



Title	枯草菌孢子形成初期遺伝子spo0Aの解析
Author(s)	工藤, 純
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24587
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

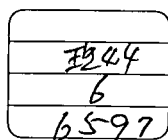
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

枯草菌孢子形成初期遺伝子 spo0Aの解析

生理学専攻 工藤 純



目次

要旨	1
序論	2
実験材料と方法	4
結果	
I. <u>spoOA</u> 遺伝子を含む枯草菌染色体DNA断片のクローニング	9
II. <u>spoOA</u> ⁺ 断片の枯草菌マルチコピープラスミドへのクローニング	15
III. <u>spoOA</u> 野生型遺伝子及び変異型遺伝子の 大腸菌へのクローニング	19
IV. <u>spoOA</u> 遺伝子産物の同定と <u>spoOA</u> 遺伝子の 塩基配列の決定	22
考察	26
図1~17	31
表1~10	47
謝辞	57
References	58

要 旨

枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成初期遺伝子 spo0A を含む 2.4 kbp の染色体断片をプロファージ形質転換法を用いてクローニングした。この 2.4 kbp 断片をもつ特殊形質導入ファージを spo0A12 変異株に溶原化させると溶原菌 (spo0A⁺/spo0A⁻ ヘテロ部分二倍体) は Sp⁺ の表現型を示す。しかし、同じ 2.4 kbp 断片をマルチコピープラスミドをベクターとして spo⁺ recE4 株に導入すると、宿主の増殖及び孢子形成が著しく阻害されることがわかった。この増殖阻害効果はプラスミド上の 2.4 kbp 断片内に生じた変異 (sgi 変異) によって抑制された。spo0A 遺伝子及び spo0A12, spo0C9V, sgi-1 変異遺伝子をそれぞれ含む 2.4 kbp 断片を pBR322 を用いて大腸菌にクローニングし、各プラスミド上にコードされる蛋白質を *in vitro* 転写翻訳系を用いて調べた。その結果、spo0A 遺伝子産物は 27.5 kilodaltons の蛋白質と同定された。spo0A12, spo0C9V, sgi-1 変異遺伝子からは、各々 6.3 kilodaltons, 27.5 kilodaltons, 26.5 kilodaltons の蛋白質が合成された。従って sgi-1 変異は spo0A 遺伝子の翻訳領域に生じた変異であることがわかった。また、2.4 kbp 断片の全塩基配列 (2375 bp) を決定したところ、spo0A 遺伝子は 239 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしていることがわかった。塩基配列から計算した spo0A 遺伝子産物の分子量は 26,472 であり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で得た値 (27,500) とよく一致した。さらに spo0A12, spo0C9V, sgi-1 変異遺伝子の塩基配列を決定したところ、すべて同ーツストロン内の変異であり、各々 amber 変異、missense 変異、frame shift 変異であることがわかった。また、spo0C9V 及び sgi-1 変異の部位から、spo0A 遺伝子産物の機能には、少なくとも末端近傍のアミノ酸配列が重要であることがわかった。

序 論

枯草菌(*Bacillus subtilis*)のような胞子形成細菌は培地中の栄養素を使い切ると増殖を終え胞子形成期に入り、一連の形態学的、生化学的変化を経て、劣悪な外部環境に抵抗性の内生胞子を形成する。この細菌の胞子形成の過程は最も単純な細胞分化のモデルと考えられ、多くの遺伝学的、生化学的研究がなされてきた。特に形質転換及び形質導入が可能な枯草菌は遺伝学的に最も詳しく研究され、多くの胞子形成不能突然変異株が分離された。これらの突然変異株は、胞子形成がどの段階で停止するかによって5種類(spo0 spoII spoIII spoIV spoV)に分類され、染色体地図上の座位が決定された。その結果、枯草菌の胞子形成の開始は少なくとも9個の遺伝子(spoQ gene)によって制御されていることがわかった(Piggot and Cooté, 1976; Hoch, 1976; Henner and Hoch, 1980)。spo0変異の特徴は、その表現型が多面発現的なことであるが、spo0A変異は中でも最も多面発現的である。すなわち、野生株の産生する抗生物質に感受性であり、抗生物質やプロテアーゼの産生、形質転換受容能(competence)が低下している(Schaeffer, 1969)。さらに $\phi 2$ や $\phi 5$ ファージに対する感受性の出現(Piggot and Cooté, 1976)、 $\phi 105$ ファージの溶原化率の低下(Ikenuchi and Kurakashi, 1978)なども観察されている。spo0A変異株からは、その表現型の一部が回復した復帰突然変異株がいくつか取られているが(Guespin-Michel, 1971; Shillitt and Hoch, 1978; Trowsdale, et al., 1978b)、その中のひとつであるabrB株では、リボソームの蛋白質に変化が起こっていることが報告されている。一方、spo0C変異は染色体地図上でspo0A変異の近傍に位置するが(図1参照)、その表現型はspo0A変異ほど多面発現的ではない(表1)。しかし、spo0C変異株に生じたある種のrib変異によって、その表現型がspo0A型になることから、両変異が同一の遺伝子に属すること及び、spo0C遺伝子産物がRNAポリメラーゼと相互作用する可能性が示唆され

ている(Ikeuchi *et al.* 1979)。これらの諸性質から、spo0A 遺伝子は転写及び翻訳系の両方に関与した機能を果たしているものと思われ、その機能を明らかにすることは、枯草菌の孢子形成開始機構を分子レベルで理解するために重要な鍵になると思われる。

✓ 最近 spo0 遺伝子の内、spo0B (Hirochica *et al.* 1981, Bonamy and Szulmajster, 1982; Ferrari *et al.* 1982)、spo0E (Kawamura, *et al.* 1980)、spo0H (Dubnau *et al.* 1981) がクローニングされ、spo0E (Shimotsu *et al.* 1983)、spo0H (Ramakrishna *et al.* 1984) は塩基配列も決定された。これらの遺伝子産物は同定されたが、孢子形成の開始時にこれらの遺伝子産物が果たす役割については、まだ何もわかっていない。

本研究では、spo0A 遺伝子の機能を明らかにするための第一歩として、spo0A 野生型遺伝子及び spo0A, spo0C 変異遺伝子をクローニングし、遺伝子産物を同定し、塩基配列を明らかにした。

実験材料及び方法

菌株、ファージ、プラスミド 本研究に用いた枯草菌株は表2に記載した。

大腸菌 C600-45 (hsdR hsdM) は C600 株由来で杉野義信先生にいただいた。また大腸菌 DH1 (hsdR recA) (Hanahan, 1983) は山田道元先生からいただいた。DH1 は pBBCA1,2 及び pBBCC1 のクローニングに用い、その他のプラスミドは C600-45 を用いてクローニングした。溶原ファージ ϕ 11 (Dean et al. 1976) と ϕ 05 (Birdsell et al. 1969) は斎藤日向先生からいただいた。プラスミド pBD9 (Gryczan and Dubnau, 1978) は *Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio State University から、プラスミド pBR322 (Bolivar et al. 1977) は、小川英行先生からいただいた。プラスミド pHVT1 は、pHV14 (Ehrlich, 1978) をベクターに用いて作製した枯草菌染色体の gene bank から得られたもので、tcpC2 遺伝子を含む染色体断片をもっている (工藤, 1981)。

培地 本研究に用いた培地の組成は次の通りである。LB 培地は 1ℓ 当たり 10g の tryptone (Difco), 5g の yeast extract (Difco), 1g の glucose, 5g の NaCl を混ぜ pH を 7.1 に合わせた。Schaeffer 培地 (Schaeffer et al. 1963) は 1ℓ 当たり 8g の nutrient broth (Difco), 0.25g の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g の KCl からなり、1mM $Ca(NO_3)_2$, 10 μ M $MnCl_2$, 1 μ M $FeSO_4$ を含む。2xSchaeffer 培地 (Korch and Doi, 1971) は 1ℓ 当たり 16g の nutrient broth (Difco), 0.25g の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g の KCl, 1g の glucose からなり、1mM $Ca(NO_3)_2$, 0.1mM $MnCl_2$, 1 μ M $FeSO_4$ を含む。Spizizen 最少栄養培地 (Spizizen, 1958) は、1ℓ 当たり 14g の K_2HPO_4 , 6g の KH_2PO_4 , 2g の $(NH_4)_2SO_4$, 1g の sodium citrate からなり、1mM の $MgSO_4$, 0.5% の glucose を含む。また必要な場合は、アミノ酸 (20 μ g/ml), あるいは塩基 (50 μ g/ml) を加えた。

染色体 DNA 及び プラスミド DNA の調製 枯草菌染色体 DNA は、168Trp⁺ 株から Saito and Miura 法 (1969) に従って精製した。枯草菌からのプラスミド DNA の精製は Gryczan の方法 (1978) を用いて行なった。

大腸菌からのプラスミドDNAの精製は Clewell and Helinski の方法 (1969) に従った。プラスミド pBD9 あるいは pBR322 をベクターとして得られた形質転換菌の中から組み換えプラスミドを screening する際には、Birnboim and Doly の方法 (1979) に従って 寒天培地上のコロニーからプラスミドDNAを調製し、その大きさ及び制限酵素による切断パターンを調べた。

ファージ及びファージDNAの調製 ファージ p11 及び phi15 の溶原菌を mitomycin C で誘発し、溶菌液を調製した。ファージ粒子は 1.1 g/ml 密度勾配遠心法を用いて精製し、ファージDNAはフェール抽出法によってファージ粒子から精製した。

DNAの制限酵素による切断・結合・電気泳動 制限酵素 EcoRI, BamHI, HindII は Boehringer-Mannheim 製を、HindIII, PstI は New England Biolabs. 製を、SalI, BclI, SphI は Bethesda Research Laboratories 製を BanIII (ClaI の isoschizomer) は Toyobo 製を、XbaI, BglII, SacI, AccI, RsaI, TagI は Nippon Gene 製をそれぞれ入手した。T4DNAリガーゼは小川英行先生からいただいたもの及び Bethesda Research Laboratories の製品を使用した。制限酵素による切断、及び T4DNAリガーゼによる結合は供給者の指定する条件で行なった。DNAのアガロースゲル (Sigma, type II) 電気泳動には Tris-acetate buffer (Birnboim and Doly, 1979) を使用した。DNA断片の形質転換活性を調べるためには、0.7% 低融点アガロースゲル (Bethesda Research Laboratories) を用いて電気泳動を行なった。泳動後 SSC 中に 30 分間浸してから、DNAバンドを含むゲルを切り出した。ゲルスライスを 70°C で 10 分間熱して溶かし、37°C にさましてから形質転換に用いた。また DNA断片の精製の際は、DNA断片をフェール・クロロホルム抽出法によって低融点アガロースゲルから回収した。

形質転換 枯草菌の competent cell は Anagnostopoulou and Spizizen

(1961)の方法に従って調製した。competent cellsとDNAを混ぜ37°Cで2時間培養した。Spo⁺形質転換では、8倍量の2xSchaeffer培地を加え、さらに37°Cで2晩培養した。Spo⁺形質転換菌は80°Cで20分間処理した後、Schaeffer寒天培地にplatingして選択した。カナマイシン抵抗性(Km^r)形質転換菌の選択には5μg/mlのKmを含むSchaeffer寒天培地を用いた。栄養要求性による形質転換菌の選択は、Spizizen最少栄養寒天培地を用いて行なった。大腸菌の形質転換はMandel and Higa(1970)の方法を若干変更して行ない、アンピシリン耐性(Ap^r)形質転換菌は100μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地上で選択した。

・ プロファージ形質転換法によるspoOA⁺遺伝子のクローニング 溶原ファージp11をバクテリウムに用いて“プロファージ形質転換法”(kawamura et al, 1979)を用いて特殊形質導入ファージp11dspoOC⁺-1を得た。枯草菌168Tp⁺株染色体DNAのHindⅢ断片とp11DNAのHindⅢ断片をT4DNAリガーゼで結合し、9V株(spoOC9V)のp11溶原菌に対してSpo⁺形質転換を行なった。得られたSpo⁺形質転換菌の内の60%はp11活性ファージを産生したが、40%はp11活性ファージを産生しなかった。後者(4株)にVLパーp11ファージを感染後 mitomycin Cで誘発して溶菌液を得た。1株由来の溶菌液にのみ9V株に対する低いSpo⁺形質導入活性が認められた。得られたSpo⁺形質導入菌の中から、p11活性ファージ産生能をもつ二重溶原菌9V(p11dspoOC⁺-1)を選択した。その内の2株(15株と35株)から得られた溶菌液には高いSpo⁺形質導入活性が認められた。15株から得た溶菌液(3.5×10⁵ transductants/ml)の方が35株から得た溶菌液(1.8×10⁵ transductants/ml)よりも高いSpo⁺形質導入活性をもつので、15株からp11dspoOC⁺-1ファージを精製した。

・ 特殊形質導入ファージp105dspoOA⁺-1の作製は次の様な方法で行なった。p11dspoOC⁺-1 DNAとp105 DNAをHindⅢで切断後、結合し、9V(p105)株に対

して Spo^+ 形質転換を行なった。得られた Spo^+ 形質転換菌の内の大部分は通常の染色体DNAのみによる Spo^+ 形質転換菌と同様に濃茶色のコロニーを作り、染色体上の spoOC 領域で組み換えを起こした Spo^+ 形質転換菌と考えられた。それに対し、 Spo^+ 形質転換菌の内、約5%はうす茶色のコロニーを形成し、Schaeffer 寒天培地に拡げると、白色 (Spo^-) のコロニーが分離してきた。従ってうす茶色の菌は、spoOC 遺伝子を含む断片が $\phi 105$ フローファージ上に組み込まれた (spoOC⁺/spoOC⁻) 部分二倍体であると思われた。うす茶色の Spo^+ 形質転換菌の中から、独立に得られた7株を選び $\phi 105$ 活性ファージ産生能を調べた。その結果7株の内3株は、フラーゲン形成能のあるファージを産生しなかった。この3株から mitomycin C 処理でファージを誘発したところ、3株の内1株の溶菌液にのみ ヘルパーファージ $\phi 105$ を加えたときに9V株に対する Spo^+ 形質導入能が見出された。159株 (spoOA12) に対しても形質導入能があるので $\phi 105dspoOA^+-1$ と名付けた。特殊形質導入ファージ $\phi 105dspoOA^+-Bc-1$ 及び $\phi 105dspoOA^+-L-18$ も同様にして、うす茶色で $\phi 105$ 活性ファージ産生能のない Spo^+ 形質転換菌の中から得られた。活性ファージ産生能の検定は、0.1ml の9V株培養液をひろげたLB寒天培地上に菌を spot し、紫外線照射 (20秒) でファージを誘発した後、37℃で1晩培養して行なった。活性ファージ産生菌のまわりにはフラーゲンが生ずる。

抗生物質に対する感受性及び抗生物質の産生 枯草菌168株の産生する抗生物質に対する感受性は Schaeffer 寒天培地上で被検定株と168株を cross streak して判定した。感受性 (Abs^S) の株では168株と交差した部分の菌の増殖が抑えられる。また抗生物質の産生能は、抗生物質に感受性のSR22株 (spoOA12) と被検定株を Schaeffer 寒天培地上で cross streak して判定した。抗生物質産生菌 (Abs^+) はSR22株の増殖を阻害する。

In vitro 転写翻訳系 プラスミドDNAによる *in vitro* 転写翻訳反応は prokaryotic DNA-directed translation kit (Amersham International plc) を用いて行なった。反応混液は $15\mu\text{l}$ 中に $0.5\text{--}1.5\mu\text{g}$ のプラスミドDNA及び $13\mu\text{Ci}$ の $\text{L-}^{35}\text{S}$ -methionine を含んでいる。37°C 30分間反応した後、 $2.5\mu\text{l}$ の methionine chase solution を加え、さらに5分間反応を続けた。17.5 μl の loading buffer を加え、100°C で5分間熱した後、一部(2-4 μl) を電気泳動にかけた。電気泳動は Laemmli (1970) の方法に従い、15% SDS (sodium dodecyl sulfate)-ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。スラブゲル中の $\text{L-}^{35}\text{S}$ -methionine で標識された蛋白質の位置はフルオログラフィーにより決めた。

DNAの塩基配列の決定 DNAの塩基配列は Sanger "dideoxy sequencing method" (1977) を用いて決定した。大腸菌 JM103 及び M13 mp8, 9 は品川日出夫先生から M13 mp10, 11 は三原勝芳先生からいただいた。DNA断片は M13 mp8-11 ツリーズを用いて JM103 にクローニングし (Messing, 1983)、M13 Sequencing kit (Amersham International plc) 及び $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ を用いて塩基配列を決定した。

標識化合物 $\text{L-}^{35}\text{S}$ -methionine (1100 Ci/mmol) 及び $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ ($>600\text{ Ci/mmol}$) は Amersham International plc から入手した。

結 果

I. spoOA遺伝子を含む枯草菌染色体DNA断片のクローニング

特殊形質導入ファージ ϕ 11dspoOC⁺-1の作製

spoOA遺伝子を含む染色体DNA断片をクローニングするにあたり、spoOA変異株では、形質転換受容能が非常に低いため、染色体地図上で spoOA変異の近傍にマップされ、野生株並みに形質転換受容能のある spoOC変異株を受容菌に用いた。まず、枯草菌168Trp⁺株染色体DNAを切断するのに適当な制限酵素を選ぶため、種々の制限酵素で切断後、9V株(spoOC9V)に対する SpoOC⁺形質転換活性を測定した。その結果、BamHIによる切断では SpoOC⁺形質転換活性はほとんど変わらないが、SalI、PstI及びHindIIIで切断後は形質転換活性が各々約23%、約14%、約6%に低下し、EcoRI切断後は形質転換活性がほとんどなくなることがわかった(表3)。また、PstI及びHindIIIで切断したDNAを低融点アガロースゲル電気泳動にかけた後、ゲルをスライスし、各ゲルスライスに含まれるDNAの形質転換活性を調べたところ、spoOC9Vマーカーは約8-9MdalのPstI断片及び、約5-6MdalのHindIII断片に含まれることがわかった(図1a,b)。これらの結果から、HindIIIを用いて染色体DNAを切断し、約5-6Mdalの spoOC9Vマーカーを含むDNA断片のクローニングを試みることにした。

枯草菌の溶原ファージ ϕ 11をベクターとして、河村らの開発したプロファージ形質転換法(Kawamura, et al. 1979)を用いて、特殊形質導入ファージ ϕ 11dspoOC⁺-1を作製した。枯草菌168Trp⁺株染色体DNAをHindIIIで切断後、ショ糖密度勾配遠心法により spoOCを含むDNA断片を部分精製した(図2)。得られたピーク画分のDNAを ϕ 11DNAのHindIII断片と結合し、9V株の ϕ 11溶原菌に導入し、Spo⁺形質転換菌を選別した。これらの Spo⁺形質転換菌にヘルパー ϕ 11ファージを感染後得られた溶菌液を用いて、SpoOC⁺形質導入活性を調べたところ、1株由来の溶菌液にのみ低い形質導入活性が認められた

(2.0×10^2 transductants/ml). 得られた9V株由来 Spo^+ 形質導入菌の中から、 pII 活性ファージ産生能をもつ二重溶原菌9V(pII)($pII\Delta spoOC^+$)を選択し、15株と名付けた。15株から調製した溶菌液には比較的高い $SpoOC^+$ 形質導入活性(3.1×10^5 transductants/ml)が認められたので以下の実験に用いた。

$pII\Delta spoOC^+$ -1 ファージの性質

15株から調製したファージを $CsCl$ 密度勾配遠心にかけて $pII\Delta spoOC^+$ -1 ファージを分離することができた(図3)。 $pII\Delta spoOC^+$ -1 DNAを $HindIII$ で切断し電気泳動すると、30以上の断片が生じたが(図4レーン2)、 pII DNAの $HindIII$ 断片(図4, レーン1)と比べると、少なくとも3つの断片(5.2Mdal, 3.7Mdal, 1.7Mdal)が新たに生じ、少なくとも6つの断片(5.0Mdal, 2.4Mdal, 2.2Mdal, 1.9Mdal, 1.15Mdal, 1.03Mdal)が失われていた。これらの結果から、9V(pII)株のプロファージ上で複数のDNA断片の間で組み換えが生じていたことがわかった。

新たに生じた3つの $HindIII$ 断片の内どの断片上に $spoOC$ 遺伝子が存在するかを調べるために、 $pII\Delta spoOC^+$ -1 DNAの $HindIII$ 断片を低融点アガロースゲル電気泳動で分離した後、ゲルをスライスし、各ゲルスライスに含まれる $SpoOC^+$ 形質転換活性を測定した。図5に示すように、 $SpoOC^+$ 形質転換活性は、予想通り5.2Mdal断片上に見出され、枯草菌168 Tp^+ 株DNAの $HindIII$ 断片を用いた結果(表3)と一致した。

$pII\Delta spoOC^+$ -1 ファージを用いた Spo^+ 形質導入をいくつかの spo 変異株に対して試みた(表4)。9V株($spoOC$ 9V)と同様にSS211株($spoOC$ 9V $recE^+$)からも Spo^+ 形質導入菌が得られたので、機能的に完全な $spoOC$ 遺伝子が、5.2Mdal断片上に含まれていることが確かめられた。また、3種類の $spoOA$ 変異株($spoOA12$, $spoOA34$, $spoOA110NA$)からも $spoOC$ 9V株を受容菌に用いた場合とほぼ同じ頻度で Spo^+ 形質導入菌が得られた。さらに $spoOA$ (Ab^S

抗生物質感受性)由来の抗生物質耐性部分復帰突然変異株 spo0A12 abrB23, spo0A11ONA cpsX30 も SpO^+ に形質導入された(脚注参照)。PBS1ファージを用いた一般形質導入実験の結果、spo0A12変異株の $\phi11dspo0C^+$ 溶原菌 (SpO^+) の染色体上で spo0A12 マーカー(地図上の位置 215)が lys 遺伝子(地図上の位置 210)と連鎖していることがわかり、この溶原菌は、 Δ テロ部分二倍体 (spo0A12/spo0A⁺) であることがわかった。この結果は、完全な spo0A 遺伝子も $\phi11$ ファージにクローニングされた断片上にはのっていることを示している。またプロファージ部分二倍体 (spo0A⁻/spo0A⁺) では、abrB および cpsX 変異の有無にかかわらず spo0A 変異が野生型 spo0A⁺ に対して劣性であることを示している。この結果は Karmazyn ら (1972) の結果とは一致せず、Trowsdale らの結果 (1978a) と一致した。表 4 に示すように spo0C 及び spo0A 遺伝子の近傍に位置する spoIII A, spoIII B, 及び spoIV B 遺伝子は、クローニングされた断片上にはのっていないかった。

脚注 Karmazyn ら (1972) は、trpE26 部分二倍体を用いた実験で、spo0A 変異が野生型に対して優性であるという結論を導き出したが、Trowsdale ら (1978a) は、同じ系で spo0A 株の部分復帰突然変異株 spo0A abrB を用いて、spo0A 変異が野生型に対して劣性であるという逆の結論を導き出した。本実験では彼らと異なる系(プロファージ部分二倍体)を用いて、abrB および cpsX 変異の有無にかかわらず、spo0A 変異が野生型に対して劣性であることを示した。

特殊形質導入ファージ $\phi105dspo0A^+$ の作製

$\phi11dspo0C^+$ は単独では形質導入活性のあるファージ粒子をつくれず、また $\phi11$ との二重溶原菌から得られるファージ粒子の量も少ない(図 3) ので、 $\phi11dspo0C^+$ DNA の 5.2 Mdal HindIII 断片を小型の溶原ファージ $\phi105$ (2.5 Mdal) にプロファージ形質転換法を用いてクローニングし、特殊形質導入ファージ $\phi105dspo0A^+$ を得た。9V 株の $\phi105dspo0A^+$ 溶原菌から mitomycin C 処理によってファージ

を誘発したところ非常にゆっくりと溶菌が進行した(37℃5時間後でも完全に溶菌しなかった。一方 $\phi 105$ 溶原菌は約2時間で完全に溶菌した)。得られた溶菌液にはプラーク形成能をもつファージは含まれておらず、また Spa^+ 形質導入能もなかった。しかし、ヘルパーファージ $\phi 105$ を加えた場合には、 Spa^+ 形質導入能を示した(表5)。9V株($spo0C9V$)のみでなく、SS211株($spo0C9V$, $recE4$)、1S9株($spo0A12$)に対しても Spa^+ 形質導入能が認められたが、 $\phi 105$ ファージのみでは形質導入はまったく起こらなかった。これらの結果は、 $\phi 105dspo0A^+$ の誘発にはヘルパーファージを必要としないが形質導入には(おそらく溶原化の段階)にはヘルパーファージを必要とすることを示唆している。

・ $\phi 105dspo0A^+$ の溶原菌から得られたファージを CsCl 平衡密度勾配遠心 にかけて一本のファージバンドを形成した。等量の培養液から得られるファージの量は、 $\phi 105$ の約半分であった。 $\phi 105dspo0A^+$ DNA を $HindIII$ で切断し (図6レーン2)、 $\phi 105$ DNA の $HindIII$ 断片 (図6レーン1) と比較したところ、 $spo0C$ 遺伝子を含む 5.2 Mdal の断片が新たに生じたが、それ以外に新たに生じた断片はなかった。また $\phi 105-HindIII$ 断片の内々なくとも5本の断片 (3.6, 3.1, 1.55, 0.72, 0.58 Mdal) が欠けていた。 $\phi 105$ の溶原化に必要な遺伝子はこれら欠失した DNA 断片上に存在していると考えられる。以上の結果から、5.2 Mdal $HindIII$ 断片には機能的に完全な $spo0C$ 遺伝子のみでなく、 $spo0A$ 遺伝子も含まれていることが示唆された。

遺伝子変換による $\phi 105dspo0A12$ ファージの作製

1S9株($spo0A12$)の $\phi 105dspo0A^+$ 溶原菌 (Spa^+) は、 $spo0A12/spo0A^+$ のヘテロ部分二倍体であるが、このようなヘテロ部分二倍体から competent cells を選択すると高頻度で遺伝子変換が起こりホモ部分二倍体が得られることが報告されている(宮地ら、1982)。この手法を用いて $spo0A12/spo0A12$ ホモ部分二倍体を得た。1S9株の $\phi 105dspo0A^+$ 溶原菌の competent culture に $trpC2^+$ 遺伝子をもつ pHT1 DNA を加え、Spizizen 最少栄養培地上

で Trp^+ 形質転換菌を選択した。 spoOA 変異株は, Spizizen 最小栄養寒天培地
 上でも透明なコロニーを形成するので野生株と容易に区別できる。 SpoOA
 表現型を示すコロニーを34株 (Trp^+ 形質転換菌の約1%) 分離した。その内29
 株は $\phi 105$ に感受性であり、プロファージを喪失したものと考えられたが、残り
 の5株は $\phi 105$ に対する免疫性をもっており、プロファージを保持していた。後
 者から2株を選び、そこから得られたファージDNAと元の $\phi 105$ dspoOA⁺-1 D
 NAを HindIII で切断し、電気泳動を行ない比較した(図7)。 spoOA 遺伝
 子を含む5.2Mdal断片も含めて HindIII 断片のパターンは3者とも同じであ
 った。また後述するように spoOA 遺伝子は1.53Mdalの BclI 断片の上に存在
 することが明らかとなったので、BclI 断片も比較したが3者の間に違いは認
 められなかった。従ってこれらのファージでは、ファージ上の spoOA 遺伝子が欠
 失(少なくとも数10bp以上の欠失ならば、この条件でも検出できる。)していないこと
 がわかったので、プロファージ上の spoOA 遺伝子に染色体上の spoOA12 変異
 が移った結果生じたものと考え、各々 $\phi 105$ dspoOA12-1, $\phi 105$ dspoOA12-2 と
 名付けた。

spoOA12変異と spoOC9V変異との相補性検定

$\phi 105$ dspoOA12-1 及び $\phi 105$ dspoOA12-2 ファージを用いて spoOA12 変異と
spoOC9V 変異との相補性検定を行なった。ヘルパーファージ $\phi 105$ を加えて
 9V株 (spoOC9V)、SS211株 (spoOC9V recE4)、IS9株 (spoOA12) に対する Spo^+
 形質導入を試みた。表6に示したように対照に用いた $\phi 105$ dspoOA⁺-1 は
 すべての株に対して形質導入能があるが、 $\phi 105$ dspoOA12-1 及び $\phi 105$ dspoOA12-
 2はSS211株に対する形質導入能が全くなかった。9V株からは $\phi 105$ dspoOA⁺-1
 の約1000分の1の頻度で Spo^+ 形質導入菌が得られたが、これらのコロニーはう
 す茶色ではなく、すべて濃茶色であり、RecE4依存性の組み換えの結果
 生じたものであることを示している。IS9株を受容菌にした場合も
 Spo^+ 形質導入菌はまったく生じなかったが、これはファージ上の spoOA 遺

伝子に $spoOA/2$ 変異がのっていることから考えて当然である。以上の結果は、 $spoOA/2$ 変異と $spoOC9V$ 変異の間に相補性がなく、 $spoOC9V$ 変異は $spoOA$ 遺伝子内の変異であることを示唆している。

5.2 Mdal HindIII 断片の切断地図

$\phi 105dspoOA^+$ -1 ファーヅの 5.2 Mdal 断片上のどの領域に $spoOA$ 遺伝子が含まれるかを調べるために $\phi 105dspoOA^+$ -1 DNA から得た 5.2 Mdal HindIII 断片を用いて制限酵素による切断地図を作製した(図8)。さらに $spoOC9V$ 変異がどの断片上に存在するかを決めるため、低融点アガロースゲル電気泳動で分離した各断片の $SpoOC^+$ 形質転換活性を調べた。4種類の制限酵素によって生ずる断片について調べた結果、XbaI, SacI, BclI 断片の各々 A 断片にのみ形質転換活性が見出された(図8右)。また EcoRI 断片では A, B, C, いずれの断片にも形質転換活性がなかったが、EcoRI 不完全分解物を用いたところ、A+B 断片に形質転換活性が見出された。以上の結果から、 $spoOC9V$ 変異部位は、図8の下に示すように、BclI-A 断片(1.53 Mdal)上で SacI-XbaI の間(約 0.65 Mdal)にあり、EcoRI 切断部位の近傍に位置することがわかった。

特殊形質導入ファーツ $\phi 105dspoOA^+-Bc-1$ の作製

1.53 Mdal BclI 断片上に完全な $spoOA$ 遺伝子がのっているかどうかを調べるために、BclI で切断した 5.2 Mdal 断片と $\phi 105$ DNA を用いて 9V ($\phi 105$) 株に対して ϕ プロファーツ形質転換法を試みた。その結果特殊形質導入ファーツ $\phi 105dspoOA^+-Bc-1$ を得た。 $\phi 105dspoOA^+-Bc-1$ ファーヅは単独で誘発可能だが、形質導入には、ヘルパーファーツ $\phi 105$ を必要とした。 $\phi 105dspoOA^+-Bc-1$ ファーヅは 9V 株($spoOC9V$)、SS211 株($spoOC recE4$)及び 159 株($spoOA/2$)に対して Spo^+ 形質導入が可能であった(表7)。また $\phi 105dspoOA^+-Bc-1$ ファーヅの DNA を BclI で切断すると予想通り 1.53 Mdal BclI 断片が検出された(図9)。これらの結果から、1.53 Mdal BclI 断片上には機能的に完全な $spoOA$ 遺伝子

がのっていることが示唆された。

II. spoOA⁺断片の枯草菌マルチコピープラスミドへのクローニング

spoOA⁺断片のプラスミドpBD9へのクローニング

河村ら(Kawamura, et al. 1981)は、spoOF遺伝子が枯草菌内にマルチコピー存在すると、孢子形成が阻害されることを報告している。同様の現象は他の孢子形成遺伝子についても報告されている(Banner, et al. 1983; Ayaki and Kobayashi, 1984)。spoOA遺伝子のコピー数の増大が枯草菌に与える影響を調べるため、spoOA⁺断片のマルチコピープラスミドへのクローニングを行なった。まず最初に5.2Mdal HindⅢ断片のプラスミドへのクローニングを試みた。p11dspoOA⁺-1 DNAのHindⅢ断片(約30種類の断片を含む)をプラスミドを用いてSS211株(spoOC⁻ recE4)に導入し、多数の形質転換菌を得たが、Spo⁺(茶色)のコロニーは出現しなかった。またSS209株(spo⁺ recE4)を受容菌に用いて同様の実験を行ない、得られた多数の形質転換菌の中から今度はSpo⁻(うす茶色または白色)のコロニーを選び、プラスミドを取って調べたが、5.2Mdal断片をもつプラスミドは得られなかった。これらの結果から、spoOA遺伝子もコピー数増大によってspoOC変異を相補しなくなることで、および宿主の増殖を阻害することが予想された。

次に精製した1.53Mdal BclⅠ断片とプラスミドpBD9を用いてクローニングを行なった。pBD9は分子量5.4×10⁶のプラスミドでカナマイシン耐性(Km^r)とエリスロマイシン耐性(Em^r)を発現し、枯草菌内では、染色体1分子当たり約17分子が存在する(Scheer-Abramowitz, et al. 1981)。またpBD9に一つ所だけ存在するBclⅠ切断部位にDNA断片を挿入するとエリスロマイシン感受性(Em^s)になる(Gryczan, et al. 1980)。φ105dspoOA⁺-BclⅠDNAから精製した1.53Mdal BclⅠ断片(0.14μg)とBclⅠで切断したpBD9 DNA(1μg)を結合した後、SS209株(spo⁺ recE4)を受容菌に用いてKm^r形質転換を行なった。311個のKm^r形質転換菌がSchaeffler 寒天培地(Km 5μg/ml)上に

生じた。それらの内約20%(58株)は $Km^r Em^s$ であったが、増殖が尋常
 非常に小さなコロニーを形成した。一方残りの80%は $Km^r Em^r$ でpBD9保
 持菌と同じ茶色(*Spo*⁺)の大きいコロニーを作った。 $Km^r Em^s$ のコロニーをSchaeffer
 寒天培地にひろげるとほとんどのクローンから、茶色の大きいコロニーのみが生
 じた。これらのコロニーからプラスミドDNAを抽出して解析すると、すべてのプ
 ラスミドが様々な欠失を起こしていることがわかった。一方2株からは、白色
 (*Spo*⁻)で小さなコロニーも茶色の大きいコロニーに混じって生じてきた。この白色
 で小さなコロニーをさらにプレートに広げると、ほとんど同じタイプのコロニーが
 生じたが、茶色の大きいコロニーもまれに生じてきた。この白色コロニーの持
 つプラスミドDNAの構造を調べたところ、1.53Mdal BclI断片がpBD9に組
 み込まれていることが確かめられ、各々pBA1, pBA2と名付けた。また白
 色コロニーから生じた茶色の大きいコロニーは、欠失プラスミドを持っているこ
 とがわかった。これらの結果から、*spoA*遺伝子を含む1.53Mdal断片
 が枯草菌中にマルチコピー存在すると、宿主の増殖を著しく阻害すること
 がわかった。1.53Mdal断片を含む欠失を起こしたプラスミドは、この増殖阻
 害能を持たないためにこれら欠失プラスミド保持菌が速やかに増殖し、そ
 のため、 $Km^r Em^s$ の小さなコロニーの内の大部分が、これら欠失プラスミド保持菌で
 占められたものと考えられる。また白色の小さなコロニーは、1.53Mdal断片を
 含むプラスミドpBA1, pBA2をもっていたが、これらのプラスミドDNAを用いて、
 再びSS209株を Km^r 形質転換すると、元と同じ白色の小さなコロニーが生じ
 たので、これらのプラスミドは1.53Mdal断片上に点突然変異を生じ、その結
 果宿主に対する増殖阻害能が弱くなったものと考えられた。この変異を
*sgi*変異(suppressor for growth inhibition)と名付け、pBA1及びpBA2
 に生じた変異を各々 *sgi-1*, *sgi-2* とした。

以上述べたようにSS209株を受容菌にした場合は、野生型の1.53Mdal
 断片を含むプラスミドの保持菌を分離することができなかつたので、次

に SS209株とは genetic background の異なる SS273株 ($spo^+ recE4$) を受容菌に用いて同様の実験を行なった。得られた $Km^r Em^s$ 形質転換菌は、やはり小さいコロニーを形成した。これらの形質転換菌 (30株) を Schaeffer 寒天培地 ($Km 5 \mu g/ml$) にひろげると、どのコロニーからも透明で扁平なコロニーと茶色 (Spo^+) の大きいコロニーが生じてきた。透明で扁平なコロニーの中には、数ヶずつ茶色の cells が混ざっており、コロニーの生育中に生じた欠失プラスミドを持つ菌が増殖したものと考えられた。また $Km^r Em^s$ 形質転換菌の1株のみは、透明で扁平なコロニーと茶色 (Spo^+) のコロニー以外にも、pBA1, pBA2 保持菌と同じ型の白色で小さなコロニーを生じた。透明で扁平なコロニー及び白色で小さなコロニーから、プラスミド DNA を抽出したところ、両者とも pBA1 及び pBA2 と同じ 6.9 Mdal の plasmid を持っていた。また茶色のコロニーからは、欠失プラスミドが検出された。以上の結果から、SS273株を宿主にした場合にも野生型の 1.53 Mdal 断片を含むプラスミドは宿主の増殖を著しく阻害することがわかった。そのため透明で扁平なコロニーしか作れず、しかもそこから常に欠失プラスミドの保持菌が派生して、非常に不安定なため、これ以上の実験には用いなかった。また比較的安定な白色の小さなコロニーから取られたプラスミドは pBA11 と名付けた。このプラスミドの 1.53 Mdal 断片上にも pBA1, pBA2 と同様の *sgl* 変異が生じているので *sgl-3* と名付けた。

sgl 変異の性質

sgl 変異をもつプラスミドの構造を図10に示した。1.53 Mdal 断片の方向は pBA1 と pBA2 が同じで、pBA11 は逆向きであった。これらのプラスミドを SS273株 ($spo^+ recE4$) に導入すると、Schaeffer 寒天培地 ($Km 5 \mu g/ml$) 上で白色 (Spo^-) のコロニーを作り、宿主の孢子形成を阻害するので、孢子形成の阻害がどの程度なのかを調べた。pBA1 及び pBA11 保持菌の培養液中に含まれる熱耐性胞子の数は、対照の pBD9 保持菌 (2.7×10^8 熱耐性胞子/ml) の約 100 分の 1 に減少していた。しかも生じた熱耐性細胞は、すべて

Spo^+ (黒色)であり、これらは欠失プラスミドを持っているので、孢子形成は 10^5 以下の頻度までにまで低下していることがわかった。

pBA1及びpBA11プラスミド上に機能的に完全な $spoOA$ 遺伝子が残っているかどうかを調べるために、pBA1及びpBA11 DNAを用いて9V(4/05)株に対する Spo^+ プロフェーズ形質転換を行なったが、ほとんど Spo^+ 形質転換菌が得られなかった。従って sgl 変異は、 $spoOC9V$ 変異の近傍に生じた $spo2$ 変異であると思われた。そこで sgl 変異を枯草菌(Spo^+)染色体に導入して実際に $spo2$ の形質転換菌が生じてくるかどうかを調べた。 sgl 変異をもつプラスミドpBA1, pBA2, pBA11のDNA及びpBD9 DNAをpHVT1 DNAと共に168株($Spo^+ trpC2$)の competent cellsに導入し、 Trp^+ 形質転換菌を選択した。pBA1, pBA2, pBA11 DNA由来の Trp^+ 形質転換菌の中には約1/3%の割合で、 $spoOA$ 変異株型の透明なコロニーが生じてきた。 Spo^+ 株を各々2株ずつ分離してその性質を調べた。6株とも Km^S であり、 sgl 変異が染色体に導入されたことを示唆した。また培養液中には全く熱耐性細胞を含んでおらず $spo2$ 変異を生じていることが明らかになった。さらに6株とも $spoOA$ 変異株と同様に野生株の産生する抗生物質に感受性で、また抗生物質産生能も持たないことがわかった。これらの結果は、 sgl 変異がいずれも $spoOA$ 遺伝子内に生じた $SpoOA$ 表現型の変異であることを示唆した。後述するようにDNAの塩基配列の比較から、 $sgl-1$ 変異は実際に $spoOA$ 遺伝子産物のC末端近傍に生じたframe shift変異であることがわかった。ので、野生型 $spoOA$ 遺伝子を含むプラスミド保持菌では、過剰に生産された $spoOA$ 遺伝子産物が宿主枯草菌の増殖を阻害するものと思われる。

Ⅲ. spoOA 野生型遺伝子及び変異型遺伝子の ϕ 105d ϕ の大腸菌へのクローニング

1.53Mdal (2.4 kbp) BclI断片のpBR322へのクローニング

spoOA 遺伝子を含む1.53Mdal断片(以下2.4 kbp断片と称する)の構造をさらに詳細に調べるため、容易に大量のDNAが得られる大腸菌のプラスミドベクターpBR322へのクローニングを行なった。 ϕ 105d ϕ spoOA⁺-BclI DNA, ϕ 105d ϕ spoOA12-I DNA及びpBA1 DNA由来の2.4 kbp BclI断片(各々spoOA⁺, spoOA12変異, sgi-1変異遺伝子を含む)をpBR322のBamHI部位へ挿入して、pBBC1(spoOA⁺), pBBCA1,2(spoOA12), pBBM1,2(sgi-1)プラスミドを得た。これらのプラスミドの構造を図11に示した。pBR322に対する2.4 kbp断片の向きは、2方向可能であるが、pBBC1, pBBCA1, pBBM1は同じ向きでpBBCA2, pBBM2はそれと逆向きである。野生型のspoOA遺伝子を含むプラスミドは調べた9個とも同じ向きで、2.4 kbp断片が逆向きに挿入したものは得られなかった(理由については後で考察する)。また、spoOA遺伝子の位置を決めるために2.4 kbp断片を切断する制限酵素BglII, HindII, EcoRIを用いて、様々な欠失プラスミドを作製した。図12にはこれらの欠失プラスミドに含まれる制限酵素断片の範囲を示した。野生型spoOA⁺遺伝子を含む2.4 kbp断片からは6種類の欠失プラスミドを作製し、sgi-1変異をもつ2.4 kbp断片からは2種類(pBBM1, pBBH1)を作製した(図12脚注参照)

spoOC9IV spoOA12 sgi-1変異の位置

pBBC1及び欠失プラスミドによるSpo⁺形質転換を9IV株(spoOC9IV), 1S9株(spoOA12)に対して試みた(表8)。Spo⁺形質転換活性はpBBC1, pBBM1, pBBCA1H, pBBB2, pBBB2ΔE1では認められたが、pBBH1, pBBCA1ΔE, pBBB1ΔEには見出せなかった。従ってspoOC9IV変異はBclI-EcoRI断片上に位置することがわかった。spoOC9IV変異が、SacI部位とXbaI部位の間でEcoRI部位の近傍に存在することはすでに示した(図8参照)ので、両者からspoOC9IV変異は、SacI-EcoRI断片(約430bp)上のEcoRI部位近傍に位置することがわかった。

$Spo0A^+$ 形質転換活性は、 $pBBC1$, $pBBC/\Delta H$, $pBBC/\Delta E$ には認められたが、その他のプラスミドには活性がなかった。従って $spo0A/2$ 変異は $EcoRI$ - $HpaI$ 断片(約780bp)上に存在し、おそらく $BglII$ 部位近傍に位置することが示された。次に、 $sgl-1$ 変異の位置を決めるため、 $sgl-1$ 変異を含む $pBBCM2$ 及び欠失プラスミド $pBBBM1$, $pBBHM1$ を用いて、QB943株($pyrD1$, spo^+)に対する $Spo0A$ 形質転換($sgl-1$ は $Spo0A$ 表現型をもつ)を $PyrD^+$ 形質転換との conjugation で行った(表9)。 $pBBCM2$ 及び $pBBBM1$ からは $Spo0A$ 表現型を示す $PyrD^+$ 形質転換菌が生じたが、 $pBBHM1$ からは生じなかった。また対象に用いた野生型のDNA断片をもつ $pBBB1$ 及び $pBBH1$ からは $Spo0A$ 表現型の形質転換菌は生じなかった。これらの結果から、 $sgl-1$ 変異は、 $pBBBM1$ に含まれる $BclI$ - $BglII$ 断片(約1.17kbp)上に存在することがわかった。

$\phi 105d spo0A^+-L-18$ フォーツ及び $pBBC1(spo0C9V)$ プラスミドの作製

$spo0C9V$ 変異は $pBBB2$ に含まれる1.17kbpの $BclI$ - $BglII$ 断片上に存在することがわかったので、この断片上に完全な $spo0C(spo0A)$ 遺伝子が含まれているかどうかを調べるために、 $pBBB2$ をプロフォーツ形質転換法を用いて9V($\phi 105$)株に導入した。また野生型及び $sgl-1$ 変異型の2.4kbp断片を含む $pBBC1$, $pBBCM2$ も同様にして9V($\phi 105$)株に導入した。表10に示すように、すべてのプラスミドDNAから Spo^+ 形質転換菌が生じた。しかし $pBBB2$ 及び $pBBCM2$ から得られた Spo^+ 形質転換菌のコロニーの中にはうす茶色のものはなく、すべて濃茶色であり、染色体上の $spo0C9V$ 領域で起こった組み換えの結果生じたものであった。

一方 $pBBC1$ から得られた Spo^+ 形質転換菌の内の約5%はうす茶色のコロニーを形成し、 $\phi 105$ のプロフォーツ上に $pBBC1(spo0C^+)$ が組み込まれた部分二倍体 $spo0C^-/spo0C^+$ であることを示唆した。これらの結果から、1.17kbp $BclI$ - $BglII$ 断片上には完全な $spo0C(spo0A)$ 遺伝子が含まれないことが示唆された。また $pBBCM2$ に含まれる $sgl-1$ 変異が $spo0C9V$ 変異を相補しないことが

ら、sgl-1はspo0C(spo0A)遺伝子内の変異であることが示唆された。

pBBC1から得られたうす茶コロニーから、すでに述べた方法でpBBC1全体を含む特殊形質導入ファージ $\phi 105dspo0A^+-L-18$ を得た。 $\phi 105dspo0A^+-L-18$ ファージは単独で誘発が可能であり、ヘルパーファージ $\phi 105$ を加えると、9V株(spo0C9V)、SS211株(spo0C9V recE4)、IS9株(spo0A12)に対して Spo^+ 形質導入活性を示した。 $\phi 105dspo0A^+-L-18$ がこれらの株に対して、 Spo^+ 形質導入活性を示すことから、pBBC1上にクローニングされた24 kbp断片上に完全なspo0A遺伝子がのっていることが確かめられた。

さらに $\phi 105dspo0A^+-L-18$ ファージ上のspo0A⁺遺伝子をspo0C9V変異遺伝子に変換するため、9V株の $\phi 105dspo0A^+-L-18$ 溶原菌(spo0C9V/spo0A⁺部分二倍体)から、自然に生じた Spo^- コロニーを分離し、そこから、 $\phi 105dspo0C9V-1$ ファージを得た。 $\phi 105dspo0C9V-1$ ファージは、SS211株(spo0C recE4)及び9V株(spo0C9V)に対する Spo^+ 形質導入能を失っており、ファージ上のpBBC1内にあるspo0A遺伝子領域にspo0C9V変異が移っていることを示した。ファージDNAから、プラスミドDNAを取り出すために $\phi 105dspo0C9V-1$ DNAをHindIIIで切断し、自己結合してから、大腸菌DH1株を形質転換し、アンピシリン耐性(Ap^r)形質転換菌を選別した。このようにして得られたプラスミドpBBCC1はspo0C9V変異を持っているが、構造はpBBC1と同じであった(図11参照)。

IV. spo0A遺伝子産物の同定とspo0A遺伝子の塩基配列の決定

In vitro 転写翻訳系で合成される蛋白質の解析

pBR322にクローニングされたspo0A遺伝子から合成される蛋白質を調べるために大腸菌のin vitro 転写翻訳系を用いた(Zubay, 1980)。フィルオログラフィーの結果を図13に示す。レーン1はDNAを加えないと蛋白質が合成されないことを示している。pBR322から合成される主要な蛋白質はamp遺伝子産物の β -lactamaseである(レーン2)。tet遺伝子産物はこの実験の条件下では検出されなかった。野生型spo0A遺伝子をもつpBBC1からは、 β -lactamase 以外に約27.5 kodaltonsの蛋白質が合成された(レーン3)。一方spo0A12変異遺伝子をもつpBBCA1からは、27.5 kilodalton-蛋白質は合成されず、代わりに約6.3 kilodaltonsの蛋白質が合成されていた(レーン4)。pBBCA2からも同様に6.3 kilodalton蛋白質が合成された(レーン7)。spo0A12変異はamber変異であり(Hoch, 1971)、この6.3 kilodalton蛋白質はamber fragmentとみなすことができるので、27.5 kilodalton蛋白質がspo0A遺伝子の産物であると同定した。spo0C9V変異遺伝子をもつpBBCC1からはspo0A遺伝子産物と同じ大きさの27.5 kilodaltonsの蛋白質が合成された(レーン5)。またsgl-1変異遺伝子をもつpBBCM1及びpBBCM2からは27.5 kilodalton蛋白質よりもやや小さい約26.5 kilodaltonsの蛋白質が合成されており(レーン6, 8)、sgl-1変異がspo0A遺伝子内に生じた変異であることを示した。欠失プラスミドpBBC1 Δ Eからは約27.5 kilodaltonsと、約25.5 kilodaltonsの2本のバンドが検出され(レーン9)、pBBC1 Δ Hからは、 β -lactamase 以外にはっきりしたバンドは検出されなかった(レーン10)。pBBC1 Δ Eはspo0C9V変異部位を含むDNA断片を失っているにもかかわらず、spo0A遺伝子産物に相当する大きさの蛋白質が合成されているが、EcoRI部位よりもC末端側はpBR322の塩基配列を利用して、たまたま同じ大きさの蛋白質が生じていると考えられる。従ってspo0C9V変異は、spo0A遺伝子産物のC末端近傍に位置

することが予想され、このことは後述するように塩基配列から確かめられた。また pBBC1ΔH は、転写あるいは翻訳の開始に必要な領域を欠失したために、spo0A 遺伝子産物を合成できなくなったものと思われる。これらの結果から、spo0A 遺伝子産物の転写の方向は、図12に示した2.4 kbp断片上で HpaI 部位から EcoRI 部位へ向かっていることが示唆された。

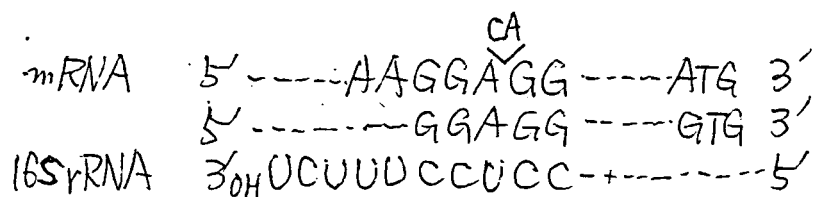
spo0A 遺伝子の塩基配列

spo0A 遺伝子を含む約 2.4 kbp 断片の全塩基配列を M13 dideoxy chain termination 法を用いて決定した。2.4 kbp 断片の制限酵素地図及び、塩基配列決定の戦略を図14に示した。また spo0A12 spo0C9V sgl-1 各変異遺伝子の塩基配列も決定した。これら変異遺伝子の塩基配列は、形質転換実験によって変異が生じていることのおかった領域についてのみ決定した(図14) 2375 bp からなる全塩基配列の中に 27.5 kilodaltons の spo0A 遺伝子産物をコードし得る open reading frame はひとつしかなく、3つの変異はすべてその open reading frame の中に位置していた(図14下段) 図15には spo0A 遺伝子とその周辺の塩基配列 (1353 bp) 及びこの領域にコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示した。変異遺伝子の塩基配列は3変異とも1ヶ所だけが野生型と異なっているだけで、それ以外の塩基配列は調べた全域にわたって野生型遺伝子と同じであった。spo0A12 変異では +184 の C が T に置換し、amber 変異に相当した。spo0C9V 変異では +68 の C が T に置換し、missense 変異を生じていた。また sgl-1 変異では +666 の T と +667 の G との間に A が付加されて frame shift 変異を起としていた。

spo0A 遺伝子産物の翻訳の開始と終止

spo0A 遺伝子産物をコードする open reading frame には開始 codon として可能なものが2つ存在した。ひとつは図15に示した ATG であり、もうひとつはそれよりも 28 codon 上流の GTG である。各々 239 アミノ酸残

基及び267アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしている。またATGの5塩基上流には AAGGACAGG, GTGの7塩基上流には GGAGGの塩基配列が存在するが、どちらも枯草菌の16S rRNAの3'末端とよい相補性を示しており (McLaughlin et al. 1981)、リボソームの結合部位 (Shine and Dalgarno, 1975) として充分機能し得ると思われる。



239アミノ酸残基及び267アミノ酸残基からなる蛋白質の分子量の計算値は各々 26,472 及び 29,681 であり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で求めた *spoOA* 遺伝子産物の分子量 (27,500) から は どちらか 合成 されているのかわからない。一方 *spoOA* 3' amber fragment の場合は、ATG を開始 codon として用いると 61 アミノ酸残基からなる分子量 6,828 のポリペプチドができ、GTG を用いると 89 アミノ酸残基からなる分子量 10,037 のポリペプチドが作られることになるが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動から求めた *spoOA* amber fragment の分子量は約 6,300 であり 前者とよく一致した (図13 レーン4,7)。また低分子量のポリペプチド鎖を解析するために適した SDS-urea ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (Weber and Osborn, 1975) から求められた *spoOA* amber fragment の分子量も約 7,200 であり 前者とよく一致した (データは示さない)。これらの結果は、少なくとも大腸菌の *in vitro* 転写翻訳系で使われる開始 codon は ATG の方であることを示している。図15には ATG codon から始まるポリペプチドのアミノ酸配列のみを示した。*spoOA* 遺伝子産物をコードする open reading frame は TAA codon で終止するが、同じ frame で 2 及び 5 codon 下流にも終止 codon TGA, TAA が存在していた。

spoOA 変異蛋白質の構造

spoOA12, spoOC9V, sgi-1 変異遺伝子の塩基配列を野生型 spoOA 遺伝子の塩基配列と比較して、各変異蛋白質のアミノ酸配列を予測した。spoOA12 変異では spoOA 蛋白質の62番目のGluをコードするCAG codonが amber stop codon TAG に変わり、61アミノ酸残基からなる amber fragment が生じていた。spoOC9V 変異では 229番目のAlaのGCG codonがGTGに変わり、Valと置換していた(図16) また sgi-1 変異では 222番目のSerをコードするAGT codonの直後にAが付け加えられたため、frame shift 変異を起し、その結果 spoOA 蛋白質よりもアミノ酸残基が9個少ない変異蛋白質が生じていた(図16)。塩基配列から予想されるこれらの変異蛋白質の分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって求められた変異蛋白質の分子量とよく一致した。

図16に示すように、spoOC9V 変異によって置換したアミノ酸残基の位置は、spoOA 蛋白質のC末端に近く(C末端から11番目のAla)、sgi-1 変異(SpoOA 表現型)によって変化したアミノ酸残基の領域(223番目のGluからC末端のSerまで)の中に含まれていた。

考 察

本研究では、枯草菌の孢子形成初期遺伝子 spo0A の野生型及び変異型遺伝子をクローニングし、これらの遺伝子の塩基配列を決定した。また、これらの遺伝子から in vitro で合成される蛋白質の大きさを決定した。spo0A 遺伝子は239個のアミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、塩基配列から計算した分子量は26,472であった。この値は in vitro で合成した spo0A 蛋白質が SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で示した分子量の値(27,500)とよく一致した。また spo0C9V 変異の塩基配列から spo0CIV 変異が spo0A 遺伝子内に生じた missense 変異であることを明らかにし、spo0A 領域の2種類の spo0 変異である spo0A 変異と spo0C 変異が同一のシストロン内の変異であることを証明した。

spo0C 変異は、spo0A 変異と同じ遺伝子内の変異であることがわかったが spo0C 変異株の表現型は、spo0A 変異株(spo0 変異の中でも最も多面発現的である)ほど多面発現的ではない。すなわち spo0C 変異は孢子形成の過程は完全に阻害するが、それ以外の多くの形質は spo0A 変異のように失われていない(表1参照)。従って spo0A 蛋白質の機能に関して2通りのモデルが考えられる。第1のモデルでは、spo0A 蛋白質が2種類(あるいはそれ以上)の機能を持っており、それらが別々の構造単位(たとえば domain)に含まれていると仮定する。ひとつは孢子形成に重要な働きをする Spo0C 領域であり、もうひとつは多面発現に関連する Spo0A 領域とする。Spo0C 領域に生じた変異では孢子形成は完全に阻害されるが、Spo0A 領域が完全なために多面発現は起こらず Spo0C 表現型を示す。また spo0A/2 のように Spo0A 領域に生じた amber 変異では両者とも失われてしまい、孢子形成も阻害され、多面発現的な表現型を示すようになる。第2のモデルでは孢子形成過程及び多面発現に必要な spo0A 蛋白質の機能は共通のものであると考える。spo0C9V 変異の

ような missense 変異では変異蛋白質にもある程度の活性が残り、spo0A 蛋白質の支配下にある形質の内の多くは、そのに関しては充分であるが、胞子形成に必須なもの内の一部に関しては不十分なために胞子形成のみが完全に阻害されたものと考えられる。

spo0C9V 及び sgi-1 変異蛋白質の構造から以上提出した2つのモデルに関連する新しい知見が得られた。図16に示したように両変異蛋白質とも spo0A 蛋白質の C 末端近傍が変化していた。Chou と Fasman の方法 (Chou and Fasman 1974) を用いてこの領域の α ペプチド配列から二次構造を予測したところ、spo0A 蛋白質の 218-222 番目の残基は折り返し構造で、223-232 番目の残基は α -ヘリックス構造と予測された。spo0C9V 変異では、この α -ヘリックス構造の中、229 番目の Ala が Val に変化しており、よって、この領域が α -ヘリックス構造を形成する傾向が弱くなり、224-229 番目の残基はむしろ β -シート構造を形成することが予測された。従って胞子形成過程に関与する spo0A 蛋白質の機能には、223-232 番目の α -ヘリックス構造が重要であることが予想された。一方、sgi-1 変異蛋白質では 223 番目以降の α ペプチド残基が失われており、よって、結果、胞子形成及び多面形質発現が共に影響を受け、Spo0A 表現型を示すようになっている。これらの結果は、胞子形成及び多面形質に関する構造が共通の領域に含まれることを示唆しており、従って前述の2つのモデルの内の第2モデルを支持している。

spo0A 遺伝子を *Escherichia coli* にクローニングして枯草菌に導入すると宿主の増殖が著しく阻害された。さらに、この増殖阻害効果は、spo0A 蛋白質に生じた突然変異 (sgi-1 変異) によって抑制されることを発見した。spo0A 変異株では胞子形成初期のみならず、対数増殖期においても野生株との違いが見出されているので、spo0A 蛋白質も当

然、対数増殖期に合成されているはずである。従って増殖阻害効果は対数増殖期に過剰生産された spoOA 蛋白質によってもたらされたものと思われる。同様の増殖阻害効果は、spoOA 遺伝子を pBR322 にクローニングして大腸菌に導入した際にも観察された。pBBCA1 (spoOA12) 及び pBBCM1 (sgl-1) 保持菌は、pBR322 保持菌と同じ大きさのコロニーを形成した。一方、pBBC1 (spoOA^T) 保持菌は、それより小さいコロニーを形成した。このアウスミドでは spoOA 遺伝子を含む 2.4 kbp 断片は pBR322 の tet (テトラサイクリン耐性) 遺伝子のプロモーターの下流に挿入されており、spoOA 遺伝子の転写の方向は tet プロモーターからの転写と逆向きになっている。そしてこの逆方向に 2.4 kbp 断片が挿入されたアウスミドでは spoOA12, sgl-1 変異遺伝子からは得られなかった (pBBCA2 及び pBBCM2)、野生型 spoOA 遺伝子からは得られなかった (調べたが、これも pBBC1 だった)。理由は何だろうか。おそらく spoOA 遺伝子が tet プロモーターからの転写と同方向で入ったために spoOA 遺伝子の転写量がふえ、合成される spoOA 蛋白質の量が増加して、宿主大腸菌の増殖が著しく阻害されたためと考えられる (あるいは逆に pBBC1 においては tet プロモーターからの転写によって spoOA 遺伝子の発現が多少程度抑えられているために生き残っていると考えてもよい)。

また、sgl-1 変異遺伝子を含むアウスミド (pBA1) をその枯草菌では、胞子形成が著しく阻害された。胞子形成遺伝子が枯草菌中にマルチコピー存在すると胞子形成が阻害されるという現象は、spoDF 遺伝子の例 (Kawamura, et al., 1981) などでも知られているが、spoDF 遺伝子の場合、プロモーター領域のみがマルチコピー存在しても胞子形成が阻害されることが報告されている (曾根ら, 1983)。spoOA 遺伝子の場合も、それがあてはまるかどうかは、欠失プラスミド等を枯草菌に導入してさらに調べる必要がある。

spoOA 蛋白質をコードする open reading frame には翻訳開始 codon として

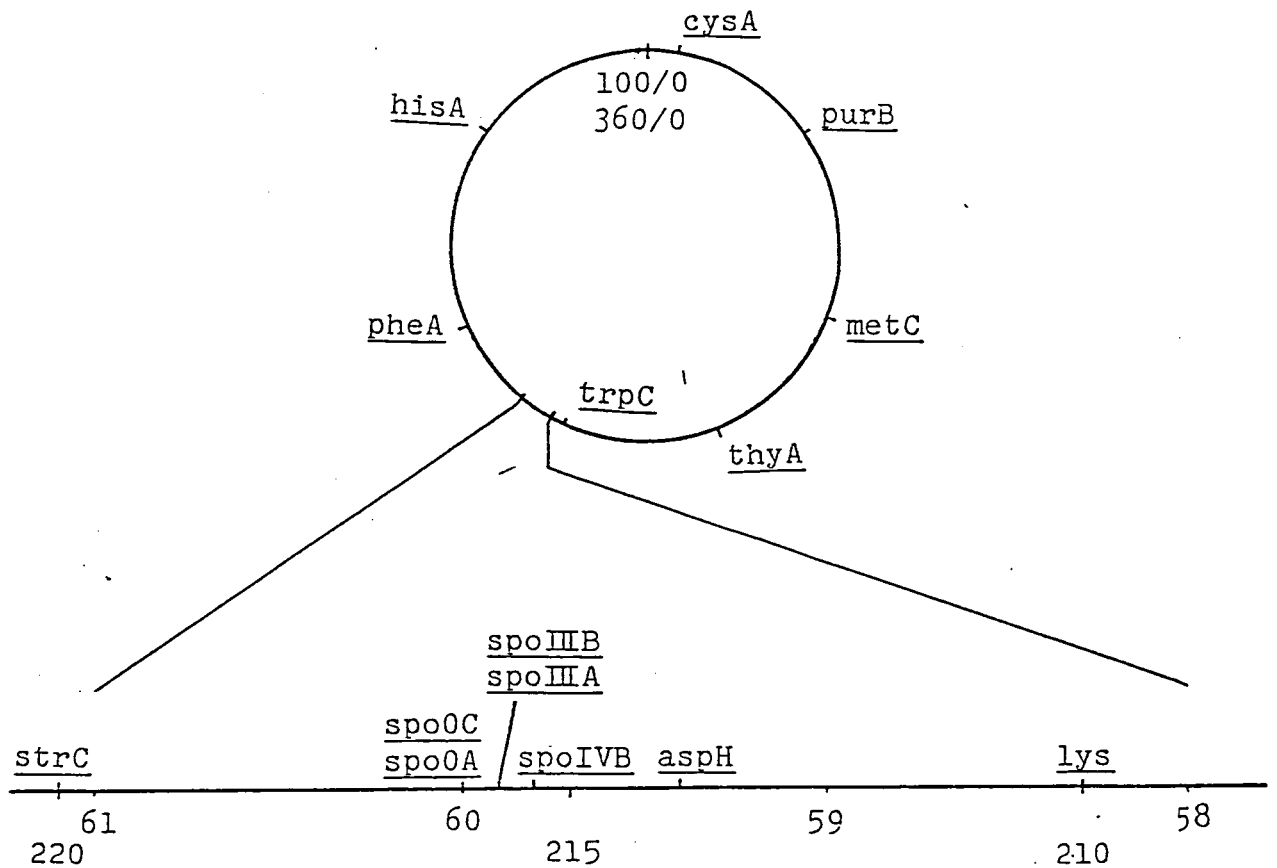
可能なものが2codon(ATGとGTG)存在し、いずれもその上流に各々5及び7塩基離れてリボソームの結合部位が存在した。spo0A 2 amber fragment の大きさから、少なくとも大腸菌の *in vitro* 転写翻訳系では、ATG codon の方がみが使われていると思われる。しかし、枯草菌の中では、GTG の方がみ、あるいは両方が使用されている可能性もあり、さらに詳しく調べる必要がある。

spo0A 遺伝子上流の BclI 部位(-1096)から、-360 に至る領域には長い open reading frame が存在した(図14下段, 図15)。この open reading frame は少なくとも 245 個以上のアミノ酸残基からなる蛋白質を code しているが、この遺伝子の正体は不明である。この open reading frame の直後には inverted repeat sequence が存在し、その後には T に富む配列(12塩基中の11塩基がT)が続いている。spo0F 遺伝子の3'領域にも類似の構造が見られるが(Shimotani, et al. 1983)、大腸菌の転写終結領域に存在する配列と似ており、転写の terminator と思われる。従って spo0A 遺伝子の転写の promoter は、ここよりも下流に存在すると思われる。また HpaI 部位から上流を失なったプラスミド pBBC14H では spo0A 蛋白質が全く合成されなかったので、HpaI 部位(spo0A 蛋白質の開始 codon ATG より 110bp 上流)よりも上流に promoter が存在すると思われる。枯草菌の RNA ポリメラーゼには多様性があり、数種の σ 因子をもっている(中山, Doi の総説がある, 1981)。ただ増殖期にある RNA ポリメラーゼの大半は σ^{54} をもち、これが転写を行なう promoter の配列は、大腸菌のものと同じである(図17)。これと類似の配列は、開始 codon から約 320~290bp 上流の領域及び約 230~180bp 上流の領域に存在した(図17)。また、この領域は非常に AT に富んでおり、開始 codon から、320~164bp 上流の領域(157bp)では、A+T 含量が 73% であった。一方 spo0A 遺伝子の蛋白質をコードしている領域(717bp)の A+T 含量は 54% であった。また、この AT に富んだ領域には、線り

返し配列が多く、たとえば開始codonの上流229~202bpの領域には5'GAAAAACA3'が2つと、それが1塩基だけ変化した5'GAATAACAが、direct repeatで並び、また278bp上流の5'TTTTTCGACAAA3'と、235bp上流の5'TTAGTCGAAAAA3'とは、12塩基中11塩基が相同のinverted repeatを形成する。これらの塩基配列の意義は明らかではないが、spo0A遺伝子の発現の調節に何らかの役割を果たしているものと思われる。一方、spo0A遺伝子の3'領域には、終止codon TAAの24bp下流にATに富むinverted repeat sequenceが存在した(図15)。この配列は転写のterminatorになり得ると思われるが、spo0A遺伝子の転写の開始、終結点を決めるためには、in vivoのmRNAを用いたS1ヌクレアゼマッピング及び ϕ 55 RNAポリメラーゼ等によるin vitroの転写実験が必要である。

spo0A蛋白質を同定することはできたが、その機能は依然として未知のままである。しかし、spo0A遺伝子がクローニングされその塩基配列が明らかとなったので、あとは今や古典的となった遺伝子工学の手法を用いれば、spo0A蛋白質の大量生産も可能になるであろう。大量生産ができれば、spo0A蛋白質の活性が未知のままでもspo0A蛋白質の精製を試みることが可能になり、spo0A蛋白質が胞子形成初期過程で演ずる役割を解明するための糸口を得られるものと考えている。

図1. Chromosomal map of B. subtilis



上部の円は枯草菌染色体の全体を示し、spo0A spo0C 近傍の領域を下に拡大して示した。map position は、全体を100と表示と360と表示の両方を記入した。

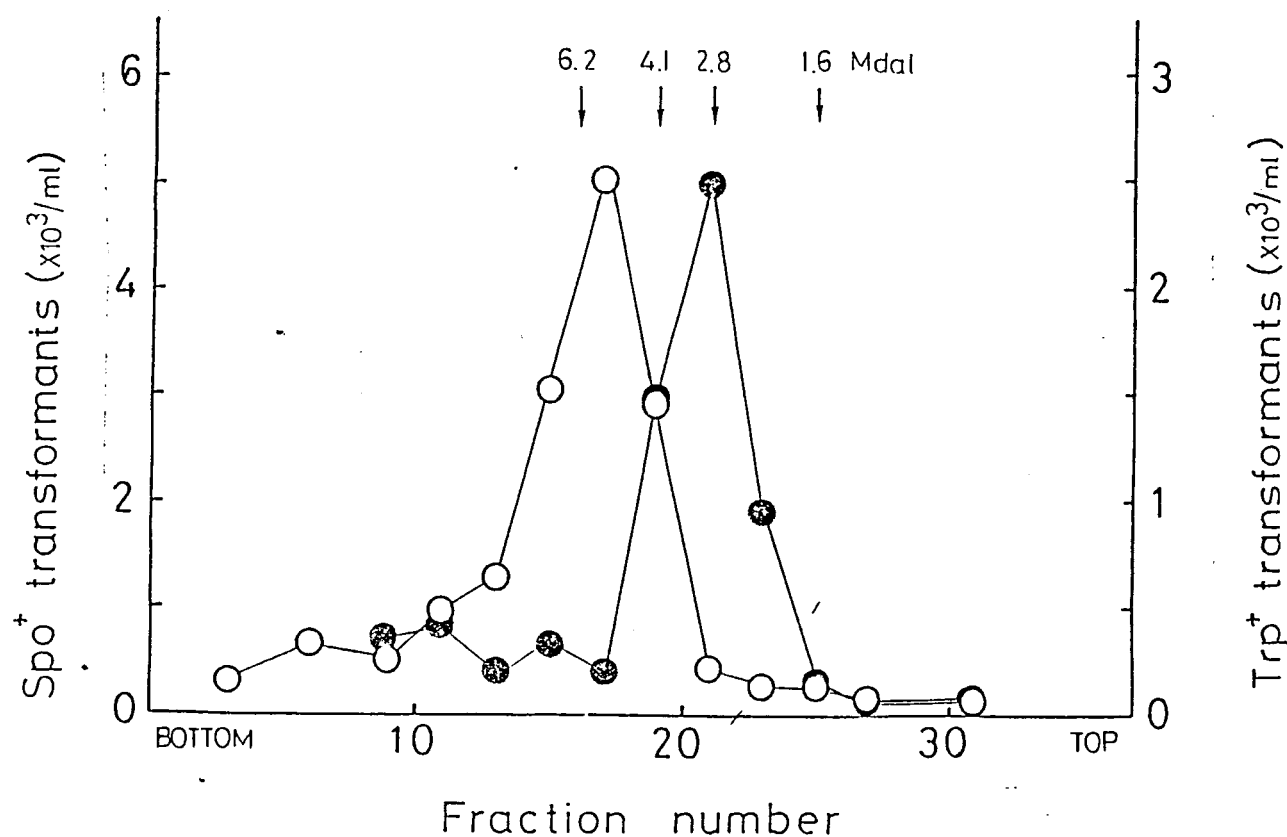


図2. ショ糖密度勾配遠心による枯草菌DNAのHindⅢ断片の分画。
HindⅢで切断した染色体DNAを5-20%ショ糖密度勾配遠心(Beckman SW 65 rotorを用いて45,000rpm 3時間)にかけた。遠心後、4滴ずつ分画し、各画分の一部(5 μ l)を用いて9V株に対するSpo⁺及びTrp⁺形質転換活性を測定した(実験材料と方法参照)。Spo⁺形質転換菌(O)の数はSchaeffer寒天培地上で、Trp⁺形質転換菌(●)の数はSpizizen最少栄養寒天培地上で測定した。矢印は λ ファージDNAのHindⅢ断片の位置を示し、分子量マーカーとして用いた。

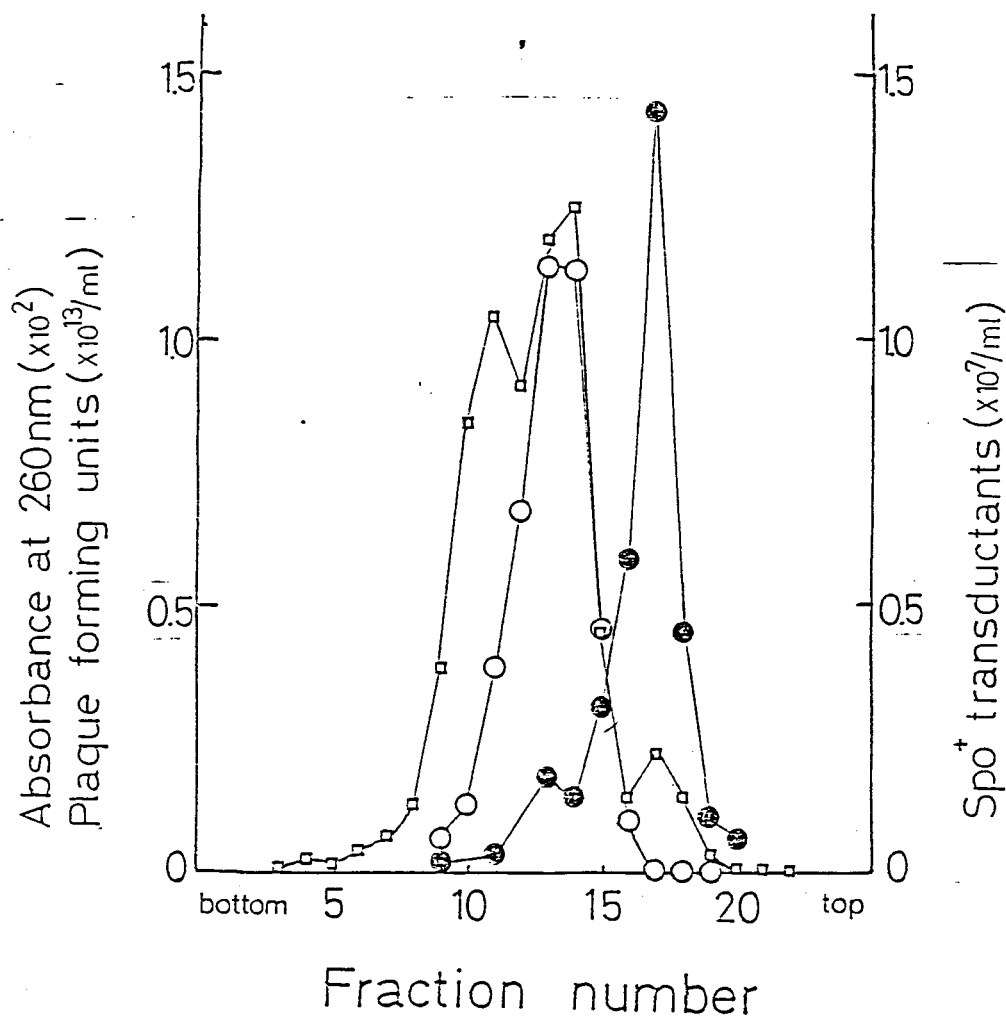


図3. CsCl 平衡密度勾配遠心による $\rho 11d spo 0C^{+1}$ ファージ粒子分離。二重溶原菌15株から調製した溶菌液を Sorvall SS-34 rotor を用いて 17,000 rpm 75 分間遠心し、ファージ粒子を集めた。ファージ粒子をファージ dilution buffer に懸濁した後、CsCl を加え、最終密度を 1.487 g/ml に合わせ、Beckman SW65 rotor を用いて、27,000 rpm 20 時間遠心し、2 滴ずつ分画した。活性ファージカ価、PFU(O) は 168 株を指示菌に用いて測定し、Spo⁺ 形質導入活性(●)は、9V 株を受容菌に用いて表4の脚注に述べた方法で測定した。□ は、260 nm の Absorbance を示す。

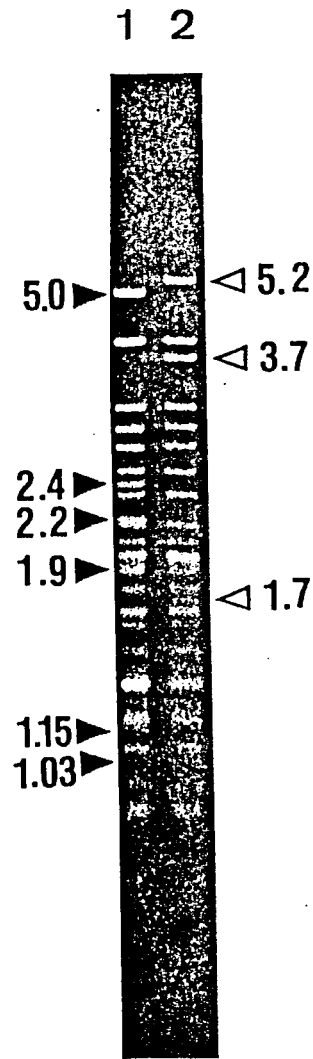


図4. HindIIIで切断したp11d spo0C±1 DNAの
アガロースゲル電気泳動。0.4 μgのファージDNAを
HindIIIで切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動を
用いて解析した。p11活性ファージDNA(レーン1)と
比較すると、p11d spo0C±1 DNA(レーン2)では
3つの新しい断片(△)が生じており、6つの断片
(▶)が消失していた。横に示した値は、断片の
大きさ(Mdal)である。

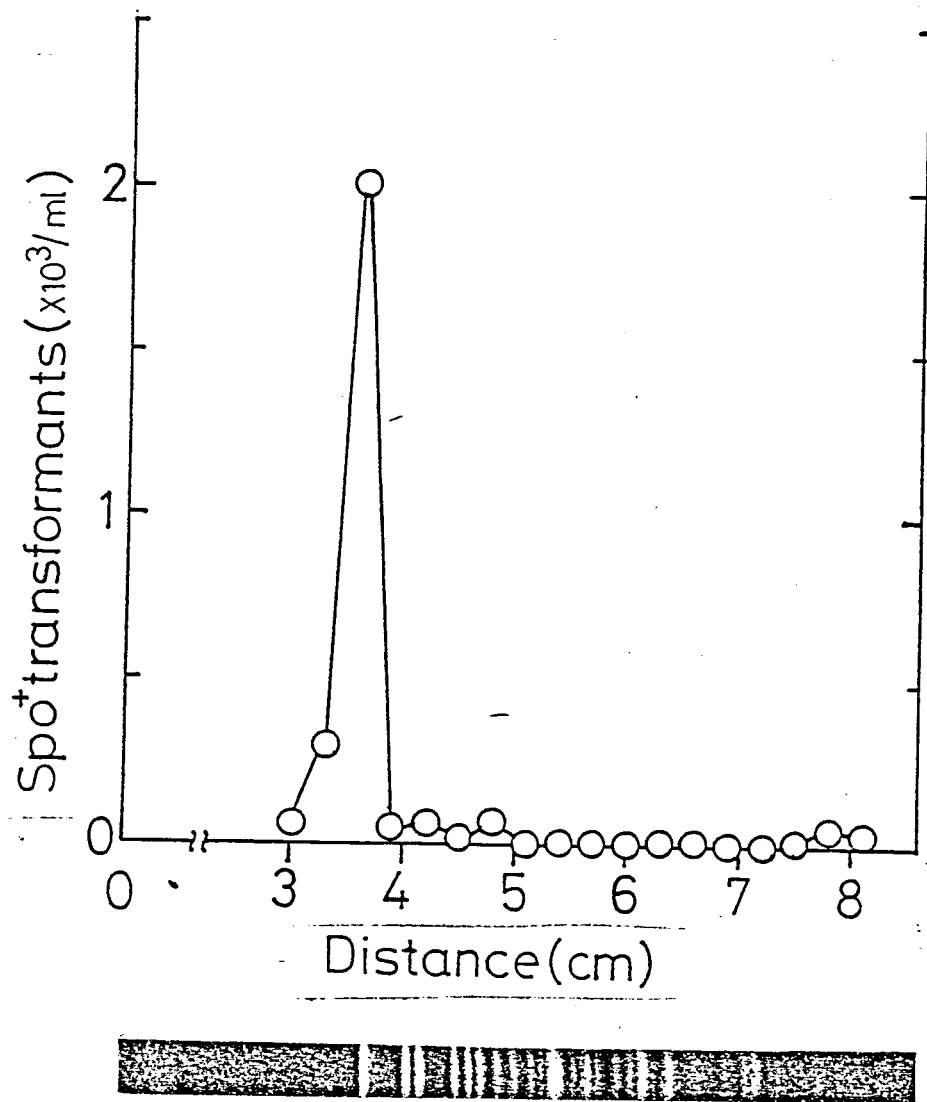


図5. spo0C マーカーを含むHindⅢ断片の決定。
 HindⅢで切断したp11d spo0C±1 DNA (0.3μg)を
 0.7%低融点アガロースゲル電気泳動により分離した。
 泳動後ゲルを3mmの厚さにスライスし、各スライスに
 含まれる Spo⁺形質転換活性を測定した。Spo⁺形質
 転換菌 (○)は“実験材料と方法”で述べた方法で
 測定した。

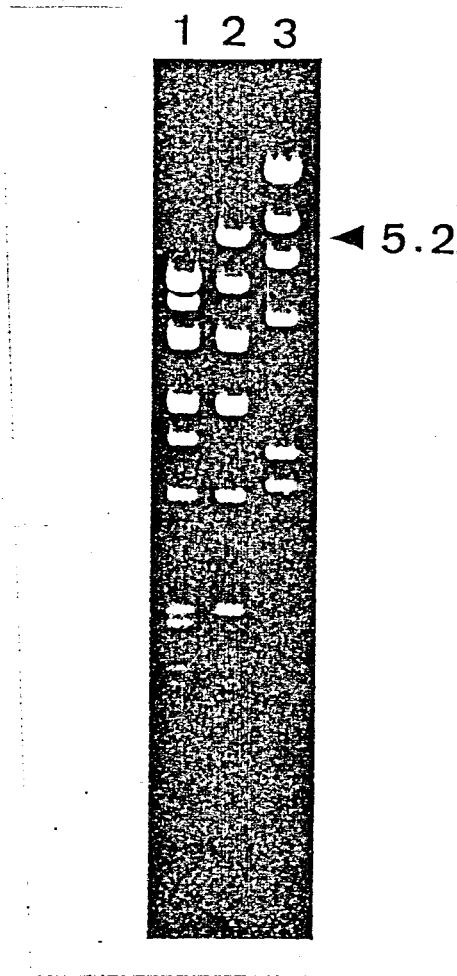


図6. Hind III で切断した $\phi 105d\text{spo}0A^+-1$ DNA のアガロースゲル電気泳動。(レーン1) $\phi 105$ DNA, (レーン2) $\phi 105d\text{spo}0A^+-1$ DNA, (レーン3) λ DNA。各々 Hind III 断片 ($0.5\mu\text{g}$) を 0.7% アガロースゲル電気泳動で解析した。spo0C マーカーを含む 5.2 Mdal 断片 (◀) の位置を示した。

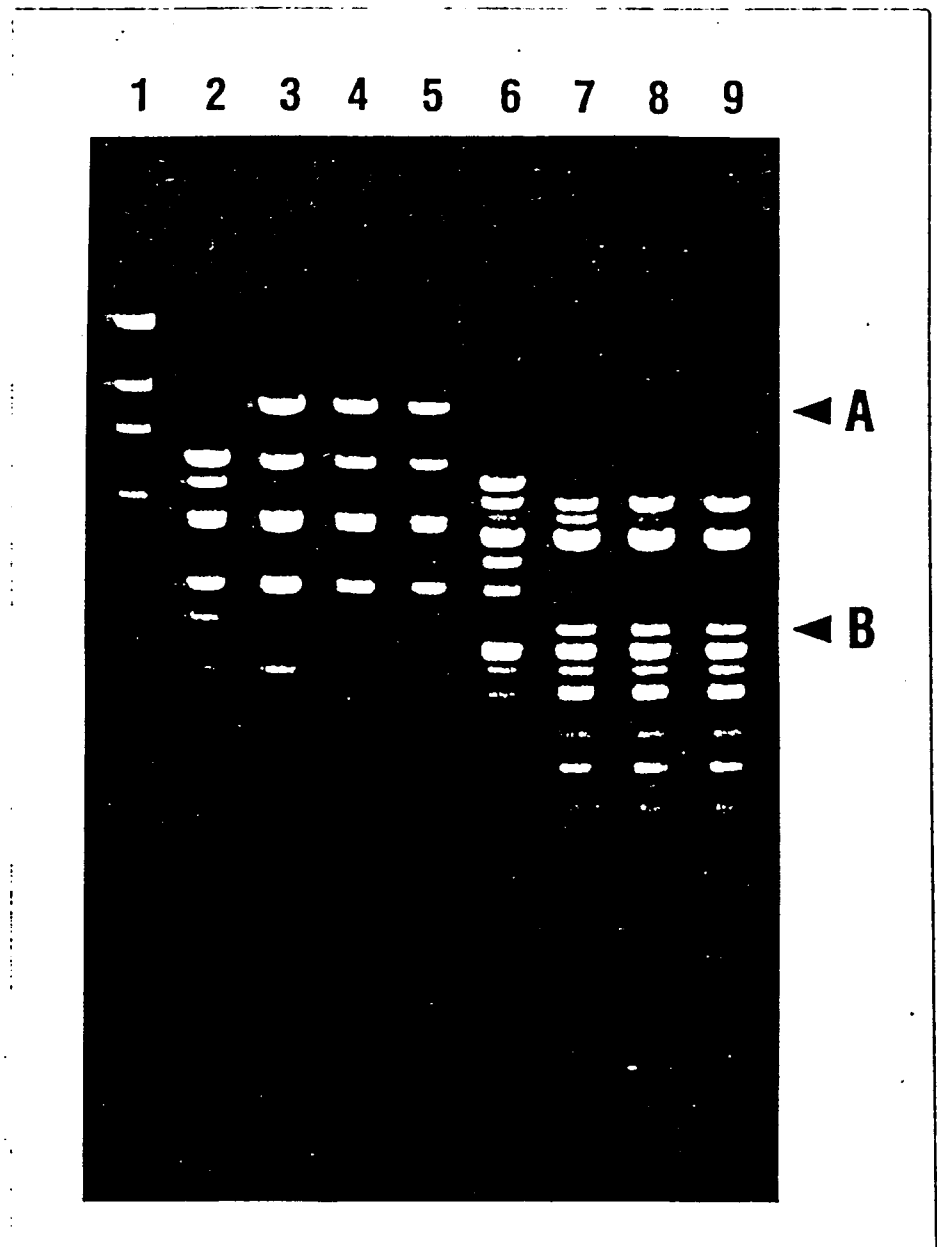


図7. HindⅢあるいはBclⅠで切断した $\phi 105$ dsp00AはDNAのアガロースゲル電気泳動。
 レーン1-5はHindⅢ切断物、レーン6-9はBclⅠ切断物である。2と6は $\phi 105$ 、3と7は $\phi 105$ dsp00A⁺-1、4と8は $\phi 105$ dsp00A 12-1、5と9は $\phi 105$ dsp00A 12-2、1は λ である。0.7%アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。

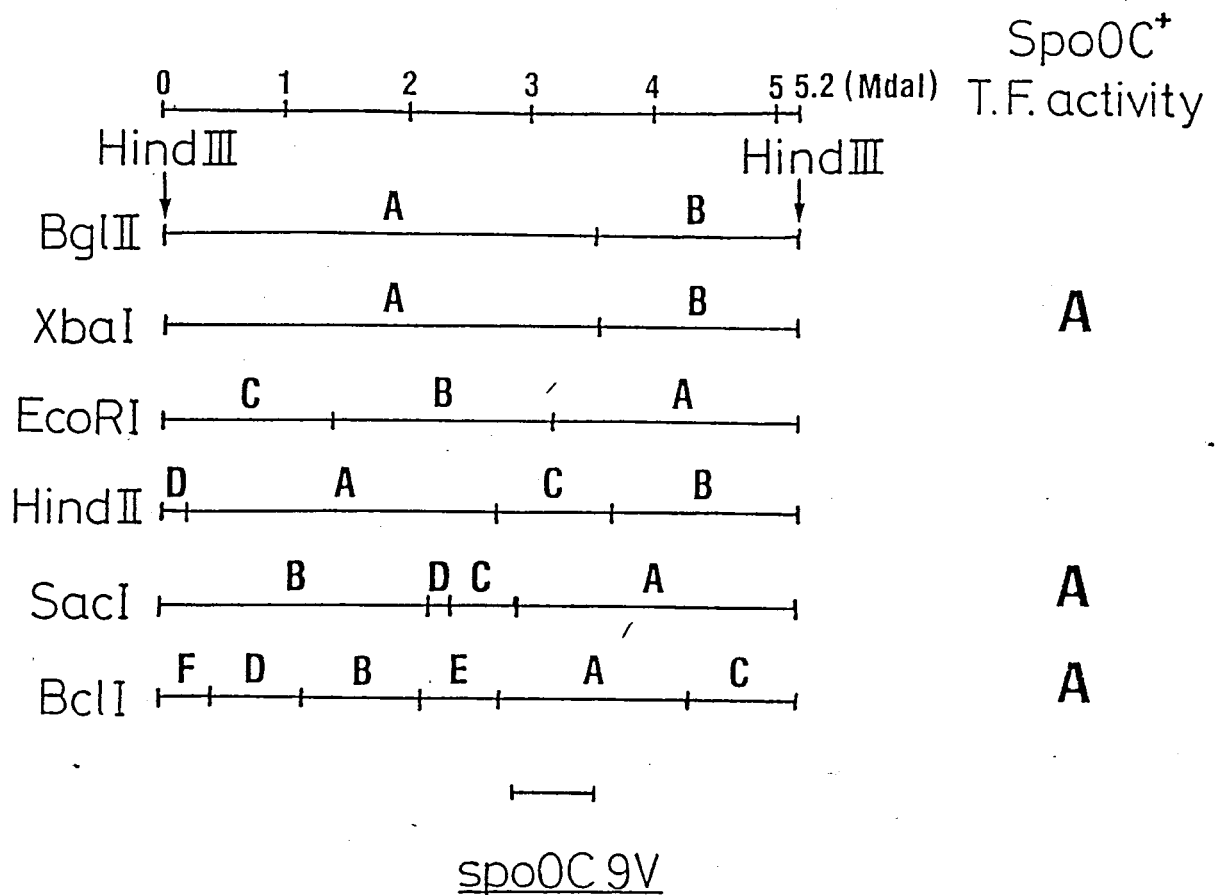


図8. 5.2 Mdal断片の切断地図と spo0C 9V 変異部位の位置。φ105d spo0A⁺1 から得た 5.2 Mdal Hind III断片を用いて切断地図を作製した。また、Spo0C⁺形質転換活性は、図5の脚注に述べた方法で測定した。最下段には、spo0C 9V 変異部位が含まれる範囲を示した。

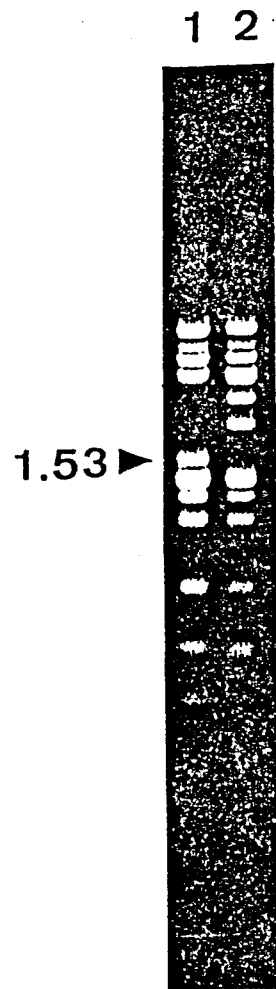


図9. BclIで切断した $\phi 105$ dspo0A⁺-Bc-1 DNA のアガロースゲル電気泳動。レーン1は $\phi 105$ dspo0A⁺-Bc-1, レーン2は $\phi 105$ DNAである。0.7%アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。spo0C9V マーカーを含む 1.53 Mdal BclI断片 (▶) の位置を示した。

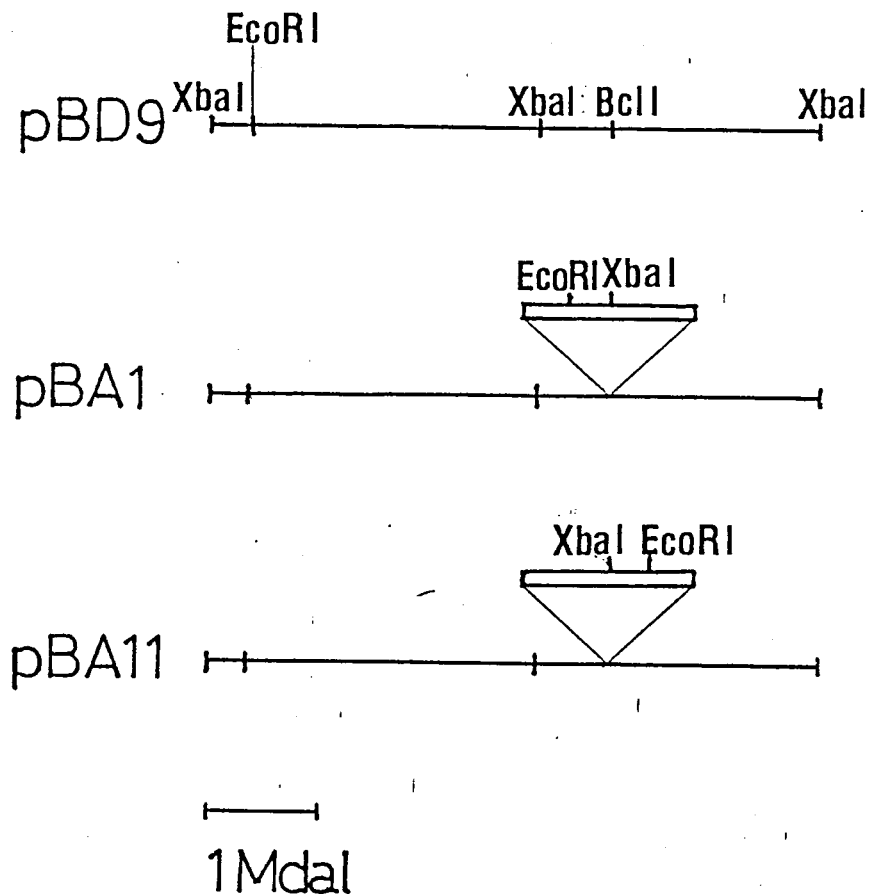


図10. 1.53Mdal 断片をもつプラスミド pBA1, pBA2, pBA11 の構造。ベクター pBD9 (5.4Mdal) は、2ヶ所ある XbaI 部位の内の1ヶ所で切断して線状に示した。1.53Mdal 断片 (□) は pBD9 の BclI 部位へ挿入されている。pBA1 と pBA2 は同じ方向に、pBA11 は逆方向に断片が挿入されていた。1.53Mdal 断片上の EcoRI 部位と XbaI 部位の位置を示した。

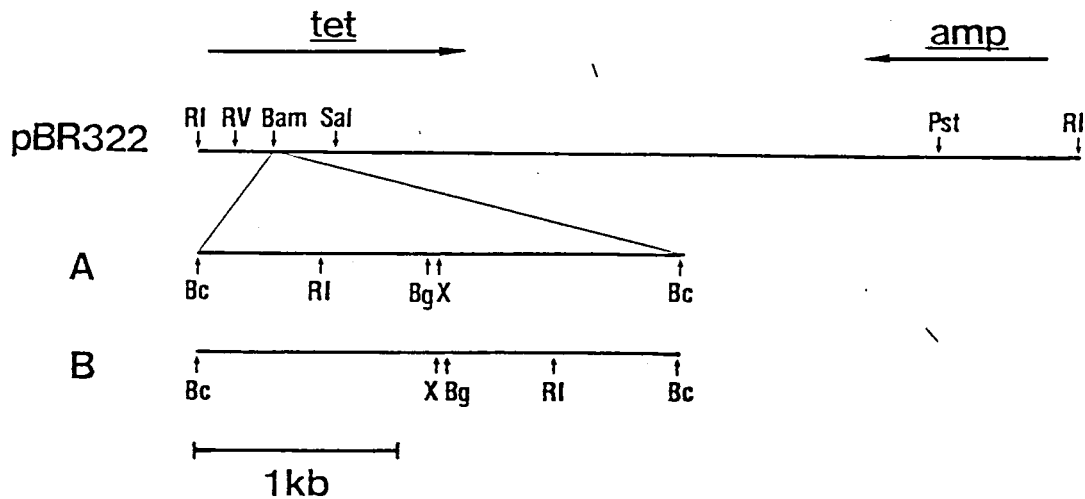


図11、2.4 kbp断片を含むプラスミドの構造。2.4 kbp断片の方向は下(A,B)に示した。pBBC1, pBBCA1, pBBCM1及びpBBCC1はAの方向で断片が挿入しており、pBBCA2, pBBCM2はBの方向で断片が挿入している。pBR322はEcoRI部位で切断し線状化した形で示した。制限酵素は略号で示した。RIはEcoRI, RVはEcoRV, BamはBamHI, SalはSalI, PstはPstI, BcはBclI, BgはBglII, XはXbaIである。水平の矢印は、pBR322の*tet*遺伝子及び*amp*遺伝子の位置と転写の方向を示した。

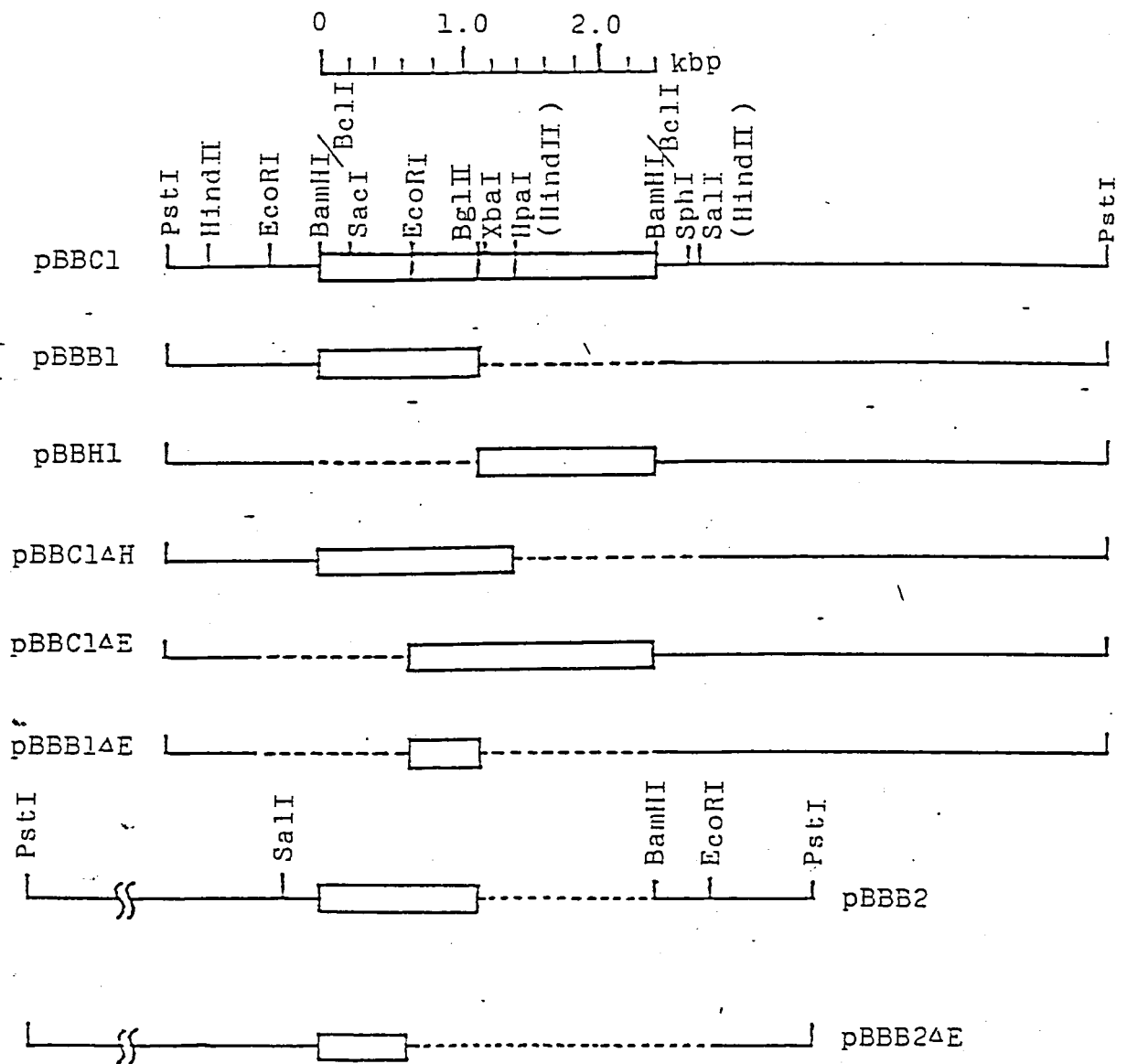


図12 pBBC1及び欠失プラスミドの構造。プラスミドはすべて pBR322 上に 1ヶ所ある PstI 部位で切断し、線状化した形で表わした。各プラスミドに含まれる 2.4 kbp 断片及びその制限酵素部分断片を(□)で示した。また、(—)は pBR322 部分を (---)は各々のプラスミドで欠失している部分を表わしている。pBBB1, 2 及び pBBH1 は、2.4 kbp BclI 断片を BglII で切断してから pBR322 の BamHI 部位へ挿入して作製した。pBBB1 及び pBBH1 は挿入断片の向きが pBBC1 と同じで、pBBB2 は逆向きである。pBBC1ΔH は、pBBC1 を HindII (3ヶ所) で切断後、T4 DNA リガーゼで再結合し、SphI で切断した後得られた Ap^r 形質転換菌の中から得た。pBBC1ΔE, pBBB2ΔE, pBBB1ΔE は各々 pBBC1, pBBB2, pBBB1 を EcoRI (2ヶ所) で切断し、自己結合を行なって作製した。pBBBM1, pBBHM1 は pBA1 (sg1-) DNA を材料に用いたが、その構造は各々 pBBB1 及び pBBH1 と同じである。

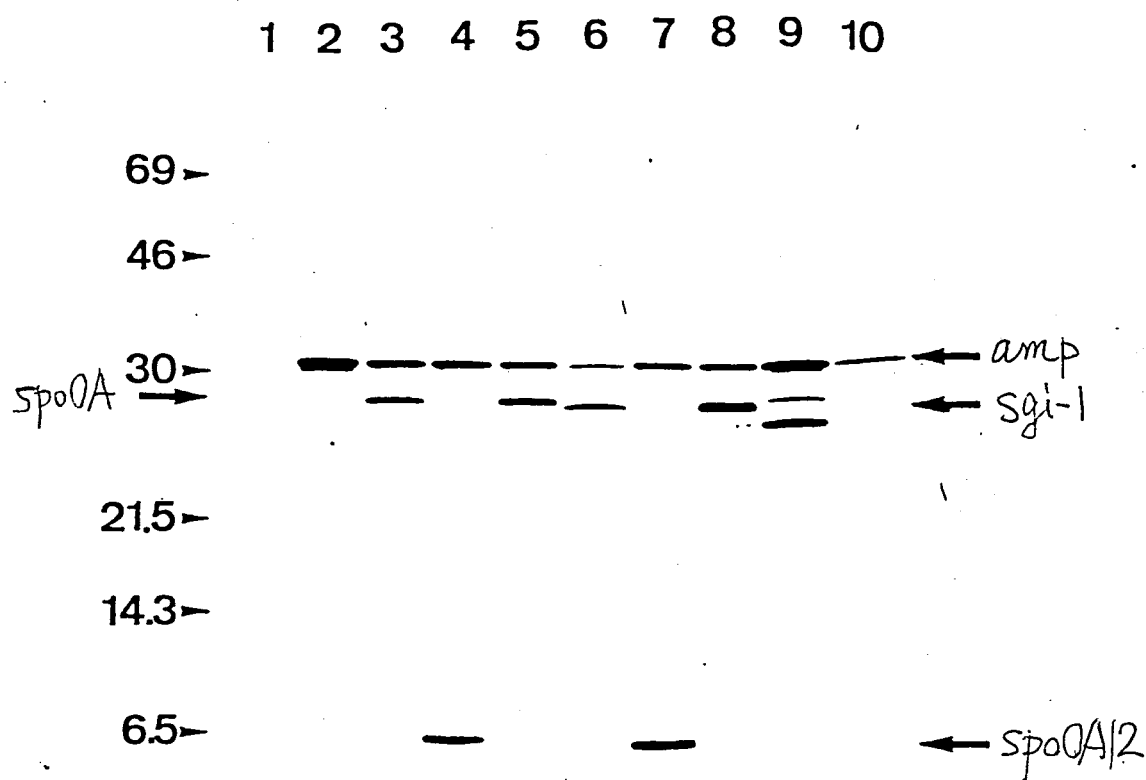


図13 組み換えプラスミドDNAからin vitro転写翻訳系を用いて合成された³⁵S標識蛋白質の解析。実験の詳細は"実験材料と方法"に述べた。各レーンは以下に述べるDNAを用いて合成された蛋白質を含んでいる。1. DNAなし。2. pBR322 3. pBBC1, 4. pBBCA1, 5. pBBCC1, 6. pBBCM1, 7. pBBCA2, 8. pBBCM2, 9. pBBC/ΔE, 10. pBBC/ΔH。分子量マーカーは, bovine serum albumin ($M_r=69,000$), ovalbumin ($M_r=46,000$), carbonic anhydrase ($M_r=30,000$), trypsin inhibitor ($M_r=21,500$), lysozyme ($M_r=14,300$), aprotinin ($M_r=6,500$)を用いた。amp, spo0A, spo0A/2, spg-1 は各々 amp, spo0A, spo0A/2, spg-1 遺伝子産物を示す。

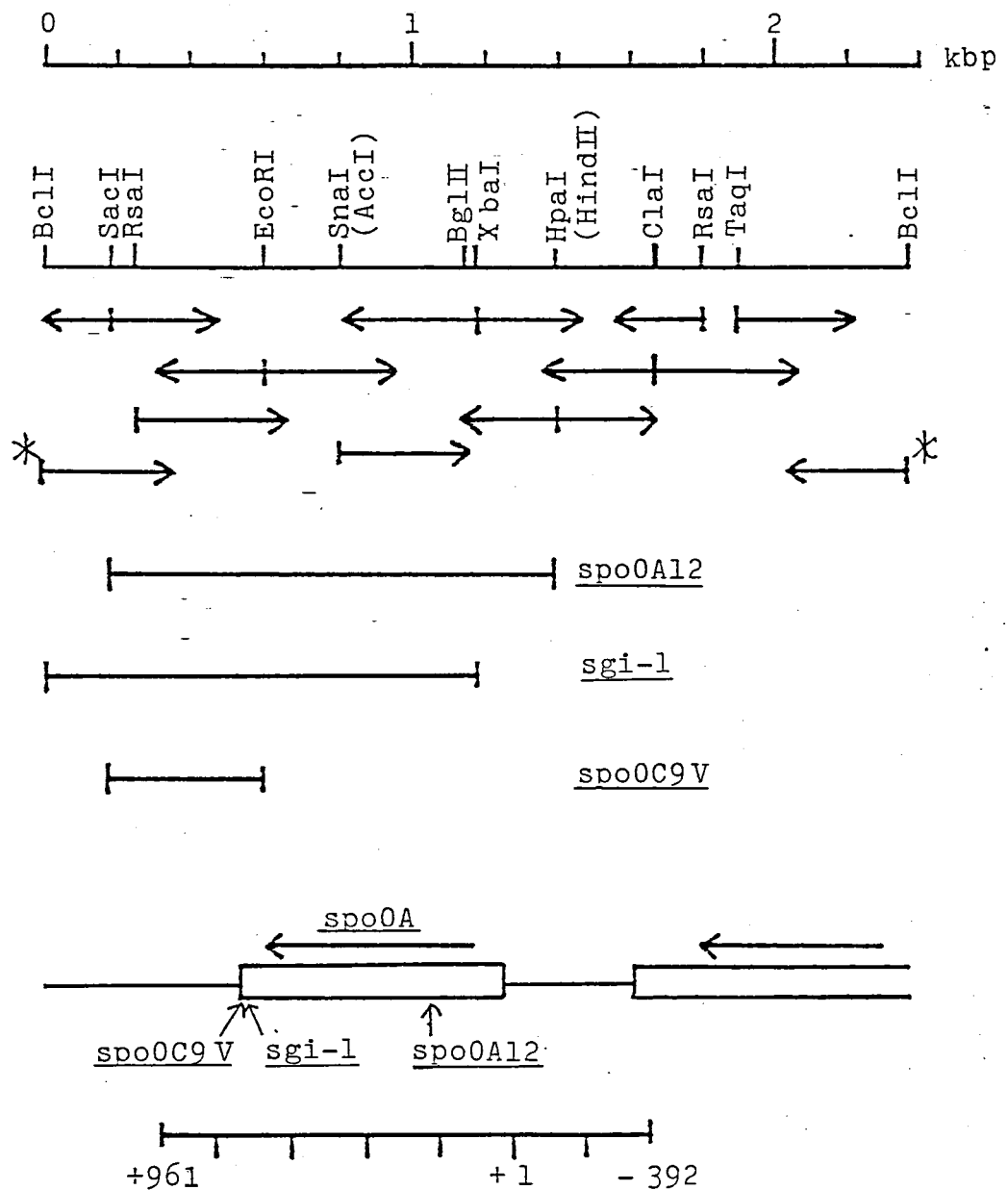


図14 2.4kbp断片の切断地図と塩基配列決定の戦略。上段には、2.4kbp断片の切断地図(塩基配列決定に用いた部位のみ)を示した。矢印は塩基配列を決定した方向と長さを示す。*印の2つの断片のみは、 ϕ 105d *spo0A*⁺BclIフラグの2.4kbp断片を用い、他はpBBC1から、M13にクローニングした。中段に示すように各変異遺伝子の塩基配列は変異部位が含まれる領域のみを決定した。各々pBR322にクローニングしたDNA断片を用いた。下段には、塩基配列からわかったlong open reading frame(□)の向き、及び各変異部位を示した。図15には一番下に表示した1353bp(-392から+961)の塩基配列を示した。

ClaI -350 -300
 ATCGATATTTATGGAAAAGAAAAGCAAGCTGACTGCCGGAGTTTCCGGCAGTTTTTTATTTGATCCCTCTTCACTTCTCAGAATACATAACGGTAAA
 IleAspIleTyrGlyLysGluLysAlaSer***
 -250 -200
 ATATACAAAAGAAGATTTTTCGACAAATTCACGTTTCCTTGTGTTGTCAAATTTCAATTTTAGTCGAAAAACAGAGAAAAACATAGAATAACAAAAGATAT
 -150 -100
 GCCACTAATATTGGTGATTATGATTTTTTTAGAGGGTATATAGCGGTTTTGTGCGAATGTAACATGTAGCAAGGGTGAATCCTGTTAACTACATTGGG
 HpaI
 -50 +1
 GAGGAAGAAACGTGGAGAAAATTAAGTTTGTGTTGCTGATGATAATCGAGAGCTGGTAAGCCTGTTAAGTGAATATATAGAGGACAGGAAGAC ATG
 fMet
 +50
 GAA GTG ATC GGC GTT GCT TAT AAC GGA CAG GAA TGC CTG TCG TTT AAA GAA AAA GAT CCC GAT GTG CTC GTA
 Glu Val Ile Gly Val Ala Tyr Asn Gly Gln Glu Cys Leu Ser Leu Phe Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Val
 XbaI BglIII +150
 TTA GAT ATT ATT ATG CCG CAT CTA GAC GGA CTT GCG GTT TTA GAG AGG CTG AGG GAA TCA GAT CTG AAA AAA CAG
 Leu Asp Ile Ile Met Pro His Leu Asp Gly Leu Ala Val Leu Glu Arg Leu Arg Glu Ser Asp Leu Lys Lys Gln
 +200
 CCG AAT GTC ATT ATG CTG ACA GCC TTT GGG CAG GAA GAT GTC ACG AAA AAG GCC GTC GAT TTA GGC GCG TCC TAC
 Pro Asn Val Ile Met Leu Thr Ala Phe Gly Gln Glu Asp Val Thr Lys Lys Ala Val Asp Leu Gly Ala Ser Tyr
 +250 +300
 TTT ATT CTC AAA CCG TTT GAT ATG GAA AAC CTT GTC GGC CAT ATC CGC CAG GTC AGC GGA AAT GCC AGC AGT GTG
 Phe Ile Leu Lys Pro Phe Asp Met Glu Asn Leu Val Gly His Ile Arg Gln Val Ser Gly Asn Ala Ser Ser Val
 +350
 ACG CAT CGT GCG CCA TCA TCG CAA AGC AGT ATT ATA CCG AGC AGC CAG CCT GAA CCA AAG AAG AAA AAT CTC GAC
 Thr His Arg Ala Pro Ser Ser Gln Ser Ser Ile Ile Arg Ser Ser Gln Pro Glu Pro Lys Lys Lys Asn Leu Asp
 +400 +450
 GCG AGC ATC ACA AGC ATT ATC CAT GAA ATC GGC GTC CCA GCC CAT ATT AAA GGC TAT CTC TAT CTG CGC GAA GCA
 Ala Ser Ile Thr Ser Ile Ile His Glu Ile Gly Val Pro Ala His Ile Lys Gly Tyr Leu Tyr Leu Arg Glu Ala
 SnaI +500
 ATC TCA ATG GTA TAC AAT GAC ATC GAA TTG CTC GGC AGC ATT ACA AAA GTC CTC TAT CCG GAC ATC GCC AAA AAA
 Ile Ser Met Val Tyr Asn Asp Ile Glu Leu Leu Gly Ser Ile Thr Lys Val Leu Tyr Pro Asp Ile Ala Lys Lys
 +550 +600
 TTT AAC ACA ACC GCA AGC CGT GTA GAA AGA GCG ATC CGC CAT GCA ATT GAA GTG GCA TGG AGC AGA GGA AAC ATT
 Phe Asn Thr Thr Ala Ser Arg Val Glu Arg Ala Ile Arg His Ala Ile Glu Val Ala Trp Ser Arg Gly Asn Ile
 +650 EcoRI
 GAT TCC ATT TCC TCG TTG TTT GGT TAT ACT GTC AGC ATG ACA AAA GCT AAA CCT ACC AAC AGT GAA TTC ATT GCA
 Asp Ser Ile Ser Ser Leu Phe Gly Tyr Thr Val Ser Met Thr Lys Ala Lys Pro Thr Asn Ser Glu Phe Ile Ala
 +700 +750
 ATG GTT GCG GAT AAG CTG AGG TTA GAG CAT AAG GCT TCT TAA ACATGAGCTTATTAAGTGGTCATTAAATCAAACGTCTTTTATT
 Met Val Ala Asp Lys Leu Arg Leu Glu His Lys Ala Ser ***
 +800 +850
 TATTAGTTTGGCGTGATAAATAGGAGGCGTTTGTGTTTGGGGACATTTGTAGTATGGGAGAAGAATATTAAGTATCCGCATATAGTAAAGGATAGGTTT
 +900 +950
 GAAAAGTAAGGAAAGCAATATGGCGGTATTAACCTGCACCTTGGTCCAATCATACATCTATAGGATCAGCAAGCATGATCGACCCTAGATGTGTCGGTT

図15. *spoOA* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列。2.4kbp
 断片(2,375bp)の内 図14の最下段に示した領域(1,353bp)の
 みを示した。ヌクレオチドは翻訳開始codon ATGを基準として番号
 をつけた。Shine-Dalgarno配列は＝で示した。またGTGの
 Shine-Dalgarno配列は＝で示した。転写のterminatorと
 思われるinverted repeatは→←で示した。

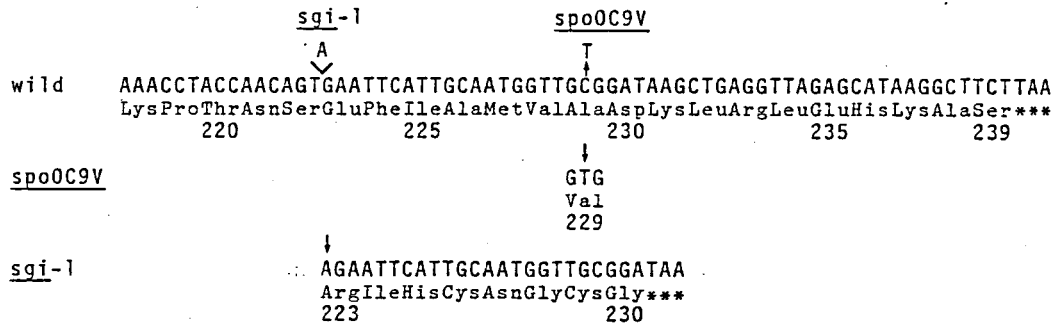


図16. spo0A 遺伝子産物のC末端近傍の塩基配列とアミノ酸配列。上段には野生型遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列及び sgi-1, spo0C9V 変異の位置と種類を示した。下には、変異によってアミノ酸配列が変化した部分のみを示した。

"-35"	"-10"
TTGACA	TATAAT
-330	TTGATCCCTCTTCACTTCTCAGAATACATACGGTAAAAATATACAAAAGAA
-241	TCATTTTtagTCGAAAAACAGAGAAAAACATAGAATAACAAAGATATGCC
-221	GAGAAAAACATAGAATAACAAAGATATGCCACTAATATTGGTGATTATGA

図17. spo0A 遺伝子のプロモーターと思われる塩基配列。"-35領域"と"-10領域"の共通配列は、枯草菌の σ^{55} RNAポリメラーゼと大腸菌のRNAポリメラーゼで共通である。左に示した値は、翻訳開始codonからの距離(bp)である。

表1 spo0A変異とspo0C変異の表現型

Mutant type	Character ^a					
	Cpt ^b	Pr	Ab	Abs	Pha	Spo
<u>spo0A</u>	—	—	—	—	—	—
<u>spo0C</u>	+	+	+	+	+	—
wild	+	+	+	+	+	+

a. wild typeの示す形質を+, 変異型の形質を—とした。

b Cpt; competence (形質転換受容能),
Pr, 細胞外プロテアーゼの産生.

Ab, 抗生物質の産生.

Abs, 野生株の産生する抗生物質に対する耐性.

Pha, $\phi 2$ や $\phi 15$ ファージに対する抵抗性

Spo, 胞子形成能.

表2. Bacillus 株

Strain	Genotype	Origin or source ^a
168	<u>trpC2</u>	S. Okubo
168 Trp ⁺		168
9V	<u>spoCC9V</u> <u>trpC2</u>	P. Schaeffer
SS211	<u>spoCC9V</u> <u>recE4</u> <u>pyrD1</u> <u>ilvA1</u>	本研究室
1S9	<u>spoDA12</u> <u>trpC2</u> <u>pheA1</u>	B.G.S.C.
SR22	<u>spoDA12</u> <u>trpC2</u>	J. Spizizen
SS209	<u>trpC2</u> <u>pyrD1</u> <u>ilvA1</u> <u>recE4</u>	本研究室
SS273 (BD224)	<u>trpC2</u> <u>thr5</u> <u>recE4</u>	B.G.S.C.
QB943	<u>trpC2</u> <u>pyrD1</u> <u>ilvA1</u> <u>thyA</u> <u>thyB</u>	B.G.S.C.

^a B.G.S.C. は Bacillus Genetic Stock Center, Ohio State University
の略号である。

表3 制限酵素による切断と残存 $SpoOC^+$ 形質転換活性

Restriction enzyme	Survival(%) of Spo^+ transformation activity	Size of fragment containing <u>$spoOC9V$</u> marker
<u>Hind</u> III	6.4	5-6Mdal
<u>Pst</u> I	13.5	8-9Mdal
<u>Eco</u> RI	0.8	—
<u>Bam</u> HI	100	—
<u>Sal</u> I	23.3	—
none	100	—

染色体DNAを各制限酵素で切断した後の $SpoOC^+$ 形質転換活性を測定し、比較した。 $spoOC9V$ マーカーを含む断片の大きさは、0.7%低融点アガロースゲル電気泳動を用いて、図5に述べた方法で決定した。 $SpoOC^+$ 形質転換活性の測定法は"実験材料と方法"に述べた。

表4. $p11dspo0C^+$ -1 フラグメントによる Spo^+ 形質導入

Recipient strain ^a	Genotype	Spo^+ transduction ^b
9V	<u>spo0C9V</u>	+
SS211	<u>spo0C9V</u> <u>recE4</u>	+
1S9(JH646)	<u>spo0A12</u>	+
1S68(R15-13)	<u>spo0A12</u> <u>abrB23</u>	+
SS176(110NA)	<u>spo0A110NA</u>	+
SS174	<u>spo0A110NA</u> <u>cpsX30</u>	+
NIG1131	<u>spo0A34</u>	+
1S42(NG1.13)	<u>spo III A35</u>	-
1S48(A3)	<u>spo III B2</u>	-
1S57(P7)	<u>spo IV B165</u>	-

^a 各受容菌の由来は次の通りである。9V, SS211, 1S9 は表2に記
載した。1S68, 1S42, 1S48, 1S57 は *Bacillus Genetic Stock*
Center からいただいた。SS176 と SS174 は J. F. Guespin-Michel
(1971) からいただいた。NIG1131 は 定家義人先生からいただいた
(Sadaie and Kada, 1983)。

^b ($p11$)($p11dspo0C^+$ -1)二重溶原菌35株の高頻度形質導入溶菌液
を用いた。LB培地で培養した受容菌 ($0.1/ml$) に $0.1/ml$ の溶菌液を
加え、 $37^\circ C$ 15分間保温した後、 $3ml$ の $2 \times$ Schaeffer 培地を加
え、 $37^\circ C$ 2晩培養した。熱耐性胞子の数は $80^\circ C$ 20分間処
理後、Schaeffer 寒天培地に plating して測定した。+では
熱耐性胞子の数が $3.7 \times 10^4 \sim 4.6 \times 10^6/ml$ であった(ただし SS
176 は $2.9 \times 10^3/ml$)。-では熱耐性胞子は存在しなかった。

表5 $\phi 105dspo0A^+$ -1 ファージによる Spo^+ transduction

Phage lysate	No. of heat resistant cells/ml ^a					
	Recipient strain ^b					
	<u>spo0C9V</u>	<u>rec⁺</u>	<u>spo0C9V</u>	<u>recE4</u>	<u>spo0A12</u>	<u>rec⁺</u>
$\phi 105dspo0A^+$ -1	0	—	—	—	—	—
$\phi 105dspo0A^+$ -1 + helper $\phi 105$	1.3×10^6		4.9×10^3		7.2×10^6	
$\phi 105$	20		0		0	

a. LB培地で培養した受容菌 0.5ml にファージ溶菌液 ($\phi 105dspo0A^+$ -1 は 0.05ml, $\phi 105$ は 0.01ml) を加え、37℃ 20分間培養した後、3.5ml の 2xSchaeffer 培地を加え、37℃ 2晩振とう培養した。熱耐性細胞の数は表4の脚注bに述べた方法で測定した。

b 受容菌は 9V株 (spo0C9V rec⁺), 55211株 (spo0C9V, recE4) 159株 (spo0A12 rec⁺) を用いた。

表6. Transduction with $\phi 105ds\text{spo0A12}$ phages

Phage lysate ^a (+ helper $\phi 105$)	No. of heat resistant cells/ml ^b					
	Recipient strain					
	<u>spo0C</u>	<u>recE</u>	<u>spo0C</u>	<u>rec</u> ⁺	<u>spo0A</u>	<u>rec</u> ⁺
$\phi 105ds\text{spo0A12-1}$	0		2.3×10^3		0	
$\phi 105ds\text{spo0A12-2}$	0		2.6×10^3		0	
$\phi 105ds\text{spo0A}^+-1$	1.7×10^4		1.2×10^6		3.1×10^6	
None	0		10		0	

ア ファージは ヘルパーファージ $\phi 105$ と混ぜて用いた.

ロ 熱耐性細胞数の測定及び 受容菌は, 表5と同じである.

表7. $\phi 105dspoOA^+-Bc-1$ フアージによる Spo^+ 形質導入

Phage lysate	No. of heat resistant cells/ml					
	Recipient strain					
	<u>spo0C9V</u>	<u>rec⁺</u>	<u>spo0C9V</u>	<u>recE4</u>	<u>spo0A12</u>	<u>rec⁺</u>
$\phi 105dspoOA^+-Bc-1$	0	—	—	—	—	—
$\phi 105dspoOA^+-Bc-1$ + helper $\phi 105$	9.0×10^6		4.8×10^5		1.6×10^6	
$\phi 105$	0		10		0	

$\phi 105dspoOA^+-Bc-1$ フアージを用いた点を除けば、実験方法は、
表5と同じである。

表8 pBBC1及び欠失プラスミドによる Spo^+ 形質転換

Plasmid	Recipient strain	
	9V(<u>spo0C9V</u>)	1S9(<u>spo0A12</u>)
pBBC1	+	+
pBBB1	+	-
pBBH1	-	-
pBBC1 Δ H	+	+
pBBC1 Δ E	-	+
pBBB1 Δ E	-	-
pBBB2	+	-
pBBB2 Δ E	+	-

0.5 μ gのプラスミドDNAを用いた Spo^+ 形質転換の方法は“実験材料と方法”で述べた。+は Spo^+ 形質転換菌が出現したものを、-は Spo^+ 形質転換菌が得られなかったものを示す。

表9 sgl-1 プラスミドによる Spo^{-} 形質転換

Plasmid (+pyrD ⁺ DNA) ^a	No. of pyrD ⁺ transformants per 5μl ^b	No. of Spo0A-type transformants per 5μl ^c	Spo0A / PyrD ⁺ ^d
pBBCM2 2.4kbp	432	12	0.028
pBBBM1 1.17kbp	453	10	0.022
pBBHM1 1.22kbp	328	0	0
pBBB1 1.17kbp wild	752	0	0
pBBH1 1.22kbp wild	375	0	0
None	597	0	0

a 0.5μgのプラスミドDNAと0.2μgの枯草菌染色体DNA (pyrD⁺)を混ぜて用いた。受容菌にはQB943株 (pyrD⁻, clpA, trpC2, thyA, thyB) を用いた。

b uracilを含まない *S. pyzizzen* 最少栄養寒天培地を用いて、PyrD⁺ 形質転換菌を選択した。

c PyrD⁺形質転換菌の内、Spo0A型の透明なコロニーを形成する形質転換菌の数を示した。

d PyrD⁺形質転換菌中のSpo0A型形質転換菌の比率を示した。

表10 pBBC1, pBBB2, pBBCM2によるプロファージ形質転換^a

Plasmid	No. of spo^+ transformants ^b	No. of light brown spo^+ transformants ^c
pBBC1	1400	80
pBBB2	194	0
pBBCM2	23	0

a プラスミドDNA(各1 μ g)を *Hind*III (pBR322部分に1ヶ所の切断部位がある)で切断し、 ϕ 105 DNAの *Hind*III断片(1 μ g)と混ぜ、T4リガーゼで結合した後、9V(ϕ 105)株に対して Spo^+ 形質転換を行なった。

b. Spo^+ 形質転換菌の測定法は"実験材料と方法"で述べた。
2 $\times$ Schaeffer培地の一部(2.4ml)中に含まれる Spo^+ 形質転換菌の数を示した。

c light brown(うす茶色) Spo^+ 形質転換菌は、 $spoOC^+/spoOC^-$ 部分二倍体である。

謝 辞

本研究中、御指導をいただいた倉橋 潔先生、池内俊彦先生、本論文の作製にあたり、適切な御批判をいただいた佐藤了先生、小川英行先生、菌株を供与して下さった多くの方々、DNA塩基配列決定で御世話になった三原勝芳先生、コンピュータ解析で御世話になった綱沢 進先生、貴重な御助言をいただいた山田道え先生、栗木芳隆先生、馬場崎勝彦氏に感謝致します。また本研究中、暖かい御支援を下さった本研究室並に蛋白研生理機能部門の方々に感謝致します。

REFERENCES

- Anagnostopoulos, C., and J. Spizizen. (1961) *J. Bacteriol.* 81, 741-746
- Ayaki, H. and Y. Kobayashi. (1984) *J. Bacteriol.* 158, 507-512
- Banner, C.D.B., C.P. Moran Jr., and R. Losick. (1983) *J. Mol. Biol.* 168, 351-365
- Birdsell, D.C., G.M. Hathaway, and L. Rutberg. (1969) *J. Virol.* 4, 264-270
- Birnboim, H.C. and J. Doly. (1979) *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523
- Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heynecker, H.W. Boyer, J.H. Crosa, and S. Falkow. (1977) *Gene* 2, 95-113
- Bonamy, C. and J. Szulmajster. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 188, 202-210
- Chou, P.Y. and G.D. Fasman. (1974) *Biochemistry* 13, 222-244
- Clewell, D.B. and D.R. Helinski. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1159-1166
- Dean, D.H., J.C. Orrego, K.W. Hutchinson, and H.O. Halvorson. (1976) *J. Virol.* 20, 509-519
- Dubnau, E., N. Ramakrishna, K. Cabane, and I. Smith. (1981) *J. Bacteriol.* 147, 622-632
- Ehrlich, S.D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1433-1436
- Ferrari, F.A., D. Lang, E. Ferrari, and J.A. Hoch. (1982) *J. Bacteriol.* 152, 809-814
- Gryczan, T.J., S. Contente, and D. Dubnau. (1978) *J. Bacteriol.* 134, 318-329
- Gryczan, T.J., and D. Dubnau. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1428-1432
- Gryczan, T., A.G. Shivakumar, and D. Dubnau. (1980) *J. Bacteriol.* 141, 246-253
- Guespin-Michel, J.F. (1971) *J. Bacteriol.* 108, 241-247
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580
- Henner, D.J. and J.A. Hoch. (1980) *Microbiol. Rev.* 44, 57-82
- Hirochika, H., Y. Kobayashi, F. Kawamura, and H. Saito. (1981) *J. Bacteriol.* 146, 494-505
- Hoch, J.A. (1971) *J. Bacteriol.* 105, 896-901
- Hoch, J.A. (1976) *Advan. Genet.* 18, 69-99
- Ikeuchi, T. and K. Kurahashi. (1978) *J. Bacteriol.* 134, 440-445

- Ikeuchi, T. and K. Babasaki, and K. Kurahashi. (1979) J. Bacteriol. 139, 327-332
- Karmazyn, C., C. Anagnostopoulous, and P. Schaeffer. (1972) Spores V; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 126-132
- Kawamura, F., H. Saito, and Y. Ikeda. (1979) Gene 5, 87-91
- Kawamura, F., H. Saito, H. Hirochika, and Y. Kobayashi. (1980) J. Gen. Appl. Microbiol. 26, 345-355
- Kawamura, F., H. Shimotsu, H. Saito, H. Hirochika, and Y. Kobayashi. (1981) Sporulation and germination; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 109-113
- Korch, C.T., and R.H. Doi. (1971) J. Bacteriol. 105, 1110-1118
- 工藤 純 (1981) 修士論文, 大阪大学
- Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
- Mandel, M., and A. Higa. (1970) J. Mol. Biol. 53, 159-162
- McLaughlin, J.R., C.L. Murray, and J.C. Rabinowitz. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11283-11291
- Messing, J. (1983) Methods Enzymol. 101, 20-78
- 宮地宏昌, 河村富士夫, 斎藤日向 (1982) 日本遺伝学会第54回大会講演要旨; 遺伝学雑誌 57, 687
- 中山建男, R.H. Doi. (1981) 蛋白質・核酸・酵素 26, 842-857
- Niaudet, B., and S.D. Ehrlich. (1979) Plasmid 2, 48-58
- Piggot, J., and J.G. Coote. (1976) Bacteriol. Rev. 40, 908-962
- Ramakrishna, N., E. Dubnau, and I. Smith. (1984) Nucleic acids Res. 12, 1779-1790
- Sadaie, Y., and T. Kada. (1983) J. Bacteriol. 153, 813-821
- Saito, H., and K. Miura. (1963) Biochim. Biophys. Acta 72, 619-629
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1236-1240
- Schaeffer, P., H. Ionesco, A. Ryter, and G. Balassa (1963) Colloq. Int. C.N.R.S. 124, 553-563
- Schaeffer, P. (1969) Bacteriol. Rev. 33, 48-71
- Scheer-Abramowitz, J., T.J. Gryczan, and D. Dubnau. (1981) Plasmid 6, 67-77

- Shiflett, M.A., and J.A.Hoch. (1978) Spores VII; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 136-138
- Shimotsu, H., F.Kawamura, Y.Kobayashi, and H.Saito. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80, 658-662
- Shine, S. and L.Dalgarno. (1975) Nature 254, 34-38
- 曾根秀隆, 下津秀則, 吉川博文, 河村富士夫, 斎藤日向 (1983) 第6回日本分子生物学会年会
- Spizizen, J. (1958) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 44, 1072-1078
- Trowsdale, J., S.M.H.Chen, and J.A.Hoch. (1978a) J.Bacteriol. 135, 99-113
- Trowsdale, J., M.Shiflett, and J.A.Hoch. (1978b) Nature 272, 179-181
- Weber, K., and B.Osborn. (1975) The Proteins; Academic Press. 1, 179-223
- Zubay, G. (1980) Methods Enzymol. 65, 856-877