

枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成トリガーへの 正の緊縮転写制御の関与

東條繁郎*、広岡和丈、藤田泰太郎

枯草菌は、デコイニンで処理すると GMP 合成酵素が阻害されることにより緊縮転写制御を引き起こす。この制御は、アミノ酸供給が制限されたときに Re1A が合成するグアノシン 5'-二リン酸 3'-二リン酸 (ppGpp) によって間接的に引き起こされる制御と同じである。緊縮制御によりそれぞれ活性化あるいは抑制を受ける遺伝子群の転写開始部位はアデニンあるいはグアニンであり、転写開始は緊縮制御で引き起こされる菌体内の ATP 濃度の上昇と GTP 濃度の減少で制御されている。デコイニンはまた、最少培地での孢子形成を誘導することが知られている。デコイニン添加条件での DNA マイクロアレイ解析によって、孢子形成を誘導するリン酸リレー系の主要なセンサーキナーゼをコードし、ともに転写開始点のアデニンである *kinA* と *kinB* の転写量が上昇することが明らかになった。そこで、*kinA* と *kinB* のコアプロモーター領域を用いた *lacZ* 融合解析を行ったところ、*kinA* と *kinB* がデコイニンによる誘導を受けることを確認した。また、この誘導は CodY と AbrB による制御から独立していることを示した。*kinA* と *kinB* の転写開始点のアデニンをグアニンに置換すると、デコイニンによる誘導が消失した。ゲノム上のこれらの転写開始点のアデニンからグアニンへの置換は、孢子形成栄養培地、デコイニンを含む最少培地、およびデコイニンを含まない最少培地での孢子形成に有意に影響を与えた。これらより、生体内の ATP 濃度の増加により引き起こされる *kinA* と *kinB* の転写の活性化が孢子形成リン酸リレーのトリガーとなることが考えられた。

キーワード：枯草菌 *Bacillus subtilis*、緊縮制御、孢子形成、リン酸リレー

孢子形成経路へのエントリーは、応答調節因子ファミリーの一員である Spo0A によって支配される (図 1)¹⁾。ほとんどの応答調節因子では、特定のセンサーキナーゼのヒスチジン残基の自己リン酸化が行われ、そのリン酸基が、応答調節因子のアスパラギン酸残基に転移して活性化される。対照的に、Spo0A は、少なくとも KinA、KinB および KinC の 3 つのセンサーキナーゼが関係する多成分リン酸リレーによって間接的にリン酸化される²⁾。Spo0F がリン酸化されて Spo0F~P となり、このリン酸が次に Spo0B に転移して Spo0B~P となり、

〒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: stojo@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

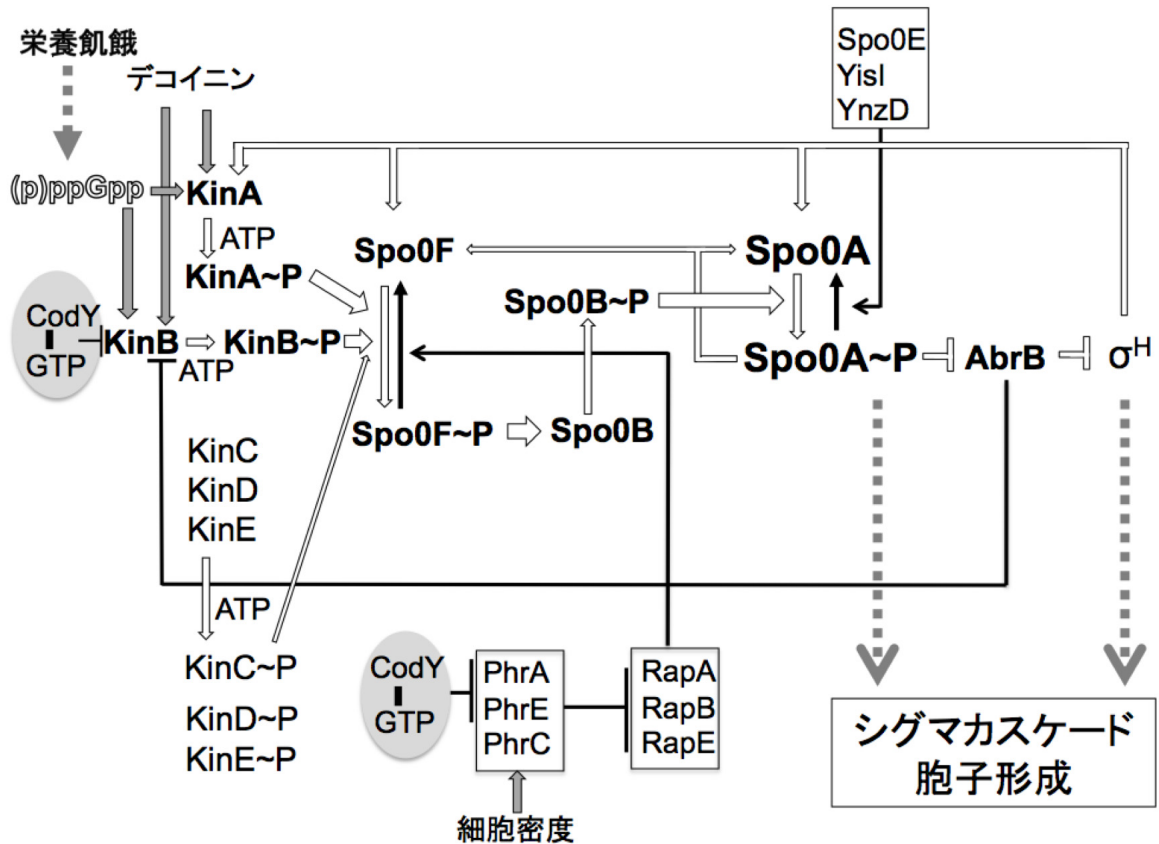


図 1. 枯草菌の胞子形成を誘導するリン酸リレー制御ネットワーク 栄養源の枯渇もしくはデコイニン添加により 2 つの主要なセンサーキナーゼ (KinA と KinB) が自己リン酸化される。加えて、3 つのマイナーなセンサーキナーゼ (KinC、KinD と KinE) も Spo0F のリン酸リレーに関連することが予想されたが¹⁰⁾、これらのセンサーキナーゼのリン酸リレーへの関与は、それ程重要でないことが分かった^{11, 12)}。KinA~P と KinB~P は、Spo0F~P と Spo0B~P を介して、胞子形成のマスター制御因子である Spo0A にリン酸を供与して Spo0A~P を生じさせる。Spo0A~P は、胞子形成遺伝子群 (Spo0A、Spo0F と AbrB を含む) の正もしくは負の制御因子となる。AbrB は、KinB と胞子形成に必須のシグマ因子であり *kinA* の転写を担う σ^H を抑制する。*kinA*、*spo0F* と *spo0A* の転写が高まると、自己強化型の閉鎖ループ系が作動する。その結果、Spo0A~P と σ^H により胞子形成に向かうシグマカスケードが誘導される。*kinB* 遺伝子は、CodY の標的遺伝子であると考えられている¹³⁾。細胞外に Phr ペプチドが放出され、プロセッシングを受け、ペンタペプチドとして細胞内に取り込まれることにより細胞密度が感知され、Rap タンパク質 (RapA、RapB と RapE) により Spo0F~P の脱リン酸が引き起こされる。*phrA* と *phrE* 遺伝子は、CodY の標的遺伝子である¹³⁾。Spo0A~P は、Spo0E^{14, 15)} とそのホモログである YisI と YnzD¹⁶⁾ (この 2 つのタンパク質は、非胞子形成状態で発現) により脱リン酸化を受ける。白抜きと灰色の矢印および黒の矢印は、それぞれ胞子形成に向かう、あるいはその反対を示している。

さらにリン酸基が Spo0A に転移して Spo0A~P となる (図 1)³⁾。Spo0A~P 濃度の上昇は *abrB* の転写を抑制し、*kinB* と RNA ポリメラーゼ (RNAP) の σ サブユニットの 1 つである σ^H をコードする *sigH* (*spo0H*) の脱抑制につながる^{4, 6, 7)}。その結果、 σ^H RNAP の濃度が上昇し、*kinA*、*spo0F* と *spo0A* の転写が誘導される (図 1)^{1, 8)}。加えて、Spo0A~P は *spo0A* と *spo0F* の転写誘導に必要であり^{5, 7, 9)}、それにより自己強化型の閉鎖ループ系が形成

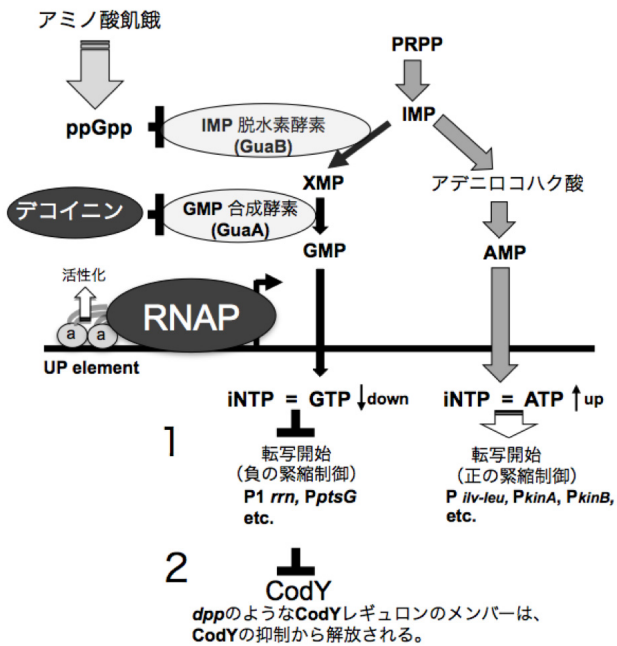


図 2. 枯草菌での緊縮制御の分子機構 ppGpp は、アミノ酸飢餓条件で RelA によって合成され、IMP 脱水素酵素阻害剤として機能する。その阻害により、GTP 濃度の減少と ATP 濃度の増加が引き起こされ、多数の緊縮制御遺伝子群の転写の誘導と抑制が起こる。負の緊縮制御を受ける、*P1rrn*²⁸⁾、*PptsGHI*²⁵⁾ などの転写開始点部位はグアニンであり、一方、正の緊縮制御を受ける、*Pilv-leu*^{23, 24)}、*PkinA*、*PkinB* などの転写開始部位はアデニンである。これらの抑制または活性化を受ける緊縮制御プロモーターの開始ヌクレオチド三リン酸 (iNTP) はそれぞれ GTP と ATP である。緊縮制御で起こる GTP 濃度の減少と ATP 濃度の上昇によって、負の制御を受ける緊縮制御プロモーターは抑制され、正の制御を受ける緊縮制御プロモーターは活性化される。GMP 合成阻害剤であるデコイニンは、GTP 濃度と ATP 濃度を ppGpp 同様に变化させる。CodY レギュロンである *dpp*²⁹⁾ などは、CodY の補因子である GTP 濃度の低下により CodY が不活化されるため脱抑制される。

される。

しかしながら、栄養飢餓の際、最初にこれらネットワークのどの成分が活性化することでリン酸リレーが開始されるのかという重大な問題に対して答えが見つかっていなかった。これまでのところ、細胞内 GTP 濃度が GTP 応答性抑制因子である CodY によってモニターされることが知られている^{17, 18)}。細胞が栄養豊富な培地で生育している時は細胞内 GTP 濃度は高く、CodY によって負に制御される遺伝子群が抑制された状態となる。栄養が制限された条件では GTP 濃度が低下し、これらの遺伝子が脱抑制される。*kinB* 遺伝子は CodY の標的遺伝子であることが全ゲノム転写解析により明らかにされているが¹³⁾、CodY 欠損株でも増殖時に高頻度の胞子形成を引き起こさないことから、CodY が胞子形成開始の第一の制御因子ではないと考えられた¹⁷⁾。

25 年以上前に、代謝されやすい炭素、窒素およびリン酸の栄養源が豊富にある条件で増殖している枯草菌に、デコイニンを添加すると胞子形成が誘導されることが発見された¹⁹⁾。デコイニンは、GMP 合成酵素を阻害し、RNAP の基質である GTP 濃度の減少と ATP 濃度の上昇を引き起こす (図 2)^{21, 25, 28)}。これらの相反する GTP 濃度と ATP 濃度の変化は、緊縮応答で活性化した RelA により合成された ppGpp による IMP 脱水素酵素阻害によっても引き起こされる^{20, 22, 23, 24)}。多数の緊縮制御プロモーターは、転写開始部位の塩基種、アデニン (A) とグアニン (G) に依存して、GTP と ATP 濃度の変化を感知し、それぞれ転写を活性化もしくは抑制する (図 2)。このように、この緊縮転写制御には転写制御因子は関与しない。 $\Delta codY$ 株とデコイニンをを用いた DNA マイクロアレイ解析²⁵⁾では、多数の緊縮制御遺伝子の中に *kinA* と *kinB* が含まれていた。これらの転写開始点は A であり^{26, 27)}、このことがデコイニンによる誘導に関与すると考えられた。

本報告では、*kinA* と *kinB* の転写開始点にある A を G に置換した結果、デコイニンによる誘導が消失し、さらに、ゲノム上にコードされる *kinA* と *kinB* の転写開始点を G に置換した株での胞子形成は、デコイニン

添加によっても部分的にしか起こらないことを明らかにした。これらの結果より、*kinA* と *kinB* の緊縮制御時の誘導は、細胞内 ATP 濃度の上昇により引き起こされ、それによってリン酸リレーが作動して孢子形成が開始することが示唆された。

材料と方法

枯草菌株の構築

本実験に使用した菌株を表 1 に示した。 Δ *abrB*::*erm* 株である FU1106 株は、組換え PCR を利用して構築した。始めに、*abrB* 遺伝子上流域と下流域を ABu-F/ABu-R と ABd-F/ABd-R (表 2) の各々のプライマー対で、野生株 (168 株) DNA を鋳型に PCR を用いて増幅した。また、エリスロマイシン耐性遺伝子断片をプラスミド pMUTIN2 を鋳型に EM-F/EM-R のプライマー対で PCR を用いて増幅した。次に、これら 3 つの断片を組換え PCR で 1 つに連結するため、ABu-F/ABd-R のプライマー対で増幅した。得られた断片は、*abrB* 上流域-エリスロマイシン耐性遺伝子-*abrB* 下流域の構成となる。この断片を用いて 168 株の形質転換を行い、選択培地としてエリスロマイシン (0.3 μ g/ml) と 10 mM グルコース含有する tryptose blood agar base (Difco 社) (TBABG) 培地プレートで培養した。 Δ *kinA*::*erm* 株である FU1095 株と Δ *kinB*::*Km* 株である FU1096 株は、それぞれ法政大学の佐藤勉先生と奈良先端大学院大学の小林和夫先生から提供された。 Δ *kinA*::*erm* Δ *kinB*::*Km* 株である FU1098 株は、FU1096 株の DNA を用いた FU1095 株の形質転換を行い、エリスロマイシン (0.3 μ g/ml) とカナマイシン (5 μ g/ml) を含む TBABG プレートで選択した。PS37t 株 (*gid*::*spc* Δ *codY*) は、PS37 株 (*gid*::*spc* Δ *codY*) の DNA を用いて 168 株を形質転換し、スペクチノマイシン (60 μ g/ml) を含む TBABG プレートを用いて選択した。FU1063 株 (*gid*::*spc* Δ *codY* Δ *kinA*) と FU1064 株 (*gid*::*spc* Δ *codY* Δ *kinB*) 株は、それぞれ FU1095 株 (Δ *kinA*) と FU1096 株 (Δ *kinB*) DNA を用いて PS37t 株の形質転換を行い、エリスロマイシン (0.3 μ g/ml) あるいはカナマイシン (5 μ g/ml) を含む TBABG プレートで選択した。PS37t 株、FU1063 株と FU1064 株での *codY* 欠失は、各菌株から抽出した DNA を鋳型に用いた PCR 法で確認した (Δ *codY* 株は野生型 *codY* と比べて約 250 bp 短い)³⁵⁾。使用した Δ *codY* 株では *gid* 遺伝子にスペクチノマイシン耐性遺伝子が挿入されているが、本研究の結果に影響はない。

kinA と *kinB* のプロモーターコア領域 (-55/+10) (+1: 転写開始点) の *lacZ* 融合をもつ株を次のようにして構築した。すでに報告のある *kinA*²⁶⁾ と *kinB*²⁷⁾ の転写開始点に基づき、各々の -55/+10 領域を KA-F1/KA-R1 と KB-F1/KB-R1 (表 2) のプライマー対で 168 株 DNA を鋳型に PCR で増幅した。これらの PCR 産物には、両端に XbaI と BamHI 部位がそれぞれ挿入されており、これらの制限酵素で処理後プラスミド pCRE-TEST2³⁶⁾ に同じ部位で連結した。得られたプラスミドを用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、アンピシリン (50 μ g/ml) を含む LB 培地プレート³⁷⁾ で選択した。プラスミドに挿入された断片の配列決定を行い、非特異的変異導入のないことを確認した。各プラスミドは PstI 処理で直線化し、これを用いて 168 株の形質転換を行い、クロラムフェニコール (5 μ g/ml) を含む TBABG プレートで選択し、それぞれ *PkinA-lacZ* と *PkinB-lacZ* をもつ

枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成トリガーへの正の緊縮制御の関与

FU1087 株と FU1115 株を作製した。

kinA と *kinB* の転写開始点の A を G に置換したプロモーターコア領域 (-55/+10) と *lacZ* 融合をもつ菌株は次のように構築した。-55/+10 領域を KA-F1/KA-R1g と KB-F1/KB-R1g (表 2) のプライマー対で 168 株の DNA

表 1. 本研究で使用した菌株

株名	遺伝子型	参考文献
168	<i>trpC2</i>	30
PS37	<i>trpC2 gid::spc ΔcodY</i>	31
PS37t	<i>trpC2 gid::spc ΔcodY</i>	本研究
FU1095	<i>trpC2 ΔkinA::erm</i>	本研究
FU1096	<i>trpC2 ΔkinB::km</i>	本研究
FU1063	<i>trpC2 gid::spc ΔcodY ΔkinA::erm</i>	本研究
FU1064	<i>trpC2 gid::spc ΔcodY ΔkinB::km</i>	本研究
FU1098	<i>trpC2 ΔkinA::erm ΔkinB::km</i>	本研究
ASK201	<i>trpC2 Δspo0H::erm</i>	32
FU1121	<i>trpC2 Δspo0A::spc</i>	33
TM0310	<i>trpC2 aprE::[spc lacI P_{spac}-mazF]</i>	34
FU1106	<i>trpC2 ΔabrB::erm</i>	本研究
FU1087	<i>trpC2 amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1088	<i>trpC2 amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究
FU1115	<i>trpC2 amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1116	<i>trpC2 amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究
FU1107	<i>trpC2 Δspo0H::erm amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1108	<i>trpC2 Δspo0H::erm amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究
FU1117	<i>trpC2 Δspo0H::erm amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1118	<i>trpC2 Δspo0H::erm amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究
FU1109	<i>trpC2 gid::spc ΔcodY amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1110	<i>trpC2 gid::spc ΔcodY amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究
FU1119	<i>trpC2 gid::spc ΔcodY amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1120	<i>trpC2 gid::spc ΔcodY amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究
FU1111	<i>trpC2 ΔabrB::erm amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1112	<i>trpC2 ΔabrB::erm amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究
FU1122	<i>trpC2 ΔabrB::erm amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1123	<i>trpC2 ΔabrB::erm amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究
FU1124	<i>trpC2 Δspo0A::spc amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1125	<i>trpC2 Δspo0A::spc amyE::[cat P_{kinA} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究
FU1126	<i>trpC2 Δspo0A::spc amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) -lacZ]</i>	本研究
FU1127	<i>trpC2 Δspo0A::spc amyE::[cat P_{kinB} (-55/+10) (A+1G) -lacZ]</i>	本研究

FU1102	<i>trpC2 kinA</i> (A+1G)	本研究
FU1103	<i>trpC2 kinA</i> (A+1G) $\Delta kinB::km$	本研究
FU1113	<i>trpC2 kinB</i> (A+1G)	本研究
FU1114	<i>trpC2 kinB</i> (A+1G) $\Delta kinA::erm$	本研究

表 2. 本研究で使用したオリゴヌクレオチドプライマー

オリゴヌクレオチド	配列 ^a
ABu-F	gtgaaaacaccgtctgatccgaa
ABu-R	gcactatcaacacactcttaagaacattctctctccaagacatt
ABd-F	ggagctaaagaggtccctagcttaataatcatttctgtacaaaa
ABd-R	cgcaagacatgaaatccactgca
EM-F	cttaagagtgtgtgatagtg
EM-R	ctagggacctcttttagctcc
KA-F1	gtgtctagattgacgttcaccataagaata
KA-R1	gtgggatccacttttaccTagtatgattcg
KA-R1g	gtgggatccacttttaccCagtatgattcg
KB-F1	gtgtctagatcttaataaaggaattttatat
KB-R1	gtgggatccataaaataTgaatctattataa
KB-R1g	gtgggatccataaaataCgaatctattataa
MF-F	cgacagcggaattgactcaage
MF-R	cgcgatccctaccaatcagtagttaaatttg
KA-F2	ctctcgcaaagacaaaaaat
KA-R2	ctgattgggtaggatccgc <u>attgacttttaccCagtatgattcgc</u>
KA-F3	gagtcaattccgctgtcgggcaatcactGggtaaaagtcaat
KA-R3	ggtttgatccccgtttatataa
KB-F2	gatcggcagcgtttgttcaaaa
KB-R2	ctgattgggtaggatccgcttctgtataaaataCgaatctattataaacactaa
KB-F3	gagtcaattccgctgtcgggtataatagattcGtattttatacga
KB-R3	cacatccgctgttttgatga

^a 下線を引いた 26 bp と 27 bp 配列は、*kinA* と *kinB* の転写開始点を含む短いリピート領域を示している。大文字で示した塩基は、転写開始点である。

枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成トリガーへの正の緊縮制御の関与

を鋳型にして PCR で増幅した。この断片を用いて FU1087 株と FU1115 株の作製の際と同様の手順で、 $P_{kinA(A+1G)}-lacZ$ 、 $P_{kinB(A+1G)}-lacZ$ をそれぞれもつ FU1088 株 と FU1116 株を作製した。

$P_{kinA}-lacZ$ 、 $P_{kinB}-lacZ$ 、 $P_{kinA(A+1G)}-lacZ$ と $P_{kinB(A+1G)}-lacZ$ をそれぞれもつ FU1087 株、FU1115 株、FU1088 株と FU1116 株の DNA を用いて、 $\Delta spo0H::erm$ 、 $\Delta abrB::erm$ 、 $gid::spc \Delta codY$ と $\Delta spo0A::spc$ の遺伝子型をそれぞれもつ ASK201 株、FU1106 株、PS37t 株と FU1121 株を形質転換した。エリスロマイシン (0.3 $\mu\text{g/ml}$) とクロラムフェニコール (5 $\mu\text{g/ml}$) を含む TBABG 培地プレートを用いて選択し、 $\Delta spo0H$ である FU1107 株、FU1117 株、FU1108 株と FU1118 株を、 $\Delta abrB$ である FU1111 株、FU1122 株、FU1112 と FU1123 株を獲得した。スペクチノマイシン (60 $\mu\text{g/ml}$) とクロラムフェニコール (5 $\mu\text{g/ml}$) を含む TBABG プレートを用いて選択し、 $\Delta codY$ である FU1109 株、FU1119 株、FU1110 株と FU1120 株 (前述のように $\Delta codY$ の確認) を、 $\Delta spo0A$ である FU1124 株、FU1126 株、FU1125 株と FU1127 株を獲得した。

ゲノム上にコードされる *kinA* と *kinB* の転写開始点の A を G に置換した FU1102 株 [*kinA* (A+1G)] と FU1113 株 [*kinB* (A+1G)] の作製を、*mazF* 遺伝子 (大腸菌の RNA 分解酵素)³⁴⁾ を利用した方法で行った (図 3)。始めに、スペクチノマイシン耐性遺伝子、*lacI*、*Pspac* プロモーター支配下の *mazF* 遺伝子、および転写開始点の A を G に置換した *kinA* の上流領域と下流領域の 3 断片を、TM0310 株の DNA [*aprE::(spc lacI Pspac-mazF)*] を鋳型に用いて、プライマー対 MF-F/MF-R、KA-F2/KA-R2 と KA-F3/KA-R3 (表 2) のそれぞれを使用した PCR にて増幅した。さらに、これら 3RCR 断片を鋳型にした組換え PCR により連結し一つの断片を得た後、プライマー対 KA-F2/ KA-R3 を用いた PCR で増幅した。この増幅断片を用いて、168 株を形質転換してスペクチノマイシン (60 $\mu\text{g/ml}$) で選択後、IPTG (1 mM) を添加した TBABG 培地プレートでの自然組換えによりスペクチノマイシン感受性に復帰した株を取得した。この菌株の DNA を抽出して配列決定を行い、*kinA* 転写開始点が G に置換されていることを確認した。FU1113 株 [*kinB* (A+1G)] も FU1102 株 [*kinA* (A+1G)] の場合と同様な操作で構築した。最初の PCR には、MF-F/MF-R、KB-F2/KB-R2 と KB-F3/KB-R3 (表 2) のプライマー対を使用し、組み換え PCR には KB-F2/ KB-R3 のプライマー対を使用した。さらに、FU1102 株 [*kinA* (A+1G)] と FU1113 株 [*kinB* (A+1G)] を、それぞれ $\Delta kinB::km$ と $\Delta kinA::erm$ の遺伝型である FU1096 株と FU1095 株の DNA を用いて形質転換を行い、カナマイシン (5 $\mu\text{g/ml}$) もしくはエリスロマイシン (0.3 $\mu\text{g/ml}$) で選択し、FU1103 株 [*kinA* (A+1G) $\Delta kinB$] と FU1114 株 [*kinB* (A+1G) $\Delta kinA$] を獲得した。

培養、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) アッセイおよび孢子形成率の測定

lacZ 融合をもつ株は、適切な抗生物質 (クロラムフェニコール、エリスロマイシンとスペクチノマイシン) を添加した TBABG プレートで 30°C 一晩前培養した。得られた菌体を、25 mM グルコースとトリプトファン (50 $\mu\text{g/ml}$) を含有する S6 培地³⁸⁾ 50 ml に接種して培養した。OD₆₀₀ が 0.5 の時に 10 ml ずつ 2 つのフラスコに分注し、一方にデコイニン (500 $\mu\text{g/ml}$ (1.8 mM) になるように添加した。30 分毎に 1 ml ずつサンプリングを行い、 β -Gal アッセイに使用した。 β -Gal アッセイは、以前に報告した方法に従って行った³⁹⁾。デコイニン添加 10 時間後 (T10) にサンプリングし、熱処理 (75°C、20 分) を行った後に、TBABG 培地でプレート培養し、生細胞 (V) と孢子 (S) の数をそれぞれを計測して、孢子形成率 (S/V x 100) を算出した。また、栄養孢子形成

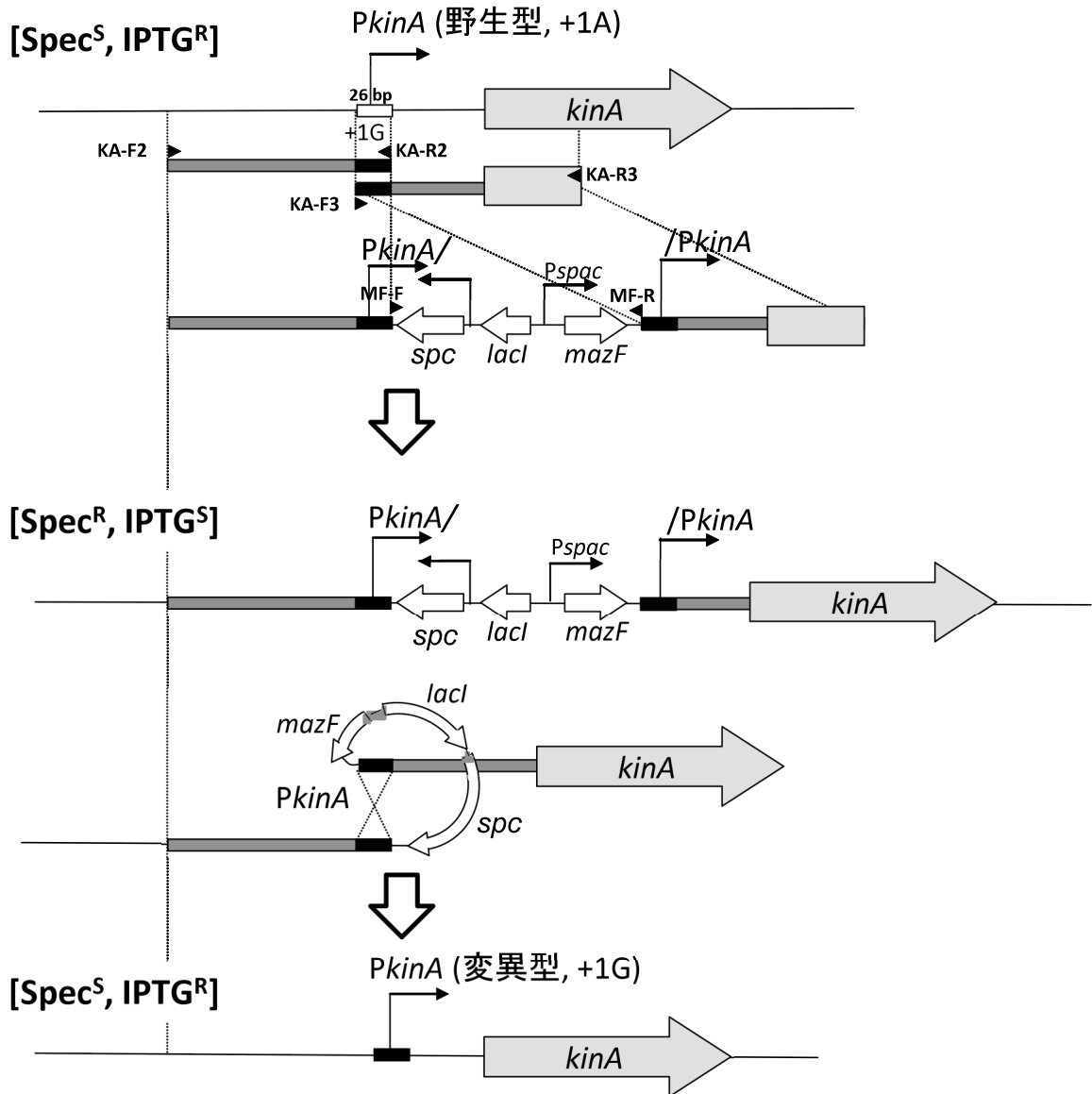


図 3. ゲノム上の *kinA* 転写開始点のアデニンのグアニンへの置換 *kinA* の転写開始点のアデニンのグアニンへの置換方法を示す。最初に、*kinA* 転写開始点の上流側と下流側の各断片で転写開始点をグアニンにしたものと、*mazF* カセット[スペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc*) + *lacI* + *Pspac* プロモーター制御下にある *mazF* 遺伝子]³⁴⁾ をそれぞれ PCR で増幅し、組換え PCR を用いてこれらの断片を連結した後、168 株(スペクチノマイシン感受性: Spec^S かつ IPTG 耐性: IPTG^R) を形質転換し、形質転換体(スペクチノマイシン耐性: Spec^R かつ IPTG 感受性: IPTG^S) を選択した。*mazF* カセットが相同配列組換えにより脱離することを利用して転写開始点がグアニンに置換した株 FU1102 株 [*kinA* (A+1G)、Spec^S IPTG^R] を得た。*kinB* の転写開始点をグアニンに置換した FU1113 株 [*kinB* (A+1G)] も同様の手順で作製した。

培地[nutrient sporulation medium(NSMP)]³⁸⁾を用いて培養を行い、T20 (定常期になって 20 時間後)の孢子形成率を同様に算出した。

結果

孢子形成開始時に作動するリン酸リレーに関わる遺伝子群のデコイニン添加による発現変動についての DNA マイクロアレイ解析

孢子形成経路へのエントリーは、転写制御因子である Spo0A によって制御される (図 1)^{4, 10}。リン酸リレ

表 3. デコイニン添加による孢子形成リン酸リレーに関連する *spo0* 遺伝子群の

<i>spo0</i> 遺伝子群	発現比率 (+デコイニン/-デコイニン)
<i>kinA</i>	3.33
<i>kinB</i>	1.96
<i>kinC</i>	0.657
<i>kinD</i> (<i>ykvD</i>)	1.53
<i>kinE</i> (<i>ykrQ</i>)	4.25
<i>spo0F</i>	8.09
<i>spo0B</i>	0.854
<i>spo0A</i>	4.31
<i>abrB</i>	0.546
<i>sigH</i>	1.92
<i>rapA</i>	14.4
<i>rapB</i>	4.84
<i>rapE</i>	2.06
<i>spo0E</i>	2.28
<i>ynzD</i>	0.560
<i>yisI</i>	0.752

この DNA マイクロアレイ解析については以前に報告している²⁵。このデータは、KEGG 発現データベース (<http://www-genome.jp/kegg/expression>)で見ることができる。

一が作動することにより、リン酸化された Spo0A (Spo0A^P) の濃度が増加し、それによって、孢子形成が誘導される。孢子形成の誘導に栄養飢餓が関わっていることはよく知られていたが、どのような成分の枯渇がリン酸リレーの引き金になるかは明らかでなかった。

最近、枯草菌の緊縮制御の分子機構が明らかになった (図 2)。アミノ酸飢餓になると RelA が ppGpp を合成し、これが IMP 脱水素酵素を阻害する。この阻害により、細胞内の GTP 濃度は低下し、逆に ATP 濃度は上昇する^{20,22,23,24})。ATP と GTP は RNAP の基質であるので、転写開始の 1 塩基目、2 塩基目の塩基種が A または G である場合、ATP と GTP の濃度変化に依存して多くの緊縮プロモーターがそれぞれ活性化または抑制を受ける^{23,25})。これに加えて、緊縮制御が孢子形成を誘導するという知見もあった^{22,40})。一方、デコイニンは GMP 合成酵素阻害剤で ppGpp に依存せずに GTP と ATP 濃度の変化を引き起こし²⁴)、緊縮転写制御を誘導する^{23,25})。また、デコイニンは代謝されやすい炭素源、窒素源やリン酸源の存在下での対数増殖期の細胞に対して孢子形成を誘導できることが知られていた¹⁹)。

以前に行った $\Delta codY$ 株を用いたデコイニン有無の条件での DNA マイクロアレイ解析の結果では、デコイニン添加により誘導された遺伝子群の中に孢子形成リン酸リレー (図 1) に関与する遺伝子群が含まれており²⁵) (DNA マイクロアレイデータは、KEGG 発現データベース <http://www.genome.jp/kegg/expression>にある)、CodY は高頻度の孢子形成過程の主要な開始因子ではないと推察された。また、この実験結果から孢子形成に関与するセンサーキナーゼ遺伝子 (*kinA*~*kinE*) (図 1) の内、*kinA*、*kinB*、*kinD* と *kinE* が、デコイニン添加で誘導される正の緊縮制御プロモーターをもつことが推測された (表 3)。KinA と KinB は孢子形成開始のリン酸リレーの主要なセンサーキナーゼであると考えられており^{27,41})、KinC は孢子形成よりもむしろバイオフィーム形成に関係があることが最近報告されている^{12,42})。また、KinD と KinE は孢子形成のリン酸リレーにそれ程関与しない¹¹)。したがって、孢子形成の引き金となる主要なセンサーキナーゼをコードし、転写開始点の A が正の緊縮制御に関与すると予想される *kinA* と *kinB* について、それらが孢子形成開始での代謝制に果たす役割を解明することとした。

Spo0A~P 濃度が上昇することにより *abrB* 転写が抑制され、それによって AbrB による *kinB* と σ^H をコードしている *sigH* (*spo0H*) の抑制が解除される。 σ^H を含む RNAP は、*kinA*、*spo0A* と *spo0F* の転写を活性化する (図 1)^{1,8,26})。また、*spo0F* と *spo0A* の転写にも Spo0A~P が必要となる^{5,7,9})。このような転写制御から予想される通り、DNA マイクロアレイ解析により、*kinA* と *kinB* に加えて *spo0F*、*spo0A* と *sigH* の発現量がデコイニン添加によって上昇することが観察された (表 3)。

デコイニン添加による *kinA* と *kinB* のプロモーター活性の誘導

DNA マイクロアレイ解析の結果、*kinA* と *kinB* 遺伝子はデコイニン添加で正の緊縮制御を受けることが示唆された (表 3)。これを確かめるために *kinA* と *kinB* のコアプロモーター領域 (-55/+10) を *lacZ* 遺伝子と連結し、*amyE* 座に挿入した FU1087 株 (P_{kinA} -*lacZ*) と FU1115 株 (P_{kinB} -*lacZ*) を作製した (表 1)。図 4 に示すように、最少培地である S6 培地³⁸) でレポーター株を培養して *kinA* と *kinB* のプロモーター活性を β -Gal 活性として測定した結果、両プロモーターはデコイニン添加により活性化されることが示された。また、*kinA* と *kinB* の転写開始点の A が緊縮制御による正の制御に関与することを確かめるために、A を G に置換した FU1088 株 [$P_{kinA(A+1G)}$ -*lacZ*] と FU1116 株 [$P_{kinB(A+1G)}$ -*lacZ*] を作製した。これらのレポーター株について同様の解析をおこなった結果 (図 4)、デコイニンによるプロモーター活性の上昇はほとんど見られず、デコイニン

枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成トリガーへの正の緊縮制御の関与

添加による正の緊縮制御が転写開始点の A に依存していることが示された。

kinA と *kinB* は、それぞれ σ^H と σ^A を含む RNAP によって転写されることが知られているので^{26,27}、 P_{kinA} -*lacZ* と P_{kinB} -*lacZ* 融合を $\Delta sigH$ 株に導入した FU1107 株 (P_{kinA} -*lacZ* $\Delta sigH$) と FU1117 株 (P_{kinB} -*lacZ* $\Delta sigH$) を作製し、これらのレポーター株について同様の解析を行った。デコイニン添加で *kinA* の誘導は観察されなかったが(図 4A)、*kinB* の誘導は野生株と同様に観察された(図 4B)。この結果は、デコイニン添加によって活性化された *kinB* の転写が σ^A を含む RNAP によって行われるのに対し、*kinA* の転写は σ^H を含む RNAP によって行われることを示している。以前に行われた CodY の標的遺伝子群を検索するトランスクリプトーム解析で、*kinB* が標的遺伝子の 1 つであることが判明している¹³。したがって、デコイニン添加で誘発される GTP 濃度の低下が CodY の不活性化を引き起こし、*kinB* の脱抑制につながることも考えられる。この可能性を確かめるために、 P_{kinA} -*lacZ* と P_{kinB} -*lacZ* の融合を $\Delta codY$ 株にそれぞれ導入し、FU1109 株 (P_{kinA} -*lacZ* $\Delta codY$) と FU1119 株 (P_{kinB} -*lacZ* $\Delta codY$) を作製し、同様のレポーター解析を行った。その結果、 $\Delta codY$ 株でも *kinA* と *kinB* の誘導は影響されず、デコイニンによる *kinA* と *kinB* の誘導に、CodY が関与しないことが示された(図 4)。仮に CodY が直接の標的遺伝子として *kinB* に作用するのであれば、その作用部位は解析に使用したコアプロモーター領域 (-55/+10) の外側にあると推察された。一方、AbrB が *kinB* プロモーターの -34/-6 領域に結合して *kinB* を抑制することが知られている(図 4B)⁶。デコイニンによるプロモーターの活性化に対する AbrB の影響を調べるために、 $\Delta abrB$ 株に P_{kinA} -*lacZ* と P_{kinB} -*lacZ* 融合をそれぞれ導入し、FU1111 株 (P_{kinA} -*lacZ* $\Delta abrB$) と FU1122 株 (P_{kinB} -*lacZ* $\Delta abrB$) を作製し、レポーター解析を行った。その結果、*kinA* と *kinB* の誘導は、 $\Delta abrB$ の影響を受けず、*kinA* と *kinB* の正の緊縮制御に AbrB が関与しないことが示唆された(図 4)。もしかすると、デコイニン添加で活性化されたリン酸リレーによって Spo0A~P が増加し、それが迅速に AbrB を不活化しているため、 $\Delta abrB$ 株と AbrB⁺ 株を用いた場合でほぼ変わらない結果になったのかもしれない。*kinA* は Spo0A~P によって抑制されることが報告されているが⁷、Spo0A~P 結合配列はコアプロモーター領域の外にある。加えて、図 1 に示したように、*kinA* は σ^H によって、 σ^H は Spo0A~P によって AbrB を介して活性化される。したがって、 $\Delta spo0A$ 株では *kinA* は転写されないと考えられる。これらを確認するために、 $\Delta spo0A$ 株に P_{kinA} -*lacZ* と P_{kinB} -*lacZ* 融合をそれぞれ導入し、FU1124 株 (P_{kinA} -*lacZ* $\Delta spo0A$) と FU1126 株 (P_{kinB} -*lacZ* $\Delta spo0A$) を作製し、レポーター解析を行った結果、予想通り、 $\Delta spo0A$ 株ではデコイニン添加で *kinA* は誘導されず(図 4A)、*kinB* は誘導された(図 4B)。

kinA と *kinB* の転写開始点を A から G に置換した $P_{kinA(A+1G)}$ -*lacZ* と $P_{kinB(A+1G)}$ -*lacZ* 融合を $\Delta sigH$ 、 $\Delta codY$ 、 $\Delta abrB$ および $\Delta spo0A$ 株に導入した菌株を用いたレポーター解析の結果では、活性を測定した結果、すべての株でデコイニン添加による誘導は観察されなかった。以上のレポーター解析の結果をまとめると、*kinA* は σ^H に、*kinB* は σ^A にそれぞれ依存してデコイニン添加により誘導され、それらの誘導は転写開始点の A に依存するが、CodY と AbrB の制御からは独立していることが明らかになった。

転写開始点のアデニンのグアニンへの置換が孢子形成効率に与える影響

kinA と *kinB* のプロモーターとの *lacZ* 融合解析により、これらの転写開始点の A がデコイニン添加による

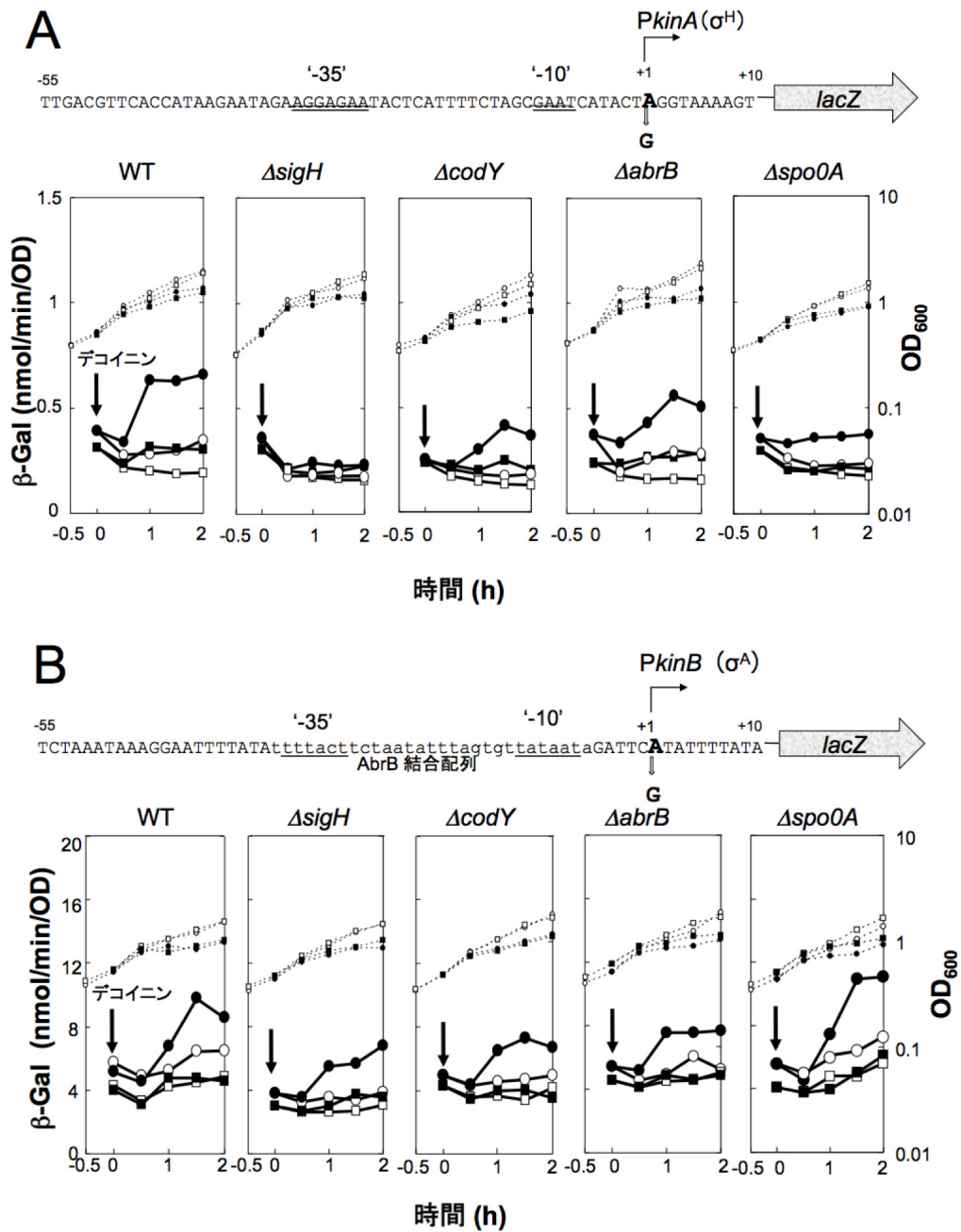


図 4. デコイニン添加による *kinA* と *kinB* のコアプロモーターの活性化

A. 図の上部に *kinA* のコアプロモーター配列 (-55/+10) を示し、転写開始点の A を太字で示し、 σ^H により認識される -10 および -35 領域²⁴⁾ を下線で示した。このプロモーター領域を *lacZ* 遺伝子と連結した。また、転写開始点の A を G に置換した株も作製した。野生型のプロモーター融合と G に置換したプロモーター融合を用いて *lacZ* がコードしている β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) の活性値を指標にデコイニン添加後の転写量を測定した。これら融合を、野生株、 $\Delta sigH$ 株、 $\Delta codY$ 株、 $\Delta abrB$ 株と $\Delta spo0A$ 株に導入した。塗りつぶしたシンボルがデコイニン添加、白抜きのもがデコイニン不添加の場合で、丸が転写開始点が A (野生型) で、四角が転写開始点を G に置換したものを示す。大きい記号が β -Gal 活性、小さい記号が OD_{600} を表す。

枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成トリガーへの正の緊縮制御の関与

B. 図の上部に *kinB* のコアプロモーター配列 (-55/+10) を示し、転写開始点の A は太字で示し、 σ^A により認識される -10 および -35 領域²⁵⁾ を下線で示した。AbrB 認識結合領域 (小文字で表示)⁵⁾ は、コアプロモーター領域に含まれる。このプロモーター領域を *lacZ* 遺伝子と連結した。また、転写開始点の A を G に置換した株も作製した。野生型の融合と G に置換した融合を用いて *lacZ* がコードしている β -Gal の活性値を指標にデコイニン添加後の転写量を測定した。この融合は、野生株、 $\Delta sigH$ 株、 $\Delta codY$ 株、 $\Delta abrB$ 株と $\Delta spo0A$ 株に導入した。記号については A で示したものと同じである。

誘導に重要であることが、G に置換した場合にするとこの誘導が起こらないことから示された (図 4)。これらの転写開始点の置換がデコイニン添加による孢子形成にどのように影響するかを明らかにするために、図 3 で示した *mazF* カセットを用いた正の選択法³⁴⁾で、ゲノム上にコードされる *kinA* と *kinB* の転写開始点の A を G にそれぞれ置換した FU1102 株 [*kinA* (A+1G)] と FU1113 株 [*kinB* (A+1G)] を作製し、これらの菌株に加えて、168 株 (野生株)、PS37t 株 ($\Delta codY$)、FU1106 株 ($\Delta abrB$)、FU1121 株 ($\Delta spo0A$)、ASK201 株 ($\Delta spo0H$)、FU1095 株 ($\Delta kinA$)、FU1063 株 ($\Delta kinA \Delta codY$)、FU1096 株 ($\Delta kinB$)、FU1064 株 ($\Delta kinB \Delta codY$)、FU1098 株 ($\Delta kinA \Delta kinB$)、FU1102 株 [*kinA* (A+1G)]、FU1103 株 [*kinA* (A+1G) $\Delta kinB$]、FU1113 株 [*kinB* (A+1G)] と FU1114 株 [$\Delta kinA \Delta kinB$ (A+1G)] についてデコイニン添加の最少培地で培養したときの孢子形成率と NSMP 培地で培養したときの孢子形成率 (コントロール実験) を算出して比較した (表 4)。その結果、野生株 (168 株) を NSMP 培地で培養したときの孢子形成率は 71% (孢子形成率、S/Vx100 : S 孢子、V : 生細胞) であるのに対して、 $\Delta spo0A$ 、 $\Delta spo0H$ と $\Delta kinA \Delta kinB$ 株では全く孢子形成されなかった ($< 5 \times 10^{-6}$ % : 熱処理による孢子計測の測定限界以下)。一方、 $\Delta kinA$ 株では 7.9%、 $\Delta kinB$ 株では 22% となり、これらの欠失が孢子形成に部分的に影響を与えることが分かった (表 4)。また、 $\Delta codY$ と $\Delta abrB$ 株ではそれぞれ 29% と 34% となり、野生株よりもやや低い値となった。デコイニン添加による孢子形成誘導について、S6 培地で培養してデコイニン添加後 10 時間 (T10) 経過したときで計測を行った結果、野生株 (168) で 19% であったが、 $\Delta spo0A$ 、 $\Delta spo0H$ と $\Delta kinA \Delta kinB$ 株では計測限界値以下 (5×10^{-6} %) であった。これに対し、 $\Delta kinA$ 株では 0.26%、 $\Delta kinB$ 株では 0.67% となり、この条件でもこれらの欠失が孢子形成に部分的に影響を与えることが示された。これら二つの培地条件で同じように孢子形成が変異に影響されることが観察されたので、デコイニン添加による孢子形成誘導は、NSMP 培地での孢子形成と同様にリン酸リレー系を介した系によるものであると考えられた。興味深いことに $\Delta codY$ 株では、36% と孢子形成率が野生型より高くなり、加えて $\Delta kinA \Delta codY$ 株で 7.3%、 $\Delta kinB \Delta codY$ 株で 1.5% と同様にそれぞれ $\Delta kinA$ 株と $\Delta kinB$ 株に較べて孢子形成率が上昇することが観察された (表 4、図 5 矢印)。これとは逆に、 $\Delta abrB$ 株では、0.40% と大幅に孢子形成率が低下した (表 4、図 5 : 白抜き三角)。したがって、NSMP 培地で培養した場合に比べて S6 培地でデコイニン添加した条件での孢子形成の方が、 $\Delta codY$ と $\Delta abrB$ が孢子形成代謝ネットワークにより大きな影響を及ぼしていると推測された。

転写開始点の A を G に置換した FU1102 株 [*kinA* (A+1G)] と FU1113 株 [*kinB* (A+1G)] では、NSMP 培地で培養した場合に孢子形成率がそれぞれ 36% と 25% (野生型 : 71%) であった。また、FU1103 株 [*kinA* (A+1G) $\Delta kinB$] と FU1114 株 [$\Delta kinA \Delta kinB$ (A+1G)] では、それぞれ 0.55% と 0.019% となり、低い孢子形成率を示

した。一方、FU1096 株 ($\Delta kinB$) と FU1095 株 ($\Delta kinA$) では、それぞれ 22% と 7.9% と比較的高い孢子形成率となった。FU1102 株 [$kinA$ (A+1G)] と FU1113 株 [$kinB$ (A+1G)] でのデコイニン添加による孢子形成率は、それぞれ 3.5% と 1.7% (野生型: 19%) となり、FU1103 株 [$kinA$ (A+1G) $\Delta kinB$] と FU1114 株 [$\Delta kinA kinB$ (A+1G)] では 6.2×10^{-4} % と 2.1×10^{-5} % と極めて低い値となった。一方、FU1096 株 ($\Delta kinB$) と FU1095 株 ($\Delta kinA$) では、それぞれ 0.67 と 0.26% であった。これらの結果から、 $kinA$ と $kinB$ の転写開始点の A の G への置換は、NSMP 培地で培養して孢子形成を誘導した場合でも、デコイニン添加で誘導した場合でも孢子形成に明確な影響を及ぼすことが明らかとなった。

表 4. $kinA$ と $kinB$ の転写開始点の G への置換を含む種々の変異が孢子形成に与える影響

株	孢子形成率 (%) ^a		
	S6, T10		NSMP, T20
	+デコイニン	-デコイニン	
野生株 168	19	0.37	71
PS37t ($\Delta codY$)	36	3.8	29
FU1106 ($\Delta abrB$)	0.40	0.040	34
FU1121 ($\Delta spo0A$)	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$
ASK201 ($\Delta spo0H$)	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$
FU1095 ($\Delta kinA$)	0.26	0.046	7.9
FU1063 ($\Delta kinA \Delta codY$)	7.3	0.93	8.5
FU1096 ($\Delta kinB$)	0.67	3.7×10^{-4}	22
FU1064 ($\Delta kinB \Delta codY$)	1.5	0.028	12
FU1098 ($\Delta kinA \Delta kinB$)	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$
FU1102 [$kinA$ (A+1G)]	3.5	0.20	36
FU1103 [$kinA$ (A+1G) $\Delta kinB$]	6.2×10^{-4}	$< 5 \times 10^{-6}$	0.55
FU1113 [$kinB$ (A+1G)]	1.7	0.0017	25
FU1114 [$\Delta kinA kinB$ (A+1G)]	2.1×10^{-5}	$< 5 \times 10^{-6}$	0.019

^a 孢子形成テストは少なくとも 3 回実施し、代表的な値をここに示す。

各数値の標準偏差は 15% 以内であった。

枯草菌を最少培地で培養した場合、孢子と生細胞の数は同じ速度で増加するが、細胞と孢子の割合は培地の成分に依存する⁴³⁾。デコイニン添加による孢子誘導実験の比較実験として、S6 培地でデコイニンを加えずに培養して OD₆₀₀ が 0.5 の時点から 10 時間培養後の孢子形成率を計測した。その結果、孢子形成率は野生株

(168 株) で 0.37%であったが、 $\Delta spo0A$ 、 $\Delta spo0H$ および $\Delta kinA \Delta kinB$ 株では、計測限界値以下であった。一方、 $\Delta kinA$ 株では 0.046%、 $\Delta kinB$ 株では 3.7×10^{-4} % (表 4) であり孢子形成に部分的に影響することが分かった。このデコイニンを含まない最少培地での孢子形成においても孢子形成栄養培地 (NSMP) で培養した場合と同様にリン酸リレー系を介した孢子形成誘導が行われることが示された。 $\Delta codY$ 株では、デコイニン誘導と同様に非存在下でも野生株より高い 3.8%の孢子形成率を示し、 $\Delta abrB$ 株では、0.04%と阻害を受けていた。興味深いことに、デコイニン非存在下での孢子形成は、 $\Delta kinA$ よりも $\Delta kinB$ により強い影響を受けており、FU1096 株 ($\Delta kinB$) と FU1095 株 ($\Delta kinA$) の孢子形成率は、それぞれ 3.7×10^{-4} % と 0.046%となった (表 4、図 5 黒塗り三角)。*kinA* (A+1G) 株と *kinB* (A+1G) 株のデコイニン非存在下での孢子形成率はそれぞれ 0.20%と 0.0017%となり、FU1103 株 [*kinA* (A+1G) $\Delta kinB$] と FU1114 株 [$\Delta kinA$ *kinB* (A+1G)] の孢子形成率は計測限界値以下になった。これらの結果は、デコイニンを含まない S6 培地非存在下の最少培地でゆるやかに生育する細胞での孢子形成にこれら転写開始点の塩基置換が大きく影響していることを示すものである。

今回、孢子形成率を計測した 3 つの条件 (NSMP 培地、デコイニンを添加した S6 培地、デコイニンを含まない S6 培地) での種々な株の孢子形成率をグラフにプロット (図 5: 近似線を直線と破線で示した) すると、3 条件でそれぞれ約 10 倍ずつずれていることが分かった。

考 察

GMP 合成酵素阻害剤であるデコイニンは、代謝しやすい炭素源、窒素源およびリン酸源の存在下で対数増殖中の細胞に対しても直ちに孢子形成誘導を引き起こすことができる (表 4)¹⁹⁾。それによって、細胞内 ATP 濃度の上昇と GTP 濃度の減少を引き起こし、転写開始点の塩基種 (A または G) に依存して緊縮制御プロモーターの転写開始速度を高める、あるいは低下させることができる^{23, 25)}。表 3 に示した DNA マイクロアレイ解析の結果では、孢子形成のリン酸リレーに関与する遺伝子群である、*kinA*、*kinB*、*kinD*、*kinE*、*spo0F*、*spo0A*、*sigH*、*rapA*、*rapB*、*rapE* および *spo0E* がデコイニン添加により 1.5 倍以上の転写誘導を示し、これらとは逆に *kinC*、*abrB* および *ynzD* では 1.5 倍以上の転写抑制がみられた。*rapA*、*rapB*、*rapE* および *spo0E* の誘導は、孢子形成のリン酸リレー系 (図 1) から考えると予想に反することであった。KinC は、孢子形成よりもむしろバイオフィーム形成に関連があるという報告がある^{12, 42)}。*ynzD* と *yisI* (1.3 倍) がデコイニン添加で抑制を受けることは、YnzD と YisI が非孢子形成条件で増加するという知見と一致するものである¹⁶⁾。KinA と KinB は、孢子形成開始のための主要なセンサーキナーゼである^{27, 41)}。KinA の閾値が孢子形成の開始を支配し⁴⁴⁾、KinA の C 末端ドメインにより触媒されるキナーゼ反応に必要な機能的な 4 量体の形成に N 末端のドメインが不可欠であることが報告されている⁴⁵⁾。これらの事実は、KinA (加えて KinB も) は活性型で合成され、それらの自己リン酸化レベルの閾値が孢子形成へのエントリーを規定していることを暗示するものである。

kinA と *kinB* のプロモーター領域を *lacZ* に融合したレポーター解析により、DNA マイクロアレイ解析で観察された結果と同じデコイニンによるプロモーター活性の誘導が確認された。図 4 で示すように、*kinA* と *kinB* プロモーターからの転写は、 σ^H と σ^A をそれぞれをもつ RNAP により行われ、転写開始点の A に依存した正の

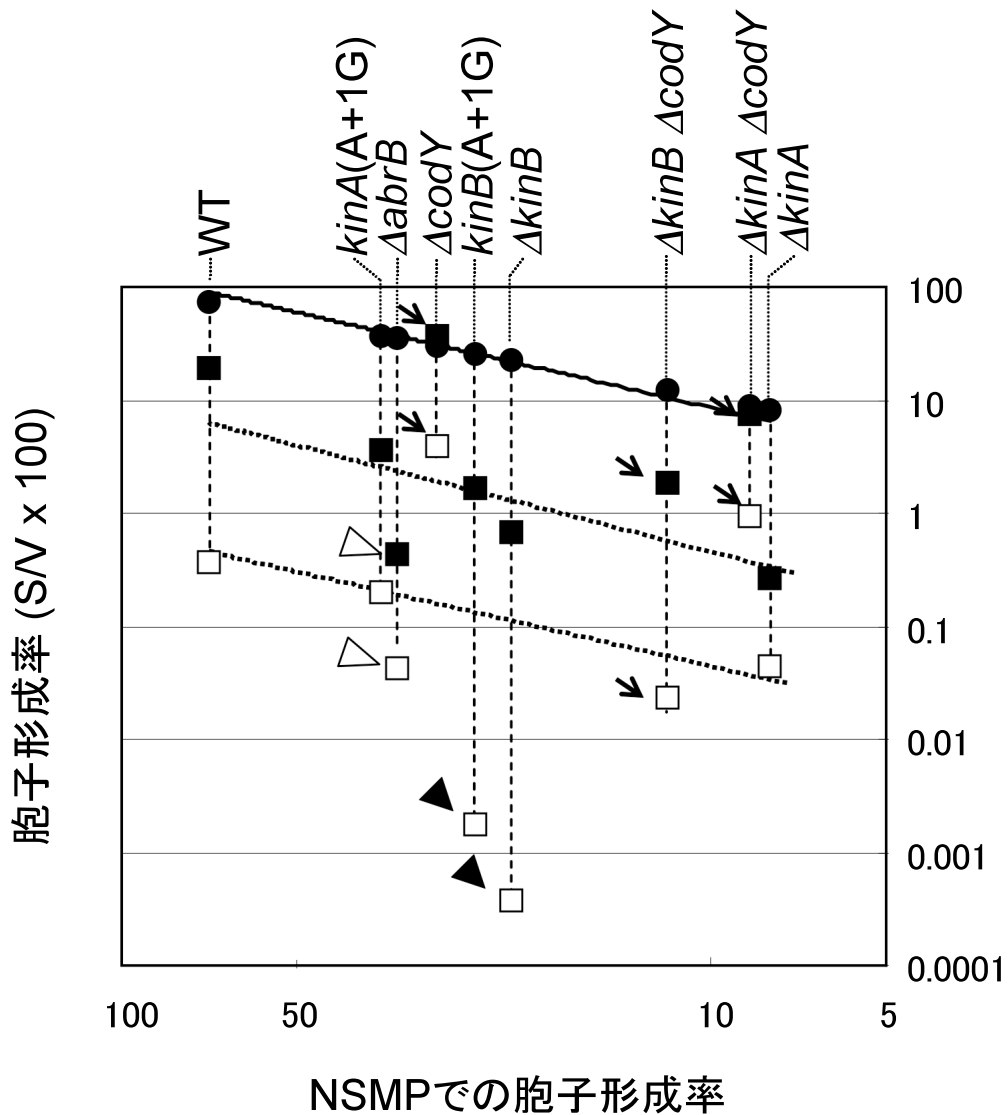


図 5. 孢子形成培地 NSMP と最少培地 S6 にデコイニンを含む、または含まない条件での孢子形成効率 孢子形成率(S/V×100)のプロットでは、表 4 に示した 14 株の内の 5 株 [$\Delta spo0A$, $\Delta spo0H$, $\Delta kinA \Delta kinB$, $kinA (A+1G) \Delta kinB$ と $\Delta kinA kinB (A+1G)$] の値を除いた。NSMP 培地の結果を縦軸と横軸に●でプロットし、近似線を実線で表した。デコイニン添加条件を■、不添加条件を□で縦軸にプロットした。矢印は $\Delta codY$ の S6 培地での結果を示し、 $\Delta abrB$ の S6 培地での結果を白抜き三角で示し、 $kinB (A+1G)$ 株と $\Delta kinB$ 株のデコイニン不添加での結果を黒塗りの三角で示した。デコイニン添加と不添加の S6 培地でのそれぞれの値の近似線を破線で表した。この近似線を引く際、 $\Delta codY$ 株 (矢印) と $\Delta abrB$ 株 (白抜き三角) の S6 培地での結果と、FU1096 株 ($\Delta kinB$) と FU1113 株 [$kinB (A+1G)$] のデコイニン不添加の結果 (黒塗り三角) は、除外している。

緊縮制御を受ける。また、これらの制御は CodY と AbrB からは独立していることが明らかとなった。一方、図 1 で示すように、 $Spo0A^P$ により AbrB が不活化されることで、 σ^H が活性化するために、 $kinA$ の転写が誘導される。 $kinA$ と $kinB$ の転写開始点は、転写開始ヌクレオチド三リン酸 (iNTP) である ATP の濃度に影響

され、デコイニン添加によって引き起こされる細胞内 ATP 濃度の上昇は、RNAP 複合体の転写開始反応を介して *kinA* と *kinB* の転写の活性化を引き起こす。

孢子形成のリン酸リレー系に関与する転写制御因子とシグマ因子は、それぞれ Spo0A、AbrB と CodY および σ^H の 4 つの因子のみである (図 1)。今回解析に用いた 3 つの孢子形成培地条件 (NSMP 培地とデコイニンを含むあるいは含まない S6 培地) で、予想通り $\Delta spo0A$ 株と $\Delta sigH$ 株では孢子形成の完全な阻害が見られた (表 4)。興味深いのは、 $\Delta codY$ と $\Delta abrB$ が NSMP 培地での孢子形成に大きな影響を及ぼさなかったことである。しかし、最少培地 (S6) での孢子形成では、 $\Delta codY$ は孢子形成を促進する効果が見られたが、 $\Delta abrB$ はこれとは逆に孢子形成を阻害する結果となった (表 4)。CodY は *kinB* と *phrE* の抑制因子であり¹³⁾、PhrA と PhrE はそれぞれ RapA と RapE に阻害作用を示すため (図 1)、 $\Delta codY$ が孢子形成に対して促進効果をもつことは妥当なことである。 $\Delta codY$ または $\Delta abrB$ は、栄養培地である NSMP 培地よりも最少培地である S6 培地での孢子形成代謝ネットワークにより大きく影響すると考えられた。

kinA (A+1G) 変異と *kinB* (A+1G) 変異は、それぞれの転写開始点の A を G に置換したものであり (図 3)、野生型と比べて *kinA* (A+1G) 変異は、デコイニン添加の有無に関わらず S6 培地での孢子形成に対して、NSMP 培地で培養した場合と同程度に影響を及ぼした (表 4)。*kinB* (A+1G) においても、これらの 3 つの孢子形成条件で野生株よりも孢子形成率の低下が認められた (表 4)。 $\Delta kinA$ と $\Delta kinB$ の単独破壊株は、これらの 3 つ条件でかなりの数の孢子を形成することができたが、 $\Delta kinA$ *kinB* (A+1G) と $\Delta kinB$ *kinA* (A+1G) の 2 重欠損株では、ほとんど孢子が形成されなかった。これらの実験結果は、緊縮制御による *kinA* と *kinB* の活性化がリン酸リレーを作用させて孢子形成へ導くことを強く示唆するものである。言い換えるなら、孢子形成しやすい培地で培養したときに栄養状況が悪化すると、細胞内 ATP 濃度が上昇することで孢子形成の開始スイッチがオンになる。この ATP 濃度の上昇は、*kinA* と *kinB* の転写開始ヌクレオチドである ATP と RNAP による転写開始反応に影響を与えてそれらのプロモーター活性が上がり、KinA と KinB 量が閾値を越えることによりリン酸リレーが始動する。加えて、細胞内で上昇した ATP 濃度は、孢子形成リン酸リレーの開始段階である KinA と KinB の自己リン酸化反応の効率を高める手助けとなる。

これとは逆に、特異的なホスファターゼ活性によってリン酸化されて活性化されたリン酸リレーシステムのタンパク質からリン酸基が除去される。RapA、RapE と RapB は低い細胞密度を感知して Spo0F~P を脱リン酸化し、また、YisI や YnzD は Spo0A~P を脱リン酸化する (図 1)^{10,15)}。これらセンサーキナーゼとホスファターゼの相反作用により、リン酸リレー系へのリン酸基の導入・除去を調節することにより孢子形成に向かうか否かの決定が行われる。したがって、Spo0A~P のレベルが環境上・生理学上のシグナルを統合するものとみなすことができる⁴⁶⁾。Spo0A~P 濃度が一定レベルに達すると、孢子形成が引き起こされる。デコイニンを添加すると、正の緊縮制御によって KinA と KinB が誘導され、転写開始点 G である遺伝子群が負の緊縮制御を受け、さらに CodY を介する正の緊縮制御も起こる。これらの正および負の制御はともに Spo0F~P と Spo0A~P の形成とそれらの脱リン酸化の阻害に作用する (図 1、表 3)。実際に、緊縮制御によって引き起こされる孢子形成の誘導効率は、リン酸リレー系でリン酸化されたタンパク質からのリン酸の除去に影響する

と思われる培地組成によっても強く影響される。例えば、デコイニン添加によって *kinA* と *kinB* の転写を十分に誘導したとしても、培地中にアンモニア、グルタミン酸あるいはグルタミンのような窒素源が豊富に存在する状態では、それ程孢子形成を引き起こさないことから、孢子形成シグナルネットワークの複雑さがかがいが知ることができる(東條、藤田：未発表データ)。

文 献

- 1) Hoch, J.A. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 441-465 (1993).
- 2) Stephenson, K., and Hoch, J.A. *Mol. Microbiol.*, **46**, 297-304 (2002).
- 3) Burbulys, D., Trach, K.A., and Hoch, J.A. *Cell*, **64**, 545-552 (1991).
- 4) Fürbass, R., Gocht, M., Zuber, P., and Marahiel, M.A. *Mol. Gen. Genet.*, **225**, 347-354 (1991).
- 5) Strauch, M.A., Trach, K.A., Day, J., and Hoch, J.A. *Biochimie.*, **74**, 619-626 (1992).
- 6) Strauch, M.A. *J. Bacteriol.*, **177**, 6999-7002 (1995).
- 7) Fujita, M., and Sadaie, Y. *J. Biochem.*, **124**, 89-97 (1998).
- 8) Strauch, M.A., and Hoch, J.A. *Mol. Microbiol.*, **7**, 337-342 (1993).
- 9) Strauch, M.A., Wu, J.J., Jonas, R.H., and Hoch, J.A. *Mol. Microbiol.*, **7**, 967-974 (1993).
- 10) Piggot, P. J. and Hilbert, D.W. *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 579-586 (2004).
- 11) Fujita, M., and Losick, R. *Genes Dev.*, **19**, 2236-2244 (2005).
- 12) López, D., Fischbach, M. A., Chu, F., Losick, R., and Kolter, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 280-285 (2009).
- 13) Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., and Sonenshein, A.L. *J. Bacteriol.*, **185**, 1911-1922 (2003).
- 14) Sonenshein, A.L. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 561-566 (2000).
- 15) Perego, M., and Hoch, J.A. Sonenshein A. L., Hoch J. A. and Losick R. (Ed.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives from genes to cells, pp. 473-482, ASM Press, Washington, DC (2002).
- 16) Perego, M. *Mol. Microbiol.*, **42**, 133-143 (2001).
- 17) Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.W., and Sonenshein, A.L. *Genes Dev.*, **15**, 1093-1103 (2001).
- 18) Sonenshein, A.L. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 203-207 (2005).
- 19) Mitani, T., Heinze, J.E., and Freese, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1118-1125 (1977).
- 20) Lopez, J.M., Dromerick, A., and Freese, E. *J. Bacteriol.*, **146**, 605-613 (1981).
- 21) Lopez, J.M., Marks, C.L., and Freese, E. *Biochim. Biophys. Acta*, **587**, 238-252 (1979).
- 22) Ochi, K., Kandala, J.C., and Freese, E. *J. Biol. Chem.*, **256**, 6866-6875 (1981).
- 23) Krásný, L., Tišerová, H., Jonák, J., Rejman, D., and Sanderová, H. *Mol. Microbiol.*, **69**, 42-54 (2008).
- 24) Tojo, S., Satomura, T., Kumamoto, K., Hirooka, K., and Fujita, Y. *J. Bacteriol.*, **190**, 6134-6147 (2008).
- 25) Tojo, S., Kumamoto, K., Hirooka, K. and Fujita, Y. *J. Bacteriol.*, **192**, 1573-1585 (2010).

- 26) Predich, M., Nair, G. and Smith, I. *J. Bacteriol.*, **174**, 2771-2778 (1992).
- 27) Trach, K.A., and Hoch, J.A. *Mol. Microbiol.*, **8**, 69-79 (1993).
- 28) Krásný, L., and Gourse, R.L. *EMBO. J.* **23**, 4473-4483 (2004).
- 29) Slack, F.J., Serron, P., Joyce, E., and Sonenshein, A.L. *Mol. Microbiol.*, **15**, 689-702 (1995).
- 30) Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. *J. Bacteriol.*, **81**, 741-746 (1961).
- 31) Serron, P., and Sonenshein, A.L. *J. Bacteriol.*, **178**, 5910-5915 (1996).
- 32) Yoshida, K., Fujita, Y., and Ehrlich, S.D. *J. Bacteriol.*, **181**, 6081-6091 (1999).
- 33) Isezaki, M., Hosoya, S., Takeuchi, M., and Sato, T. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **204**, 239-245 (2001).
- 34) Morimoto, T., Ara, K., Ozaki, K., and Ogasawara, N. *Genes Genet. Syst.*, **84**, 315-318 (2009).
- 35) Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., and Fujita, Y. *Mol. Microbiol.*, **56**, 1560-1573 (2005).
- 36) Miwa, Y., and Fujita, Y. *J. Bacteriol.*, **183**, 5877-5884 (2001).
- 37) Sambrook, J., and Russell, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001).
- 38) Fujita, Y., and Freese, E. *J. Bacteriol.*, **145**, 760-767 (1981).
- 39) Yoshida, K., Ishio, I., Nagakawa, E., Yamamoto, Y., Yamamoto, M., and Fujita, Y. *Microbiology*, **146**, 573-579 (2000).
- 40) Ochi, K., Kandala, J.C., and Freese, E. *J. Bacteriol.*, **151**, 1062-1065 (1982).
- 41) Kobayashi, K., Shoji, K., Shimizu, T., Nakano, K., Sato, T. and Kobayashi, Y. *J. Bacteriol.*, **177**, 176-182 (1995).
- 42) Shemesh, M., Kolter, R., and Losick, R. The biocide chlorine dioxide stimulates biofilm formation in *Bacillus subtilis* by activation of the histidine kinase KinC. *J. Bacteriol.*, **192**, 6352-6356 (2010).
- 43) Schaeffer, P., Millet, J. and Aubert, J.-P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **54**, 704-711 (1965).
- 44) Eswaramoorthy, P., Duan, D., Dinh, J., Dravis, A., Devi, S.N., and Fujita, M. *J. Bacteriol.*, **192**, 3870-3882 (2010).
- 45) Eswaramoorthy, P., Dravis, A., Devi, S.N., Vishnoi, M., Dao, H.A. and Fujita, M. *J. Bacteriol.*, **193**, 6113-6122 (2011).
- 46) Fujita, M., González-Pastor, J.E., and Losick, R. *J. Bacteriol.*, **187**, 1357-1368 (2005).

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (11), 1-20 (2012)

Involvement of positive stringent transcription control in sporulation triggering of *Bacillus subtilis*

Shigeo Tojo, Kazutake Hirooka, and Yasutaro Fujita

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

Bacillus subtilis cells were exposed to decoyinine to trigger stringent transcription control through inhibition of GMP synthase, they having a limited amino acid supply to result in the same control that is indirectly mediated by 5'-diphosphate 3'-diphosphate guanosine. The positive and negative transcription control of the stringent genes involves adenine and guanine at the transcription initiation sites, whereby they sense an increase and a decrease in the *in vivo* ATP and GTP pools, respectively. Decoyinine also induces massive sporulation in minimum medium. DNA microarray analysis revealed that decoyinine induced two major sensor kinase genes, *kinA* and *kinB*, involved in phosphorelay leading to spore formation. *lacZ*-fusion experiments involving the core promoter regions of *kinA* and *kinB*, whose transcription initiation bases are adenines, indicated that decoyinine induced their expression. This induction was independent of CodY and AbrB. When the adenines were replaced with guanines, the induction by decoyinine was abolished. The *in situ* replacement of the adenines with guanines actually affected sporulation in nutrient medium and decoyinine-induced sporulation. These results imply that sporulation phosphorelay is presumably triggered by enhancement of the transcription initiation of *kinA* and *kinB*, which is mediated by an increase in the ATP pool.