

枯草菌の細胞表層統合性維持に寄与する細胞外ストレス応答機構の解析

2013年9月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

理工学専攻（主指導教員 朝井 計）

井 上 広 海

目次

1. 序論

2. 方法と材料

3. 結果

4. 考察

5. 総括

6. 参考文献

7. 謝辞

1. 序論

1-1. グラム陽性菌の細胞表層

バクテリアの細胞表層は、細胞膜のほか、糖やペプチドを中心とした強固な構造を持ち、細胞の形態維持や細胞外のストレスから細胞を保護する重要な役割を担っている。近年、いくつかのバクテリアでは、外界の環境変化に対して細胞表層の構造を変化させることで、生存率を高める機構が存在することが明らかになってきた。本論文では、細胞外の環境が変化したとき、それに応じて細胞表層の構造に一定の変化が生じることを、細胞表層の「統合性」と呼ぶ。環境変化と対応する細胞表層の構造変化という細胞の反応が乖離せず、統合性が維持されることは、枯草菌に代表される土壌細菌のように、千変万化する環境中で生育するバクテリアにとって、特に肝要であるといえる。グラム陽性菌およびグラム陰性菌の細胞表層構造の模式図を Fig. 1 に示す。

バクテリアの細胞壁はペプチドグリカン (PG)で構成される複雑な網目状の構造を取っており、その構造は2種類の amino-sugar、N-acetylglucosamine (GlcNAc) と N-acetylmuramic acid (MurNAc) で成り立っているグリカン鎖を持つ【1】。この強固な構造は細胞形態の維持や膨圧に対する防御機構として非常に重要な働きを持っている。一方で、細胞が成長する際には強固な構造はかえって細胞伸長の妨げになるため、細胞壁はある程度の柔軟性も保っていなければならない。また、目まぐるしく変化する細胞外の環境の変化に適応するため、細胞壁の構造は柔軟に変化する必要がある。GlcNAc と MurNAc-pentapeptide からなる PG の単位構造は細胞質側で合成、編成される。この際炭素 55 個からなるイソプレノイド脂質である bactoprenol 分子【2】上で合成される。このとき PG の単位構造は2分子のリン酸をリンカーとして bactoprenol に結合しており、この構造を Lipid II と呼ぶ。この分子は膜の外側へと転移され、transglycosidase および transpeptidase の働きによりすでに合成されている PG 構造内に取り込まれる【1】。PG

単位構造から離れた後、bactoprenol リン酸(C55-P) は細胞内に回収されて再利用される。グラム陽性菌における PG 合成経路とその阻害剤の一部を Fig. 2 に示す。

グラム陽性菌においては、PG 構造はさらに、炭化水素鎖を単位構造とするアニオンポリマー、wall teichoic acid(WTA) と lipoteichoic acid(LTA) による修飾を受けており、これらの構造は細胞表層の統合性の維持に非常に重要である。WTA はグリセロール-3-リン酸(Gro-P) もしくは リビトールリン酸の繰り返し構造から成り、GlcNAc-ManNAc 構造を根元に持っている。これらの構造は細胞質側で C55-P を足場として合成され、細胞外に運ばれた後共有結合的に PG に結合される【3】。これに対して LTA は、糖脂質ジグリコシルジアシルグリセロール(DGDG) をアンカーとして細胞膜に結合しており、グリセロールリン酸(Gro-P) のポリマーから成る構造のみが知られている。一般的に、WTA および LTA の Gro-P ポリマー構造は D-アラニンによる修飾を受けており、多くのバクテリアでは糖修飾も受けることがわかっている。WTA および LTA はリン酸に富む分子であり、PG 層にマイナスチャージを与えることで様々な細胞表層の必須な機能に影響を与えている【4】。

PG および WTA、LTA の構造維持および修飾はファージの認識、病原菌の病原性に関わるほか、バクテリアの細胞表層ストレス応答に重要な役割を果たしており、抗生物質のターゲットとしても注目され、非常に研究が盛んな分野である。実際に上で述べた WTA や LTA の D-アラニン修飾はカチオン性の抗生物質(CAMPs)によって促進され、そのアミノ基の存在により CAMPs に対する抵抗性を高める働きをしていることが明らかにされている【5】。また、枯草菌では、PG の O-アセチル化がリゾチーム耐性に寄与することが明らかにされているほか、機能は未知であるものの、WTA のグルコース修飾が起こっていることがわかっている【6,7】。枯草菌において明らかになっている細胞表層の修飾系について Fig. 3 に示した。このほかにも、様々なバクテリアにおいてストレス応答性の細胞表層修飾系が明らかにされてきており、ストレスに応じて細胞表層の統合性を維持することは非常に重要であることがわかる。

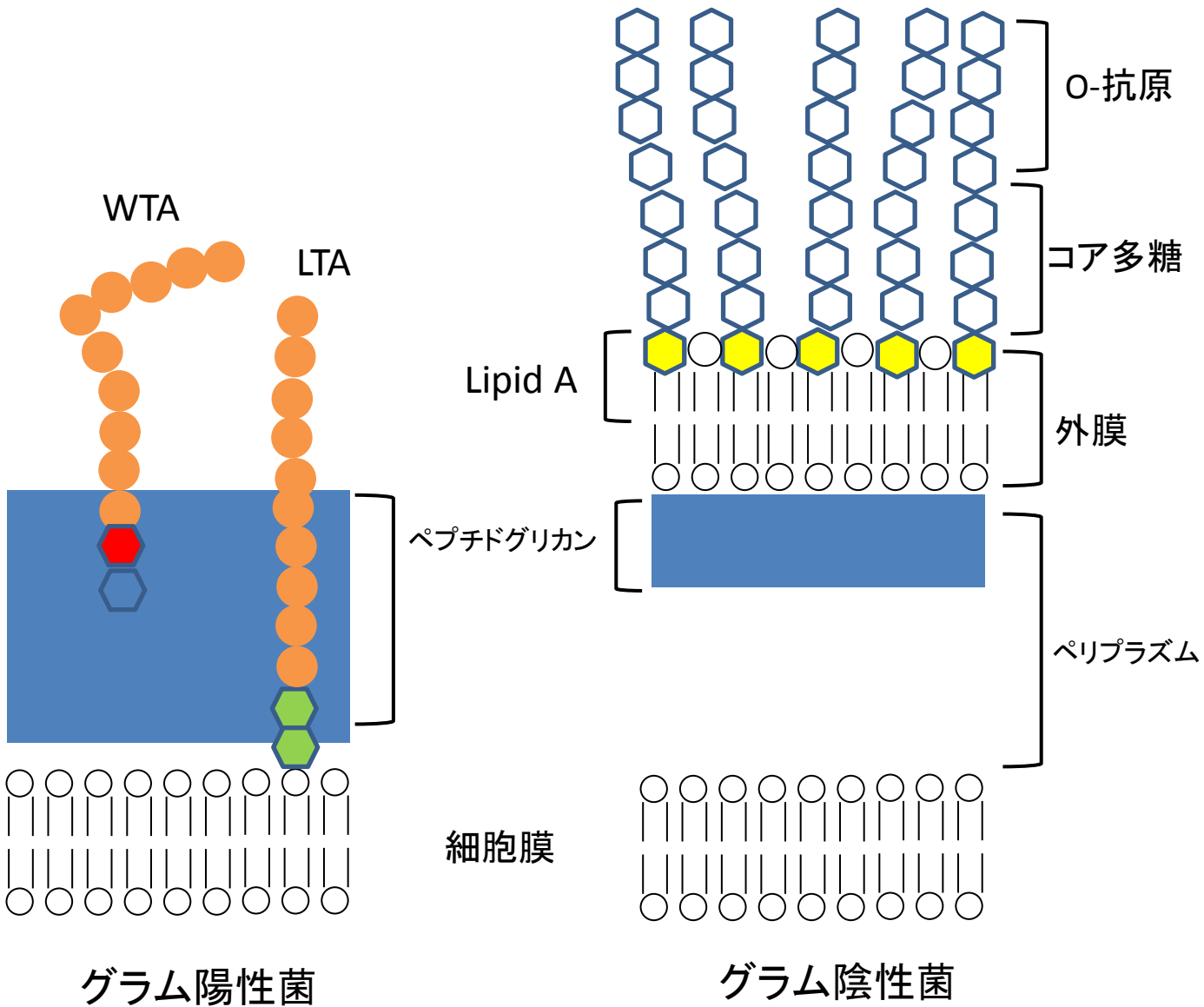


Fig. 1 バクテリアの細胞表層構造の模式図。

左がグラム陽性菌、右はグラム陰性菌の細胞表層構造を示す。; LTA, lipoteichoic acid; WTA, wall teichoic acid. 参考: Thomas J. Silhavy et. al., 2010

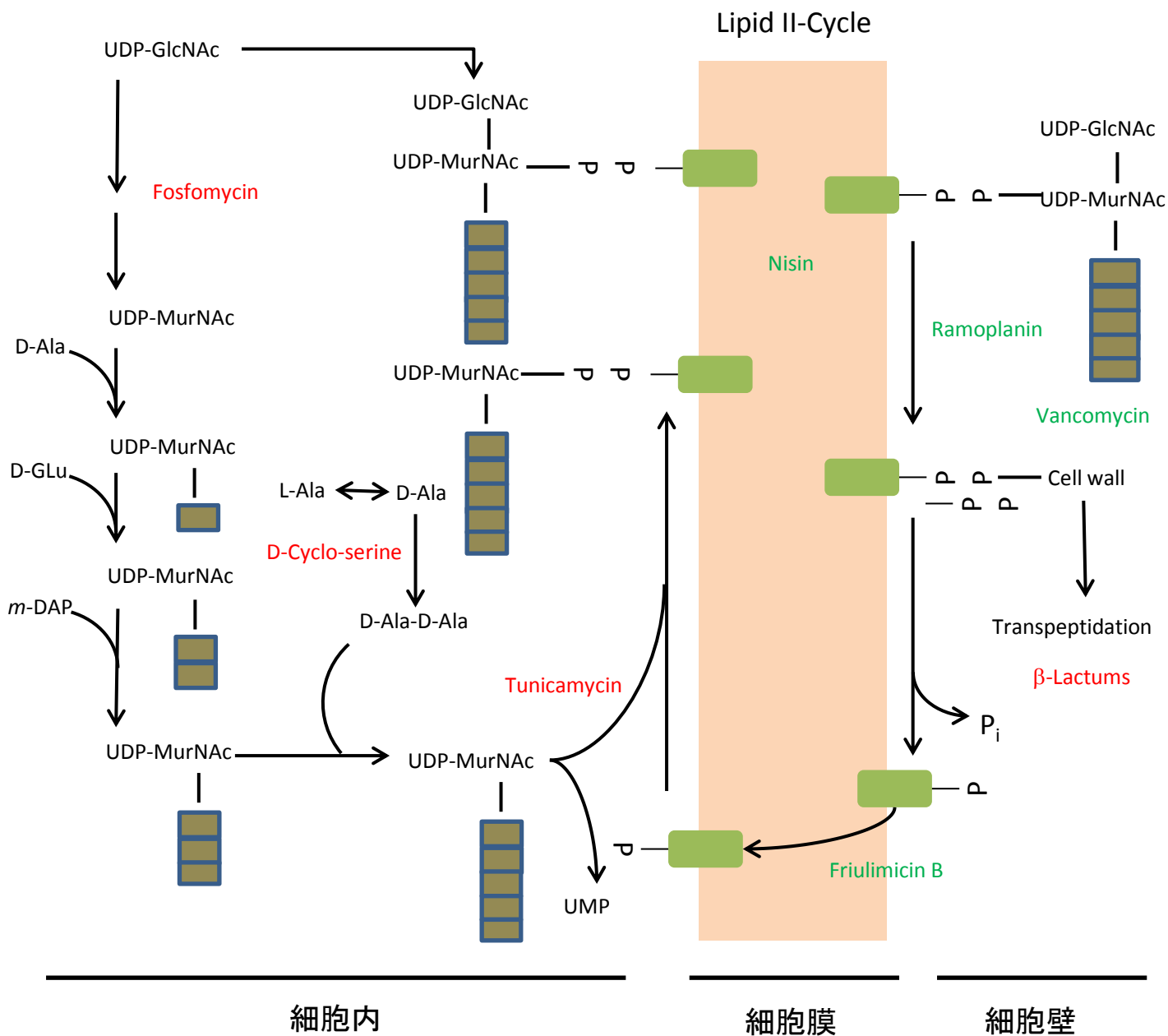


Fig. 2 グラム陽性菌のペプチドグリカン (PG) 生合成経路の模式図【37】。
 PG 合成の各ステップを阻害する抗生物質を図に示している。赤：Lipid II cycle に作用しない抗生物質。緑：Lipid II cycle に作用する抗生物質。

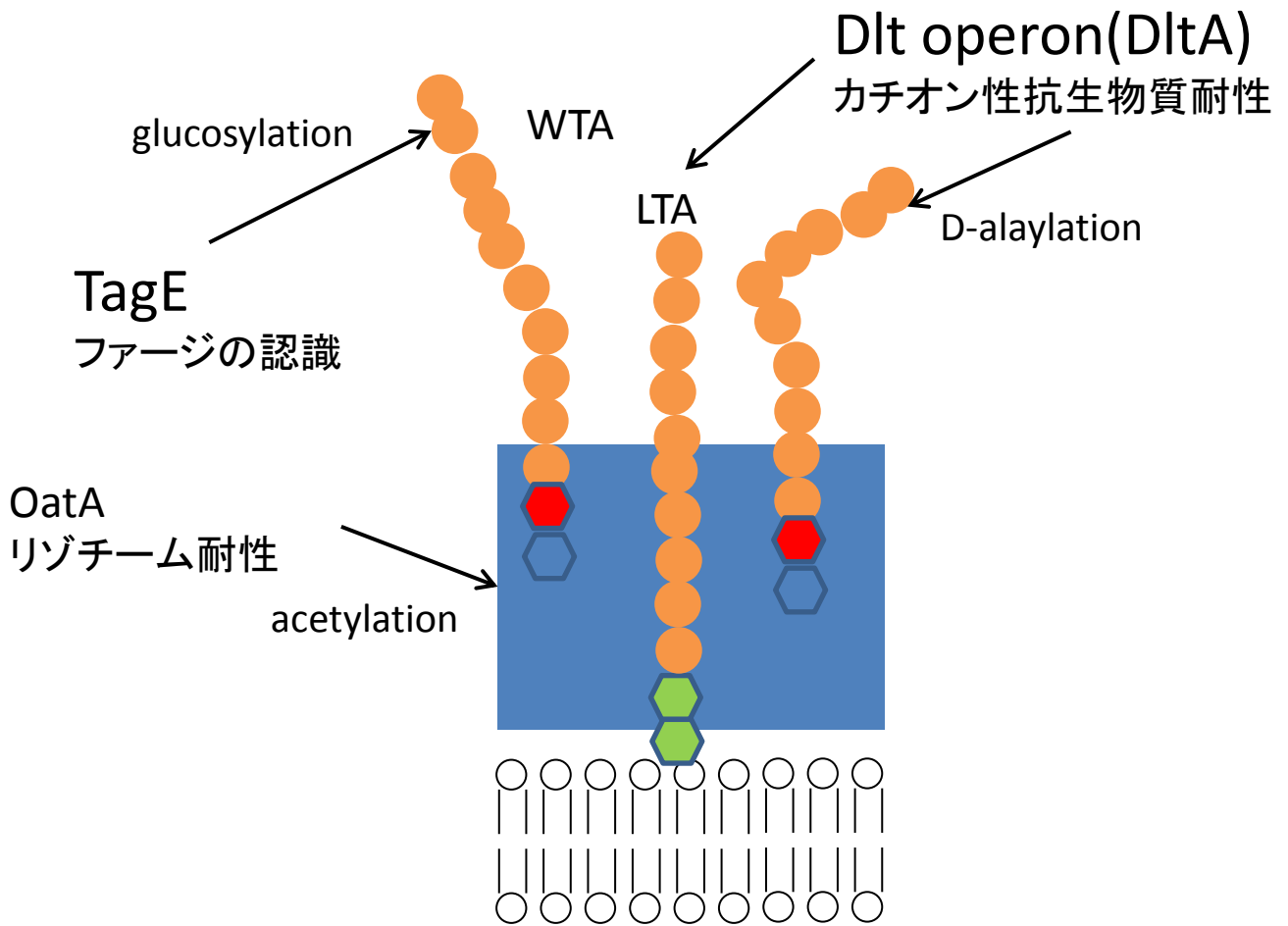


Fig. 3 バクテリアの細胞表層構造修飾系の模式図。

すでに明らかにされている枯草菌の細胞表層修飾とその機能および、それぞれの反応を触媒する酵素を示した。参考：Thomas J. Silhavy et. al., 2010

1-2. 枯草菌 ECF シグマ因子 SigM と細胞表層統合性

Extra-cytoplasmic-function (ECF) シグマ因子は、様々な環境変化に応答して活性化し、レギュロン遺伝子の転写を活性化することでストレス応答に寄与している。レギュロン遺伝子は特に細胞表層やペリプラズムに関連した機能を持つことが多く、細胞表層の統合性維持とかかわりが深い【8】。枯草菌では、現在までに7つの ECF シグマ因子が同定されている。7つの ECF シグマ因子が応答する細胞外ストレスを Table 1 に示した。7つの ECF シグマ因子の中で、SigM が細胞表層統合性に特に深い関係があるとされている【9】。枯草菌 SigM の発現と活性化は、酸、熱、塩、過酸化ストレスおよび細胞表層ストレスにより引き起こされる【10】。さらに、SigM のレギュロンには、LTA や WTA の合成系の遺伝子、イソプレノイド合成系の遺伝子などが含まれ、細胞表層に重要な機能を持つことが示唆されている【9,11】。また、近年 LTA 合成酵素の欠損により *sigM* 遺伝子の転写が活性化されるという報告がなされた【12】。これらの事実から、枯草菌 SigM の活性化は、細胞表層統合性の維持と密接に関係していると思われる。そこで本研究では、枯草菌 SigM の活性制御機構を解明することで、枯草菌の細胞表層統合性維持機構について新たな知見を得ることを目的とした。

Table 1. 枯草菌のECF シグマ因子と応答するストレス

σ 因子	応答するストレス条件
σ^M	高塩 熱 エタノール 酸 細胞壁合成阻害剤 過酸化ストレス 界面活性剤
σ^V	高塩 熱 リゾチーム
σ^W	高塩 アルカリ 抗生物質 酸化ストレス
σ^X	細胞壁抗生物質 CAMPs
σ^Y	窒素飢餓
σ^Z	高塩
σ^{ylaC}	酸化ストレス

Thackray PD *et al.*, J Bacteriol. ,2003

Guariglia-Oropeza V, Helmann JD J. Bacteriol 2011

1-3. 枯草菌 SigM の活性制御系について

ECF シグマ因子は一般的に膜タンパク質であるアンチシグマタンパク質と直接相互作用することでその活性を負に制御されており、細胞がストレスを感知するとアンチシグマタンパク質から解離して活性化し、RNA ポリメラーゼコア酵素と結合してホロ酵素を形成してレギュロン遺伝子の転写を活性化することが知られている。枯草菌 SigM は2つのタンパク質 YhdL と YhdK によってその活性を負に制御していることが知られており【13】、両者とも膜タンパク質であると予測されている。また、酵母ツーハイブリッド法を用いたタンパク質相互作用解析では、SigM と直接結合するアンチシグマタンパク質は YhdL であり、YhdK は YhdL と相互作用することで間接的に SigM 活性を負に制御していることが示されている【14】。しかしながら、SigM またはアンチシグマがどのようにして細胞外ストレスを感知するのか、またストレスを感知した際、どのようなメカニズムで SigM がアンチシグマから解き放たれるのかといった SigM の活性制御機構については研究が進んでいない。

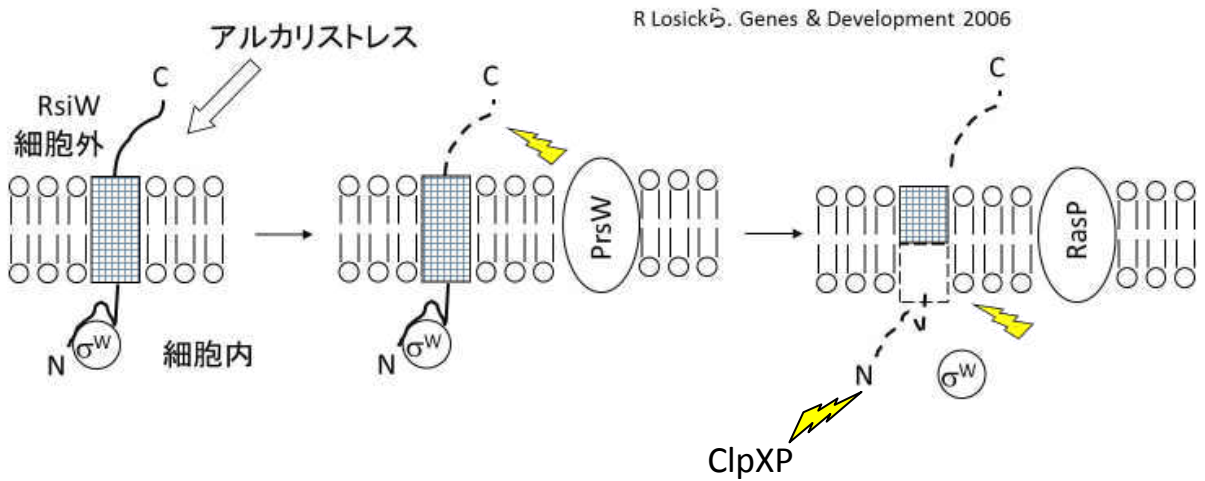
SigM 以外の ECF シグマ因子については、活性制御系が明らかにされているものがいくつか存在する。鉄を感知する大腸菌 FecI の場合は外膜タンパク質 FecA に鉄-クエン酸複合体が結合することで FecA のペリプラズム側の構造が変化し、この部分が内膜タンパク質であるアンチシグマ FecR のペリプラズム側領域と疎水性相互作用を持つことがシグナルとなり、FecR の細胞質側の領域がプロテアーゼにより切断され、これにより FecR の細胞質側領域と相互作用する FecI が活性化する【15】。酸化ストレスを感知する放線菌の SigR の場合はアンチシグマタンパク質 RsrA に存在する HCC motif が活性制御に関わっており、酸化ストレスにより RsrA 分子の Cys-Cys 間に分子内 S-S 結合が生じてタンパク質のコンフォメーションが変化し、SigR との結合を保てなくなり、SigR が活性化する【16】。大腸菌 FecI のケースではアンチシグマではない FecA がストレスの感知を行っており、放線菌 SigR のケースではアンチシグマが直接ストレスを感知している。

枯草菌 ECF シグマ因子については前述のように7つが知られているが、このうち SigW についてはある程度活性制御機構が明らかになっている。SigW はアルカリストレスを感知して活性化するが、このときアンチシグマタンパク質 RsiW は PrsW および RasP という膜局在型プロテアーゼにより細胞の外側、内側の順に2段階に分解され、さらに切断された細胞の内側の領域は複数のプロテアーゼによって分解を受けることで SigW の活性化が起こる(Fig. 4-A) および【17】。このとき、アルカリストレス下で Western blotting によりアンチシグマタンパク質 RsiW の細胞内の量が減少し、分解産物が検出されている(Fig. 4-B)。枯草菌 SigW の系で最初にアルカリストレスを感知する因子が何であるかはまだ明らかにされていない。

本研究ではこれらの事実を参考に枯草菌 SigM の活性制御機構の解析を行うこととした。前半では SigW の系を参考に、SigM とアンチシグマタンパク質の関係について、アンチシグマ YhdL にエピトープタグを付加して Western blotting により解析することで解明しようと試みた。研究の後半では、トランスポゾンミュータジェネシスを用いて SigM 活性に影響を与える未知の因子を広範に探索することを試みた。SigM 活性に影響を与える未知の因子が見つければ、それは SigM ないしアンチシグマの活性を制御する因子もしくは SigM のストレス感知に関与する因子であることが期待されるほか、前述のように SigM は細胞表層統合性維持に深い関わりを持つことから、細胞表層統合性維持機構についても新たな知見が得られる可能性がある。さらに、SigM が活性化するストレスはよく知られるが、何が SigM 活性化の真のシグナルであるかは明らかでないため、SigM 活性に影響を与える条件を探索することは SigM 活性化シグナルの詳細な解析にもつながる。

本論文では、SigM-アンチシグマ系による活性制御について今までに知られていない活性制御系を持つことを示唆しているほか、トランスポゾンミュータジェネシスにより探索した因子の1つについて詳細に解析することにより枯草菌の細胞表層統合性維持機構に寄与する新たなストレス応答機構の存在、および SigM の活性化シグナルについて議論する。

A.



B.

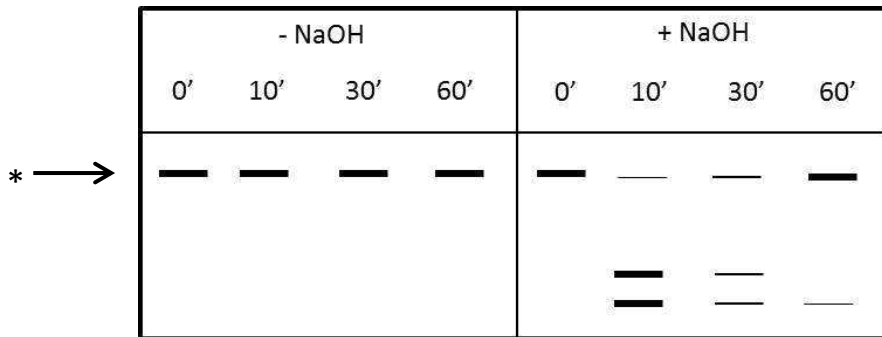


Fig. 4 枯草菌 SigW の活性制御系。

(A) 明らかにされているアルカリストレスによる SigW 活性化機構の模式図。アルカリストレスを細胞が感知すると、アンチシグマタンパク質 RsiW が膜局在型プロテアーゼによって二段階に切断され、その後細胞質プロテアーゼである ClpXP によって分解される。

(B) RsiW 分解産物の Western blotting による検出イメージ。*: RsiW 全長。

参考: T. Wiegertら Molecular Microbiology 2004

2. 方法と材料

2-1. 使用菌株、DNA および生育条件

本研究で使用した株、プラスミド、プライマーそれぞれ Table 2、3、4 に示した。プライマーの作成はグライナー・ジャパンに依頼した。細菌の培養は液体 LB 培地で振とうしながら、あるいは 1.5 % agar (国産化学) を含む LB プレート上で 37°C で行った。必要に応じて以下の抗生物質を添加した。枯草菌に対しては、spectinomycin (Sp), 100 µg/ml; neomycin (Nm), 5 µg/ml; chloramphenicol (Cm), 5 µg/ml; erythromycin (Em), 0.5 µg/ml, 大腸菌に対しては、ampicillin (Ap), 50 µg/ml; kanamycin 50 µg/ml を用いた。枯草菌からの DNA 抽出法、大腸菌からのプラスミド調製、PCR 反応は慣例に従って行った。

2-2. 枯草菌の形質転換

枯草菌を CI 培地(CII 培地 + 0.11 % casamino acid、0.05 % yeast extract、0.005 % L-tryptophan) に植菌して培養し、37 °Cで振とう培養し、O.D.600 = 0.9 付近で等量の CII 培地(14 % $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 、6 % KH_2PO_4 、1 % trisodium citrate $\cdot 5H_2O$ 、2 % glucose、11 µg/ml ferric ammonium citrate、2.5 mg/ml potassium asparatate、3 mM $MgSO_4$)を加えて 37 °Cで 1 h 振とう培養した後、培養液 300 µl を分取して供与 DNA を添加し、1 h 以上 37 °C でインキュベート後、30 µl を選択マーカを含む LB 寒天培地にスプレッドした。37 °Cで一晩培養して transformants を得た。

2-3. 大腸菌の形質転換

大腸菌を LB 培地で O.D.600 = 0.5 付近まで培養し、集菌して培養液の 1/10 量の NTS (LB 培地 + 30 mM $MgCl_2$ 、10 % PEG1500) に懸濁し、氷上に 10 min 以上静置後、供与 DNA を加えて氷上 10 min、25 °C 10 min、氷上 10 min 処理し、10 倍量の LB 培

Table 2 本研究で使用した菌株

Strain	Relevant genotype	Reference or source
B. subtilis strains		
168	trpC2	lab stock T.Morimoto,et al.,Genes Genet. Syst. (2009) 84, p.315-318
TMO310	trpC2 aprE::spc lacI Pspac-mazF	K. Kosono, et al., FEMS Microbiol. Lett. 232 (2004) 93-井上 修論(2009) 上原 修論(2006)
BSU41	trpC2 amyE :: PsigM'-lacZ cat	FEMS Microbiol. Lett. 232 (2004) 93-井上 修論(2009) 上原 修論(2006)
His-yhdL PsigM-lacZ FLAG-yhdK PsigM-lacZ PsigM'-bgaB	trpC2 Pspac-his-yhdLerm::spc PsigM-lacZ trpC2 Pspac-his-yhdLerm::spc PsigM-lacZ trpC2 amyE :: PsigM'-bgaB cat	
YABHp YACMp	trpC2 gtaB ::lacZ lacI bla erm Pspac-gtaB trpC2 ispE ::lacZ lacI bla erm Pspac-ispE trpC2 ispD ::lacZ lacI bla erm Pspac-ispDF	lab stock lab stock H.Yamamoto,et al,
HY1055	trpC2 tagB' ::lacZ lacI bla erm Pspac-tagB	Molecular Microbiology (2008) 70(2) 297-310 H.Yamamoto,et al,
HY1056	trpC2 tagF' ::lacZ lacI bla erm Pspac-tagF	Molecular Microbiology (2008) 70(2) 297-310 H.Yamamoto,et al,
MH1023	trpC2 tagO ::lacZ lacI bla erm Pspac-tagO	Molecular Microbiology (2008) 70(2) 297-310
HRI001 57F	trpC2 amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm trpC2 yfhO::Tn 10	This study 上原 修論(2006) K. Asai, et al., J. Bacteriol. 190, (2008) 2633-2636.
ASK2001	trpC2 sigM :: cat	This study
HRI002	trpC2 ΔcsbB	This study
HRI003	trpC2 ΔyfhO	This study
HRI004	trpC2 ΔcsbB-yfhO	This study
HRI005	trpC2 ΔcsbB PsigM'-lacZ cat :: erm	This study
HRI006	trpC2 ΔyfhO PsigM'-lacZ cat :: erm	This study
HRI007	trpC2 ΔcsbB-yfhO PsigM'-lacZ cat :: erm	This study
HRI008	trpC2 amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05	This study
HRI009	trpC2 ΔcsbB amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05	This study
HRI010	trpC2 ΔcsbB-yfhO amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05	This study
HRI011	trpC2 amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-csbB	This study
HRI012	trpC2 ΔcsbB amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-csbB	This study
HRI013	trpC2 ΔcsbB-yfhO amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-csbB	This study
HRI014	trpC2 ΔcsbB-yfhO amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-csbBFLAG	This study
HRI015	trpC2 ΔcsbB-yfhO amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-csbBFLAG D97A	This study
HRI016	trpC2 ΔcsbB-yfhO amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-csbBFLAG D44A	This study
HRI017	trpC2 amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-ASD-csbB	This study
HRI018	trpC2 ΔcsbB amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-ASD-csbB	This study
HRI019	trpC2 ΔcsbB-yfhO amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-ASD-csbB	This study
HRI020	trpC2 amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-gtrB	This study
HRI021	trpC2 ΔcsbB amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-gtrB	This study
HRI022	trpC2 ΔcsbB-yfhO amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-gtrB	This study
HRI023	trpC2 amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-ASD-gtrB ^N -csbB ^C	This study
HRI024	trpC2 ΔcsbB amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-ASD-gtrB ^N -csbB ^C	This study
HRI025	trpC2 ΔcsbB-yfhO amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-ASD-gtrB ^N -csbB ^C	This study
HRI026	trpC2 amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-ASD-csbB ^N -gtrB ^C	This study
HRI027	trpC2 ΔcsbB amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-ASD-csbB ^N -gtrB ^C	This study
HRI028	trpC2 ΔcsbB-yfhO amyE :: PsigM'-lacZ cat :: erm pHCMC05-ASD-csbB ^N -gtrB ^C	This study
HRI029	trpC2 tagB' ::lacZ lacI bla erm Pspac-tagB PsigM-bgaB cat	This study
HRI030	trpC2 tagF' ::lacZ lacI bla erm Pspac-tagF PsigM-bgaB cat	This study
HRI031	trpC2 tagO ::lacZ lacI bla erm Pspac-tagO PsigM-bgaB cat	This study
HRI032	trpC2 ispE ::lacZ lacI bla erm Pspac-ispE PsigM-bgaB	This study
HRI033	trpC2 ispD ::lacZ lacI bla erm Pspac-ispDF PsigM-bgaB	This study
HRI034	trpC2 gtaB ::lacZ lacI bla erm Pspac-gtaB PsigM-bgaB	This study
HRI035	trpC2 ΔyfhO Pspac-his-yhdLerm::spc PsigM-lacZ ::cat	This study
HRI036	trpC2 ΔyfhO Pspac-flag-yhdKerm::spc PsigM-lacZ ::cat	This study
HRI037	trpC2 sigM :: cat :: neo PsigM-lacZ ::cat lacI :: pAX01erm xylR PxylA	This study
HRI038	trpC2 sigM :: cat :: neo PsigM-lacZ ::cat lacI :: erm xylR PxylA-sigM-his-yhdL	This study
HRI039	trpC2 sigM :: cat :: neo PsigM-lacZ ::cat lacI ::erm xylR PxylA-sigM-his-yhdL-yhc	This study
E. coli strain		
JM109	endA1 glnV44 thi -1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB ⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZAM15] hsdR17 (r _K m _K ⁺)	lab stock
C600	F ⁻ tonA21 thi -1 thr -1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ ⁻	lab stock
BTH101	F ⁻ , cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str r), hsdR2, mcrA1, mcrB1.	EUROMEDEX

抗生物質耐性遺伝子は次のように示す。erm, erythromycin; spc, spectinomycin; cat, chloramphenicol; kan, kanamycin; bla ampicillin.

Plasmids	Relevant characteristics	Reference or source
Table 3	本研究で使用したプラスミド	
pAPNC213-mazF		Morimoto T et al., (2009) Genes Genet Syst. 84 (4) : 315 - 318.
pHCMC05	shuttle vector; replicative in bacillus subtilis, Pspac promoter SD sequence; cat	H.D. Nguyen et al. Plasmid 54 (2005) 241-248.
pHCMC05-csbB	pHCMC05 derivative carrying csbB gene and its SD sequence	This study
pHCMC05-csbB DxA	pHCMC05 derivative carrying csbB gene with D97A point mutation and its SD sequence	This study
pHCMC05-csbB D44A	pHCMC05 derivative carrying csbB gene with D44A point mutation and its SD sequence	This study
pHCMC05-csbB FLAG	pHCMC05 derivative carrying csbB gene FLAG-tagged at C-terminus and its SD sequence	This study
pHCMC05-csbB FLAG DxA	pHCMC05 derivative carrying csbB gene FLAG-tagged at C-terminus with D97A point mutation and its SD sequence	This study
pHCMC05-csbB FLAG D44A	pHCMC05 derivative carrying csbB gene FLAG-tagged at C-terminus with D44A point mutation and its SD sequence	This study
pHCMC05-ΔSD-csbB	pHCMC05 derivative carrying csbB gene without its SD sequence	This study
pHCMC05-gtrB	pHCMC05 derivative carrying E. coli gtrB gene	This study
pHCMC05-gtrB ^N -csbB ^C	pHCMC05 derivative carrying chimeric gene composed of N-terminus of E. coli gtrB gene and C-terminus of csbB gene with SD sequence of csbB	This study
pHCMC05-ΔSD-gtrB ^N -csbB ^C	pHCMC05 derivative carrying chimeric gene composed of N-terminus of E. coli gtrB gene and C-terminus of csbB gene without SD sequence of csbB	This study
pHCMC05-csbB ^N -gtrB ^C	pHCMC05 derivative carrying chimeric gene composed of N-terminus of csbB gene and C-terminus of E.coli gtrB gene with SD sequence of csbB	This study
pHCMC05-ΔSD-csbB ^N -gtrB ^C	pHCMC05 derivative carrying chimeric gene composed of N-terminus of csbB gene and C-terminus of E.coli gtrB gene without SD sequence of csbB	This study
pUT18	derivative of the high copy number vector pUC19, ampicillin resistant, harboring T18 fragment of CyaA at downstream of MCS	EUROMEDEX
pUT18C	derivative of the high copy number vector pUC19, ampicillin resistant, harboring T18 fragment of CyaA at upstream of MCS	EUROMEDEX
pKT25	derivative of the low copy-number plasmid pSU40, kanamycin resistant, harboring T25 fragment of CyaA at upstream of MCS	EUROMEDEX
pKNT25	derivative of the low copy-number plasmid pSU40, kanamycin resistant, harboring T25 fragment of CyaA at downstream of MCS	EUROMEDEX
pUT18C-sigM	pUT18C derivatives carrying coding region of sigM gene	鈴木 修論(2010)
pKT25-sigM	pKT25 derivatives carrying coding region of sigM gene	鈴木 修論(2010)
pKNT25-sigM	pKNT25 derivatives carrying coding region of sigM gene	鈴木 修論(2010)
pUT18C-yhdL	pUT18C derivatives carrying coding region of yhdL gene	鈴木 修論(2010)
pKT25-yhdL	pKT25 derivatives carrying coding region of yhdL gene	鈴木 修論(2010)
pKNT25-yhdL	pKNT25 derivatives carrying coding region of yhdL gene	鈴木 修論(2010)
pUT18-yhdK	pUT18 derivatives carrying coding region of yhdK gene	鈴木 修論(2010)
pKT25-yhdK	pKT25 derivatives carrying coding region of yhdK gene	鈴木 修論(2010)
pKNT25-yhdK	pKNT25 derivatives carrying coding region of yhdK gene	鈴木 修論(2010)
pUT18-yfhO	pUT18 derivatives carrying coding region of yfhO gene	鈴木 修論(2010)
pKT25-yfhO	pKT25 derivatives carrying coding region of yfhO gene	鈴木 修論(2010)
pKNT25-yfhO	pKNT25 derivatives carrying coding region of yfhO gene	鈴木 修論(2010)
pUT18-csbB	pUT18 derivatives carrying coding region of csbB gene	This study
pKT25-csbB	pKT25 derivatives carrying coding region of csbB gene	This study
pKNT25-csbB	pKNT25 derivatives carrying coding region of csbB gene	This study
pAX01	ectopic integration vector, harboring xylose inducible promoter PxylA and gene encoding its repressor xylR, erm and integrated within lacA gene in B. subtilis cell	Hartl, B., et al. (2001) J. bacteriol 183 : 2696-2700
pAX01-sigM-yhdL	pAX01 derivatives carrying B.subtilis sigM operon with SD sequence without yhdK gene	This study
pAX01-sigM-yhdL-yhdK	pAX01 derivatives carrying B.subtilis sigM operon with SD sequence	This study
pAX01-sigM-his-yhdL	pAX01 derivatives carrying B.subtilis sigM operon with SD sequence, yhdL gene his-tagged at its N-terminus and without yhdK gene	This study
pAX01-sigM-his-yhdL-yhdK	pAX01 derivatives carrying B.subtilis sigM operon with SD sequence and yhdL gene his-tagged at its N-terminus	This study

Table 4

本研究で使用したプライマー

Primer name	Sequence (5' --> 3')
Tn inverse-F	GCATGCTTCAAAGCCTGTTCGG
Tn inverse-R	CTCTAATTTACACAAGAGGACGC
csbB_DF1	GCCCCGATATACCGGAGGC
csbB_DR1	tgtcagacgccgatctTCCTTGCTTCATTAAGGCACC
csbB_DF2	AGCATGCGGCGTCTGACA
csbB_DR2	ctgattggtaggatccgcgGCACAAGCAGCGGAAGCC
csbB_1F	gagtcaattccgctgctgTTGGCAGCGACGTGCAGC
csbB_1R	CCCAGGCACAGAAATACC
yfhO_DF1	GACGGTGTTCGGTACTTC
yfhO_DR1	gtctcccttttgcgcttCAGCAAACCTGGCCGCATA
yfhO_DF2	AAGGCGCAAAGGGAGAC
yfhO_DR2	ctgattggtaggatccgcgGTTGCGCTCGGGCTGATT
yfhO_1F	gagtcaattccgctgctgGGCTTCAGCGCGTATTCC
yfhO_1R	GGCCTGATTTAGGCACTC
csbByfhO_DR1	gtctcccttttgcgcttTCCTTGCTTCATTAAGGCACC
pAPNC-F(univ)	CGACAGCGGAATTGACTCAAGC
chpA-R(Bam)	CGCGGATCCTACCCAATCAGTACGTTAATTTTG
chpA1-rev	gcgatgTAGATGTTCTAGTCGTCG
chpA2-for	cgacgACTAGAACATCTACATCGC
csbB-SD-F(Sal Bam)	gtcagcgatccGAATAATAAAAAGAAGGTGCC
csbB-R(Bam Sal Sma)	ggatccgtcgaccgggCGCTTGGTATTTTCAGTG
gtrB-F	ggatccATGAAGATATCTCTTGTAATTC
gtrB-R	ggatccgggTCATTTTTTACTCTCTTAATG
csbB-DxA(D97A)-F	GccCTGCAGCATCCGACATATTTGCT
csbB-DxA(D97A)-R	GGCATCCATGACAATAACCGCC
csbB-D44A-F	GcgGGAAGTGTTGATGACACGCTTCA
csbB-D44A-R	GTTTTATGAAGAATATTTTCATAGTCATAATGAATG
csbB-inverse-F1	TGTTTTTATACAGGCATTTTCATCC
csbB-SD-inverse-R	TAAGGCACCTTCTTTTTATTATTC
gtrB-N-SLiCE-F	gaataataaaaagaagtgcttaATGAAGATATCTCTTGTAATTC
gtrB-N-SLiCE-R1	ggatgaaaatgcctgtataaaaacaGATGCGAAGAGGGAATGTGG
pHCMC05-inverse-F	CCCGGGCAGCCC GCCTAAT
csbB-inverse-R1	TAATCTCAGCGGCTTATG
gtrB-C-SLiCE-F1	cataagccgctgagattaTGGACATACATAGGGTTAG
gtrB-C-SLiCE-R	attagccgggctgccccggTCATTTTTTACTCTCTTGATG
csbB-FLAG-inverse-F	gattataaagatgatgataaaTGAAAATACCAAGCGCCCCGGG
csbB-tag-inverse-R	GTGCATTTTTGTCAGACGCC
csbB-F(Bam)	ggatccATGAAGCAAGGATTAATCTCG
pHCMC05-R(delta Bam)	TCACCTCCTTAAGCTTAATTG
csbB-BACTH-F	ggaggatcccATGAAGCAAGGATTAATCTCG
csbB-BACTH-R	ggtggtaccGGTGCATTTTTGTCAGACGCC
pAX01-inverse-F	TCCCATTTCCCCCTTTGA
pAX01-inverse-R	TCCGAGCTCCCCGCGGCG
sigM-SD-pAX-F	aatcaagggggaaatgggaGTGTATAACATAGAGGGG
yhdL-pAX-R	tgcggccgcccgggagctcggaCTTACCAGTTCCATAATTCCACC
yhdK-pAX-R	tgcggccgcccgggagctcggaCGCCTGAAAAGGCGTCTT
yhdLHis-F	atgaatgaacatcacatcacatcATGAATGAAGAATTTAAAAAGCGTTTTGATC
yhdLHis-R	CATTAACACCTCTATTATAAAGTGC

tag 配列もしくは変異導入部位は小文字で示した。

地を加えて 37 °Cで 1 h インキュベート後、選択マーカーを含む LB 寒天培地にスプレッドした。37 °Cで一晩インキュベートして transformants を得た。

2-4. YhdL の細胞内挙動における YhdK の影響を解析するための枯草菌株の作成

pAX01-sigM-his-yhdL および pAX01-sigM-his-yhdL-yhdK のプラスミドは、SLiCE(Seamless Ligation Cloning Extract) システムを用いて作成した【19】。枯草菌ゲノム DNA を鋳型として、SD 配列を含む *sigM* オペロンの全長を sigM-SD-pAX-F and yhdK-pAX-R のプライマーペアを用いて PCR で増幅した。また、yhdK を除いた sigM オペロンを sigM-SD-pAX-F and yhdL-pAX-R のプライマーペアを用いて PCR で増幅した。一方、プラスミド pAX01 を鋳型として、pAX01-inverse-F and pAX01-inverse-R のプライマーを用いて inverse PCR を行い、プラスミドをリニア化した。SLiCE システムにより、リニア化した pAX01 にそれぞれの *sigM* オペロンの断片を導入し、それぞれ pAX01-sigM-yhdL-yhdK および pAX01-sigM-yhdL のプラスミドを得た。得られた2つのプラスミドを鋳型として、yhdLHis-F and yhdLHis-R のプライマーペアを用いて inverse PCR を行った。得られた PCR 断片を T4 polynucleotide kinase(New England Biolabs) でリン酸化し、ligation kit(TAKARA) を用いてセルフライゲーションした後、大腸菌に形質転換し、pAX01-sigM-his-yhdL-yhdK および pAX01-sigM-his-yhdL のプラスミドを得た。得られたプラスミドおよび pAX01 を本来の *sigM* オペロン をネオマイシン耐性遺伝子カセットで破壊した枯草菌株に導入し、それぞれ HRI039, HRI038 と HRI037 を得た。

2-5. β -gal assay および Western blotting

lacZ fusion または *bgaB* fusion を持つ枯草菌株を LB 培地で培養し、各株ごとの条件に従ってサンプリングし、 β -gal assay に用いた。サンプリングした菌体を Z-buffer (60

mM Na₂PO₄、40 mM NaH₂PO₄、10 mM KCl、1 mM MgSO₄、50 mM 2-メルカプトエタノール) 700 μl に懸濁し、50 ml のトルエンを加えてボルテックスで激しく混合して菌体を破碎した。200 ml の 4 mg/ml o-nitrophenyl-β-galactoside (ONPG) を加えて、*lacZ* fusion の場合は 28 °C、*bgaB* fusion の場合は 62 °C でインキュベートし、1 M Na₂CO₃ を加えて反応を停止させた。反応後の液体の O.D.420 を HITACHI U-1800 分光光度計で測定し、活性は $O.D.420(\text{反応液}) * 1000 / O.D.600(\text{培養液}) / \text{min}(\text{反応時間}) / \text{ml}(\text{培養液})$ の式に従って求めた。

Western blotting は、下層 12 %、上層 5 % のポリアクリルアミドゲルでタンパク質を分離し、慣例に従った方法で行った。枯草菌株を LB 培地で培養し、各条件に従って 5 ml の菌体をサンプリングした菌体を 250 μl のソニケーションバッファー(50 mM Tris-HCl pH 8.0) に懸濁し、0.2 mg/ml のリゾチームと 1 mM の PMSF を加えてソニケーション後、7,000 rpm, 5 min, 4 °C で遠心して残渣を除き、上清に等量の 2×SDS バッファー(125 mM Tris-HCl(pH6.8)、4 % SDS、20 % グリセロール、0.2 mg BPB)を加えたものをサンプルとし、培養液の O.D.600 = 1 あたり 10 μl をゲルにロードした。FLAG-tag の場合は抗 FLAG-抗体(Sigma) を一次抗体として用い、His₆-tag の場合は抗 His₆-tag 抗体(Novagen) を一時抗体として用い、二次抗体には goat anti-mouse HRP(sigma)を用いた。検出は ECL plus または advance detection kit(GE Helthcare) を用いて行った。SigA の検出は 抗 SigA 抗体を一次抗体、goat anti-rabbit HRP(sigma) を用いた。

2-6. 枯草菌の膜画分の調製

ソニケーション後、残渣を除いたタンパク質溶液 (Total protein 画分とする) を 100,000 × g, 4 °C、1 h で超遠心し、上清と沈殿に分けた。上清を Soluble 画分とした。ペレットを最初ソニケーション液の容量と等量のソニケーションバッファー(1 mM PMSF を含む) に懸濁し、もう一度 100,000 × g, 4 °C、1 h で超遠心して Wash した。上清を Wash

画分とした。ペレットに最初のソニケーション液と等量の 0.08 % SDS を加えたソニケーションバッファーに溶解し、Membrane 画分として SDS-PAGE、Western blotting に用いた。

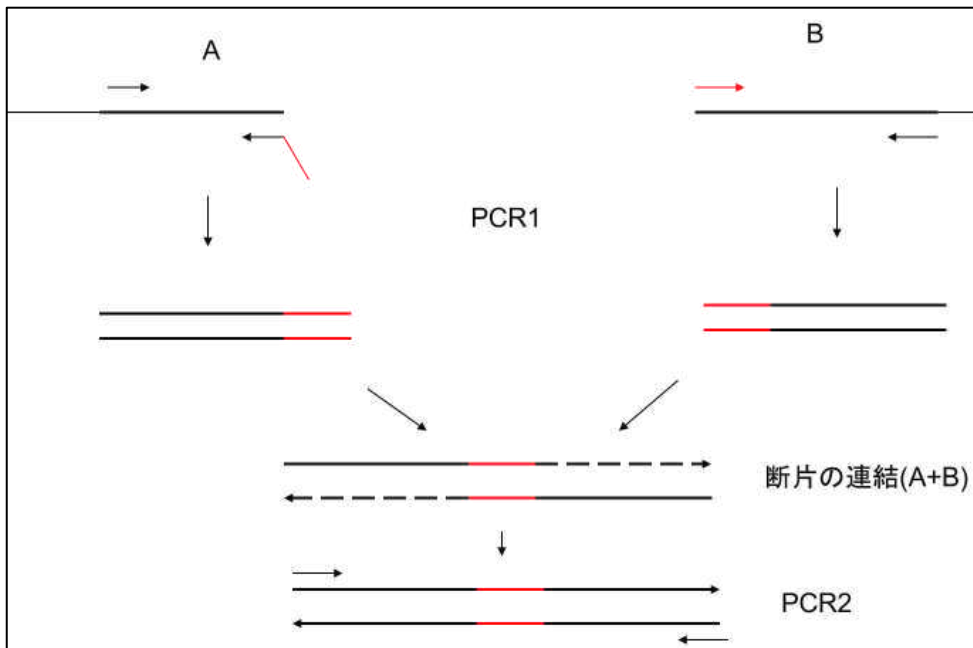
2-7. トランスポゾン導入部位の決定

候補株からゲノム DNA を抽出し、*Hind*III で制限酵素処理し、ligation kit(TAKARA) を用いてセルフライゲーション反応を行い、トランスポゾン内に含まれる *ColE1* オリジンと β -lactamase 遺伝子を指標にして大腸菌に形質転換し、トランスポゾンと隣接した枯草菌ゲノム DNA 領域を含むプラスミドを回収した。または、候補株のゲノム DNA を抽出し、*Pst*I で制限酵素処理し、セルフライゲーション後、Tn-inverse_F と Tn-inverse_R のプライマーを用いて inverse PCR により隣接領域を含む断片を回収し、DNA シークエンシングにより隣接するゲノム DNA 配列を決定した。

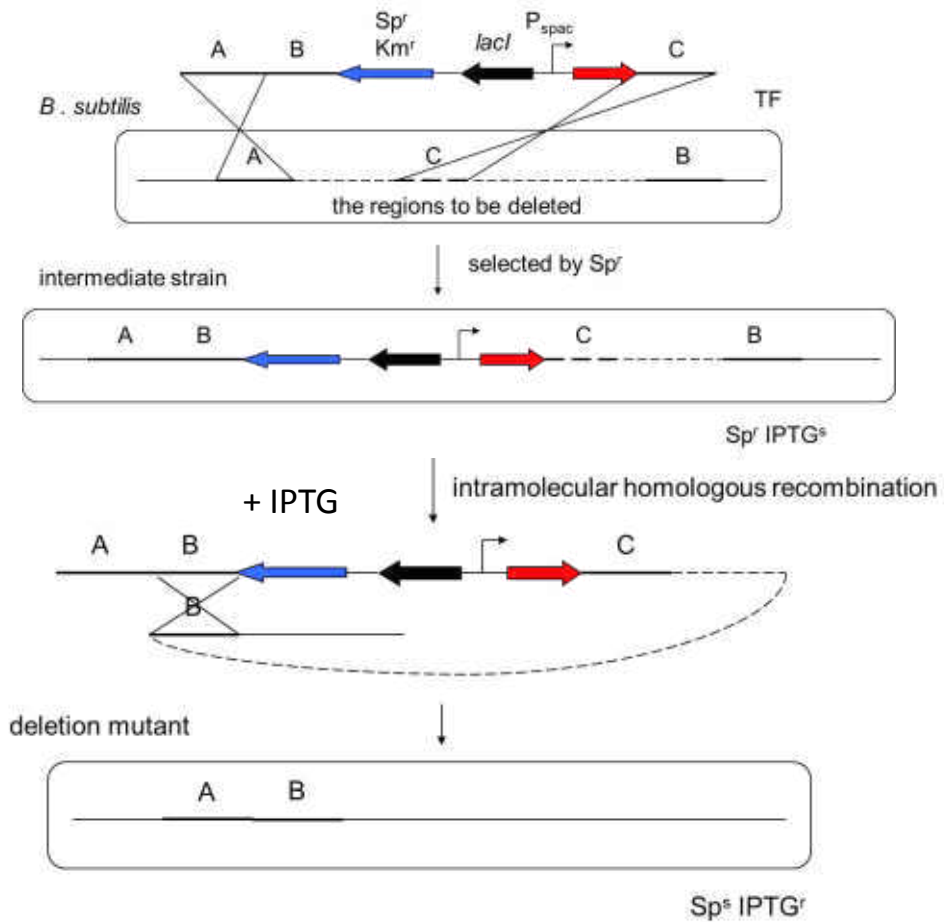
2-8. deletion mutant の作成

csbB、*yfhO*、および *csbB-yfhO* 二重破壊の in-frame deletion 株の作成は以下論文を参考に行った【18】。その原理を Fig. 5-A & B に示す。どの場合もはじめに、枯草菌のゲノム DNA を鋳型として3つの DNA 断片を PCR により増幅した(A) 破壊したい遺伝子上流領域 (*csbB_DF1* and *csbB_DR1*, *yfhO_DF1* and *yfhO_DR1*, *csbB_DF1* and *csbByfhO_DR1* のプライマーペアを用いた)、(B) 下流領域 (*csbB_DF2* and *csbB_DR2*, *yfhO_DF2* and *yfhO_DR2*, *yfhO_DF2* and *yfhO_DR2* のプライマーペアを用いた)、(C) 遺伝子内領域 (*csbB_1F* and *csbB_1R*, *yfhO_1F* and *yfhO_1R*, *yfhO_1F* and *yfhO_1R* のプライマーペアを用いた)。枯草菌 TMO310 のゲノム DNA を鋳型として MazF をコードするカセットを pAPNC-F and *chpA2*-rev および *chpA2*-for and *chpA*-R のプライマーペアを用いて、2つに分けて増幅した。それぞれの PCR 産物 (A)、(B)、MazF 断

A.



B.



 MazF encoding gene

Fig 5. in-frame deletion mutant 作成の原理。

(A) PCR による 2 断片連結の原理。(B) in-frame deletion 株作成の原理。

片 1、MazF 断片 2, および (C) を 3 段階の recombinant PCR により連結させた。完成した DNA 断片を枯草菌に形質転換し、MazF 断片上の *spc* 遺伝子により選択した。得られた形質転換体を IPTG を含む LB 寒天培地に植菌した。IPTG を含む LB 寒天培地上で生育したコロニーを候補とし、コロニー PCR により目的遺伝子の欠失を確認するとともに、薬剤感受性および IPTG 耐性についても再度チェックを行い、欠失株を得た。

2-9. Bacterial two-hybrid 解析

bacterial two-hybrid による相互作用解析は、*BACTH* system kit (Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit) (EUROMEDEX) を用いて行った。各操作は Kit のマニュアルに従い、X-gal を含む LB 寒天培地上でコロニーの呈色によりタンパク質間相互作用を検出した。枯草菌 168 のゲノム DNA を鋳型として *csbB*-BACTH-F(Bam) and *csbB*-BACTH-R(Kpn) を用いて *csbB* 遺伝子全長を PCR で増幅し、pUT18、pKT25 pKNT25 の BamHI-KpnI サイトにクローニングし、大腸菌 JM109 に TF して pUT18-*csbB*、pKT25-*csbB* および pKNT25-*csbB* をそれぞれ作成し、CsbB のタンパク質相互作用の解析に用いた。

2-10. *csbB* および *gtrB* 過剰発現用プラスミドの作成

自身の SD 配列を含めた *csbB* 遺伝子の全長配列を枯草菌 168 株のゲノム DNA を鋳型として、*csbB*-SD-F and *csbB*-R のプライマーペアを用いて PCR で増幅した。この DNA 断片を pHCMC05 プラスミドの *Bam*HI-*Sma* I サイトに導入し、pHCMC05-*csbB* を得た。SD 配列を含まない *gtrB* 遺伝子の全長配列を大腸菌 JM109 のゲノム DNA を鋳型として、*gtrB*-F and *gtrB*-R のプライマーペアを用いて PCR で増幅した。この DNA 断片を pHCMC05 プラスミドの *Bam*HI-*Sma* I サイトに導入し、pHCMC05-*gtrB* を得た。

pHCMC05-*csbB* D97A および D44A を作成するため、pHCMC05-*csbB* プラスミド DNA を鋳型として、それぞれ *csbB*-D97A-F and *csbB*-D97A-R、*csbB*-D44A-F and *csbB*-D44A-R のプライマーペアを用いて inverse PCR を行った。得られた PCR 断片を T4 polynucleotide kinase(New England Biolabs) でリン酸化し、ligation kit(TAKARA) を用いてセルフライゲーションし、大腸菌に形質転換し、pHCMC05-*csbB* D97A もしくは D44A を得た。完成したプラスミドおよび pHCMC05-*csbB* を鋳型として *csbB*-FLAG-inverse-F and *csbB*-tag-inverse-R のプライマーを用いて inverse PCR、リン酸化、self-ligation を行い、大腸菌に形質転換して pHCM05-*csbB*FLAG、D97AFLAG および D44AFLAG を得た。

GtrB と CsbB のキメラタンパク質のクローンは SLiCE システムを用いて作成した。*gtrB* 遺伝子の N 末端領域を大腸菌 JM109 のゲノム DNA を鋳型として、*gtrB*-N-SLiCE-F and *gtrB*-N-SLiCE-R1 を用いて PCR で増幅した。また、pHCMC05-*csbB* を鋳型として *csbB*-inverse-F1 and *csbB*-SD-inverse-R を用いて inverse PCR を行った。2つの断片を混合し SLiCE 反応液を加えて *in vitro* で組み換えを起こし、大腸菌 C600 に形質転換して両者を結合させ、pHCMC05-*gtrB^N-csbB^C* を作成した。同じく大腸菌 JM109 のゲノム DNA を鋳型として *gtrB*-C-SLiCE-F1 and *gtrB*-C-SLiCE-R を用いて *gtrB* 遺伝子の C 末端領域を増幅し、pHCMC05-*csbB* を鋳型として pHCMC05-inverse-R and *csbB*-inverse-R1 を用いて inverse PCR を行い、SLiCE システムにより両者を連結して大腸菌 C600 に形質転換し、pHCMC05-*csbB^N-gtrB^C* を得た。

各プラスミドに含まれるの *csbB* 遺伝子の SD 配列を取り除いたプラスミドは、pHCMC05-*csbB* および pHCMC05-*csbB^N-gtrB^C* については *csbB*-F(Bam) and pHCMC05-R(delta Bam) を用いて、pHCMC05-*gtrB^N-csbB^C* については *gtrB*-F and pHCMC05-R(delta Bam) を用いて inverse PCR を行い、リン酸化とセルフライゲーション

ンを行い、大腸菌に形質転換して作成し、pHCMC05- Δ SD-*csbB*、pHCMC05- Δ SD-*csbB^N-gtrB^C* および pHCMC05- Δ SD-*gtrB^N-csbB^C* を得た。

2-1-1. 顕微鏡観察

各枯草菌株をそれぞれの実験ごとの条件で培養し、培養液のうち 500 μ l を分取し、集菌後 400 μ l の上清を捨てて 100 μ l の培地に菌体を再懸濁し、2 μ l をスライドガラス上にスポットし、Nikon ECLIPSE phase-contrast microscope with a 100 \times UplanApo objective を用いて観察を行い、ORCA charge-coupled device camera および software を用いて写真を撮影、画像を取得した。

2-1-2. *csbB* および *yfhO* 破壊株の表現型解析

エタノールストレスおよび NaCl ストレス感受性検定には以下の組成の合成培地を用いた(【20】の方法を一部改変した); 15 mM (NH₄)₂SO₄、8 mM MgSO₄、27 mM KCl、7 mM trisodium citrate、50 mM Tris、1 mM KH₂PO₄、2 mM CaCl₂、1 mM FeSO₄、10 μ M MnCl₂、0.5 % Glucose、0.005 % L-trp、4.5 mM L-Glu、0.02 % casamino acid。一部の成分については初めに (NH₄)₂SO₄、KCl、trisodium citrate、Tris および KH₂PO₄ を含む 5 \times salt solution を調製し、HCl を用いて pH 7.5 に合わせたものを終濃度 1 \times になるように使用した。ただし、NaCl ストレスについては浸透圧の影響を考慮して L-Glu を加えない培地を使用した。熱ストレスに関しては LB 培地で枯草菌を生育させて検定した。

3. 結果

3-1. His-*yhdL* 株を用いた YhdL タンパク質の挙動解析

枯草菌 SigW の例を参考にして、SigM についてもストレスによる活性化が起こるときにはアンチシグマタンパク質が分解されているのではないかと仮定し、ストレス条件下でのアンチシグマタンパク質を Western blotting により解析しようと考えた。前述のとおり、SigM と直接相互作用するタンパク質は YhdL であることが示されていたため、YhdL の N 末端に His-tag を付加した His-YhdL タンパク質の発現を IPTG の添加により誘導できる株 (His-*yhdL* 株) を構築した(2009 Inoue 修士論文)(Fig. 6-A)。

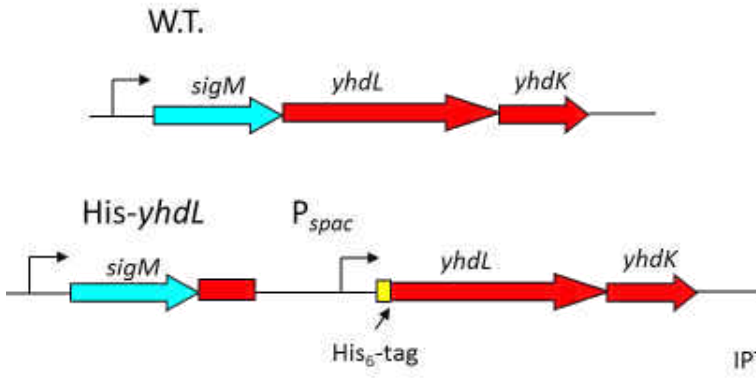
まず、His-tag を付加した YhdL タンパク質がアンチシグマタンパク質としての機能を保っているかどうかを検証した。His-*yhdL* 株を 様々な 濃度の IPTG を添加した LB 培地で生育させ、各 IPTG 濃度における His-YhdL タンパク質の発現を Western blotting により解析するとともに、SigM が認識して転写を活性化するプロモーター配列と *lacZ* 遺伝子の転写 fusion により、SigM の活性化による転写の上昇を β -galactosidase の発現量 (単位菌体量当たりの活性の強さ) として測定する系を用いて、His-YhdL の発現により SigM 活性の上昇を抑えられるかどうかを検証した(His-*yhdL* P*sigM*'-*lacZ* 株)。Western blotting による解析では、IPTG 添加量に応じて His-YhdL の発現量が上昇していたが、IPTG 0.05 mM 以上ではほとんど見かけの発現量に変化はなかった(Fig. 6-B)。SigM 活性は確かに His-YhdL の発現量が減少するにしたがって上昇していることから(Fig. 6-C) His-YhdL はアンチシグマタンパク質としての機能を保持していると結論付けた。

そこでこの株を用いてストレス応答時の YhdL タンパク質の挙動を解析した。まず、1 mM の IPTG を加えて十分にアンチシグマタンパク質を発現させて実験を行った。ストレスとしてはよく研究が進んでいた NaCl ストレスを用いた【13】。野生株 (BSU41) と同様に His-*yhdL* P*sigM*'-*lacZ* 株でも NaCl による SigM 活性の上昇が見られた(Fig. 7-A)。

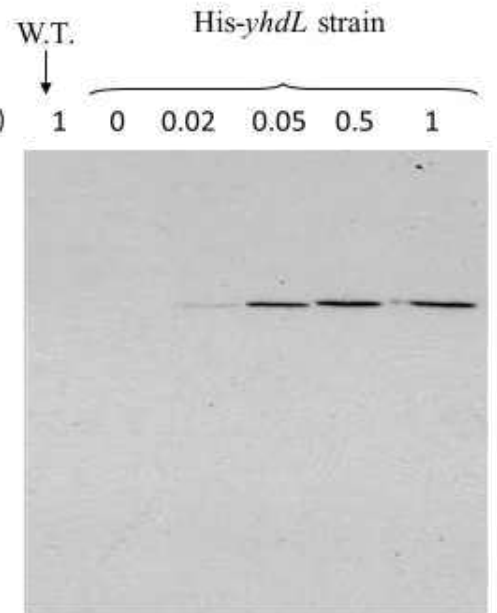
しかし、このときの His-YhdL 量を NaCl なしとありの条件で比較すると、両者に明確な違いは見られなかった(Fig. 7-B)。ここで、IPTG を十分量加えて His-YhdL タンパク質を大量に発現させていたために変化が見られなかった可能性を考量し、IPTG 量を制限した状態で同じ実験を行った。His-*yhdL* P*sigM'*-*lacZ* 株を用いた場合、SigM 活性が W.T. と同等のレベルになる IPTG 量は 0.025 mM の時であったが、この IPTG 量において NaCl の有無による His-YhdL 量の明らかな変化は見られなかった(Fig. 7-C)。このことから、野生株において SigM がストレスによって活性化するとき、細胞内の YhdL 量が劇的に変化させるような反応は起こっていないと結論付けた。

次に、YhdL タンパク質の発現に *yhdK* 遺伝子が与える影響を解析した。既知の SigW 活性化機構では、YhdK のような補助因子が存在しないため、YhdK の影響を解析することで、SigM の活性化について新たな知見が得られる可能性がある。枯草菌ゲノム上の本来の位置に存在する *sigM* 遺伝子を neo カセットにより破壊することで、下流の *yhdL* および *yhdK* の遺伝子を含めた *sigM* オペロンの発現を停止させた枯草菌株の *lacA* 部位に *yhdK* を含むまたは含まない *sigM* オペロン、あるいは空ベクターを導入した(Fig. 7-D and データ未掲載)。それぞれの株について、LB 培地で生育させ、対数増殖期に xylose を 0、0.2、0.5 および 1 % の濃度で加えた(空ベクターを導入した株では、0 と 1 % のみ)。xylose を加えてから 1.5 h 後にサンプリングを行い、*lacZ* レポーターアッセイにより SigM 活性を測定するとともに、western blotting により YhdL タンパク質の挙動を解析した。*sigM* オペロンを発現させたとき、枯草菌細胞内で SigM 活性の上昇が見られたが、*yhdK* 遺伝子を導入した株の方が、SigM 活性の上昇の程度が低かった(Fig. 7-E)。この結果は *yhdK* 遺伝子破壊株では SigM 活性が上昇するという過去の研究と矛盾しない【13】。また、このとき YhdL の挙動を His-tag 抗体を用いて解析したところ、*yhdK* が存在しない条件では、YhdL を検出することができなかった(Fig. 7-E)。したがって、*yhdK* 遺伝子は YhdL の正常な発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

A.



B.



C.

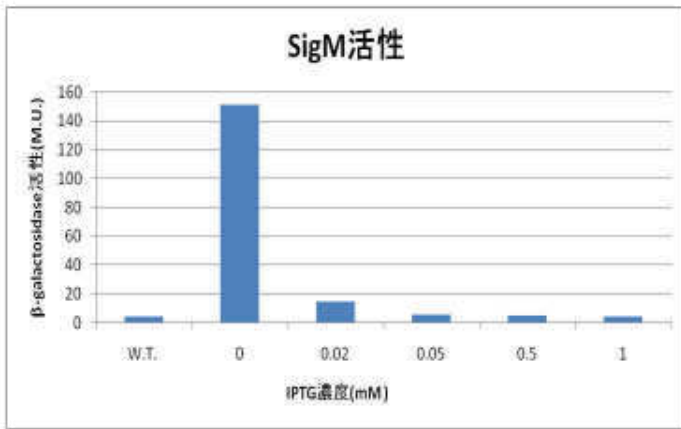
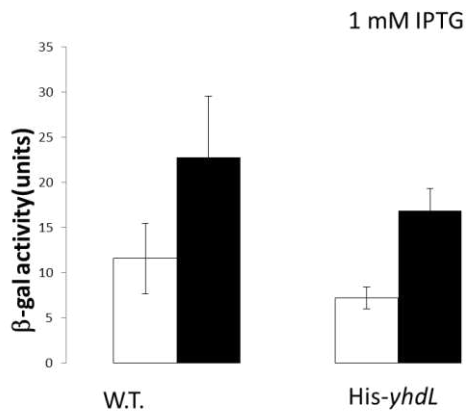


Fig 6. His-YhdL タンパク質の発現と機能

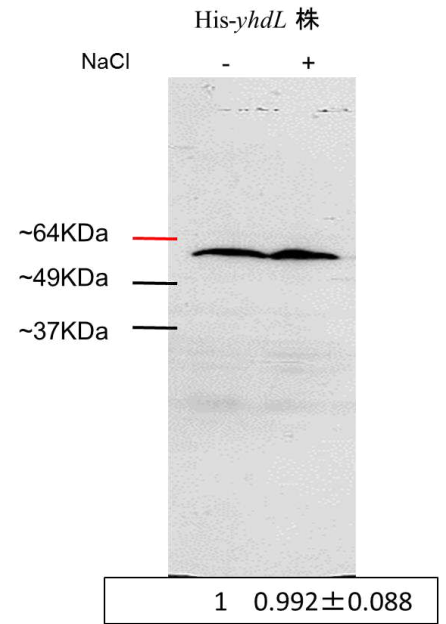
(A) His-yhdL 株における SigM オペロンの構造。(B) His-YhdL タンパク質の検出。

BSU41 (W.T.) および His-yhdL P_{sigM} -lacZ 株を 0.1 mM の IPTG を含む LB 培地で生育させ、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 0-1 mM の IPTG を含む LB 培地に植菌して 120 min 後にサンプリングを行い、抗 His₆-tag 抗体を用いた Western blotting によりタンパク質を検出した。(C) His-YhdL タンパク質のアンチ SigM 活性の評価。(B) と同じサンプルを用いて各 IPTG 濃度のサンプルについて β -gal 活性を測定した。

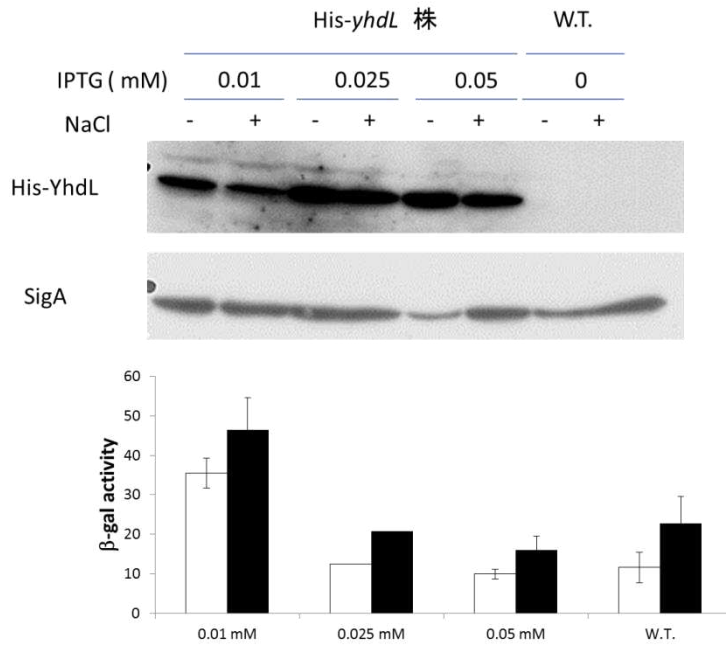
A.



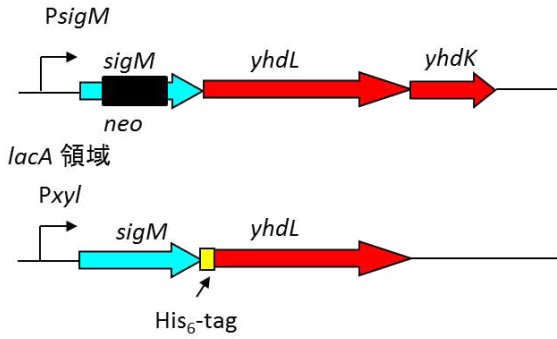
B.



C.



D_M(His)L 株(HRI038)



M(His)L K株(HRI039)

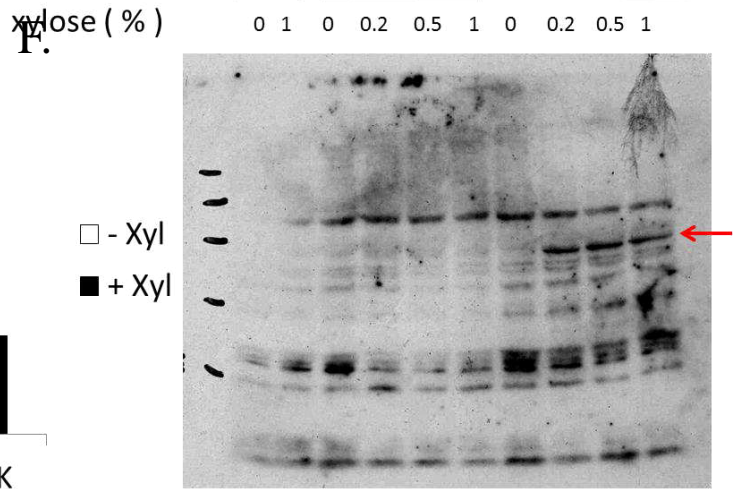
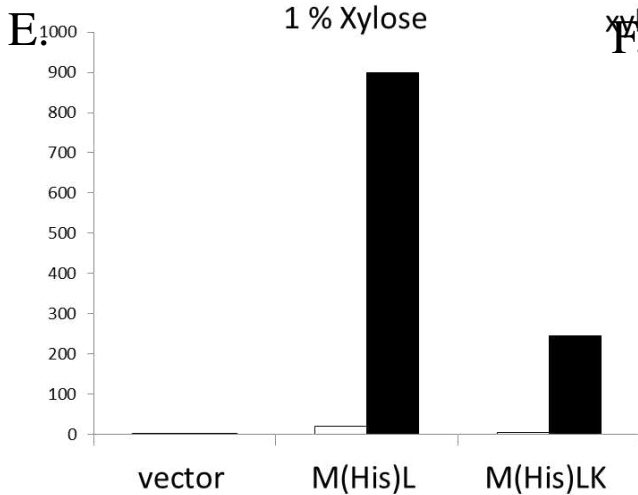
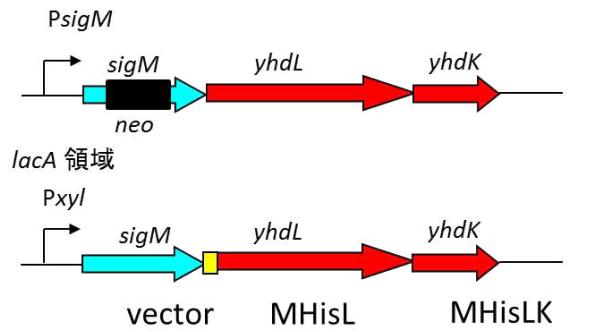


Fig 7. 様々な条件下での His-YhdL タンパク質の発現と機能

(A) BSU41 (W.T.) および His-*yhdL* *PsigM*-*lacZ* 株を 0.1 mM の IPTG を含む LB 培地で生育させ、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 1 mM の IPTG を含む LB 培地に植菌して、O.D.600= 0.4 になったところで培養液を二等分し、片方に終濃度 0.5 M の NaCl を加えて 60 min 後にサンプリングを行い、 β -gal 活性を決定した。白: NaCl なし 黒: NaCl あり (B) His-YhdL タンパク質の検出。(A) と同じサンプルを用いて抗 His6-tag 抗体を用いた Western blotting によりタンパク質を検出した。バンドの濃さを ImageJ により比較し、NaCl なしを 1 としたときの NaCl ありのバンドの濃さを下に示した。(C) BSU41 (W.T.) および His-*yhdL* *PsigM*-*lacZ* 株を 0.1 mM の IPTG を含む LB 培地で生育させ、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 0.01-1 mM の IPTG を含む LB 培地に植菌して (A) と同じようにサンプリングを行い、 β -gal 活性測定と抗 His6-tag 抗体を用いた western blotting を行った。白: NaCl なし 黒: NaCl あり。(D) HRI038 および HRI039 株の *sigM* オペロン構造の模式図。(E) HRI037(pAX01 empty vector)、HRI038(*Pxyl-sigM-his-yhdL*) および HRI039 (*Pxyl-sigM-his-yhdL-yhdK*) 株を xylose を含まない LB 培地で 1 晩培養し、fresh な LB 培地に植え継ぎ、O.D.600=0.2~0.3 の時点で、0、0.2、0.5、1% の終濃度(HRI037は 0 および 1% のみ)の xylose を加えて培養し、1.5 h 後に サンプリングを行い、 β -gal 活性を測定した。代表として 1% の時の結果を示す。白: xylose なし、黒: xylose あり。(F) (E) と同じサンプルを用いて、抗 His6-tag 抗体を用いた Western blotting によりタンパク質を検出した。赤い矢印は His-YhdL タンパク質を示す。

3-2. His-YhdL タンパク質の膜局在性の解析

アンチシグマタンパク質 YhdL は一回膜貫通型の膜タンパク質であるという予測が SOSUI プログラムによって立てられているが、実際に膜に局在するかどうかは実験的に証明されていなかった。YhdL が膜に局在するかどうかは、YhdL がどのようにしてストレスを感知するかという機構に迫るうえで重要な事実である。そこで、枯草菌の膜画分を分取し、His-YhdL タンパク質がそこに含まれるかどうかを調べることで、YhdL タンパク質の膜局在性を解析することにした。

枯草菌の膜画分を分離した手順のフローチャートを Fig. 8-A に示した。各画分を SDS-PAGE で分離後、Western blotting により His-YhdL を検出したところ、His-YhdL は Total protein および Membrane 画分に検出され、Soluble 画分にはほとんど検出されなかった(Fig. 8-B)。これに対し、Soluble タンパク質である SigA は Soluble 画分および Total protein 画分にのみ検出された(Fig. 8-B)。これらの事実から、YhdL は確かに膜に局在しすることが確かめられた。

そこでストレスにより SigM が活性化するときには YhdL の膜局在性が変化するのではないかと考え、NaCl を加えた細胞と加えない細胞から膜画分を調製して His-YhdL の膜局在性を調べた。NaCl ストレスの有無に関わらず His-YhdL は膜画分に検出されたため(Fig. 8-C&D)、NaCl ストレスによる SigM 活性化の際には YhdL の明らかな膜局在性の変化は起こっていないことが示唆された。

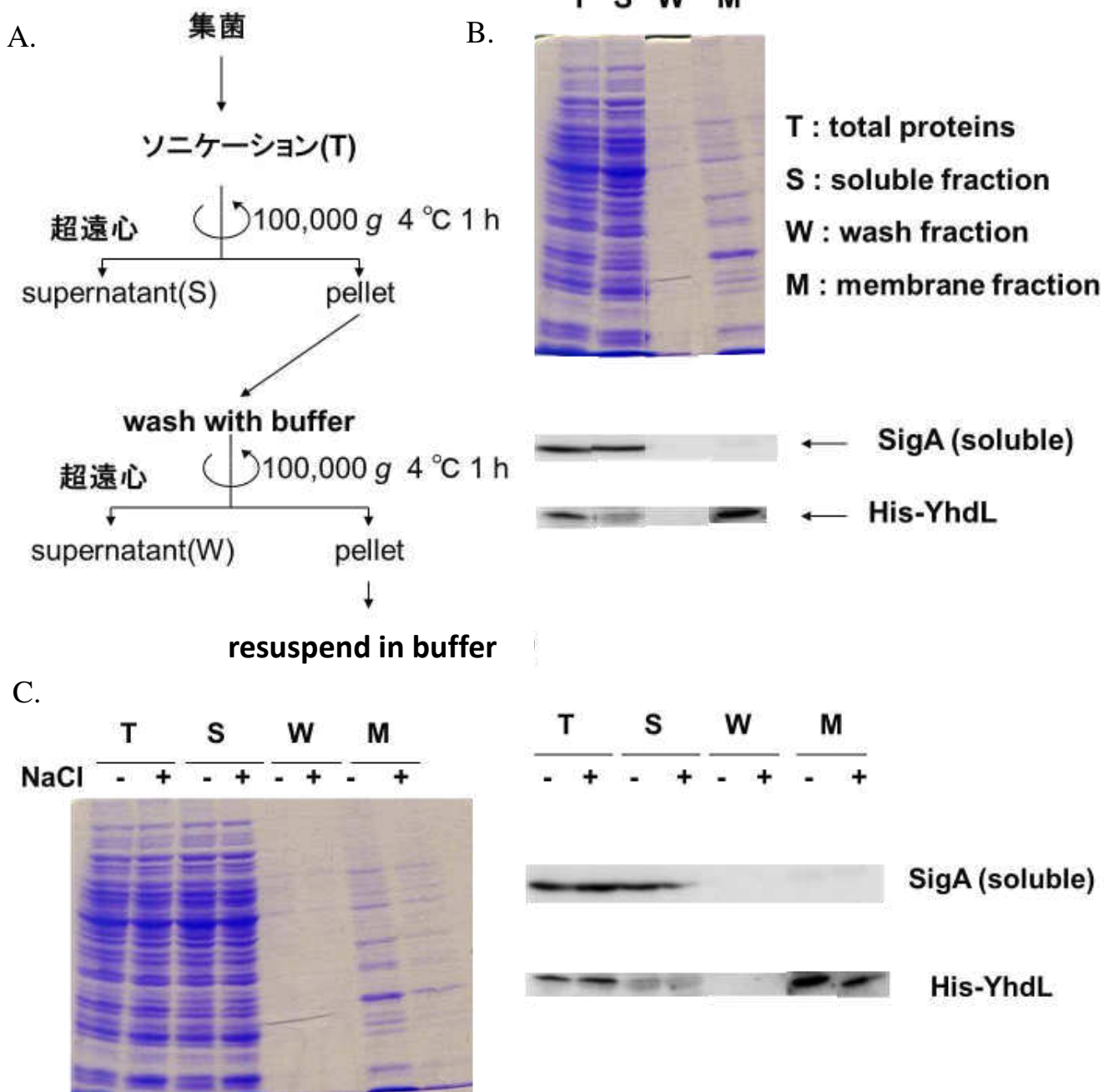


Fig 8. His-YhdL タンパク質の膜局在性の解析

(A) 枯草菌の膜画分調整のフローチャート。(B) His-YhdL タンパク質の検出。His-*yhdL* *PsigM*'-*lacZ* 株を 0.1 mM の IPTG を含む LB 培地で生育させ、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 1 mM の IPTG を含む LB 培地に植菌して 120 min 後にサンプリングを行い、膜画分を調製後、各画分について等量のバッファーに溶解したサンプルを SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色および抗 His6-tag 抗体を用いた Western blotting により検出した。(C) His-*yhdL* *PsigM*'-*lacZ* 株を 0.1 mM の IPTG を含む LB 培地で生育させ、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 1 mM の IPTG を含む LB 培地に植菌して、O.D.600=0.4 になったところで培養液を二等分し、片方に終濃度 0.5 M の NaCl を加えて 60 min 後にサンプリングを行い、膜画分を調製後、各画分について等量のバッファーに溶解したサンプルを SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色および抗 His6-tag 抗体を用いた Western blotting により検出した。

3-3. トランスポゾン変異株 (57F) の解析

先行研究により、すでにトランスポゾンミュータジェネシスが行われており、SigM 活性に影響を与える 19 の候補株が得られていた(2006 Uehara 修士論文)。本研究と先行研究をあわせて、そのうち 11 株についてトランスポゾン導入部位が決定された(Table. 5)。本研究では、得られた候補株のうち SigM 活性に与える影響が最も大きく、未知の膜タンパク質をコードする *yfhO* 遺伝子の変異株に着目した。*yfhO* 遺伝子のコード領域にトランスポゾンが挿入された変異株、57F は、野生株よりも高い SigM 活性を示すことが示されていた(2010 Suzuki 修士論文)ので、その追試を行ったところ、同様の結果が得られた(Fig. 9-A)。SigM 活性は、SigM 認識プロモーターと *lacZ* 遺伝子の転写融合を用いて、 β -gal 活性としてモニターした。57F 株における SigM 活性はどの生育フェイズにおいても野生株よりも高く保たれていた。また、この活性は、SigM 遺伝子の破壊によって失われたため、*yfhO* 遺伝子の破壊は、確かに SigM 依存の転写活性に影響していることが示された。

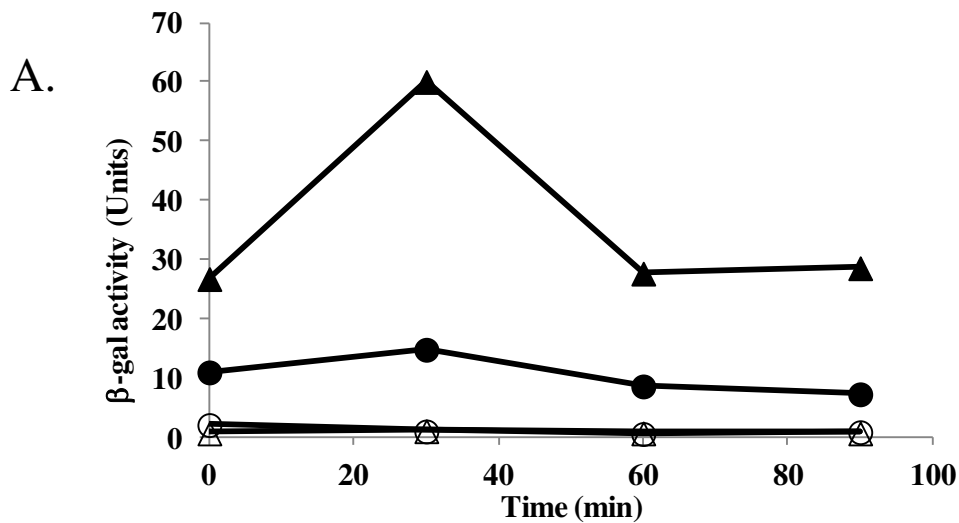
この結果を受けて、57F 株における SigM 活性の上昇が、YfhO タンパク質の欠失によるものであることを確かめるため、IPTG 誘導性の Pspac プロモーターを持つ low-copy number のプラスミド、pHCMC05 に *yfhO* 遺伝子をクローニングし、57F 株に導入した。作成した株の SigM 活性を、X-gal を含む LB 寒天培地上で検定したところ、空ベクターを導入した場合は、57F 株は青いコロニー示したのに対して、pHCMC05-*yfhO* を導入した場合は、IPTG の存在下でのみ X-gal の分解による青色の呈色が見られなくなった(Fig. 9-B)。言い換えれば、57F における SigM 活性の上昇が、プラスミドから *yfhO* を発現させることによって相補された。この結果から、57F 株における SigM 活性の上昇は、YfhO タンパク質の機能が失われたことに由来することが示唆された。

Table 5. この研究で単離された SigM 活性に変化のあった Tn-10 挿入変異株

変異株	同定された Tn-10 導入遺伝子	遺伝子産物 ^a	SigM 活性 ^b
SigM 活性の上昇が見られた株			
23D	<i>glpD</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1.3
43A	<i>ecsB</i>	ABC-2 type transport system permease protein	2.0
46A	<i>secDF</i>	Protein translocase subunit	2.5
57F	<i>yfhO</i>	Conserved membrane protein	4.0
57L	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	2.5
SigM 活性の低下が見られた株			
9B	<i>ygxA</i>	Uncharacterized protein	0.7
56E	<i>yddH</i>	D,L-endopeptidase, cell wall hydrolase	0.6
57G	<i>minC</i>	Septum site-determining protein	0.6
60I	<i>miaA</i>	tRNA dimethylallyltransferase	0.7
62C	<i>iolR</i>	repressor of myo-inositol catabolism operon	0.5
65B	<i>liaS</i>	cell wall antibiotics resistance related sensor kinase	0.5

^a 各遺伝子産物について BSORF *Bacillus subtilis* genome database における機能のアノテーションを示した。

^b 親株 (BSU41)を 1 としたときの相対的な活性の値



B.



+ IPTG

- IPTG

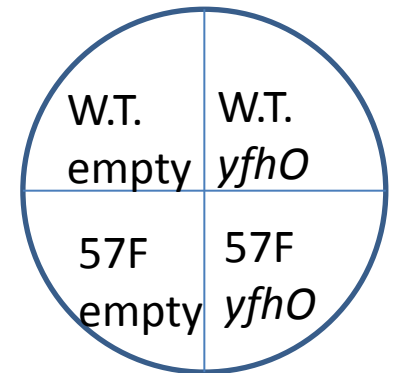


Fig. 9 57F 株における SigM 活性の上昇

(A) W.T. (BSU41) および 57F 株の SigM 活性測定。LB 培地で枯草菌を生育させ、O.D.600 = 0.4 の点を time 0 として、そこから 30 min ごとにサンプリングを行い、各生育フェイズで *lacZ* 活性を測定した。● : W.T.、▲ : 57F 白抜きのシンボルはそれぞれの *sigM* 破壊株。(B) *yfhO* の発現による 57F 株の相補実験。株などの条件は図中に示した。各株は 0.01 % X-gal を含む LB 寒天プレートに植菌してから 37 °C で 48h インキュベート後、写真を撮影した。

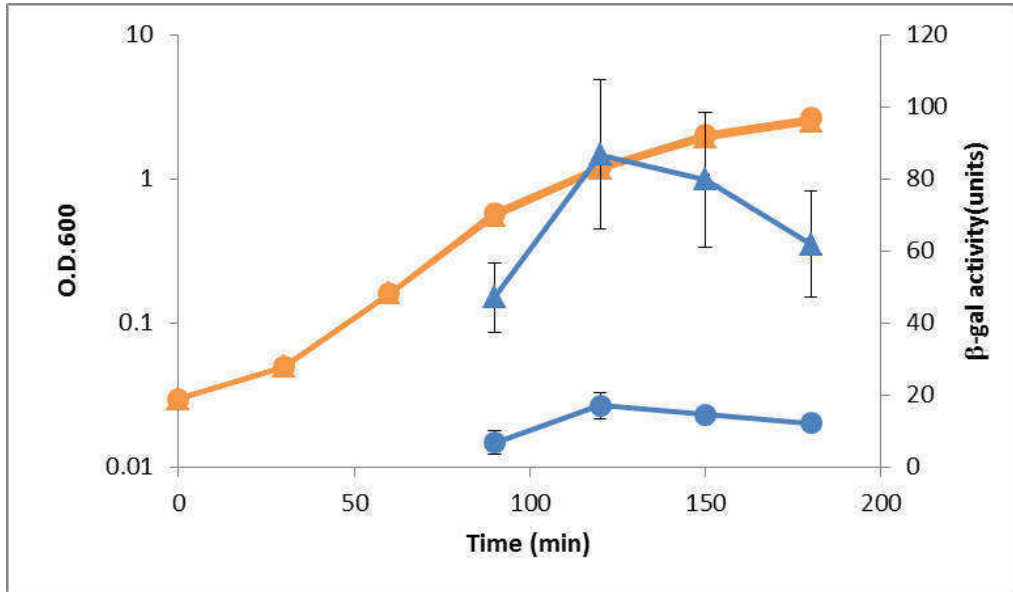
3-4. *yfhO* deletion mutant の作成と解析

トランスポゾン挿入変異株に加えて、すでに *yfhO* 遺伝子の pMutin 挿入破壊株についても SigM 活性の上昇が確認されている(2010 Suzuki 修士論文)。しかし、これらの挿入変異株は、極性効果の懸念があることに加えて、複数の薬剤耐性マーカーの使用により、これ以上の遺伝子操作が困難になるという問題点があった。そこで、マーカーフリーによる in-frame deletion 変異株 ($\Delta yfhO$ 株)を作成し、今後の解析に用いることとした。マーカーフリーの変異株の作成は、実験方法のセクションに示した方法で行った。

作成した変異株を用いて、SigM 活性の測定を行った。 $\Delta yfhO$ 株においても、SigM 活性は野生型に比べて 3~4 倍ほどに上昇していた(Fig. 10-A)。野生株においても変異株においても、SigM 活性は対数増殖期の終わりにピークを示した。

さらに、*yfhO* の変異が枯草菌の他の ECF シグマ因子 (SigV, W, X, Y, Z, YlaC) の活性に影響を及ぼすかどうかを、各 ECF シグマ因子が認識するプロモーターと *lacZ* 遺伝子の転写融合を用いて解析した。SigM 以外の ECF シグマ因子の中で、*yfhO* の破壊により有意に活性が上昇したものはなかった (Fig. 10-B)。SigW と SigX については、*yfhO* 遺伝子の破壊によりわずかながら活性の低下が見られたものの、その影響は大きくなかった。このことから、YfhO 欠失の影響は、SigM に特異的であることが示唆された。

A.



B.

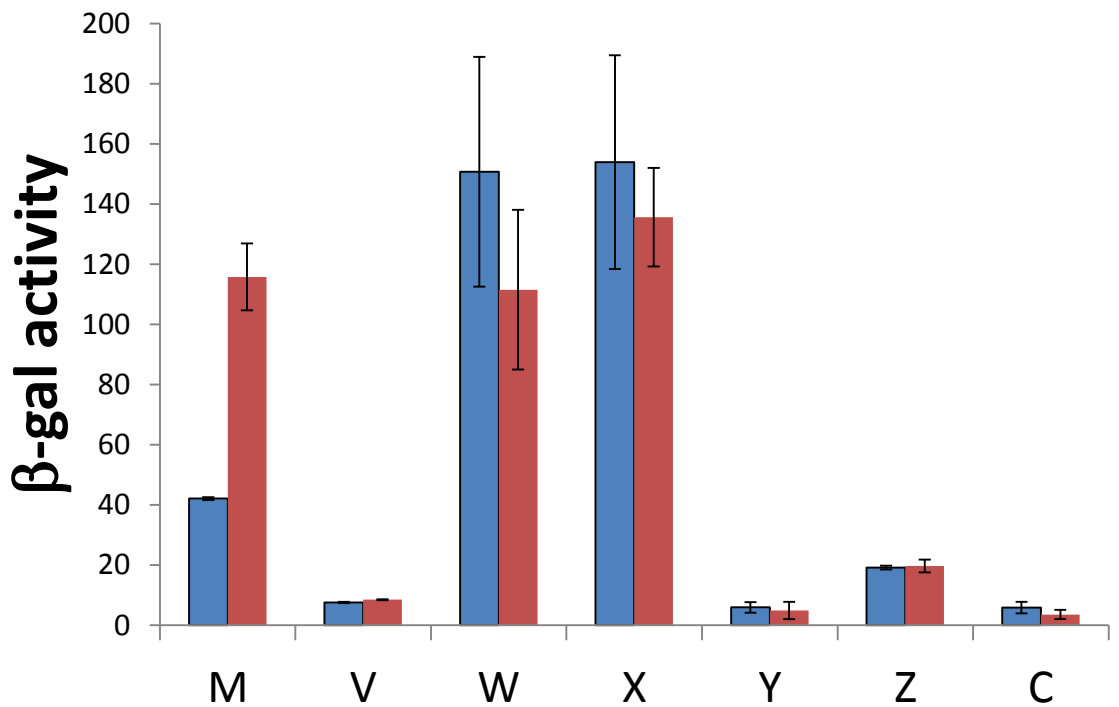


Fig. 10 *yfhO* 遺伝子の破壊が SigM および他の ECF シグマ因子の活性に与える影響
 (A) W.T. (HRI001) および $\Delta yfhO$ 株の生育と SigM 活性。●：W.T.、▲： $\Delta yfhO$ オレンジ：生育 青： β -gal 活性。(B) $\Delta yfhO$ 株における各 ECF シグマ因子の活性測定。各株を LB 培地で生育させ、経時的に *lacZ* 活性を測定し、各 ECF シグマ因子について *lacZ* 活性が最大になる点のデータを示した。青：W.T. 赤： $\Delta yfhO$ 。M, *PsigM-lacZ*; V, *PsigV-lacZ*; W, *PsigW-lacZ*; X, *PsigX-lacZ*; Y, *PsigY-lacZ*; Z, *PsigZ-lacZ*; C, *PylaC-lacZ*。

3-5. *csbB* 遺伝子の影響

yfhO 遺伝子の破壊による SigM の活性化は、そのすぐ上流に位置する遺伝子、*csbB* の破壊によりサプレスされることが先行研究により示唆されていた (2010 Suzuki 修士論文)。そこで、その追試を行うとともに、*csbB* 遺伝子の影響について詳しく解析するため、*csbB* および *csbB-yfhO* 領域についても in-frame deletion 変異株 (それぞれ、 $\Delta csbB$ および $\Delta csbB-yfhO$ 株) を作成した。なお、*csbB* と *yfhO* の間には約 70 bps の遺伝子間領域があり、この2つがオペロンを形成しているかどうかは明らかになっていない。

プラスミド挿入破壊株で行われた先行研究と同様に、新たに作成した deletion 破壊株においても、*yfhO* の破壊による SigM 活性の上昇は、*csbB* の破壊により見られなくなった (Fig. 11-A)。また、*csbB* 単独破壊株の場合には、SigM 活性は野生株とほとんど変わらなかった。このことから、少なくとも YfhO が存在しない条件において、CsbB は SigM を活性化させることができることが示唆された。

そこで、*csbB* を人工的に発現させることで SigM が活性化するかどうかを検証するため、*csbB* 遺伝子を pHCMC05 プラスミドにクローニングし、枯草菌に導入し、*csbB* の発現を IPTG により誘導した時の SigM 活性を測定した。測定は、*yfhO* が存在する条件 (野生株) と存在しない条件で行ったが、*yfhO* 単独欠失株は、それだけで野生株よりも高い SigM 活性を示してしまうため、野生株とバックグラウンドレベルがほぼ同等の $\Delta csbB-yfhO$ 株を *yfhO* 欠失株として用いた。野生株においては、*csbB* の発現を誘導しても SigM の活性化は起こらなかったが、 $\Delta csbB-yfhO$ 株では、IPTG を添加してから 60~120 分後に SigM 活性の上昇が見られた (Fig. 11-B)。この結果から、CsbB の機能により SigM が活性化し、その効果は、YfhO の存在の有無に依存していることが明らかになった。

A.

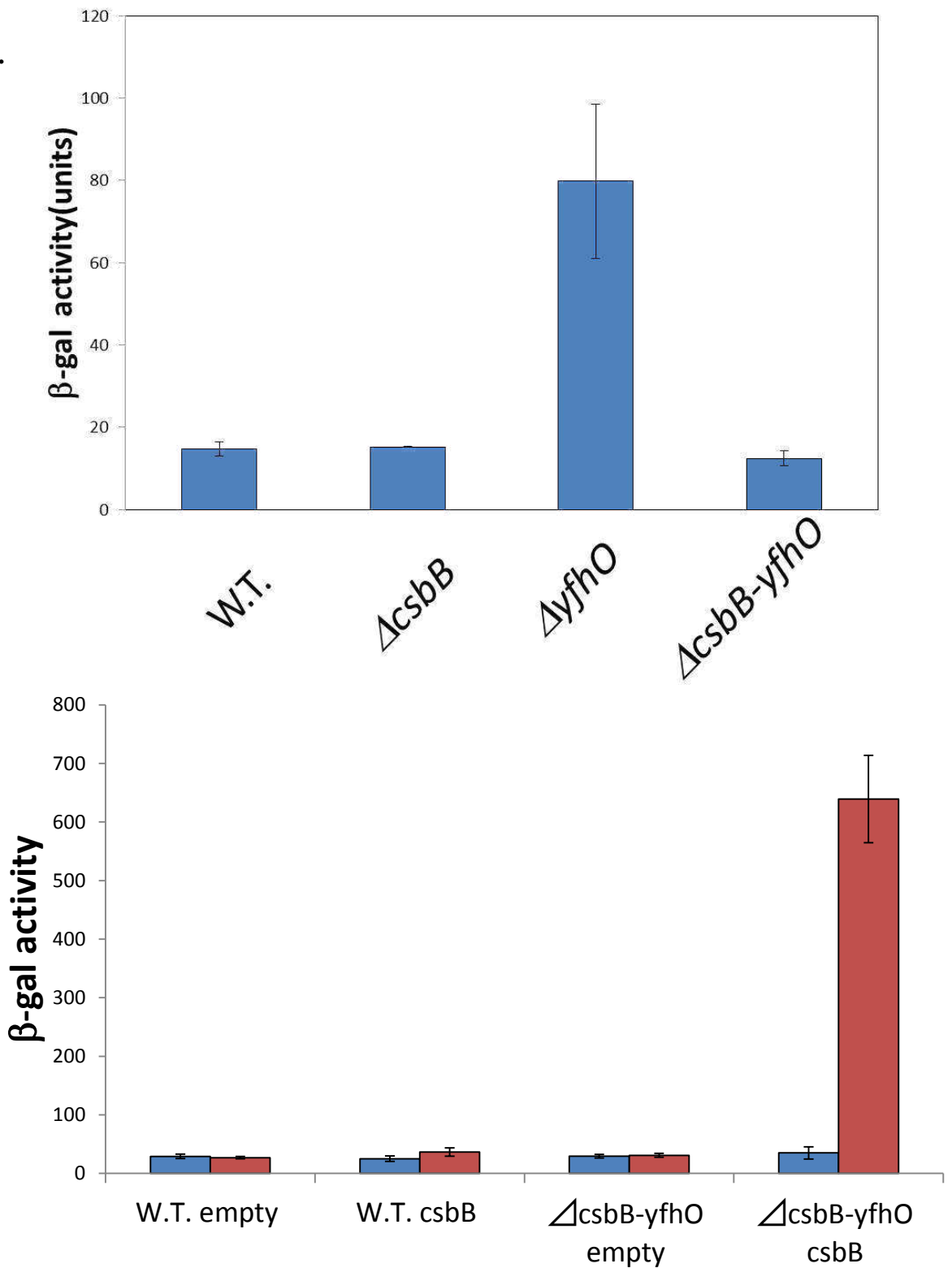


Fig. 11 *csbB* 遺伝子の発現が SigM 活性に与える影響

(A) W.T.(HRI001)、 $\Delta csbB$ (HRI005)、 $\Delta yfhO$ (HRI006) および $\Delta csbB-yfhO$ (HRI007) における SigM 活性の測定。各株を LB 培地で生育させ経時的に SigM 活性を測定して最大になる点の活性を示した。(B) HRI008、HRI 017、HRI010 および HRI 019 株を LB 培地で生育させ、O.D.600 = 0.2~0.3 で培養液を二等分し、片方に終濃度 1 mM の IPTG を加えて 120 min 後の β -gal 活性を示した。青：IPTG なし 赤：IPTG あり。

3-6. SigM および YhdL、YhdK と CsbB および YfhO の相互作用解析

CsbB と YfhO の欠損が SigM 活性に影響を与えることが明らかになったため、これらのタンパク質が SigM およびそのアンチシグマ因子 YhdL、YhdK と直接の相互作用をもつかどうかを、bacterial two-hybrid (BACTH) 法により解析した。また、CsbB-YfhO 間にも遺伝学的な相互作用が見られたことから、同時にこれらのタンパク質間相互作用も解析した。BACTH 法では、大腸菌を宿主とし、adenylate cyclase の T18 ドメインと、T25 ドメインにそれぞれのタンパク質を融合し、タンパク質間に相互作用がある場合には、adenylate cyclase が機能を持ち、セカンドメッセンジャーである cAMP の合成が起こることで、転写を cAMP に依存するレポーター遺伝子の転写が活性化し、それをもとに相互作用を解析する (Fig. 12-A) 【21】。本実験では、*lacZ* 遺伝子をレポーターとして用いている。今回相互作用解析に用いるタンパク質のうち、SigM 以外は膜貫通ドメインを持つ。この実験系は、細胞内を自由に移動できる cAMP を指標にしていることで、酵母ツーハイブリッド法に比べて膜タンパク質同士の相互作用解析に適しているとされている。

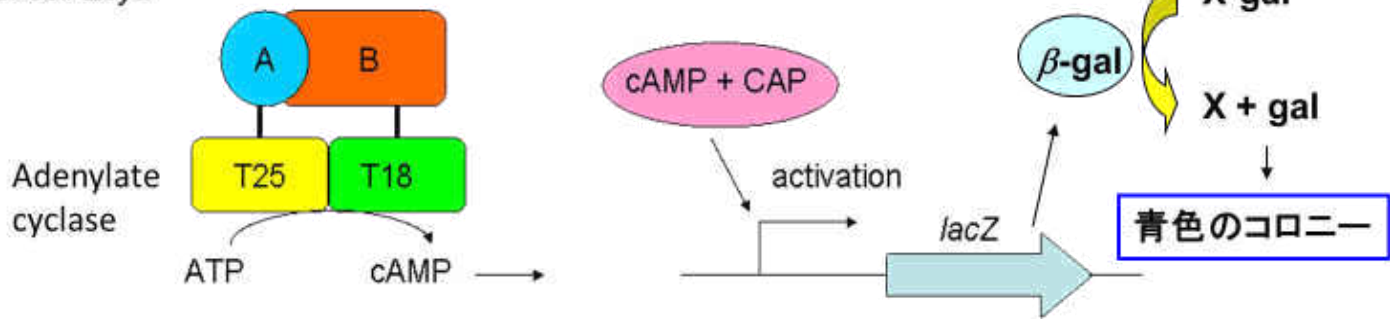
SigM と YhdL および YhdL と YhdK のタンパク質間については、すでに酵母ツーハイブリッド法により相互作用があることが示唆されている【14】。まず、これら既知の相互作用について BACTH 法で検出できるかを検証した。BACTH を用いた実験系では、pUT18C-*yhdL* と pKT25-*sigM* 間で相互作用が見られた (Fig. 12-B) が、YhdL-YhdK 間の相互作用を検出することはできなかった (Fig. 12-B)。pUT18C-*sigM* については pKNT25 にクローニングしたタンパク質といくつかの組み合わせで青いコロニーを形成したが、空ベクターに対しても青いコロニーを生じており、偽陽性の可能性がある (データ未掲載)。

アンチシグマと CsbB or YfhO 間に関しては pUT18-*yfhO* と pKT25-*yhdK* 間に相互作用が検出された (Fig. 12-C)。このほかの組み合わせでは相互作用を検出することはできなかった (データ未掲載)。

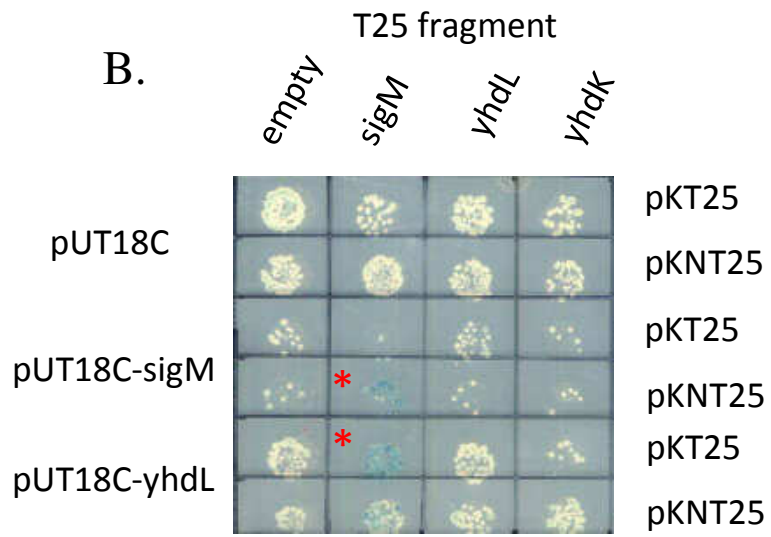
CsbB-YfhO 間 に関しては pUT18-*yfhO* と pKT25-*csbB*、pUT18-*yfhO* と pKT25-*csbB* で強い相互作用が検出されたほか、YfhO-YfhO 間、CsbB-CsbB 間でも相互作用が検出された(Fig. 12-C)。

A.

E. coli Δcya



B.



C.

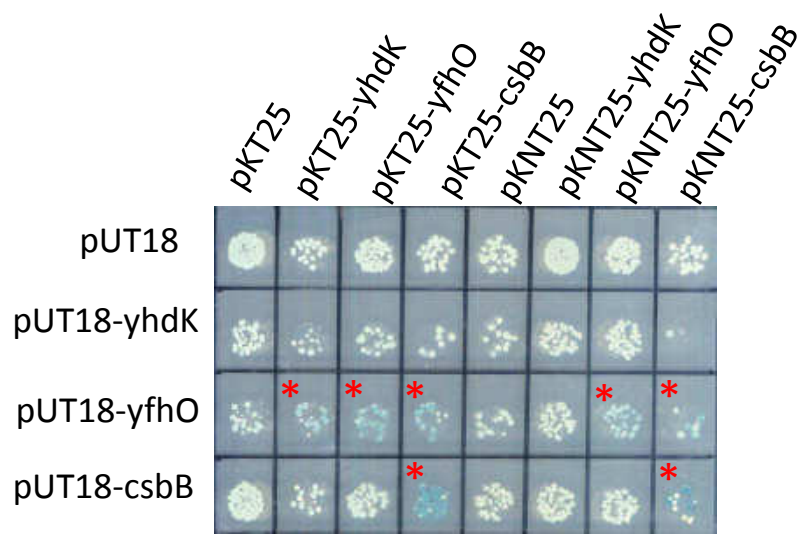


Fig. 12 SigM、YhdL、YhdK、YfhO および CsbB 間のタンパク質相互作用解析
 (A) BACTH 法による相互作用解析の原理の模式図。
 (B) SigM、YhdL および YhdK 間の相互作用解析。図に示した 2 種類のプラスミドを共形質転換した大腸菌 $\Delta cyaA$ 株 (BTH101) の transformant 10 μ l を Ap、Km、0.0002 % X-gal および 0.5 mM IPTG を含む LB 培地にスポットし、30°C で 48 h インキュベート後、写真を撮影した。相互作用が検出されたと判断した組み合わせについて赤のアスタリスクで示した。
 (C) YhdK、YfhO および CsbB 間の相互作用解析。実験方法は (B) に準ずる。実験は 2~3 回行い、代表的な写真を示した。

3-7. YfhO 欠損による SigM の活性化と YhdL および YhdK の挙動解析

YfhO の欠損により SigM が活性化することが明らかになったほか、YfhO は YhdK とタンパク質相互作用を持つことが示唆されたため、YfhO の欠損により SigM が活性化するとき、SigM と直接相互作用するタンパク質である YhdL や YhdK の量の変化や、分子量の変化が見られるかどうか検証した。

まず、*ΔyfhO* 株を His-YhdL を発現する株から抽出したゲノム DNA で形質転換し、SigM 活性を測定した。その結果、His-YhdL を IPTG で人工的に誘導した株においても、*yfhO* を破壊することで、SigM の活性化が起こっていた (Fig. 13-A)。その時の His-YhdL の量をウェスタンブロッティングにより解析したところ、YfhO の欠損により SigM が活性化していても、細胞内の YhdL 量にはほとんど変化がなかった (Fig. 13-B)。

次に、FLAG-YhdK を発現する株について同様の実験を行ったところ、YhdK タンパク質についても、YfhO 欠損により SigM が活性化するときには、細胞内の量に大きな変化は見られなかった (Fig. 13-C & D)。

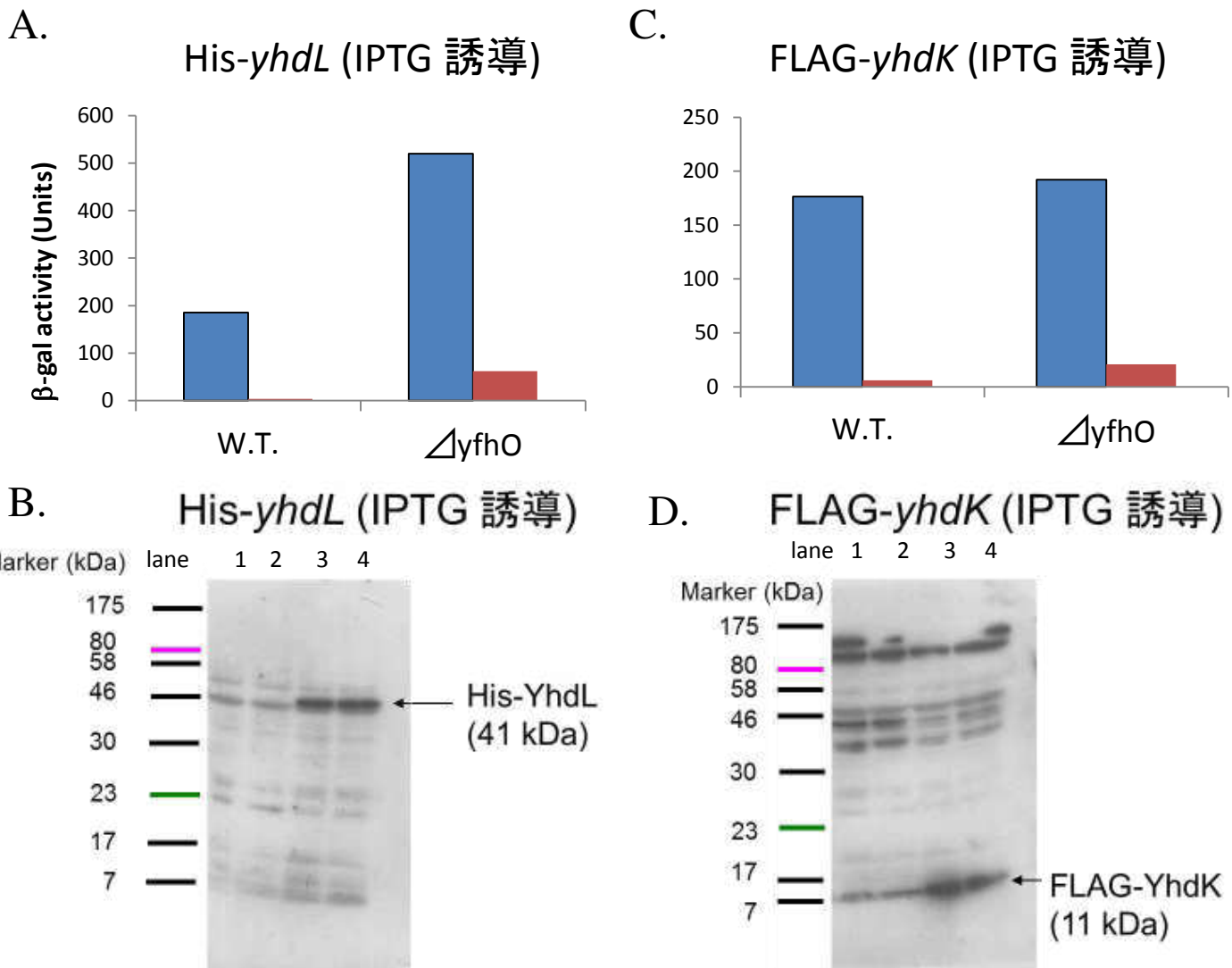


Fig. 13 YfhO の欠損が SigM のアンチシグマタンパク質に与える影響

(A) His-*yhdL* 株で *yfhO* を破壊したときの SigM 活性測定。終濃度 1mM の IPTG を含む LB 培地で His-*yhdL* (W.T.) および His-*yhdL* $\Delta yfhO$ 株 を培養し、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 1 mM の IPTG を含むまたは含まない LB 培地に植菌して O.D.600 = 0.5 付近でサンプリングし、 β -gal 活性を測定した。白：IPTG なし 黒：IPTG あり。(B) His-YhdL タンパク質の発現。サンプルは (A) と同じ菌体を用いた。一時抗体に anti-His6 抗体(Novagen) を用い、サンプルの標準化は O.D.600 あたりで行った。図の左のレーンから、レーン 1：W.T. IPTG なし レーン 2： $\Delta yfhO$ IPTG なし レーン 3：W.T. IPTG あり レーン 4： $\Delta yfhO$ IPTG あり。(C) FLAG-*yhdK* 株で *yfhO* を破壊したときの SigM 活性測定。終濃度 1mM の IPTG を含む LB 培地で FLAG-*yhdK* (W.T.) および FLAG-*yhdK* $\Delta yfhO$ 株 を培養し、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 1 mM の IPTG を含むまたは含まない LB 培地に植菌して O.D.600 = 0.5 付近でサンプリングし、 β -gal 活性を測定した。赤：IPTG なし 青：IPTG あり。(D) サンプルは (C) と同じ菌体を用いた。一時抗体に anti-FLAG M2 抗体(Sigma) を用い、サンプルの標準化は O.D.600 あたりで行った。図の左のレーンからレーン 1：W.T. IPTG なし レーン 2： $\Delta yfhO$ IPTG なし レーン 3：W.T. IPTG あり レーン 4： $\Delta yfhO$ IPTG あり。

3-8. SigM のストレス応答と *csbB* の発現

これまでの実験では、YfhO 非存在下という条件ではあったが、*csbB* の発現により SigM の活性化が引き起こされることを明らかにした。*csbB* 遺伝子は、一般ストレス応答シグマ因子 SigB と、細胞壁合成を阻害する抗生物質により活性化することが知られている SigX によりその転写を制御されていることが知られている【22,23】。また、*csbB* 遺伝子のプロモーター部分と *lacZ* 遺伝子の転写融合を用いた研究では、NaCl ストレスによって *csbB* プロモーターからの転写量が増加することが知られている【22】。さらに、SigB および SigX が活性化する細胞外ストレスは、SigM を活性化させる細胞外ストレスと共通する部分も多い (Table. 1)。

これらの事実から、SigM がストレスにより活性化する際には、*csbB* のストレスによる発現が関与しているのではないかと考え、*csbB* 破壊株について、ストレスによる SigM の活性化が起こるかどうかを検証した。CsbB の機能に関係が深いと思われる YfhO を欠失させた株についても同様に SigM のストレス応答に影響するかどうかを検討した。ストレスについては、SigM 活性化ストレスのうち、塩ストレス (0.5 M NaCl)、エタノールストレス (5 % Ethanol)、酸ストレス (0.03 M HCl) および細胞壁の合成阻害を引き起こす抗生物質 (2 mg/ml vancomycin) を用いた。その結果、今回適用したどのストレスについても、*csbB* および *yfhO* が存在しない条件でも、野生株と同様にストレスにより SigM が活性化した場合が多かった (Fig. 14-A~D)。なお、この条件では各破壊株についてストレス添加時の生育に差は見られなかった(データ未掲載)。

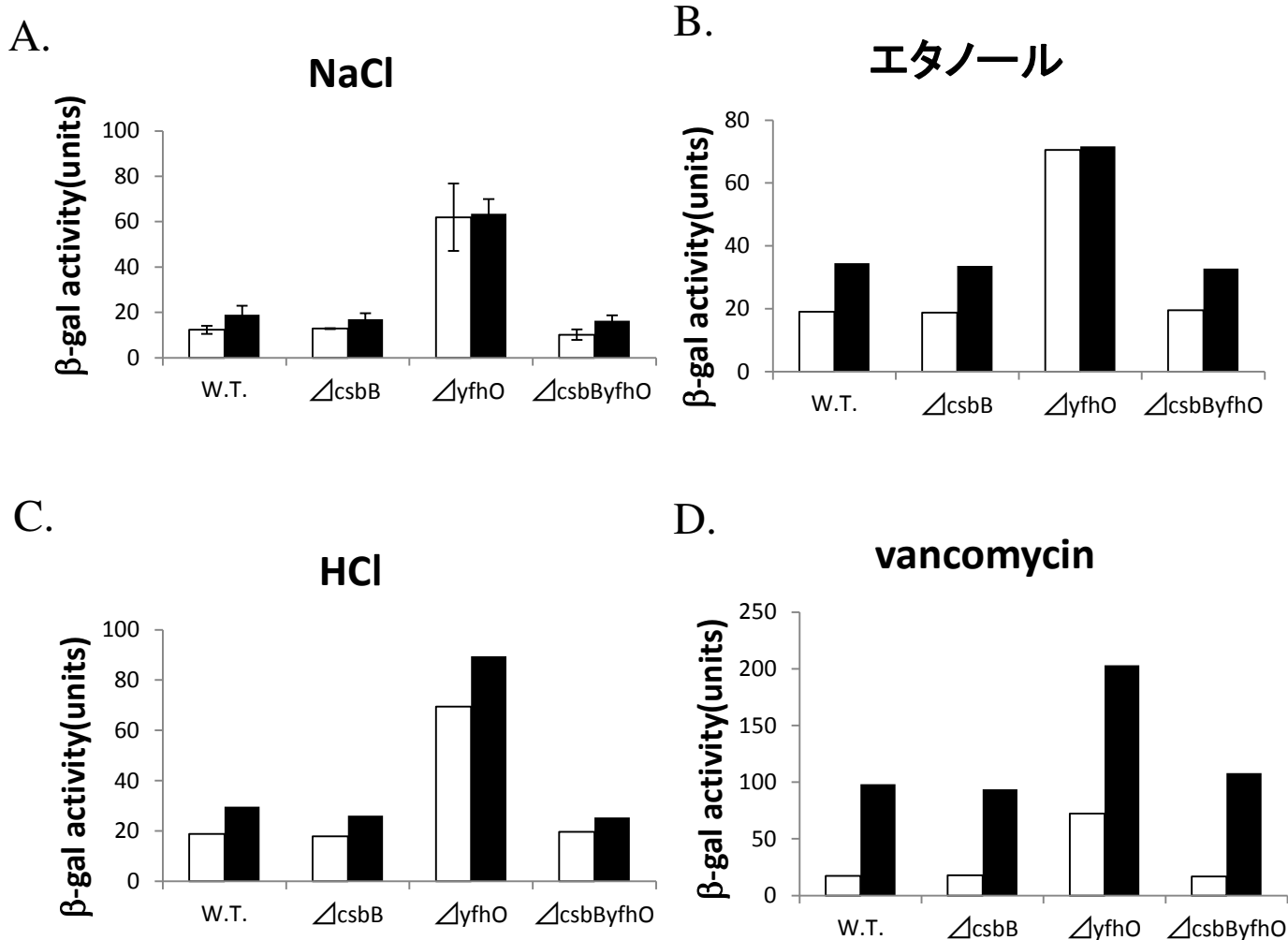


Fig. 14 *csbB* および *yfhO* 破壊株のストレス応答

(A) NaCl ストレス。W.T.(HRI001)、 $\Delta csbB$ (HRI005)、 $\Delta yfhO$ (HRI006) および $\Delta csbB$ -*yfhO* (HRI007) における NaCl 応答。各株を LB 培地で生育させ、O.D.600= 0.4 付近で培養液を二等分し、片方に終濃度 0.5 M の NaCl を加えて経時的に β -gal 活性を測定し、NaCl 添加から 90 min 後の結果を示した。(B) エタノールストレス。各株を (A) と同様に培養液を二等分し、片方に終濃度 5 % のエタノールを加え、もう片方にはエタノールと等量の滅菌水を加えて経時的に β -gal 活性を測定し、エタノール添加から 90 min 後の結果を示した。(C) 酸ストレス。各株を (A) と同様に培養液を二等分し、片方に終濃度 0.03 M (pH 4.3 となる量) の HCl を加えて経時的に β -gal 活性を測定し、HCl 添加から 90 min 後の結果を示した。(D) 細胞壁合成阻害剤ストレス。各株を (A) と同様に培養液を二等分し、片方に終濃度 2 mg/ml の vancomycin を加えて経時的に β -gal 活性を測定し、vancomycin 添加から 90 min 後の結果を示した。白：ストレスなし。黒：ストレスあり。

3-9. CsbB の機能解析と SigM の活性化

csbB の発現による SigM 活性化の原因を明らかにするため、次に CsbB の機能解析を行った。

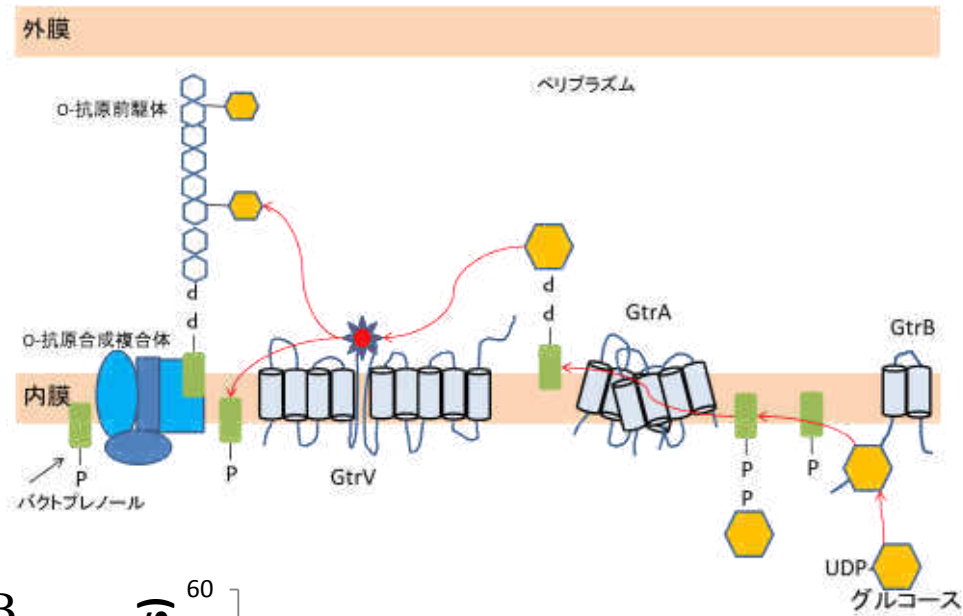
CsbB はゲノムデータベース上で、Glycosyltransferase family 2 の GtrB subfamily に属する糖転移酵素にアノテーションされている。GtrB については、病原性のグラム陰性菌である *Shigella flexineri* においてその機能がすでに明らかにされており、グラム陰性菌に特有の細胞表層リポ多糖構造である O 抗原のグルコース修飾の開始ステップに関わる bactoprenol glucosyltransferase として働いている (Fig. 15-A および [24])。GtrB は、UDP-glucose を用いて、糖キャリアの bactoprenol-phosphate (C55-P) に glucose を付加し、反応産物の C55-PP-glucose がその後 O 抗原の修飾に使われる。

NCBI の blast プログラムを用いた相同性解析の結果、枯草菌の CsbB と *S. flexineri* の GtrB は、ほぼ全長の配列に関して、identity で 40%、similarity で 62% と非常に高い相同性を示した。このことから、CsbB も GtrB と同様の機能を持つ酵素であると仮定した。なお、グラム陽性菌である枯草菌には O 抗原は存在しないが、GtrB の基質となる C55-P は枯草菌にも存在しており、細胞壁などの細胞外多糖の合成の際に糖のキャリアとして働いていることがわかっている [25]。

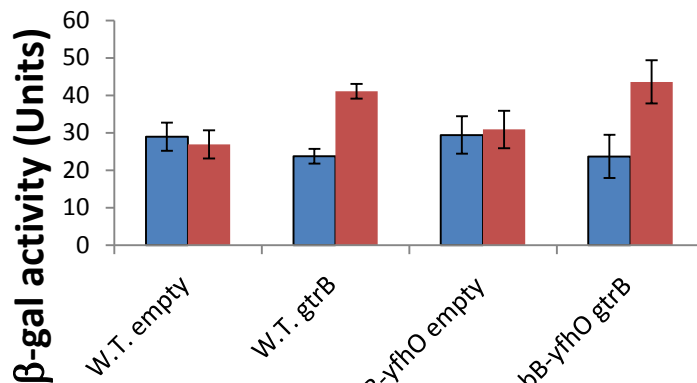
CsbB の機能が GtrB と同様であるかを検証するため、*csbB* と同様に *gtrB* 遺伝子についても pHCMC05 にクローニングし、枯草菌野生株と、 Δ *csbB-yfhO* 株に導入して、GtrB の発現により SigM の活性化が起こるかどうかを検証した。ただし、病原性菌の DNA は取扱いが難しいため、同じグラム陰性菌である大腸菌の *gtrB* 遺伝子を用いた。*gtrB* 遺伝子を枯草菌で発現させることにより、*csbB* の場合ほど顕著ではないものの SigM 活性の上昇が見られた。ただし、この活性上昇は、*yfhO* の有無に依存していなかった (Fig. 15-B)。

GtrB の発現が、枯草菌細胞中で CsbB と同等の効果を示さなかった理由について、GtrB が 2 つの膜貫通領域を持つ膜タンパク質であることに着目した。大腸菌や、*S. flexneri* の GtrB は本来グラム陰性菌の内膜に局在するタンパク質であると考えられている【24】。枯草菌 CsbB も 2 つの膜貫通領域を持つ膜タンパク質であると予測されているが、グラム陰性菌とグラム陽性菌では細胞膜の組成が異なることから、枯草菌中で、大腸菌 GtrB がうまく細胞膜に局在していない、あるいは発現していないのではないかと仮定した。そこで、これらのタンパク質の活性部位である N 末端と膜貫通領域をもつ C 末端を入れ替えたキメラタンパク質を枯草菌中で発現させて、枯草菌 SigM 活性に与える影響を検証した。大腸菌 GtrB の活性部位と枯草菌 CsbB の膜貫通領域を持つキメラタンパク質(GtrB^N-CsbB^C) を発現させた枯草菌においては、*ΔyfhO* バックグラウンドで 枯草菌 CsbB を発現させたときとほぼ同等の SigM 活性の上昇が見られた(Fig. 15-C)。ただし、この活性の上昇は YfhO の有無に依存していなかった。また逆に CsbB の N 末端と GtrB の C 末端を持つキメラタンパク質 (CsbB^N-GtrB^C) を発現させた場合は SigM 活性の上昇は見られなかった(Fig. 15-C)。GtrB と相同性を持つ酵素や、GtrB と同じく UDP-sugar を基質として用いる糖転移酵素に関して、その機能に重要なアミノ酸残基がいくつか同定されている。GtrB と相同性を持つ酵素には、真核生物や古細菌に見られる dolichol phosphate mannose synthase (DPM) がある。高度好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* の DPM について、特定のアミノ酸をアラニンに置換した場合の酵素活性を検証する実験がすでに行われており、いくつかのアスパラギン酸残基 (D38, 39, 89, 91) が活性に重要であることが示されている【26】。また、この古細菌の酵素は、*in vitro* で C55-P も基質として利用できることも同じ論文で示されている。

A.



B.



C.

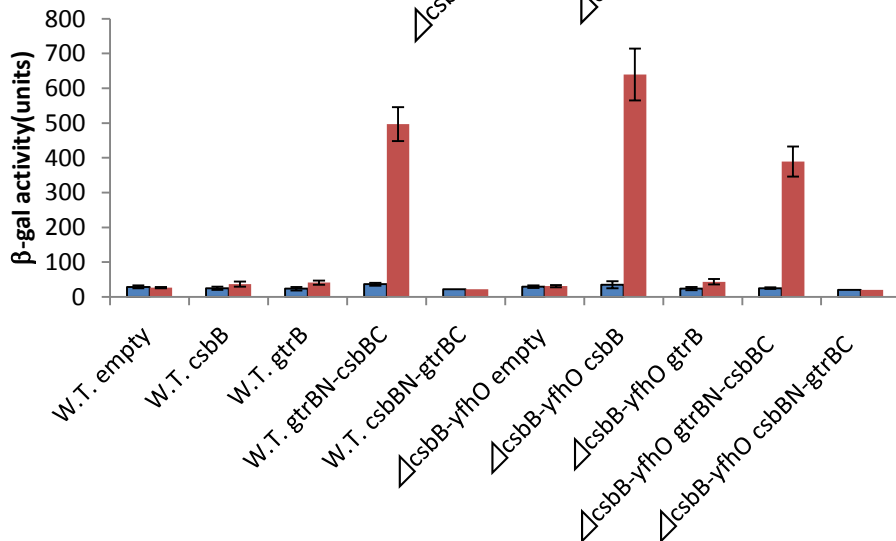


Fig. 15 大腸菌 *gtrB* の発現と SigM の活性化。(A) *Shigella flexneri* GtrB の機能(Korres et.al, BBRC 2005 参照)。(B) 大腸菌 *gtrB* をプラスミドから発現させたときの SigM 活性。HRI008、HRI020、HRI010 および HRI022 株を LB 培地で生育させ、O.D.600 = 0.2~0.3 で培養液を二等分し、片方に終濃度 1 mM の IPTG を加えて 90 min 後の β -gal 活性を示した。青：IPTG なし 赤：IPTG あり。(C) キメラタンパク質をプラスミドから発現させたときの SigM 活性。HRI008、HRI 017、HRI020、HRI023、HRI 026、HRI010、HRI019、HRI022、HRI025 および HRI028株を LB 培地で生育させ、O.D.600 = 0.2~0.3 で培養液を二等分し、片方に終濃度 1 mM の IPTG を加えて 90 min 後の β -gal 活性を示した。青：IPTG なし 赤：IPTG あり。

そこで、枯草菌の CsbB と、いくつかの生物の GtrB および DPM について、UniprotKB データベースの配列をもとに ClustalX2 プログラムを用いてアライメントを行ったところ、*P. horikoshii* の DPM において活性に重要であった Asp 残基のうち、D39, D89, および D91 に相当するものが、CsbB を含む GtrB 型の酵素にも保存されていることが明らかになった (Fig. 16-A)。枯草菌 CsbB では、D44, D95 および D97 がこれにあたる。このうち、D95 と D97 は、DxD motif と呼ばれる、UDP-sugar を基質とする糖転移酵素に共通するモチーフで、UDP-sugar や、補因子となる金属イオンの結合の際に働き、Asp 残基2つがセットで機能すると考えられている【27】。

これを受けて、CsbB の2つのアミノ酸、D44 と D97 にアラニン置換を導入し、これらの変異アミノ酸を発現させたとき、枯草菌 SigM の活性化が起こるかどうかを検証した。なお、この実験に用いた株は、すべて $\Delta csbB\text{-}yfhO$ 株がバックグラウンドとなっている。変異 CsbB を発現させた場合は、野生型 CsbB を発現させたときに比べて、SigM の活性化がほとんど起こらなかった (Fig.16-B)。また、タンパク質の発現レベルを抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting により解析したところ Western blotting により解析したところ、各変異タンパク質は野生型 CsbB と同等以上のレベルで細胞内に存在していることが明らかになった (Fig. 16-C)。このことから、SigM の活性化には、CsbB の糖転移酵素としての活性が重要であることが示唆された。

A.

EcGtrB 1 -----MKISLIVPVNEEEAIPFVKTV-REFEELKSYEVEIVFINDGSKDATESI
 FnGtrB 1 ----MDNKDKLTSIIIPVKDEAEGIEHLFARL-MPILEKLPKYELVFINDGSDNDNTLEL
 BsCsbB 1 -----MKQGLISIIIPSYNEGYNVKLHESLKKEFKNT-HYDYEIFFINDGSDVDDLQO
 SfGtrB 1 -----MKISLIVPVNEEEAIPVFKTV-REFQELKPYEVEIVFINDGSKDATESI
 FnFlmF2 1 MMTSRNVNDNRIYAVIPVYNEEVLTIESFLRELAAKLSQI-SINYKIVVVDDGSLDNSKKI
 EcArnC 1 ---MNNTDIKLVSVVPIPVYNEEASLPALLSRVTAAACDQL-SQNYEVLIDDGSHDGSTEL
 PHDpm1 1 -----MKVSIIVPTYNERDNLEELSRVSSALKGY---DYEIITVDDSDPKTWEK



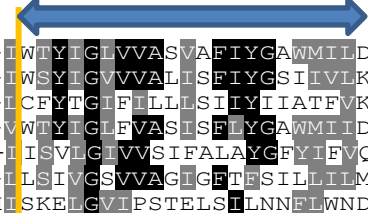
EcGtrB 51 INALA-VSDPLVVPVLSFTRNFGKEPALFAGLDHATG-DAIIPIDVDLQDPIEVIPIHLIEK
 FnGtrB 56 LLEKQ-KDIPEIAIVDLNFRNFGKEAALFAGFANCNG-DAAISADADLQDPELILEMVQH
 BsCsbB 54 IKDLA-ATCSRVKYISFSRNFGKEAAILAGFEHVQG-EAVIVDADLQHPITYLLIKEFIKG
 SfGtrB 51 INALA-VSDPLVVPVLSFTRNFGKEPALFAGLDHATG-DAVIPIDVDLQDPIEVIPIHLIEK
 FnFlmF2 60 IQSLV-DQLN-IKFISFSRNFGQEAAITAGLEASRDADAAILMDCDFQHPPIEVIDQFYSK
 EcArnC 57 IRDAAAVEGSKLVGVLLNRNYGQHAAIMAGFETAKG-DLVITIDADLQNPPEEIPRLVEA
 PHDpm1 49 AMELS--KLYPVKVIARRVNEKGLSSAVIRGFSEASG-DVFFVVDADLQHPPEVIPSLLRE



EcGtrB 109 WQAGADMVLAKRSDRSTDGRLKRKTAEFYK---LHNKISNPKIE---ENVGDFRLMSRD
 FnGtrB 114 WLDGYEVVTAVRENRTDTSTKKHTAGLFYK---VMNKISDTKLT---PNAGDYRLLNRA
 BsCsbB 112 YEEGYDQVIAQR-NRKGDSFVRSLLSSMYK---FINKAVEVDLR---DVGDFRLLSRQ
 SfGtrB 109 WQAGADMVLAKRSDRSTDGRLKRKTAEFYK---LHNKISTPKIE---ENVGDFRLMSRE
 FnFlmF2 118 WCEGYSNVYGVV-TRDDQSATRSFLSETEFK---LSNKLMGVKIP---ANAGYFRLLDKQ
 EcArnC 116 AMQGYDVVGTMRNRNQRD-SWFRKTASKLINK---SVQKATGVHMS---DYGCMRLAYRRH
 PHDpm1 106 IEKGNDAIASRYVKGKGVENWPFYRRLISRGAITIGRLALPKIAGIKDPVSGFFALKRS

EcGtrB 163 VVENIKLMPE-RNFLFMKGIISWVGGKTDIVEYVRAERIAAGDT-KFNGWKLWNLA-----
 FnGtrB 168 AVNAFLELKE-KIRFNKGLLTIWGFKEKIVYHAREERAAGQT-KWNYWKLKFKS-----
 BsCsbB 165 AVNALLKLSE-GNRFSGKLFVIGFDQKIVFYENVERKNGTS-KWSFSSLFNYG-----
 SfGtrB 163 VVENIKLLPE-RNFLFMKGIISWVGGQTDVVEYVRAERVAGIS-KFNGWKLWNLA-----
 FnFlmF2 171 CIKAFNSLPE-NSRFIRGLFAWIGFNSYAIPEEVADRKDGTSRWGYKKLFLKLA-----
 EcArnC 169 IIDAMLCCQE-RSTFIPILANSFARRTIELEVGHAEARHGES-KYGLMHLINLM-----
 PHDpm1 166 VVEGVKLNPIGFKILMEILIKGKYSRVTEVPFTFSTRKFGES-KLKGKTMVNYLRHVYRL

EcGtrB 215 -----LEGITSFSTFPLR-----IWTYIGLVVASVAFIYGAWMILDT
 FnGtrB 220 -----IDGITSFSRAPLE-----IWSYIGVVVALISFIYGSIIIVLKS
 BsCsbB 217 -----MDGVVSNHKKPLR-----ICFYTGIFILLLSIIYIATFVKI
 SfGtrB 215 -----LEGITSFSTFPLR-----IWTYIGLVVASISFLYGAWMIIDT
 FnFlmF2 224 -----FTGIFSFSSVPLR-----IISVLGIVVSI FALAYGFYIFVQS
 EcArnC 221 -----YDLVTCMTTTPLR-----LLSIVGSVVAGIGFTFSILLILMR
 PHDpm1 225 MKWEGEVDRILKFSIVGLSGVGVNEGFLWLFVNFHISKELGVIPSTELSLNLFWNLDL



EcGtrB 252 IIFG----NAVRYGYPSSLVSIILFLGGIQMIGIGVLGEYIGRTIYIETKKR---PKYIIKRV
 FnGtrB 257 LLFG----VDVPGYPSLVTFILFFSGLQMIGIGMLGSYIGRIFDIETKHR---PLYIIRQV
 BsCsbB 254 LTNG----ISVPGYFTIISAVLFLGGVQLLSLGIIGEYIGRIYIYETKCR---PHYLIIKA
 SfGtrB 252 LVFG----NPVRGYPSLLVSIILFLGGVQLIGIGVLGEYIGRIYIEVKNR---PKYIIKKS
 FnFlmF2 261 LFFN----VNVITGWPITVVSIMFFSGVQLISLGLVGEYISRIEIDEAKKR---PRYIIDED
 EcArnC 258 LILGAD--WAADGVFTLFAILFTFVGVQLLGMGLLGEYIGRMYTDVRRAR---PRYFIHQI
 PHDpm1 285 WTEFKDIKKGSVIERLAKFHVAAFVGVAVQFLVYVWILLFLGIHYLLANLFGIGASFVVRYI



EcGtrB 305 K-----K-----
 FnGtrB 310 H-----RAKE-----
 BsCsbB 307 NIPNKDLPETNELKSMRRLTKMH
 SfGtrB 305 H-----RGNP-----
 FnFlmF2 314 -----ESRNI-----
 EcArnC 313 VRSATTPSQQEAEQ-----
 PHDpm1 345 FN-----RHITWAG-----

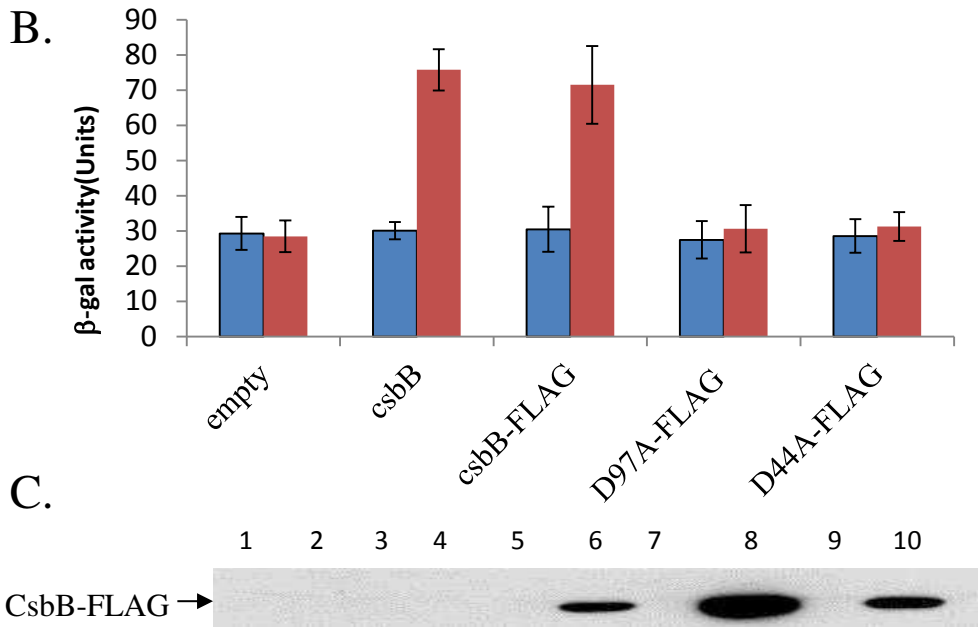


Fig. 16 保存された Asp 残基の Ala 置換が CsbB による SigM の活性化に与える影響。
 (A) GtrB subfamily に属する糖転移酵素およびそのホモログタンパク質のアミノ酸配列のアライメント。アライメントは ClustalX2 プログラムを用いて行い、BOX SHADE サーバー(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) の機能を用いて相同部位を影で示した。矢印は本研究で Ala 置換を行った CsbB の Asp 残基を示す。アライメントの上部に描いた両方向の矢印は予想される膜貫通領域を示す。赤い枠は各酵素の DxD motif を示す。アライメントの図を縦断する線は BsCsbB と EcGtrB のキメラタンパク質作成の際に交換した境界を示す。各タンパク質のアミノ酸配列は UniprotKB データベースより取得した (<http://www.uniprot.org/>)。UniprotKB における Entry ID はそれぞれ EcGtrB, P77293 *Escherichia coli* GtrB; FnGtrB, A0Q7Q8 *Francisella novicida* GtrB; BsCsbB, Q45539 *Bacillus subtilis* CsbB; SfGtrB, P68667 *Shigella flexneri* GtrB; FnFlmF2, A0Q5C5 *Francisella novicida* Undecaprenyl phosphate N-acetylgalactosamine transferase; EcArnC, C4ZU96 *Escherichia coli* Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase; PhDpm1, O57812 *Pyrococcus horikoshii* Dolichol phosphate mannose synthase となっている。
 (B) Ala 置換を導入した CsbB をプラスミドから発現させたときの SigM 活性。HRI010, HRI013, HRI014, HRI015 および HRI016 株を LB 培地で生育させ、O.D.600 = 0.2~0.3 で培養液を二等分し、片方に終濃度 1 mM の IPTG を加えて 120 min 後の β -gal 活性を示した。青：IPTG なし 赤：IPTG あり。
 (C) 変異 CsbB タンパク質の発現解析。発現解析の菌体は (B) と同じサンプルを用いた。一時抗体に anti-FLAG M2 抗体 (Sigma) を用い、サンプルの標準化は O.D.600 あたりで行った。各レーンのサンプルはすべて (B) と対応しており、図の左から、レーン1：HRI010 IPTG なし レーン2：HRI010 IPTG あり レーン3：HRI013 IPTG なし レーン4：HRI013 IPTG あり レーン5：HRI014 IPTG なし レーン6：HRI014 IPTG あり レーン7：HRI015 IPTG なし レーン8：HRI015 IPTG あり レーン9：HRI016 IPTG なし レーン10：HRI016 IPTG あり。

3-10. *ΔyfhO* 株における UDP-glucose の利用制限の SigM 活性化への影響

これまでの研究では、*yfhO* 欠損時に見られる CsbB による SigM の活性化は CsbB の糖転移酵素としての活性に依存していると可能性が高いことを明らかにした。また、CsbB と GtrB の類似性、キメラタンパク質を用いた実験から、CsbB は GtrB と同じ bactoprenol glucosyltransferase ではないかと仮定した。CsbB と GtrB の機能が同じであれば、CsbB は基質として UDP-glucose を利用する。この仮定が正しいとすれば、枯草菌細胞内の UDP-Glc 濃度を低下させることで、CsbB が C55-P にグルコースを付加しにくくなるため、CsbB による SigM の活性化を抑えることができるのではないかと考え、次の実験を行った。

枯草菌において UDP-Glc の生合成を触媒する UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase をコードする *gtaB* 遺伝子を IPTG 誘導性の Pspac プロモーターの下流に置いたコンストラクションを *ΔyfhO* 株に導入し、IPTG を加えない培地で生育させることで、枯草菌細胞内の UDP-Glc 量を制限した条件で SigM の活性化が起こるかどうかを検討した。なお、名前が似ているが *GtaB* と *GtrB* は全く別の酵素であるので混同しないよう注意されたい。*YfhO* が不在条件で *gtaB* の発現を抑制しても SigM 活性化が起こっていた(Fig. 17)。また、この実験では *YfhO* の有無に関わらず *gtaB* の発現を抑制すること自体が SigM を活性化させるという結果が得られた(Fig. 17)。これらの事実から、この実験では CsbB が UDP-Glc を利用するかどうかは判断できなかった。

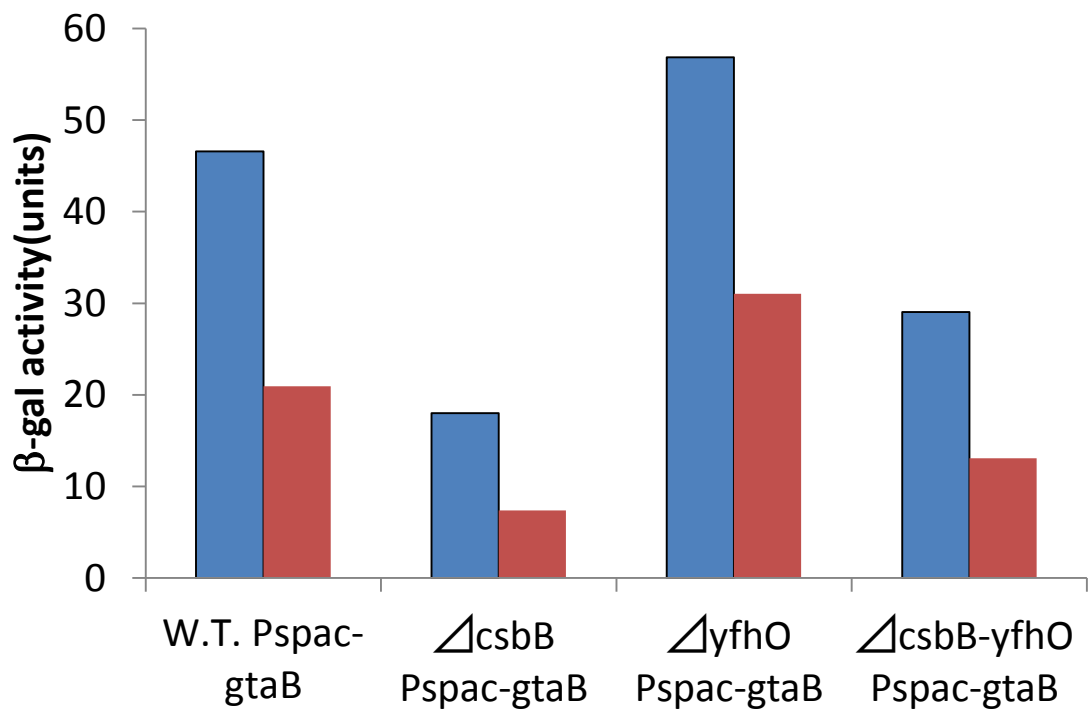


Fig. 17 UDP-Glc 合成を制限したときの SigM 活性。

UDP-Glc 合成酵素 GtaB の発現制御株の SigM 活性。各株を 1 mM の IPTG を含む LB 培地で生育させ、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 1 mM の IPTG を含むまたは含まない LB 培地に植菌して生育させ、植菌から 60、120、180 min 後に β -gal 活性を測定した。結果は 180 min 後のものを示す。青：IPTG なし 赤：IPTG あり。

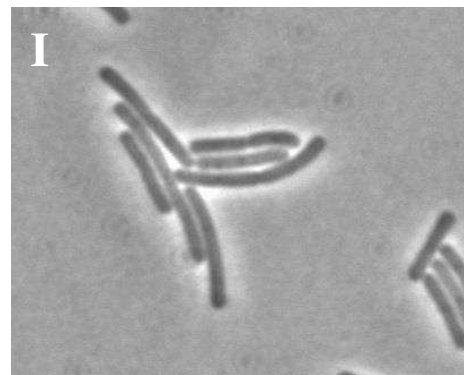
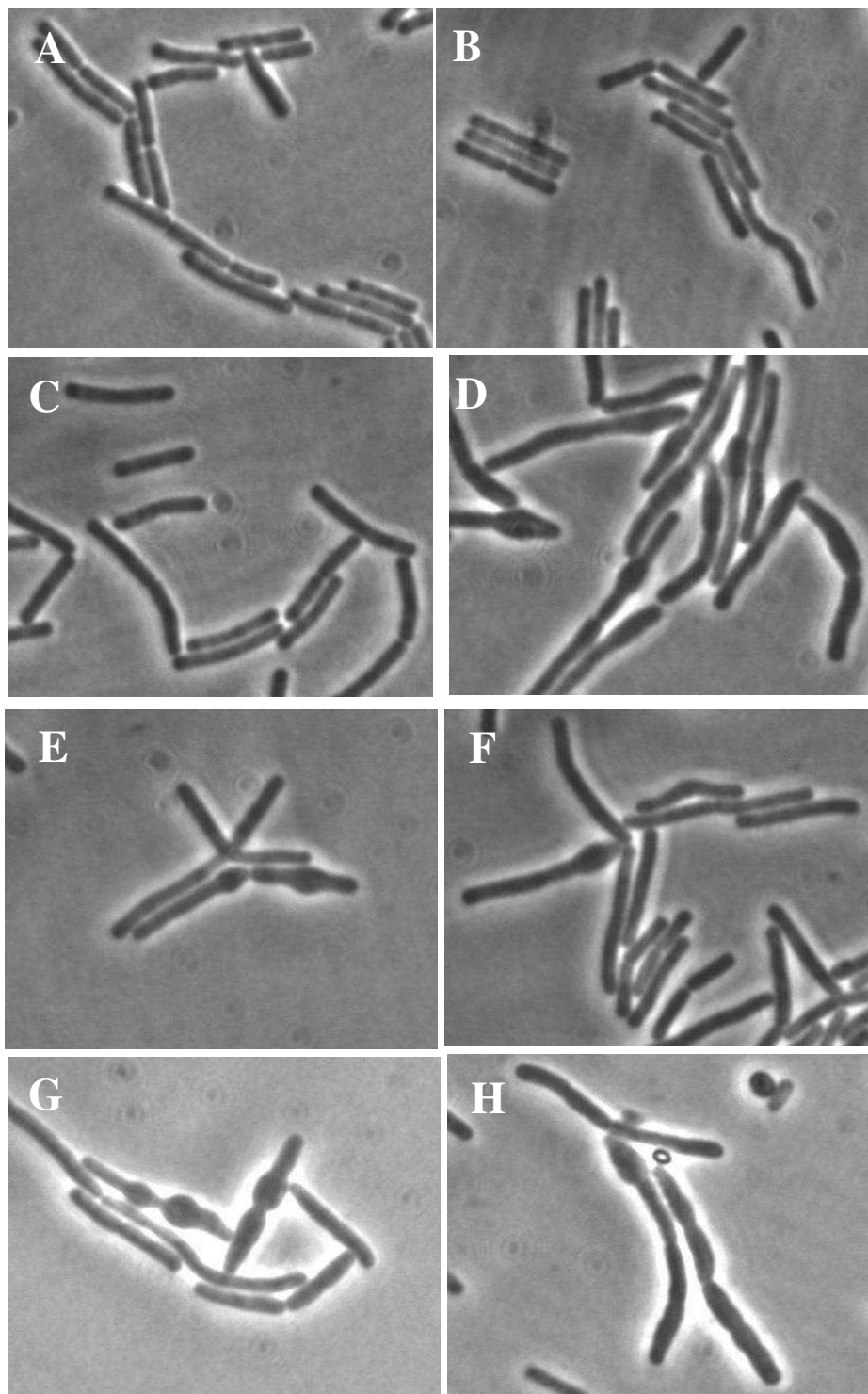
3-11. CsbB および GtrB 発現時の枯草菌細胞の顕微鏡観察

前述のとおり、GtrB はグラム陰性菌の細胞表層構造である O-抗原のグルコース修飾に関与する *bactoprenol glucosyltransferase* である。*S. flexineri* の O-抗原の修飾系には GtrB の他に、GtrA および GtrX という 2 つの酵素が関与することが知られている。GtrA は GtrB により細胞質側で糖を付加された C55-P-glucose をペリプラズム側へと転移させる flippase であり、GtrX は serotype 特異的な糖転移酵素で、C55-P-glucose から O-抗原へと glucose を転移させる【24】。このとき糖キャリアとして働いた C55-P は再び細胞質側へと回収され、再利用されると考えられている。C55-P は O-抗原の修飾以外にも、ペプチドグリカンなどバクテリア細胞にとって重要な細胞表層構造の合成の際にも糖キャリアとして利用されるため、C55-P のリサイクルは非常に重要な生体反応と言える。実際に、O-抗原の修飾系において *gtrX* 単独または *gtrA* と *gtrX* の二重欠損株において *gtrB* を過剰発現させると *S. flexineri* の生育に悪影響を及ぼすが、これは C-55P を用いる反応系が途中でストップすることによって C55-P がリサイクルされないことが原因ではないかと言われている【28】。

これまでの研究やホモロジーなどから、枯草菌 CsbB は大腸菌 GtrB と同様の機能を持ち、YfhO と強調して働いていることが示唆された。また、YfhO は GtrA や X とホモロジーがないが、巨大な膜タンパク質である点などが特に GtrX と共通している。このことから、CsbB-YfhO 系は枯草菌において GtrBAX 系と同様の反応機構を持ち、YfhO のない状態で CsbB を発現させることは、C55-P のリサイクルを阻害し、C55-P を糖キャリアとして利用するペプチドグリカンや WTA の生合成に干渉し、SigM を活性化させているのではないかと仮定した。ペプチドグリカンや WTA の生合成が阻害された細胞では、形態異常が生じることが知られていることから、CsbB および GtrB を過剰発現させたときの枯草菌の細胞を位相差顕微鏡により観察した。CsbB を発現させた細胞では、*ΔyfhO* バックグラウンドでのみ、一部の細胞が非対称に膨張する特徴的な細胞形態を示した(Fig.

18-A-D)。GtrB を発現させた株は形態異常を示さなかったが、GtrB^N-CsbB^C を発現させた場合は YfhO の有無に関らず形態異常が見られた(Fig. 18-E-F)。これは、SigM を活性化させる条件と一致する。

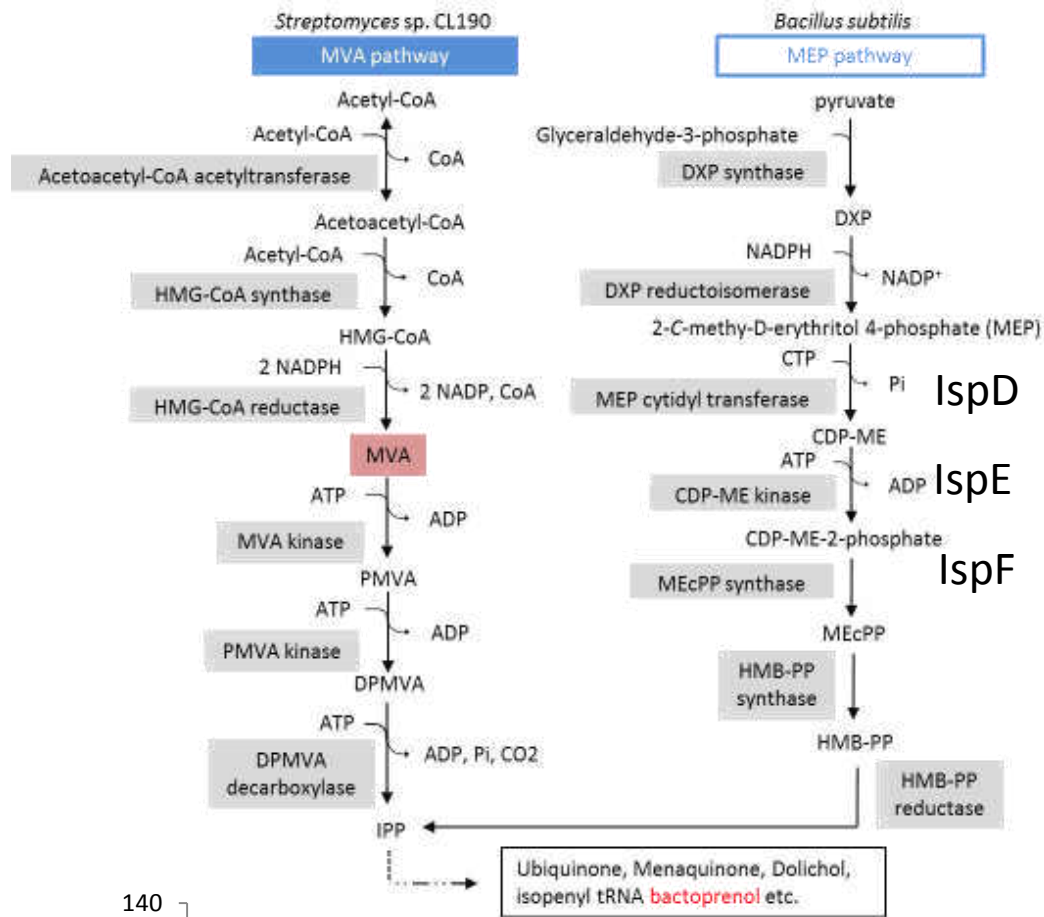
この研究で着目している C55-P はイソプレノイド系の脂質である。枯草菌においてイソプレノイド脂質は非メバロン酸経路 (MEP 経路) により合成される(Fig. 19-A および【29】)。そこで、枯草菌 MEP 経路の主要遺伝子である *ispE* および *ispDF* オペロンを IPTG 誘導プロモーターの制御化に置き、IPTG を含まない培地で生育させることでイソプレノイド系脂質の合成を制限した細胞の形態観察を行った。どちらの株においても、-IPTG の条件で 各糖転移酵素を過剰発現させたときと似た形態変化を生じていた(Fig. 18 G-H)。これに加えて、イソプレノイドの合成を制限した条件では、SigM の活性化が起こっていた(Fig.19-B)。これらの結果は、CsbB は GtrB と同様に C55-P を基質にしていることを示唆している。



5 μ M —

Fig. 18 CsbB 過剰発現および イソプレノイド合成制限株の細胞の位相差顕微鏡観察。(A) HRI017(W.T. CsbB) IPTG なし (B) HRI017 IPTG あり (C) HRI019(Δ *csbB-yfhO* CsbB) IPTG なし (D) HRI019 IPTG あり (E) HRI023(W.T. GtrB^N-CsbB^C) IPTG あり (F) HRI025(Δ *csbB-yfhO* GtrB^N-CsbB^C) IPTG あり。各株を LB 培地で培地で生育させ、O.D.600 = 0.2~0.3 で培養液を二等分し、片方に終濃度 1 mM の IPTG を加えて 90 min 後に顕微鏡観察を行った。(G) Pspac-*ispE* IPTG なし (H) Pspac-*ispDF* IPTG なし。各株を 0.1 mM の IPTG を含む LB 培地で生育させ、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 1 mM の IPTG を含むまたは含まない LB 培地に植菌して 90 min 後に顕微鏡観察を行った。(I) 168 株。対数増殖期後期 (O.D.600 = 1.0 付近) で観察を行った。

A.



B.

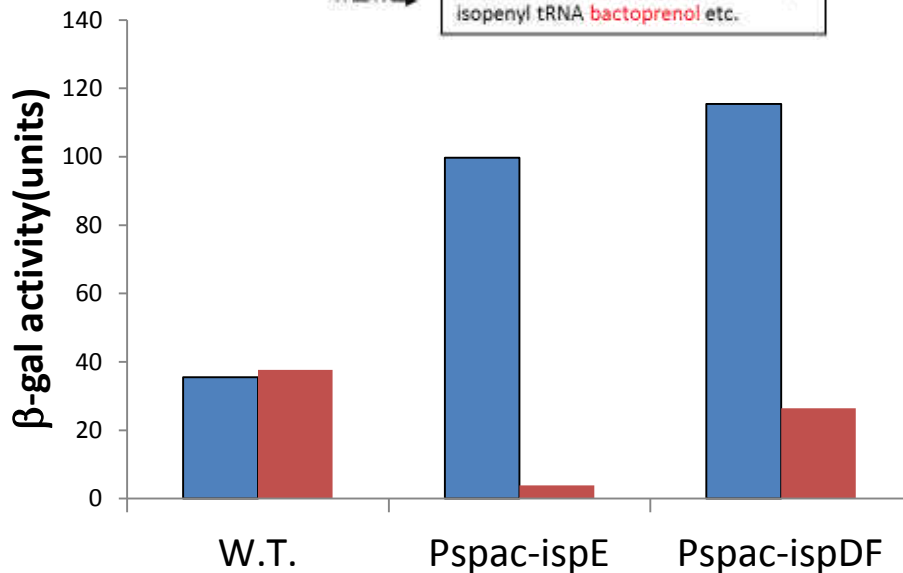


Fig. 19 イソプレノイド合成系遺伝子の発現制御株の生育と SigM 活性。

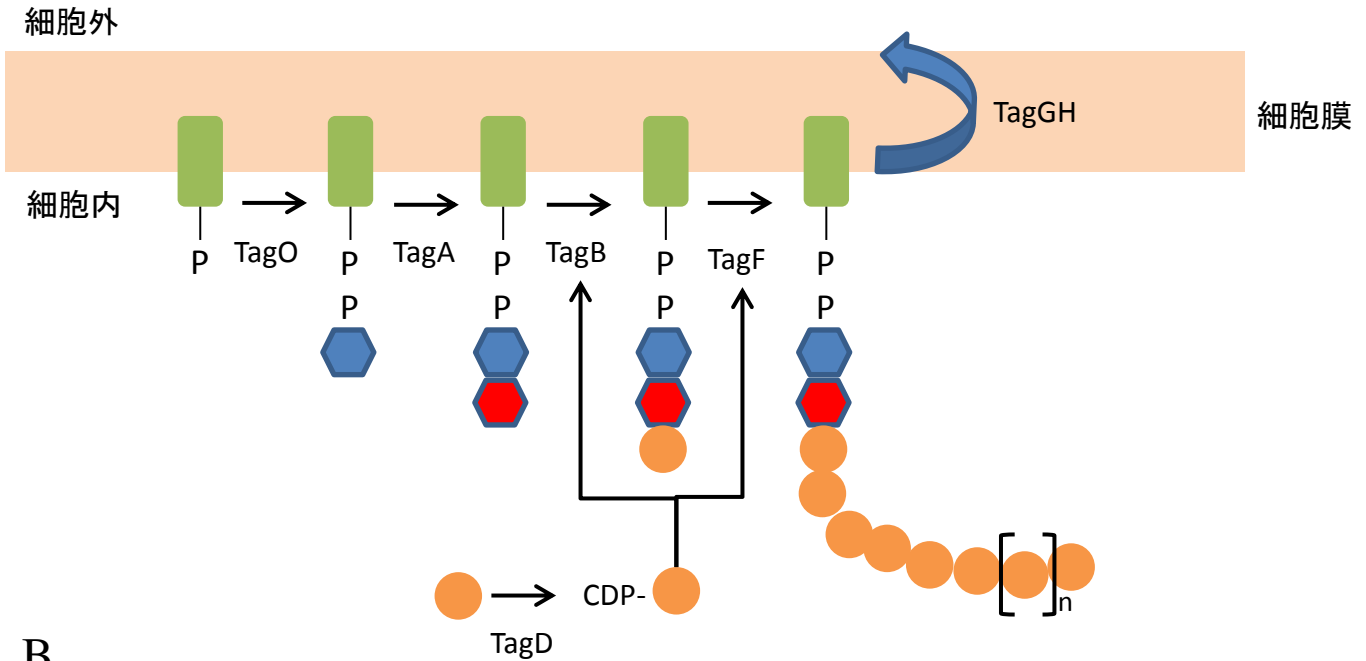
(A) イソプレノイド合成系酵素と Bactoprenol の生合成。枯草菌は右の MEP 経路のみを持つ。本実験で発現制御を行った酵素名を図中に示した。(B) イソプレノイド合成系遺伝子の発現制御株の SigM 活性。各株を 0.1 mM の IPTG を含む LB 培地で生育させ、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 1 mM の IPTG を含むまたは含まない LB 培地に植菌して生育を測定した。培養開始から 90 min 後と 180 min 後にサンプリングを行い β -gal 活性を測定し、180 min の結果を示した。青：IPTG なし 赤：IPTG あり。

3-12. WTA 生合成系による C55-P 利用と SigM の活性化

これまでの実験から、CsbB や GtrB は C55-P のリサイクルを阻害することで SigM を活性化させているのではないかと仮定した。C55-P はペプチドグリカンや WTA の合成に用いられる。C55-P のリサイクルの阻害による SigM の活性化の原因が、C55-P に糖が付加した前駆体が蓄積した結果であるのか、ペプチドグリカンや WTA の合成が滞ったからなのかは未だはっきりしていない。これを確かめるため、WTA 合成酵素遺伝子の発現抑制株を用いて次の実験を行った。

枯草菌の WTA 合成系では、C55-P に UDP-GluNAc から GluNAc を転移する TagO が初めの反応を触媒し、その後複数の酵素が関与して C55-P 上で WTA の主要構造が合成され、最後に TagT により C55-P から切り離され、ペプチドグリカン細胞壁に共有結合することで成熟した WTA となる【3】。言い換えれば、TagO 以降 TagT 以前の反応はすべて C55-P 上で行われており、この間の反応を阻害することで C55-P のリサイクルを阻害できる。一方、TagO の反応を阻害した場合は、WTA の合成はできなくなるが、C55-P のリサイクルは影響を受けないと予想される。TagO から TagT の間には少なくとも8つの酵素が関与しているが(Fig. 20-A および【7])、いくつかはオペロンを形成しているため、極性効果の影響を受けない TagB、TagF および TagO 遺伝子の発現制御株を実験に用いた。これら3つの遺伝子それぞれを IPTG 誘導プロモーターの制御化に置いた枯草菌株を IPTG を含むまたは含まない培地で生育させて SigM 活性を測定したところ、すべての株において SigM 活性の上昇が見られた(Fig. 20-B)。このことから、SigM は WTA の欠損自体に応答して活性化することがわかった。

A.



B.

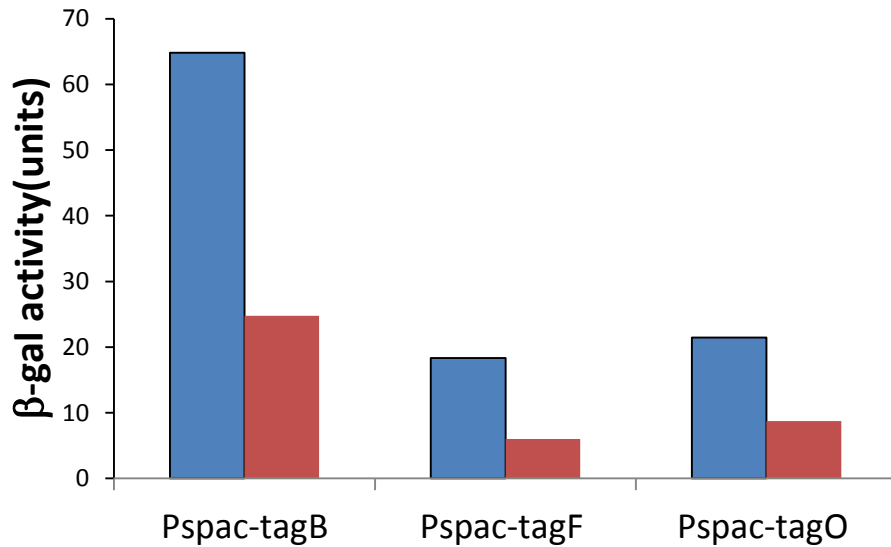


Fig. 20 枯草菌の WTA 生合成経路遺伝子の発現制御株の SigM 活性。

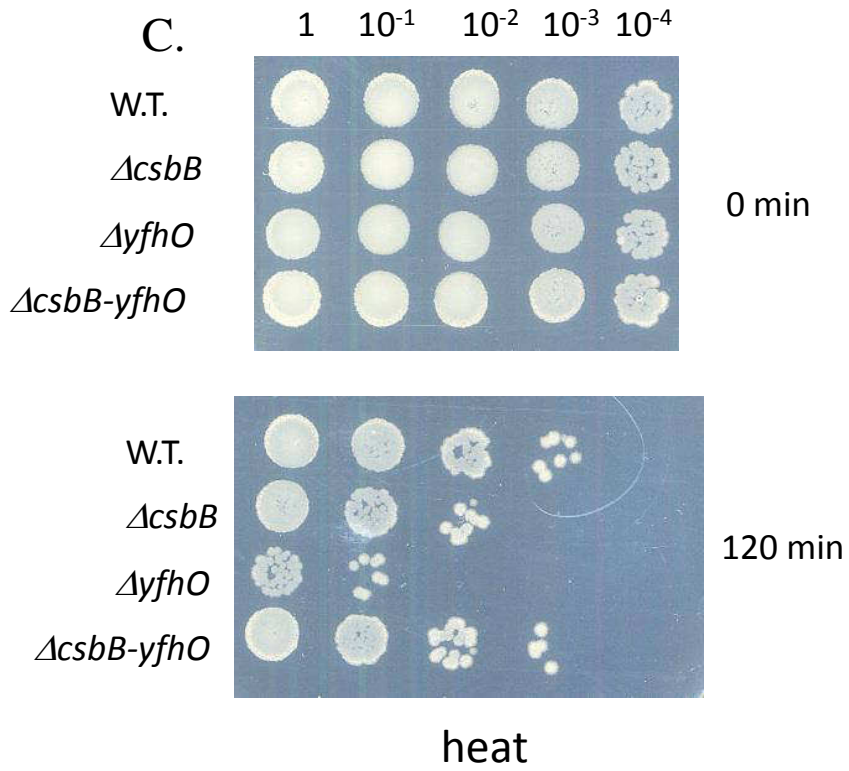
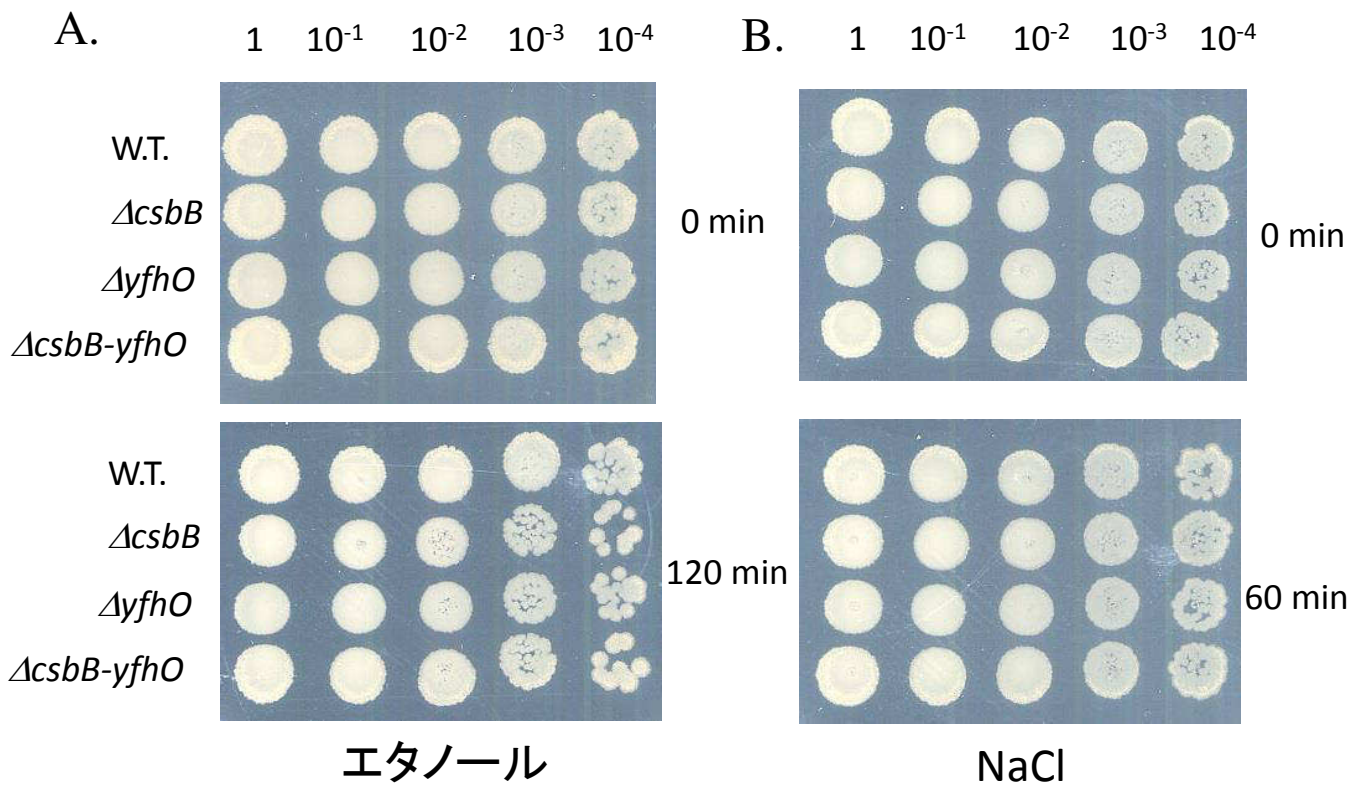
(A) 枯草菌の WTA 生合成系の模式図。●: GlcNAc ●: ManNAc ●: グリセロール-3-リン酸。Sarah E. Allison et al JBC 2011 より一部改変。(B) WTA 生合成経路遺伝子の発現制御株の SigM 活性。各株を 1 mM の IPTG を含む LB 培地で生育させ、対数増殖期に集菌して Fresh な LB 培地で 2 回 Wash し、終濃度 1 mM の IPTG を含むまたは含まない LB 培地に植菌して生育させ、植菌から 60、120、180 min 後に β -gal 活性を測定した。結果は 180 min 後のものを示す。青: IPTG なし 赤: IPTG あり。

3-13. *csbB* および *yfhO* 破壊株の表現型解析

これまでの実験では、CsbB および YfhO と SigM 活性化の関係性について解析してきた。しかし、枯草菌細胞内での CsbB および YfhO の必要性や役割は未だ明らかではない。

これを解明するため、 $\Delta csbB$ および $\Delta yfhO$ 株の表現型を解析することにした。*csbB* 破壊株については、すでに合成培地において、NaCl および エタノールストレスに対する感受性が増すことが明らかになっている【20】。この事実を受けて、今回作成した $\Delta csbB$ および $\Delta yfhO$ 株についても NaCl、エタノールおよび熱ストレスに対する感受性をテストした。また、本研究において、GtrB と CsbB が同様の機能を持つことが示唆されたため、CsbB は細胞表層の構造維持に関与するのではないかと予想し、細胞壁の合成を阻害する抗生物質 vancomycin、phosphomycin、bacitracin について、 $\Delta csbB$ 、 $\Delta yfhO$ 、 $\Delta csbB$ -*yfhO* 株について野生株と比べて抵抗性が変化するかどうかを検討した。

この結果、 $\Delta csbB$ 、 $\Delta yfhO$ 、 $\Delta csbB$ -*yfhO* 株において若干ではあるものの、エタノールストレスに対する感受性が増加した(Fig. 21-A)。今回の実験では NaCl への感受性の変化は見られなかった(Fig. 21-B)。熱ストレスに関しては、 $\Delta yfhO$ 株で感受性が上昇していたものの、 $\Delta csbB$ -*yfhO* 株では W.T. と同程度の感受性に戻っていた(Fig. 21-C)。抗生物質に関しては、 $\Delta yfhO$ 株が phosphomycin に対する耐性が増加するが、 $\Delta csbB$ -*yfhO* 株では W.T. 並みの感受性を示した。その他の抗生物質に対する明確な感受性の変化は観察できなかった(Fig. 21-D)。



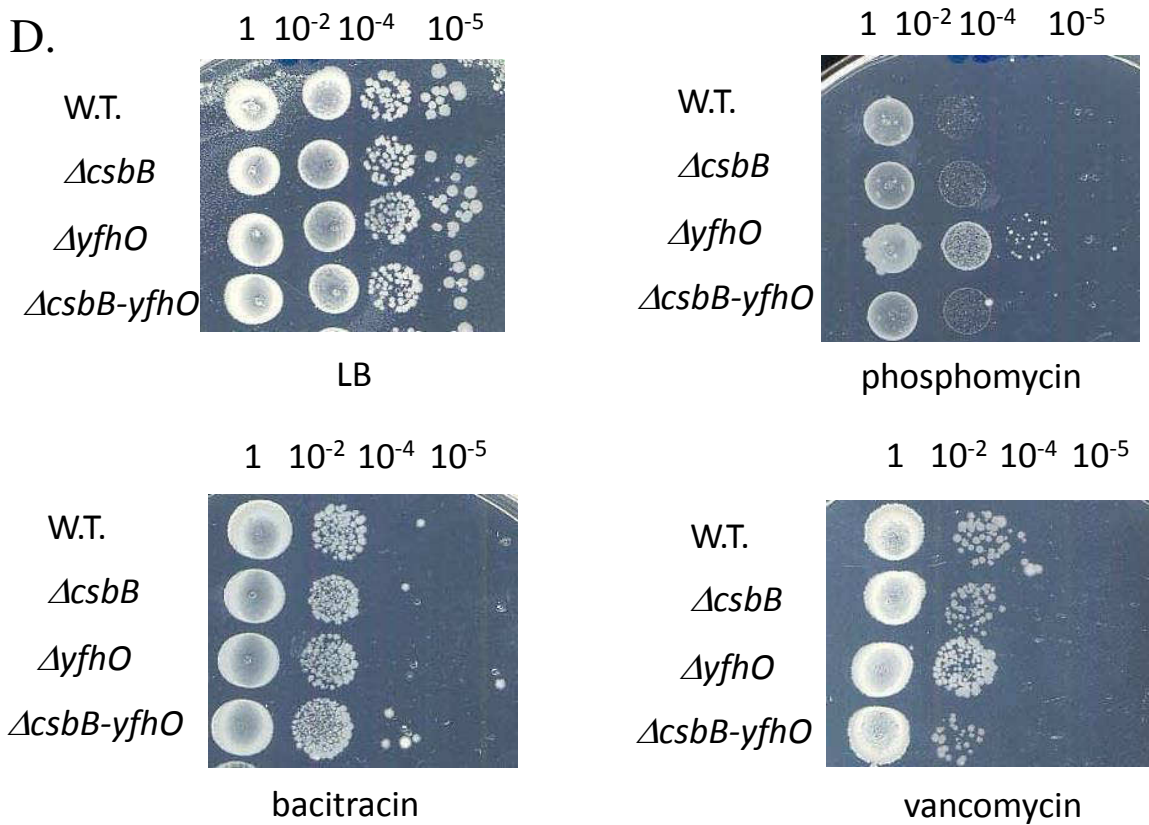


Fig. 21 *csbB* および *yfhO* 破壊株の表現型解析。

(A) エタノールストレスに対する感受性テスト。各枯草菌株を合成培地(組成は方法と材料の項を参照)で生育させ、O.D.600 = 0.45 付近で終濃度 10% になるようにエタノールを添加し、添加直前(0 min)と添加から 60、120 min 後に培養液を分取し、原液および 0.9% NaCl で 10^{-1} から 10^{-4} に希釈したものを LB 寒天培地に 5 μ l ずつスポットした。結果は 0 min と 120 min のものを示した。(B) NaCl に対する感受性テスト。各枯草菌株を合成培地で生育させ、O.D.600 = 0.45 付近で菌体を集菌して、4% NaCl を含む合成培地に再懸濁し、30 min 間プレアダプテーションを行い、菌体を集菌して 10% NaCl を含む合成培地に再懸濁し、プレアダプテーション終了時を 0 min として、30 min、60 min のサンプルを (A) と同様にスポットした。結果は 0 min と 60 min のものを示した。(C) 熱ストレスに対する感受性テスト。各枯草菌株を LB 培地で生育させ、O.D.600 = 0.45 付近で 48 $^{\circ}$ C に移し、30 min 間プレアダプテーションを行い、さらに 54 $^{\circ}$ C に移し、プレアダプテーション終了時を 0 min として、60 min、120 min のサンプルを (A) と同様にスポットした。結果は 0 min と 120 min のものを示した。各プレートは、37 $^{\circ}$ C で 16 h 培養後に写真撮影した。(D) 細胞壁合成阻害剤に対する感受性テスト。枯草菌を LB 培地で overnight 培養し、O.D.600 = 1.0 になるように滅菌水で希釈し、これを原液として 10^{-2} 、 10^{-4} および 10^{-5} に希釈し、各抗生物質を含む LB 寒天培地に 5 ml をスポットし、37 $^{\circ}$ C で 16 h インキュベートした後写真を撮影した。phosphomycin : 75 μ g/ml、bacitracin : 200 μ g/ml vancomycin : 0.2 μ g/ml。

4. 考察

4-1. 枯草菌 SigM のアンチシグマタンパク質による制御について

本研究では、すでに明らかになっている SigW の活性制御機構を参考に SigM がストレスにより活性化するときの YhdL の挙動を Western blotting により解析することで、YhdL による SigM の活性調節機構について調べようとした。枯草菌の膜画分を分取することで、YhdL タンパク質が細胞膜に局在するという実験的証拠を初めて示すことができた(Fig. 8-B)一方、NaCl ストレス条件で YhdL タンパク質の量や分子量、膜局在の明らかな変化は観察することができなかつた(Fig. 7A-C および Fig. 8)。このことから、アンチシグマタンパク質による SigM の活性制御は SigW とは異なる機構で行われている可能性が高いことが示唆された。

序論で述べたとおり、枯草菌以外に目を向けるとアンチシグマタンパク質の分解以外の活性調節機構を持つ ECF シグマ因子の例がいくつか知られている。放線菌の SigR のアンチシグマタンパク質 RsrA は HCC motif というドメインを持ち、酸化ストレスにより2つのシステインが分子内 S-S 結合を形成してで RsrA のコンフォメーション変化が生じることで SigR が RsrA の結合から外れて活性化する【16】。枯草菌 SigM は過酸化ストレスに応答して活性化することが知られているが、YhdL や YhdK タンパク質に HCC motif は見られない。他に酸化ストレスに応答することが知られている枯草菌 YlaC はそのアンチシグマ YlaD が HCC motif を持っている【16】。このことから、SigM が SigR と同様の制御機構を持つことは考えにくい。大腸菌 FecI の場合は鉄クエン酸キレート複合体を感知する外膜タンパク質 FecA のコンフォメーション変化をシグナルとしてアンチシグマ FecR と FecA が相互作用することで FecR が分解されて FecI が活性化される【15】。この系に関しては YhdL の分解が検出されておらず、枯草菌には外膜が存在しないことから、まったく同じ活性制御系を持つとは考えにくい。YhdL には相互作用を持

つタンパク質 YhdK があり、ストレス感知に関しては似た系を持っている可能性もある。

また、YhdK タンパク質の存在は SigM 活性制御機構を考える上で非常に重要であると考えられる。YhdK タンパク質は YhdL と相互作用を持つタンパク質であり【14】、*yhdK* 遺伝子の破壊により SigM 活性の恒常的な上昇が見られることが明らかにされている【13】。本研究において、*yhdK* 遺伝子の存在の有無によって、細胞内の YhdL タンパク質がどのような影響を受けるのかを western blotting により解析した。*yhdK* 遺伝子の存在しない条件では、YhdL タンパク質が検出されず、YhdL タンパク質が安定して存在できないことが示唆された(Fig.7-F)。また、*yhdK* が存在しないとき、*sigM* と *yhdL* のみのオペロンを発現させると、SigM 活性が普段の百倍程度にまで上昇していた(Fig.7-E)。本研究の実験条件では、*yhdK* が存在する条件において、ここまで高い SigM 活性を示す条件を発見できていないことに加え、ストレス条件下での YhdK タンパク質の挙動を詳細に解析できていないため、ストレスによって YhdK が分解され、その結果として YhdL のごくわずかな量の変化が生じて SigM が活性化しているということは否定できていない。しかし、少なくともストレスにより YhdL が検出できなくなることはなかったことから、YhdK についても、ストレス時にプロテアーゼなどによる積極的な分解を受けているとは考えにくいと思われる。

また、NaCl 以外のストレスによる SigM 活性化時の YhdL タンパク質の挙動を解析することで新たな知見が得られる可能性がある。近年、枯草菌 SigW のアンチシグマタンパク質 RsiW は放線菌 SigR のアンチシグマタンパク質 RsrA と同じく HCC motif を持つことが示され【16】、実際に SigW は酸化ストレスに応答することから、同じシグマ-アンチシグマ系でも応答するストレスによって応答メカニズムが異なる可能性がある。しかし、後述するが、少なくとも *yfhO* 破壊条件において SigM が活性化する際には YhdL の分解は見られなかった(Fig. 13-B)。

これらのことから、SigM のアンチシグマタンパク質による活性制御系は未知であるが、

現在のところ YhdK の存在などから 1 つの制御系として、YhdL のコンフォメーション変化により調節されている可能性を想定している。また、当研究室での解析により、SigM を過剰発現すると、枯草菌細胞に毒性を示すことが明らかになっている。このため、SigM はストレス時に活性化しなければならないが、活性化しすぎても細胞に悪影響を与えてしまうというジレンマをかかえていることになる。SigM は補助因子である YhdK を含めた他にはない複雑な制御系を持つことにより、活性の微妙な調節を可能にし、枯草菌の生存に寄与しているのかもしれない。

本研究では SigM 活性化時の YhdL の変化を検出できなかったことから、逆に人工的に YhdL に変化を与えることで SigM の活性制御に関する実験を考え、株の構築を進めている。具体的には、当研究室の研究により、アンチシグマタンパク質の膜貫通領域の長さがアンチシグマの機能に重要であることが明らかにされたため【30】、膜貫通領域の長さを変化させた YhdL タンパク質を発現させる系を考えている。また、本研究で YhdL タンパク質が膜に局在することを示したが、酵母ツーハイブリッド法による YhdL と SigM の相互作用領域から、YhdL は細胞質側に N 末端側、細胞外に C 末端側が位置すると予測されている。YhdL が C 末端側で細胞外ストレスを感知することも想定し、C 末端領域を欠失した YhdL を発現させて SigM のストレス応答を研究することを試みている。

4-2. CsbB および YfhO の機能について

本研究では、トランスポゾンミュタジェネシスを用いた解析により、SigM 活性に影響を与えることが明らかになった機能未知の膜タンパク質、CsbB および YfhO の解析から、枯草菌の細胞表層統合性維持機構について新たな知見を得ようと試みた。

はじめに、先行研究の追試を行うとともに、*csbB* と *yfhO* の存在下または非存在下での SigM 活性化の詳しいプロファイルを調査した。*yfhO* 遺伝子のトランスポゾン挿入破壊株や、プラスミド (pMutin) 挿入破壊株において、SigM が活性化することを示した先行研究では、YfhO タンパク質の機能が失われたことにより SigM が活性化しているのか、ゲノム上の DNA 配列が分断されたことで、極性効果などにより *yfhO* 遺伝子以外の因子の発現が失われ、SigM 活性に影響を与えているのかははっきりとわかっていなかった。そこで、プラスミドに *yfhO* 遺伝子全長をクローニングし、トランスポゾン挿入破壊株に導入して、相補実験を行ったところ、プラスミドから *yfhO* を発現させることで、トランスポゾン挿入破壊株で見られていた SigM 活性の上昇が見られなくなった(Fig. 9-B)。このことから、SigM 活性の上昇は、YfhO タンパク質の機能が失われたことに起因すると考えられる。

次に、*csbB* と *yfhO* それぞれの遺伝子、または両方の遺伝子を欠失させた株を新たに作成し、SigM 活性を測定したところ、YfhO 非存在下における SigM の活性化は、*csbB* 遺伝子の存在に依存していることが確かめられた(Fig. 11-A)。このことは、プラスミドを用いて *csbB* を人工的に発現させる実験で確かめられた(Fig. 11-B)。これらの実験から、CsbB と YfhO は、機能的に相互に関係していることが強く示唆された。

これらの結果を受けて、CsbB と YfhO のタンパク質間の相互作用を解析した。また、CsbB と YfhO の発現は、SigM 活性に影響を与えていることから、SigM とそのアンチシグマタンパク質 YhdL および SigM 活性に影響を与える YhdK についても、網羅的に相互作用を解析した。解析には、BACTH 法を用いた。まず、既知の相互作用については、

SigM と YhdL の相互作用が検出されたが、YhdL と YhdK の相互作用は検出できなかった(Fig. 12-B)。この理由は不明であるが、大腸菌内でのタンパク質の共発現がうまくいっていない可能性や、adenylate cyclase のサブユニットを fusion させたことで、本来あるはずの相互作用が起こらなくなった可能性が考えられる。その他にも、膜タンパク質のトポロジーが原因で相互作用が検出できないことも考えられる。YhdL と YhdK はそれぞれ膜貫通ドメインを1つおよび3つ持つと予測されている。膜貫通の回数が奇数回であれば、通常 N 末端または C 末端のどちらかが細胞質側、もう一方がペリプラズム側に向いている。2つのタンパク質それぞれの N 末端もしくは C 末端に adenylate cyclase のサブユニットを融合させた場合、2つのタンパク質に相互作用があったとしても、サブユニットの片側が細胞外、もう片方が細胞内にある場合には、cAMP の合成が起こらず、レポーター遺伝子の発現が起こらないことが考えられる。また、2つのサブユニットが両方とも細胞外にある場合には、仮に cAMP の合成が起こったとしても、細胞外に拡散してしまうことも考えられる。YhdL については、酵母ツーハイブリッドの実験結果から、N 末端側で SigM と相互作用することが示されており、SigM が細胞質タンパク質であることから、N 末端側が細胞質内にあると考えられている【14】。今回の実験で SigM と YhdL の相互作用が見られたのも、YhdL の N 末端側に T25 ドメインを融合させた場合であり、過去の結果と矛盾しない。ただし、YhdL と YhdK の例についてはどの組み合わせでも相互作用が検出されず(データ未掲載)、この例には当てはまっていないため pull-down assay などを用いた相互作用解析や、大腸菌内でのタンパク質の発現、局在の確認が必要である。

次に、未知の相互作用を検出するため、CsbB と YfhO を含めて相互作用解析を行った結果、CsbB と YfhO、YfhO と YhdK に相互作用が検出された(Fig. 12-C)。また、CsbB どうし、あるいは YfhO どうしでも相互作用が検出された(Fig. 12-C)。YfhO は膜貫通ドメインを13個、CsbB は2つ持っていると予測されており、CsbB は、相同性のある GtrB と同様と考えると、タンパク質の両端とも細胞質側にあると予測される。このことは、CsbB

どうしの相互作用がどの組み合わせでも検出されていることと一致する。YfhO の相互作用が一部の組み合わせでしか見られないのは、トポロジーもしくはタンパク質の発現の問題だと考えている。これらの結果から、CsbB と YfhO が相互作用することが示唆され、前述の CsbB と YfhO の機能的な相関関係を裏付ける結果となった。さらには、YfhO と YhdK 間にも相互作用が検出されたことから、CsbB や YfhO は、YhdK を通じて YhdL や SigM と巨大な複合体を形成し、SigM の活性を制御している可能性も示唆された。

この結果から、YfhO 欠損条件で、SigM が活性化するとき、アンチシグマタンパク質 YhdL や、YhdK が分解されている可能性を考慮し、これらの条件で、細胞内の YhdL および YhdK タンパク質の量を、ウェスタンブロッティングにより解析した。これらの条件では、SigM の活性化は見られたが、YhdL および YhdK の量の明らかな減少は見られなかった(Fig. 13-B&D)。このことから、CsbB や YfhO による SigM の活性化機構は、YhdL や YhdK の分解は介していないことが示唆された。本研究では、BACTH において YfhO と YhdK の間に相互作用が検出された意味について明らかにするには至っていないため、さらなる解析、確認が必要であると考ええる。

また、CsbB や YfhO が YhdK を介して 直接 SigM の活性制御に関与している可能性が考えられたため、次に、CsbB や YfhO が存在しないときに、SigM のストレスによる活性化が起きるかどうかを検証した。その結果、SigM は *csbB* や *yfhO* を欠損させた株においても、NaCl、エタノール、酸、vancomycin に応答して活性化した(Fig. 14-A-D)。少なくとも試験した条件では CsbB や YfhO は SigM のストレス応答に必須ではないことが明らかとなった。

次に、CsbB の機能解析から、CsbB 発現時に SigM が活性化する理由に迫ろうとした。CsbB はグラム陰性菌の O 抗原の糖修飾に関与する bactoprenol phosphate glucosyltransferase、GtrB と高い相同性を持っていた(Fig. 16-A)。このことから、CsbB は GtrB に近い機能を持つと予測された。そこで、CsbB を含めて GtrB に近い糖転移酵素

素に保存されているいくつかの Asp 残基についてアラニンに置換した CsbB タンパク質をプラスミドから発現させ、SigM 活性の上昇が起こるかどうかを検証した。その結果、アラニン置換をもつ変異型 CsbB を発現させた場合は SigM の活性化は見られなかった (Fig. 16-B)。このことから、CsbB による SigM の活性化は、CsbB の糖転移酵素としての活性に依存している可能性が示唆され、CsbB が糖転移酵素であるという仮定を支持する結果となった。

次に、大腸菌の GtrB を枯草菌内で発現させたとき、CsbB の場合と同じく SigM の活性化が起こるかどうかを検討した。その結果、GtrB をプラスミドから発現させた場合にも、CsbB の場合ほど顕著ではないものの、SigM の活性化が起こった (Fig. 15-B)。また、GtrB の活性ドメインと CsbB の膜貫通領域を持つキメラタンパク質を用いた実験により、GtrB の効果が CsbB より弱いのは、タンパク質の膜への局在、もしくは発現レベルの問題であり、GtrB の活性でも CsbB と同等程度に SigM を活性化できることを示唆した (Fig. 15-C)。

ここで、GtrB の活性ドメインを持つタンパク質 (GtrB および GtrB^N-CsbB^C) を発現させた場合の SigM の活性化は CsbB の場合と異なり、YfhO の有無に依存していなかった (Fig. 15-B&C)。この理由について現段階で2つの仮説を立てている。1つは、CsbB と GtrB の機能は同じであるが、YfhO と GtrB 間ではタンパク質相互作用ができないという可能性である。これを確かめるには、GtrB についても BACTHなどで YfhO との相互作用を解析する必要がある。もう1つは、CsbB と GtrB の機能が異なるという場合である。アミノ酸配列の類似性やキメラタンパク質を用いた実験から、CsbB と GtrB は似た機能を持つことが予想できるが、GtrB と相同性を持つタンパク質には、グルコース以外の糖を C55-P に付加するものがいくつか知られている。たとえば、大腸菌の ArnC は GtrB と約 30% の相同性と約 50% の類似性を持つが C55-P に 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose を付加し【31】、グラム陰性菌 *Francisella novicida* の

FlmF2 は C55-P に N-acetylgalactosamine を付加する【32】。これらの酵素が反応に利用する糖をどのように区別しているかははっきりとわかっていないが、N 末端側に DxD motif を含む活性部位を持ち、C 末端側に膜貫通ドメインを2つ持つこと、糖の転移先として C55-P を利用すること、基質として UDP-sugar を利用することが共通している。CsbB にも DxD motif や2つの膜貫通領域が保存されている。さらに、イソプレノイド合成系の酵素の発現を抑制した株と CsbB 過剰発現株の比較実験から、CsbB は C55-P を利用している可能性が高いことが示唆された。これらの酵素の中で タンパク質全体として CsbB と最も高いホモロジーを持つのは GtrB であるが、CsbB がグルコース以外の糖を C55-P に転移する可能性は十分に考えられる。YfhO は CsbB との間に遺伝学的な機能の相関が見られるため、CsbB および YfhO がグルコース以外の糖を認識するために、GtrB と YfhO 間に遺伝学的な相互作用が見られなかった可能性がある。UDP-Glc の生合成を制限した株でも CsbB による SigM の活性化が起こっていたこと(Fig. 16)からもこの仮説がある程度支持される。CsbB および YfhO がどのような糖を認識するかを詳細に解析するためには、2つの膜タンパク質の精製やラジオアイソトープを使用した糖転移実験が必要となるため、これは今後の課題である。

次に、CsbB-YfhO 系の本来の役割について考察する。枯草菌の *csbB* 遺伝子については前述のとおり、一般ストレス応答シグマ因子 SigB と細胞表層に関連する抗生物質に応答する ECF シグマ因子 SigX に認識されるプロモーターから転写されることが明らかにされており、このうち SigB 認識プロモーターからの転写は NaCl ストレスに応答して活性化することがすでにわかっている【22,23】。また、*csbB* の破壊株についてはエタノールおよび NaCl ストレス下で viability が低下することが実験的に示されており【20】、エタノール ストレスによる viability の低下は本研究の追試でも見られていた(Fig. 21-A)。NaCl による viability の低下は本研究で再現することはできなかった。これは、細かな培養条件の違いや遺伝子破壊の方法に起因している可能性があり、さらなる条件検討が必要である。

枯草菌 *yfhO* 遺伝子破壊株の表現型については今まで研究されていなかったが、本研究において、エタノールストレス条件で *csbB* 破壊株と同様に *viability* が低下することを示した(Fig. 21-A)。*csbB-yfhO* の二重破壊株についてもエタノールストレスにより *viability* が低下するという結果が得られた(Fig. 21-A)。これらの事実から CsbB-YfhO はストレスに応答して発現し、枯草菌のストレス応答に一定の役割を果たしていることが示された。

また、熱ストレスおよび細胞壁合成阻害剤 phosphomycin に関しては、 $\Delta yfhO$ 株で感受性の変化が見られるが、 $\Delta csbB$ および $\Delta csbB-yfhO$ 株では W.T. と似た表現型を示すという結果が得られた(Fig. 21-D)。phosphomycin の耐性メカニズムは、抗生物質の取り込みに関与する遺伝子の破壊および phosphomycin の分解系が知られるが【33, 34】これらの変異により耐性を示したのならば、糖転移酵素をコードする可能性が高い *csbB* の破壊で感受性がもとに戻ることは考えにくい。むしろこれは SigM 活性の上昇と似ており、CsbB-YfhO の機能の欠損というよりはむしろ C55-P のリサイクルが阻害されるという CsbB のみが発現しているときの細胞の状態を反映していると考えられる。同じ細胞壁合成阻害剤でも、vancomycin や bacitracin では $\Delta yfhO$ 株において phosphomycin のように耐性が変化するという効果は得られなかった(Fig. 21-D)。vancomycin や bacitracin は C55-P のリサイクルを阻害するが、phosphomycin は C55-P とは無関係の細胞壁合成ステップを阻害する(Fig. 2)。このことが、 $\Delta yfhO$ 株における表現型の違いにつながっている可能性も考えられるが、結論を出すには他の様々な細胞壁阻害剤を用いて実験を行う必要がある。

また、データベースを用いた解析により、*csbB-yfhO* 遺伝子は他のグラム陽性菌にもよく保存されていることが明らかになった(Fig. 22)。このことから、*csbB-yfhO* はグラム陽性菌に一般的な新たな糖転移システムである可能性がある。なお、一部のグラム陽性菌では、*csbB* と *yfhO* の間に グラム陰性菌 Gtr 系に見られる GtrA 様のタンパク質をコードする遺伝子を持っている (*gtrA-like* と表示)。GtrB と CsbB が類似の酵素であるとい

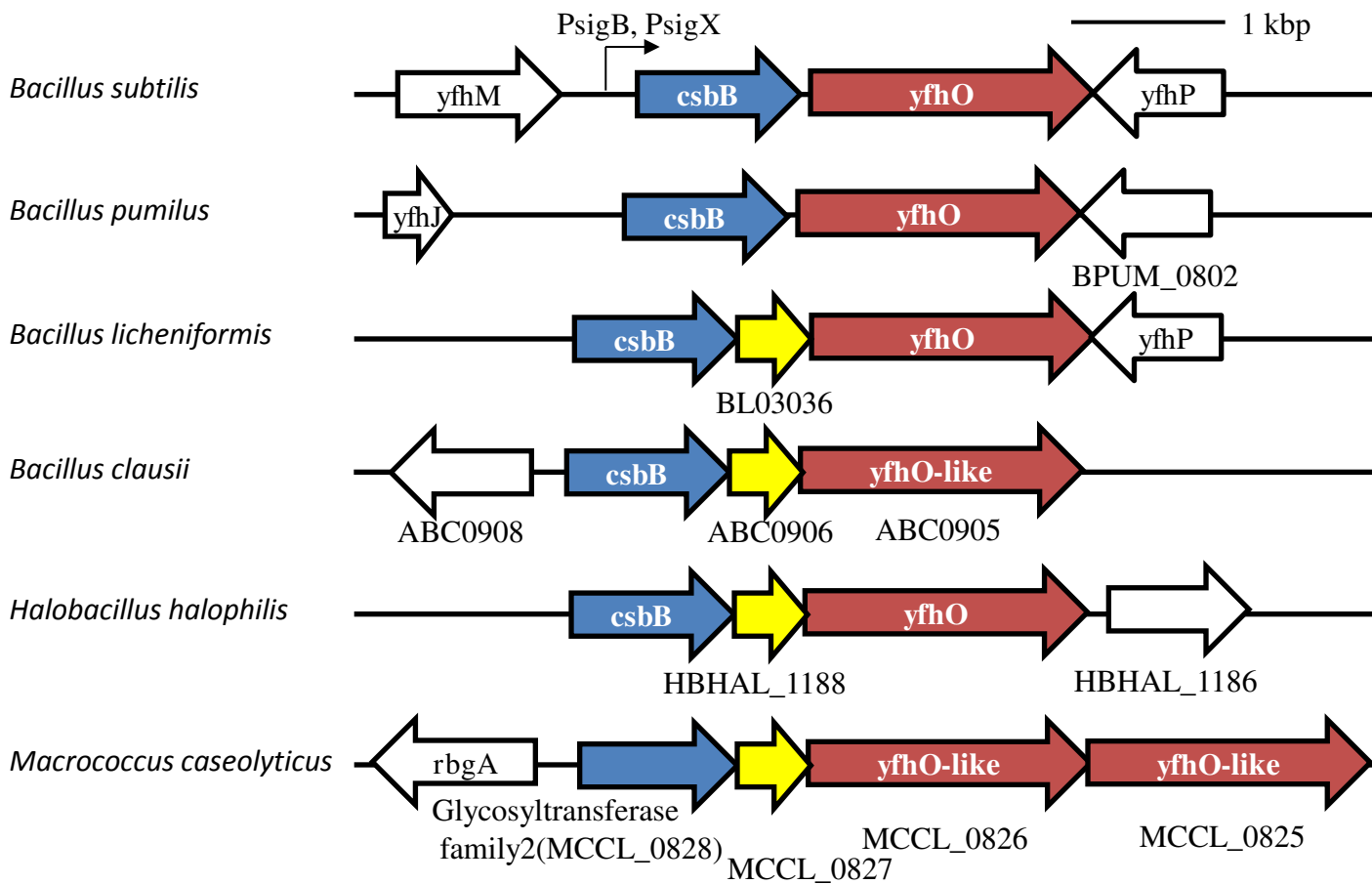


Fig. 22 *Bacillus* 属およびグラム陽性菌における *csbB* と *yfhO* の保存性。
CsbB および *CsbB* と相同性を持つ Glycosyltransferase family 2 タンパク質をコードする遺伝子を青で示した。*YfhO* および *YfhO* motif を持つタンパク質をコードする遺伝子 (*yfhO-like* と表記) をコードする遺伝子を赤で示した。持っている場合は、*GtrA-like* とデータベース上でアノテーションされたタンパク質をコードする遺伝子を黄色で示した。その他の近傍に存在する遺伝子は白で示した。ゲノムマップは、KEGG genome database (<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>) に従って作成した。

う本研究の示唆を踏まえると、グラム陽性菌における *gtrB-gtrA-gtrX* というグラム陰性菌における遺伝子配置が *csbB-gtrA-yfhO* というグラム陽性菌の遺伝子配置に対応しており、この2つの系はもともと同一のシステムであった可能性が高いと思われる。グラム陰性菌の O-抗原の修飾系が3つの酵素を必要とするのに対して、枯草菌や一部の *Bacillus* 属細菌は *gtrA-like* 遺伝子を持っていないが、SigM の活性化や細胞形態に与える影響を見る限り、少なくとも枯草菌においては *csbB* と *yfhO* 2つの遺伝子で機能が完結しているように見える。枯草菌内では未知の酵素が GtrA (flippase) の役割をしているか、もしくは YfhO が GtrA としての働きも持つのかかもしれない。これらの知見から、CsbB-YfhO はグラム陽性菌に広く分布する新奇なストレス応答性の細胞表層構造糖修飾システムであることが示唆された。CsbB-YfhO 系が枯草菌細胞表層のうち、どの構造に糖を付加するシステムであるかは本研究内で明らかになっていないが、現在のところグラム陰性菌の O-抗原の構造的なアナロジーである WTA や LTA を想定してさらなる研究を進めている。

一方、枯草菌内に目を向けると、YkcC と YkoT という CsbB のホモログが存在している(Fig. 23-A)。これらのタンパク質についても実験的に機能は証明されていないが、ともにいくつかのデータベース上で glycosyltransferase family 2 に分類されており、DxD motif や2つの膜貫通領域を持つなど CsbB と共通点が見られる。*ykcC* および *ykoT* の上流にはそれぞれ *ykcB*, *ykoS* という巨大な膜タンパク質をコードする遺伝子を保持している(Fig. 23-B)。YfhO とこれら2つの膜タンパク質に明確な相同性は見られないものの、予想される膜貫通領域の数は YkcB が14、YkoS が8であり、13の膜貫通ドメインを持つと予測される YfhO とある程度近い。さらに、株の確認が取れていないため予備的なデータではあるが *ykcB* 破壊株において *ykcC* を人工的に発現させると SigM が活性化するという結果が得られている(データ未掲載)。この結果は *csbB-yfhO* の関係によく似ている。一方、*ykoS* 破壊株において *ykoT* の発現を誘導した場合は SigM の活性化は確認できなかった(データ未掲載)。*ykcB* と *ykcC* はオペロンを形成し

A.

```

YkcC 1 MSR-HIQY SIVVVPVYNEELVTHET YQR LKEVMD-----QTKE NYEL L FVNDGSKDRST E
YkoT 1 MKQSQPVL IIVVPCVNEEEV FQETSHQLTEV VDD IEEKLIAEBSKILFV D GSKDR TWA
CsbB 1 --MKQGLI SIIITPSYNEGYNVR LIHES LKKEFKNI-----HYDYET F FVNDGSMV DDTIQ

YkcC 54 LLRFHS I D P R V K I I D F S R N F G H Q I A T T A G M D Y A Q G --N A I V V I D A D L Q D P P E L I I E M T E
YkoT 61 L I A M E S I R N K R V T G K L A C N V G H Q A L L A G L H K A K N R S D C V I S I D A D L Q D D I S V I R D F M L
CsbB 53 Q I K I L A A T C S R V K Y I S F S R N F G K E A A I L A G F E H V Q G --E A V I V M D A D L Q H P T Y L L K E F I K

YkcC 112 K K E G Y E V V Y A V R T K R K G E T F F K K Q T A A M F Y R L L S G M T D I D I P I D T G D F R L M D R K K V C E M
YkoT 121 K Y H E G C E I V Y G V R R S R K T D T F F K R T T A L G F Y R L M N - K I G I K L I Y N H A D F R L M N K R S L E E L
CsbB 111 G Y E G Y D Q V I A Q R - N R K G D S E V R S L L S S M Y Y K F I N K A V E V D L R D G V G D F R L L S R Q A M N A L

YkcC 172 K R L R E K N P F V R G L V S W G F K Q T A V E Y V R D E R L A G E T K Y P L K K M L K L S M D G I T I F S H K P L K
YkoT 180 E R Y P E A N L F L R G I V P M I G F R S A E V I Y D R K E R F A G K T K Y P L K K M L S F A F N G I T S F S V A P I R
CsbB 170 L K L S E G N R F S K G L F C W I G E D C K I V F Y E N V E R K N G T S K W S F S S I F N Y G M D G V V S F N H K P L R

YkcC 232 L A S Y A G I L M S G T G F L Y M F I V L Y L K L F T D S T I T G W S S L I V I Q L L F S G I V L L I L C V I G E Y I G
YkoT 240 F F I L L G F V I F F L S A V A G I G A F I Q K L L G - H T N A G W A S L I I S E W F L G G L Q L M G I G I G E Y I G
CsbB 230 L C F Y T G I F L L L S I I Y I I A T F V K I L T N G I S V P C Y F T I I S A W L F L G G V Q L L S L G I G E Y I G

YkcC 292 R I Y D E A K D R P ----- L Y I V Q K S Y G I E N K R I Y R D H M S
YkoT 299 T I E S E V K R R P K Y A I D I D - L Y N E Q L S P L O R E K E R L K K Y S
CsbB 290 R I Y V E T K R R P H Y L I K E A N P N K D L P E T N E L K S M R R L T K M H

```

B.

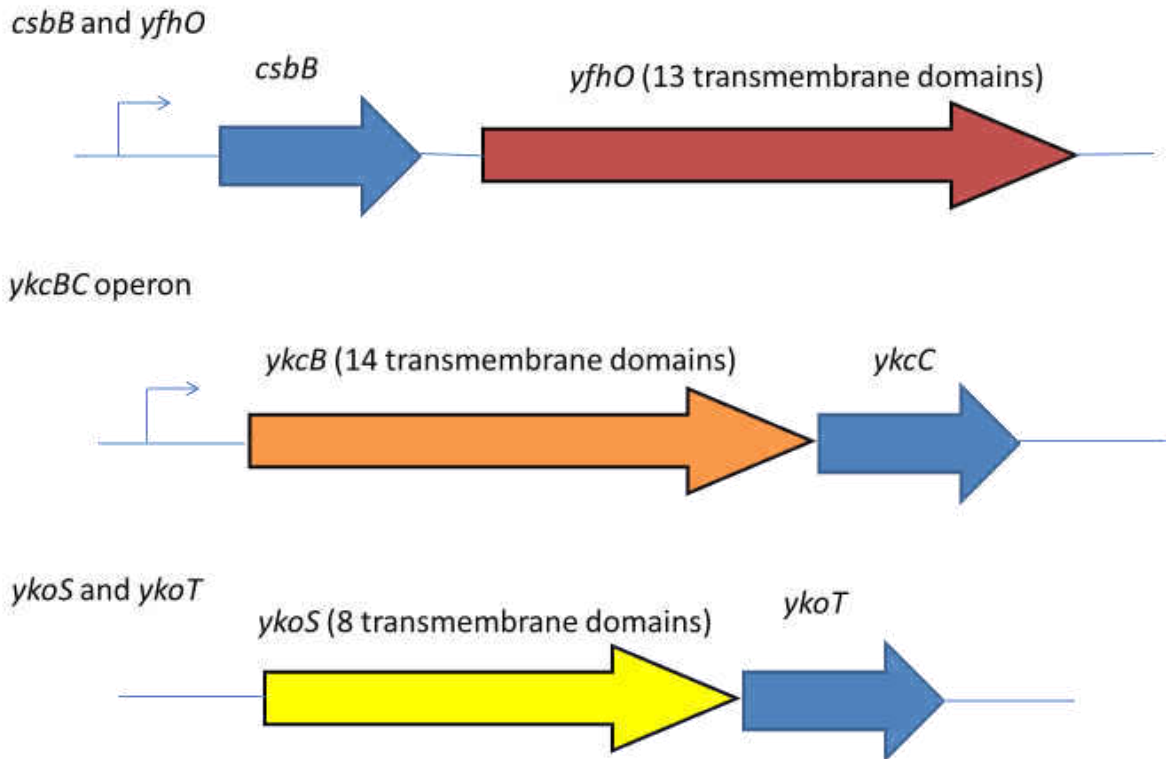


Fig. 23 枯草菌内ゲノム内の *CsbB* ホモログをコードする遺伝子と *csbB* の比較
 (A) *CsbB* とそのホモログ *YkcC* および *YkoT* のアライメント。アライメントは ClustalX2
 プログラムを用いて行い、BOX SHADE サーバー
 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) の機能を用いて相同部位を影で示した。
 各配列は UniprotKB データベースから取得した。データベース上の Entry ID は次の通り。
CsbB ; Q45539, *YkcC* ; O34319, *YkoT* ; O34755。
 (B) *csbB*, *ykcC* および *ykoT* のその近傍に位置している巨大な膜タンパク質をコードする遺伝子。ゲノムマップは BSORF
 データベース(<http://bacillus.genome.ad.jp/>) に従って作成した。

ており、機能未知の二成分制御系 YrkQP と YclJK により制御されていることが実験的に示唆されている【35,36】一方、*ykoS* および *ykoT* の転写制御については明らかにされていない。二成分制御系は ECF シグマ因子と並んで細菌のストレス応答に寄与する転写制御システムであるため、枯草菌は細胞外ストレスに応じて細胞表層の糖修飾を変化させることで千変万化する環境に適応しているのかもしれない。CsbB-YfhO 系の機能の予測図と CsbB による SigM 活性化のモデル図を Fig. 24 に示した。

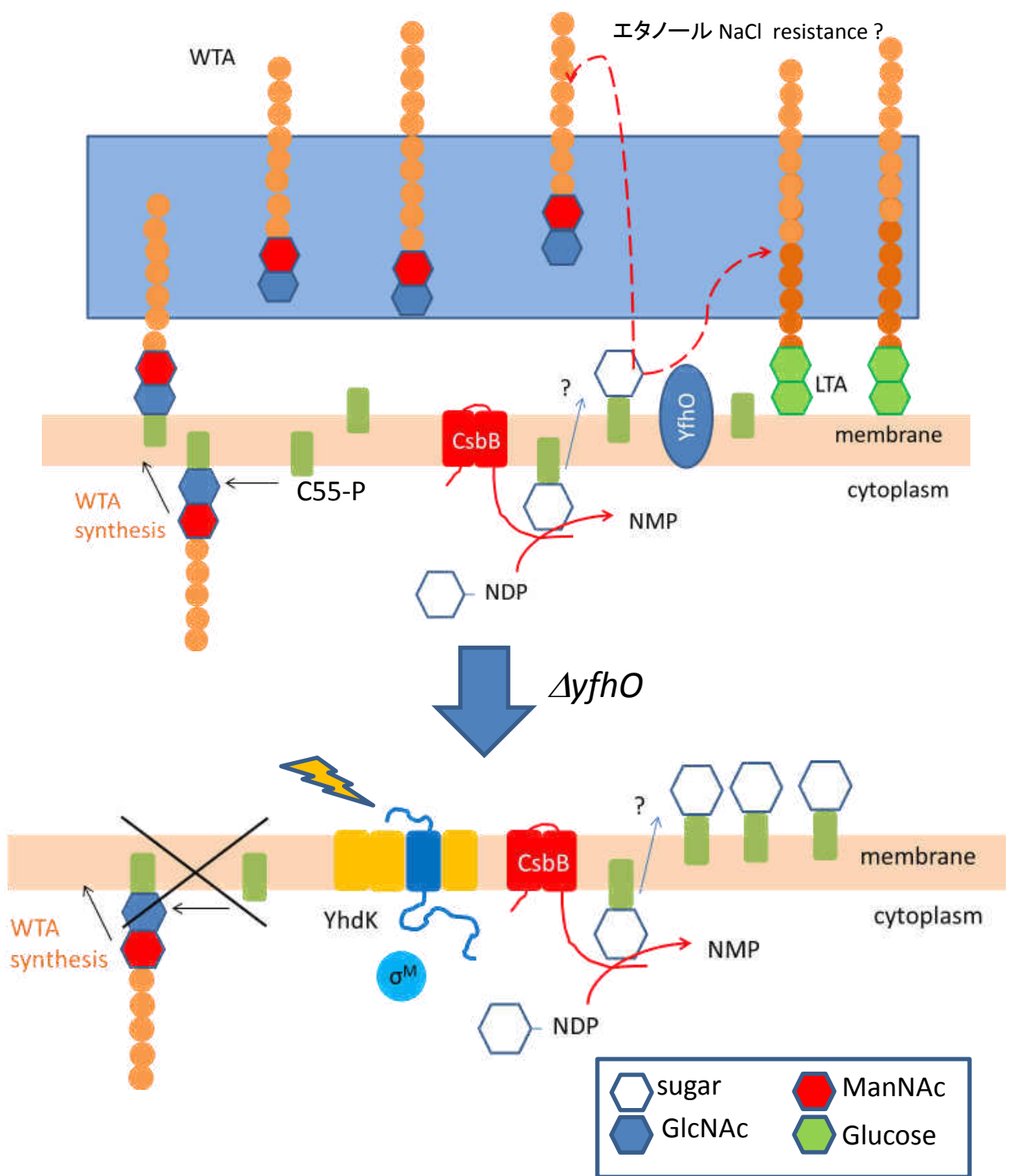


Fig. 24 CsbB および YfhO の機能と CsbB による SigM 活性化のモデル図。
 CsbB は GtrB を参考にトポロジーを描いた。YfhO はトポロジーが不明のため、楕円で示した。野生株では、CsbB-YfhO がストレスにตอบสนองして C55-P を介して糖転移反応を行い、エタノールや NaCl 耐性に寄与していると考えられる。YfhO 欠損状態では、C55-P のリサイクルが阻害されることで、主に WTA 合成が滞り、それをシグナルとして SigM が活性化しているのではないかと考えている。本研究で示唆された経路を赤で、それ以外を黒の矢印で示し、実験的証拠が乏しい部分は点線で示した。SigM のアンチシグマタンパク質が直接シグナルを感知しているかどうかは未だ不明である。

4-3. SigM の活性化シグナルについて

すでに述べたとおり、枯草菌 SigM については、様々な環境ストレスに応答すること、複数の細胞表層に影響する抗生物質に応答することがすでに明らかにされていたが、活性化条件が多岐に渡るため、SigM が実際に何を感知して活性化しているかはよくわかっていなかった。本研究で行った実験から、SigM 活性化シグナルについてもいくつかの知見が得られた。

CsbB の機能解析を行った実験では、CsbB の糖転移酵素としての機能が細胞内の C55-P リサイクルを阻害することで SigM を活性化させている可能性を示唆した。すでに SigM を活性化させることが知られている bacitracin という抗生物質は、bactoprenol pyrophosphate(C55-PP) phosphatase の活性を阻害することが知られている。糖キャリアとして C55-P が働くときには、C55-P と NDP-sugar から C55-PP-sugar が合成され、糖キャリアとしての役割を終えた直後の bactoprenol は C55-PP の形で存在し、再利用するためには脱リン酸化が必要となる【37】。C55-PP phosphatase は枯草菌では *bcrC* という遺伝子にコードされており、*bcrC* の転写は SigM に依存していること【38,39】から、bacitracin で SigM が活性化することは非常に理にかなっている。さらに、抗生物質 friulimicin B は細胞の外側にある C55-P に結合して細胞内への再回収を直接的に阻害するという作用メカニズムを持つことが実験的な証拠から示唆されているが、friulimicin B の添加により SigM が強く活性化されることが最近になって明らかにされた【40】。これらの事実から、C55-P の再回収の阻害によって SigM が活性化することは確からしいといえる。

一方で、C55-P の再回収が阻害されるとペプチドグリカンや WTA など細胞表層の主要な構成成分の合成が阻害されると考えられる。今までの実験では再回収が阻害された C55-P 自体が SigM を活性化させるのか、C55-P のリサイクルが阻害された結果として細胞表層の構成成分が合成されないことで SigM が活性化するのかははっきりとわからない

い。そこで、合成に C55-P を使用する WTA 合成の各ステップの酵素の発現を調節することでこれを確かめようとした。この実験では、C55-P のリサイクルに干渉すると予想される TagB や TagF の発現制御株だけでなく、C55-P のリサイクルに干渉しないが WTA の合成は行われないと予想される TagO の発現制御株においても SigM の活性化がみられた(Fig. 20-B)。このことから、C55-P の再回収阻害による SigM の活性化は WTA 合成が阻害された結果である可能性が高いと考えられる。

さらに、C55-P の生合成に関与するイソプレノイド合成系の遺伝子の発現制御株においても SigM が活性化することを示した。このことから C55-P のリサイクルの阻害は新規に C55-P が使用できないことに由来していることが示唆された。ただし、イソプレノイドは C55-P の合成以外にも様々な代謝ステップで使用されるため、直接的な C55-P 合成酵素である UppS の発現制御株を用いて追試を行う必要があると考えられる。

また、別の研究グループの研究においても SigM 活性化シグナルについて考えるための重要な知見がいくつか得られる。まず、人工的に遺伝子の破壊や発現抑制を行うことで SigM を活性化させる条件がいくつか知られている。近年、WTA と同じくグラム陽性菌の主要な細胞表層構成成分である LTA の生合成酵素 LtaS の破壊株において SigM が活性化することが明らかにされた【12】。このほか、糖脂質合成酵素である UgtP の破壊によっても SigM が活性化することが知られている【41】。UgtP の破壊による影響は少なくとも2通り考えられる。1つ目として、糖脂質が合成されなくなると膜組成が変化するため、本来のシグナルとは関係なく膜タンパク質であるアンチシグマタンパク質がうまく機能できなくなり、SigM が活性化してしまう可能性がある。2つ目の可能性として、LTA の生合成は UgtP によって合成される糖脂質を土台として行われることが知られているため【14】、UgtP の破壊は LTA の生合成を阻害することで SigM を活性化させているのかもしれない。LTA および WTA の合成阻害により SigM が活性化していることから、SigM は細胞表層のアニオンポリマーの合成阻害によって活性化する可能性が高い。今後、

実際にこれらの条件で LTA や WTA が合成されていないことを実験的に確かめる必要がある。

また、この仮説は UDP-Glc 合成に関与する *gtaB* の発現制御株を用いた実験結果からも支持される。UDP-Glc は LTA 合成の足場となる糖脂質の合成過程でグルコース源として使用されるため、*gtaB* の発現を抑制したときに SigM が活性化するのは LTA の合成が正常に行われないうちに起因すると考えられる。

抗生物質を用いた研究では、多くのペプチドグリカン細胞壁合成阻害剤に応答して SigM が活性化することが知られていた。しかし、ある研究グループの実験では、様々なペプチドグリカン合成を阻害剤のうち、Lipid II 前駆体 (C55-PP-MurNAc-pentapeptide-GlcNAc) に結合するものが SigM をよく活性化させるという結果が得られている【38】。Lipid II の状態で細胞壁合成が阻害されることは C55-P の再回収の阻害につながる。このことは、C55-P のリサイクルの阻害が SigM の活性化を引き起こすという仮説と一致する。また、C55-P の再回収の阻害は WTA の合成阻害を引き起こすことで SigM を活性化させる可能性にはすでに言及したが、Lipid II 前駆体に干渉しない細胞壁阻害剤でも多少 SigM が活性化するのは、WTA がペプチドグリカンにアンカーされているため間接的に WTA が影響を受けているからかもしれない。一方、枯草菌 SigM のレギュロンには WTA 合成系の酵素、LTA 合成系の酵素および WTA 合成に必要な C55-P 供給に必須なイソプレノイド生合成系酵素、C55-PP phosphatase をコードする遺伝子が含まれており【11】、WTA や LTA 機能欠損により SigM が活性化するのは非常に合理的であると考えられる。

これまで、枯草菌 SigM は C55-P のリサイクルの阻害を介した WTA や LTA の欠損によって活性化することを主張してきた。しかし、抗生物質を用いた実験以外については遺伝子の破壊もしくは発現制御などを利用しており、自然環境中でこれが起こることはほぼありえない。抗生物質を除けば、SigM を活性化させる環境ストレス条件としては、塩 (NaCl)、エタノール、酸、熱およびパラコートによる過酸化ストレスが知られている。塩

ストレスについては浸透圧ストレスやイオンストレス、脱水ストレスといった複数のストレスが細胞にかかることが考えられる。WTA や LTA はアニオンポリマーであり、細胞表層を陰性に保つ働きをもつと言われているため、実は WTA や LTA がいないときの SigM 活性への影響は細胞表層の陰性度が下がることに由来しており、陽イオンによって細胞表層の陰性度が下がることで SigM の活性化が起こるのかもしれない。エタノールストレスが枯草菌細胞に及ぼす影響(stimulon など) はあまり研究されていないが、一般的に低濃度のエタノールは細胞に脱水によるタンパク質の変性、膜脂質の変性などの影響を与えられている。これらの影響により膜タンパク質であるアンチシグマタンパク質がうまく機能できなくなり、SigM が活性化するのかもしれない。酸ストレスについては、バクテリア細胞に与える影響ははっきりと分かっていないものの、stimulon についてはある程度研究されており、グラム陽性菌 *Staphylococcus aureus* では、アミンなどの塩基性成分の生成酵素の遺伝子の他、膜脂質の生合成遺伝子や、コートタンパク質など細胞表層に関連する遺伝子、金属、糖、グリセロールなどの取り込み系の遺伝子が活性化することが明らかにされている【42】。これらのタンパク質は、細胞表層に存在するものが多いことから、酸ストレスは細胞表層のタンパク質や構造を変性させている可能性が高く、この作用によってアンチシグマタンパク質が機能を失って SigM が活性化すると考えられる。また、近年細胞内外の pH 勾配の変化により細胞表層に局在する細胞壁分解酵素（オートリシン）の活性が変化することが提唱されているため【43】、酸性ストレスにより過剰に活性化した細胞壁分解酵素の作用で、ペプチドグリカンや WTA 等が構造を保てなくなり、SigM の活性化を誘導している可能性もある。熱ストレスは細胞膜の流動性を変化させて膜タンパク質に影響を与えるほか、熱に弱いタンパク質の変性をもたらすため、膜タンパク質であるアンチシグマタンパク質の機能が失われて SigM が活性化するのかもしれない。過酸化ストレスを生じるとされるパラコートによる処理では、生体内でラジカルが生じることで、様々な分子に悪影響を与えることが知られている。パラコートの厳密な作用機構は、影響

が広範に渡るためあまり知られていないが、枯草菌におけるパラコート耐性機構には、SigM および C55-PP phosphatase である BcrC が関与すること【44】が明らかにされており、パラコートについても C55-P のリサイクルに作用していることが考えられる。酸化ストレスを生じる試薬の中でもパラコートによる酸化ストレスはラジカル反応を周期的に何度も生じるため非常に強力であることが知られており、H₂O₂ による酸化ストレスでは SigM の活性化は見られていない【10】。このことから、酸化ストレスは SigM の真の活性化ストレスではないのかもしれない。

また、本研究および先行研究ではトランスポゾンミュータジェネシスにより SigM を活性化させる因子を広く探索することを試みている。見つかった因子の中には、細胞表層に関連する機能をもつ *yddH* や *liaS* のほか、様々な機能を持つものが含まれていた(Table. 5)。遺伝子破壊により SigM 活性を上昇させた *glpD* は グリセロール-3-リン酸の代謝に関与する酵素である。本研究で、SigM の活性化シグナルとして WTA や LTA による細胞表層の陰性度が関与することを示唆したが、これらのアニオンポリマーの主成分はグリセロールリン酸であることから、*glpD* の破壊が SigM を活性化させるという事実は仮説にある程度合致しているといえる。このほか、ABC トランスポーターをコードする *ecsB* の破壊は SigW の活性化に関わることが知られており、SigM の活性制御にも何らかの役割を持つかもしれない。*secDF* はタンパク質を細胞外に局在させるトランスロカーゼのサブユニットをコードしている。*ecsB* や *secDF* は細胞表層構造のメンテナンスを行う酵素の局在を行うことで、細胞表層の統合性維持に関与するのかもしれない。そのほかの遺伝子に関しては一見して WTA や LTA の合成に関与することはなさそうに見える。これらは複雑な代謝経路を通じて細胞表層構造に影響をあたえているか、もしくは間接的に SigM 活性に関与すると考えている。

5. 総括

本研究では、SigM の アンチシグマ による活性制御機構が既知のものとは異なる新しいシステムであることを示唆した。

また、CsbB-YfhO がグラム陽性菌に広く保存される新奇な細胞表層成分糖修飾システムであり、ストレスに応答して枯草菌の細胞表層統合性に寄与することを示唆した。

加えて、CsbB による SigM 活性化のメカニズムの研究から、グラム陽性菌の細胞表層構成成分である WTA や LTA の機能の欠損が SigM 活性化のシグナルである可能性を新しく示した。

6. 参考文献

- 【1】 A.L. Lovering, S.S. Safadi, N.C. Strynadka, Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly, *Annu. Rev. Biochem.* 81 (2012) 451-478.
- 【2】 K.J. Thorne, E. Kodicek, The structure of bactoprenol, a lipid formed by lactobacilli from mevalonic acid, *Biochem. J.* 99 (1966) 123-127.
- 【3】 Yoshikazu Kawai, Jon Marles-Wright, Robert M Cleverley, Robyn Emmins, Shu Ishikawa, Masayoshi Kuwano, Nadja Heinz, Nhat Khai Bui, Christopher N Hoyland, Naotake Ogasawara, Richard J Lewis, Waldemar Vollmer, Richard A Daniel, Jeff Errington, A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *EMBO J.*: 2011, 30(24);4931-41
- 【4】 Schirner K, Marles-Wright J, Lewis RJ, Errington J. Distinct and essential morphogenic functions for wall- and lipo-teichoic acids in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 2009 Apr 8;28(7):830-42.
- 【5】 Min Cao and John D. Helmann, The *Bacillus subtilis* Extracytoplasmic-Function σ^X Factor Regulates Modification of the Cell Envelope and Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides, *JB.*186.4.1136-1146.2004
- 【6】 Veronica Guariglia-Oropeza and John D. Helmann, *Bacillus subtilis* σ^V Confers Lysozyme Resistance by Activation of Two Cell Wall Modification Pathways, Peptidoglycan O-Acetylation and d-Alanylation of Teichoic Acids, *J Bacteriol.* 2011 November; 193(22): 6223–6232.

- [7]** Allison SE, D'Elia MA, Arar S, Monteiro MA, Brown ED. Studies of the genetics, function, and kinetic mechanism of TagE, the wall teichoic acid glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* 168. *J Biol Chem.* 2011 Jul 8;286(27):23708-16.
- [8]** M.A. Lonetto, K.L. Brown, K.E. Rudd, M.J. Buttner, Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 7573-7757.
- [9]** Warawan Eiamphungporn and John D. Helmann, The *Bacillus subtilis* σ M regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Molecular Microbiology* (2008) 67(4), 830–848
- [10]** Thackray PD, Moir A. SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *J Bacteriol.* 2003 Jun;185(12):3491-8
- [11]** Jervis AJ, Thackray PD, Houston CW, Horsburgh MJ, Moir A. SigM-responsive genes of *Bacillus subtilis* and their promoters. *J Bacteriol.* 2007 Jun;189(12):4534-8. Epub 2007 Apr 13.
- [12]** Hashimoto M, Seki T, Matsuoka S, Hara H, Asai K, Sadaie Y, Matsumoto K. Induction of extracytoplasmic function sigma factors in *Bacillus subtilis* cells with defects in lipoteichoic acid synthesis. *Microbiology.* 2013 Jan;159(Pt 1):23-35.
- [13]** Horsburgh MJ, Moir A. Sigma M, an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol Microbiol.* 1999 Apr;32(1):41-50.

- 【14】 Yoshimura M, Asai K, Sadaie Y, Yoshikawa H. Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology*. 2004 Mar;150(Pt 3):591-9.
- 【15】 Volkmar Braun, Susanne Mahren and Monica Ogierman, Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signaling, *Current Opinion in Microbiology* 2003, 6:173–180
- 【16】 Jung YG, Cho YB, Kim MS, Yoo JS, Hong SH, Roe JH. Determinants of redox sensitivity in RsrA, a zinc-containing anti-sigma factor for regulating thiol oxidative stress response. *Nucleic Acids Res.* 2011 Sep 1;39 (17):7586-97.
- 【17】 Janine Heinrich, Thomas Wiegert, Regulated intramembrane proteolysis in the control of extracytoplasmic function sigma factors, *Research in Microbiology* 160 (2009) 696-703.
- 【18】 Morimoto,T., Ara,K., Ozaki,K. and Ogasawara,N. A new simple method to introduce marker-free deletions in the *Bacillus subtilis* genome. *Genes Genet. Syst.* (2009) 84, p.315-318
- 【19】 Yongwei Zhang, Uwe Werling and Winfried Edelmann, SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Research*, 2012, 1–10.
- 【20】 Höper D, Völker U, Hecker M. Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2005 Apr;187(8):2810-26.
- 【21】 Aurélia Battesti, Emmanuelle Bouveret, The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* Volume 58, Issue 4, December 2012, Pages 325–334

- [22]** Akbar S, Price CW. Isolation and characterization of *csbB*, a gene controlled by *Bacillus subtilis* general stress transcription factor sigma B. *Gene*. 1996 Oct 24;177(1-2):123-8.
- [23]** Xuejun Huang and John D. Helmann, Identification of Target Promoters for the *Bacillus subtilis* σ^X Factor using a Consensus-directed Search. *J. Mol. Biol.* (1998) 279, 165-173.
- [24]** Korres H, Mavris M, Morona R, Manning PA, Verma NK. Topological analysis of GtrA and GtrB proteins encoded by the serotype-converting cassette of *Shigella flexneri*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 25;328(4):1252-60.
- [25]** Schneider T, Gries K, Josten M, Wiedemann I, Pelzer S, Labischinski H, Sahl HG. The lipopeptide antibiotic Friulimicin B inhibits cell wall biosynthesis through complex formation with bactoprenol phosphate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Apr;53(4):1610-8.
- [26]** Y. Urushibata, S. Ebisu, I. Matsui, A thermostable dolichol phosphoryl mannose synthase responsible for glycoconjugate synthesis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*, *Extremophiles* 12 (2008) 665-676.
- [27]** Wiggins CA , Munro S. Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Jul; Volume: 95 (Issue: 14).
- [28]** Shukui Guan, David A. Bastint and Naresh K. Verma. Functional analysis of the 0 antigen glucosylation gene cluster of *Shigella flexneri* bacteriophage SfX. *Microbiology* (1999), 145, 1263-1 273

- 【29】 Wagner WP, Helmig D, Fall R. Isoprene biosynthesis in *Bacillus subtilis* via the methylerythritol phosphate pathway. *J Nat Prod.* 2000 Jan;63(1):37-40.
- 【30】 Yano K, Inoue H, Mori H, Yee LM, Matsuoka S, Sadaie Y, Asai K. Heterologous expression of the *Oceanobacillus iheyensis* SigW and its anti-protein RsiW in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(5):966-75. Epub 2011 May 20.
- 【31】 Yan A, Guan Z, Raetz CR. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2007 Dec 7;282(49):36077-89.
- 【 32 】 Song F, Guan Z, Raetz CR. Biosynthesis of undecaprenyl phosphate-galactosamine and undecaprenyl phosphate-glucose in *Francisella novicida*. *Biochemistry.* 2009 Feb 17;48(6):1173-82.
- 【33】 Wu HC, Venkateswaran PS. Fosfomycin-resistant mutant of *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci.* 1974 May 10;235(0):587-92.
- 【34】 Cao M, Bernat BA, Wang Z, Armstrong RN, Helmann JD.
FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*.
- 【35】 Ogura M, Tsukahara K, Tanaka T. Identification of the sequences recognized by the *Bacillus subtilis* response regulator YclJ. *Arch Microbiol* (2010) 192:569–580
- 【36】 Ogura M, Ohsawa T, Tanaka T. Identification of the sequences recognized by the *Bacillus subtilis* response regulator YrkP. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008 Jan;72(1):186-96.
- 【 37 】 Jordan S, Hutchings MI, Mascher T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 Jan;32(1):107-46.

- 【38】 Cao M, Helmann JD. Regulation of the *Bacillus subtilis* bcrC bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors. *J Bacteriol.* 2002 Nov;184(22):6123-9.
- 【39】 Bernard R, El Ghachi M, Mengin-Lecreulx D, Chippaux M, Denizot F. BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem.* 2005 Aug 12;280(32):28852-7.
- 【40】 Wecke T, Zühlke D, Mäder U, Jordan S, Voigt B, Pelzer S, Labischinski H, Homuth G, Hecker M, Mascher T. Daptomycin versus Friulimicin B: in-depth profiling of *Bacillus subtilis* cell envelope stress responses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Apr;53(4):1619-23.
- 【41】 Matsuoka S, Chiba M, Tanimura Y, Hashimoto M, Hara H, Matsumoto K. Abnormal morphology of *Bacillus subtilis* ugtP mutant cells lacking glucolipids. *Genes Genet Syst.* 2011;86(5):295-304.
- 【42】 Erlend Bore, Solveig Langsrud, Øyvind Langsrud, Tone Mari Rode and Askild Holck. Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology* (2007), 153, 2289–2303.
- 【43】 Kelly C. Rice and Kenneth W. Bayles. Molecular Control of Bacterial Death and Lysis. 10.1128/MMBR.00030-07. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008, 72(1):85.
- 【44】 Min Cao, Charles M. Moore, John D. Helmann. *Bacillus subtilis* Paraquat Resistance Is Directed by σ^M , an Extracytoplasmic Function Sigma Factor, and Is Conferred by YqjL and BcrC *J Bacteriol.* 2005 May; 187(9): 2948–2956. doi: 10.1128/JB.187.9.2948-2956.2005.

7. 謝辞

本研究を行うにあたって、熱心に指導して下さった分子統御研究室の朝井計准教授、定家義人名誉教授、高橋康弘教授、に心より感謝いたします。また、研究を進めるにあたって菌株の分与を頂きました、信州大学の山本博規准教授、様々な貴重なアドバイスを頂きました、遺伝情報研究室の松本幸次教授、原弘志准教授、太田にじ講師、松岡聡助教、分子生物学科の先生方、昼夜をともにした諸先輩方、後輩のみなさんにこの場を借りて御礼を申し上げます。