

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/24587">https://hdl.handle.net/11094/24587</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 【6】

氏名・(本籍)	く 工	どう 藤	じゅん 純
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	6 5 9 7	号
学位授与の日付	昭和 59 年 9 月 25 日		
学位授与の要件	理学研究科 生理学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	枯草菌孢子形成初期遺伝子 <i>spo0A</i> の解析		
論文審査委員	(主査) 教授 倉橋 潔 (副査) 教授 佐藤 了 教授 小川 英行		

## 論 文 内 容 の 要 旨

枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成は細胞分化の最も単純なモデルと考えられているが、孢子形成開始機構に關与する遺伝子 (*spo0*) の機能についてはほとんど何もわかっていない。本研究では、*spo0* 遺伝子の中でもその変異株の表現型が最も多面発現的な *spo0A* 遺伝子の機能を明らかにするための第一歩として *spo0A* 遺伝子のクローニングを行ない、遺伝子産物を同定し、塩基配列を決定した。

孢子形成初期遺伝子 *spo0A* を含む 2.4 kbp の枯草菌染色体断片をプロフェージ形質転換法を用いてクローニングした。この 2.4 kbp 断片を含む特殊形質導入フェージ *spo0A12* 変異株に溶原化させると溶原菌 (*spo0A*<sup>+</sup>/*spo0A*<sup>-</sup> ヘテロ部分二倍体) は *spo*<sup>+</sup> 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*<sup>+</sup> *recB4* 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。野生型 *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た。そして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 27,500 ダルトンの蛋白質と同定された。*spo0A12*, *spo0A9V*, *sgi-1* 変異遺伝子からは各々 6,300 ダルトン, 27,500 ダルトン, 26,500 ダルトンの蛋白質が合成された。また 2.4 kbp 断片の全塩基配列 (2,375 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、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、すべて同一シストロン内の変異であり、各々アンバー変異、ミスセンス変異、フレームシフト変異であることがわかった。塩基配列から予想される各変

異蛋白質の大きさは、ゲル電気泳動の結果とよく一致した。これらの結果から、表現型の異なる *spo0C* 変異と *spo0A* 変異が同一の遺伝子内に生じた変異であることが明らかとなった。また *sgi-1* 変異が *spo0A* 蛋白質の変異であることから、過剰生産された野生型 *spo0A* 遺伝子産物によって、宿主の増殖が阻害されることが示唆された。さらに、*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 C 末端近傍のアミノ酸配列が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 論文の審査結果の要旨

バシラス属の細菌は炭素源や窒素源が涸渇すると、栄養増殖を止め、孢子形成を行う。その機構に関しては、古くより、細胞分化の最も単純なモデルとして数多くの研究がなされてきたが、その本質に迫る研究結果は何も得られていない。工藤君は組換え DNA 技術を用いて、枯草菌の孢子形成の最初期に参与することが明らかになっている *spo0A* 遺伝子クローン化し、その遺伝子構造を解析、*in vitro* で発現させて mRNA 及びその産物を合成、同定し、枯草菌の環境変化に対応した遺伝子発現から形態変化に繋がる一連の孢子形成反応機構を明らかにしようと試みた。

先づ *spo0A* 変異株は形質転換能も欠損して居り、材料として不適なので *spo0A* 遺伝子の近傍に位置し、形質転換が可能な *spo0C* 変異株を受容菌として用い、この領域の遺伝子を  $\phi$ 11 溶原ファージにクローン化し、続いて  $\phi$ 105 ファージに再クローン化した。遺伝学的解析の結果、クローン化された 2.4 — Kb DNA 上の *spo0A*、*spo0C* 両遺伝子は同一遺伝子であることが判明した。次に 2.4 kbp 断片をプラスミド pBR322 に導入し、プラスミド DNA を *in vitro* 転写翻訳系により翻訳させ、得られた分子量約 27,500 の蛋白質が *spo0A* 遺伝子の産物であると同定した。クローン化された 2.4 kbp 断片の全塩基配列 (2,375 bp) の決定からは *spo0A* 遺伝子は 239 個のアミノ酸をコードしており、その分子量は 26,422 と算出された。

工藤君は又、*spo0A* 遺伝子上に map される *spo0A12*、*spo0C9V*、*sgi-1* 変異遺伝子もクローン化し、夫々の DNA 上の変異部位も決定した。*sgi-1* 変異は工藤君が新たに見出した、*spo0A* 遺伝子を含むマルチコピープラスミドによる宿主菌の増殖阻害、孢子形成抑制を解除する変異である。

以上、工藤君の研究は、細菌の孢子形成機構の解明に重要な知見を加えたもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。