The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	枯草菌胞子形成初期遺伝子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

枯草菌胞子形成初期遺伝子 spo0A の解析

生理学専攻　工藤 純

理44
6
6597

目次

要旨 1

序論 2

実験材料と方法 4

結果

I. spo0A遺伝子を含む枯草菌染色体DNA断片のクローニング 9

II. spo0A⁺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. spo0A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. spo0A遺伝子産物の同定とspo0A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 の胞子形成初期遺伝子 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2.4kbp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 Spo$^+$の表現型を示す。しかし、同じ2.4kbp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、宿主の増殖及び胞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2.4kbp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2.4kbp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、2.4kbp断片の全塩基配列(2,375bp)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、すべて同一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C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(spo0 gene)によって制御されていることがわかった(Piggot and Coote, 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変異はその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φ2やφ15ファージに対する感受性の出現(Piggot and Coote, 1976)、φ105ファージの溶原化率の低下(Ikeuchi and Kurahashi, 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; Shiflett 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rif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、枯草菌の胞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、胞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

<u>菌株、ファージ、プラスミド</u>　本研究に用いた枯草菌株は表2に記載した。大腸菌C600-45(<u>hsdR</u> <u>hsdM</u>)はC600株由来で杉野義信先生にいただいた。また大腸菌DH1(<u>hsdR</u> <u>recA</u>)(Hanahan, 1983)は山田道夫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φ11(Dean <u>et al.</u> 1976)とφ105(Birdsell <u>et al.</u> 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<u>Bacillus</u> Genetic Stock Center, Ohio State Universityから、プラスミドpBR322(Bolivar <u>et al.</u> 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、<u>trpC2</u>遺伝子を含む染色体断片をもっている(工藤, 1981)。

<u>培地</u>　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 <u>et al.</u> 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 $Ca(NO_3)_2$, 10μM $MnCl_2$, 1μM $FeSO_4$を含む。2×Schaeffer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 $MnCl_2$, 1μM $FeSO_4$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(20μg/ml)、あるいは塩基(50μg/ml)を加えた。

<u>染色体DNA及びプラスミドDNAの調製</u>　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らの方法(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。

<u>ファージ及びファージDNAの調製</u>　ファージρ11及びφ105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CsCl密度勾配遠心法を用いて精製し、ファージDNAはフェノール抽出法によってファージ粒子から精製した。

<u>DNAの制限酵素による切断;結合,電気泳動</u>　制限酵素EcoRI, BamHI, HindIIはBoehringer-Manheim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, TaqI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, typeII)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断片をフェノール: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。

<u>形質転換</u>　枯草菌のcompetent cellはAnagnostopoulos 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2×Schaeffer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。

・ <u>プロファージ形質転換法によるspo0A$^+$遺伝子のクローニング</u>　溶原ファージφ11をベクターに用いて"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φ11dspo0C$^+$-1を得た。枯草菌168Trp$^+$株染色体DNAのHind III断片とφ11DNAのHind III断片をT4DNAリガーゼで結合し、9V株(spo0C9V)のφ11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φ11活性ファージを産生したが、40%はφ11活性ファージを産生しなかった。後者(4株)にVLバーφ11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、φ11活性ファージ産生能をもつ二重溶原菌9V(φ11D)(φ11dspo0C$^+$-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(3.5×10^5 transductants/ml)の方が35株から得た溶菌液(1.8×10^5 transductants/ml)よりも高いSpo$^+$形質導入活性をもつので、15株からφ11dspo0C$^+$-1ファージを精製した。

特殊形質導入ファージφ105dspo0A$^+$-1の作製は次の様な方法で行なった。φ11dspo0C$^+$-1 DNAとφ105DNAをHind IIIで切断後、結合し、9V(φ105)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φ105プロ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φ105活性ファージ産生能を調べた。その結果7株の内3株は、プラーク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φ105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φ105dspoOA$^+$-1と名付けた。特殊形質導入ファージφ105dspoOA$^+$-Bc-1及びφ105dspoOA$^+$-L-18も同様にして、うす茶色でφ105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プラークが生ずる。

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。

<u>In vitro 転写翻訳系</u>　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15μl中に0.5-1.5μgのプラスミドDNA及び13μCiのL-[^{35}S]-methionineを含んでいる。37℃30分間反応した後、2.5μlのmethionine chase solutionを加え、さらに5分間反応を続けた。17.5μlのloading bufferを加え、100℃で5分間熱した後、一部(2-4μl)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L-[^{35}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。

<u>DNAの塩基配列の決定</u>　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M13mp10,11は三原勝芳先生からいただいた。DNA断片はM13mp8-11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、[α-^{35}S]dATPαSを用いて塩基配列を決定した。

<u>標識化合物</u>　L-[^{35}S]-methionine (1100 Ci/mmol)及び[α-^{35}S]dATPαS (>600 Ci/mmol)はAmersham International plcから入手した。

結果

I. spo0A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 φ11dspo0C$^+$-1の作製

spo0A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、spo0A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spo0A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spo0C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(spo0C9V)に対するSpo0C$^+$形質転換活性を測定した。その結果、BamHIによる切断ではSpo0C$^+$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、spo0C9V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(データは示さない)。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spo0C9V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φ11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φ11dspo0C$^+$-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spo0C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φ11DNAのHindIII断片と結合し、9V株のφ11溶原菌に導入し、Spo$^+$形質転換菌を選択した。これらのSpo$^+$形質転換菌にヘルパーφ11ファージを感染後得られた溶菌液を用いて、Spo0C$^+$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、φ11活性ファージ産生能をもつ二重溶原菌9V(φ11)(φ11dspoOC$^+$-1)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。

φ11dspoOC$^+$-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、φ11dspoOC$^+$-1ファージを分離することができた(図3)。φ11dspoOC$^+$-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)、φ11DNA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(φ11)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、φ11dspoOC$^+$-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168Trp$^+$株DNAのHindⅢ断片を用いた結果(表3)と一致した。

φ11dspoOC$^+$-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(spoOC9V)と同様にSS211株(spoOC9V recE4)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spoOC9V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(Abs^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, spo0A110NA 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φ11dspo0C$^+$-1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)と連関していることがわかり、この溶原菌は、ヘテロ部分二倍体(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φ11ファージにクローニングされた断片上に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あるいは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spoIIIA, spoIIIB, 及びspoIVB遺伝子は、クローニングされた断片上にはのっていなかった。

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あるいは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φ105dspo0A$^+$-1の作製

φ11dspo0C$^+$-1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φ11とのこ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、φ11dspo0C$^+$-1 DNAの5.2Mdal HindIII断片を小型の溶原ファージφ105(25Mdal)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φ105dspo0A$^+$-1を得た。9T株のφ105dspo0A$^+$-1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φ105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Spo$^+$形質導入能もなかった。しかし、ヘルパーファージφ105を加えた場合には、Spo$^+$形質導入能を示した(表5)。9V株(spo0C9V)のみでなく、ss211株(spo0C9V, recE4)、159株(spo0A12)に対してもSpo$^+$形質導入能が認められたが、φ105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、φ105dspo0A$^+$-1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。

φ105dspo0A$^+$-1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ると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、φ105の約半分であった。φ105dspo0A$^+$-1DNAをHind Ⅲで切断し(図6レーン2)、φ105DNAのHind Ⅲ断片(図6レーン1)と比較したところ、spo0C遺伝子を含む5.2Mdal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φ105-Hind Ⅲ断片の内少なくとも5本の断片(3.6, 3.1, 1.55, 0.72, 0.58Mdal)が欠けていた。φ105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、5.2Mdal Hind Ⅲ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φ105dspo0A12ファージの作製

159株(spo0A12)のφ105dspo0A$^+$-1溶原菌(Spo$^+$)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。159株のφ105dspo0A$^+$-1溶原菌のcompetent cultureにtrpC2$^+$遺伝子をもつpHVT1DNAを加え、Spizizen最少栄養培地上

でTrp^+形質転換菌を選択した。spo0A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。Spo0A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φ105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φ105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φ105dspo0A$^+$-1 DNAをHind III で切断し、電気泳動を行ない比較した(図7)。spo0A遺伝子を含む5.2Mdal断片も含めてHind III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spo0A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spo0A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spo0A遺伝子に染色体上のspo0A12変異が移った結果生じたものと考え、各々φ105dspo0A12-1, φ105dspo0A12-2と名付けた。

spo0A12変異とspo0C9V変異との相補性検定

φ105dspo0A12-1及びφ105dspo0A12-2ファージを用いてspo0A12変異とspo0C9V変異との相補性検定を行なった。ヘルパーファージφ105を加えて9V株(spo0C9V)、SS211株(spo0C9V, recE4)、159株(spo0A12)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φ105dspo0A$^+$-1はすべての株に対して形質導入能があるが、φ105dspo0A12-1及びφ105dspo0A12-2はSS211株に対する形質導入能が全くなかった。9V株からはφ105dspo0A$^+$-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。159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spo0A遺

伝子にspo0A12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、spo0A12変異とspo0C9V変異の間に相補性がなく、spo0C9V変異はspo0A遺伝子内の変異であることを示唆している。

5.2Mdal HindIII断片の切断地図

φ105dspo0A$^+$-1ファージの5.2Mdal断片上のどの領域にspo0A遺伝子が含まれるかを調べるためにφ105dspo0A$^+$-1DNAから得た5.2Mdal 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spo0C9V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Spo0C$^+$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、spo0C9V変異部位は、図8の下に示すように、BclI-A断片(1.53Mdal)上でSacI-XbaIの間(約0.65Mdal)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ジφ105dspo0A$^+$-Bc-1の作製

1.53Mdal BclI断片上に完全なspo0A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5.2Mdal断片とφ105DNAを用いて9V(φ105)株に対するプロファージ形質転換法を試みた。その結果特殊形質導入ファージφ105dspo0A$^+$-Bc-1を得た。φ105dspo0A$^+$-Bc-1ファージは単独で誘発可能だが、形質導入には、ヘルパーファージφ105を必要とした。φ105dspo0A$^+$-Bc-1ファージは9V株(spo0C9V)、SS211株(spo0C recF4)及びIS9株(spo0A12)に対してSpo$^+$形質導入が可能であった(表7)。またφ105dspo0A$^+$-Bc-1ファージのDNAをBclIで切断すると予想通り1.53Mdal BclI断片が検出された(図9)。これらの結果から、1.53Mdal BclI断片上には機能的に完全なspo0A遺伝子

がのっていることが示唆された。

II. spo0A$^+$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

spo0A$^+$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、spo0E遺伝子が枯草菌内にマルチコピー存在すると、胞子形成が阻害されることを報告している。同様の現象は他の胞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)。spo0A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、spo0A$^+$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。pIIdspo0A$^+$-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(spo0C 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、spo0A遺伝子もコピー数増大によってspo0C変異を相補しなくなること、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5.4×10^{6}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分子当り約17分子が存在する(Scheer-Abramowitz, et al. 1981)。またpBD9に一ケ所だけ存在する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)。φ105dspo0A$^+$-Bc-1 DNA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Schaeffer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、増殖が遅く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拡げると、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、spo0A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ったので、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 5μg/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、数ケずつ茶色の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6.9Mdal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1.53Mdal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、非常に不安定なので、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1.53Mdal断片上にもpBA1, pBA2と同様のsgi変異が生じているのでsgi-3と名付けた。

sgi変異の性質

sgi変異をもつプラスミドの構造を図10に示した。1.53Mdal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 5μg/ml)上で白色(Spo⁻)のコロニーを作り、宿主の胞子形成を阻害するので、胞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(2.7×10⁸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^+(茶色)であり、これらは欠失プラスミドを持っているので、胞子形成は10^{-5}以下の頻度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spo0A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(φ105)株に対するSpo^+プロファージ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sg1変異は、spo0C9V変異の近傍に生じたspo−変異であると思われた。そこでsg1変異を枯草菌(spo^+)染色体に導入して実際にspo−の形質転換菌が生じてくるかどうかを調べた。sg1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、spo0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、sg1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spo−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spo0A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、sg1変異がいずれもspo0A遺伝子内に生じたSpo0A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、sg1-1変異は実際にspo0A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spo0A遺伝子を含むプラスミド保持菌では、過剰に生産されたspo0A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. spo0A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

1.53Mdal(2.4kbp)BclI断片のpBR322へのクローニング

spo0A遺伝子を含む1.53Mdal断片(以下2.4kbp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。φ105dspo0A+Bc-1 DNA, φ105dspo0A12-1 DNA及びpBA1 DNA由来の2.4kbpBclI断片(各々spo0A+, spo0A12変異, sgi-1変異遺伝子を含む)をpBR322のBamHI部位へ挿入して、pBBC1(spo0A+)、pBBCA1,2(spo0A12), pBBCM1,2(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2.4kbp断片の向きは、2方向可能であるが、pBBC1, pBBCA1, pBBCM1は同じ向きでpBBCA2, pBBCM2はそれと逆向きである。野生型のspo0A遺伝子を含むプラスミドは調べた9個とも同じ向きで、2.4kbp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、spo0A遺伝子の位置を決めるために2.4kbp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spo0A+遺伝子を含む2.4kbp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2.4kbp断片からは、2種類(pBBBM1, pBBHM1)を作製した(図12脚注参照)

spo0C9IV spo0A12 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(spo0C9IV)、IS9株(spo0A12)に対して試みた(表8)。Spo0C+形質転換活性はpBBC1, pBBB1, pBBC1ΔH, pBBB2, pBBB2ΔEには認められたが、pBBH1, pBBC1ΔE, pBBB1ΔEには見出せなかった。従ってspo0C9IV変異はBclI-EcoRI断片上に位置することがわかった。spo0C9IV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、spo0C9IV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, pBBC1△H, pBBC1△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spo0A12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、sgi-1変異の位置を決めるため、sgi-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(sgi-1はSpo0A表現型をもつ)をPyrD$^+$形質転換とのcongressionで行なった(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、sgi-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。

φ105dspo0A$^+$-L-18ファージ及び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をプロファージ形質転換法を用いて9V(φ105)株に導入した。また野生型及びsgi-1変異型の2.4kbp断片を含むpBBC1, pBBCM2も同様にして9V(φ105)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、φ105のプロファージ上に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sgi-1変異がspo0C9V変異を相補しないことか

ら、sgi-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φ105dspo0A^{+}-L-18を得た。φ105dspo0A^{+}-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φ105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。φ105dspo0A^{+}-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2.4 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φ105dspo0A^{+}-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に、9V株のφ105dspo0A^{+}-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、φ105dspo0C9V-1ファージを得た。φ105dspo0C9V-1ファージは、SS211株(spo0C recE4)及び9V株(spo0C9V)に対するSpo^{+}形質導入能を失なっており、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φ105dspo0C9V-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})形質転換菌を選択した。このようにして得られたプラスミドpBBC11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27,500daltons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、27.5kilodalton蛋白質は合成されず、代わりに約6.3kilodaltonsの蛋白質が合成されていた(レーン4)。pBBCA2からも同様に6.3kilodalton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6.3kilodalton蛋白質はamber fragmentとみなすことができるので、27.5kilodalton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27.5kilodaltonsの蛋白質が合成された(レーン5)。またsgi-1変異遺伝子をもつpBBCM1及びpBBCM2からは27.5kilodalton蛋白質よりもやや小さい約26.5kilodaltonsの蛋白質が合成されており(レーン6,8)、sgi-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pBBC1ΔEからは約27.5kilodaltonsと、約25.5kilodaltonsの2本のバンドが検出され(レーン9)、pBBC1ΔH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)。pBBC1ΔEはspo0C9V変異部位を含むDNA断片を失な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2.4kbp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2.4kbp断片の全塩基配列をM13 dideoxy chain termination法を用いて決定した。2.4kbp断片の制限酵素地図及び、塩基配列決定の戦術を図14に示した。またspo0A12、spo0C9V、sgi-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わかった領域についてのみ決定した(図14) 2375bp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(1353bp)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ケ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+686のCがTに置換し、missense変異を生じていた。またsgi-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変異を起こしていた。

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28codon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′末端と良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。

```
                                CA
mRNA      5′-----AAGGA^GG-----ATG 3′
          5′-------GGAGG-----GTG 3′
16SrRNA   3′OH UCUUUCCUCC-+---------5′
```

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)からはどちらが合成されているのかわからない。一方spoOA/2 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のに適した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転写翻訳系で使用される開始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5codon下流にも終止codon TGA, TAAが存在していた。

spo0A変異蛋白質の構造

spo0A12, spo0C9V, sgi-1 変異遺伝子の塩基配列を野生型spo0A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。spo0A12変異ではspo0A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。spo0C9V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が付加されたため、frame shift変異を起こし、その結果spo0A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、spo0C9V変異によって置換したアミノ酸残基の位置は、spo0A蛋白質のC末端に近く(C末端から11番目のAla)、sgi-1変異(Spo0A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、枯草菌の胞子形成初期遺伝子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spo0C9V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変異は胞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変異のようには失われていない(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。ひとつは胞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胞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spo0A12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、胞子形成も阻害され、多面発現的な表現型を示すようになる。第2のモデルでは胞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のものに関しては充分であるが、胞子形成に必須なものの内の一部に関しては不充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アミノ酸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の229番目のAlaがValに変化しており、そのため、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番目以降のアミノ酸残基が失なわれており、その結果、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与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のモデルを支持している。

spo0A遺伝子をマルチコピープラスミド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spo0A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、spo0A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(spo0A12)及びpBBCM1(sgi-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が、pBBC1(spo0A⁺)保持菌はそれよりも小さいコロニーを形成した。これらのプラスミドではspo0A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、spo0A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。そしてこれと逆方向に2.4 Kbp断片が挿入されたプラスミドではspo0A12, sgi-1変異遺伝子からは得られたが(pBBCA2及びpBBCM2)、野生型spo0A遺伝子からは得られなかった(調べた9ケともpBBC1だった)。理由はハッキリしないが、おそらくspo0A遺伝子がtetプロモーターからの転写と同じ向きで入ったためにspo0A遺伝子の転写量がふえ、合成されるspo0A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spo0A遺伝子の発現がある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、sgi-1変異遺伝子を含むプラスミド(pBA1)をもつ枯草菌では、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、spo0F遺伝子の例(Kawamura, et al., 1981)などで知られているが、spo0F遺伝子の場合は、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(曽根ら, 1983)。spo0A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。

spo0A蛋白質をコードするopen reading frameには翻訳開始codonとして

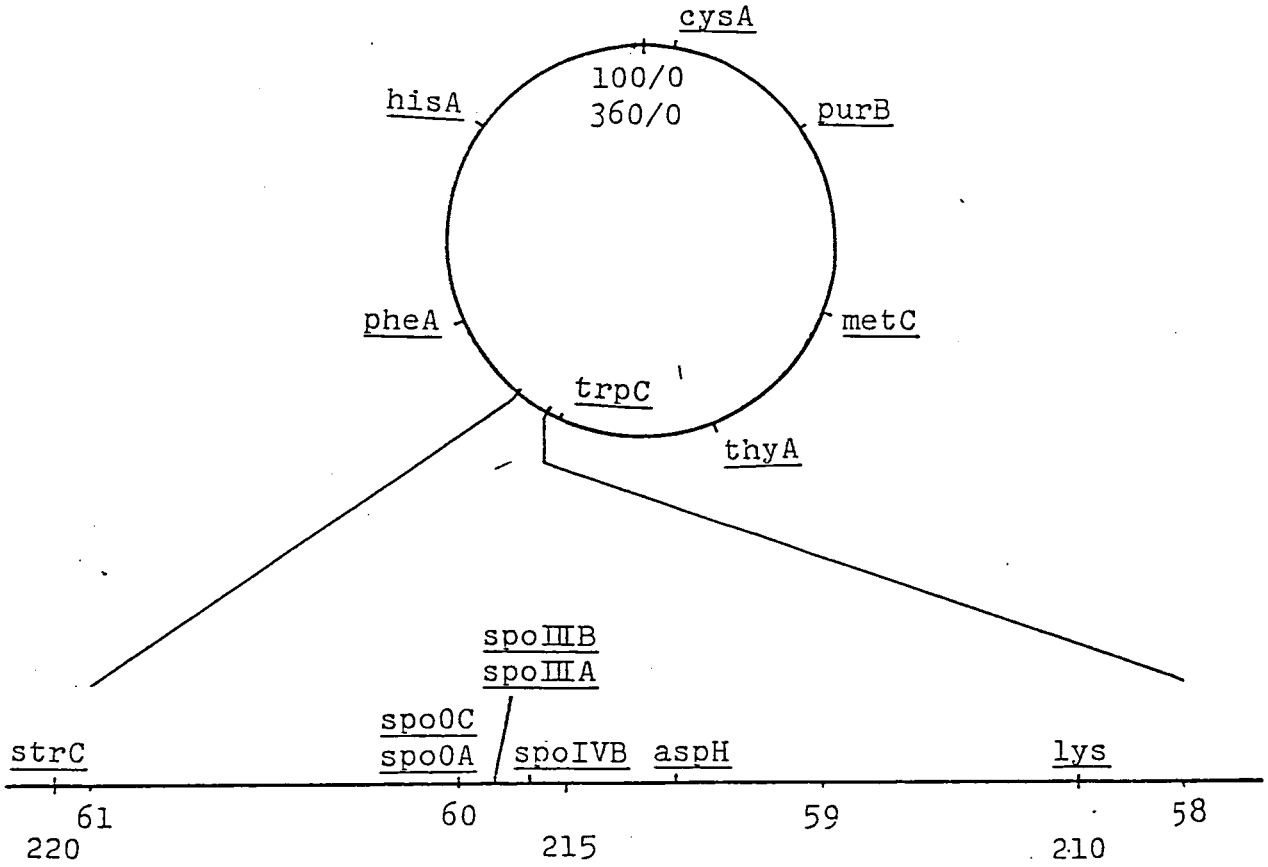
可能なものが2codon(ATGとGTG)存在し、いずれもその上流に各々5及び7塩基離れてリボソームの結合部位が存在した。spo0A/2 amber fragmentの大きさから、少なくとも大腸菌のin vitro転写翻訳系では、ATG codonの方のみが使われていると思われる。しかし、枯草菌の中では、GTGの方のみが、あるいは両方が使用されている可能性もあり、さらに詳しく調べる必要がある。

spo0A遺伝子の上流の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(Shimotsu, 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^{55}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、繰り

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ヌクレアーゼマッピング及びσ55 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とする表示と360とする表示の両方を記入した。

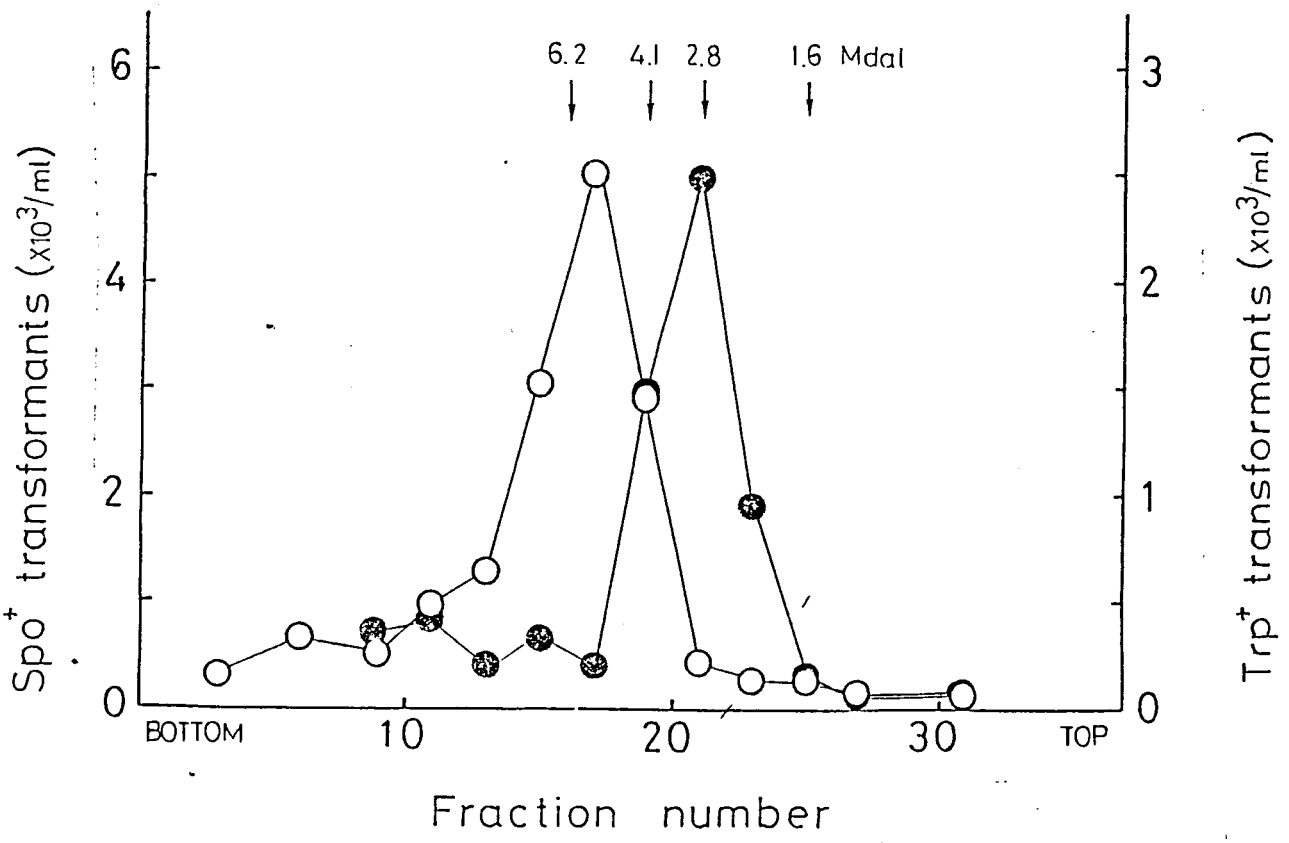


図2. ショ糖密度勾配遠心による枯草菌DNAのHind III断片の分画。Hind IIIで切断した染色体DNAを5−20%ショ糖密度勾配遠心(Beckman SW 65 rotorを用いて45,000rpm 3時間)にかけた。遠心後、4滴ずつ分画し、各画分の一部(5μl)を用いて9V株に対するSpo⁺及びTrp⁺形質転換活性を測定した(実験材料と方法参照)。Spo⁺形質転換菌(○)の数はSchaeffer寒天培地上で、Trp⁺形質転換菌(●)の数はSpizizen最少栄養寒天培地上で測定した。矢印はλファージDNAのHind III断片の位置を示し、分子量マーカーとして用いた。

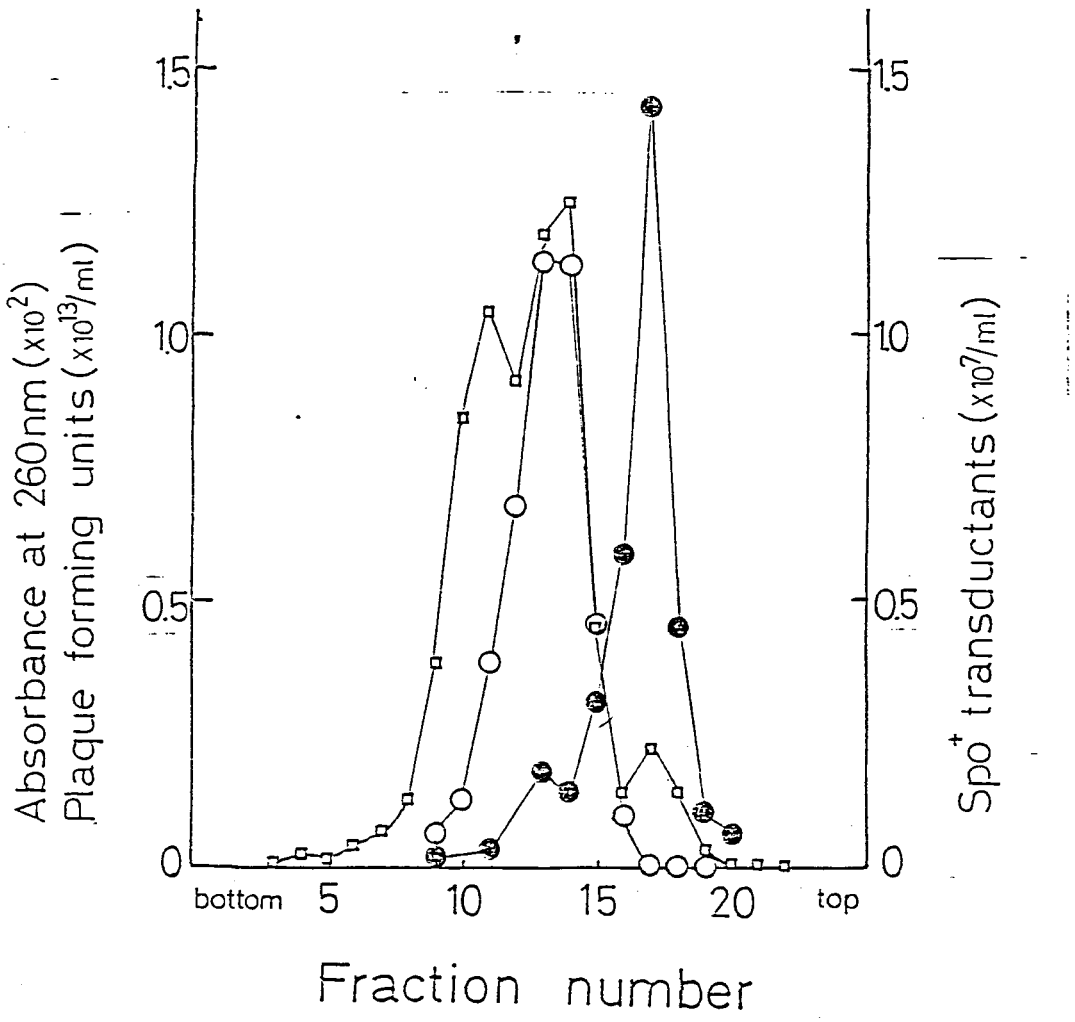


図3. CsCl平衡密度勾配遠心による ρ11d spo0C±1 ファージ粒子分離。二重溶原菌15株から調製した溶菌液をSorvall SS-34 rotorを用いて17,000rpm 75分間遠心し、ファージ粒子を集めた。ファージ粒子をファージdilution bufferに懸濁した後、CsClを加え、最終密度を1.487g/mlに合わせ、Beckman SW65 rotorを用いて、27,000rpm 20時間遠心し、2滴ずつ分画した。活性ファージ力価、PFU(○)は168株を指示菌に用いて測定し、Spo⁺形質導入活性(●)は、9V株を受容菌に用いて表4の脚注に述べた方法で測定した。□は、260nmのAbsorbanceを示す。

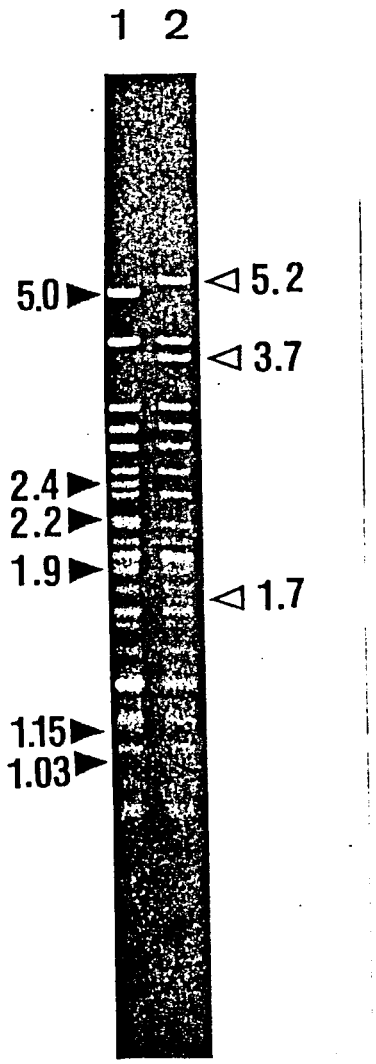


図4、HindⅢで切断したρ11dspoOC±1 DNAのアガロースゲル電気泳動。0.4μgのファージDNAをHindⅢで切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。ρ11活性ファージDNA(レーン1)と比較すると、ρ11dspoOC±1 DNA(レーン2)では3つの新しい断片(◁)が生じており、6つの断片(▶)が消失していた。横に示した値は、断片の大きさ(Mdal)である。

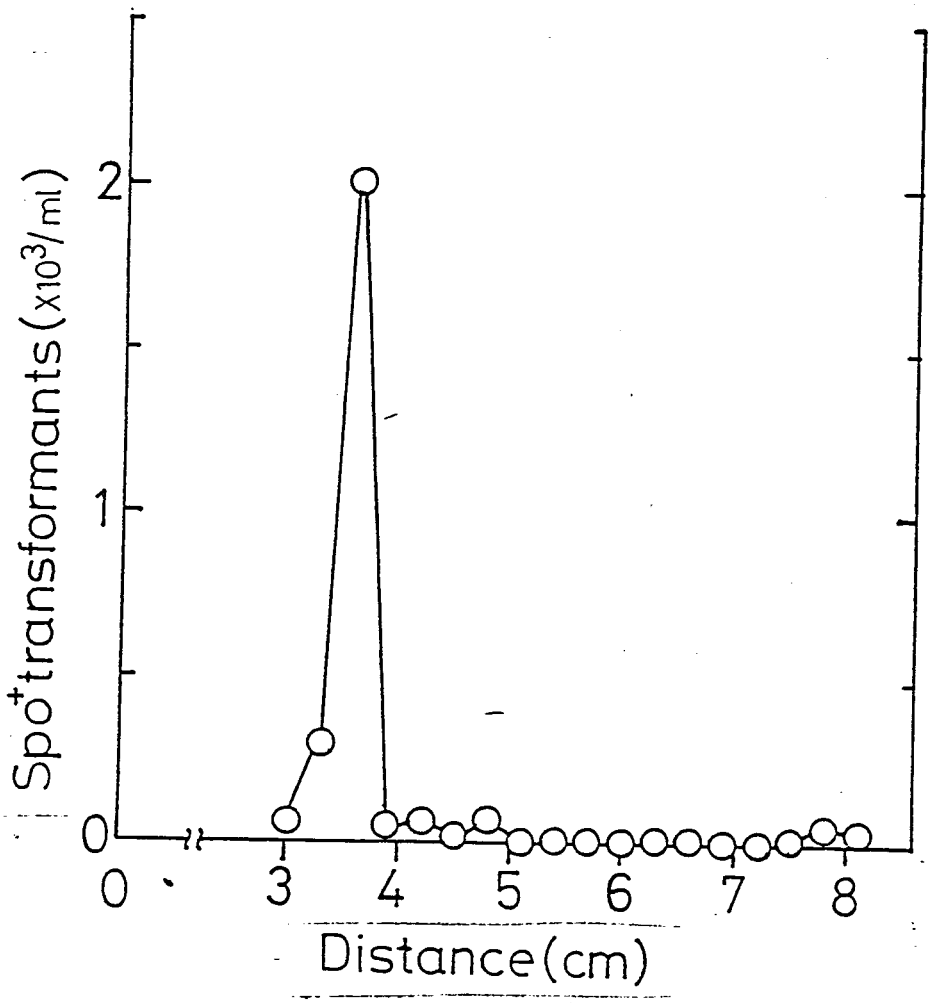


図5. spo0C マーカーを含むHind III断片の決定。
Hind III で切断した p11d spo0C±1 DNA (0.3μg) を
0.7% 低融点アガロースゲル電気泳動により分離した。
泳動後ゲルを3mmの厚さにスライスし、各スライスに
含まれるSpo+形質転換活性を測定した。Spo+形質
転換菌(○)は"実験材料と方法"で述べた方法で
測定した。

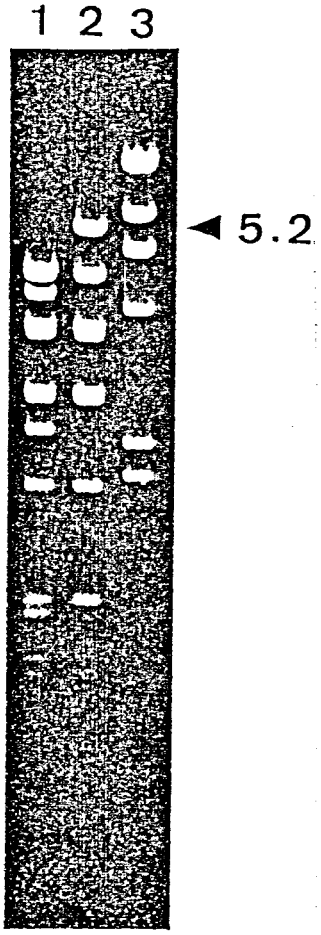


図6. HindⅢで切断したϕ105d<u>spo0A</u>$^{+}$-1 DNAのアガロースゲル電気泳動。(レーン1) ϕ105 DNA, (レーン2) ϕ105d<u>spo0A</u>$^{+}$-1 DNA, (レーン3) λ DNA。各々HindⅢ断片(0.5μg)を0.7%アガロースゲル電気泳動で解析した。<u>spo0C</u>マーカーを含む5.2 Mdal断片(◀)の位置を示した。

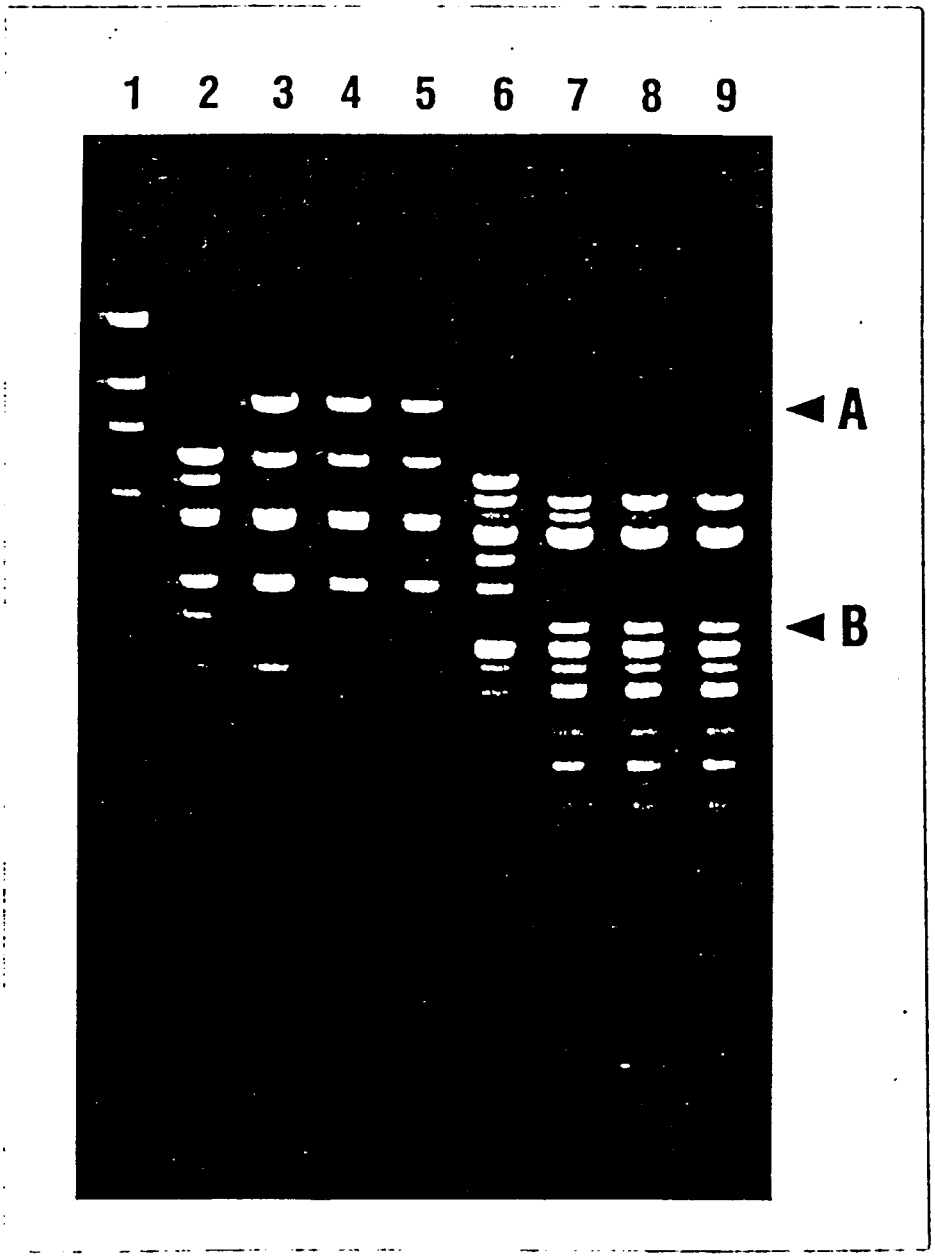


図7. HindⅢあるいはBclⅠで切断したφ105 dspo0A 12 DNAのアガロースゲル電気泳動。
レーン1-5はHindⅢ切断物、レーン6-9はBclⅠ切断物である。2と6はφ105、3と7はφ105dspo0A^{+}-1、4と8はφ105dspo0A12-1、5と9はφ105dspo0A12-2、1はλである。0.7%アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。

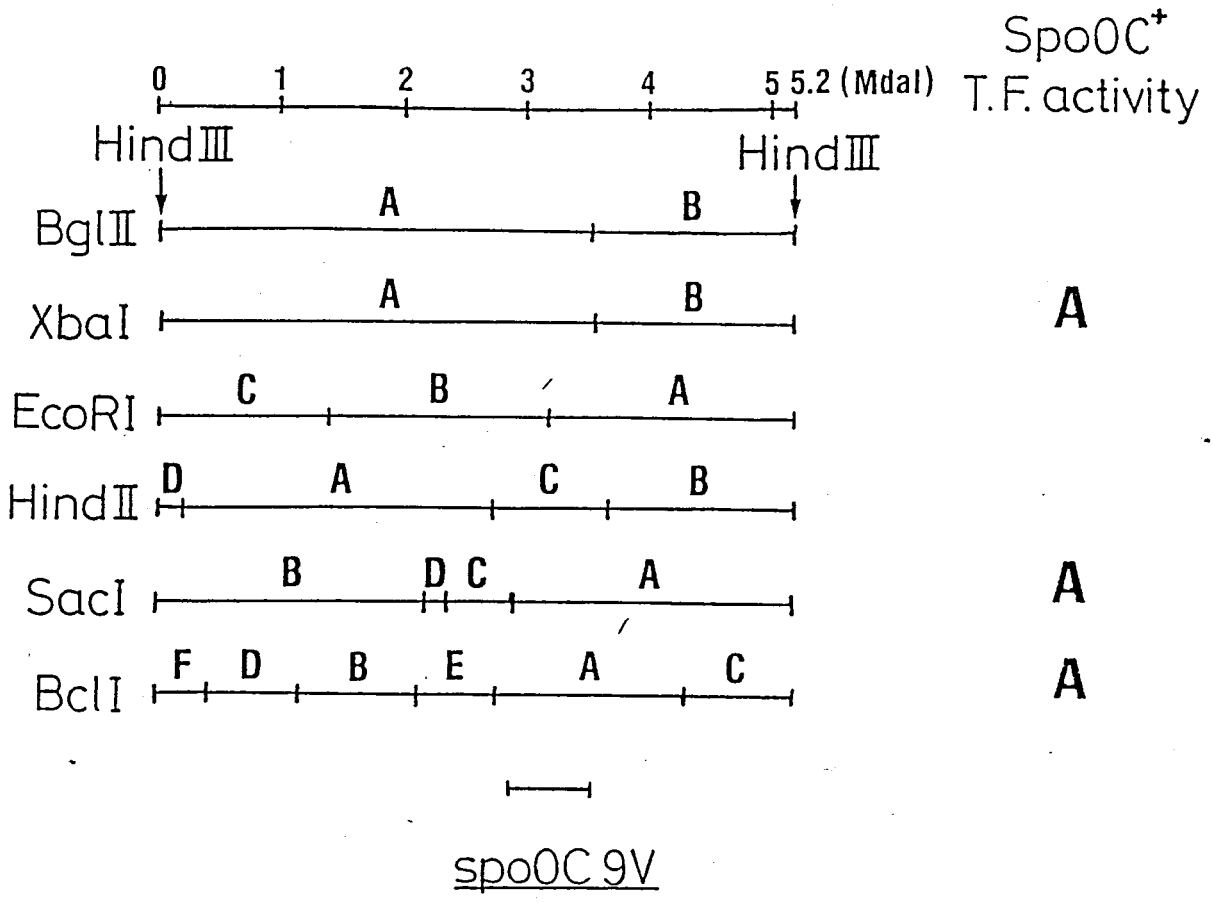


図8. 5.2 Mdal断片の切断地図とspoOC9V変異部位の位置。φ105dspoOA$^{+}_{-}$1から得た5.2 Mdal HindIII断片を用いて切断地図を作製した。また、SpoOC^{+}形質転換活性は、図5の脚注に述べた方法で測定した。最下段には、spoOC9V変異部位が含まれる範囲を示した。

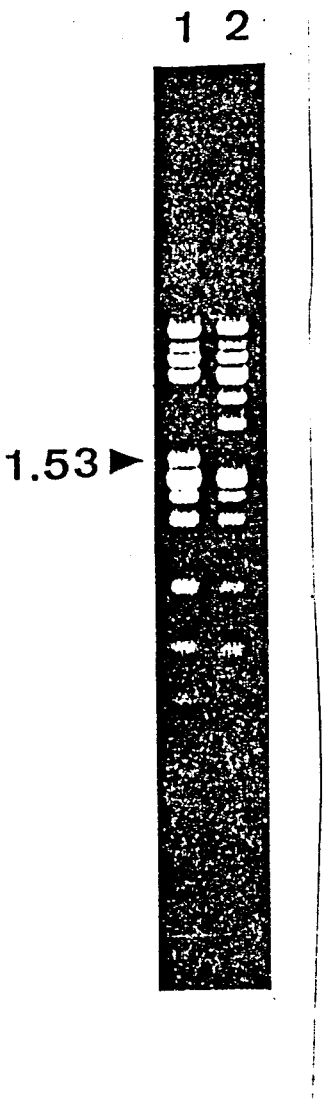


図9、BclIで切断したφ105dspo0A^{+}-Bc-1 DNAのアガロースゲル電気泳動。レーン1はφ105dspo0A^{+}-Bc-1，レーン2はφ105 DNAである。0.7%アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。spo0C9Vマーカーを含む1.53 Mdal BclI断片（▶）の位置を示した。

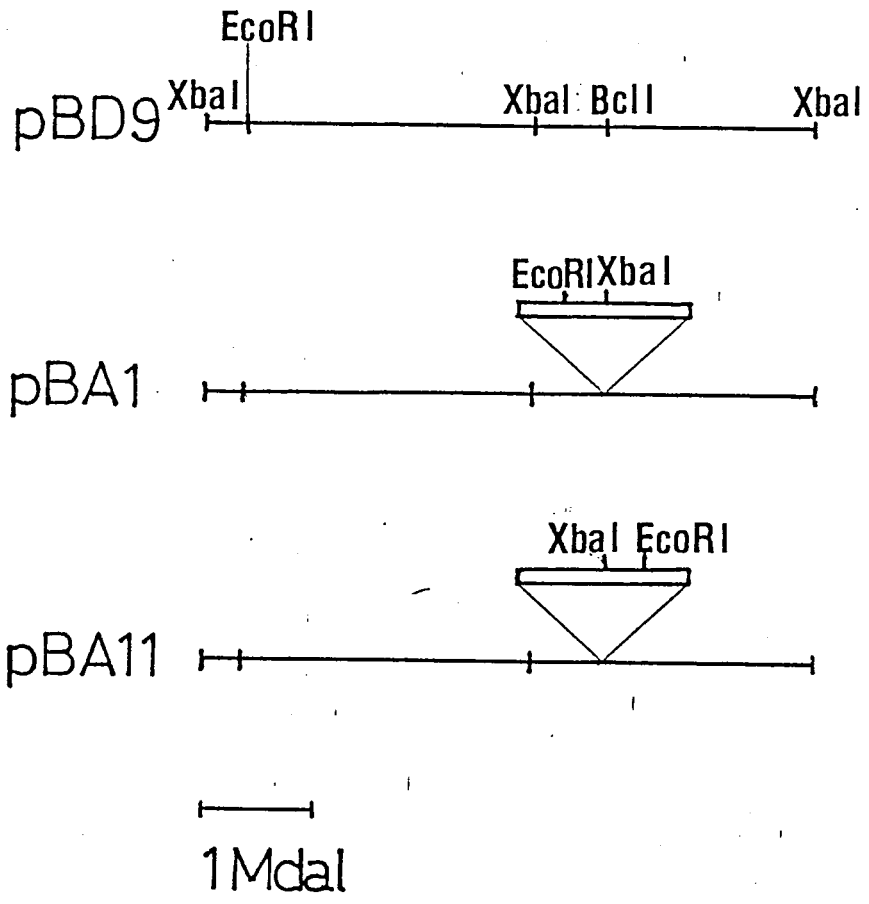


図10. 1.53Mdal断片をもつプラスミドpBA1、pBA2、pBA11の構造。ベクターpBD9(5.4Mdal)は、2ヶ所あるXba I部位の内の1ヶ所で切断して線状に示した。1.53Mdal断片(□)はpBD9のBcl I部位へ挿入されている。pBA1とpBA2は同じ方向に、pBA11は逆方向に断片が挿入されていた。1.53Mdal断片上のEcoR I部位とXba I部位の位置を示した。

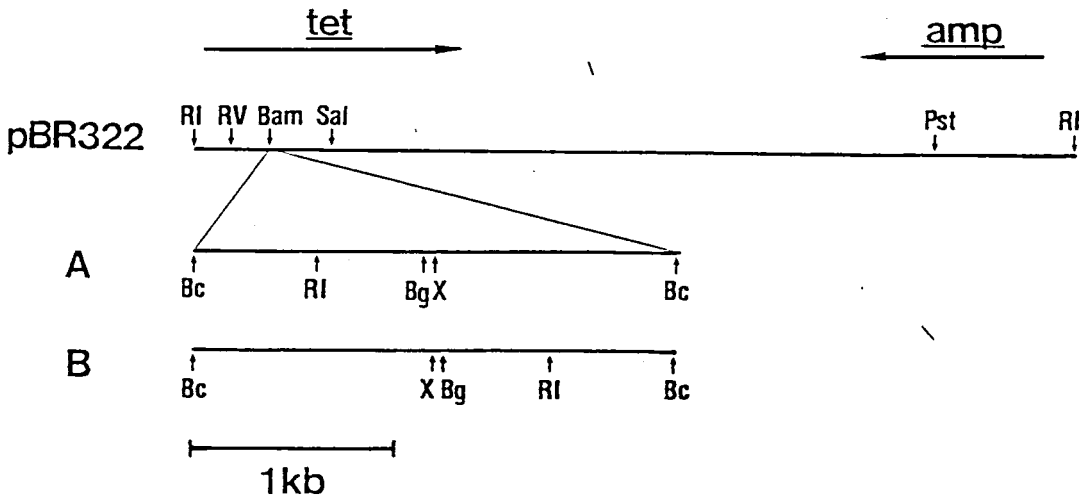


図11、2.4Kbp断片を含むプラスミドの構造。2.4kbp断片の方向は下(A,B)に示した。pBBC1, pBBCA1, pBBCM1及びpBBCC1はAの方向で断片が挿入してあり、pBBCA2, pBBCM2はBの方向で断片が挿入している。pBR322はEcoRI部位で切断し線状化した形で示した。制限酵素は略号で示した。RIはEcoRI、RVはEcoRV、BamはBamHI、SalはSalI、PstはPstI、BcはBclI、BgはBglII、XはXbaIである。水平の矢印は、pBR322のtet遺伝子及びamp遺伝子の位置と転写の方向を示した。

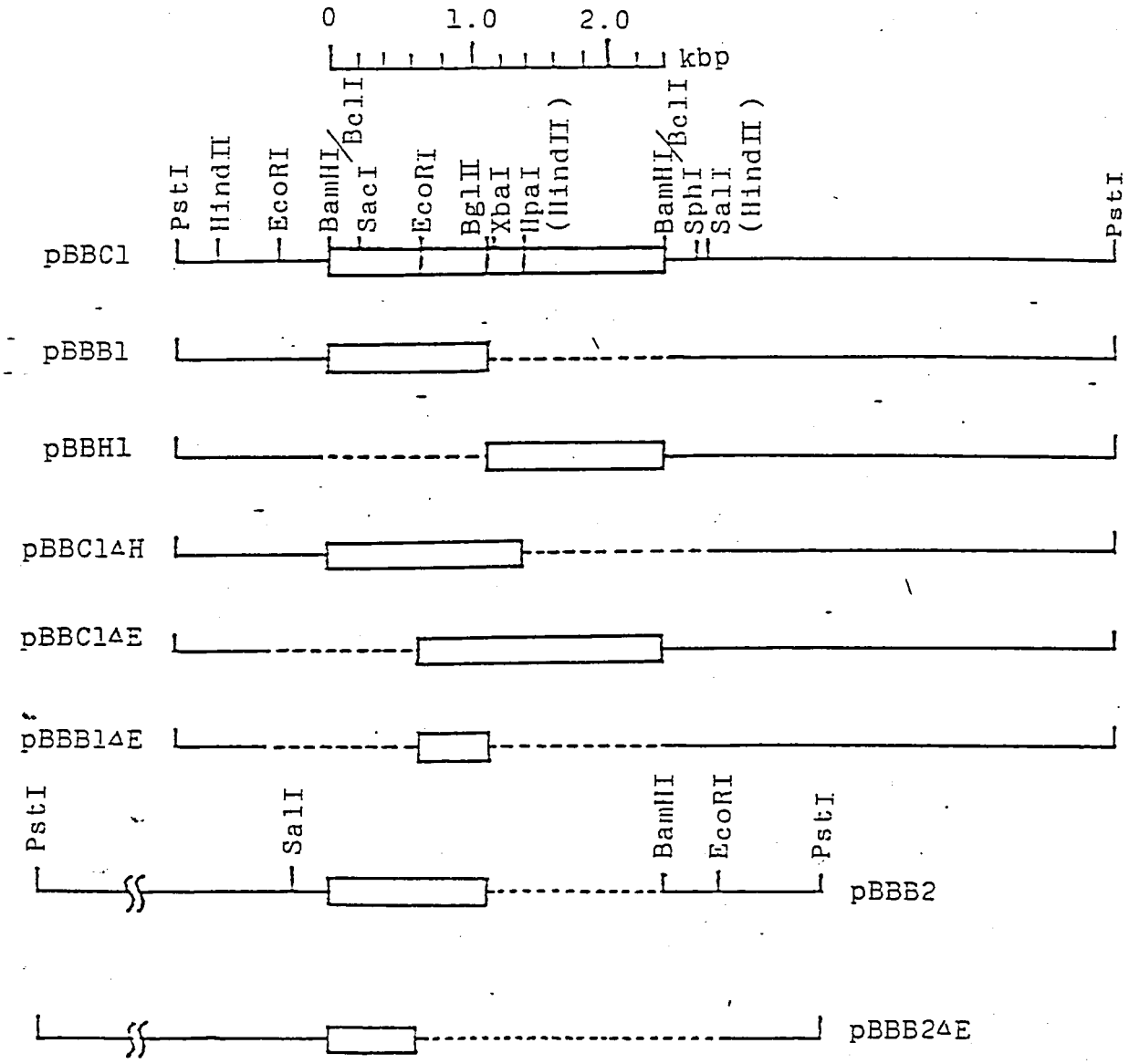


図12 pBBC1及び欠失プラスミドの構造。プラスミドはすべてpBR322上に1ヶ所あるPstI部位で切断し、線状化した形で表わした。各プラスミドに含まれる2.4kbp断片及びその制限酵素部分断片を(▭)で示した。また、(—)はpBR322部分を(----)は各々のプラスミドで欠失している部分を表わしている。pBBB1,2及びpBBH1は、2.4kbpBclI断片をBglIIで切断してからpBR322のBamHI部位へ挿入して作製した。pBBB1及びpBBH1は挿入断片の向きがpBBC1と同じで、pBBB2は逆向きである。pBBC1ΔHは、pBBC1をHindII(3ヶ所)で切断後、T4DNA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(sgi-1)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。

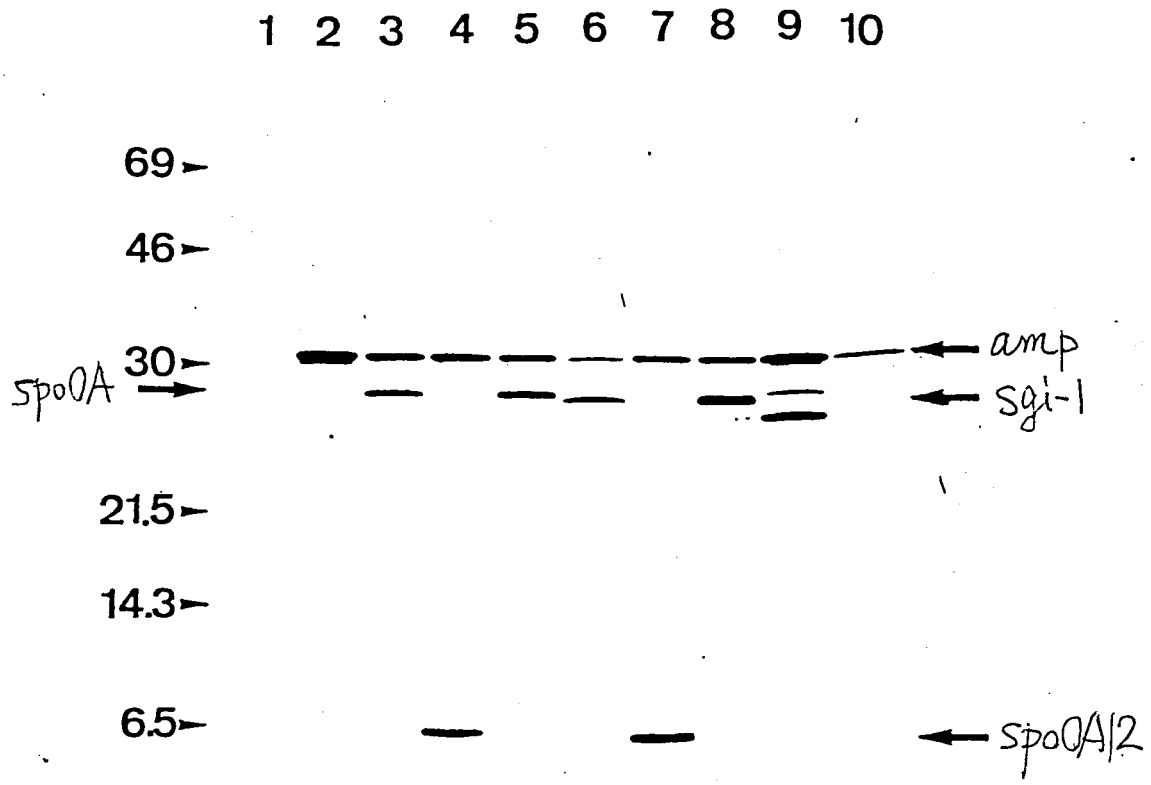


図13 組み換えプラスミドDNAからin vitro転写翻訳系を用いて合成された[35S]標識蛋白質の解析。実験の詳細は"実験材料と方法"に述べた。各レーンは以下に述べるDNAを用いて合成された蛋白質を含んでいる。1. DNAなし. 2. pBR322 3. pBBC1, 4 pBBCA1, 5. pBBCC1, 6 pBBCM1, 7. pBBCA2, 8 pBBCM2, 9 pBBC1ΔE, 10. pBBC1ΔH。分子量マーカーは、bovine serum albumin (M_r=69,000), ovalbumin (M_r=46,000), carbonic anhydrase (M_r=30,000), trypsin inhibitor (M_r=21,500), lysozyme (M_r=14,300), aprotinin (M_r=6,500)を用いた。amp, spoOA, spoOA12, sgi-1は各々amp, spoOA, spoOA12 sgi-1遺伝子産物を示す。

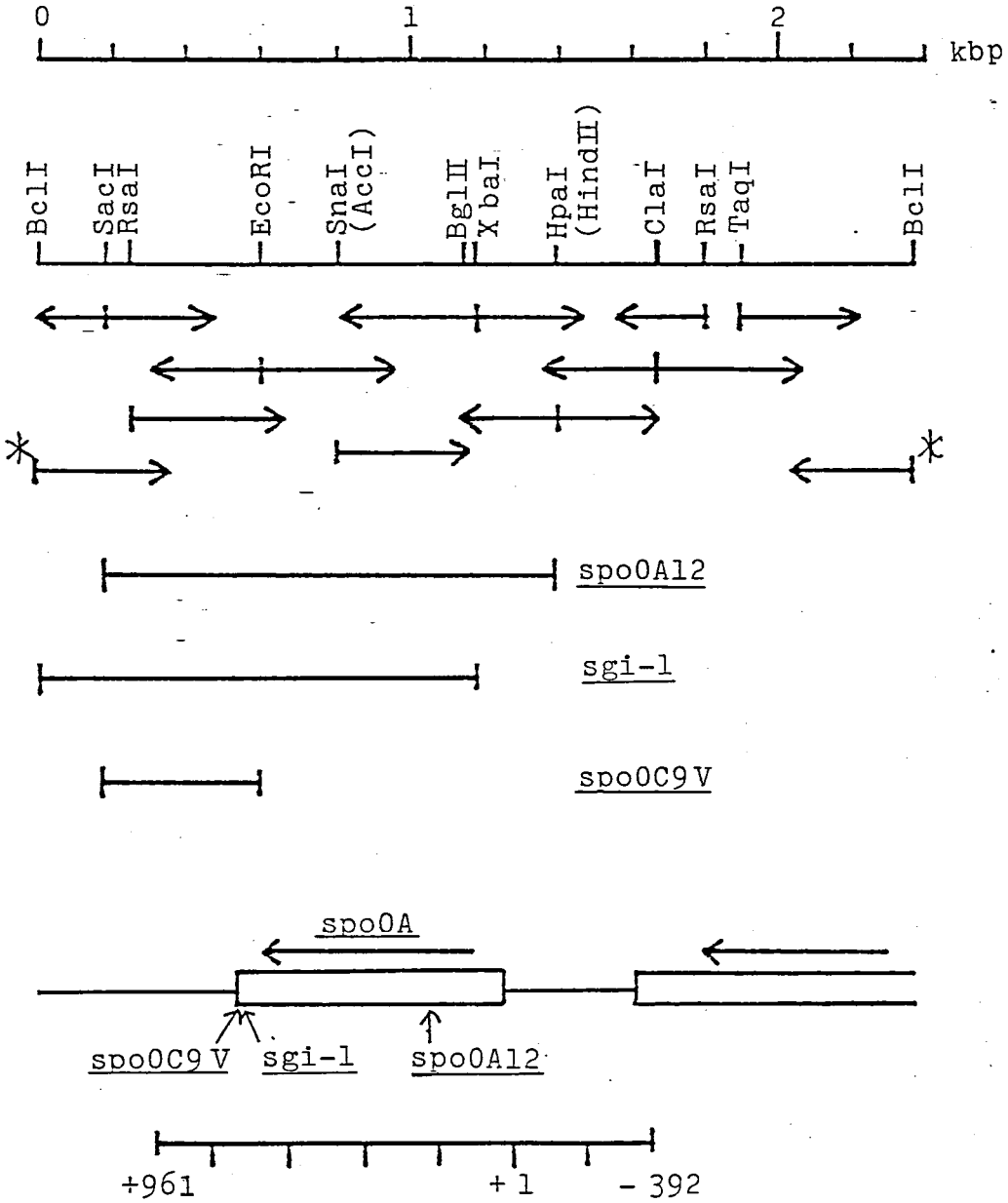


図14 2.4kbp断片の切断地図と塩基配列決定の戦略．上段には、2.4kbp断片の切断地図（塩基配列決定に用いた部位のみ）を示した。矢印は塩基配列を決定した方向と長さを示す。＊印の2つの断片のみは、φ105dspo0A⁺Bc-1ファージの2.4kbp断片を用い、他はpBBC1から、M13にクローニングした。中段に示すように各変異遺伝子の塩基配列は変異部位が含まれる領域のみを決定した。各々pBR322にクローニングしたDNA断片を用いた。下段には、塩基配列からわかったlong open reading frame（▭）の向き、及び各変異部位を示した。図15には一番下に表示した1353bp（-392から+961）の塩基配列を示した。

```
 ClaI                                   -350                                                    -300
ATCGATATTTATGGAAAAGAAAAAGCAAGCTGACTGCCGGAGTTTCCGGCAGTTTTTTTATTTTGATCCCTCTTCACTTCTCAGAATACATACGGTAAA
IleAspIleTyrGlyLysGluLysAlaSer***

                                        -250                                                    -200
ATATACAAAAGAAGATTTTTCGACAAATTCACGTTTCCTTGTTTGTCAAATTTCATTTTTAGTCGAAAAACAGAGAAAAACATAGAATAACAAAGATAT

                                        -150                                    HpaI            -100
GCCACTAATATTGGTGATTATGATTTTTTTAGAGGGTATATAGCGGTTTTGTCGAATGTAAACATGTAGCAAGGGTGAATCCTGTTAACTACATTTGGG

                                        -50                                                     +1
GAGGAAGAAACGTGGAGAAAATTAAAGTTTGTGTTGCTGATGATAATCGAGAGCTGGTAAGCCTGTTAAGTGAATATATAGAAGGACAGGAAGAC ATG
                                                                                                fMet

                                                                +50
GAA GTG ATC GGC GTT GCT TAT AAC GGA CAG GAA TGC CTG TCG CTG 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                                                    BglII       +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 CGC 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
TATTAGTTTGCGCTGATAAATAGGAGGCGTTTTGTTTTGGGGACATTTGTAGTATGGGAGAAGAATATTAAGTATCCGCATATAGTAAAGGATAGGTTT

                                +900                                                    +950
GAAAAGTAAGGAAAGCAAATGGCGGTATTACCTGCACTCTTGGTCCATTCATACATCTTATAGGATCACGAAGCATGATCGACCCTAGATGTGTCCGTT
```

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。

```
                    sgi-1                spo0C9V
                      A                    T
wild    AAACCTACCAACAGTGAATTCATTGCAATGGTTGCGGATAAGCTGAGGTTAGAGCATAAGGCTTCTTAA
        LysProThrAsnSerGluPheIleAlaMetValAlaAspLysLeuArgLeuGluHisLysAlaSer***
              220            225            230            235          239
                                              ↓
spo0C9V                                      GTG
                                             Val
                                             229
                        ↓
sgi-1                   AGAATTCATTGCAATGGTTGCGGATAA
                        ArgIleHisCysAsnGlyCysGly***
                        223                  230
```

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  TTGATCCCTCTTCACTTCTCAGAATACATACGGTAAAATATACAAAAGAA
-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
spo0A	−	−	−	−	−	−
spo0C	+	+	+	+	+	−
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, φ2やφ15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	trpC2	S. Okubo
168 Trp$^+$		168
9V	spoOC9V trpC2	R. Schaeffer
SS211	spoOC9V recE4 pyrD1 ilvA1	本研究室
159	spoOA12 trpC2 pheA1	B.G.S.C.
SR22	spoOA12 trpC2	J. Spizizen
SS209	trpC2 pyrD1 ilvA1 recE4	本研究室
SS273 (BD224)	trpC2 thr5 recE4	B.G.S.C.
QB943	trpC2 pyrD1 ilvA1 thyA thyB	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 spoOC9V marker
HindIII	6.4	5-6Mdal
PstI	13.5	8-9Mdal
EcoRI	0.8	—
BamHI	100	—
SalI	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. φ11dspo0C$^+$-1ファージによるSpo$^+$形質導入

Recipient strain[a]	Genotype	Spo$^+$ transduction[b]
9V	spo0C9V	+
SS211	spo0C9V recE4	+
1S9(JH646)	spo0A12	+
1S68(R15-13)	spo0A12 abrB23	+
SS176(110NA)	spo0A110NA	+
SS174	spo0A110NA cpsX30	+
NIG1131	spo0A34	+
1S42(NG1.13)	spoIIIA35	-
1S48(A3)	spoIIIB2	-
1S57(P7)	spoIVB165	-

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 (φ11)(φ11dspo0C$^+$-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(0.1ml)に0.1mlの溶菌液を加え、37°C 15分間保温した後、3mlの2xSchaeffer培地を加え、37°C 2晩培養した。熱耐性胞子の数は80°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3.7×10^4~4.6×10^6/mlであった(ただしSS176は2.9×10^3/ml)。−では熱耐性胞子は存在しなかった。

表5 φ105d<u>spo0A</u>$^+$-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>$^+$
φ105d<u>spo0A</u>$^+$-1	0	–	–
φ105d<u>spo0A</u>$^+$-1 + helperφ105	1.3×10^6	4.9×10^3	7.2×10^6
φ105	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(φ105d<u>spo0A</u>$^+$-1は0.05ml, φ105は0.01ml)を加え、37℃ 20分間培養した後、3.5mlの2×Schaeffer培地を加え、37℃ 2時振とう培養した。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(<u>spo0C9V</u> <u>rec</u>$^+$), SS211株(<u>spo0C9V</u>, <u>recE4</u>) 159株(<u>spo0A12</u> <u>rec</u>$^+$)を用いた。

表6. Transduction with φ105dspo0A12 phages

Phage lysate[a] (+ helper φ105)	No. of heat resistant cells/ml[b] Recipient strain		
	spo0C recE	spo0C rec$^+$	spo0A rec$^+$
φ105dspo0A12-1	0	2.3×10^3	0
φ105dspo0A12-2	0	2.6×10^3	0
φ105dspo0A$^+$-1	1.7×10^4	1.2×10^6	3.1×10^6
None	0	10	0

a ファージはヘルパーファージφ105と混ぜて用いた.

b 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. φ105d<u>spo0A</u>$^{+}$-Bc-1 ファージによる 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>$^{+}$
φ105d<u>spo0A</u>$^{+}$-Bc-1	0	—	—
φ105d<u>spo0A</u>$^{+}$-Bc-1 + helperφ105	9.0×10^{6}	4.8×10^{5}	1.6×10^{6}
φ105	0	10	0

φ105d<u>spo0A</u>$^{+}$-Bc-1 ファ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(spo0C9V)	1S9(spo0A12)
pBBC1	+	+
pBBB1	+	-
pBBH1	-	-
pBBC1ΔH	+	+
pBBC1ΔE	-	+
pBBB1ΔE	-	-
pBBB2	+	-
pBBB2ΔE	+	-

0.5μg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 sgi-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 SpoOA-type transformants per 5μl [c]	SpoOA/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(pyrD1 ilvA1 trpC2 hisA hisB)を用いた。

b uracilを含まないSpizizen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、SpoOA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SpoOA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1μg)を HindIII (pBR322部分に1ケ所の切断部位がある)で切断し、φ105DNAのHindIII断片(1μg)と混ぜ、T4リガーゼで結合した後、9V(φ105)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×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、コンピューター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夫先生、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.Rodriquez, 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.Ramarkrishna, 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, 斉藤日向 (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

曽根秀隆, 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