

枯草菌のゲノムサイエンス

関口 順一*・山本 博規

微生物ゲノムバイオテクノロジーの一環として枯草菌におけるこの分野の内容を紹介しようとしたとき、枯草菌ゲノムの基礎科学が大部分で、バイオテクノロジーについては目立った成果が得られていないのが現状である。そこで本稿では枯草菌のゲノムサイエンスについて、日本での取り組みを中心にその一端を紹介し、バイオテクノロジーについては展望として短く触れることにしたい。

1. なぜ枯草菌ゲノムなのか

枯草菌はグラム陽性の土壌細菌であり、グラム陰性の大腸菌や真核生物の酵母と並んで古くから生理学的・生化学的な研究成果が蓄積されてきた。また枯草菌は組換え能力が高く、形質転換が可能な生物として1960年代から遺伝子変異株の分離、遺伝子解析、染色体地図の作成など分子遺伝学、分子生物学的研究が行われ、グラム陽性細菌のなかではもっとも広く、深く研究されている微生物である。一方枯草菌の生活環境は栄養が豊富な場合には細胞分裂を繰り返して増殖するが、環境中の栄養が枯渇すると子孫を残すための胞子形成へと進む。胞子はさまざまな化学物質や熱、紫外線、乾燥などの過酷な条件に耐性を示し、再び生育環境が整うと速やかに発芽して増殖を繰り返す。この胞子形成に至る過程は発生分化のモデルとして注目されていたことから、これまでにさまざまな研究がなされてきた。その結果、最近ではカタボライト抑制やシグナル伝達機構が複雑に絡み合った系であることが明らかになっている。枯草菌はさまざまな分解酵素の分泌生産能にすぐれており、また納豆の製造にも使われる工業的にも価値の高い微生物である。¹⁾

2. 枯草菌ゲノムの塩基配列決定から機能解析へ

このような背景から、枯草菌の全ゲノム配列を明らかにするためのプロジェクトが1989年に欧州共同体(EU)で始まり、その後1990年から1994年にかけて創成基礎研究「ヒトゲノム解析」の下に、奈良先端大・小笠原直毅教授を中心にして日本の研究グループも参加した国際共同研究が行われた。最終的には1997年11月に枯草菌ゲノム4.2 Mbの全塩基配列が決定され、約4000個の遺伝子が同定された。そのうち日本のグループは全ゲノムの約1/3にあたる1369 kbの配列決定を行った。この詳しい

内容は引用文献^{2,3)}およびWebサイト(<http://bacillus.tokyo-center.genome.ad.jp:8008/BSORF-DB.html>)を参照戴きたい。枯草菌は全ゲノム配列が決定された10番目の生物であるが、その後微生物ゲノムにおいても全塩基配列決定が世界中で活発に展開されており、本稿執筆時点でも20の微生物ゲノムの全塩基配列が公開されている。

塩基配列決定はゲノム解析の第1段階であり、次に塩基配列から遺伝子の機能を決定することが重要な課題である。枯草菌ゲノムのホモロジー解析より解ったことは、50%近くがまったく既知のタンパク質とホモロジーを示さないか、それとも他の生物の機能未知な遺伝子と有意なホモロジーを示すものであり、この割合は他の生物ゲノムにおいてもほぼ同じである。そこで欧州共同体とともに、日本でも特定領域研究「ゲノムサイエンス」(1995-1999)、および未来開拓学術研究推進事業(1995-1999)の下に、枯草菌ゲノムの機能解析のプロジェクトが引き続いて開始され今日に至っている。機能解析としては2つの段階が設定された。まず0次解析としては個々の遺伝子破壊株の作成および*lacZ* レポーター遺伝子を指標とした発現時期の解析、さらにノーザン法による転写単位の同定があげられる。この0次解析は主に個々のグループの分担領域中の遺伝子について行われた。一方1次解析は欧州共同体のグループと打ち合わせを行いながら、各研究グループの得意な分野についてそれぞれが工夫を凝らしたスクリーニング系を確立し、日本では日本のグループによって作られた遺伝子破壊株のすべてが機能解析の対象である。このようにして得られたデータはインターネット上でデータベースとして近々公開予定であり、また遺伝子破壊株もできるだけ早く配布できるよう努めている。

3. 枯草菌ゲノムの機能解析法(0次—1次解析)

0次解析に用いたプラスミド pMUTIN (ここでは pMUTIN2)⁴⁾と遺伝子破壊の方法を Fig. 1 に示した。目的の遺伝子が破壊されるだけでなく、破壊株は *lacZ* レポーター遺伝子とターゲット遺伝子の間で transcriptional fusion を形成するため、 β -ガラクトシダーゼ(LacZ)活性を測定することにより、その遺伝子の発現時期および発現量をモニタリングすることができる。またオペロン単位で転写される遺伝子では、破壊された遺伝子の下流

*著者紹介(代表) 信州大学繊維学部応用生物科学科(教授)

〒386-8567 上田市常田3-15-1 TEL. 0268-21-5344 FAX. 0268-21-5331 E-mail: jsekigu@giptc.shinshu-u.ac.jp

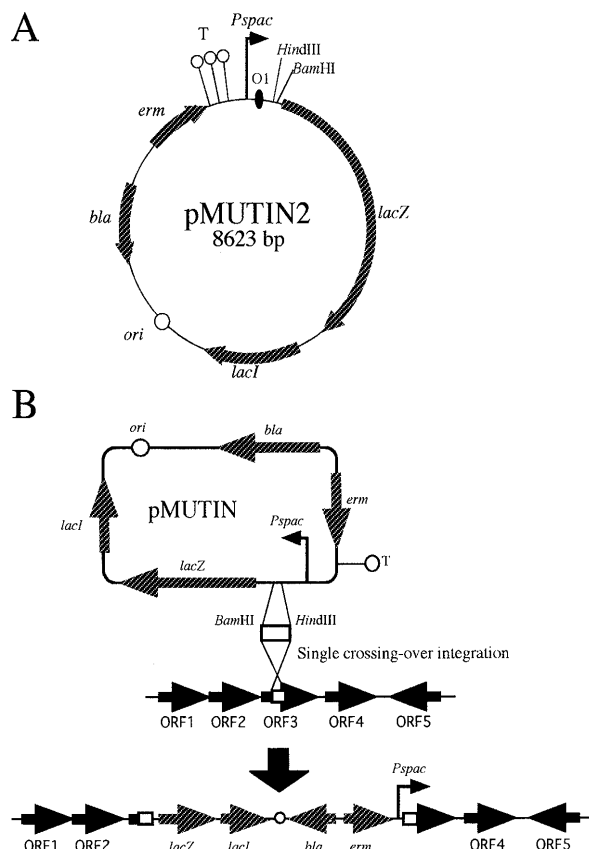


Fig. 1. Physical map of a *B. subtilis* plasmid, pMUTIN2 (A) and illustration of the integration event into the *B. subtilis* chromosome (B). *lacZ*, *E. coli* gene encoding β-galactosidase; *lacI*, *E. coli* gene encoding the lactose repressor; *ori*, plasmid origin of replication; *bla*, β-lactamase gene for selection in *E. coli*; *erm*, erythromycin-resistance gene for selection in *B. subtilis*; T, lambda T0 and *E. coli* *rrnB* T1 T2 terminator; *Pspac*, IPTG-inducible promoter controlled by LacI; O1, LacI operator O1.

の遺伝子が影響をうける、いわゆる極性効果が生じるが、この効果は IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) によりコントロールすることができる。さらに必須遺伝子の場合には SD 配列を含む形でターゲット遺伝子の 5' 領域をクローニングしたプラスミドを用いて枯草菌を形質転換し、IPTG 依存性プロモーターの制御下にその遺伝子を置くことにより必須遺伝子であるかどうかの判別が可能である。この結果より、たとえばその遺伝子は孢子（スポア、芽胞）形成期に発現する遺伝子であるとか、発現がほとんど認められないために特殊な環境下（heat shock 条件下など）で働く遺伝子なのかなど、機能の解析に際し重要な手掛かりを与えてくれる。勿論この方法にも欠点があり、破壊した遺伝子が自分の転写を正または負に調節している場合、異常な発現を示したり、発現時期が野生株と大きくずれることもある。これを避けるためにはノーザン法を用いた野生株の転写解析が有効で

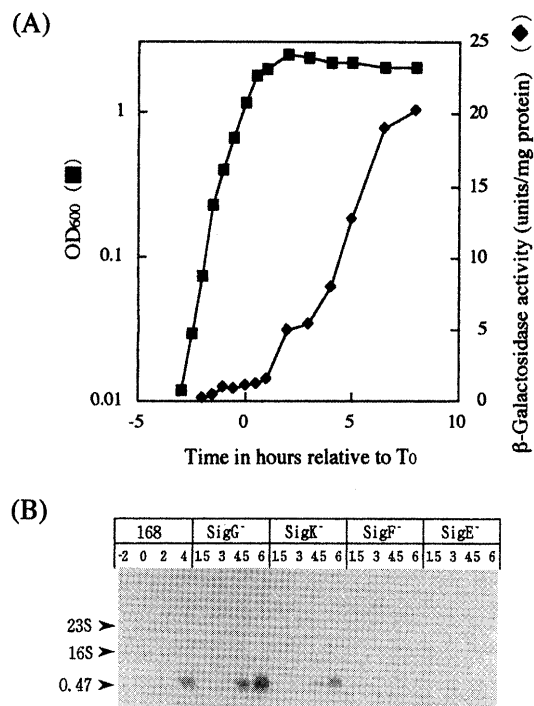


Fig. 2. Time course of the production of the *cwlJ*-*lacZ* fusion protein (A) and Northern blot analysis of the *cwlJ* region (B). (A) *cwlJ*-directed β-galactosidase activity of strain cbQ (*cwlJ*::pMUTIN2cJ) was determined at the indicated times after the onset of sporulation. Squares, cell growth at an optical density of 600 nm (OD₆₀₀); diamonds, β-galactosidase activity. (B) Northern hybridization performed with the *cwlJ*-specific RNA probe. The lanes contained 5 μg of RNA from *B. subtilis* 168 at *t*₋₂ (-2), *t*₀ (0), *t*₂ (2), or *t*₄ (4), and *B. subtilis* 1S86 (SigF⁻), 1S60 (SigE⁻), spoIIIGΔ1 (SigG⁻), and 1S38 (SigK⁻) at *t*_{1.5} (1.5), *t*₃ (3), *t*_{4.5} (4.5), or *t*₆ (6). 0.47 indicates the size (in kilobases) of the hybridizing RNA in comparison with the migration of 23S and 16S RNAs. Figure is quoted from *J. Bacteriol.*, **180**, 1375-1380 (1998).

あり、多くの場合 0 次解析に付け加えられることが多い。またノーザン法は LacZ 法より高感度に転写物を確認できるとともに、転写物のサイズの解析も可能である。そしてこれらの結果を総合的に判断し、個々の遺伝子の正確な発現パターンの同定を行っている。Fig. 2 に著者らが関係した孢子の発芽に関与する細胞壁溶解酵素遺伝子 *cwlJ* の LacZ 解析、およびノーザン解析の結果を示した。⁵⁾ これらの結果より *cwlJ* 遺伝子は孢子形成期に発現する遺伝子で、孢子形成に関係するシグマ因子の欠損株の転写解析よりシグマ E の RNA 合成酵素で転写されることが解る。ノーザン法に用いられた non-RI ラベルの RNA プロブは一見プロブ作成が面倒に思われるが、破壊株作成時に用いるターゲット遺伝子のインサート断片を含んだ pMUTIN プラスミドから比較的容易に作成でき、検出感度もよく長期保存が可能である。

1次解析は日本では12グループに分かれて、具体的にはさまざまなストレス耐性や運動性、形態変化、炭素源資化性、栄養要求性、カタボライト抑制、種々の薬剤・抗生物質に対する耐性、プロテアーゼ生産性、孢子形成、コンピテンス、孢子の発芽等についての網羅的な機能解析が行われている。著者らは孢子の発芽を担当し、変異株孢子のL-アラニンなどの発芽誘導物質存在下での吸光度の変化を野生株と比較したところ、520株の遺伝子破壊株の中から新たに17株の発芽異常株を見つけることができた。この中には孢子形成期に発現する遺伝子以外に、グローバルな制御遺伝子として知られているものもあり大変興味深い。そして各項目のデータを集計すれば、未知遺伝子の機能についてかなりの手掛かりが得られるものと考えられる。小笠原教授からの私信によると、現時点でまとめただけでも、およそ50%の遺伝子破壊株に何らかの表現型の変化が認められた。

4. 枯草菌のプロテオーム解析と トランスクリプトーム解析

細胞全体のタンパク質の変化を同時に解析できる方法としてプロテオーム解析が注目されている。⁶⁾この方法とは細胞から抽出した全タンパク質を2次元電気泳動にかけ、スポットを分離し、それらのスポットがゲノム上のどのタンパク質に相当するかをN末端アミノ酸配列決定やMALDI-TOF MASSで決定するとともに、各種条件下での全タンパクの挙動をイメージアナライザーを用いて解析する方法である。⁷⁾一例としてストレスタンパク質の解析に用いられ、多くの熱ショックタンパク質を含むストレスタンパク質が新たに同定された。しかしタンパク質がプロテアーゼで分解されたり、スポットがオーバーラップすることも多く、注意が必要である。もちろん狭い等電点の幅で泳動することもできるので、スポットの重なりあう領域の分離を向上させることもでき、費用はかさむが有効な手段である。枯草菌のプロテオーム解析は、日本の機能解析グループとしては宮崎医大の中山建男教授が中心になって進めており、また筑波大の山根國男教授らは分泌タンパク質に焦点を当ててプロテオーム解析を行っている。

著者らは表層タンパク質のプロテオーム解析に興味を持ち、枯草菌の表層に局在するタンパク質を1.5 M LiClで抽出し、各スポットの同定を進めている。途中経過ではあるが、野生株の菌体表層には細胞壁結合性プロテアーゼであるWprAが存在しており、このプロテアーゼによる表層タンパク質の分解産物と考えられるスポッ

トが多数存在することが明らかになった。そこでwprA欠損株を用いたところ、部分分解産物のスポットがほとんど見られなくなった。それとともに新規の表層タンパクが見つかってきており、未知遺伝子の機能を考える上でも有効である。本誌細胞表層工学の特集にその結果の一部が掲載されているので参照願いたい。⁸⁾

トランスクリプトーム解析として最近注目されている技術にマイクロアレーやDNAチップ技術があるが、⁹⁾それは一枚のスライドガラス上に数千から数万のDNA（合成オリゴヌクレオチド、cDNAなど）を結合させ、細胞からの転写物は標識してハイブリダイズさせ、転写量を測定する技術で、酵母では全遺伝子の転写を同時に測定することができる革新的な手法である。この方法は理論的にはすべての生物の転写の解析に利用可能であり、枯草菌でも福山大の藤田泰太郎教授のグループが中心となって最適条件の検討が行われている。特に枯草菌を含めた細菌でのこの技術の難しさは、多量に存在するリボソームRNAの共雑による影響をいかに克服するかであろう。

これ以外にもタンパク質・タンパク質相互作用の解析は、酵母菌で積極的に展開されている技法で、¹⁰⁾これを枯草菌の全タンパク質に応用できれば大きな成果が期待できる。

5. パラログ解析、オルソログ解析

枯草菌全ゲノム配列決定から、同一ゲノム内でホモロジーを示す遺伝子の種類と数、他の生物の遺伝子とホモロジーを示す遺伝子についての知見がデータベースの検索より簡単に得られるようになり、これらの解析はそれぞれパラログ解析、オルソログ解析と呼ばれている。その結果、枯草菌のシグマ因子（候補株を含む）は19個あり、その中には新しく9個のシグマ因子の候補が含まれていた。²⁾パラログ解析は1つの機能に対して相補する遺伝子の数が複数ある場合は、とりわけ有効な手段となり得る。なぜなら組織的にパラログ遺伝子を2重、3重に欠損させた変異株を作ることができるからである。そこで名古屋大・牧野志雄教授が報告した発芽に関与するコレックス溶解酵素SleBの例をあげてみよう。¹¹⁾彼らは*Bacillus cereus* sleB遺伝子とオルソログの関係にある枯草菌sleB遺伝子を見つけ、その遺伝子破壊株は発芽の際の孢子の屈折率が部分的にしか起こらないことを示した。¹²⁾しかしこの変異株孢子を寒天培地で培養すると、野生株と同程度の発芽率を示す(Table 1)。一方枯草菌sleBのパラログ遺伝子として他に*cwlJ*遺伝子があり、こ

Table 1. Germination frequencies of the *cwlJ* and *cwlJ sleB* mutants.

Strain	No. of spores	Germination frequency ^a (%)	
		No heat	Heat ^b
168 (wild)	1.3×10^8	24.6	21.5
cbQ (<i>cwlJ</i>)	9.8×10^7	27.6	17.3
168SB (<i>sleB</i>)	9.3×10^7	53.8	43.0
CJSB (<i>cwlJ sleB</i>)	1.2×10^8	$< 8.5 \times 10^{-4}$	$< 8.5 \times 10^{-4}$

^a Defined as the ratio of the number of colonies on LB agar after heat treatment or no heat treatment to the number of spores determined under a microscope.

^b Spore heat treatment was performed at 80°C for 20 min in 10 mM Tris-HCl (pH 8.4).

の遺伝子破壊株の胞子は発芽における屈折率の変化のパターンが少し違うだけで、最終的には野生株と同程度まで変化し、発芽率もまったく野生株と変わらない。しかし *sleB cwlJ* 2 重欠損株は寒天培地上でも完全に発芽が欠損し、コロニーが得られず、発芽に伴う胞子の暗色化も生じなかった。⁵⁾ これらの結果は発芽の際には、SleB, CwlJ の2つのコルテックス分解酵素が相補的に作用していることを示している。そしてこのような結果は意図的にパラログ遺伝子を破壊し、組み合わせなければ得られないもので、ゲノム解析からもたらされた逆遺伝学の成果である。著者らはまた細胞壁溶解酵素のパラログ解析から新たに7種類の細胞壁ペプチドグリカンのペプチド鎖に働くエンドペプチダーゼ遺伝子を見つけ、¹³⁾ このうち少なくとも CwlE(LytF) と CwlF(LytE) が細胞分裂の最後のステップである細胞の分離に関係していることを、2重欠損株を作成することにより明らかにした。^{14,15)}

6. 枯草菌ゲノムとバイオテクノロジーへの展望

ゲノム情報は物質の代謝経路を推測するもっとも有効な手段の1つであり、オルソログ解析から代謝経路に対応する遺伝子を選びだすことができる。そして従来の代謝経路に対応する遺伝子産物が見つからない場合は、ホモロジーのないタイプの酵素の存在が充分予想されよう。さらにその経路に対応する複数の酵素が見つからない場合には、新たな代謝経路の存在が示唆されるかもしれない。このようなアプローチは物質生産にとってもき

わめて有効であると考えられる。病原性のグラム陽性菌のゲノムと枯草菌のゲノムを比較して、病原性の遺伝子群をあぶりだすこともできよう。枯草菌を宿主とした場合の組換えタンパク質の不安定性も、プロテアーゼの網羅的解析やシャペロンの網羅的解析から改善が計れるかもしれない。ゲノム情報からシステムとしての反応全体を理解できるようになれば、たとえば分泌量のより一層の向上なども可能になることが期待される。これらは枯草菌バイオテクノロジーにおけるほんの少数例であり、新しい観点からさまざまな方向に枯草菌ゲノムバイオテクノロジーが大きく発展して行くものと思われる。

最近の学術審議会特定研究領域推進分科会バイオサイエンス部会の中間報告では、枯草菌も国際標準生物種として位置づけられる様子であり、枯草菌での機能解析を含めた実験的研究と情報科学が一体となって、枯草菌のみならず生物全体への重要な現象の理解が飛躍的に進むと考えられる。さらに病原微生物への対策、有用微生物への利用、環境の分野への利用など、画期的な技術開発が期待できる。日本ではゲノム情報を利用した有用微生物、環境微生物への取り組みがきわめて遅れており、産・官・学共同のゲノム応用プロジェクトを早急に立ちあげる必要がある。

文 献

- 1) Harwood, C. R.: In *Bacillus* (Harwood, C. R., ed.), p. 1, Plenum Press, New York (1989).
- 2) Kunst, F. et al.: *Nature*, **390**, 249 (1997).
- 3) 小笠原直毅ら：蛋核酵, **44**, 印刷中.
- 4) Vagner, V. et al.: *Microbiology*, **144**, 3097 (1998).
- 5) Ishikawa, S. et al.: *J. Bacteriol.*, **180**, 1375 (1998).
- 6) Fey, S. J. et al.: *Electrophoresis*, **18**, 1361 (1997).
- 7) Bernhardt, J. et al.: *Microbiology*, **143**, 999 (1997).
- 8) 関口順一：生物工学, **76**, 501 (1998).
- 9) Schena, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10614 (1996).
- 10) Field, S. and Song, O.: *Nature*, **340**, 245 (1989).
- 11) Makino, S. et al.: *Microbiology*, **140**, 1403 (1994).
- 12) Moriyama, R. et al.: *J. Bacteriol.*, **178**, 6059 (1996).
- 13) 関口順一：防菌防黴, **27**, 19 (1999).
- 14) Ishikawa, S. et al.: *J. Bacteriol.*, **180**, 2549 (1998).
- 15) Ohnishi, R. et al.: *J. Bacteriol.*, **181**, 3178 (1999).