

枯草菌転写制御ネットワークの全体像の解明

●藤田 泰太郎^{1, a)} ◆三輪 泰彦^{1, b)} ◆広岡 和丈^{1, c)} ◆関口 順一^{2, b)} ◆田中 暉夫^{3, a)}
◆定家 義人^{4, a)} ◆吉田 健一^{1, d)}

1) 福山大学生命工学部 2) 信州大学繊維学部 3) 東海大学海洋学部 4) 埼玉大学理学部
a) 2000-2004年度 b) 2003-2004年度 c) 2004年度 d) 2000-2003年度

〈研究の目的と進め方〉

枯草菌は、グラム陽性菌の代表として大腸菌と並ぶ基礎研究の歴史をもっている。特に、細胞分化のモデルと見なされる枯草菌の孢子形成の分子レベルでの研究は、他の生物の細胞分化の研究を凌駕するものといえる。さらに、枯草菌は α -アミラーゼやプロテアーゼ等の菌体外酵素、ペプチド系抗生物質等の生産菌として、重要な応用微生物の一つに数えられている。

日欧の国際共同研究により枯草菌ゲノムの全塩基配列が決定され、1997年Nature誌に発表された。その結果、101個のRNA遺伝子と4,100個に及ぶ蛋白質遺伝子が同定されたが、これらの遺伝子の秩序だちかつ統合のとれた発現の総体が枯草菌という細菌を形成し活動させていると考えられる。しかしながら、枯草菌蛋白質遺伝子のほぼ2分の1、2,000個以上が機能未知遺伝子であり、ゲノム研究のモデル生物としてこれらの機能未知遺伝子の体系的解明を目指す新たな日欧共同研究が精力的に推進され、機能未知遺伝子の解明が大きく前進した。このような研究背景のもとで枯草菌を総体として理解するためには、RNAと蛋白質遺伝子発現制御の絶妙なネットワークの解明が必須となってくる。そこで、最新のマイクロアレイ解析技術によるトランスクリプトーム解析、制御蛋白質の機能解析、および制御蛋白質とDNAの相互作用研究に基づく、転写制御蛋白質で構成される遺伝子発現制御ネットワークの解明研究を着想するに至った。

枯草菌遺伝子発現制御ネットワークの根幹は、全19個のRNAポリメラーゼのシグマ因子、34個の2成分制御系の応答制御因子および200個を超えるのHTH転写制御蛋白質のレギュロン発現制御の総体より形成されていると考えられる。シグマ因子は細胞の増殖や孢子形成あるいは環境適応における遺伝子転写制御を支配し、2成分制御系の応答制御因子やHTH蛋白質群は各々の傘下の遺伝子の転写制御を通じて、栄養素等の種々の環境変化あるいは特殊環境に対応する。これらの制御蛋白質の各々が支配しているレギュロンを構成する遺伝子群を同定し、かつオペロン単位で整理する。さらに、各制御蛋白質が認識し結合するシス配列を明らかにするとともに、機能未知レギュロンの機能の解明を目指す。これらの研究を通じて、各制御蛋白質の制御系を階層化し、かつ種々の環境要因に対応した遺伝子転写制御ネットワークを構築する。

枯草菌転写制御ネットワーク研究で得られた知見は、各制御蛋白質、またファミリーごとのシス配列情報を比較検討する事によってDNA結合転写制御蛋白質の配列認識機構に関する分子進化論の展開にも期待でき、また、他のバクテリアゲノムにも演繹可能であり、普遍的にゲノムサイエンスに貢献する成果となるであろう。さらには、このような体系的な遺伝子発現制御系の解明が、遺伝子発現制御の新たな秩序系を明らかにする可能性もある。

本研究では、DNAマイクロアレイ解析技術を駆使し、枯草菌の野生株とDNA結合制御蛋白質遺伝子の変異株を

種々の培養条件で増殖させ、それらトランスクリプトームを比較することにより、DNA結合制御蛋白質の標的遺伝子候補を体系的に抽出する。とくに、シグマ因子の総てと2成分制御系の多くは正の制御因子であり、これらの標的遺伝子の抽出にはこれらの因子の強制過剰発現に応答する遺伝子をDNAマイクロアレイ解析で網羅的に抽出することが出来る。

これらのDNAマイクロアレイ解析の結果とゲノム上の認識シス配列のin silico探索とを組み合わせ標的遺伝子候補を絞る。さらに、DNA結合制御蛋白質と標的遺伝子候補の制御部位との相互作用をゲル移動度シフト法やフットプリント法等の生体外系で体系的に解析し、そのレギュロン構成遺伝子と認識配列の特定を図る。これらの解析は、機能未知のレギュロンの機能解明にも結びつく情報をも提供できる。このようにして獲得した研究成果とこれまで蓄積されてきた既知文献情報を統合することにより、枯草菌転写制御ネットワークの全体像を明らかにする。

〈研究開始時の研究計画〉

- ① mRNAがポリ(A)末端を持たずmRNAを精製することが困難な原核生物のマイクロアレイ解析で非特異的なハイブリダイゼーションのシグナルによるバックグラウンドを抑える方法を考案し、枯草菌DNAマイクロアレイ技術を確立させる。
- ② 枯草菌の発芽、増殖および孢子形成期および培地条件を含む種々の培養条件で増殖させた野生株並びに種々のストレスに曝した野生株のトランスクリプトームを解析を行うことにより、発現制御を共にする遺伝子群のクラスタリングをする。
- ③ RNAポリメラーゼのシグマ因子（主要シグマSigAを除く）、2成分制御因子系の応答制御因子とHTH制御蛋白質について、野生株と各DNA結合制御蛋白質遺伝子の破壊株あるいは過剰発現株を用いたDNAマイクロアレイ解析により各制御遺伝子の制御下にある遺伝子を抽出する。

マイクロアレイ解析に用いる制御蛋白質遺伝子の破壊株は、日欧の共同研究で作製したプラスミドpMutin挿入変異株（文献：20）等を用いるが、未破壊の制御蛋白質遺伝子は本プラスミドやcatカセットで挿入破壊する。転写制御蛋白質が正の制御因子として作動する場合には、その機能が発現していない培養条件でもこれら正の制御蛋白質遺伝子を強制的に過剰発現させるとそれらの標的遺伝子の発現が上昇すると予想される。従って、これらの制御蛋白質遺伝子を強制的に発現した場合としない場合でDNAマイクロアレイ解析を行い強制発現により発現が上昇する遺伝子がこれらの制御蛋白質の標的遺伝子候補と考えられる。制御蛋白質過剰生産株は、プラスミドベクターを用い制御遺伝子をspacプロモーターの下流にクローン化し、IPTG添加により、正の制御因子を過剰生産する。

- ④ DNA結合転写制御蛋白質（EFCファミリーのシグマ因

子、2成分制御系の応答制御因子およびHTH制御蛋白質)の網羅的なDNAマイクロアレイ解析の結果に基づき、機能既知および機能未知の制御蛋白質の各々の支配するレギュロンの分子遺伝学的手法による機能解析を進める。すなわち、転写制御蛋白質遺伝子を大腸菌にクローン化し、その発現蛋白質の標品を用いてゲル移動度シフト解析やフットプリント解析を行い、直接の標的か否かが明らかにすることにより、機能未知のレギュロンの機能を類推する手掛かりを掴む。

- ⑤細胞内で遺伝子発現制御を引き起こす要因は種々の低分子化合物の濃度の変動と考えられる。従って、メタボロームがトランスクリプトームを規定している。従って、転写制御ネットワーク構築のためには、トランスクリプトーム解析とメタボローム解析を連動させる必要があり、京大の西岡研究室と共同して、DNAマイクロアレイデータを得るためRNAを調製した同じ培養条件下で、メタボロームを解析しアレイデータと比較・検討する。
- ⑥DNA結合転写制御因子の文献情報をデータベース化する。また、本計画研究で蓄積した膨大なDNAマイクロアレイ解析データの表示法を開発するとともに、その公開を図る。

＜研究期間の成果＞

- ①1998年より枯草菌の全蛋白質遺伝子のPCR産物をスポットしたDNAチップの作成とマイクロアレイ解析技術の開発に取り組み、本計画研究の初年度には枯草菌のマイクロアレイ技術を確立することができた。本技術は、次に挙げる特徴ある解析方法を採用しており、原核生物のマイクロアレイ技術全般に適用できるものである。(文献：2、3)
- a. 標準と試料RNAからcDNA合成する際、プライマーは全遺伝子に相補的なオリゴヌクレオチドの混合物を用い、耐熱性の逆転写酵素を用いて65℃で逆転写する。
- b. RNA標品の微妙な差等により逆転写反応の伸張に

化したCy3またはCy5でカップリングしてラベルする。

- c. DNAチップとのハイブリダイゼーションの温度を70℃で行う。この事とa)の方策により、DNAマイクロアレイ解析の本質的な問題であるクロスハイブリダイゼーションによるハイブリダイゼーションのシグナルの干渉を低下させる。
- ②枯草菌の発芽、増殖および胞子形成期および種々の培養条件下で増殖させた野生株における遺伝子発現のクラスタリングにより次に列挙する研究成果を挙げた。
- カタボライト抑制と炭素代謝に関与する遺伝子の発現制御の解析(文献：2、4、6、15)

グルコース添加および非添加の栄養培地で野生株を増殖させRNAを精製する。これらRNAを用いたDNAマイクロアレイ解析により、グルコース抑制を受ける遺伝子群を抽出した。さらに、これらの遺伝子群のうちCcpAが関与するカタボライト抑制を受ける遺伝子を選び出した。(図1参照)。また、種々の炭素源で野生株を増殖させ、マイクロアレイ解析にかけることにより、解糖と糖新生時に発現する遺伝子を解析するとともに各々の炭素源資化に必要な遺伝子群をクラスタリングした。代謝され難い炭素源での増殖では、増殖速度が遅くなるに従い胞子形成遺伝子等の顕著な発現がみられた。グルコースでの増殖は解糖系を作用させ、リンゴ酸では糖新生を促進させる。リンゴ酸では、解糖の逆反応を触媒するホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼとグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをそれぞれコードする、*pckA*と*gapB*の発現上昇がみられた。*ywkA*は機能未知遺伝子であるが、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子と相同性があり、これも解糖の逆反応を触媒していると考えられる。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼが触媒する1, 3-ジホスホグリセリン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸への反応については、1種類の酵素が可逆的な反応を触媒するとこれまで考えられていた。しかし、最近になって、枯草菌では*GapA*と*GapB*の2種類の酵素がそれぞ

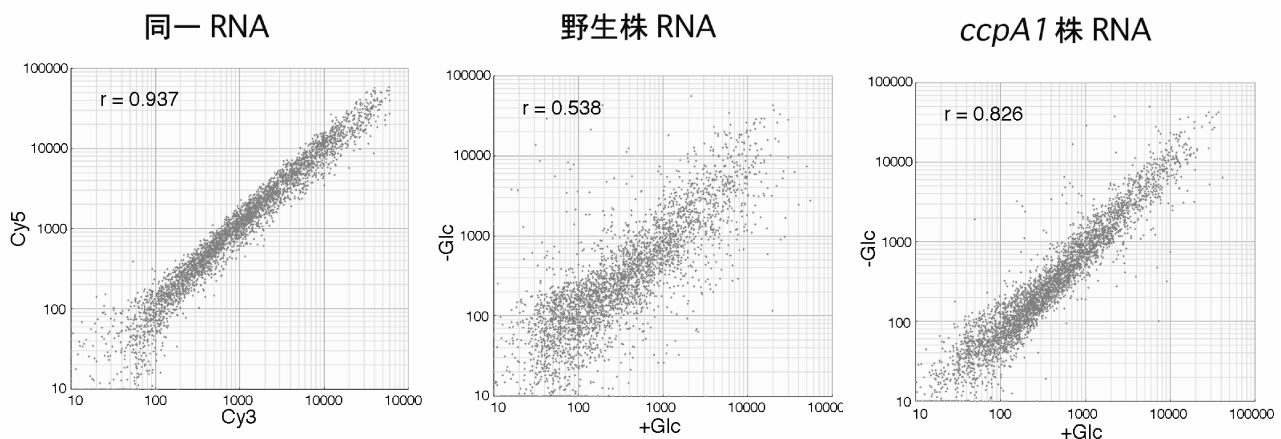


図1. 枯草菌グルコース抑制のマイクロアレイ解析 同一のRNA、枯草菌を用いて得られた全遺伝子のスポットのCy3とCy5の蛍光強度をプロットすると両者の相関係数r値は0.937であるが、栄養培地のみおよびグルコース(Glc)を添加して増殖させた野生株から調製したRNAを用いると炭素代謝に関与する多くの遺伝子の発現が変動するため、r値は0.538低下する。しかし、同様の培地条件下で増殖させた*ccpA1*株の場合はカタボライト抑制に非感受性になるため、r値が高まり0.826となる。(文献：2)

わずかな差が生じ、本来の遺伝子の発現誘導比を正確に得られない。そこで、cDNA合成の際、aminoallyl-dUTPを用いてそれぞれのcDNAをaminoallyl化した後、N-hydroxysuccinimideで活性

れ不可逆反応を触媒し、前者が解糖反応を、後者が糖新生反応を進めることが判明し、この知見と一致した結果がこのマイクロアレイ解析でも得られた。ピルビン酸デヒドロゲナーゼをコードする*pdhABCD*も発現の

上昇がみられるが、これは糖新生で生じたピルビン酸からアセチルCoAを供給するためと思われる。一方、グルコースでの増殖時には、*tpi*、*pgk*、*gpm*および*eno*の4つの遺伝子からなるオペロンが誘導された。これらはそれぞれ解糖系の中に位置するトリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼおよびエノラーゼをコードしており、解糖時にはそれらの必要性が増大するためと思われる。*gapA*も解糖時に誘導発現されるが*GapA*は上述の*GapB*の逆反応、すなわち解糖を促進する反応を触媒する。同じく発現誘導される*yjmC*は機能未知遺伝子であるが、TCAサイクルのリンゴ酸からオキサロ酢酸を生成する反応を触媒するリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子と相同性がある。この解析から同定された*ywkA*や*yjmC*といった機能未知遺伝子は、他の遺伝子との相同性から糖代謝に関与していることは予想されていたが、解糖から糖新生への移行過程で発現制御されることが新たに判明した。

●窒素代謝制御に関与する遺伝子群の発現と制御の解析

枯草菌では、グルタミンが最も効率のよい窒素源であり、さらにアミノ酸群を添加すると最高の増殖速度が得られる。一方、グルタミン酸は窒素源として効率が悪いものの一つである。そこで、これら種々の窒素源での増殖時に発現する遺伝子をクラスタリングするとともに、窒素代謝に関与する遺伝子群の発現を制御すると考えられている*GlnA*、*GlnR*、*CodY*および*TnrA*の標的遺伝子の同定を行った。その結果、種々の窒素源での増殖時に発現する遺伝子群とこれらの制御蛋白質の標的遺伝子の間には密接な関連があり、その制御が*GlnA*に依存するものと依存しないものがあることがわかった。

●枯草菌のoutgrowth期の遺伝子発現プロファイリング

枯草菌の胞子は外環境の発芽誘導物質を認識し発芽する。outgrowth期はその発芽期から対数増殖期への移行段階であり、形態的にも変化を示すことから枯草菌のライフサイクル上重要な時期である。発芽期の最終段階からoutgrowth期にかけての遺伝子発現プロファイルを用いてDNAマイクロアレイを用いて解析し、胞子中に特定のmRNAが残存している事および発芽の極初期からoutgrowthに必要な殆ど総ての遺伝子が転写される事がわかった。

●アミノ酸合成のフィードバック制御のDNAマイクロアレイ解析

枯草菌野生株を20種類のアミノ酸を添加した最少培地で対数増殖期中期まで培養し、DNAマイクロアレイ解析で遺伝子発現を調べた。アミノ酸合成経路に基づいて20種類のアミノ酸から数種類ずつ除いたところ、アルギニン、メチオニン、トリプトファンなど6種類のアミノ酸合成遺伝子群は、その最終産物であるアミノ酸を含まない培地で発現制御が解除されフィードバック制御されると判った。また、既知のアミノ酸合成遺伝子と類似の発現様式を示す遺伝子を検索したところ、メチオニン、アルギニンとシステインで特異的にフィードバック制御される機能未知遺伝子群を発見し、これら遺伝子のアミノ酸合成やアミノ酸の細胞内への取り込みへの関与が示唆された。

③DNA結合制御蛋白質の欠損株または過剰発現株を用いた、標的遺伝子候補を抽出するDNAマイクロアレイ解析の結果、次に列挙する成果が得られた。

●ECFファミリーのシグマ因子をIPTG添加により過剰産生できる菌株を用いて、7種のECFシグマ因子の網羅的

な標的遺伝子候補の抽出を終了した。ECFシグマ因子は、種々の物理的あるいは化学的ストレスに応答するが、これらストレスにより誘導される遺伝子群は、広範なストレスに対応するシグマBの支配下にある遺伝子とは明らかに区別できた。また、*SigZ*を除くECFシグマ因子オペロンはすべて自身のシグマ因子がその転写に与っていた。

枯草菌の鞭毛形成に関わるシグマDのマイクロアレイ解析も行い多数の新規な標的遺伝子を同定した(文献:21)。

●枯草菌の2成分制御系の中で、最初に強制発現系でのマイクロアレイ解析が作動するかどうかを検討したが、*DegS-DegU*系である(文献:3)。プラスミド(*pDG148*)に*degU*遺伝子とそのSD配列を含むDNA断片をクローン化し、IPTGを加えて培養すると*degU*遺伝子を強制発現することができる。作製プラスミド(*pDG148-degU*)を、*DegU*の既知の標的遺伝子の一つアルカリ性蛋白質分解酵素(*aprE*)にレポーター遺伝子*lacZ*を所持する野生株と*degS*欠損変異株(*DdegS*)に形質転換し、IPTG添加後の β -ガラクトシダーゼの活性を追ったところ、野生株ではIPTGでの*degU*の強制発現の有無に関わらず同じように β -ガラクトシダーゼの合成がみられる。ところが、*DdegS*株では、IPTGを添加した場合にのみ β -ガラクトシダーゼの合成が認められた。この事実は、枯草菌を*degS*欠失にすることにより、外界からのシグナルが遮断され*DegU*をリン酸化されていない状態、すなわち標的遺伝子の発現を抑えた状態に置くことができ、IPTGを添加することによりリン酸化されていない*DegU*を過剰生産することにより、リン酸化された*DegU*と同じように標的遺伝子の発現を上昇させると考えられる。そこで、IPTG添加有無で培養したプラスミド(*pDG148-degU*)を保持する枯草菌(*DdegS*)から調製したRNAを使用したマイクロアレイ解析による*DegU*の標的遺伝子の同定を行ったところ、幾つかの既知遺伝子を含む標的遺伝子候補を抽出する事ができた。この成績は、枯草菌の機能不明の2成分制御系の標的遺伝子の同定にもこの手法が適用出来ることを示すものであった。

枯草菌には、35個の応答制御蛋白質が同定されている。その内、*YycF*は対応するセンサーキナーゼ(*YycG*)とともに必須蛋白質であり、センサーキナーゼ遺伝子の破壊を含む上記の標的遺伝子同定法は適用できない。また、*Spo0F*、*CheY*、*YneI*、*CheV*と*CheB*の5種の応答制御蛋白質は、C末のDNA結合ドメインをもたず、過剰発現させても標的遺伝子の発現の変動が期待できない。さらに、*Spo0A*と*ResD*の標的遺伝子群は他の制御蛋白質の制御も受けている可能性が高く、本標的遺伝子同定法が有効に機能しないと考えられた。そこで、*DegU*、*ComA*と*PhoP*を含め27種類の応答制御蛋白質の網羅的なDNAマイクロアレイ解析を実施したところ、23種の機能未知の2成分制御系応答制御蛋白質の標的遺伝子候補のリストには、かなりの機能既知の遺伝子が含まれていた。この機能既知の標的遺伝子を足がかりに、機能未知の2成分制御系の機能解析へと進む事ができた。また、これら標的遺伝子群の重なりから、図2に示す2成分制御間の相互作用が予想できた。(文献:5、8)

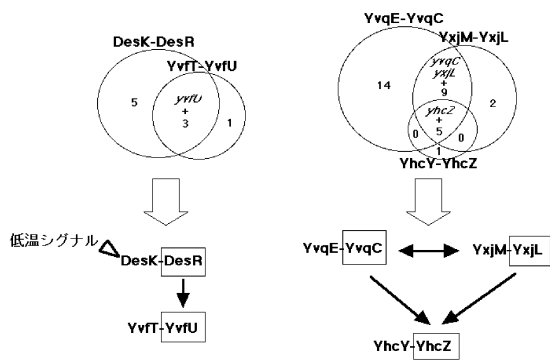


図2. マイクロアレイ解析で明らかになった2成分制御系間の相互作用 DesK-DesRとYvfT-YvfUの各々の標的遺伝子候補とYvqE-YvqC、YxjM-YxjLとYhcY-YhcZの各々の標的遺伝子候補に顕著な重複(重なりあっている円内の数字は重複数)が見られる。前者の重複は、DesK-DesRとYvfT-YvfU系の標的遺伝子群のなかにyvrU遺伝子が含まれる事で説明でき、また後者の重複は、YxjM-YxjL系の標的遺伝子群には応答制御蛋白質遺伝子(yvqCとyhcZ)が、YvqE-YvqC系の標的遺伝子群にもyxjMとyhcZが含まれる事から説明できる。これらの重複から、矢印で示す2成分制御系の相互作用が示唆された。(文献:5)
●枯草菌には、DNA結合HTH転写制御蛋白質が200個以

上存在することがPfam検索で明らかになっている。これらのHTH制御蛋白質の全破壊株(既存のものおよびcatカセット挿入による新たなもの)を揃え、野生株と比較する網羅的なDNAマイクロアレイ解析を2002年度末に完了させた。

④DNA結合転写制御蛋白質(EFCファミリーのシグマ因子、2成分制御系の応答制御因子およびHTH制御蛋白質)の網羅的なDNAマイクロアレイ解析の結果に基づく、分子遺伝学的体系的的手法による体系的な機能解析の結果、次に列挙する研究成果が得られた。

●ECFシグマ因子(文献:12、19、29、40)

ECFファミリーのシグマ因子の過剰発現系を用いたDNAマイクロアレイ解析により、標的遺伝子候補を抽出した。これらの結果をもとに、ECFファミリーのシグマ因子の発現を誘導するストレスの特定を行い、SigV、SigZとYlaCが、それぞれ高浸透圧と高温、高浸透圧および過剰酸化で誘導されることを見いだした。また、酵母の2ハイブリット系、および遺伝子破壊により、SigV、SigYとYlaCのアンチシグマを同定した。さらに、anti-SigV、-SigW、-SigXのC末側にシグナル受容部位がある事を明らかにした。これらの研究の結果、図3に示すECFファミリーのシグマ因子の機能を総括的に捉える事ができた。

●2成分制御系(文献:17、31、33、35、38)

現在までの2成分制御系の研究の結果、応答制御蛋白質の過剰発現系を用いたDNAマイクロアレイ解析および2成分制御系遺伝子のシネチー解析によっても機能の類推すら出来ないものは6種にすぎない。DNAマイクロアレイ解析の結果に基づいて、その機能の実

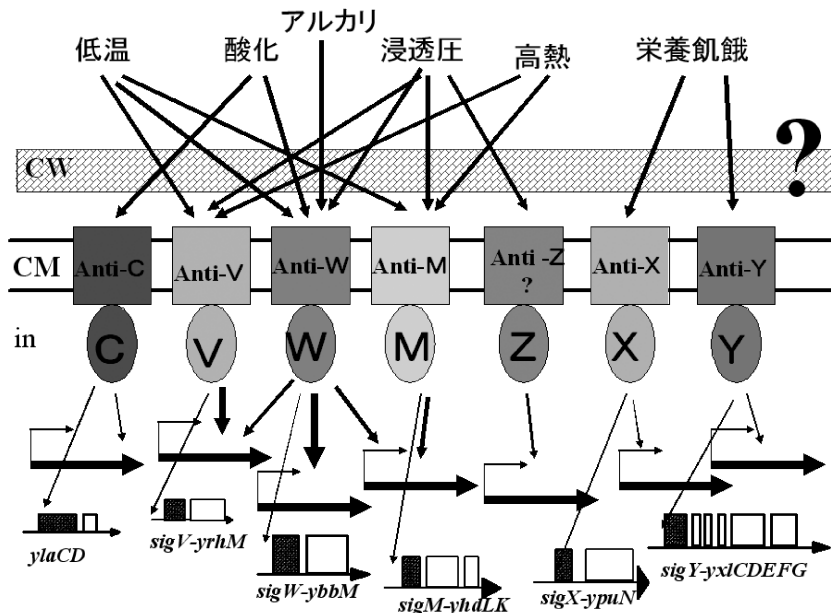


図3. ECFシグマ因子の活性化をもたらす環境ストレスの多様なシグナル伝達 7種のECFシグマ因子の各々が細胞膜に組み込まれたアンチ(Anti)シグマと結合することにより、不活性化している。アルカリ、酸化、高温、栄養飢餓等の環境ストレスがあると未知の機構で細胞壁を通じ、これらのシグナルが伝達されアンチシグマが不活性化され、ECFシグマが活性化される。これらのシグナル伝達の様相は複雑で、例えば低温シグナルがSigV、SigWとSigMを活性化するように、一つのシグナルが複数のシグマ因子を活性化したり、一つのシグマ因子が複数のシグナルにより活性化される。ECFシグマ因子は、いくつかの標的オペロンを有する。その標的の一つが、シグマ遺伝子オペロンであることが多く、普通はそのオペロンにアンチシグマ因子もコードされており、またそのシグマ自身をもつRNAポリメラーゼで転写される。

証されていないレギュロンで機能解析が進んだのは、YccG-YccH、YrkQ-YrkP、YvrG-YvrH、YufL-YufM (MalK-MalR)、YcbA-YcbB (GlnK-GlnL)、YclK-YclJ、YdfH-YdfI、YhcY-YhcZおよびYvrG-YvrHである。MalK-MalRはリンゴ酸をセンスし、その取り込みと代謝に関与するywkA、maeN、yflSを誘導する。GlnK-GlnLはグルタミンをセンスし、その取り込みと代謝に関与するglsA-glnTオペロンを誘導する。YdfH-YdfIは薬剤耐性に関連し、YrvG-YrvHは細胞表層の維持や安定化に関与すると推測された。YccG-YccHはエタノールストレスに関与しているとの知見を得た。

この網羅的研究の結果、枯草菌2成分制御系のなかでグローバルな制御系は5個余りとかなり少なく、特定の物質の取り込み、代謝あるいは排出等の機能に関与するものが大部分を占める事が判明した。シンテニー解析をも行い機能を類推した枯草菌の2成分制御系の個々の機能を表1に纏める。

表1. 枯草菌2成分制御系の機能

＜排出系の誘導＞	
YccG/H: Na	BceS/R: 薬剤
YvcQ/P: 薬剤	YxdJ/K: 薬剤
YdfH/I: 薬剤	YfiJ/K: 薬剤?
YkcY/Z: 薬剤?	YcbM/L: 薬剤?
YvfT/U: 薬剤?	
＜細胞膜・壁ストレス＞	
CssS/R: 細胞膜	DesK/R: 細胞膜
LiaS/R: 細胞膜	YvrG/H: 細胞壁
YrkQ/P: 表層蛋白質	YclK/J: 細胞外多糖
YycG/F: 細胞外皮	LytS/T: 自己融解酵素
＜環境ストレス＞	
ResE/D: 酸素	
＜小分子の取り込み＞	
PhoP/R: リン酸	CitS/T: クエン酸
DctS/R: C4-2 炭糖	MalK/R: リンゴ酸
GlnK/R: グルタミン	YesM/N: 糖
＜走化性＞	
CheA/B	
＜定常期の遺伝子発現＞	
ComP/A: 形質転換能	DegS/U: 分解酵素
KinABCD/SpoF: 胞子形成	
(Spo0B)/Spo0A: 胞子形成	
＜機能未知＞	
YbdJ/K	YkoH/G
YhcY/Z	YxiM/L
YwpD/-	- /YneI

小笠原直哉ら 蛋白質 核酸 酵素 50: 2191-2197 (2005)
より改変

ランスクリプトームを比較する、網羅的DNAマイクロアレイ解析を行った。その結果に基づいた、約200種に及ぶHTH転写制御因子の支配するレギュロンの網羅的機能解析は困難で、グローバルな制御因子である、CcpA、TnrA、CodY、AhrC、RocR、ComK、DegR、SenS、PaiAとDeoRレギュロンの機能解析、並びに薬剤耐性遺伝子のHTH転写制御因子を多く含む、MarR、TetRとMerRファミリーの制御因子の支配するレギュロンの網羅的解析を進めた。MarRの21因子 (YbfA、YdcH、YdgG、YdgJ、YetL、YfiV、YhbI、YhjH、YkmA、YkoM、YkvE、YpoP、YqzB、YsmB、YusO、YvmB、YwaE、YwhA、YwoH、YxaD、YybA)、TetRの19因子 (LmrA、PksA、YcnC、YdeS、YdgC、YerO、YezE、YfiR、YhgD、YobS、YrhI、YttP、YuxN、YvaF、YvdT、YvkB、YwcC、YxaF、YxbF) およびMerRの5因子 (TnrA、YdfL、YfmP、YhdQ、YyaN) の蛋白質生産系を構築した。TnrAレギュロンの解析に続くLmrAとYvmBレギュロンの解析では、それぞれ2種、3種の標的遺伝子の同定に成功した。既にMarRの13因子 (YbfA、YdgG、YdgJ、YetL、YfiV、YhbI、YkmA、YkvE、YqzB、YusO、YvmB、YxaD、YybA)、TetRの13因子 (LmrA、YcnC、YdeS、YezE、YhgD、YobS、YrhI、YsiA、YuxN、YvaF、YvdT、YvkB、YxaF) およびMerRの2因子 (TnrA、YfmP) の標的遺伝子を同定し、これら28因子のうち17因子の結合配列の同定に成功している。また、LmrAとYxaFの誘導物質は、ケルセチン等のフラボノイドであり、YsiAレギュロンは脂肪酸のβ-酸化に関与する遺伝子群から成り立っていた。さらに、YcnC、YvaF、YvdTの標的遺伝子のコードするefflux transporterの基質薬剤を特定した。

●代謝制御に関与するグローバルな転写制御因子(CcpA、CodY、TnrAとRelA)のDNAマイクロアレイ解析とその結果に基づく分岐鎖アミノ酸合成オペロンのこれらの転写因子による多重制御の分子遺伝学的解析で次の基幹代謝ネットワークを明らかにする事ができた。(文献: 11、23、30)

枯草菌の炭素代謝制御、窒素代謝制御や緊縮制御の遺伝子発現のクラスタリング解析、代謝に関連した転写制御蛋白質のDNAマイクロアレイ解析による標的遺伝子の抽出およびそれに続く分子遺伝学的解析から、合成系を代表する分岐鎖アミノ酸合成の制御を中心に据える炭素代謝、窒素代謝と緊縮制御の次のようなネットワークを想定できた。すなわち、炭素代謝、窒素代謝、アミノ酸合成、緊縮制御等の各ネットワークが主要アミノ酸等の合成制御に集約され、細胞総体としてバランスのとれた代謝調節が機能している。これら主要アミノ酸はグルタミンと分岐鎖アミノ酸で、グルタミンは窒素供給状態、分岐鎖アミノ酸は細胞の栄養状態の指標となり、各々窒素代謝のグローバルな転写制御蛋白質であるTnrAとCodYのオペレーターへの結合活性を調節し、有用遺伝子群の転写を制御する。炭素の供給状態は、フルクトース-二リン酸量に反映され、炭素代謝のグローバルな転写制御蛋白質であるCcpAの機能を制御する。細胞のエネルギー状態は細胞内のGTPのレベルに反映され、この量はCodYによって検知され胞子形成を始め種々の細胞機能を制御する。細胞の栄養飢餓状態を感知するRelAは、GTPをppGppに変化させることでIMP脱水素酵素活性を阻害して、GTPの濃度を低下させることにより、CodYの作動を止め、またppGppそのものによる転写制御をも引き起こす。

蛋白質合成を反映すると考えられる分岐鎖アミノ酸

●HTH転写制御因子 (文献: 7、9、11、13、14、15、22、24、37)
野生株とHTH転写制御因子遺伝子の欠損変異株とのト

合成に与る *ilv-leu* オペロンは、*CodY* と *TnrA* で負に *CcpA* と *RelA* で正に制御される。(図4、参照)。これらのグローバルな代謝制御蛋白質の認識シス配列は *ilv-leu* プロモータの上流に整然と配置されている。窒素潤

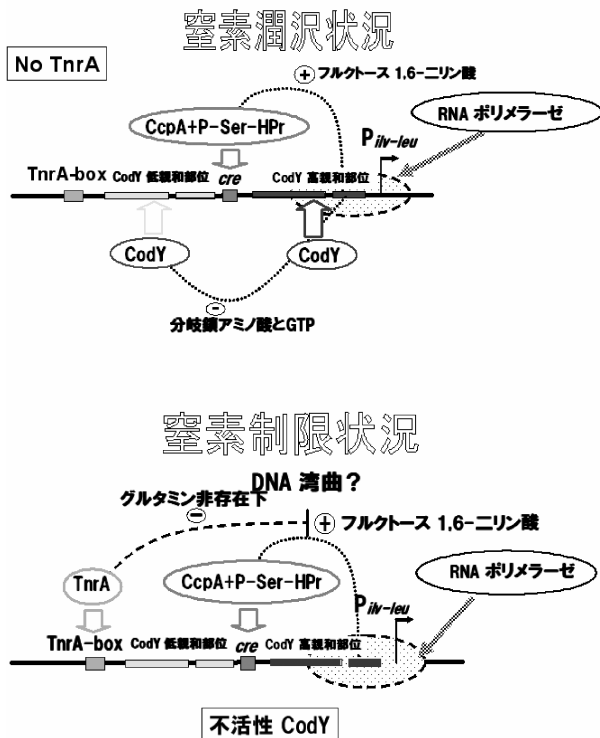


図4. 枯草菌の分岐鎖アミノ酸合成オペロンの窒素供給状態に依存したグローバルな代謝制御因子による高度な制御 *ilv-leu* プロモータの上流には *TnrA* の結合 *cis* 配列 (*TnrA*-box)、*CcpA* と *P-Ser-HPr* の複合体の結合 *cis* 配列 (*cre*) および *CodY* 結合配列 (低親和部位と高親和部位) が整然と並んでいる。炭素源としてグルコースを使用した場合、生体内のフルクトース-二リン酸の濃度が上昇し、*P-Ser-HPr* が形成され、*CcpA* と *P-Ser-HPr* との複合体が *cre* に結合し RNA ポリメラーゼと相互作用して、プロモーター活性を上げる。培地中の窒素が潤沢な時 (グルタミンとアミノ酸を使用) は、コリプレッサーである分岐鎖アミノ酸と GTP が *CodY* を活性化し、その結合部位を認識して結合することにより負の制御を及ぼす。*TnrA* は、グルタミンが存在する時はグルタミン合成酵素にトラップされ、その機能を失っている。窒素源が制限されている時 (グルタミン酸のみを使用) は、*CodY* のコリプレッサー濃度の低下のために失活するが、*TnrA* がグルタミン合成酵素から遊離し *TnrA*-box に結合して、転写を抑える。この負の制御は、*CcpA* と *P-Ser-HPr* との複合体による正の制御を DNA 湾曲を介してキャンセルするのではないかと考えている。(文献: 30)

沢培養条件では、*CcpA* による正の制御と窒素潤沢状況で活性化する *CodY* による負の制御を受ける。一方、窒素制限状況では、窒素潤沢状況と同じく、*CcpA* による正の制御が働くが、*TnrA* による負の制御が機能する。さらに緊縮制御がかかると形成された ppGpp により GTP の濃度が低下し、*CodY* の不活性化とプロモータの活性化が起こる。このような巧妙な多重制御により、細胞の栄養やエネルギー状態を反映させ、炭素代謝や窒素代謝のバランスをとり、アミノ酸、蛋白質合成ひいては細胞増殖の制御へと至る。(図5参照)。

グラム陽性の低GC細菌では、これら炭素代謝と窒素代謝のグローバルな転写制御因子は極めて良く保存され、基本的な代謝制御が極めて類似している。従って上記ネットワークは、枯草菌のみならず、広く病原菌

を含む低GC含量のグラム陽性菌全体に適用されうるものである。このような炭素代謝、窒素代謝等の基幹代謝制御間のネットワークは、他の生物にも広く存在している事を予見する。

- ⑤ 西岡研究室で確立した、メタボローム解析法に準じて、枯草菌細胞をメタノールか蟻酸に浸潤し、代謝産物を抽出した。抽出液をキャピラリー電気泳動 (CE) にかけて、代謝産物を分離し質量分析計 (MS) にかけて、個々の代謝産物を分析した。主として炭素代謝について解析したところ、対数増殖期における代謝物質の濃度プロフィールは、枯草菌を解糖系で代謝される炭素源で培養すれば大きな変動はなかった。代謝物質の濃度は、炭素源とした物質や、クエン酸、コハク酸、乳酸では比較的高い濃度であるが、これら以外の主要代謝物質で予想に反して低かった。測定した主要代謝物質は、ATP を合成、細胞増殖に必要なアミノ酸や核酸を合成する際の原料として利用される代謝物質である。対数増殖期では細胞が激しく分裂・増殖している状態にあるので、主要代謝物質は生合成されると代謝反応によってすぐに変換され、代謝ネットワーク上を拡散するように消費されていくのであろう。グルコースとフルクトースは、細胞外から細胞内の代謝系への入口がそれぞれ解糖系のグルコース6-リン酸、フルクトース-二リン酸と互いに近いので、それらを炭素源としたときの代謝物質プロフィールは似ていることが予想されていた。グルコースを炭素源とした場合とフルクトースを炭素源とした場合の代謝物質プロフィールを比較すると、代謝物質の濃度が3倍ほど異なる代謝物質が3つほどあるが、それ以外の代謝物質では2倍以内の濃度差で互いによく似ている。このことは、この実験における枯草菌の培養、代謝物質の抽出、CE-MSによる測定が、再現性・信頼性ともに極めて高い分析法であることを示した。

また、枯草菌のメタボローム解析研究から代謝経路はいくつかのブロックに分けられる事、およびアイソザイムのなかの一つの酵素の変異は表現型に現れることなく極めてに巧妙に代謝産物の量により相補される事等、極めて示唆に富むデータを得てきた。このような代謝変異株を用いたDNAマイクロアレイ解析とメタボローム解析のデータを連動させる事により、ある特定の代謝系の酵素遺伝子の転写制御や代謝酵素の活性調節に与るキー代謝産物を特定していく事が可能であった。

- ⑥ 枯草菌の転写制御因子のデータベース {DBTBS (文献: 1)、BSTF} を作成した。本計画研究により、500近くの枯草菌のDNAマイクロアレイ解析のデータを蓄積した。これらのDNAマイクロアレイ解析データのうち論文として公表されたものに関しては、<http://www.genome.ad.jp/kegg/expression> で公表している。その他のデータもデータベース化した。

DNAマイクロアレイ解析の膨大なデータを的確に表示する事も必要となってくる。そこで、図6に示すインテックW&G社と枯草菌のDNAマイクロアレイデータの表示ソフト (枯草菌WebGen-Net) を開発した。

研究成果の総括

枯草菌には18個のRNAポリメラーゼのシグマ因子が存在する。さらに、34個の2成分制御系の応答制御蛋白質および約200程のHTH制御蛋白質群が同定されており、これらの制御蛋白質によるレギュロン発現制御の総和が枯草菌転写制御ネットワークである。本研究では、DNAマ

マイクロアレイ技術を駆使し、種々の培地条件下で増殖させた野生株における遺伝子発現のクラスタリングとDNA結合蛋白質遺伝子の破壊株を用いた、そのレギュロンの構成遺伝子候補の抽出を行った。これら転写制御ネットワークそのものと見なされる、500近くに上るDNAマイクロアレイ解析実験データの殆どに今後実証すべき知見が含まれていた。これらの解析結果に基づき、環境に应答する転写制御ネットワークの解明を目指し、機能が類推あるいは未知のECFシグマ因子、2成分制御系およびMarR、TetRおよびMerRファミリーのHTH制御蛋白質の網羅的な分子遺伝学的レギュロン機能解析を行ったところ、個々の解析の多くを学術論文として公表するとともに次のような事実が明瞭になった。

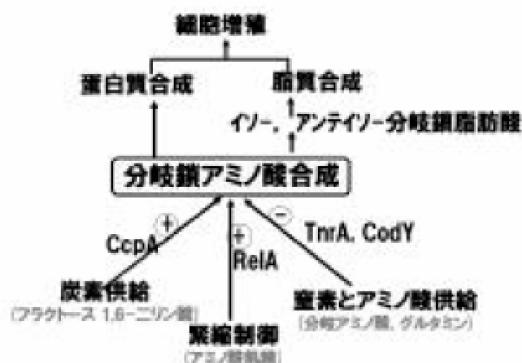


図5. 枯草菌の基幹代謝ネットワーク 図の説明は本文に記載してある。

1. 炭素代謝、窒素代謝、アミノ酸合成、緊縮制御等の各ネットワークが主要アミノ酸（分岐鎖アミノ酸、グルタミン）等の合成制御に集約され、細胞総体としてバランスのとれた代謝調節が機能していた。
2. 土壌細菌の枯草菌は、自然環境において様々なストレスに曝される。ECFシグマ因子は主として物理的に、2成分制御系は主として栄養ストレスに関係しているとの示唆を得た。
3. 枯草菌は土壌中で種々の有害薬剤に曝され、抗生物質を生産する放線菌等と共存しつつ生存してきたためか、種々の薬剤や抗生物質等に対する耐性機構を有する。この耐性機構のいくつかはECFシグマ因子や2成分制御系レギュロンに担われているが、多くはHTH制御蛋白質レギュロン（特にMarR、TetRおよびMerRファミリーに属するもの）が担っている。
4. 環境変化は特定のシグナル伝達系を介して、直線的な遺伝子発現の変化をひき起こすのではなく、複数のシグナルシグナル伝達系が、相互作用しながら機能ネットワークを形成しているという新しい姿が浮かび上がってきた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

国内外を問わず細菌の遺伝子発現制御のネットワークの構築研究は、ゲノム研究の一つの柱と見なされている。本研究開始当初、国外では枯草菌転写制御ネットワーク構築研究が、EUのプロジェクトとして始動していた。EUのプロジェクトが終了した2002年まで本研究は日本とEUとのそれまでの国際協力研究をさらに発展させることを留意し、EUのプロジェクトと密接に連動させ情報交換をした。

本計画研究によるDNAマイクロアレイ解析を引用し、そのデータ (<http://www.genome.ad.jp/kegg/expression/>)

を公表した関連論文は、15編ある。これは、国際的に見て枯草菌のトランスクリプトーム解析を質・量ともに圧倒するものである。また、転写制御ネットワークの全体像の構築を目指す、トランスクリプトーム解析結果に基づいた2成分制御系の網羅的な機能解析やシグマ因子とHTH制御蛋白質の体系的なレギュロンの構成遺伝子の同定と機能解析は国際的に例がない。さらに、トランスクリプトームとメタボロームを統合せんとする研究も、国際的に新規なものである。このように、国際的にみても枯草菌のみならず原核生物の転写制御ネットワーク研究の進展に大いに貢献した。なかでも、枯草菌の分岐鎖アミノ酸合成系が、分解系代謝制御に関わるグローバルな転写制御因子により高度に制御されていることが明らかになった。この事は、個々の遺伝子発現制御ネットワーク研究から、ネットワーク間の連携を明らかにしていくという、細胞機能のシステムの理解を目指す今後の方向を示す研究として注目されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ECFシグマ因子、2成分制御系やHTH制御蛋白質の体系的機能解析で、それらレギュロンの構成遺伝子の解析や認識シス配列の解析は順調に進んだが、機能未知レギュロンの機能解析や2成分制御系のシグナルの同定は多大な労力を必要とするため、解析ができたのは極一部であった。また、生体外系での制御タンパク質のDNA結合能とシス配列との関連性を現在のシス配列検索アグロリズムで類推することは極めて困難であった。

本計画研究で膨大な遺伝子発現制御の情報を得、転写制御個々のレギュロンの織りなすネットワークの一端を明らかにするという大きな成果を挙げられた。しかしながら、細菌においてさえ数百のDNA結合転写制御因子が織りなす転写制御ネットワークの根幹さえモデル化することは現在のデータ収集量やその処理法では極めて困難で、ましてや転写制御の全体像を捉えるまでには至らなかった。

〈今後の課題〉

●本計画研究で到達できなかった、今後の課題として次の点が挙げられる。

1. 転写制御ネットワークの発動に与るのは代謝産物等の低分子化合物であり、その生体内の種類および濃度が極めて重要である。そのため、本計画研究でも試行したが、転写制御ネットワークとメタボローム解析を連動させる事が肝要である。
2. DNA結合転写制御蛋白質は、標的遺伝子の発現制御部位のシス配列を認識して機能する。これらシス配列の一部は一次配列に強く依存するが、多くは一次配列に起因する高次構造の認識を含みそのコンセンサス配列を予想することが困難である。このDNA結合転写制御蛋白質とシス配列の認識機能の生物種にとらわれない体系的な解明が必要となる。
3. DNAマイクロアレイデータの収集ではもっと目標を絞って関連する遺伝子群のプロファイルデータを多量に収集することが必要であろう。今後、こうした経験を踏まえうえて、実験研究者と情報科学者の共同研究として、細胞機能のシステムの理解に挑戦する事が肝要である。

●今後、本計画研究で獲得した知見をもとに展開させる応用研究として次の2研究課題を挙げる。

1. 枯草菌は、菌体外酵素や抗生物質の産生、イノシン酸等の呈味性成分の発酵生産等に、産業界で頻用される有用な微生物である。本計画研究により明らかにな

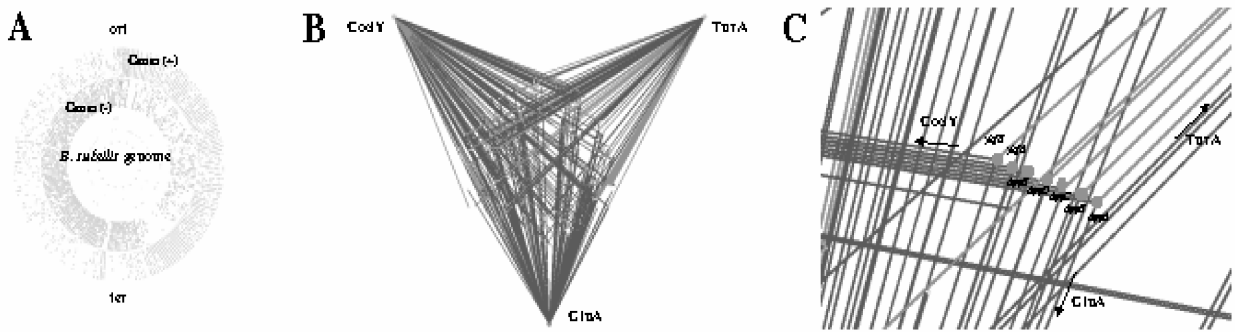


図6. 枯草菌の転写制御表示ツール (*Bacillus subtilis* WebGen-Net) による表示例 このツールは、インテックW&G社との共同開発である。(A) 枯草菌の全蛋白質遺伝子4,100個をゲノムの+鎖にある遺伝子群を外側に-鎖にある遺伝子を内側にゲノム上の位置に従い円形に配置する。DNA複製の方向と遺伝子転写の方向が一致する傾向があるので、図のような偏りが出来る。(B) GlnA, CodYとTnrAの転写制御蛋白質は、窒素代謝制御に関与している。制御蛋白質群は遺伝子群が作る円の内側に位置しているが、これらの3種の制御蛋白質を各々三角の頂点に移動させ、そこから各標的遺伝子群と直線で結んだものが、この図である。(C) B図を10倍に拡大し、*dppABCDE-ykfAB*遺伝子群のある部分を表示したものである。直線の流れを見ることにより、これらの遺伝子群はGlnA, CodYとTnrAの制御下にあり、かつ単一のオペロンを形成していることがみてとれる。

った代謝制御ネットワーク情報を活用して、枯草菌の物質産生系への有効活用を図る。主たる研究対象とする転写制御蛋白質は個々の物質合成系のフィードバック制御に関与するものとグローバルに代謝制御に関与するものである。後者の転写制御蛋白質としてまず挙げられるのは、本研究でレギュロン解析をした、炭素代謝を統括するCcpAであり、抗生物質生産や分泌酵素生産を低下させるカタボライト抑制に関与している。その他のグローバルな転写制御因子は、GTPと分岐鎖アミノ酸の濃度で制御されるCodY蛋白質と緊縮制御を担うRelA蛋白質であり、物質合成系の制御に深く関わっている。これらのグローバルな制御蛋白質を改変し物質産生能の向上を図るが、その改変に伴う細胞機能の障害をいかに解決するかが問題になり、そのためにも本計画研究で蓄積してきた転写制御ネットワークの知見が必要となる。また、これらの転写制御蛋白質が作動しうる状態なのか、あるいは物質産生のボトルネックとなっている代謝産物は何か等のメタボローム情報も、有用物質の効率よい産生のための代謝制御ネットワークの改変に必須となる。これらの改変により、菌体外酵素や抗生物質の産生等の枯草菌によるものづくりの効率化をはかる。

2. グラム陽性細菌を代表する、土壌細菌の枯草菌は、自然環境において様々なストレスに曝され、また抗生物質を生産する放線菌等と共存しつつ生存してきたためか、種々の抗生物質等に対する耐性機構を有する。また、感染症を引き起こす種々のグラム陽性菌の遺伝子機能を解明するための非病原性モデル微生物として格好の研究対象でもある。本計画研究により、DNA結合転写制御蛋白質遺伝子の破壊株を用いたDNAマイクロアレイ解析によりその制御蛋白質の標的遺伝子の特定が体系的に遂行された。

本計画研究により確立した、DNAマイクロアレイ解

析とDNA結合転写制御蛋白質のDNA結合の評価を連動させた手法により、機能未知制御蛋白質の標的遺伝子を迅速に同定するシステムを開発したが、このシステムを薬剤耐性遺伝子の探索に応用する。即ち、まず薬剤耐性調節に関わる制御蛋白質を推定し、その遺伝子の破壊株と野生株のトランスクリプトームをDNAマイクロアレイ解析で比較し、標的遺伝子候補を得る。次に、それらの転写制御を担うDNA領域を推定し、その領域への制御蛋白質の結合を評価することで標的遺伝子を同定する。そして、制御蛋白質の不活性化によって標的遺伝子が常に発現するようになった変異株に可能な限り多数の様々な薬剤を作用させ、標的遺伝子が推定どおり薬剤耐性に関与するかどうかを検証する。実際に薬剤耐性が増強されていれば、この戦略は上述の制御蛋白質の変異によって薬剤耐性菌株が生じる現象を人為的に作り出すことに他ならない。しかし、特筆すべきは、薬剤耐性菌株が取得されると同時に原因遺伝子も同定されるという画期的意義である。すなわち、未知制御蛋白質による転写制御の解明を足がかりに潜在薬剤耐性遺伝子を戦略的に発掘し、医療上の大きな問題である細菌の薬剤耐性の確立機構を包括的に理解できる。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1. 01110301414

Ishii, T., Yoshida, K., Terai, G., Fujita, Y., and Nakai, K. DBTBS: a database of *Bacillus subtilis* promoters and transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 29 (1), 278-280 (2001). [DBTBS: <http://elmo.ims.u-tokyo.ac.jp/dbtbs/>]

2. 01110301443

Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M.,

- Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T., and Fujita, Y. Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 29 (3), 683-692 (2001).
3. 0110301610
Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Fujita, Y., and Tanaka, T. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Research* 29 (18), 3804-3813 (2001)
 4. 0110301638
Miwa, Y., and Fujita, Y. Involvement of two distinct catabolite-responsive elements in catabolite repression of the *Bacillus subtilis* myo-inositol (*iol*) operon. *Journal of Bacteriology* 183 (24), 7365-7370 (2001)
 5. 0201311333
Kobayashi, K., Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Ogasawara, N., Tanaka, T., and Fujita, Y. Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *Journal of Bacteriology*. 183 (24), 7365-7370 (2001)
 6. 0201311618
Yoshida, K., Yamamoto, Y., Omae, K., Yamamoto, M., and Fujita, Y. Identification of two myo-inositol transporter genes of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 184 (4), 983-991 (2002)
 7. 0204181002
Ogura, M., Yamaguchi, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Fujita, Y., and Tanaka, T. Whole genome analysis of genes regulated by *Bacillus subtilis* competence transcription factor, ComK. *Journal of Bacteriology* 184 (9), 2344-2351 (2002).
 8. 0303201228
Ogura, M., and Tanaka, T. Recent progress in *Bacillus subtilis* two-component regulation. *Frontiers in Bioscience*, 7, d1815-1824 (2002).
 9. 0303201402
Ogura, M., Hashimoto, H., and Tanaka, T. Med, a cell-surface localized protein regulating a competence transcription factor, comK, in *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66 (4), 892-896 (2002).
 10. 030228124
Ohki, R., Takeno, K., Okada, Y., Okajima, H., Asai, K., Sadaie, Y., Murata, M., and Aiso, T. A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *Journal of Bacteriology*, 185 (1), 51-59 (2003).
 11. 0303201451
Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., and Sonenshein, A. L. Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *Journal of Bacteriology*, 185 (6), 1911-1922 (2003)
 12. 308071854
Asai, K., Yamaguchi, H., Kang, C., Yoshida, K., Fujita, Y., and Sadaie, Y. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* sigma factors of extracytoplasmic function family. *FEMS Microbiology Letters* 220 (1), 155-160 (2003).
 13. 0403261611
Fukushima, T., Ishikawa, S., Yamamoto, H., Ogasawara, N., and Sekiguchi, J. Transcriptional, functional and cytochemical analyses of the *veg* gene in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 133 (4), 475-483 (2003).
 14. 0309121859
Yoshida, K., Yamaguchi, H., Kinehara, M., Ohki, Y., Nakaura, Y., and Fujita, Y. Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box. *Molecular Microbiology* 49 (1), 157-165 (2003).
 15. 0309131349
Watanabe, S., Hamano, M., Kakeshita, H., Bunai, K., Tojo, S., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Wong, S., and Yamane, K. Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (MtlD) is required for mannitol and glucitol assimilation in *Bacillus subtilis*: possible cooperation of *mtl* and *gut* operons. *Journal of Bacteriology* 185 (16), 4816-4824 (2003).
 16. 0404011353
Ogura, M., Shimane, K., Asai, K., Ogasawara, N., and Tanaka, T. Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49 (6), 1685-1697 (2003).
 17. 0309131318
Doan, T., Servant, P., Tojo, S., Yamaguchi, H., Lerondel, G., Yoshida, K., Fujita, Y., and Aymerich, S. The *Bacillus subtilis* *ywkA* gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiology*, 149 (9), 2331-2343 (2003).
 18. 0403261630
Yamamoto, H., Kurosawa, S., and Sekiguchi, J. Localization of the vegetative cell wall hydrolases LytC, LytE, and LytF on the *Bacillus subtilis* cell surface and stability of these enzymes to cell wall-bound or extracellular proteases. *Journal of Bacteriology*, 185 (22), 6666-6677 (2003).
 19. 0403081842
Tojo, S., Matsunaga, M., Matsumoto, T., Kang, C., Yamaguchi, H., Asai, K., Sadaie, Y., Yoshida, K., and Fujita, Y. Organization and Expression of the *Bacillus subtilis* sigY Operon. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 134 (6), 935-946 (2003).
 20. 0404061624
Kobayashi, K., Ehrlich, S. D. et al. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (8), 4678-4683 (2003). 著者99名中、27番目.
 21. 0403261757
Serizawa, M., Yamamoto, H., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Sekiguchi, J. Systematic analysis of SigD-regulated genes in *Bacillus subtilis* by DNA microarray and Northern blotting analyses. *Gene*, 329, 125-136 (2004).
 22. 0412201810
Yoshida, K., Ohki, Y., Murata, M., Kinehara, M.,

- Matsuoka, H., Satomura, T., Ohki, R., Kumano, M., Yamane, K., and Fujita, Y. *Bacillus subtilis* LmrA is a repressor of the *lmrAB* and *yxaGH* operons: Identification of its binding site and functional analysis of *lmrB* and *yxaGH*. *Journal of Bacteriology*, 186 (17), 5640-5648 (2004).
23. 0412210927
Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Yoshida, K., Hirooka, K., and Fujita, Y. Negative transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon for biosynthesis of branched-chain amino acids through *Bacillus subtilis* global regulator TnrA. *Journal of Bacteriology*, 186 (23), 7971-7979 (2004).
24. 0601231405
Ogura, M., Matsuzawa, A., Yoshikawa, H., and Tanaka, T. *Bacillus subtilis* SalA (YbaL) negatively regulates expression of *scoC* encoding the repressor for the alkaline exoprotease gene, *aprE*. *Journal of Bacteriology*, 186 (10), 3056-3064 (2004).
25. 503091225
Imamura, D., Kobayashi, K., Sekiguchi, J., Ogasawara, N., Takeuchi, M., and T. Sato, T. *spoIVH* (*ykvV*), a requisite cortex formation gene, is expressed in both sporulating compartments of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 186 (16), 5450-5459 (2004).
26. 503041008
Yamaguchi, H., K. Furuhata, K., Fukushima, T., Yamamoto, H., and Sekiguchi, J. Characterization of a new *Bacillus subtilis* peptidoglycan hydrolase gene, *yvcE* (named *cw1O*), and the enzymatic properties of its encoded protein. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98 (3), 174-181 (2004).
27. 503041030
Fukushima, T., Tanabe, T., Yamamoto, H., Hosoya, S., Sato, T., Yoshikawa, H., and Sekiguchi, J. Characterization of a polysaccharide deacetylase gene homologue (*pdaB*) on sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 136 (3), 283-291 (2004).
28. 0601241831
Matsuoka, S., Arai, T., Murayama, R., Kawamura, F., Asai, K, and Sadaie Y. Identification of the *nonA* and *nonB* loci of *Bacillus subtilis* Marburg permitting the growth of SP10 phage. *Genes & Genetic Systems*. 79 (6), 311-317 (2004).
29. 0404021801
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*, 150 (3), 591-599 (2004).
30. 0601201534
Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., and Fujita, Y. Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of *CcpA*, *CodY* and *TnrA*. *Molecular Microbiology*, 56 (6), 1560-1573 (2005).
31. 0601201619
Satomura, T., Shimura, D., Asai, K., Sadaie, Y., Hirooka, K., and Fujita, Y. Enhancement of glutamine utilization in *Bacillus subtilis* through the GlnK-GlnL two-component regulatory system, *Journal of Bacteriology*, 187 (14), 4813-4821 (2005).
32. 503041048
Fukushima, T., Kitajima, T., and Sekiguchi, J. A polysaccharide deacetylase homologue, *PdaA*, in *Bacillus subtilis* is N-acetylmuramic acid deacetylase in vitro. *Journal of Bacteriology*, 187 (4), 1287-1292 (2005).
33. 0601241428
Serizawa, M., and Sekiguchi, J. The *Bacillus subtilis* *YdfHI* two-component system regulates the transcription of *ydfJ*, a member of the RND superfamily. *Microbiology*, 151 (6), 1769-1778 (2005).
34. 0601241446
Mishima, M., Shida, T., Yabuki, K., Kato, K., Sekiguchi, J., and Kojima, C. Solution structure of the peptidoglycan binding domain of *B. subtilis* cell wall lytic enzyme, *CwlC*: characterization of the sporulation-related repeats by NMR. *Biochemistry*, 44, 10153-10163 (2005).
35. 0601241506
Serizawa, M., Kodama, K., Yamamoto, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Sekiguchi, J. Functional analysis if the *YvrGHb* two-component system of *Bacillus subtilis*: identification of the regulated genes by DNA microarray and Northern blot analyses. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69 (11), 2155-2169 (2005).
36. 0601231437
Westers, H., Peter, G., Braun, P., Westers, L., Antelmann, H., Hecker, M., Jongbloed, J. D. H., Yoshikawa, H., Tanaka, T., van Dijk, J. M., and Quax, W. J. Genes for *SkfA* killing factor production protect a *Bacillus subtilis* lipase against degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (4), 1899-1908 (2005).
37. 0601231505
Kawachi, E., Abe, S., and Tanaka, T. Inhibition of *Bacillus subtilis* *scoC* expression by multicopy *senS*. *Journal of Bacteriology*, 187 (24), 8526-8530 (2005).
38. 0601241806
Matsumoto, T., Nakanishi, K., Asai, K., and Sadaie, Y. Transcriptional analysis of the *ylaABCD* operon of *Bacillus subtilis* encoding a sigma factor of extracytoplasmic function family. *Genes & Genetic Systems* 80 (6), 385-393 (2005).
39. 0601241836
Matsuoka, S., Asai K, and Sadaie, Y. Restriction and modification of SP10 phage by *BsuM* of *Bacillus subtilis* Marburg. *FEMS Microbiology Letters* 244 (2), 335-339 (2005).
40. 0601241825
Asai, K., Matsumoto, T., and Sadaie, Y. ECF (extracytoplasmic function) sigma factors of *Bacillus subtilis*. In "Survival and Death in Bacteria", ed. Mamoru Yamada (Research Signpost), pp. 143-153 (2005).