

枯草菌孢子形成遺伝子spo0Eの解析

飯島, 庸介 / IIJIMA, Yousuke

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

55

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2014-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00010394>

枯草菌胞子形成遺伝子 *spo0E* の解析

ANALYSIS OF A SPOLUTATION GENE SPO0E IN BACILLUS SUBTILIS

飯島庸介

Yousuke IJIMA

指導教員 佐藤 勉

法政大学大学院工学研究科生命機能学専攻修士課程

Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is regulated by a signal transduction pathway called the phosphorelay. The processing and integration of the signals by the phosphorelay control the level of phosphorylation of the transcription factor, Spo0A, while Spo0E (85aa) composed of two α -helices is a phosphatase specifically active on Spo0A-P. To study the amino acid residues at the C terminus of the Spo0E for enzymatic activity, a series of C-terminal deletion mutants of Spo0E were analyzed. I found that the phosphatase activity was reduced by the deletions, 3-5 aa and 33-50 aa residues from the C terminus, whereas the activity was increased by the deletions 6-30 aa residues from the C terminus. I further demonstrated that the phosphorylated Spo0A is required for initiation but also for the subsequent progression of sporulation.

Key Words : *Bacillus subtilis*, sporulation, phosphatase

1. 緒言

枯草菌 *Bacillus subtilis* はグラム陽性菌に属し、胞子形成能を持った土壌細菌である。枯草菌の胞子形成開始時にはリン酸リレー系と呼ばれるシグナル伝達機構が働くが、これは多数のタンパク質が関与する 2 成分制御系の発展系である。リン酸リレー系は、Kin タンパク質の自己リン酸化が誘導され、これらのリン酸基が応答制御因子である Spo0F、Spo0B に伝達され、さらに胞子形成開始のマスター転写制御因子である Spo0A にリン酸が伝達される過程である (図 1)。最終的に細胞内のリン酸化された Spo0A の濃度が閾値を越えると胞子形成が開始される。そして非対称隔膜が形成されると、次にシグマカスケードと呼ばれるシグマ因子の逐次的機能発現によりフォアスポア ($\sigma^F \rightarrow \sigma^G$) と母細胞 ($\sigma^E \rightarrow \sigma^K$) で異なる遺伝子発現がおこる。本研究では Spo0A-P のホスファターゼとして働く Spo0E の解析を行った。*spo0E* は 1987 年に Perego らによって胞子形成を抑制する遺伝子として同定された [1]。この遺伝子は対数増殖期の終了時から胞子形成開始期にかけて発現する。*spo0E* の多コピーでの導入は胞子形成を強く阻害し、この遺伝子に変異が生じるとリン酸リレーが強化される [2,3]。また、Spo0E は 85 アミノ酸からなり、2 つの α -helix を有している。一方、Spo0E と類似の構造を持つホスファターゼ YisI (56aa) と YnzD (57aa) と比較すると Spo0E は C 末端側約 30aa ほど長い (図 2)。また、 α -helix2 に共通配列 SQELD が存在し、この配列は

ホスファターゼ活性に重要な働きを持つと考えられる。本研究は Spo0E の C 末端側のアミノ酸配列に着目し、研究を進めた。

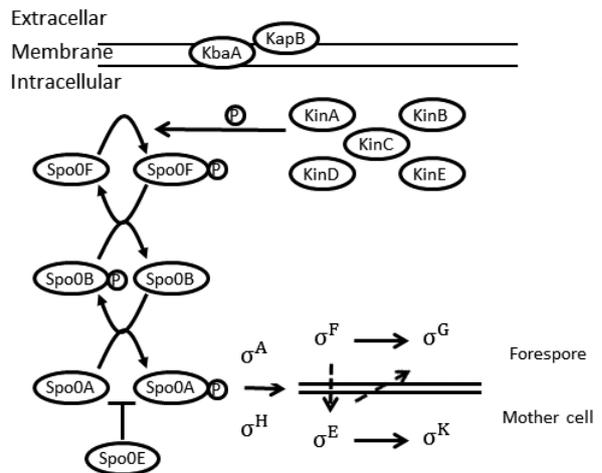


図 1 胞子形成開始のリン酸リレー系とシグマカスケード



図 2 Spo0E の構造 (YisI, YnzD との比較) “SQELD”: 共通配列, (*) : 保存されている配列, (・) : 性質の似たアミノ酸

2. 実験方法

(1) Spo0E C 末端側からのアミノ酸配列欠失株の作製

spo0E の上流と 3'末端から段階的に上流側に設計したプライマーセットで増幅し、得られた DNA 断片にカナマイシン耐性を運ぶ pJM114 に連結させ、枯草菌ゲノムに導入し、Spo0E 段階的欠失株を得た。

(2) Spo0E C 末端側アミノ酸配列欠失株の Spo0A 活性

Spo0E C 末端欠失株に *abrB-lacZ* を導入した。*abrB* は Spo0A-P によって転写が抑制され、Spo0A-P が Spo0E に脱リン酸化されることにより *abrB* の抑制が行われなくなり、転写が開始される。よって *abrB-lacZ* の活性量を測定することで、間接的に Spo0E のホスファターゼ活性量を測定することができる。

(3) Spo0E ΔC10 の孢子形成への影響

IPTG で誘導可能な *Pspac* プロモーター、および母細胞のみで誘導可能な *PspoVG* プロモーターの下流にホスファターゼ活性が強化されている *spo0E ΔC10*(C 末端 10aa の欠失)を置いた株を作製した。これらの株の孢子形成を顕微鏡観察および耐熱性孢子形成率により調べた。

3. 実験結果と考察

(1) Spo0E C 末端側からのアミノ酸配列欠失株の作製

Spo0E の各 C 末端欠失株の Spo0A-P 活性を *abrB-lacZ* の β-ガラクトシダーゼ活性を指標に測定した(図 3)。

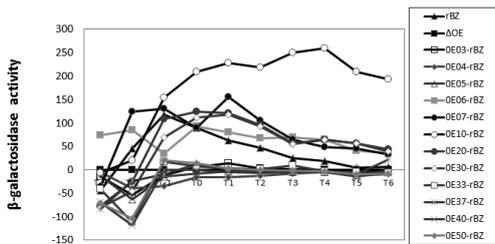


図 3 Spo0E C 末端欠失株の *abrB-lacZ* 活性

その結果、孢子形成開始後 4 時間後(T4)の活性レベルは、OE10(数字は欠失した C 末端からのアミノ酸残基数)が最も高く、次いで OE6, OE7, OE20, OE30 が野生株よりも上昇していた。また、活性がほぼ消失している株は OE3, OE4, OE33, OE37, OE40, OE50 であった。この結果を図 4 にまとめた。

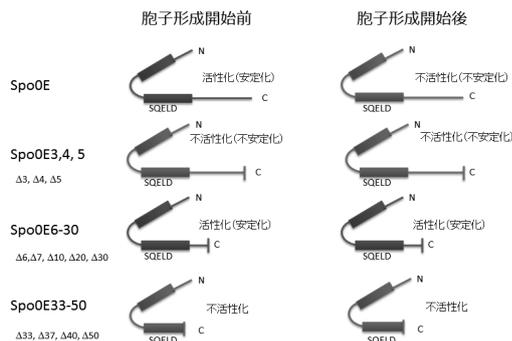


図 4 Spo0E C 末端側欠失解析から考えられる機能モデル

つまり、Spo0E の C 末端側 3~5、33~50 アミノ酸を欠失した場合には不活性化し、6~30 アミノ酸欠失した場合には活性化状態となる。即ち、C 末端側から 5 アミノ酸まではホスファターゼとして活性化するために重要であるが、この領域は外部からの刺激を受ける領域かもしれない。また、6~30 アミノ酸残基は活性を抑制している。さらに 33 アミノ酸から N 末端までのアミノ酸配列は、ホスファターゼ本体であると考えられた。なお、これらの欠失 Spo0E 検出のために N 末端に 6×His-tag と 12×His-tag を付加した Spo0E および、その発現を強化した *spo0E* 株を作製したが検出には至らなかった。

(2) Spo0EΔC10 の孢子形成への影響

この研究の過程で、ホスファターゼ活性が強化されたと考えられた OE10 が得られた。*Pspac spo0E ΔC10* 株の孢子形成率測定によって、Spo0A-P が T0 まで存在していないと孢子形成が正常に行われなかったことが示された。一方で、Spo0A-P によって転写される *spoIIE-gfp* を用いて蛍光観察した結果、孢子形成中期でも Spo0A-P が母細胞特異的に活性を持つことが報告されている[4]。このことから、母細胞特異的に Spo0E ΔC10 を発現させたところ、孢子形成に遅れが見られた。この結果、リン酸化した Spo0A は、孢子形成開始期のみならず非対称隔膜形成後の母細胞においても一定の機能を持っていることが示唆された。

4. 結言

Spo0E C 末端側からのアミノ酸配列欠失株のホスファターゼ活性を *abrB-lacZ* の活性を指標に調べた結果、活性に関わる 3 つの領域、C 末から 1-5, 6-30, 31-85 が存在することが示された。また、リン酸化された Spo0A は非対称隔膜形成後の母細胞においても必要であることが示された。

参考文献

- 1) Perego M. and Hoch J. Isolation and sequence of the *spo0E* gene: its role in initiation of sporulation *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 1:125-132, 1987.
- 2) Perego M. and Hoch J. Negative regulation of *Bacillus subtilis* sporulation by the *spo0E* gene product. *J. Bacteriol.* 173:2514-2520, 1991.
- 3) Hosoya S *et al.* Mutation in *yaaT* leads to significant inhibition of phosphorelay during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184:5545-5553, 2002.
- 4) Fujita M and Losick R. The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes & Dev.* 17:1166-1174, 2003.