

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

松岡 浩史

枯草菌の脂肪酸分解に関わる YsiA レギュロンの構成と機能を研究した。ノザン解析およびプライマー伸長解析により、このレギュロンが 5 オペロン (*lcfA-ysiA-B-etfB-A*, *ykuF-G*, *yhfL*, *yusM-L-K-J* および *ywjF-acdA-rpoE*) から構成されることを明らかにした。おそらく、YusJ と AcdA、YsiB と YusL、YusK は、それぞれアシル-CoA デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシル-CoA デヒドロゲナーゼ/エノイル-CoA ヒドラターゼ複合体、アセチル-CoA C-アシルトランスフェラーゼをコードしており、脂肪酸の β -酸化経路に直接的に関与している。加えて、LcfA と YhfL はおそらく長鎖アシル-CoA リガーゼをコードしている。精製した YsiA 蛋白質を用いたゲル移動度シフト解析およびフットプリント解析の結果、*ysiA*、*ykuF*、*yusL*、*yhfL* および *ywjF* の上流プロモーター領域内へ YsiA の結合する *cis*-配列 (YsiA-box) を同定することができた。それぞれの YsiA の DNA へ結合する平衡解離定数 (K_d) は、20、21、37、43 および 65 nM であり、YsiA 結合能は 14 から 20 炭素数の長鎖飽和アシル-CoA により特異的に抑制され、炭素数 18 のアシル-CoA がより効果的であった。長鎖飽和アシル-CoA 以外の試験では、モノ不飽和オレオイル-CoA および分岐鎖 12-メチルテトラデカノイル-CoA が最も効果的であった。これら *in vitro* での発見は、*yusJ*、*etfA* または *etfB* 破壊によりアシル-CoA 脱水素反応が止められ、細胞内に長鎖アシル-CoA が蓄積されることにより YsiA が不活性化した *in vivo* 情報の結果により裏付けられた。さらに、*yusL*、*yusK*、*yusJ*、*etfA*、*etfB* または *ykuG* の破壊は、長鎖脂肪酸を代表するパルミチン酸の資化利用に影響を及ぼした。この研究により、*ysiA*、*ysiB*、*ykuF*、*ykuG*、*yhfL*、*yusM*、*yusL*、*yusK*、*yusJ* および *ywjF* を、*fadR*、*fadB*、*fadH*、*fadG*、*lcfB*、*fadM*、*fadN*、*fadA*、*fadE* および *fadF* (*fad*: fatty acid degradation) と改名した。

キーワード：脂肪酸、アシル-CoA、 β -酸化、転写因子、資化、枯草菌

全ての生物において、脂肪酸は膜の必須成分であり、かつ重要な代謝エネルギーの供給源でもある。脂肪酸の分解と生合成経路は脂肪酸を利用可能であるかの状況に応じて ON/OFF のスイッチの切り換えが行われている。これらの経路の制御は、主にモデル微生物の大腸菌においてよく研究が進められている¹⁾。大腸菌は直鎖状の脂肪酸を生産し菌体内で FabH が選択的にアセチル-CoA を用いて脂肪酸合成を開始する^{2, 3)}。これとは対照的に、枯草菌は分岐鎖脂肪酸を主に生産し、2 種類の FabH アイソザイム (FabHA および FabHB)

〒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: +81-84-936-2023, E-mail: hmatsuok@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

が分岐鎖のアシル-CoA に対しても選択性があり、この点において大腸菌の酵素とは異なっている⁴⁾。この合成系の第二段階では FabF や FabB の縮合酵素が引き続いて脂肪酸の伸長反応を行う⁵⁾。枯草菌では FabF 蛋白質が唯一の縮合酵素であり、脂肪酸合成において次の段階の伸長反応を行う⁶⁾。細胞内で形成された、あるいは細胞外から供給された脂肪酸は、細胞が炭素源を枯渇させた場合に β -酸化によって分解される。

大腸菌では FadR 転写因子が調節スイッチとして機能し、脂肪酸 β -酸化分解に必要な機構 *fad* 遺伝子群を負に制御し、不飽和脂肪酸生合成において鍵となる酵素 [3-ケトアシル-ACP (アシルキャリアープロテイン) デヒドラターゼ (FabA) と 3-ケトアシル-ACP 合成酵素 I (FabB)] を正に制御する^{5, 7-9)}。*fad* 遺伝子群は、脂肪酸トランスポーターをコードする *fadL* と、脂肪酸-CoA リガーゼをコードする *fadD*、アシル CoA デヒドロゲナーゼをコードする *fadE*、3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ/エノイル CoA ヒドラターゼ複合体をコードする *fadB*、アセチル CoA-C-アシルトランスフェラーゼをコードする *fadA*、そして 2,4-ジエノイル CoA レダクターゼをコードする *fadH* の、脂肪酸 β 酸化に関与する一連の遺伝子群で構成される^{8,10)}。加えて、FadR はグリオキシル酸シャント酵素の負の制御因子をコードする *iclR* 遺伝子の発現を活性化し、一般的なストレス蛋白質遺伝子 (*uspA*) の発現を抑制している。この FadR レギュロンの発現は、長鎖アシル-CoA が FadR のオペレーター部位への結合を阻害する形で制御されている¹¹⁾。

枯草菌では脂肪酸の生合成と分解の経路のバランスを取るように作用する FadR のような中心的な調節因子については、これまで報告されておらず、代わりに FapR 転写制御因子についての報告が近年なされている¹²⁾。FapR は脂肪酸およびリン脂質代謝に関与する *fap* レギュロンの発現を制御し、それらの中には *fapHA*、*fapHB* および *fabF* (マロニル-ACP と分岐鎖アシル-CoA を縮合し、続いて鎖伸長反応を進める酵素がコードされる) が含まれている。FapR 蛋白質は、細胞内のマロニル-CoA の蓄積量によって制御されており、脂肪酸の生合成の状態を感知し、それに応じて *fap* レギュロンメンバーの発現を調節している。枯草菌は *lcfA*、*yhjL*、*yhjT*、*ysiB*、*yusLKJ*、*acdA*、*yhjS*、および *mmgABC* といった脂肪酸の β -酸化に関与すると思われるいくつかの遺伝子を保持している (Fig. 1) (*mmgABC* は σ^E -依存のオペロンである)¹³⁻¹⁶⁾。それにもかかわらず、大腸菌 FadR のように脂肪酸の分解を負に制御し、合成を正に制御する調節スイッチとして働く転写因子は最近まで報告されていなかった。

枯草菌ゲノムの網羅的機能解析 (<http://bacillus.genome.jp/>) の一環として数百の DNA 結合蛋白質の網羅的な DNA マイクロアレイ解析が行われた。その中で *ysiA* [HTH (ヘリックス-ターン-ヘリックス) 転写因子の 1 つをコードする] 破壊株を用いた DNA マイクロアレイ解析の結果、YsiA は少なくとも 10 個の遺伝子を負に制御しており、それらの多くは脂肪酸の β -酸化に関わるものであることが示唆された。これをもとにした最近の研究によって、*lcfA-ysiA-B-etfB-A*、*ykuF-G*、*yhjL*、*yusM-L-K-J*、および *ywjF-acdA-rpoE* オペロンからなる YsiA レギュロンの構成と機能について新たな知見が得られた。YsiA は、*lcfA* と *yusM* 以外のこれらオペロンを構成する遺伝子群を、オペロン上流域の YsiA-box に結合することによって転写を抑制し、また *etfA*、*etfB*、*ykuG*、*yusL*、*yusK*、および *yusJ* 遺伝子の破壊は、脂肪酸を唯一の炭素源とした際の生育に影響することが明らかとなった。さらに、*in vitro* と *in vivo* の実験によって、長鎖アシル-CoA がインデューサー (もしくはリガンド) として YsiA の YsiA-box への結合を阻害することが示唆された。

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

実験方法

菌株とその構築 この研究に使用した枯草菌株は、Table 1 に示す。FU788 株は小林氏 (奈良先端大) より提供され、Japan Functional Analysis Network for *B. subtilis* (JAFAN; <http://bacillus.genome.jp>) の枠組みにより、リコンビナント PCR の手法¹⁹⁾ [一回目の PCR は、鋳型として 168 株 DNA および *cat* 遺伝子²⁰⁾ を用いて *ysiA*-F1/*ysiA*-R1、*ysiA*-F2/*ysiA*-R2、および pUC-F(*cat*)/pUC-R(*cat*) (Table 2) のプライマーペアでそれぞれ PCR し、続いて鋳型として上記の 3 つの PCR 産物と *ysiA*-F1/*ysiA*-R2 プライマーペアによる PCR を行った] により調整した PCR 産物を 168 株へ形質転換することで構築した。YKUFd および YHFLd 株は、それぞれ YKUFd-H/ YKUFd-B および YHFLd-H/YHFLd-B (Table 2) のプライマーペアを用いて、以前述べたように構築した²¹⁾。

TABLE 1. 研究に使用した枯草菌株

Strain	Genotype	Reference or source
168	<i>trpC2</i>	Standard strain ¹⁸⁾
FU788	<i>ysiA::cat trpC2</i>	JAFAN* (K. Kobayashi)
LCFAd	<i>lcfA::pMUTIN trpC2</i>	JAFAN
BFS2426	<i>ysiA::pMUTIN trpC2</i>	Micado ^b
BFS2427	<i>ysiB::pMUTIN trpC2</i>	Micado
ETFAAd	<i>etfA::pMUTIN trpC2</i>	JAFAN
ETFBd	<i>etfB::pMUTIN trpC2</i>	JAFAN
YKUFd	<i>ykuF::pMUTIN trpC2</i>	JAFAN (this work)
BFS1835	<i>ykuG::pMUTIN trpC2</i>	Micado
YHFLd	<i>yhfL::pMUTIN trpC2</i>	JAFAN (this work)
BFS1341	<i>yusM::pMUTIN trpC2</i>	Micado
BFS1347	<i>yusL::pMUTIN trpC2</i>	Micado
BFS1346	<i>yusK::pMUTIN trpC2</i>	Micado
BFS1345	<i>yusJ::pMUTIN trpC2</i>	Micado
BFS1246	<i>ywjF::pMUTIN trpC2</i>	Micado
ACDAd	<i>acdA::pMUTIN trpC2</i>	JAFAN

*JAFAN, Japan Functional Analysis Network for *B. subtilis* (<http://bacillus.genome.jp>)

^b Micado, Microbial Advanced Database Organization (<http://locus.jouy.inra.fr/micado>)

DNA マイクロアレイ解析およびノザン解析 DNA マイクロアレイ解析は、以前報告したのと同様の方法で行った²²⁻²⁴⁾。RNA サンプルは、LB (Luria-Bertani) 培地²⁵⁾ で増殖させ、吸光度 600 nm (OD₆₀₀) = 0.5 の対数増殖中期で回収した 168 (野生型) 株および FU788 (*ysiA::cat*) 株の細胞から調製した。

ノザン解析において、上述と同じ RNA サンプルを、グリオキサールゲルで電気泳動させ、Hybond-N 膜 (GE Healthcare)²⁵⁾ へ転写した。ハイブリダイゼーションに用いる *ykuF*、*ykuG*、*yhfL*、*yusL*、*yusK*、*yusJ*、*ywjF*、*acdA*、*rpoE*、*lcfA*、*ysiA* および *ysiB* 断片は、各プライマーペア (NykuF-F/NykuF-R、NykuG-F/NykuG-R、Nyhfl-F/Nyhfl-R、NyusL-F/NyusL-R、NyusK-F/NyusK-R、NyusJ-F/NyusJ-R、NywjF-F/NywjF-R、NacdA-F/NacdA-R、NrpoE-F/NrpoE-R、NlcfA-F-F/NlcfA-R、NysiA-F/NysiA-R、および NysiB-F/NysiB-R ; Table 2) と鋳型としての 168 株の染色体 DNA からそれぞれ PCR により増幅させ、*BcaBEST* labeling kit (Takara Bio, Japan) と [α -32P] dCTP (GE Healthcare) を用いて標識した。ハイブリダイゼーションは、以前報告したように行い²⁵⁾、転写産物の検出は、Bio-imaging Analyzer (Fuji Photo Film Co.,Ltd) のイメージングプレートによって行った。

プライマー伸長解析 プライマー伸長解析は、以前報告したように行った²⁶⁾。全 RNA は上述のように YSIAd (*ysiA::pMUTIN*) 株および野生株から抽出し、精製した。逆転写反応はそれぞれ +122 から +141、+146 から

+165、+102 から+121、+141 から+160、および+111 から+131 (+1 は YsiA の制御するプロモーターの各々の転写開始塩基、本研究にて同定) に対応する EysiA-R、EykuF-R、EyhfL-R、EyusL-R および EywjF-R プライマー (Table 2) から始めた。それらの逆転写に用いたプライマーは、Megalabel kit (Takara Bio) と [γ -³²P]

TABLE 2. 研究で使用したプライマー

Primer	Sequence ^a
<u>ysiA disruption</u>	
ysiA-F1	GCTTGCCGCTCCGTATGAGC
ysiA-F2	CGTCGTGACTGGGAAAAC TATTGGTATCCGGAATTCAC
ysiA-R1	GTTATCCGCTCACAATTCGCTTCAATGTTCAATCGTTCC
ysiA-R2	TAGCGGCAAGTGCTTTTGC
pUC-F(cat)	GTTTTCCCAGTCAACGACG
pUC-R(cat)	GAATTGTGAGCGGATAAC
<u>YKUFd and YHFLd construction</u>	
YKUFd-H	GCCG <u>AAGCTT</u> AAGCGGCATGGGAAAAGCG
YKUFd-B	GCGCAGATCTGGCTGCAAAAAAATGTGCCG
YHFLd-H	GCCG <u>AAGCTT</u> GAAACAGCATCTGAGAAGCC
YHFLd-B	GCGCAGATCTAATCAGGCGAATTGCCAAGC
<u>ysiA cloning</u>	
YsiA-N	GGAAGGAACGATGACATATGAAAGCAA
YsiA-H	<u>GCAAGCTT</u> TCAACCGCAAGTGAAATTGC
<u>Northern analysis</u>	
NysiA-F	AAACGGCTACCACCAGTCAC
NysiA-R	AGCGCAACGAGATCGTACTT
NysiB-F	GGCCAGCAGTTAATGGAGAG
NysiB-R	GACTCAAATGCTTCCCCAAA
NyhfL-F	TCAGGAACGACTGGAAAACC
NyhfL-R	CCTGTCAAACGGGTAAAGC
NykuF-F	CTGAATTAGGGTGGCACGTT
NykuF-R	TATTTGCTCCCCATTCAAC
NykuG-F	GTCCCTTAAGAGGGCAGGTT
NykuG-R	CCCAATTGTAAGGCAAAGGA
NyusL-F	ACGTTGCCGAAATGTGTAT
NyusL-R	CGTCCCACATCTCAAAGGT
NyusK-F	TAAAGCCCTTGCAAGAGAA
NyusK-R	TCAGTTCAAACAAGCCGATG
NyusJ-F	AACTCTGCTTTTGCCGATGT
NyusJ-R	GCCGTGAAGTGGCTCATATT
NywjF-F	GAGCGGGAAAAATTGAGGAT
NywjF-R	CCTTGCCGCTCAATACTTGT
NacdA-F	CGGCGTTGCTGATATTTACA
NacdA-R	ACCATGCAGCCTGATAGGTC
NlcfA-F	CACGTTCCGTTCTGTATGA
NlcfA-R	ATTCAGGGTGATGCAAAAAGG
NrpoE-F	GGCTTTAGTTGAAATCGCTCAC
NrpoE-R	CGATCTCAAGATCATCGTCGT
<u>Primer extension, gel retardation and footprinting analyses</u>	
YHFLd-B	GCGCAGATCTAATCAGGCGAATTGCCAAGC
EysiA-F	AAGGCGTTTACTTGAAGAAG
EysiA-R	CAATTTTGGATACCTGTGAC
EyhfL-F	TGACAGTACTGACACTCAGG
EyhfL-R	TAAACCTGCATGCGATGCTG
EykuF-F	TTAGAAATTGCTTCTGGACATC
EykuF-R	TTTCTCAAGTGCCATG
EyusL-F	TTGACTTGTCGGTTTTCCGC
EyusL-R	CAGGAATTCCGATGTTAGCC
EywjF-F	CTTCATACCGGCACTCCTTT
EywjF-R	AACAAATAGACAGCGTAAGCG
PykuF-F	TCATATGAGCATGTGCTGAC
PykuF-R	CCACCTAATTCAGCCTGTT
PyusL-F	GCTATTGAAGTCGAACCGGA
PyusL-R	GCTATCCCGAACCATTAC
PywjF-R	AAGCCGCTCATTCCAATTCC

^a Underlined sequences are the sites of restriction enzymes used for strain construction.

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

ATP (GE Healthcare) を使用することにより 5'末端を標識させた。5'末端標識したプライマーから始まるジデオキシシーケンス反応に用いる鋳型は、各々のプライマーペア (Table 2; EysiA-F/EysiA-R, EykuF/EykuF-R, EyhfL/EyhfL-R, EysL-F/EysL-R, および EywjF-F/EywjF-R) と鋳型としての 168 株 DNA を用いた PCR によって調製した。

YsiA 蛋白質の生産と精製 大腸菌内で YsiA 蛋白質を生産するための *ysiA* 遺伝子領域は、プライマーペア (YsiA-N/YsiA-H, Table 2) と鋳型としての 168 株 DNA を用いた PCR によって増幅させた。その後、PCR 産物と pET-22b(+)ベクター (Novagen) をそれぞれ NdeI と HindIII 消化し、得られた断片を連結させて、大腸菌 BL21(DE3)へ形質転換した。pET-22b(+)-YsiA プラスミド内の *ysiA* 遺伝子の正確なクローニングは、ヌクレオチドシーケンシングにより確認した。

YsiA 蛋白質は、培地へ 1 mM になるようイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加することにより pET-22b(+)-YsiA を保持した大腸菌 BL21(DE3)内で過剰に発現させた。細胞は遠心分離により回収し、50 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 8.0) にて二回洗浄した。その後、細胞を 1% (W/V) グリセロールを含む 50 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 8.0) で懸濁して超音波により破碎し、遠心分離 (10,000 × g、10 分間、4 °C) によって上清を得た。その上清を陰イオン交換カラムクロマトグラフィー [TOPO-PEARL (DEAE-650M) (TOSHO CorP, Japan)] に供することで、ほぼ均一な YsiA 蛋白質まで精製した。精製した YsiA 蛋白質は、1% (W/V) グリセロールを含む 50 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 8.0) を用い、Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare) ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより 100 mM NaCl 条件下で分子量の決定を行った。

ゲル移動度シフト解析および DNase I フットプリント解析 ゲル移動度シフト解析および DNase I フットプリント解析は、以前報告したのと同様に行った²⁷⁾。ゲル移動度シフト解析において、YsiA が結合する *cis*-配列 (YsiA-box) を含む *ysiA*、*yhfL*、*ykuF*、*yusL*、および *ywjF* プロモーター領域のプロープ DNA は、それぞれ [α -³²P] dCTP (GE Healthcare) の存在下でプライマーペア (EysiA-F/EysiA-R, EyhfL-F/EyhfL-R, PykuF-F/PykuF-R, PyusL-F/PyusL-R, および EywjF-F/PywjF-R, Table 2) と 168 株 DNA から PCR により増幅させることで標識した。DNase I フットプリント解析において、各プロープ DNA は上記と同様のプライマーペアを用いた PCR 増幅により調製した。そのとき使用したプライマーは、どちらかを Megalabel kit (Takara Bio) と [γ -³²P] (GE Healthcare) を用いることにより 5'末端を標識した。

分岐長鎖アシル-CoA の化学合成 12-メチルテトラデカノイル-CoA と 13-メチルテトラデカノイル-CoA は、Seubert の方法により 12-メチルテトラデカノイル酸と 13-メチルテトラデカノイル酸 (Larodan Fine Chemicals AB) から化学的に合成した²⁸⁾。まず、分岐長鎖脂肪酸をオキザリルクロリドと共にアシルクロリド形成まで反応させ、次にアシルクロリドを CoA と共に アシル-CoA まで変換させた。生成されたアシル-CoA の量は、ガスクロマトグラフィーを用いることで決定した。

細胞増殖と β-ガラクトシダーゼ (β-Gal) 分析 YsiA レギュロンメンバーの pMUTIN²⁹⁾破壊株 (Table 1) は、0.3 μg/ml エリスロマイシンを含む tryptose blood agar base (Difco) + 10 mM グルコース (TBABG) にて 30 °C で一晚、前培養した。細胞を 1 mM IPTG を含むものと含まない 50 ml LB 培地にそれぞれ接種し、37 °C で培養した。計時的に培養液から 1 ml を回収し、細胞の β-Gal 活性を以前報告したように吸光度を用い

て測定した²¹⁾。pMUTIN 破壊株を用いた脂肪酸の利用試験は、上述のように TBABG プレートで前培養した細胞をトリプトファンを含む S6 培地³⁰⁾に懸濁し、一定量の細胞 (OD₆₀₀ × ml = 0.5) を 50 μg/ml トリプトファンと 4.35 mM パルミチン酸ナトリウムを含む S6 固形培地に広げた。37℃ でそれぞれのプレートを培養し、トリプトファンを含む S6 培地 5 ml に懸濁し、細胞の生育度を OD₆₀₀ で測定した。そして、その細胞の β-Gal 活性を前述のように測定した。

結果

DNA マイクロアレイ解析により検出された YsiA の制御する遺伝子候補

YsiA 蛋白質は、Pfam³¹⁾で区分される細菌の HTH 転写制御蛋白質の TetR ファミリーのメンバーである。Japan Functional Analysis Network for *B. subtilis* の枠組みの中で、YsiA に制御される遺伝子の候補を見つけるため、DNA マイクロアレイ解析を遂行した。ysiA 破壊株 (FU788 株) とその親の 168 野生株の細胞から得られた

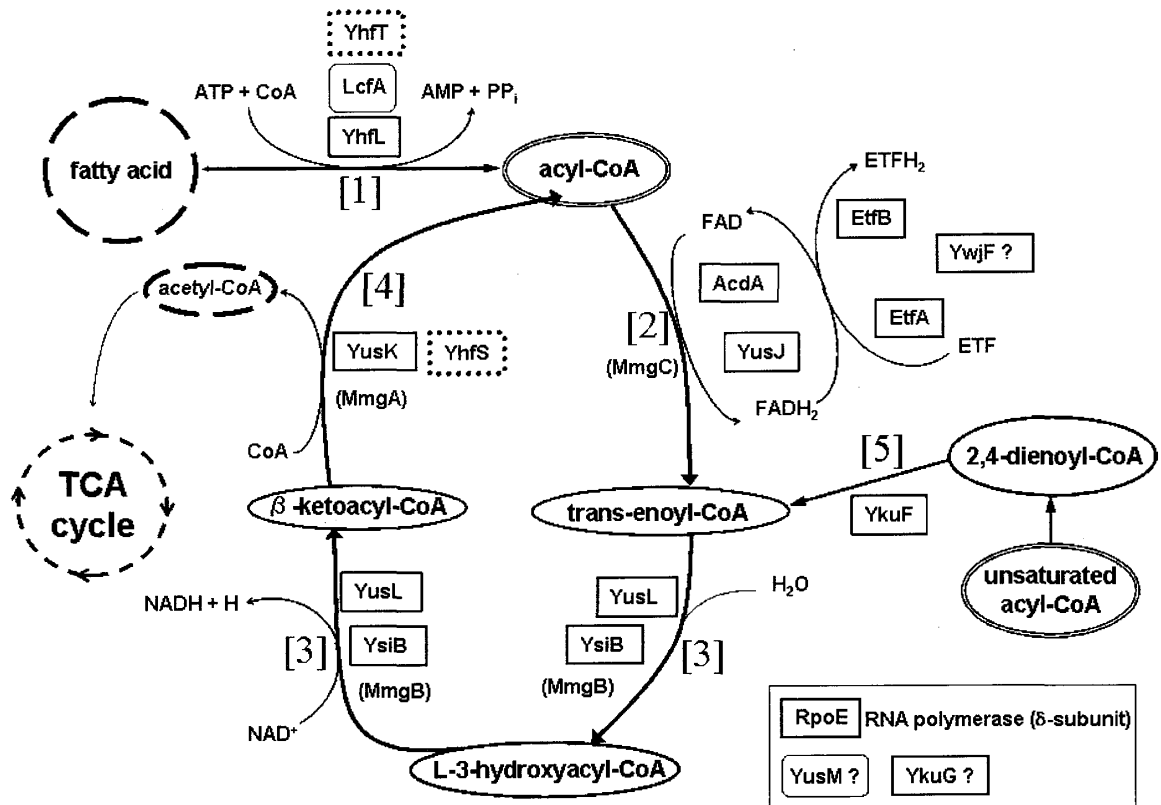


Fig. 1. 脂肪酸 β-酸化経路と YsiA レギュロンメンバーとの関与

YsiA レギュロンは 15 遺伝子から構成された 5 オペロン (*lcfA-ysiA-B-ettB-A, ykuF-G, yhfL, yusM-L-K-J, ywjF-acdA-rpoE*) から成り立っている。これら遺伝子産物の BLASTP 配列相同性検索¹⁷⁾の結果、YwjF、YkuG、YusM、および RpoE を除く遺伝子産物が脂肪酸 β 酸化経路で機能することが明らかとなり、この経路に関与する酵素へ遺伝子産物を割り当てた。YwjF は 4Fe-4S フェレドキシン蛋白質としてアシル-CoA デヒドロゲナーゼ反応に関与している可能性がある。この経路の酵素は、長鎖脂肪酸 CoA リガーゼ[1]、アシル-CoA デヒドロゲナーゼ[2]、3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ/エノイル-CoA ヒドラターゼ複合体[3]、アセチル-CoA C-アシルトランスフェラーゼ[4]、および 2,4-ジエノイル-CoA レダクターゼ[5]である。ボックス および 丸ボックスの遺伝子産物は、それぞれ YsiA により直接的および間接的な負の調節を受けているものを示した。2 重丸の長鎖アシル-CoA は、YsiA の結合する YsiA-box への相互作用を妨げる誘導物質である。BLASTP 検索¹⁷⁾の結果、点線ボックスの YhfS および YhfT も同様にアセチル-CoA C-アシルトランスフェラーゼおよび脂肪酸-CoA リガーゼと相同性を示し、また括弧内の *mmgABC* 遺伝子 [σ^E -RNA ポリメラーゼにより転写されている¹⁸⁾]も、それぞれアセチル-CoA C-アシルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ/エノイル-CoA ヒドラターゼ複合体、およびアシル-CoA デヒドロゲナーゼと相同性を示した。

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

トランスクリプトームの比較を通して *ykuF*, *ykuG*, *yusM*, *yusL*, *yusK*, *yusJ*, *ywjF*, *acdA*, *rpoE*, *yhfL*, *lcfA*, *ysiB*, *etfA*, *etfB*, および *ysiA* 自身が YsiA により制御される遺伝子の候補として挙げられた。これらの遺伝子は、*yhfL* 以外、*ykuF*, *ykuG*; *yusM*, *yusL*, *yusK*, *yusJ*; *ywjF*, *acdA*, *rpoE*; および *lcfA*, *ysiA*, *ysiB*, *etfB*, *etfA* 遺伝子の順にそれぞれクラスター化されていた。それら遺伝子産物の BLASTP 配列類似性検索¹⁷⁾ は、YusL と YsiB、YusK、および YusJ と AcdA 蛋白質が多くの細菌の 3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ/エノイル-CoA ヒドラターゼ複合体、アセチル-CoA C-アセチルトランスフェラーゼおよびアシル-CoA デヒドロゲナーゼとそれぞれ高い配列類似性を示し、LcfA と YhfL 蛋白質は長鎖脂肪酸-CoA リガーゼと高い類似性を示し、EtfA と EtfB 蛋白質は電子伝達フラビン蛋白質の α -および β -サブユニットと高い配列類似性を示した (Fig. 1)。これらの酵素は、脂肪酸の β -酸化へ関与することが知られており、これら遺伝子の産物 (LcfA, YhfL, AcdA, YusJ, YusL, YsiB, YusK, EtfA, および EtfB) の予測される機能に従って各段階の酵素へ割り当てることができた (Fig. 1)。加えて、YkuF 蛋白質は *Bacillus* および近縁の種に属するグラム陽性細菌の 2,4-ジエノイル-CoA へ配列類似性が示され、YwjF 蛋白質は、アシル-CoA 脱水素反応へ関連した電子伝達に関与する可能性のある 4Fe-4S フェレドキシン蛋白質と相同性を示した。また、YkuG 蛋白質はペプチドグリカン結合ドメインを持ち、後述に示すように脂肪酸の輸送に関与する可能性がある。しかしながら、現在のところ RpoE (RNA ポリメラーゼ δ -サブユニット)、およびの YusM (プロリンデヒドロゲナーゼへ類似性を示す) がどのように脂肪酸分解へ関与しているのかは説明できていない。

YsiA に制御される遺伝子のオペロン構成

YsiA に抑制される遺伝子のオペロン構成を明らかにするため、それら遺伝子のプローブ DNA と LB 培地で増殖させた FU788 (*ysiA::cat*) および 168 株の細胞から調製した全 RNA とを用いてノザンプロットングを行った (Fig. 2 および 3)。3.5-kb 転写産物は *ykuF* または *ykuG* プローブで、1.7-kb 転写産物は *yhfL* プローブで、それぞれ *ysiA* 破壊株から得た RNA のレーンでのみ検出された。*ykuG* および *yhfL* のすぐ下流には、 ρ -依存ターミネーターとして機能するであろうパリンδροーム構造が見られたため、*ykuF* と *ykuG* 遺伝子はオペロンを構成し、*yhfL* 遺伝子はモノシストロニックに転写されたと考えられる (Fig. 2)。5.5-および 7.0-kb 転写産物は *yusL*, *yusK* または *yusJ* プローブによって *ysiA* 破壊株から得た RNA のレーンでのみ共に検出された。*yusJ* のすぐ下流に ρ -依存ターミネーター様配列が見られるため、*yusL*, *yusK* および *yusJ* 遺伝子はオペロンを構成していることが示された。そして、7.0-kb 転写産物は *yusL*, *yusK* および *yusJ* 遺伝子に加えて上流の *yusM* 遺伝子を含むと思われた (Fig. 2)。4.2-kb 転写産物は、*ywjF*, *acdA* および *rpoE* プローブで *ysiA* 破壊株から得た RNA のレーンでのみ検出され、短い 0.7-kb 転写産物は *rpoE* プローブでのみ FU788 (*ysiA::cat*) および 168 株から得た RNA のレーンで共に検出された (Fig. 2)。 ρ -依存ターミネーター様配列は *rpoE* のすぐ下流に見つかり、4.2-kb 転写産物はおそらく *ywjF*, *acdA* および *rpoE* 遺伝子を含み、また 0.7-kb 転写産物は *rpoE* のみを含んでいると考えられた。

lcfA, *ysiA*, *ysiB*, *etfB* および *etfA* 遺伝子はこの順に並んでいる。*ysiA* 遺伝子への pMUTIN プラスミド挿入株 [YSIAd 株 (*ysiA::pMUTIN*)] (Fig. 4) は、*ysiA* 自身の発現を検証するために構築された。pMUTIN 破壊した *ysiA* の周辺の遺伝子構成に示したように、*ysiA* の 5'側の ORF 内に pMUTIN プラスミドをシングル-クロス

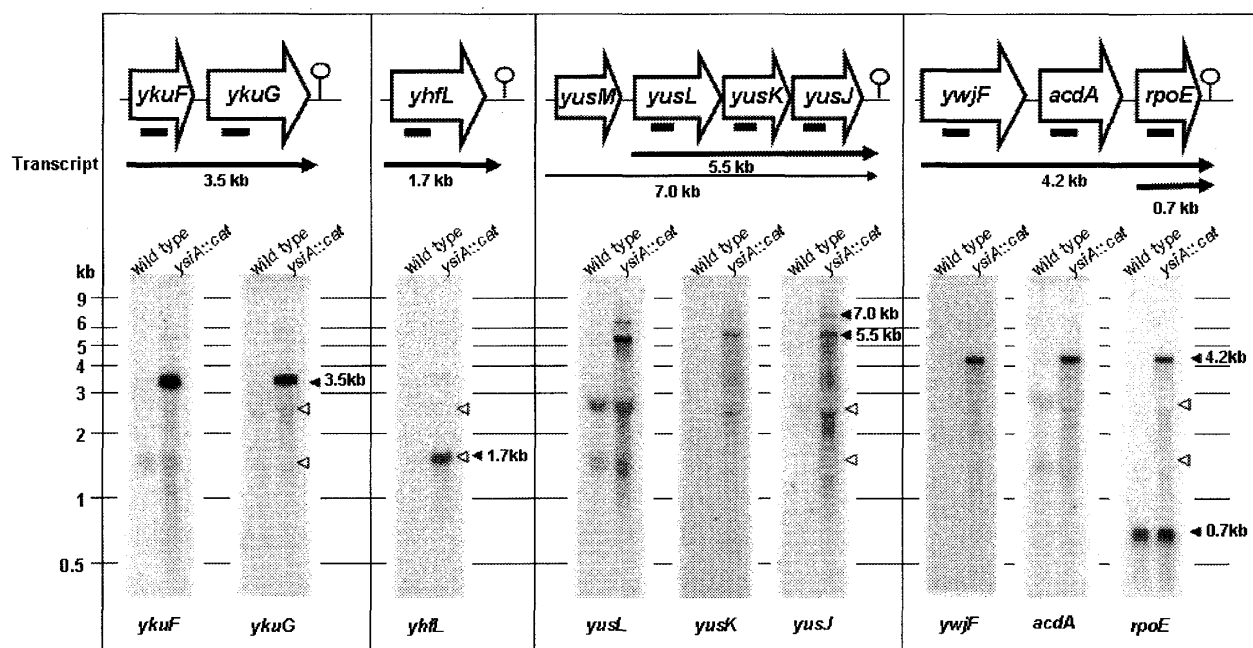


Fig. 2. *ykuF-G*, *yhfL*, *yusM-L-K-J*, *ywjF-acdA-rpoE* 転写産物のノザン解析

LB 培地で OD₆₀₀ = 0.5 まで増殖させた 168 (野生型) 株および FU788 (*yjsA::cat*) 株の全 RNA サンプルに、*ykuF*, *ykuG*, *yhfL*, *yusL*, *yusK*, *yusJ*, *ywjF*, *acdA*, *rpoE* プローブを用いてノザン解析を行った (パネルの下方)。各レーンには 10 μg の RNA を用いた。サイズマーカーは左に示した。中抜き三角は、それぞれ 23 および 16 rRNA の位置を示す。遺伝子下方に示した太線はプローブの位置を示している。推定の転写ターミネーターはオペロンの最終遺伝子の下流に示している。

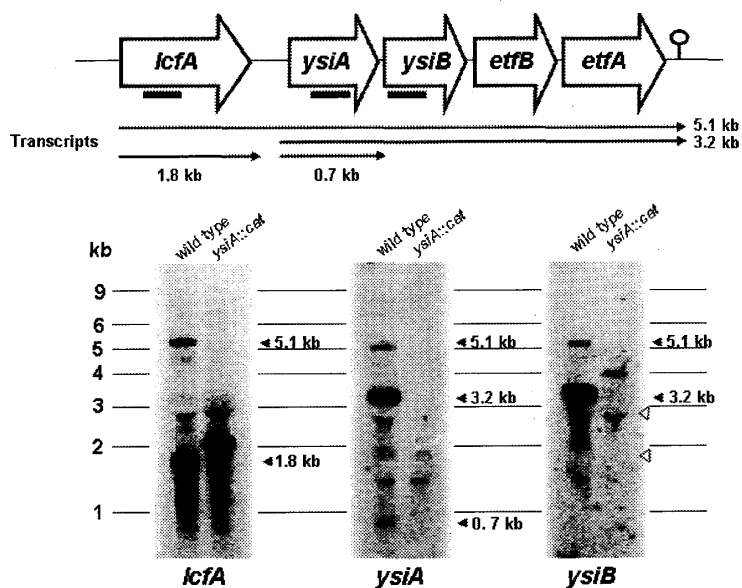


Fig. 3. *lcfA-ysiA-B-etfB-A* 転写産物のノザン解析

Fig. 2 に示した解析に使用したのと同様の RNA を用い、*lcfA*, *ysiA*, *ysiB* プローブを使用してノザン解析を行った (パネルの下方)。各レーンは Fig. 2 のノザンプロットングで使用した 2 倍量の 20 μg RNA を使用した。イメージングプレートに、Fig. 2 の解析より 5 倍の長さ感光させた。サイズマーカーの位置は左に示した。中抜き三角はそれぞれ 23 および 16 rRNA の位置を示す。

オーバーにより挿入破壊させた。このとき *yjsA* 遺伝子に破壊を挿入しただけではなく、*yjsA* の発現レポーターとして *lacZ* も挿入される²⁹⁾。YSIAd 株は LB 培地で細胞増殖させた時、構成的に β-Gal が合成され (およそ 100 nmol/min per OD₆₀₀)、これにより *yjsA* 遺伝子は自己抑制されることが示された。したがって、イメージングプレートの ³²P 感光の時間を長くし、FU788 (*yjsA::cat*) と 168 (野生型) 株の RNA を 2 倍量用いたノザン解析により、野生株で *yjsA* オペロンの転写産物を検出することができた (Fig. 3)。5.1-, 3.2-, および

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

0.7-kb 転写産物は *ysiA* プローブによって野生型 RNA のレーンでのみ検出された。5.1-および 3.2-kb 転写産物は *ysiB* プローブにより野生型 RNA のレーンでのみ観察され、0.7-kb 転写産物はおそらく *ysiA* だけがコードされていると考えられた。5.1-および 1.8-kb 転写産物は *lcfA* プローブにより野生型 RNA のレーンで検出され、1.8-kb 転写産物は *lcfA* だけを含んでいると考えられた。予想される ρ 依存ターミネーターは *etfA* のすぐ下流に見つかり、3.2-kb 転写産物は *ysiA*、*ysiB*、*etfB* および *etfA* 遺伝子を含み、5.1-kb 転写産物は *ysiA* のすぐ上流に位置する *lcfA* 遺伝子をも含んでいると思われた。このように、ノザン解析の全ての結果は、YsiA レギュロンが 5 つのオペロン (*lcfA-ysiA-ysiB-etfB-etfA*、*ykuF-ykuG*、*yhfL*、*yusM-yusL-yusK-yusJ*、および *ywjF-acdA-rpoE*) から構成されていることを示した。

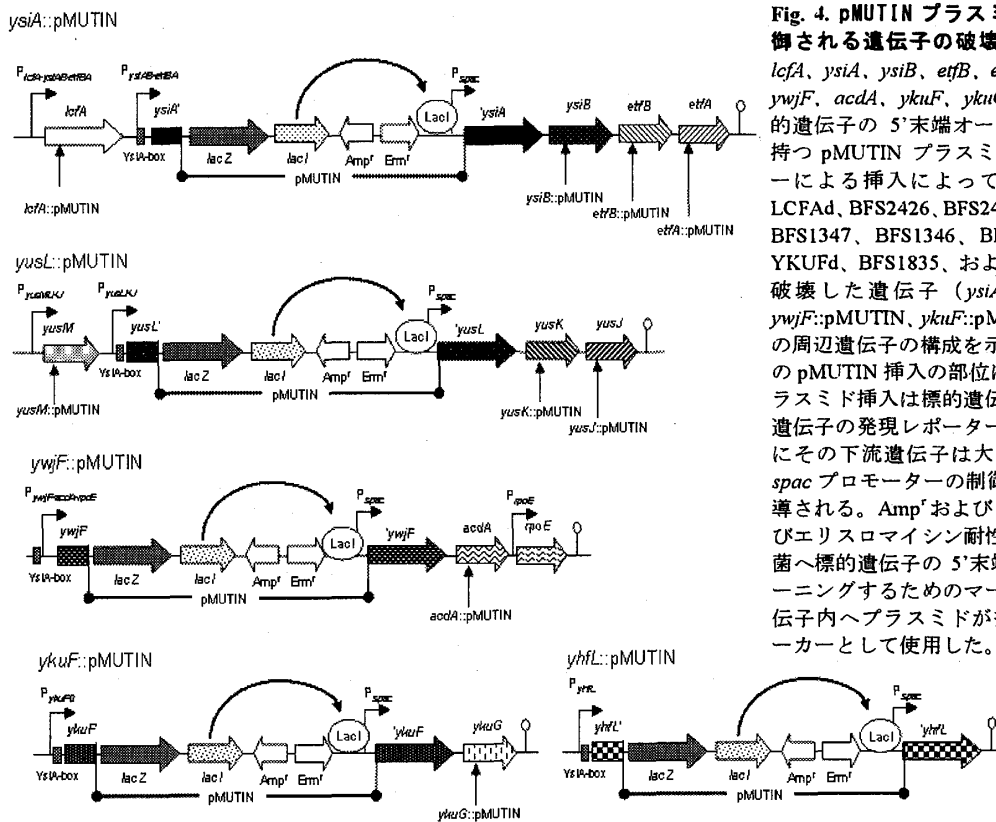


Fig. 4. pMUTIN プラスミドの挿入による YsiA に制御される遺伝子の破壊

lcfA、*ysiA*、*ysiB*、*etfB*、*etfA*、*yusM*、*yusL*、*yusK*、*yusJ*、*ywjF*、*acdA*、*ykuF*、*ykuG*、および *yhfL* 遺伝子は各標的遺伝子の 5' 末端オープンリーディングフレームを持つ pMUTIN プラスミド²⁹⁾のシングルクロスオーバーによる挿入によって破壊することで、それぞれ LCFAd、BFS2426、BFS2427、ETFAd、ETFBd、BFS1341、BFS1347、BFS1346、BFS1345、BFS1246、ACDAd、YKUFd、BFS1835、および YHFLd 株を構築している。破壊した遺伝子 (*ysiA*::pMUTIN、*yusL*::pMUTIN、*ywjF*::pMUTIN、*ykuF*::pMUTIN、および *yhfL*::pMUTIN) の周辺遺伝子の構成を示した。その他の遺伝子の各々の pMUTIN 挿入の部位は、矢印で示した。pMUTIN プラスミド挿入は標的遺伝子の破壊だけではなく、その遺伝子の発現レポーターとして *lacZ* を使用する。さらにその下流遺伝子は大腸菌 *LacI* により抑制される *spac* プロモーターの制御下に置かれるため IPTG で誘導される。Amp^r および Erm^r はアンピシリン耐性およびエリスロマイシン耐性遺伝子を示し、それぞれ大腸菌へ標的遺伝子の 5' 末端部位を持つ pMUTIN をクローニングするためのマーカー、および枯草菌の標的遺伝子内へプラスミドが挿入されたことを確認するマーカーとして使用した。

3.2-kb *ysiA-ysiB-etfB-etfA*、3.5-kb *ykuF-ykuG*、1.7-kb *yhfL*、5.5-kb *yusL-yusK-yusJ*、および 4.2-kb *ywjF-acdA-rpoE* (Fig. 2 および 3 より決定) の転写開始点を決定するため、ノザンプロットと同様の方法により *ysiA* 破壊株 (*ysiA*::pMUTIN) から RNA サンプルを調製し、プライマー伸長解析を遂行した (Fig. 5)。Fig. 5 に示したように、転写産物と各プライマーからの run-off cDNA の特異的なバンドは *ysiA* 破壊株の RNA サンプルでのみ検出された。*ysiA*、*ykuF*、*yhfL*、*yusL*、および *ywjF* 遺伝子の上流に転写開始塩基を同定し、 σ^A により認識されるであろう YsiA に抑制されるプロモーターを決定した [*yusL-K-J* 転写産物の転写開始塩基の同定により、YusL の開始コドンの位置が以前に示された¹⁴⁾のより下流に 78-bp 移動した] (Fig. 5)。*ysiA*、*yhfL*、*ykuF*、*yusL*、および *ywjF* 遺伝子の上流域に YsiA-box の候補となる相同性の高いパルンドローム配列を発見した (Fig. 6)。推定上の YsiA-box の位置は、*ysiA-B-etfB-A*、*ykuF-G*、*yhfL*、および *yusL-K-J* 転写産物の転写開始塩基の

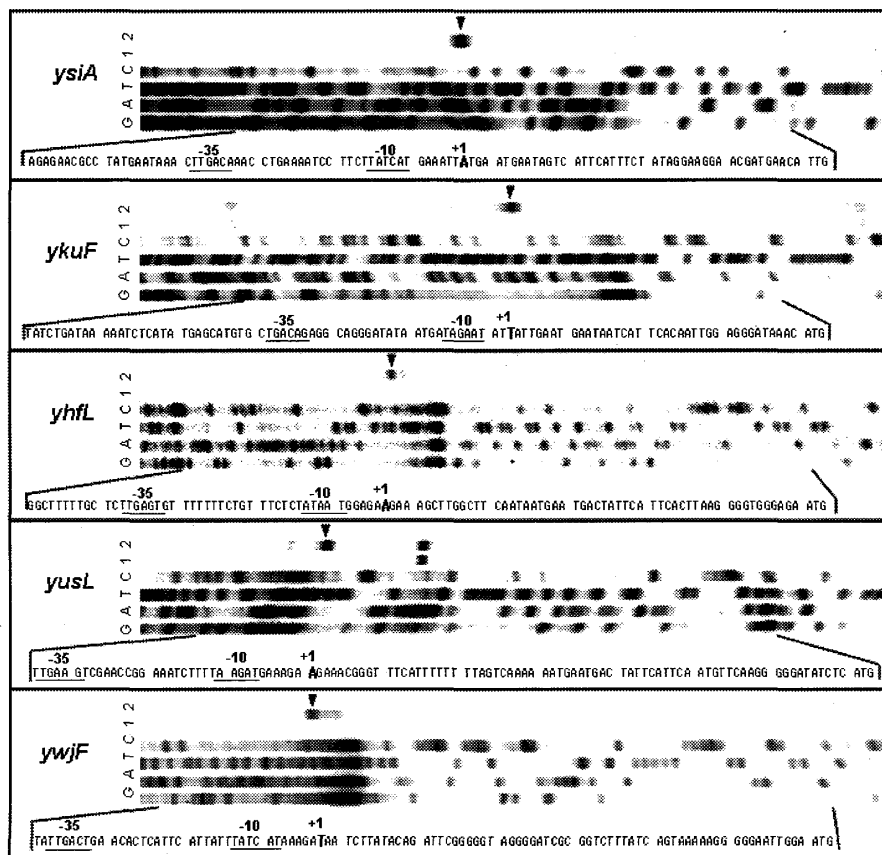


Fig. 5. *ysiA-B-etfB-A*, *ykuF-G*, *yhfL*, *yusL-K-J*, *ywjF-acdA-rpoE* 転写産物の転写開始点決定のためのプライマー伸長解析

LB培地でOD₆₀₀ = 0.5まで増殖させた168(野生型)株およびBFS2426(*ysiA::pMUTIN*)株からのRNAサンプル(45 μg)を用いて、*ysiA-B-etfB-A*, *ykuF-G*, *yhfL*, *yusL-K-J*, および *ywjF-acdA-rpoE* 転写産物へそれぞれのプライマー(EysiA-R, EykuF-R, EyhfL-R, EyusL-R, および EywjF-R, Table 2)をアニーリングさせ、逆転写させた。レーン1および2は、それぞれ168株およびBFS2426株からのrunoff cDNAを用いている。レーンG, A, T, およびCはジデオキシシークエンス反応物。三角は、プライマー伸長解析によるrunoff cDNAの位置を示している。ラダーと対応するコーディング鎖のヌクレオチド配列は、転写開始塩基(太字, +1), および推論した“-10”と“-35”領域(下線)を示している。*yusL-K-J* 転写産物の転写開始塩基の同定によって、以前までに報告されていたのよりYusLの開始コドン(ATG)が78-bp下流に移動した。

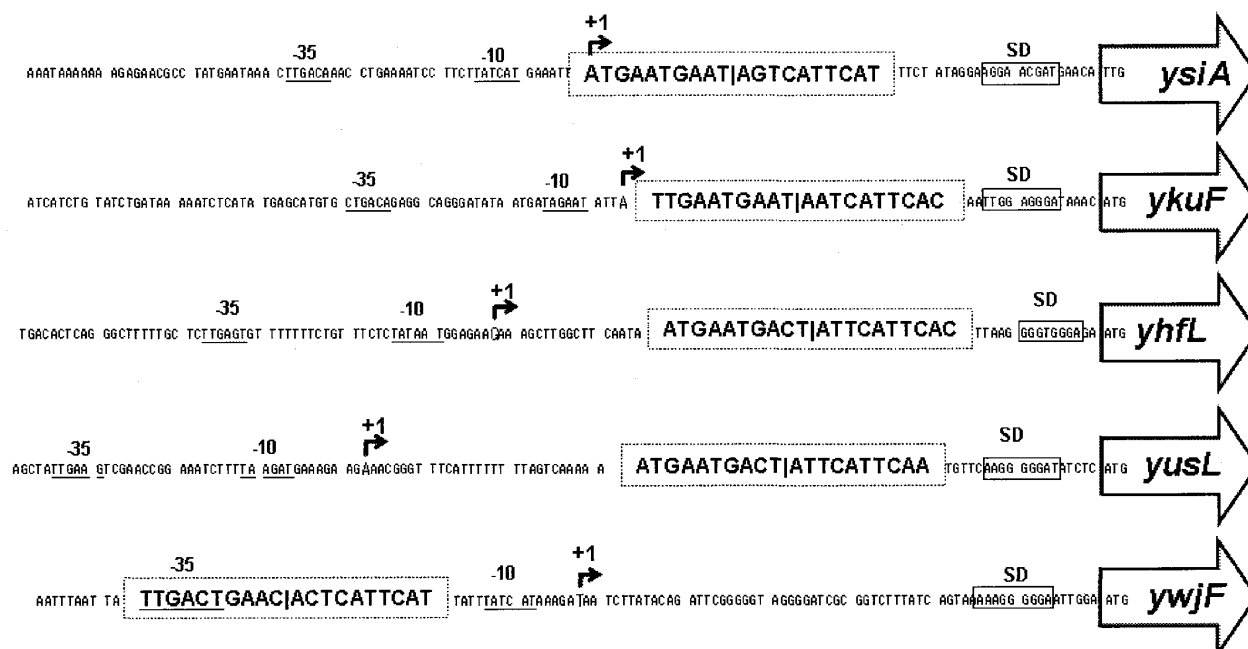


Fig. 6. *ysiA-B-etfB-A*, *ykuF-G*, *yhfL*, *yusL-K-J*, および *ywjF-acdA-rpoE* のプロモーター領域におけるYsiA-boxの位置

ysiA, *ykuF*, *yhfL*, *yusL*, および *ywjF* 翻訳領域の上流塩基配列の、転写開始塩基(+1), それらプロモーターの“-35”および“-10”領域、シャイン-ダルガノ(SD)配列、および翻訳開始コドンを示した。そこに、それぞれのYsiA-boxを位置づけた(各パンドロ

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

すぐ下流に位置しており、*ywjF-acdA-rpoE* 転写産物ではプロモーターの”-35”領域に重なって位置していた (Fig. 6)。

in vitro 解析による YsiA-box の同定

YsiA-box を決定するためゲル移動度シフト解析を遂行した。YsiA 蛋白質は、大腸菌内で生産させ、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによりほぼ均一に精製した (Fig. 7)。精製した YsiA 蛋白質は、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより 40.2 kDa の分子量であることが示され、2 サブユニット ($M_r = 22.0$ kDa) のホモダイマーであることが示された (データ未発表)。YsiA 蛋白質を用いたゲル移動度シフト解析により、

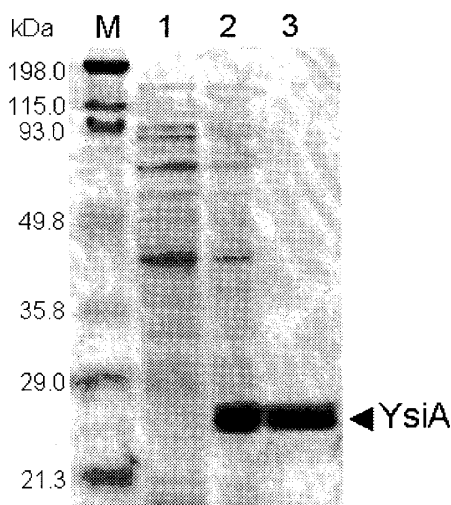
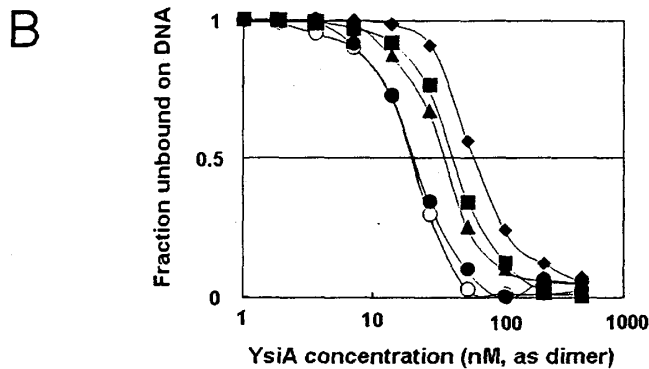
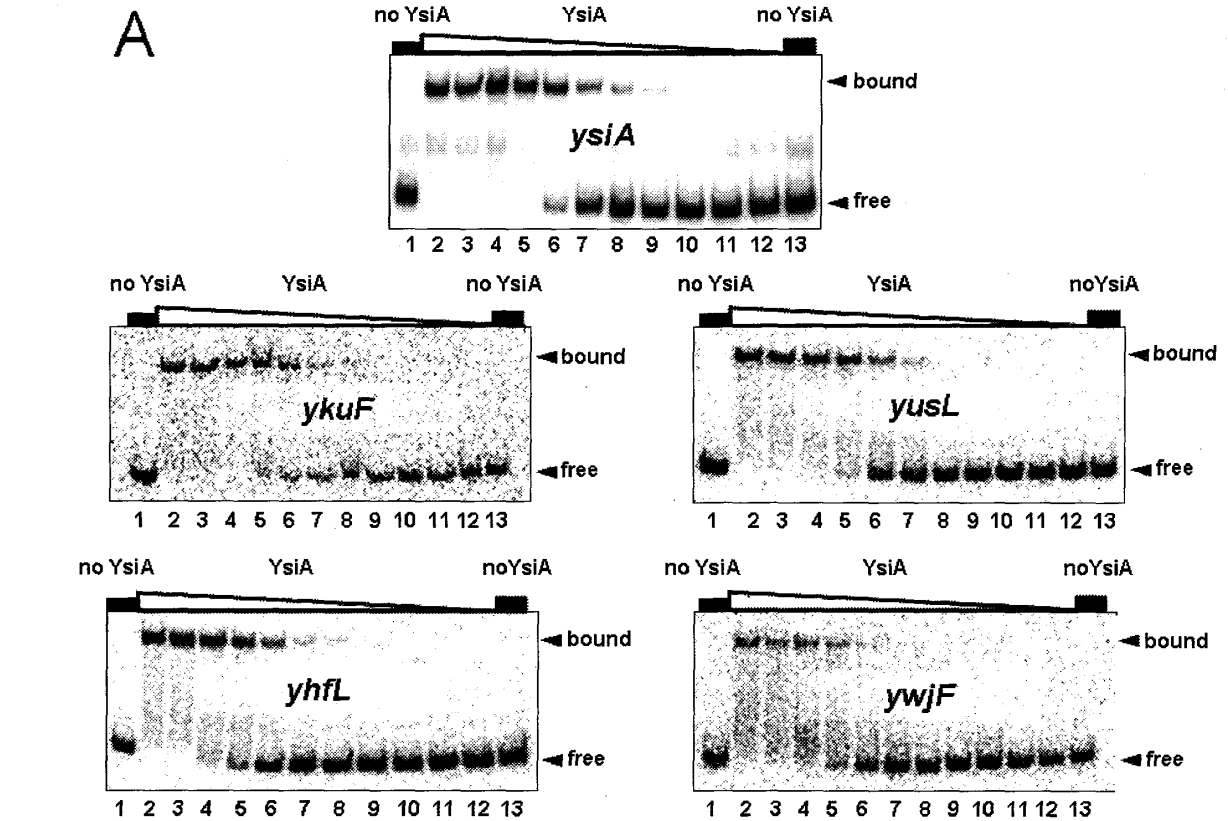


Fig. 7. 大腸菌により生産させた YsiA 蛋白質の精製

ysiA 遺伝子を pET-22b(+)ベクターへクローニングした pET-22b(+)-YsiA プラスミドを保持する大腸菌 BL21(DE3)内で YsiA 蛋白質を過剰に発現させた。そのとき YsiA 蛋白質は本文に記した方法によって均質に近い状態に精製した。精製した YsiA 蛋白質 (レーン 3)、および pET-22b(+)-YsiA プラスミドを非保持 (レーン 1) および保持 (レーン 2) した大腸菌 BL21(DE3)の破碎抽出物を 12.5%の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた (各レーン当り 5 μ g 蛋白質)。後者の大腸菌 (レーン 2) は YsiA を誘導するため 1 mM IPTG 存在下で培養した。蛋白質マーカーの位置は左に示している。三角は YsiA 蛋白質の位置を示して

推定 YsiA-box を含む *ysiA*、*ykuF*、*yhfL*、*yusL*、および *ywjF* 断片 (それぞれ、-104 から+143、-46 から+123、-65 から+121、-39 から+132、および-98 から+73 までの DNA 断片) への YsiA の結合により YsiA 蛋白質-DNA 複合体のバンドが形成され、泳動の遅延がみられた (Fig. 8A)。YsiA 蛋白質を用いた DNase I フットプリント解析では、YsiA を入れたレーンでのみ、それぞれの予想される YsiA-box を含む領域が DNase I 消化に対して保護され、YsiA が YsiA-box へ結合することが証明された。その他にも枯草菌ゲノム上に YsiA-box が存在する可能性があるため、同定した 5 つの YsiA-box 配列をウェブ上の GRASP-DNA ソフト³²⁾により検索したが、*lcfA-ysiAB-etfBA*、*ykuFG*、*yusMLKJ*、*ywjF-acdA-rpoE*、および *yhfL* 領域の 5 つ以外の YsiA-box 候補は見つからなかった。

ゲル移動度シフト解析 (Fig. 8A) により得られたデータから、各プローブ DNA 断片に対して結合と非結合の量が等しくなる YsiA 濃度 [平衡分離定数 (K_d)] を算出した (Fig. 8B)。共通配列 (WTGAATGAMTANTC ATTCAN : W、M、および N はそれぞれ A または T、A または C、およびいずれかの塩基) を持つ YsiA-box は YsiA への親和性により K_d 値の一致する 3 つのグループに分類することができた。YsiA-box_{*ysiA*} および YsiA-box_{*ykuF*} の 20 および 21 nM、YsiA-box_{*yusL*} および YsiA-box_{*yhfL*} の 37 および 43 nM、および YsiA-box_{*ywjF*} の 65 nM で、それらはパンドローム性と関連付けることができた (Fig. 8B)。



Promoter	YsiA-Box	Palindrome-matching (%)	K_d (nM)
<i>ysiA</i>	ATGAATGAaT AgTCATTCA ¹⁵ T ²⁰	90	20
<i>ykuF</i>	tTGAATGAaT AaTCATTCAc	80	21
<i>yusL</i>	aTGAATGAcT AtTCATTCAa	80	37
<i>yhfL</i>	aTGAATGAcT AtTCATTCAc	80	43
<i>ywjF</i>	tTGAaTGAac acTCaTTCaT	60	65
Consensus	WTGAATGAMT ANTCATTCAN		

Fig. 8. YsiA レギュロンメンバーの各 YsiA-box へ結合する YsiA のゲル移動度シフト解析

A、精製した YsiA 蛋白質と ³²P-ラベル DNA プロンプ (*ysiA*, *ykuF*, *yusL*, *yhfL*, および *ywjF*) のゲル移動度シフト解析は本文へ記したように行った。レーン 1 と 13 は YsiA を入れず、レーン 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, および 12 は、それぞれ YsiA 蛋白質 (ダイマー) を 22.1, 11.1, 5.5, 2.8, 1.4, 0.69, 0.34, 0.17, 0.087, 0.043, および 0.022 pmol 入れた。各レーンは 0.02 pmol の DNA プロンプを入れた。DNA プロンプ (free) と YsiA-DNA 複合体 (bound) のバンドは三角で示した。B、YsiA-DNA プロンプ結合曲線。白丸、黒丸、三角、四角およびひし形は、それぞれ *ysiA*, *ykuF*, *yhfL*, *yusL*, および *ywjF* プロンプで得られたデータを示し、(A)の実験より得ている。Kd 値 (DNA 非結合の比が 0.5 になる YsiA 濃度) は、下部の Table に示した。これらプロンプの YsiA-box 配列を半分にし、2つの配列からパルindrome性の百分率を算出した。YsiA-box の左と右半分で塩基対を形成する塩基を大文字で示し、各パルindromeの中心は垂直ラインで示している。YsiA-box はこれらのミスマッチ塩基 (太字) とパルindrome性の百分率が合致する 3つのグループ (*ysiA* と *ykuF*; *yusL* と *yhfL*; *ywjF*) に分類することができた。

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

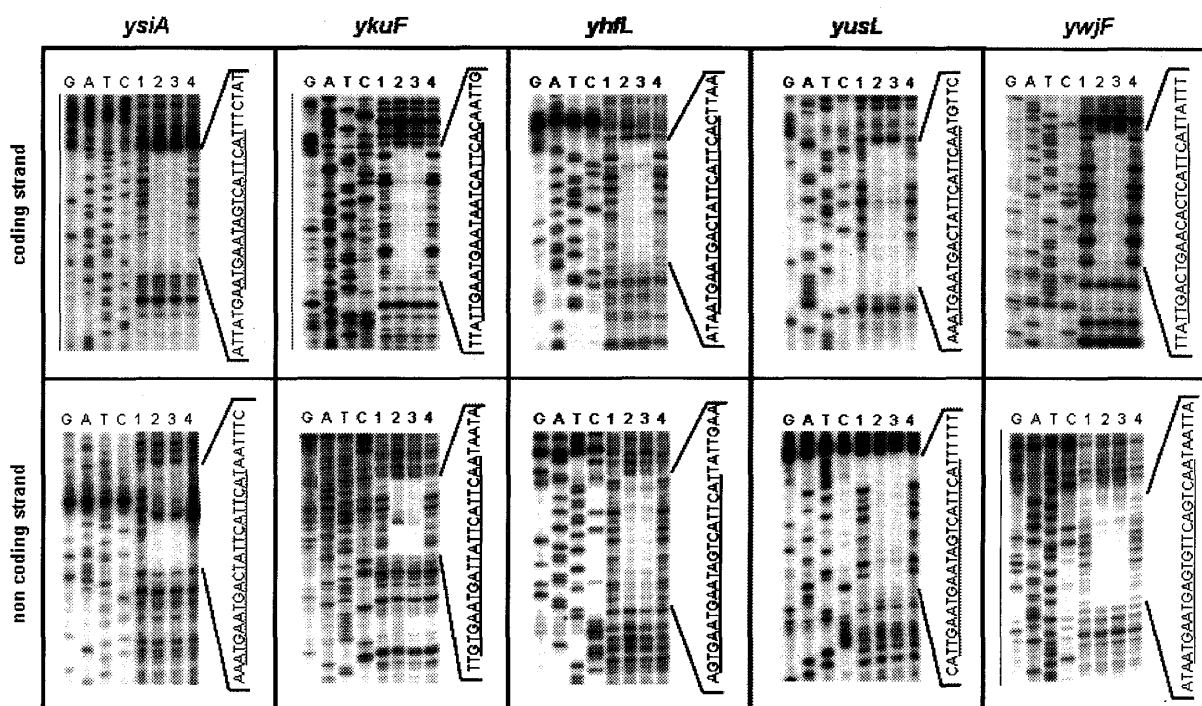


Fig. 9. YsiA-box への YsiA 蛋白質の相互作用を示す DNase I フットプリント解析

上側と下側のパネルは、それぞれ DNA プロブの 5'末端ラベルしたコーディングおよび非コーディング鎖の DNase I フットプリント解析の結果を示した。レーン 1 から 4 は、反応溶液 (50 μ l) に 0.04 pmol の 32 P ラベルした DNA プロブを用いた。レーン 1、2、3、および 4 は、それぞれ YsiA (ダイマー) を 0、44.3、22.2、および 0 pmol 入れた。レーン G、A、T、および C は、プロブ調製と同じプライマーを用いたジデオキシシーケンス反応の産物である。各プロブのコーディングおよび非コーディング鎖のプロテクトされた領域のヌクレオチド配列をそれぞれの右側に示し、YsiA-box 配列を下線で示した。

YsiA レギュロンの誘導物質の同定

枯草菌 YsiA は、長鎖アシル-CoA 化合物が誘導物質となる脂肪酸代謝のグローバルな転写制御因子である大腸菌 FadR の機能ホモログだと考えられた¹¹⁾。そのため、YsiA-box の代表として YsiA-box_{ywjF} を用い YsiA との相互作用を長鎖アシル-CoA の添加により阻害させる試験を行なった (Fig. 10)。長鎖分岐アシル-CoA (12-メチルテトラデカノイル-CoA および 13-メチルテトラデカノイル-CoA) は、枯草菌において最も多い脂肪酸³³⁾であるため、12-メチルテトラデカノイル酸および 13-メチルテトラデカノイル酸 (15:0) から化学的に合成して実験に用いた。Fig. 10A および B に示すように、炭素数 12 から 20 の直鎖アシル-CoA、不飽和のオレオイル-CoA (18:1) とパルミトレオイル-CoA (16:1)、および分岐鎖の 12-メチルテトラデカノイル-CoA と 13-メチルテトラデカノイル-CoA は、50 μ M の濃度で YsiA-box_{ywjF} との相互作用を阻害した。さらに、アラキドイル-CoA、ステアロイル-CoA、パルミトイル-CoA、オレオイル-CoA、パルミトレオイル-CoA、および 12-メチルテトラデカノイル-CoA は、5 μ M の濃度でも強い阻害を示した。アシル-CoA の平衡阻害定数 (K_i) (μ M) は、アシル-CoA 量を変動させたゲル移動度シフト解析 (データ未発表) により算出しており、アラキドイル-CoA、ステアロイル-CoA、パルミトイル-CoA、ミリストイル-CoA、ラウロイル-CoA、オレオイル-CoA、パルミトレオイル-CoA、13-メチルテトラデカノイル-CoA、および 12-メチルテトラデカノイル-CoA の K_i 値は、それぞれ 1.0、0.85、4.3、5.2、23、0.39、4.0、0.40、および 5.2 μ M であった。すなわち、炭素数 18 のステアロイル-CoA およびオレオイル-CoA が、この YsiA 蛋白質-DNA 複合体の形成に最も高い阻害を示した。ステ

アロイル-CoA へ1つの2重結合が導入されたオレオイル-CoA は、さらに阻害性が高まった。加えて、ミリストイル-CoA (テトラデカノイル-CoA) のメチル化により YsiA-DNA 複合体形成の阻害性は増加し、12-メチルデカノイル-CoA で最も高い阻害作用を示した。イソバレニル-CoA および炭素数3から8の直鎖アシル-CoA では、YsiA-box_{ywjF}と YsiA 蛋白質の相互作用に阻害を示さなかった。さらに、コエンザイム A や脂肪酸でも同様に阻害を示さなかった (Fig. 10)。このように、オレオイル-CoA、パルミトレオイル-CoA、12-メチルテトラデカノイル-CoA、および13-メチルテトラデカノイル-CoA を含めた炭素数14から20までの長鎖アシル-CoA が、YsiA-box へ YsiA 蛋白質が結合するのを妨げる YsiA レギュロンのインデューサーとして働いていると考えられた。

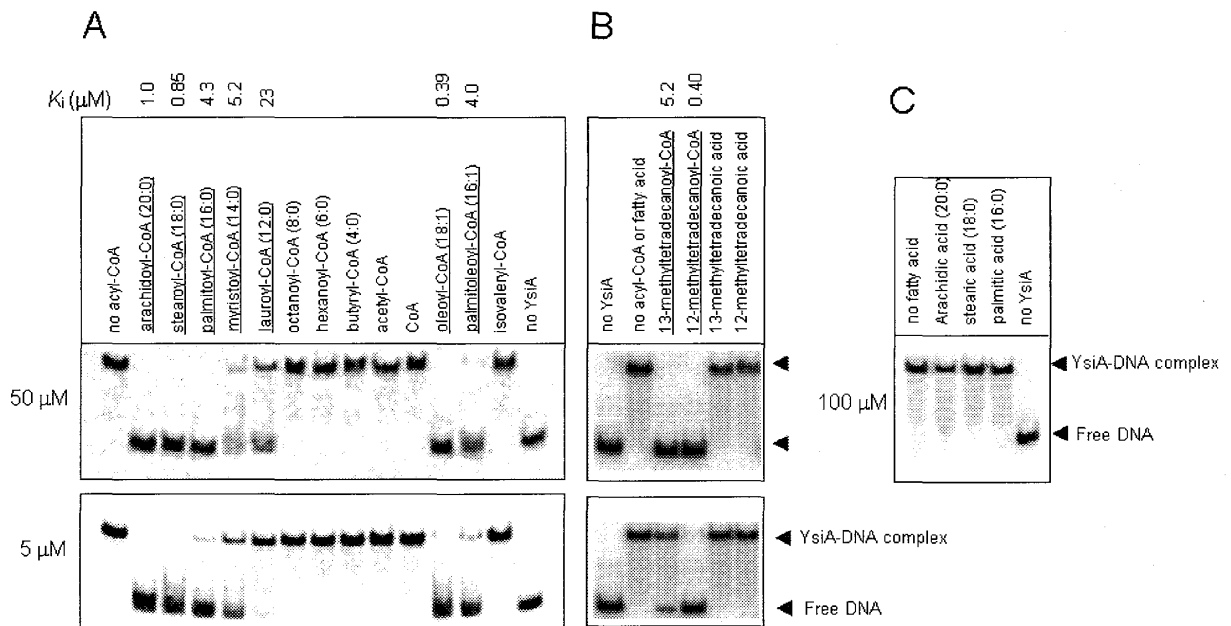


Fig. 10. アシル-CoA の添加における YsiA-box への YsiA 特異的結合の阻害

ゲル移動度シフト解析は、前述の Fig. 8 の説明文に示したように行った。反応液 (25 μl) は YsiA-box_{ywjF}を含む DNA プローブ (0.02 pmol)、220 nM YsiA 蛋白質 (ダイマー)、5 μM または 50 μM のアシル-CoA、および脂肪酸 (A および B)、または 100 μM 脂肪酸 (C)、および 4%ジメチル硫酸 (DMSO) を含む。アシル-CoA および脂肪酸は DMSO で溶解して使用した。YsiA-DNA 複合体の形成に対し、阻害的影響を示したアシル-CoA に下線を引いた。それぞれの長鎖アシル-CoA の濃度を変動させたゲル移動度シフト解析 (データ未発表) により求めた Ki 値を (A) および (B) のパネル上部に示している。

pMUTIN-破壊株を用いた YsiA に制御される各プロモーター調節下にある lacZ の発現

in vitro 試験により、YsiA は YsiA レギュロンメンバーのレプレッサーであることが示された。この YsiA による転写の抑制は、それらレギュロンメンバーの YsiA-box への YsiA の結合によるものであり、この結合の解除は長鎖アシル-CoA により引きおこされた (Fig. 10)。また、YsiA レギュロンメンバーの遺伝子産物の多くは、脂肪酸の β-酸化に関与する酵素であり、YsiA がそれら酵素の合成を強く抑制している。

各遺伝子の破壊によって脂肪酸の β-酸化が止められ、YsiA による転写の抑制制度が変わり、これらプロモーターの活性に影響を示す可能性があると考えられたため、YsiA により制御される遺伝子の全ての pMUTIN 破壊株を揃えた (Fig. 4)。ysiA、yusL、ywjF、ykuF、および yhfL 遺伝子の pMUTIN 破壊を例として、挿入付近の遺伝子構成を示した (Fig. 4)。図に示したように、pMUTIN プラスミド挿入は標的遺伝子を破壊するだけ

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

ではなく、その遺伝子の発現を *lacZ* をレポーターとして追跡できる。また、その下流遺伝子は、大腸菌の *LacI* により抑制される *spac* プロモーターの制御下にあるため²⁹⁾、培地へ IPTG を加えることにより誘導できる。この一連の pMUTIN 破壊株を用いて、IPTG 存在および非存在下で培養し β -Gal 合成を追跡した。Fig. 11A は、蛋白質相同性検索の結果、脂肪酸の β -酸化に直接的に関与していると考えられる 6 遺伝子 (*ysiB*, *etfB*, *etfA*, *yusL*, *yusK*, および *yusJ*) の pMUTIN 破壊株による β -Gal 合成のモニターを示している。Fig. 11A に示した

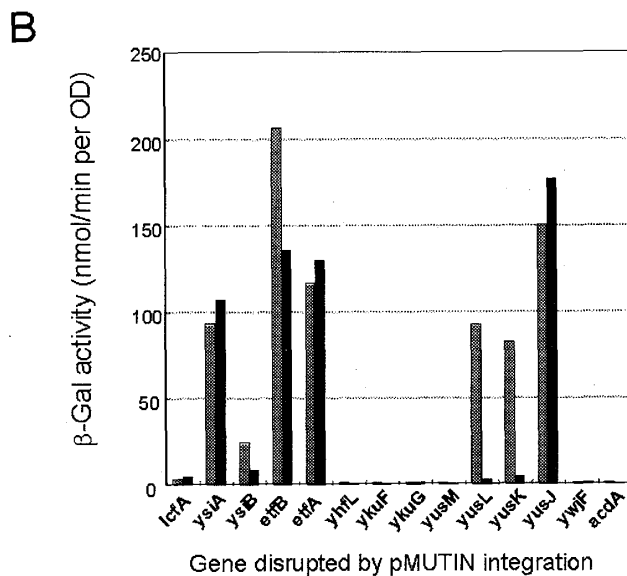
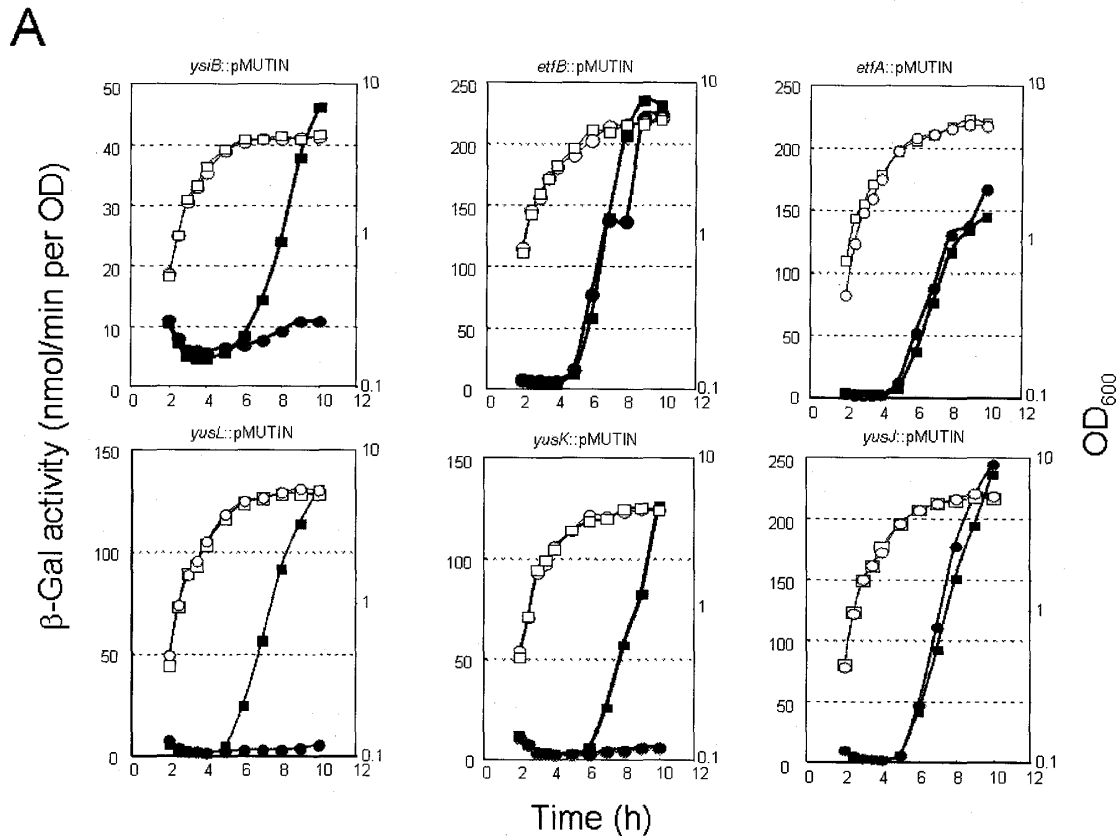


Fig. 11. YsiA に制御される遺伝子の破壊による、それら遺伝子の脱抑制

pMUTIN 破壊株 (LCFAd, BFS2426, BFS2427, ETFAd, ETFBd, YKUFd, BFS1835, YHFLd, BFS1341, BFS1347, BFS1346, BFS1345, BFS1246, および ACDA 株はそれぞれ *lcfA*, *ysiA*, *ysiB*, *etfA*, *etfB*, *ykuF*, *ykuG*, *yhfL*, *yusM*, *yusL*, *yusK*, *yusJ*, *ywfF*, および *acdA* の破壊株) を、10 時間培養し、本文に記したように細胞破砕物の β -Gal 活性を測定した。(A)、 β -Gal 合成の結果は、脂肪酸の β -酸化に最も関与する *ysiB*, *etfB*, *etfA*, *yusL*, *yusK*, および *yusJ* 破壊株のものを示した。白色および黒色の印は OD_{600} 値および β -Gal 活性を示し、丸および四角の印は 1 mM IPTG 添加および未添加をそれぞれ示している。(B)、1 mM IPTG を添加および未添加で 8 時間培養後の菌体破砕物の β -Gal 活性を黒色および灰色でそれぞれ示している。X 軸の下に示した遺伝子の pMUTIN 破壊株を使用している。

ように、これら破壊株の β -Gal 活性は、IPTG 非存在により定常期初期に極端に増加した。IPTG を加えることにより、pMUTIN 挿入破壊した遺伝子の下流遺伝子を誘導させ単独の遺伝子破壊状態にしたとき、それぞれアシル-CoA デヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビン蛋白質の α -および β -サブユニットをコードする *yusJ*、*etfA*、および *etfB* 遺伝子 (Fig. 1) の破壊によって β -Gal 合成が極端に増加した (Fig. 11)。これらの破壊株は、YsiA レギュロンを誘導する長鎖アシル-CoA [*in vitro* 解析 (Fig. 10) により明らかにした] が生体内に蓄積されることにより生じたためと考えられた。また、*yhjL*、*ykuF*、*ykuG*、*yusM*、*ywjF*、*acdA* および *lcfA* の破壊では高い β -Gal 活性は検出されなかった (Fig. 11B)。また、これらのプロモーター領域の YsiA-box 配列は、*yusM* および *lcfA* では存在しておらず、また *yhjL*、*ykuF*、*ykuG*、*ywjF*、および *acdA* 破壊の β -酸化への影響は顕著でないため、長鎖アシル-CoA の蓄積による転写の誘導は生じなかったと考えられた。これら *in vivo* の結果は長鎖アシル-CoA が YsiA レギュロンを誘導するという上述の *in vitro* の結果を裏付けるものとなった。

YsiA レギュロンメンバーの破壊により生じる、唯一の炭素源として脂肪酸を用いた培地での生育障害

大腸菌の *fad* 遺伝子は長鎖脂肪酸を炭素源として利用するのに必須とされ、FadR により制御されていることが報告されている³⁴⁾。しかしながら、これまで枯草菌の変異株などを用いた、長鎖脂肪酸を炭素源とした生育試験の報告は全くされていなかった。脂肪酸を炭素源とした YsiA レギュロンメンバーの破壊株を用いた生育実験では、上述の実験で示されたように、パルミトイル-CoA が YsiA-box へ結合する YsiA を阻害するインデューサーとして機能していたため、代表的な脂肪酸としてパルミチン酸を選出した。各々の破壊株は、

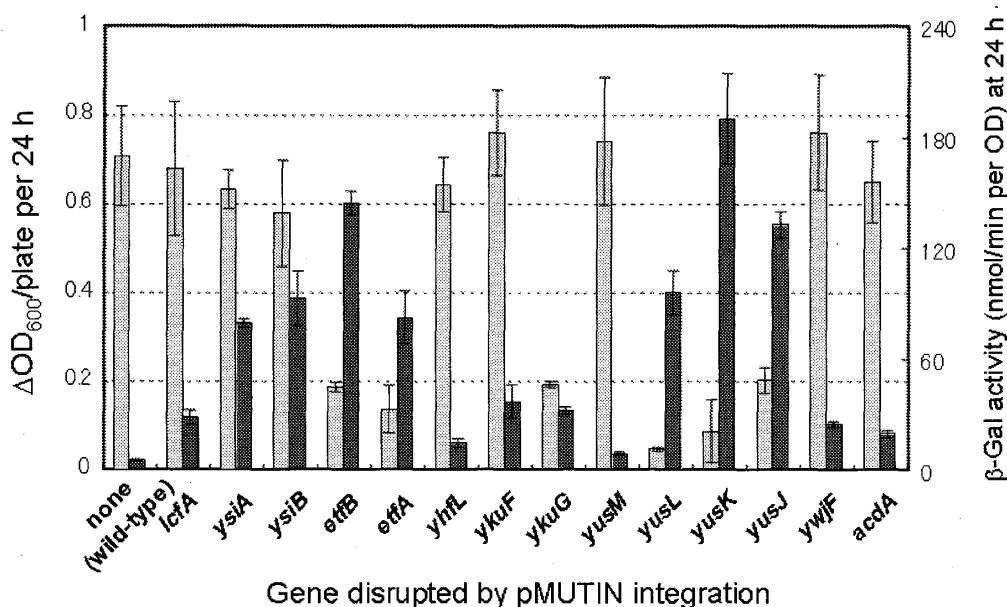


Fig. 12. 長鎖脂肪酸を炭素源とした最小培地における YsiA レギュロンメンバーの pMUTIN 破壊株の生育および β -Gal 合成
YsiA レギュロンメンバーの pMUTIN 破壊株は、エリスロマイシン (0.3 μ g/ml) を含む TBABG 培地にて 30°C で一晚培養し、菌体を 50 μ g/ml トリプトファンを含む S6 培地²⁰⁾ へ懸濁した。各々の菌体懸濁液を一定量 ($OD_{600} \times ml = 0.5$) にし、トリプトファン、4.35 mM パルミチン酸ナトリウムおよび 1 mM IPTG を含む S6 固体培地 3 枚に広げた。そして、37°C で 3 日間培養した。3 枚のプレートの各々の菌体は 24 時間毎に OD_{600} の測定のためトリプトファンを含む S6 培地 5 ml に懸濁した。左 Y 軸の 24 時間あたりの $\Delta OD_{600}/plate$ 値は、24 から 48 時間まで培養した $OD_{600}/plate$ の増加量であり、明灰色のバーで示している。この実験は 3 回繰り返して行い、3 つの値の平均および標準偏差を示した。菌体破砕物の β -Gal 活性は、植菌後 24 時間で懸濁したものをを用いて分析を行い、暗灰色で示した。この実験も 3 回行い、3 つの値の平均と標準偏差を示した。

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

炭素源として 4.35 mM パルミチン酸ナトリウムを含む最小培地(S6)³⁰⁾ に IPTG を添加したプレートに広げ、37°C で培養し、増殖を追跡した。24 から 48 時間までの生育度を算出するため、プレート表面に生育した菌体を S6 培地で懸濁し OD₆₀₀ 値を測定した。Fig. 12 の明灰色バーで示したように、*etfB*、*etfA*、*ykuG*、*yusL*、*yusK*、および *yusJ* 破壊株は、炭素源としてパルミチン酸の資化利用へ明らかな障害が引き起こされた。一方で、他の遺伝子破壊株は野生株と同様の生育度を示した。IPTG の添加により破壊した下流の遺伝子は誘導されるため、長鎖脂肪酸として用いたパルミチン酸の資化利用には、上述の 5 つの遺伝子が重要であることが強く示唆された。YsiA により制御される遺伝子の誘導を炭素源としてパルミチン酸を加えた最小培地で培養することにより *in vivo* でも分析した。パルミチン酸プレートへ植菌ののち、24 時間後に菌体を回収し、破碎後、β-Gal 活性を測定した。Fig. 12 に示した暗灰色バーは YsiA により直接的に制御されるプロモーターの活性を *ysiB*、*etfB*、*etfA*、*yhfL*、*ykuF*、*ykuG*、*yusL*、*yusK*、*yusJ*、*ywjF*、および *acdA* の pMUTIN 破壊株の β-Gal 活性を測定することで求めた。注目すべきは、*ysiB*、*etfB*、*etfA*、*yusL*、*yusK*、および *yusJ* の破壊による β-Gal 活性は、細胞内に長鎖アシル-CoA が蓄積されることにより YsiA による転写の抑制が阻害されたため高いと考えられた。そのうち *ysiB* 破壊株を除く他の破壊株は、パルミチン酸による生育は見られなかった (Fig. 12)。これは *ysiB* 破壊株においては、YsiB パラログの 3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ/エノイル-CoA ヒドラターゼ活性によりパルミチン酸による生育を補うのかもしれないが、長鎖アシル-CoA の蓄積を妨げるのには十分ではないと考えられた。

考察

DNA マイクロアレイ解析により、細菌の DNA 結合性制御蛋白質である TetR ファミリーに属する YsiA の 15 個の標的遺伝子候補を明らかにすることができた。それら標的遺伝子は BLASTP 相同性検索¹⁷⁾により、その多くが脂肪酸の β-酸化およびそれに関連する反応に関与する酵素と高い相同性を示すことが明らかになった (Fig. 1)。よって、この YsiA が脂肪酸分解の中心的制御因子だという可能性が示唆された。ノザン解析は、これら 15 遺伝子が 5 オペロン (*lcfA-ysiA-B-etfB-A*、*ykuF-G*、*yhfL*、*yusM-L-K-J*、および *ywjF-acdA-rpoE*) から構成されることを示した (Fig. 2 および 3)。これらオペロンから得られる多くの転写産物のうち、*ysiA-B-etfB-A* (5.1-kb)、*ykuF-G* (3.5-kb)、*yhfL* (1.7-kb)、*yusL-K-J* (5.5-kb)、および *ywjF-acdA-rpoE* (4.2-kb) は、YsiA により強く抑制されていた。プライマー伸長解析によって、*ysiA*、*ykuF*、*yhfL*、*yusL*、および *ywjF* の転写開始塩基を明らかにした。そのすぐ上流には、σ^A に依存する RNA ポリメラーゼの認識するような "-35" および "-10" 配列が位置していた (Fig. 5)。また、*in silico* の解析によって、この 5 つの転写開始塩基の近傍に、YsiA-box だと考えられる高い類似性を示すパルンドローム配列を発見することができた (Fig. 6)。

in vitro 実験に用いる YsiA 蛋白質の調製は、大腸菌内で YsiA を過剰に生産させ、均一に精製した (Fig. 7)。この精製した YsiA を分子量マーカーと共にゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供することによって、ダイマー蛋白質 (Mr = 40.2 kDa) であることが判明した。精製した YsiA 蛋白質を用いたゲル移動度シフト解析およびフットプリント解析は、*ysiA*、*ykuF*、*yhfL*、*yusL*、および *ywjF* プロモーター付近に存在するパルンドロ

ーム配列が YsiA の結合する YsiA-box であることを証明した (Fig. 9)。Fig. 8B に示したように、YsiA-box から推定した共通配列は WTGAATGAMT ANTCATTCAN (W、M、および N は、それぞれ A または T、A または C、およびいずれかの塩基) であり、これらの配列は YsiA への親和性を示す Kd 値およびパンドローム構造の適合性の一致により 3 つのグループ (*ysiA* と *ykuF*; *yusL* と *yhfl*; *ywjF*) に分類できた。YsiA-box_{*ysiA*} および YsiA-box_{*ykuF*} を比較すると、5 つ全ての YsiA-box に共通な塩基を除くと、5、9、および 10 番目の位置にある A、A、および T が保存されていた (Fig. 8B)。同様の位置にある YsiA-box_{*yusL*} および YsiA-box_{*yhfl*} の配列には、A、C、および T 塩基が観察された。しかし、YsiA-box_{*ywjF*} には保存されていなかった。このように、これらの塩基置換が、YsiA の DNA への結合性を示す Kd 値の変化を決定付けていると考えられた。

5 つの YsiA-box の配列を用いたウェブ上の GRASP-DNA 検索³²⁾は、これらの配列をベスト 5 として点数付け、*lcfA-ysiA-B-etfB-A*、*ykuF-G*、*yusM-L-K-J*、*ywjF-acdA-rpoE*、および *yhfl* の領域にある YsiA-box 以外の新たな候補を見つけることはできなかった。また、5.1-kb *lcfA-ysiA-B-etfB-A* および 7.0-kb *yusM-L-K-J* 転写産物の合成は、*lcfA* および *yusM* の上流のプロモーター領域に YsiA-box 様配列を持たずに、YsiA の負の制御下にあった。この YsiA による間接的な転写調節の説明は、これら転写産物の合成および (または) 翻訳が YsiA により制御される他の転写制御因子によって引き起こされると推測された。しかし、その制御因子の存在を実験的に証明するに至っていない。

枯草菌 YsiA は、長鎖アシル-CoA をインデューサーとした脂肪酸代謝のグローバルな転写制御因子である大腸菌 FadR の機能ホモログであると推測された¹¹⁾。FadR のように、14 から 20 炭素の長鎖アシル-CoA が YsiA 蛋白質の YsiA-box への結合を妨げるように作用する YsiA レギュロンのインデューサーだと考えられた (Fig. 10)。YsiA の標的遺伝子の pMUTIN 破壊株を用いた *in vivo* 実験 (Fig. 11) では、*yusJ*、*etfB*、および *etfA* の破壊によってアシル-CoA 脱水素反応の破壊が生じるため、分岐および直鎖の長鎖アシル-CoA が蓄積し、YsiA の標的遺伝子への抑制を解除しているであろうことが示された。加えて、脂肪酸の β -酸化へ直接的に関与している *ysiB*、*yusJ*、*yusL*、および *yusK* の破壊は、パルミチン酸を唯一の炭素源として生育させたとき、長鎖アシル-CoA が蓄積され、それにより β -Gal が誘導されたと考えられた (Fig. 12)。さらに YsiA により直接的に抑制されるプロモーターを追跡した Fig. 12 の実験では、パルミチン酸培地による細胞増殖の間、多くの遺伝子で YsiA の脱抑制がみられ誘導していた。しかし、*yhfl*、*ykuF*、*ywjF*、および *acdA* の破壊株では、インデューサーである長鎖アシル-CoA は他の遺伝子の機能により補完されたため代謝され、それらのプロモーターを抑制する YsiA の非活性化は生じないと考えられた。これら *in vivo* の結果は、YsiA レギュロンのインデューサーが長鎖アシル-CoA であるという *in vitro* の発見を補うものとなった。

pMUTIN 挿入による *lacZ* 融合株の実験 (Fig. 11) は、YsiA により制御される脂肪酸 β -酸化に直接的に関与する *yusJ*、*yusL*、*yusK*、*ysiB*、*etfA*、および *etfB* 以外の遺伝子の β -Gal 活性から、それら遺伝子が、LB 培地での増殖において、YsiA により常に抑制されていることが示された。すなわち、このとき誘導がみられなかった遺伝子は長鎖アシル-CoA の蓄積を引き起こさず、YsiA が常に活性化されていると考えられた。さらに、IPTG をこの培地に加えたときの *ysiB*、*yusL*、および *yusK* 遺伝子の単独破壊の状態では、 β -Gal 合成の誘導が生じないことから、これら遺伝子は LB 培地での定常期では他のパラログ遺伝子により補われていることが

枯草菌の脂肪酸分解に関する YsiA レギュロンの構成と機能

示唆された。

etfA, *etfB*, *yusL*, *yusK*, および *yusJ* 遺伝子の破壊は、脂肪酸の β -酸化経路に関与しており (Fig. 1)、パルミチン酸の資化利用に明らかな影響を及ぼした (Fig. 12)。しかしながら、アシル-CoA デヒドロゲナーゼをコードする *yusJ* 破壊の生育障害は 3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ/エノイル-CoA ヒドラターゼ複合体およびアセチル-CoA C-アシルトランスフェラーゼをそれぞれコードするであろう *yusL*, および *yusK* の破壊よりも寛容であった。この結果は、パルミチン酸培地での生育において、YusJ はパルミチン酸のアシル-CoA 脱水素反応をパラログ関係にある AcdA により補って触媒しているのに対し、YusL, および YusK のパラログはそれぞれの反応を補えないため、極端に生育が遅延したのだと考えられた。さらに、長鎖脂肪酸 CoA リガーゼである LcfA または YhfL の破壊は、パルミチン酸の資化利用には影響を及ぼさなかったため、お互いにまたは他のパラログな機能を持つ酵素に補われていると考えられた。その他、ペプチドグリカン結合ドメインを持つ細胞壁蛋白質だと考えられる YkuG の欠失は、パルミチン酸の資化利用に大きく影響を及ぼしたため、この蛋白質は長鎖脂肪酸の輸送に関わるのかもしれない。4Fe-4S フェレドキシン蛋白質である YwjF は、アシル-CoA 脱水素反応に関わるであろうと考えられたが、破壊株を用いた *in vivo* の実験では予測するような結果は観察されなかった (Fig. 11 および 12)。また、パルミチン酸の資化利用実験および発現解析などからは、YusM および RpoE がどのように脂肪酸代謝に関与しているのかは不明のままであった。しかしながら、*rpoE* 破壊株では、形態変化や定常期からの復帰を遅らすことが示されており³⁵⁾、この知見と脂肪酸分解との関わりは大変興味深い研究内容である。

大腸菌において、FadR 蛋白質は脂肪酸代謝の制御における中心的な役割を果たす転写因子であり、脂肪酸の β -酸化および生合成を調節する鍵となる酵素の発現を必要に応じて巧妙に制御するスイッチとして働く^{7, 8)}。枯草菌における脂肪酸代謝は、FapR (脂肪酸とリン脂質合成を調節している)¹²⁾と YsiA (脂肪酸分解を調節している) により調節されている。FapR はマロニル-CoA の *in vivo* 濃度を感知し、非活性化する¹²⁾。一方、YsiA は長鎖アシル-CoA の *in vivo* 濃度の増加により非活性化する (Fig. 10, 11)。このことは、枯草菌ではこれら2つの転写因子が脂肪酸の合成と分解を必要に応じて調節する大腸菌 FadR のような重複制御機構を反映しているのかもしれない。

BLASTP 類似性検索¹⁷⁾により、YsiA が *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, および他の近縁の属を含むグラム陽性細菌に高度に保存されていることが明らかになった。そこで、*Bacillus* およびその近縁の属の YsiA 配列のアライメントを Fig. 13 に示した。意外なことに、YsiA のオルソログは、*Metanosarcina* (古細菌)、および *Bordetella*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* (β -プロテオバクテリア) といった離れた属にも見つかった。また、膜脂質合成のグローバルな転写因子 FapR は、*Bacillus*, *Listeria*, および *Staphylococcus* 属、および *Clostridium* や他の近縁属に保存されているが、転写因子 YsiA は、*Listeria*, *Staphylococcus* 属には保存されていないことは注目すべき点であり、この YsiA オルソログのユニークな分布は、分子進化の過程で生じる遺伝子の水平伝播を意味しているであろうと考えられた。

枯草菌 YsiA の N 末端領域における、アミノ酸の 27 から 48 番目までに位置するヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを NPS@ (network protein sequence analysis)³⁶⁾により予測した (Fig. 1)。最近、Structural GenomiX

Inc. (SGX) が実施して、細菌ゲノム構造プロジェクト³⁷⁾の枠組みの中で、この枯草菌 YsiA の結晶構造が機能未知のユニークな蛋白質の1つとして決定され、Protein Data Base でコード 1VIO³⁸⁾として登録された。Fig. 13 に示したように、8つの α -ヘリックスが確認されており、7および8のヘリックスは YsiA ホモダイマーの安定化に関与している(本研究でも、YsiA が2つの同一のサブユニットから構成されるホモダイマーであることを明らかにした)。このとき、YsiA 蛋白質は1分子のラウロイル-CoA を含んでいることが示され³⁸⁾、ラウロイル-CoA の H および O 元素と水素結合を形成するアミノ酸の同定を可能とした。しかしながら、ラウロイル-CoA は YsiA と YsiA-box_{ywjF} 間の複合体形成へ若干の干渉を示すが、YsiA ダイマー構造の変化を生じさせ、YsiA-DNA 複合体形成を阻害するには至らないと考えられた (Fig. 10)。Fig. 13 に示すように、ラウロイル-CoA と相互作用するのは YsiA ダイマーの両サブユニット由来のアミノ酸であり、共に C 末端領域に分布していた。それとは対照的に、大腸菌 FadR では、ホモダイマー蛋白質のうちの1つのサブユニットに1分子の長鎖アシル-CoA が独占的に埋め込まれている^{39, 40)}。しかし、YsiA に埋め込まれたアシル-CoA の親水性部位であるアデノシン 3'リン酸および2リン酸部分は、大腸菌 FadR のように溶媒にさらされていた。これらのことから、長鎖アシル-CoA または YsiA-box (DNA) のいずれかと相互作用を示すユニークな YsiA 転写因子の結晶構造解析は、今後の研究の極めて興味深い課題であると思われる。

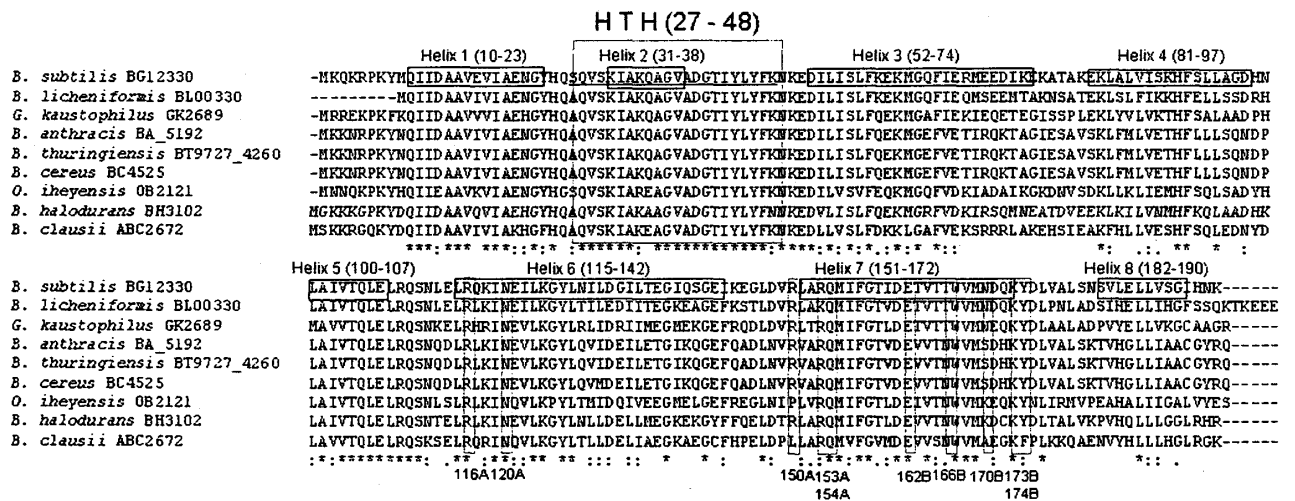


Fig. 13. 様々な低 GC グラム陽性細菌の YsiA 配列中の高度な保存
 様々な低 GC グラム陽性細菌の YsiA 配列のアライメントを示す。22 アミノ酸から構成されるヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフは、NPS@ (network protein sequence analysis)³⁶⁾を用いて枯草菌 YsiA の N 末端領域に予測された。YsiA 蛋白質の X 線結晶化解析により同定された8つの α -ヘリックス³⁷⁾は、アミノ酸配列をボックスで囲んだ。 α -ヘリックス7および8は YsiA サブユニットのダイマー形成へ関与することが示されている。大腸菌内で生産させた YsiA 蛋白質はダイマー当り1分子のラウロイル-CoA 含み、相互作用するアミノ酸が同定されており、そのアミノ酸番号をアミノ酸配列の下方に示した。YsiA ダイマーの2つのサブユニットからのアミノ酸を、それぞれ A および B で示した。略語: B, *Bacillus*; G, *Geobacillus*; O, *Oceanobacillus*。

文献

- 1) Cronan, J. E., Jr., and Rock, C. O. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, F. C., Curtiss, R., III, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechfer, M., and Umberger, H. E., eds) 2nd. Ed., pp. 612-636, ASM Press, Washington, D. C. (1996)
- 2) Rock, C. O., and Cronan, J. E., *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1320**, 1-16 (1996)
- 3) Rock, C. O., and Jackowski, S., Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 1155-1166 (2002)
- 4) Choi, K. H., Heath, R. J., and Rock, C. O., beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **182**, 365-370 (2000)
- 5) Campbell, J. W., and Cronan, J. E., Jr., Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery., *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 305-332 (2001)
- 6) de Mendoza, D., Schujman, G. E., and Aguilar, P. S., *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds), pp. 43-55, ASM Press, Washington, D. C. (2002)
- 7) Cronan, J. E., Jr., and Subrahmanyam, S., FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency., *Mol. Microbiol.* **29**, 937-943 (1998)
- 8) DiRusso, C. C., and Nyström, T., The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Mol. Microbiol.*, **27**, 1-8 (1998)
- 9) Campbell, J. W., and Cronan, J. E., Jr., *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the fabB fatty acid biosynthetic gene. *J. Bacteriol.*, **183**, 5982-5990 (2001)
- 10) Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O., and Cronan, J. E., Jr., Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **57**, 522-542 (1993)
- 11) DiRusso, C. C., Heimert, T. L., and Metzger, A. K., Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. Interaction with the fadB promoter is prevented by long chain fatty acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8685-8691 (1992)
- 12) Schujman, G. E., Paoletti, L., Grossman, A. D., and de Mendoza, D., FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis. *Dev. Cell*, **4**, 663-672 (2003)
- 13) Bryan, E. M., Beall, B. W., and Moran, C. P., Jr., A sigma E dependent operon subject to catabolite repression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **178**, 4778-4786 (1996)

- 14) Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I. *et al.*, The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, **390**, 249-256 (1997)
- 15) Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., and Nakaya, A., The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 42-46 (2002)
- 16) Koburger, T., Weibezahn, J., Bernhardt, J., Homuth, G. and Hecker, M., Genome-wide mRNA profiling in glucose starved *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Gen. Genomics*, **274**, 1-12 (2005)
- 17) Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402 (1997)
- 18) Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J., Requirement for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **81**, 741-746 (1961)
- 19) Wach, A., PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 259-265 (1996)
- 20) Horinouchi, S., and Weisblum, B., Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.*, **150**, 815-825 (1982)
- 21) Yoshida, K., Ishio, I., Nagakawa, E., Yamamoto, Y., Yamamoto, M., and Fujita, Y., Systematic study of gene expression and transcription organization in the gntZ-ywaA region of the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology*, **146**, 573-579 (2000)
- 22) Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T., and Fujita, Y., 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)
- 23) Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Fujita, Y., and Tanaka, T., DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3804-3813 (2001)
- 24) Kobayashi, K., Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Ogasawara, N., Tanaka, T., and Fujita, Y., Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *J. Bacteriol.*, **183**, 7365-7370 (2001)
- 25) Sambrook, J., and Russell, D. W., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001)
- 26) Yoshida, K., Aoyama, D., Ishio, I., Shibayama, T., and Fujita, Y., Organization and transcription of the *myo*-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **179**, 4591-4598 (1997)

枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

- 27) Yoshida, K., Yamamoto, Y., Omae, K., Yamamoto, M., and Fujita, Y., Identification of two myo-inositol transporter genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **184**, 983-991 (2002)
- 28) Seubert, W. *Biochem. Prep.*, **7**, 80-83 (1960)
- 29) Vagner, V., Dervyn, E., and Ehrlich, S. D., A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **144**, 3097-3104 (1998)
- 30) Fujita, Y., and Freese, E., Isolation and properties of a *Bacillus subtilis* mutant unable to produce fructose-bisphosphatase. *J. Bacteriol.*, **145**, 760-767 (1981)
- 31) Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L., Studholme, D. J., Yeats, C., and Eddy, S. R., The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **32**, D138-141 (2004)
- 32) Schilling, C. H., Held, L., Torre, M., and Saier, M. H., Jr., GRASP-DNA: a web application to screen prokaryotic genomes for specific DNA-binding sites and repeat motifs. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 495-500 (2000)
- 33) de Mendoza, D., Grau, R., and Cronan, J. E., Jr., *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds), pp. 411-421, ASM Press, Washington, D. C.
- 34) Nunn, W. D., A molecular view of fatty acid catabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **50**, 179-192 (1986)
- 35) de Saro, F. J. L., Yoshikawa, N., and Helmann, J. D., Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15953-15958 (1999)
- 36) Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deléage, G., NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 147-150 (2000)
- 37) Badger, J., Sauder, J. M., et al., , Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins*, **60**, 787-796 (2005)
- 38) Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E., The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242 (2000)
- 39) van Aalten, D. M. F., DiRusso, C. C., Knudsen J., and Wierenga R. K., Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold. *EMBO J.*, **19**, 5167-5177 (2000)
- 40) Xu, Y., Health, R. J., Li, Z., Rock, C. O., and White, S. W., The FadR-DNA complex. Transcriptional control of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 17373-17379 (2001)

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (6), 1-24

Organization and function of the YsiA regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation

Hiroshi Matsuoka

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

The organization and function of the *Bacillus subtilis* YsiA regulon involved in fatty acid degradation were investigated. Northern and primer extension analyses indicated that this regulon comprises five operons, i.e., *lcfA-ysiA-B-etfB-A*, *ykuF-G*, *yhfL*, *yusM-L-K-J*, and *ywjF-acdA-rpoE*. YusJ and AcdA, YsiB and YusL, and YusK presumably encode acyl-CoA dehydrogenases, 3-hydroxyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase complexes, and acetyl-CoA C-acyltransferase, respectively, which are directly involved in the fatty acid β -oxidation cycle. In addition, LcfA and YhfL are likely to encode long-chain acyl-CoA ligases. On gel retardation and footprinting analyses involving the purified YsiA protein, we identified *cis*-sequences for YsiA-binding (YsiA-boxes) in the promoter regions upstream of *ysiA*, *ykuF*, *yusL*, *yhfL*, and *ywjF*, the equilibrium dissociation constants (K_D) for YsiA-binding being 20, 21, 37, 43, and 65 nM, respectively. YsiA binding was specifically inhibited by long-chain acyl-CoAs with 14-20 carbon atoms, acyl-CoAs with 18 carbon atoms being more effective; out of long-chain acyl-CoAs tested, monounsaturated oleoyl-CoA and branched-chain 12-metyltetradecanoyl-CoA were most effective. These *in vitro* findings were supported by the *in vivo* observation that the knockout of acyl-CoA dehydrogenation through *yusJ*, *etfA*, or *etfB* disruption resulted in YsiA inactivation, probably due to the accumulation of long-chain acyl-CoAs in the cells. Furthermore, the disruption of *yusL*, *yusK*, *yusJ*, *etfA*, *etfB*, or *ykuG* affected the utilization of palmitic acid, a representative long-chain fatty acid. Based on this work, *ysiA*, *ysiB*, *ykuF*, *ykuG*, *yhfL*, *yusM*, *yusL*, *yusK*, *yusJ*, and *ywjF* can be renamed *fadR*, *fadB*, *fadH*, *fadG*, *lcfB*, *fadM*, *fadN*, *fadA*, *fadE*, and *fadF*.

Key words : fatty acid, beta-oxidation, acyl-CoA, transcription factor, utilization, *Bacillus subtilis*