitrogen starvation in MM medium (0.02% glutamine). β-Gal was assayed as described in the text. Open and closed symbols denote OD₆₀₀ and β-Gal activity, respectively.

IPTGを添加したものと添加しなかったもので培養し生育を検討した。IPTG存在の有無に関係なくすべての株は、LB液体培地において168株と同様の生育をした(結果省略)。しかしながら、ASK431とASK432株は、IPTG

pDG148-(*sigY-yx1C-D-E*) では、IPTG添加で活性が無くなることからYx1Dが、*sigY*の負の制御因子であることが分かった。Yx1Eは、Yx1Dまでで十分な負の制御が見られるので、負の制御因子ではない。Yx1Cが存在する時のみYx1Dが負の制御因子として働くという可能性を排除しなかった。FU356 (*PsigY-lacZ*) 株は、FU355 (*PsigY-sigY-lacZ*) 株 (Fig. 3) のような孢子形成期での高い活性を示さなかった。このことは、FU356株では、*sigY*遺伝子がゲノム中に一つしかないため負の制御が働いたためと思われ、今までの結果と一致した。

σ^M の負の制御因子であるアンチ σ 因子は、 σ^M によって発現するYhdLとYhdMで構成されると推測されるおり、両者共、栄養培地での増殖に必須である¹¹⁾。Yx1Dについては、 σ^Y の負の制御因子である事が分かった。本研究では、*yx1C*と*yx1D*をプラスミドpMUTINを用いて破壊することが出来なかったが、*sigY*と*yx1E*については、破壊することが出来た。そこで、*yx1C*と*yx1D*が生育に必須な遺伝子であることを確かめるためにASK431, ASK432, ASK433株を構築した。これらの株は、各々 *yx1C-D-E-F-G*, *yx1D-E-F-G*, *yx1E-F-G*が、*Pspac*制御下に置かれている。構築した株をYF316株 (*sigY::pMUTIN*) と共にLB培地に1 mM

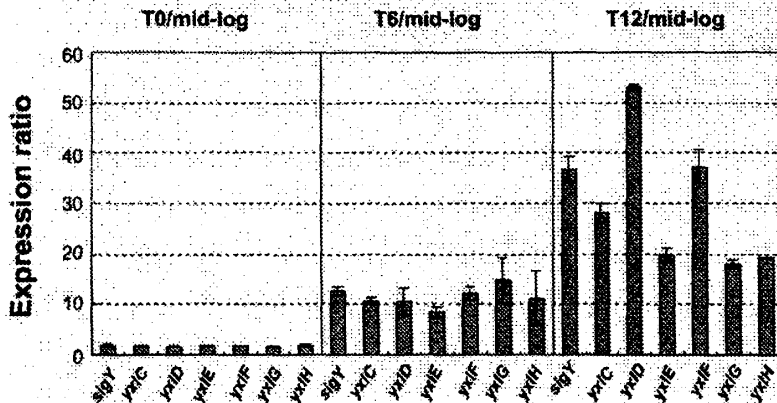


Fig. 6. DNA microarray analysis of the induction of the *sigY* operon. Total RNAs were prepared from strain 168 cells harvested 2 h before T0 (mid-logarithmic phase (mid-log)), and T0, T6, and T12. DNA microarray analysis was performed as described in the text. The gene expression intensities (Cy5) obtained with RNAs from the cells at T0, T6, and T12 were divided by those at the mid-logarithmic phase, which yielded the expression ratios, T0/mid-log, T6/mid-log, and T12/mid-log, respectively. The expression ratio for each gene was taken as the average of two values obtained for duplicate expression profiles, the standard deviation of which is also shown.

枯草菌の *sigY* オペロンの構成と発現

の存在しないLB平板培地においてほとんど生育しなかったが、YF316とASK433株は普通に生育した。しかし、LB平板培地に1 mM IPTGを添加した時は、全ての株が正常に生育した(結果省略)。ASK431とASK432株は、LB液体培地では、普通の生育をするが、LB平板培地では生育できない。これらの結果は、*sigY*が無傷で存在した時、*yx1C*と*yx1D*が、LB平板培地で生育するのに必要な遺伝子であることを示唆した。さらに、このことは、*yx1C*と*yx1D*がプラスミドを用いて破壊できない理由となった。

窒素飢餓による *sigY* の誘導 孢子形成に依存した発現を検討するために、 β -Galアッセイで*sigY*の発現が、強く観察できるFU355 (*PsigY-sigY-lacZ*)株を使用して、MM固体培地からいろいろな栄養源を減らした。その結果、窒素源を減らした時、*sigY*が誘導される結果を得た(結果省略)。Fig. 4AとBから、MM培地では、FU355株はOD₆₀₀=5まで生育するが、グルタミンを0.02%にするとOD=1までしか生育しなくなり、窒素飢餓になる。MM培地で培養した時、T12期まで追跡したが、 β -Gal活性の増加は見られなかった(Fig. 4A)。MM培地からグルタミンの濃度を0.2%から0.02%にした時は、T3期から急速に β -Gal活性が出始めた(Fig. 4B)。このことは、*sigY*が窒素飢餓によって誘導されることを示唆した。T2期に窒素源としてグルタミンやアンモニアを添

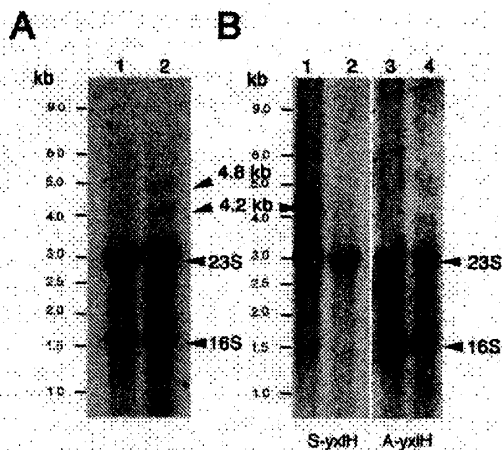


Fig. 7. Northern analysis of the *sigY* transcript. (A) RNA samples prepared from strain 168 cells harvested at T1 (lane 1) and T6 (lane 2) after nitrogen starvation were subjected to Northern analysis using a *sigY*-specific ³²P-labeled DNA probe, as described in the text. Each lane contained 5 μ g RNA. The positions of size markers are indicated on the left. Two arrowheads indicate the 4.2- and 4.8-kb *sigY* transcripts, respectively. The two dense bands denoted as 23S and 16S resulted from unspecific hybridization of the probe to abundant 23S and 16S rRNAs. (B) RNA samples prepared from strain 168 cells bearing plasmid pDG148-*sigY* grown to the mid-logarithmic phase with 1 mM IPTG (lanes 1 and 3) and without IPTG (lanes 2 and 4) were subjected to Northern analysis using two kinds of *yxH*-specific DIG-labeled RNA probes [S-*yxIH* (lanes 1 and 2) and A-*yxIH* (lanes 3 and 4) carrying sense and anti-sense RNA sequences, respectively], as described in the text. Each lane contained 15 μ g RNA. The same size markers as for Northern analysis (A) were used, and the arrowhead indicates the 4.2-kb transcript covering from *sigY* to convergent *yxIH*.

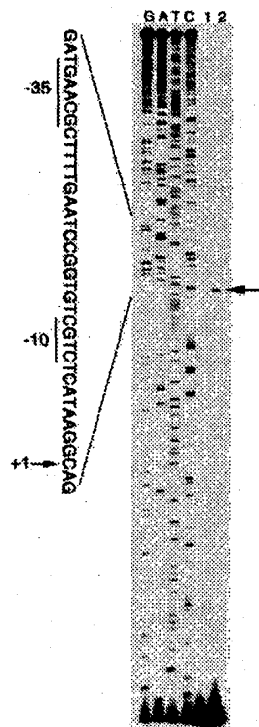


Fig. 8. Primer extension analysis to identify the 5'-end of the *sigY* transcript. RNA samples prepared from strain 168 harvested at T1 (lane 1) and T6 (lane 2) after nitrogen starvation were subjected to primer extension analysis using the primer (Table 2; PED) ³²P-labeled at its 5' end. The arrow indicates the position of the reverse transcript. Lanes G, A, T, and C contained the products of the respective dideoxy sequencing reactions performed with the same labeled primer, using the PCR product amplified with a primer pair (PEU/PED) as a template. The part of the nucleotide sequence of the noncoding strand corresponding to the ladder is shown with the "-35" and "-10" regions of *PsigY*, which were deduced from the location of the 5'-end of the *sigY* transcript determined on this analysis (+1) and the results of deletion analysis of the *sigY* promoter region (Fig. 9).

加すると、生育は回復し、 β -Gal活性は急激に低下した(Fig. 5A)。このことから、*sigY*が窒素飢餓により誘導されることを示唆した。FU356 (*PsigY-lacZ*) 株についても同様に窒素源過剰条件と飢餓条件で、 β -Galの活性を追跡すると、窒素源飢餓条件でのみT3期からの発現の上昇が見られるが、発現量自体はFU355株に比べて100倍低い値を示した(Fig. 4CとD)。この発現量の差は、NSMP培地の孢子形成期に観察されたものほとんど同じだった(Fig. 3)。したがって、NSMP培地でT5期からの活性の上昇は、培地中の窒素源の枯渇によって誘導されたのかもしれない。

sigYの誘導は、孢子形成とは関係ない 先に述べたように、*sigY*遺伝子の破壊は、NSMP培地中の孢子形成に若干影響を与えた。168株を窒素源飢餓にした時、孢子形成率は、NSMP培地のT8期と比べて10倍低かった。この孢子形成率は、*sigY*破壊株であるYF316株を使うことにより、30倍程度低くなった。しかしながら、YF316

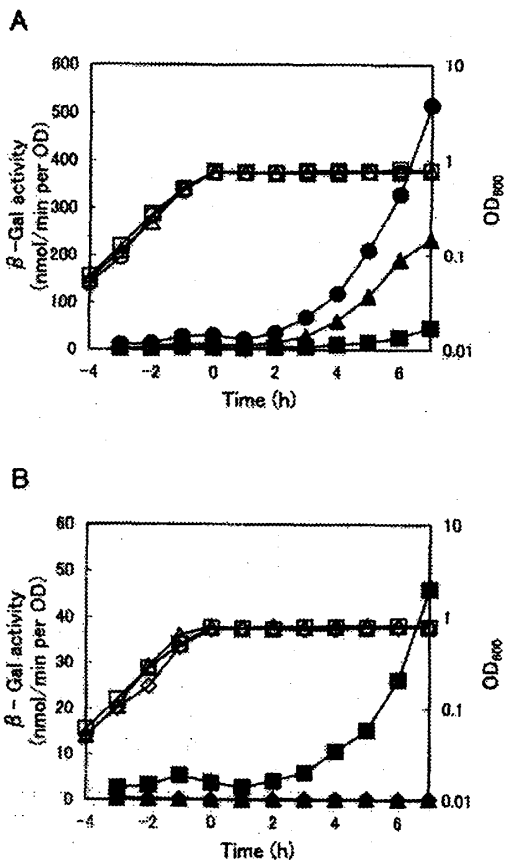


Fig. 9. Deletion analysis of the *sigY* promoter region. The structures of the strains used are given in Fig. 2. OD₆₀₀ (open symbols) and β -Gal activity in the cells (closed symbols) were monitored during growth and nitrogen starvation. The β -Gal assay was performed as described in the text. (A) Cells of strains FU412 [*PsigY-sigY* (-55/+568), circles], FU355 [*PsigY-sigY* (-181/+568), triangles], and FU411 [*PsigY-sigY* (-39/+568), squares] were grown on 0.02% glutamine and subjected to nitrogen starvation. A large scale is adopted for the vertical axis. (B) Cells of strain FU411 (squares), FU409 [Δ *PsigY-sigY* (-4/+568), diamonds], and FU410 [*PsigY-sigY* (-12/+568), triangles] were grown and subjected to nitrogen starvation. A fine scale is adopted for vertical axis.

株を20時間窒素飢餓で培養した場合、その差は、見られなくなった(結果省略)。窒素飢餓における*sigY*遺伝子の発現が、孢子形成との関係を検討するために、FU357, FU358, FU359, FU360, FU361株を構築した。これらの株は、FU355株の孢子形成に必須 σ 因子 σ^H , σ^F , σ^E , σ^G , σ^K が、それぞれ破壊されている。Fig. 5Bから、FU359 [*spoII GAB (sigE)::kan PsigY-sigY-lacZ*]株は、FU355 (*PsigY-sigY-lacZ*)株同様に窒素飢餓でT3期からの活性の上昇が見られた。FU357 (*spoOH::erm PsigY-sigY-lacZ*)株についても同様に、T3期からの活性の上昇が見られたが、その発現量は、FU355株やFU359株より高かった(Fig. 5B)。さらに、FU358, FU360, FU361株については、FU355株と同様の発現量を示した(結果省略)。これらの結果は、窒素飢餓における*sigY*の発現上昇には、孢子形成が関与しないことを示唆した。

窒素飢餓における*sigY*オペロンの発現 Fig. 1より*sigY*オペロンは、6つの遺伝子(*sigY*, *yx1C*, *D*, *E*, *F*, *G*)から構成されると思われる³⁾。この6つの遺伝子が、窒素源飢餓により誘導される事

枯草菌の *sigY* オペロンの構成と発現

を確認するために、168株の窒素源飢餓になる前と後のサンプルを用いて、DNAマイクロアレイ解析を行った。対数増殖期、窒素飢餓条件のT0、T6、T12期の菌を集菌し、それぞれのRNAを用いて、マイクロアレイ解析を行った。解析条件は、T0/対数増殖期、T6/対数増殖期、T12/対数増殖期の3通りで行った。このDNAマイクロアレイ解析の結果は、KEGG Expression Database website (<http://www.genome.ad.jp/kegg/expression>)で公開している。Fig. 6に*sigY*オペロンを構成していると仮定した*sigY*, *yx1C*, *D*, *E*, *F*, *G* さらに、*yx1G* 下流に位置し、逆向きに転写される*yx1H*の (T0, T6, T12/対数増殖期) の発現比率を示した。期待通り、*sigY*, *yx1C*, *D*, *E*, *F*, *G*は、窒素飢餓条件でT6, T12期に誘導された。このことは、*sigY*オペロン(*sigY*, *yx1C*, *D*, *E*, *F*, *G*)が、窒素源飢餓により誘導されることを示唆した。この結果は、Fig. 4B, Dの β -Galアッセイの結果と一致していた。特に、Fig. 4DのFU356株での結果と一致していた。*yx1H*の予想していなかった窒素飢餓での発現については、次に説明する。

***sigY*オペロンの転写解析** 窒素飢餓で誘導される*sigY*遺伝子についてノザン解析を行った(Fig. 7)。RNAは、168株を窒素源飢餓のT1, T6で集菌し、RNAを抽出した。プローブには、*sigY*特異的プローブを使用した。Fig. 7Aから、T6 (lane2) で4.2 kbと4.8 kbの転写産物を検出した。同じRNAを用いてプライマー伸長法を行い、*sigY*転写産物の5'末端を決定した(Fig. 8)。これより、*sigY*の転写は、翻訳開始点の31bp上流より開始されることが示唆された。この*sigY*転写開始点から生じる*yx1H*までの転写産物は4133bpと予想され、ノザン解析で検出された4.2 kbの転写産物(Fig. 7A)は、十分に*sigY*, *yx1C*, *D*, *E*, *F*, *G*, および*yx1H*を含むことが出来る(Fig. 1)。4.8 kbの産物については、*yx1H*の先頭にあるターミネーターが効かなかった為に現れたと思われた。

*sigY*転写産物に逆向きに転写された*yx1H*が含まれていることを確認するために、ノザンプロット解析に、2種の*yx1H*特異的RNAプローブ(センスプローブのS-*yx1H*, アンチセンスプローブのA-*yx1H*)を用いた。T6期のRNAを用いたノザン解析でも、*yx1H*を含む転写産物を確認できなかった(Fig. 7A)。これは、おそらくmRNAの濃度が薄かった為と思われた。したがって、以前に述べたように¹³⁾ IPTG添加でプラスミド上の σ^Y を発現させ、*sigY*オペロンと*yx1H*を発現させるために、pDG-148-*sigY*を168株に組み込みIPTG添加、無添加で培養しRNAを調製した。Fig. 7Bより、IPTGを添加し、S-*yx1H*をプローブとしたサンプル (lane1) でのみ4.2kbの転写産物が確認された。このことは、*sigY*オペロンの転写産物が、*yx1H*をも含んでいることを示した。 ρ -独立の典型的なターミネーターを*sigY*転写開始点から4066から4099地点で見出し、*sigY*オペロンのターミネーターと思われた(Fig. 1)。このことは、DNAマイクロアレイ解析に用いたDNAチップは、2本鎖のPCR産物をスポットしたので、何故逆向きの*yx1H*が、DNAマイクロアレイ解析により検出されるかを明確に説明できた(Fig. 6)²³⁾。

*sigY*オペロンの転写が、*yx1G*と*yx1H*の間で止まらずに*yx1H*まで転写することは、普通ではない。BLAST検索²⁷⁾によりYx1Hタンパク質の類似性を検索したところ、様々な微生物の薬剤の多剤排出に関与するタンパク質と類似性を持つことが分かった。また、*yx1H*領域で*sigY*オペロンと同一転写方向のopen reading frameを見出すことが出来なかった(結果省略)。*yx1H*破壊株であるYXLHd株を用いて、窒素飢餓条件で β -Galの活性を

調べた。しかしながら、窒素源飢餓条件での、 β -Galの活性の増加は、観察されなかった(結果省略)。

sigYプロモーター領域の欠失解析 プライマー伸長法により、*sigY*転写産物の5'末端を定めた(Fig. 5)。この定めた地点が、転写開始点であることを定めるために、FU355株 [*PsigY-sigY* (-181/+568)-*lacZ*]からの一連の欠失変異株の構築をした。Fig. 2と9から、FU355, FU411, FU412株では、 β -Galの活性が観察された。しかしながら、FU409とFU410株では、観察されなかった。FU412, FU411株の活性は、FU355株に比べて活性が、2倍および1/5倍になった。このことは、-181から-56と-55から-40の間に、それぞれ活性を不活性化・活性化する配列が、それぞれあると思われた。しかしながら、FU411とFU412株の活性の誘導パターンがFU355株と同じ事からこれらの配列は、窒素飢餓条件での発現に関与していないと予想された。ともあれ、FU411株で活性が観察されることから、-39から+1の間に*sigY*プロモーターが位置することを示唆した(Fig. 2と8)。

既知の σ^X および σ^Y の標的遺伝子^{5, 28)}のプロモーター領域と*sigY*上流域の-39から+1を比較したところ*sigY*プロモーターの"-10"および"-35"配列は、それぞれCGTCおよびTGAACGであることが示唆された(Fig. 2と8)。

考察

枯草菌の*sigY*オペロンは、6個の遺伝子*sigY*, *yx1C*, *D*, *E*, *F*, *G*から成り、窒素源飢餓により誘導される(Fig. 4から8)。このオペロンは、*sigY*遺伝子31塩基上流から転写が開始され、隣接する*yx1H*まで転写され、4.2kbのmRNAを生じる(Fig. 1と6から8)。Fig. 3と4とTable 3から*sigY*オペロンが窒素飢餓により誘導され σ^Y による正のオート制御を受けている事が示唆された。この σ^Y による直接的な転写は、Yx1Dタンパク質により負の制御を受けている(Fig. 3と4とTable 3)。*sigY*と*yx1H*間でのmRNAの重複から、*sigY*オペロンの*yx1H*までの転写が、*yx1H*の翻訳を阻害するかもしれない可能性が示唆された。しかしながら、窒素飢餓での*yx1H*の発現は観察できなかった。

プライマー伸長法により、*sigY*転写産物の5'末端を決定し(Fig. 8)、*sigY*プロモーター領域の欠失解析(Fig. 2と9)と σ^X , σ^Y および $\sigma^{M5, 28)}$ の標的遺伝子のプロモーター領域と*sigY*遺伝子との比較により、*sigY*プロモーターの"-10"および"-35"配列は、それぞれCGTCおよびTGAACGと推定した。興味深いことに、 σ^X , σ^Y および σ^M は、CGTCを認識することが出来る^{5, 8-11, 28-30)}。しかし、-35領域の3つの σ 因子のコンセンサス配列は、 σ^Y 認識配列とは異なるtGaAACであると思われる^{5, 8-10, 29, 30)}。ただ、*sigY*プロモーター領域は、TGとCGの間に2個のAAのみでACCのモチーフは保存されていた。

sigY オペロン(*sigY*, *yx1C*, *D*, *E*, *F*, *G*)の機能の推定と他の生物にどのように保存されているかをアミノ酸配列を元にして、BLAST2.2.3 プログラム²⁷⁾を用いて解析を行った。 σ^Y は、他のいろいろな微生物のシグマ因子と相同性があり、一番高いスコア(100)を好気性バクテリアでグラム陰性桿菌の*Thermoanaerobacter tengcongensis*のRpoE5遺伝子が示した³¹⁾。Yx1Fは、いろいろな生物のABC輸送体のATP結合タンパク質と高い相同性があり、その上位4つのスコアはそれぞれ、241, 238, 237, 198であり好アルカリ性バクテリア*Bacillus halodurans*のBH0290遺伝子²⁷⁾、好アルカリ性で耐塩性バクテリア*Oceanobacillus iheyensis*

枯草菌の *sigY* オペロンの構成と発現

の AP004596_43 遺伝子²³⁾、食品媒介病原体 *Listeria monocytogenes* の LM02227 遺伝子、*T. tengcongensis* の CcmA12 遺伝子に対するものだった。YxlC と D については、スコアが 50 を超える遺伝子が無かった。ただ、YxlD について、スコアが一番高いものは、43.5 で *T. tengcongensis* の TTE2180 遺伝子だった。YxlE の上位は、*T. tengcongensis* の TEE2181 (スコア 52)、*L. monocytogenes* の LM02228 (スコア 49)、*O. iheyensis* の AP004596_44 (スコア 45) だった。YxlG は、上位スコア (145, 121, 117, 65) で、*L. monocytogenes* の LM02226、*O. iheyensis* の AP004596_42、*B. halodurans* の BH0291、*T. tengcongensis* の TTE2183 であった。これらの結果は、*sigY* オペロンは RpoE5 オペロン (*rpoE5*, TTE2179, TTE2180, TTE2181, *ccmA12*, TTE2183) に最もよく似ていることを示した³¹⁾。さらに、*yx1E*, F, G については、*L. monocytogenes* と *O. iheyensis* のそれらと同じ順序であった。さらに、*yx1F* と *yx1G* は *B. halodurans* で隣り合わせであった。非常に過酷な環境下で生育する 3 種の生物種に於いて、*sigY* オペロンが保存されている事実は、その過酷な環境下で生育するための機能と *sigY* オペロンの機能が、関係しているのかもしれない。実際、*sigY* オペロンは、窒素飢餓 (生物にとって不適当な環境の一つ) によって誘導される (Fig. 4 から 8)。これら、4 つの生物種に保存されている *sigY* オペロンは、その構成する遺伝子が進化的に密接に関連づけられるか、それとも、それらが進化の時間の中で水平伝播されたかもしれないことを示唆した。

YxlF は、ABC 輸送システム Quentin *et al.*²³⁾ の ATP 結合タンパクとの高い相同性を示した。また、YxlF と G これらの遺伝子は、同時に転写され (Fig. 6 と 7)、ABC 輸送体を構成し抗生物質の排出に関与することを示唆した。さらに、ホモロジー検索は、*L. monocytogenes* と *O. iheyensis* に YxlF, G のみでなく YxlE も持っていることを明らかにした。さらに、順序も枯草菌と同じであったので、3 つの蛋白質 (YxlE, F, G) が ABC 輸送体を構成する可能性を示唆した。

LacZ 融合解析に於いて窒素源飢餓にしてから 3 時間後に *sigY* 発現が誘導される (Fig. 4 と 5)。*sigY* を完全に含む *PsigY-sigY-lacZ* では、LacZ 合成が 9 時間目まで増加し、*PsigY-lacZ* に比べて 100 倍高い活性を示した (Fig. 4)。このように高い *sigY* の発現は、細胞内の *sigY* 遺伝子が 2 倍になることだけで観察された。マイクロアレイ解析やノザン解析により *sigY* オペロンの発現は明確に観察することが出来たが、前述したような高い活性は、窒素飢餓条件では観察出来なかった。このことは、細胞内の *sigY* オペロンが、最大の活性を示していないことを示唆した (Fig. 6 と 7)。この弱い発現は、おそらく *sigY* オペロン発現により含まれる YxlD による負の制御の存在の為だろう (Table 3)。*sigY* オペロンは、3 種の極限環境微生物 (*T. tengcongensis*, *B. halodurans*, *O. iheyensis*) に保存されていることから、窒素飢餓より過酷な未知の環境に於いて *sigY* オペロンの発現が最大になるかもしれない。*sigY* 破壊株に於いて、窒素飢餓条件で孢子形成に影響があることから過酷な生活条件下の枯草菌の生存に関与しているかもしれない。さらに、*sigY* 遺伝子が完全な形で存在する時、*yx1C* と *yx1D* は、自然の状態である土壌に近い状態である LB 固体培地での生育に必須である。このことは、 σ^Y オペロンが、固体培地での成長に未知の生理学的役割を持っているかもしれないことを示唆する。

最近、168 株に pDG148-*sigY* を組み込み、 σ^Y を過剰発現する株を構築した。LB 培地で IPTG を添加、無添加で培養を行い、RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、17 個の σ^Y 標的遺伝子候補を推定した¹³⁾。同じ株を用いて、Difco 孢子形成培地²³⁾ を使用し IPTG を添加、無添加で培養し、マイクロアレイ解析により 10 個の

σ^Y 標的遺伝子候補を推定した。さらに、168株(野生株)と *sigY*破壊株を用いたマイクロアレイ解析により62個の σ^Y 標的遺伝子候補を推定した。新たなマイクロアレイ解析の結果は、KEGG Expression Database website (<http://www.genome.ad.jp/kegg/expression>) で公開している。しかしながら、*sigY*オペロンと偽の正の制御の *yx1H*以外の遺伝子は、この3種の候補遺伝子群で重なり合わなかった。新たな *sigY*標的遺伝子を見出せなかったが、3種のマイクロアレイ解析の結果から、標的遺伝子はかなり少数であることが予想できた。

ごく最近、Caoらにより枯草菌 *sigY*オペロンに関する論文が発表された³⁷⁾。その中で、*sigY*オペロンの負の制御因子が、Yx1D、Eであることが推察されている。そして、*sigY*標的遺伝子として *ybgB*が見つまっている。しかし、この研究で使用しているDNAチップには、*ybgB*がスポットされていなかった。Caoらの *sigY*の負の制御因子がYx1D、Eであるという結論は、本研究のYx1Eは *sigY*オペロンの負の制御には関与しない結果と矛盾している。さらに、本研究ではYx1Cが存在する時のみYx1Dが、*sigY*オペロンの負の制御因子である可能性を除外していない。*sigY*発現の負の制御機構については、今後の研究を要する。

文献

- 1) W.G. Haldenwang: The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.*, **59**, 1–30 (1995)
- 2) A.M. Lonetto, K.L. Brown, K.E. Rudo, and M.J. Buttner: Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 7573–7577 (1994)
- 3) F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, *et al.* : The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, **390**, 249–256 (1997)
- 4) D. Missiakas and S. Raina: The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.*, **28**, 1059–1066 (1998)
- 5) J.D. Helmann: The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.*, **46**, 47–110 (2002)
- 6) X. Huang, and J.D. Helmann, Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* σ^X factor using a consensus directed search. *J. Mol. Biol.*, **279**, 165–173 (1998)
- 7) M.S. Turner and J.D. Helmann: Mutations in multidrug efflux homologs, sugar isomerases, and antimicrobial biosynthesis genes differentially elevate activity of the σ^X and σ^W factors in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**, 5202–5210 (2001)
- 8) T. Wiegert, G. Homuth, S. Versteeg, and W. Schumann: Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* σ^W regulon. *Mol. Microbiol.*, **41**, 59–71 (2001)
- 9) M. Cao, P.A. Kobel, M.M. Morshedi, M.F. Wu, C. Paddon, and Helmann, J.D. Defining the *Bacillus subtilis* σ^W regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J. Mol. Biol.*, **316**, 443–457 (2002)
- 10) M. Cao, T. Wang, R. Ye, and J.D. Helmann: Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* σ^W and σ^M regulons. *Mol. Microbiol.*, **45**, 1267–1276 (2002)
- 11) M.J. Horsburgh, and A. Moir: σ^M , an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for

枯草菌の *sigY* オペロンの構成と発現

- growth and survival in high concentrations of salt. *Mol. Microbiol.* **32**, 41–50 (1999)
- 12) P.D. Thackray, and A. Moir: SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *J. Bacteriol.*, **185**, 3491–3498 (2003)
 - 13) K. Asai, H. Yamaguchi, C. Kang, K. Yoshida, Y. Fujita, and Y. Sadaie: DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* sigma factors of extracytoplasmic function family. *FEMS Microbiol. Lett.*, **14**, 151–160 (2003)
 - 14) T.L. Raivio, and T.J. Silhavy: Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 591–624 (2001)
 - 15) J. Sambrook, and D.W. Russell: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001)
 - 16) K. Yoshida, I. Ishio, E. Nagakawa, Y. Yamamoto, M. Yamamoto, and Y. Fujita: Systematic study of gene expression and transcription organization in the *gntZ-ywa4* region of the *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **146**, 573–579 (2000)
 - 17) K. Yoshida, Y. Fujita, and S.D. Ehrlich: Three asparagine synthetase genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**, 6081–6091 (1999)
 - 18) V. Vagner, E. Dervyn, and S.D. Ehrlich: A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **144**, 3097–3104 (1998)
 - 19) Y. Miwa, and Y. Fujita: Involvement of two distinct catabolite- responsive elements in catabolite repression of the *Bacillus subtilis* myo-inositol (*iol*) operon. *J. Bacteriol.*, **183**, 5877–5884 (2000)
 - 20) P. Stragier, C. Bonamy, and C. Karmazyn-Campelli: Processing of asporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: how morphological structure could control gene expression. *Cell*, **52**, 697–704 (1988)
 - 21) A. Wach: PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 259–265 (1996)
 - 22) Y. Fujita, and E. Freese: Isolation and properties of a *Bacillus subtilis* mutant unable to produce fructose-bisphosphatase. *J. Bacteriol.*, **145**, 760–767 (1981)
 - 23) K. Yoshida, K. Kobayashi, Y. Miwa, C. Kang, M. Matsunaga, H. Yamaguchi, S. Tojo, M. Yamamoto, R. Nishi, N. Ogasawara, T. Nakayama, and Y. Fujita: Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 683–692 (2001)
 - 24) M. Ogura, H. Yamaguchi, K. Yoshida, Y. Fujita, and T. Tanaka: DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3804–3813 (2001)
 - 25) K. Kobayashi, M. Ogura, H. Yamaguchi, K. Yoshida, N. Ogasawara, T. Tanaka, and Y. Fujita: Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *J. Bacteriol.*, **183**, 7365–7370 (2001)
 - 26) K. Yoshida, D. Aoyama, I. Ishio, T. Shibayama, and Y. Fujita: Organization and transcription of the myo-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **179**, 4591–4598 (1997)
 - 27) S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389–3402 (1997)
 - 28) J. Qiu, and J.D. Helmann: The –10 region is a key promoter specificity determinant for the *Bacillus subtilis*

- extracytoplasmic- function d factors σ^X and σ^W . *J. Bacteriol.*, **183**, 1921–1927 (2001)
- 29) X. Huang, K.L. Fredrick, and J.D. Helmann: Promoter recognition by *Bacillus subtilis* σ^W : autoregulation and partial overlap with the σ^X regulon. *J. Bacteriol.*, **180**, 3765–3770 (1998)
- 30) X. Huang, A. Gaballa, M. Cao, and J.D. Helmann: Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function d factor, σ^W . *Mol. Microbiol.* **31**, 361–371 (1999)
- 31) Q. Bao, Y. Tian, W. Li, Z. Xu, Z. Xuan, S. Hu, W. Dong, J. Yang, Y. Chen, Y. Xue, Y. Xu, X. Lai, L. Huang, X. Dong, Y. Ma, L. Ling, H. Tan, R. Chen, J. Wang, J. Yu, and H. Yang: A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Res.*, **12**, 689–700 (2002)
- 32) C.F. Higgins: ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **8**, 67–113 (1992)
- 33) H. Takami, K. Nakasone, Y. Takaki, G. Maeno, R. Sasaki, N. Masui, F. Fuji, C. Hiramata, Y. Nakamura, N. Ogasawara, S. Kuhara, and K. Horikoshi: Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4317–4331 (2000)
- 34) H. Takami, Y. Takaki, and I. Uchiyama: Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3927–3935 (2002)
- 35) P. Glaser, L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, *et al.* Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, **294**, 849–852 (2001)
- 36) Y. Quentin, G. Fichant, and F. Denizot: Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *J. Mol. Biol.*, **287**, 467–484 (1999)
- 37) M. Cao, L. Salzberg, C.S. Tsai, T. Mascher, C. Bonilla, T. Wang, R.W. Ye, L. Márquez-Magaña, and J.D. Helmann: Regulation of the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function protein d^Y and its target promoters. *J. Bacteriol.*, **185**, 4883–4890 (2003)
- *****
Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (3), 1-17 (2004)

Organization and expression of the *Bacillus subtilis* sigY operon

Shigeo Tojo

Department of Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

We investigated the organization and expression of the *Bacillus subtilis* sigY operon, the first gene of which codes for σ^Y , one of the extracytoplasmic function (ECF) family of sigma factors. The sigY operon, comprising six genes (sigY, yxjC, D, E, F and G), was induced upon nitrogen starvation; it was continuously transcribed from the 31st base upstream of sigY to a neighboring convergent gene, yxjH, resulting in a 4.2-kb mRNA. The expression of the sigY operon was also positively autoregulated through σ^Y , suggesting that its transcription is likely to be directed by σ^Y .

枯草菌の *sigY* オペロンの構成と発現

Deletion analysis of the *sigY* promoter having been localized by primer extension revealed the promoter region of *sigY* with the "-10" and "-35" sequences of CGTC and TGAACG, respectively. The latter sequence was distinct from those recognized by σ^W , σ^X or σ^M . The σ^Y -directed transcription of *sigY* was negatively regulated by YxlC and D, implying that they might function together as anti- σ^Y . *sigY* disruption affected sporulation induced by nitrogen starvation, but *sigY* induction upon nitrogen starvation was not associated with the sporulation process. The organization and function of the *sigY* operon were significantly conserved in several microorganisms living in adverse living environments.

Key words: *Bacillus subtilis*, extracytoplasmic function, negative regulation, nitrogen starvation, positive autoregulation, sigma factor, *sigY* operon, sporulation, transcription