

枯草菌の増殖と細胞分化を規定する蛋白質ネットワークの解明

●小笠原 直毅¹⁾ ◆守家 成紀 (H12-14)¹⁾ ◆笠原 康裕 (H12-14)¹⁾ ◆朝井 計 (H12)¹⁾
 ◆小林 和夫 (H13-16)¹⁾ ◆石川 周 (H15, 16)¹⁾ ◆河村 富士夫²⁾ ◆吉川 博文³⁾ ◆佐藤 勉⁴⁾
 ◆竹内 道雄 (H12-14)⁴⁾ ◆渡部 一仁⁵⁾ ◆高松 宏治 (H12-14)⁵⁾ ◆金谷 重彦 (H15, 16)¹⁾

1) 奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 2) 立教大学理学部 3) 東京農業大学応用生物科学部
 4) 東京農工大学農学研究所 5) 摂南大学薬学部

〈研究の目的と進め方〉

枯草菌は遺伝学、分子生物学研究のためのモデル生物として長い研究の歴史を持っている。ゲノム研究においても、ゲノム配列決定、そして、ゲノム配列決定から見出された新規遺伝子のシステムチックな機能解明の試みが日欧の枯草菌研究グループの共同研究として進められ、ゲノム科学の発展に寄与してきた。本特定領域研究においても、そうした研究の歴史を引き継ぎ、新たな視点からの枯草菌のゲノム研究が進められた。

本計画研究は、研究期間の前半3年間は「**枯草菌蛋白質の相互作用ネットワークの解明**」(研究代表者：小笠原直毅、研究分担者：守家成紀、笠原康裕、朝井計、小林和夫、吉川博文、河村富士夫)と「**枯草菌細胞分化の遺伝子ネットワークの全体像**」(研究代表者：佐藤勉、研究分担者：竹内道夫、渡部一仁、高松宏治)として進められた。

本特定領域発足時に、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析に加えて、質量分析法を用いたプロテオミクス解析、酵母two-hybrid systemや細胞内複合体の精製による蛋白質間相互作用のシステムチックな解析が注目されつつあった。そうした点を背景に、「枯草菌蛋白質の相互作用ネットワークの解明」においては、全遺伝子の変異株作製、その表現型の検出による遺伝子レベルでのゲノム機能解析に続く課題として、枯草菌蛋白質間の相互作用のシステムチックな解析により遺伝子機能ネットワークを解明することを課題とした。そこで、細胞増殖期に常に発現しているために転写制御ネットワークの解析手法では解析が難しいと思われる増殖制御因子(細胞分裂・複製関連蛋白質、分子シャペロン、また、多くのゲノムに保存されている機能未知蛋白質等)を出発点として蛋白質相互作用を複数の方法で解析し、枯草菌蛋白質間の相互作用情報の収集、蓄積を進めると共に、各解析法を改良、組み合わせ、より効率良い網羅的解析法を確立することを目指した。

また、細胞分化のメカニズムを解明することは現代生物学の重要な課題の一つである。枯草菌は、栄養源の枯渇のシグナルを感知すると、細胞内に化学的・物理的処理に対する抵抗性や休眠性を持つ胞子を形成する。本研究計画以前に、胞子形成には100程度の胞子形成遺伝子が関与していることが、クローン化された胞子形成遺伝子とその産物の解析から明らかになっていたが、全体像は漠然としたものであった。しかし、国際ゲノムプロジェクトの成果により、ゲノム情報に基づいたDNAアレー解析やプロテオーム解析などがゲノム配列を利用して効率的に行えるようになった。さらに、機能未知遺伝子の破壊株作製により、機能未知である全遺伝子の変異株を網羅的に解析することにより、草菌細胞分化にかかわる遺伝子の全体像を把握することが可能となった。そのため、「枯草菌細胞分化の遺伝子ネットワークの全体像」では、栄養源の枯渇のシグナルを受け胞子形成を開始し、耐熱性をもつ胞子が完成するまでの過程について、1) 胞子形成に関与する全遺伝子を、遺伝子破壊株を用いたアプロ

ーチにより同定し、それらの遺伝子の機能解明を行う、2) DNAマイクロアレイにより、胞子形成期に発現する各遺伝子の転写制御機構を明らかにすることにより、シグマ因子と転写制御因子を介した遺伝子間のネットワークを解明する、3) 胞子形成に関与する全遺伝子とその産物を網羅的に解析するために、胞子蛋白質の同定とそれらをコードする遺伝子の発現制御及び機能を中心に検討し、これらの解析から枯草菌細胞分化の遺伝子ネットワークの全体像の解明に迫ることを目的とした。



図1. 枯草菌胞子形成細胞の電子顕微鏡写真

大きい方の細胞は母細胞、小さい方は将来胞子となるフォアスポアと呼ばれる。それぞれ同一の染色体DNAを有する

前半3年間の研究で、「枯草菌蛋白質の相互作用ネットワークの解明」においては、1) 新に約400遺伝子の変異株作製を行い、未解析遺伝子の変異株バンクを完成させ、その結果、LB, 37度の培養条件での必須遺伝子は272であることを明らかにした、2) 非特異的な相互作用によるバックグラウンドを抑えるための選択条件を明らかにし、酵母2ハイブリッド系の枯草菌ゲノムライブラリーを用いて、必須遺伝子を中心に蛋白質間相互作用の探索を進めた、3) LC/MS/MS質量分析計による微量蛋白質の同定の方法を検討し、数十fmol程度の試料を解析できるようになった、4) バックグラウンドの低減のために、変性条件下でカラムを通すという方法を開発し、まず、機能未知である必須GTP結合蛋白質ファミリーについて複合体解析を進めた。一方、ハイスループットに、信頼性のある相互作用データを得るには、方法論として限界があることも明らかになった。また、「枯草菌細胞文化の遺伝子ネットワークの全体像」においては、変異株バンクの検定により、耐熱胞子の形成に必須なほぼすべての遺伝子の同定を終了した。また、プロテオーム解析・DNAアレー解析から胞子形成期に発現する遺伝子は約500であることも明らかにした。こうした前半3年間の研究の進捗を踏まえ、第3年次に領域全体の組織と研究目標の見直しを行った結果、後半2年間では、2計画研究を統合し、「枯草菌の増殖と細胞分化を規定する蛋白質ネットワークの解明」を目指して、以下の目標を設定した。

枯草菌では、栄養豊富なLB培地における必須遺伝子は約270であることが明らかになった。その大部分は機能が同定または推定可能で、蛋白質合成やDNA複製など限られたプロセスに分類され、機能が推定できない蛋白質はわずか10数個であった。バクテリアの細胞増殖システムの根幹は、我々が予想していたよりも単純な構成で成り立っていることが示唆された。しかしながら、細胞が増殖していくには各プロセス間の協調システムが必要であり、それに関わる蛋白質間相互作用や因子の同定が細胞システムとして理解するために重要であるが、同定された必須蛋白質の中には、そのような協調システムに関わると予想される蛋白質は、6つのG蛋白質以外に見出されず、微生物では真核生物と異なり、機能蛋白質間の直接の相互作用が協調システムとして機能している可能性も考えられた。また、いくつかのG蛋白質はリボソームと相互作用していることが示唆されており、重要な協調システムの一つとしては、蛋白質合成と各プロセスの機能発現のバランス調節機構が考えられる。10数個の機能未知必須遺伝子やリボソーム蛋白質などの増殖必須因子を出発点とし、複数の方法で細胞増殖に関わる蛋白質間相互作用を明らかにすることで、細胞増殖の根幹をなす、複製・転写・翻訳・細胞分裂・エネルギー代謝等のプロセスの協調システムの解明をめざす。

また、明らかとなっている約270必須遺伝子は、栄養豊富なLB培地におけるものであり、最小ゲノムとして考えると代謝系など多くの重要な細胞機能を担う遺伝子が欠落している。そこで、さらに最小培地における増殖や高温等のストレス耐性に必須である基本的な遺伝子の同定を行い、枯草菌の自然界での増殖のための最小遺伝子セットを明らかにし、それらと必須遺伝子ネットワークとの関係の解明を進める。

枯草菌の増殖に特徴的である胞子形成については、機能未知遺伝子の変異株の解析によりゲノム中の耐熱胞子の形成に必須なほぼすべての遺伝子の同定が終了している。またDNAアレー解析から胞子形成期に発現する遺伝子は、約500であることも明らかになり、胞子形成過程の全体像の理解に迫りつつある。そこで、胞子形成過程の完全な理解をめざし、未解明のまま残っている胞子形成開始のシグナル認識機構とコート蛋白質群の胞子へのアセンブリー機構の解明を行う。特に、胞子形成の開始については、これまで明らかになっていない細胞増殖に必須なプロセスと胞子形成開始を結び付ける機構を明らかにする。

〈研究開始時の研究計画〉

「枯草菌蛋白質の相互作用ネットワークの解明」

- (1) タグとその抗体を用いて細胞内複合体を分離し、質量分析法を用いてその構成成分を同定する。必要に応じ、*in vivo* crosslinking処理を行い、複合体を安定化する。
- (2) 酵母2ハイブリッド解析用枯草菌ゲノムライブラリーを用いて蛋白質相互作用を解析する。
- (3) 2種のGFP間の蛍光エネルギー移動を利用した蛋白質相互作用の*in vivo*検出法を検討する。
- (4) 機能解析プロジェクトで作製された変異株ライブラリーを利用し、致死性となる変異の組み合わせの探索、マルチコピーサプレッサーの単離と同定等、遺伝学的手法による機能的相互作用の解析を行う。

「枯草菌細胞分化の遺伝子ネットワークの全体像」

- (1) 機能未知遺伝子の破壊株（最終的には約2500株）全てについて、培養開始24時間後の1mlあたりの熱耐性細

胞調べることにより、胞子形成能を調べる。胞子数が野生株に比べ減少しているものについては、再度、破壊株を構築し、再現性を調べる。さらに、異常のある株については、蛍光顕微鏡により細胞膜の観察と電子顕微鏡による詳細な形態観察を行い、胞子形成の停止する時期を決定する。また、新規胞子形成遺伝子については、転写調節・産物の局在を明らかにし、細胞分化の遺伝子ネットワーク上への位置付けを行う。

- (2) 胞子形成期に発現する遺伝子について、DNAマイクロアレーを用いて発現調節機構を調べかつ胞子形成との関わりについて調べる。

- (3) 胞子形成期に発現する遺伝子の遺伝子破壊株について胞子を精製し、含まれる蛋白質をSDS-PAGEにより解析することで、胞子構成蛋白質に影響を与える可能性のある遺伝子を検索する。胞子形成期に発現する全ての遺伝子について同様の解析を行い、スポア構造形成や蛋白質の生産制御・修飾等に関わる因子を明らかにすることで、最終的には胞子構成蛋白質同士の相互作用マップを作成する。

「枯草菌の増殖と細胞分化を規定する蛋白質ネットワークの解明」

- (1) リボソーム蛋白質遺伝子を含む全必須遺伝子について、酵母2ハイブリッドシステムを用いて、総当たりの相互作用検定を行う。

- (2) 機能未知必須遺伝子について温度感受性変異株を多数単離し、その表現型を解析するとともに、そのサプレッサー変異の単離を行い、機能的に相互作用する因子の同定を行う。

- (3) これまでに精製したリボソーム画分を2次元電気泳動で分離し、リボソーム蛋白質をTOF-MASで同定することに成功している。そこでリボソーム画分を、より低塩濃度で抽出する方法を検討し、リボソームと会合している因子の同定とその生育条件に応じた変化の解析を行う。

- (4) これまでに作製した約3,000変異株について、最小培地における生育能を調べ、最小培地における必須遺伝子の同定を行う。また、

- (5) これまでに明らかになった細胞増殖に必要なプロセスが胞子形成開始のリン酸リレー系の活性化に影響するかどうか調べ、リン酸リレーの活性化と関係するプロセスの同定を行う。また、これまでに単離された未解析の胞子形成開始因子の機能解析も併せて行う。

- (6) コート蛋白質の欠損はほとんどの場合、表現型としては現れない。そこで、DNAアレー解析から明らかになった胞子形成時に発現する蛋白質約500についてGFP融合蛋白質を作製し、細胞内局在を調べることで、胞子に局在する蛋白質の同定を行う。

- (7) モデル微生物の比較ゲノム解析：本研究での成果を加えて、枯草菌、大腸菌、シアノバクテリアなどのモデル微生物を中心に全遺伝子の機能の比較解析を情報学的に行う。

〈研究期間の成果〉

5年間の研究により、枯草菌必須遺伝子セットの同定と機能未知であった必須遺伝子の機能解析による細菌の基本遺伝子セットの解明、胞子形成期に発現する遺伝子のシステムチェックな同定による枯草菌胞子形成システムの解明に成果を挙げることができ、蛋白質相互作用情報に基づく、一定数の遺伝子機能解明も行った。また、胞子の中での蛋白質の配置という、今後の重要な研究テーマも明らかとなった。しかしながら、蛋白質相互作用のシ

ステマチックな解析システムの構築には、現在の方法論の限界が明らかとなり、必須細胞プロセスの協調システムの解明は今後の課題となった。

1) 枯草菌の必須遺伝子セットの同定と機能解明

枯草菌の機能未知遺伝子の破壊株セットを作るプロジェクトは国際共同研究として始まったが、その進捗状況を見直し、本研究で新たに約300の変異株を作製することにより、枯草菌の全4,100遺伝子中、約3,000遺伝子の変異株作製が終了し、全機能未知遺伝子を含む変異株バンクが作製された。その過程で同定された必須遺伝子（132遺伝子）の情報と既知遺伝子の情報を総合することにより、枯草菌の富栄養培地・37度での増殖には、271遺伝子が必須であることを明らかにした（表1、論文19）。この成果は一つの生物の必須遺伝子セットが実験的に明らかになったという、非常に大きな意義を持っており、大きな注

目を集めた。その内、ゲノムの維持に関わるもの25、転写・翻訳・蛋白質の折りたたみ・分泌に関わるもの109、細胞膜・壁の合成と細胞分裂に関わるもの64であり、こうした細胞増殖の根幹にかかわる遺伝子が全体の73%であり、細胞増殖の基本システムが明らかとなった。

破壊株作成過程で、必須遺伝子の中から、イソプレノイド合成の非メバロン酸経路の全貌が明らかとなり、また、新たな鉄硫黄クラスター合成遺伝子系が同定されたが、21遺伝子については機能推定ができない、あるいは、なぜ必須であるか説明できないものであった。本研究では、そうした遺伝子の機能解明にも取り組み、公募班員・関根と共同して、その一つがtRNA中の塩基修飾にかかわることを明らかにした（論文23）。さらに、機能未知の必須膜蛋白質YneSが、その機能が明確に定義されていなかったPlsXと共に、リン脂質合成の第一ステップに関与することを発見した。このステップは、大腸菌ではPlsBという蛋白質が担っているが、その遺伝子はプロテオバクテリアの一部等にはしか見出されず、PlsX/YneSのシステムが、より普遍的なものである（論文作成中）。また、大腸菌で最初に発見されたGTP結合蛋白質（Era）のファミリーをコードする遺伝子が、枯草菌には8種存在するが、その内6遺伝子が必須であった（論文12）。これらのシステムチックな機能解析を進めた結果、その一つ、YlqF、について、それが50Sリボソーム粒子の形成の最終段階に関与することを明らかにすることができた（論文34）。

また、必須遺伝子の重複により、個々の遺伝子は破壊可能になっていることが、少数ながら見出された。そこで、その問題を検討するために、枯草菌遺伝子中に283組存在する doublet に注目し、そのうち各々は非必須である256組を対象に二重破壊を行った。その結果、fabHA-fabHB, polA-ypcP, thrS-thrZ, def-ykrB, spoIIIJ-yqjG（膜蛋白質トランスロケーター）、yocS-ybaS（Naトランスポーター）、yqhM-yhfJ（Lipoate-protein ligase）の2重破壊株は致死となることを明らかにした。特に、polA-ypcPについては、共通して持つ5'→3'エキソヌクレアーゼドメインが岡崎プライマーRNAの除去機能に必須であることを明らかにした（論文準備中）。

破壊株作製プロジェクトで作製された2951株について、最少培地での生育を調べ、最少培地における増殖必須遺伝子を同定することも進め2416株について、最少培地における増殖必須遺伝子を同定した。その結果、次の19株が増殖不可であることを見出した。

hemAT, hom, ycdD, yetA, yetG, yhcB, yirY, yjcF, yjcM, yjcS, yjqA, ykkA, yodL, yoeA, yycJ

興味深いことに、それらの遺伝子の配列からはアミノ酸等の小分子の合成に関与するとは考えにくく、今後の機能解明が興味深い。また、thyA-thyB, gltA-yerD, leuA-yngG, sdhA-nadB, pyrC-pucH, ykkE-purN, oxdC-yoaN, pyrB-argF, tenI-thiE, leuC-citBの2重破壊株も、最少培地で増殖できず、機能的な重複を見出した。

破壊株作成プロジェクトでは、対象から除外されていたリボソーム蛋白質遺伝子の機能解析も進め、リボソーム蛋白質をRFHR 二次元電気泳動法を用いて展開し、50種のリボソーム蛋白質と2種の機能未知蛋白質（YvyD, YugI）を同定した。さらに、L31蛋白質が2種（RpmE, YtiA）存在し、これら2種が亜鉛環境変動に呼応してリボソームで入れ替わる制御機構が存在することを見出した。詳細な解析を行った結果、この二種のL31蛋白質の入れ替わりは細胞内亜鉛濃度の変動に応じて起こることが明らかとなった。亜鉛が豊富に存在するときは、RpmEは

表 1. 枯草菌の必須遺伝子の機能分類

ゲノムの維持	27
DNA複製装置	16
DNA高次構造・分配	9
修飾酵素	2
遺伝子の発現	110
転写装置	5
転写制御	3
RNAの修飾	9
アミノアシルtRNA合成酵素	18
リボソーム蛋白質	52
翻訳因子	10
蛋白質の折りたたみ、修飾	5
蛋白質の分泌	6
細胞膜・壁の合成と細胞分裂	64
細胞膜の脂質の合成	16
細胞壁の合成	28
細胞の形と細胞分裂	10
エネルギーの生産	30
解糖系	8
メナキノン合成	16
チトクローム合成	3
チオレドキシン	3
小分子の合成・代謝	26
ヌクレオチド代謝	10
鉄硫黄クラスター形成	6
NADの再利用	4
Folateの再利用	4
CoAの再利用	1
S-アデノシルメチオニン合成	1
その他の機能	16
細胞内pHの維持	5
ピロリン酸の分解	1
シアロペプチダーゼ	1
デヒドロゲナーゼ	2
GTP結合蛋白質	7
機能不明	7

変性剤存在下で単離する方法を採用した。それにより、上述のYlqFをFtsZ複合体内に同定し、遺伝学的解析により細胞分裂に関与していることを確認した(論文投稿中)。しかし、系の確立に時間がかかり、大規模の解析には至らなかった。

さらに、非必須遺伝子について、他のバクテリアにおける保存性、遺伝子の発現情報等をもとに細胞増殖に関わる遺伝子の候補を選び出し、約1200種類のGFP融合遺伝子を作成して、その細胞内局在を観察する準備を整えた。また、蛋白質の生産時期と局在部位の比較を行うため、GFPとRFPを用いた2色蛍光観察実験系を構築した。クロラムフェニコールを耐性マーカーとするGFP融合蛋白質生産株に対し、カナマイシンを耐性マーカーとしてRFP融合蛋白質の遺伝子を導入し観察することが可能となった。これにより、枯草菌の細胞内における蛋白質相互作用の新たな解析手法を確立した。

3) 新規孢子形成遺伝子の遺伝学的解析

日本と欧州の研究グループにより作製された機能未知遺伝子破壊株2500株について、孢子形成能を調べた。さらに、破壊株を再構築し、再現性を調べ17個の新規孢子形成遺伝子を同定した。また、既知の孢子形成遺伝子と相同性を有する遺伝子についても、孢子形成との関連が期待されるため解析を行った。下記にこれらの遺伝子のうち論文として報告した7遺伝子(オペロン)についての研究成果の概要を示した。

ybdA (論文2)

ybdA変異株の孢子形成能は野生株の1/10に低下していた。ybdAはybcOPQST-ybdABDE転写単位内に存在するABCトランスポーターをコードする遺伝子である。枯草菌の孢子形成はリン酸リレー系と呼ばれるシグナル伝達機構の活性化によって開始する。孢子形成開始のシグナルを感知したヒスチジンキナーゼであるKinA、KinB、KinC、KinD、KinEは自己リン酸化し、リン酸基はSpo0F、Spo0Bを経て転写制御因子であるSpo0Aに伝達される。リン酸化によって活性化したSpo0Aは孢子形成の開始に必要なとされる遺伝子の転写を促進するが、ybdA欠損株ではこれら遺伝子の転写が著しく阻害され、ybdAはリン酸リレー系に関与することが予想された。この遺伝子の転写は、リン酸化Spo0Aによって制御されていた。しかし、ybdAの欠損株ではSpo0Aのリン酸化がおこらないことからYbdAを介した孢子形成開始の正のフィードバック機構の存在が示唆された。

yaaT (論文8)

yaaT変異株は、ほとんど著しく孢子形成能が低い(野生株の1/10000程度)変異株として分離された。yaaTの上流にはDNAポリメラーゼIIIの δ' サブユニットをコードする必須遺伝子holBが存在し、下流には染色体DNAの複製開始を阻害するyabAが存在する。yaaTは上流からの転写とyabAとの共転写によって発現し、yaaT欠損株は栄養増殖を阻害しないが孢子形成が著しく阻害された。一方、yabA欠損株は、孢子形成には関与しないが、栄養増殖期において細胞分裂が阻害されることが確認された。yaaT欠損株ではSpo0Aの活性化段階が阻害されていると考えられた。sof-1変異はspo0A変異の一つであり、ヒスチジンキナーゼの一つKinCから直接リン酸基を受け取ることによってリン酸リレー系をバイパスするが、yaaT欠損株へsof-1変異を導入したところ、yaaT欠損株における孢子形成能の欠損が完全に復帰したため、yaaTはリン酸リレー系に関与することが確認された。孢子形成の開始を担うリン酸リレー系は、様々な蛋白質とシグナルによ

って厳密に制御されている。このうちSpo0EはSpo0A-Pを脱リン酸化するホスファターゼである。yaaT spo0E二重欠損株において孢子形成欠損の表現型が完全に復帰した。従って、YaaTはSpo0Eの活性を直接的または間接的に制御することによってSpo0Aの活性化を調節し、孢子形成の開始を制御するのではないかと示唆された。以上の結果から、yaaTはリン酸リレーに深く関与する極めて重要な遺伝子であることが明らかになった。

ycbG (論文7)

ycbG変異株の孢子形成能は野生株の1/10に低下していた。ycbGはHTHモチーフを持つ転写制御因子と相同性がある。また、ycbGの上流、下流には、ycbABCDEF、ycbHJ遺伝子がそれぞれ存在する。これらの遺伝子は相同性からgalactarateとglucarateの資化に関する遺伝子であると推定され、ycbG下流のycbCDEFGHJの発現は、これらの添加によって誘導された。また、このオペロンの破壊株はこれをsole carbon sourceとする最少培地において生育できず、これらの遺伝子がgalactarateやglucarateの資化に関与することが確認された。大腸菌においては、これらの遺伝子のホモログがglycerateによっても誘導されることが知られているが、枯草菌においては誘導されず、また、枯草菌野生株はglycerateをsole carbon sourceとする最少培地においてほぼ生育できなかったことから、大腸菌とは異なる代謝経路を持つことが予想された。ycbG変異株は、孢子形成開始期で停止し、孢子形成開始期に機能する転写制御因子であるSpo0Aの活性が低下することから、ycbGは当初孢子形成の初期に関与すると考えられた。しかしながら、ycbG変異はycbCDEFGの過剰発現を引き起こし、また、ycbG変異株においてycbCDEF遺伝子の転写を阻害したところ、孢子形成能は野生株レベルに回復したことから、ycbG変異により孢子形成が阻害した理由は、ycbG変異によるycbCDEF遺伝子の過剰発現によると示唆された。

spoIIIJ/yqjG (論文5)

枯草菌のspoIIIJは、孢子形成遺伝子として同定されたが、その産物はアミノ酸配列から膜蛋白質の細胞膜への構築に必要なトランスローケース(YidCまたはOxa1ファミリー)であることが推定された。また、枯草菌にはそのパラログyqjGが存在する。これらの遺伝子の機能を調べるために、それぞれの破壊株を作製したが、spoIIIJ変異株の孢子形成能が著しく低下する表現型以外は、両者の間の違い及び野生株との違いは見出せなかった。しかし、それらの二重変異株を作製したところ致死性を示し、両遺伝子の生育への関与を示す重要な表現型が示された。さらに、いずれの遺伝子産物も細胞質膜及びフォアスポア膜に局在することを明らかにした。この結果は、spoIIIJとyqjGの遺伝子産物は、トランスローケースとしての重要な機能を有し、栄養増殖期では、spoIIIJとyqjGがオーバーラップした機能を持ち、ほぼ同じ膜蛋白質の細胞膜への構築を行うことが示唆された。しかし、孢子形成においては、SpoIIIJのみが孢子形成特異的な膜蛋白質の膜への構築に必要であり、両者は機能的にはオーバーラップしているが、孢子形成期に関してはSpoIIIJに依存する膜蛋白質が存在することが示された。

dgkA (論文17)

diacylglycerol kinaseをコードするdgkA破壊株は、孢子形成能が著しく阻害されていた。位相差顕微鏡による観察結果より、dgkA変異株の孢子は、孢子形成開始6時間後では正常に見えるが、9時間後では異常なdark sporeとして観察された。このためこの変異株においては孢子の構造に欠陥が生じることが明らかになった。さらに、胞

子の主成分のひとつであるジピコリン酸の流出が観察されたこと及びこの変異株の電子顕微鏡観察結果から、胞子のコレテックスに異常が生じていることが示唆された。しかし *dgkA* は栄養増殖期に発現するため、栄養増殖期に生産される胞子形成に必須なステップまたは酵素の活性化に関与していると考えられた。

ykV (spoIVH) (論文29)

ykV変異株もほとんど著しく胞子形成能が低い変異株として分離された (ykVについては、この論文でspoIVHと改名した)。SpoIVHは、チオレドキシシンモチーフを有する蛋白質であり、蛋白質のS-S結合の架け替えに関わっていると推定された。spoIVH遺伝子破壊株の電子顕微鏡観察を行った結果、この株は、異常なコレテックスを形成することが示された。さらに、この遺伝子の転写調節機構を調べるためにノーザン解析およびプライマー伸長法による転写開始点を決定した結果、spoIVHの直上流にはシグマEとGによって認識される2つのプロモーターが存在することが見出された。シグマEとシグマFはそれぞれ、母細胞とフォアスポアで機能することから、spoIVHは母細胞とフォアスポアの両方で発現していることが示された。次に、spoIVH変異株に、spoIVHを母細胞およびフォアスポアのどちらか一方のみで発現するようにプロモーターを改変したspoIVHを導入したところ、それぞれのspoIVH発現系の導入はspoIVH変異を相補することができた。また、SpoIVHは、N末端にシグナル配列を有しているが、このシグナル配列はSpoIVHが機能するために必須であることが示された。さらに、フォアスポア二重膜の間に輸送されることが知られているSleBのシグナル配列をSpoIVHのシグナル配列部分へ変換した場合もSpoIVHは完全に機能することから、どちらの細胞で発現してもフォアスポア二重膜の一方をSpoIVHが通過し、コレテックスが形成される二重膜の間に輸送され機能することが示された。以上の結果より、SpoIVHは、コレテックス形成の場であるフォアスポア膜間隙に入り、S-S結合の架け替えを行い、蛋白質の品質管理を行っていることが示唆された。

ybaN (論文30)

この遺伝子破壊株は、異常な胞子を作る表現型を示した。この遺伝子は胞子形成シグマであるシグマE転写され、SpoIIDで負に制御されるプロモーターを有していた。また、この蛋白質は多糖脱アセチル化酵素と推定された。また、局在解析の結果から胞子の成熟に関係する遺伝子であることが示唆された。

以上のような胞子形成欠損株のスクリーニングに基づく解析に加え、これまでに明らかになった細胞増殖に必要なプロセスについて、胞子形成開始に必要なリン酸リレー系の活性化に影響するか否かについて調べ、リン酸リレー系に関するプロセスの同定も行い、ydhHの変異株では胞子形成開始のリン酸リレー系が阻害されること、さらに細胞死をひきおこすことを見出した。また、YdhHは、細胞内NADH/NAD⁺比を感知する*S. coelicolor*の転写調節因子Rexのホモログであるため、DNAアレー解析により、YdhHの標的遺伝子を見出した。その結果、YdhHにより多くのエネルギー代謝系の遺伝子が制御されていることが示唆された。YdhHは、NADH dehydrogenase をコードする *ndh* (*yj1D*) の転写を抑制するが、*ndh*破壊によりNADH比を高めることにより *ndh* 遺伝子の転写活性の増加が認められた。また、1) NADH/NAD⁺比をYdhHが感知し、酸化還元環境に応じた遺伝子発現調節をおこなうこと、2) YdhHにより発現調節される *ndh* 産物 (NADH dehydrogenase) が直接NADH/NAD⁺比の調節に関与

ることを示し、新規のRedox制御系を見出した。これらの結果から、胞子形成開始に必要なリン酸リレー系とRedox制御系との新たな関係が示唆された。

こうした結果は、網羅的手法を特徴とするゲノム解析の有効性を示している。すなわち、旧来の方法では見出すことができなかった胞子形成遺伝子を、時間を必要とするが全機能未知遺伝子の破壊株を用い、1つ1つ丁寧に調べる網羅的研究手法により、今まで同定されることのなかった多くの細胞分化に関与する遺伝子が同定された。機能未知遺伝子破壊株バンクから多くの新規胞子形成遺伝子が見出された意味は大きい。

4) 胞子蛋白質のシステムチックな解析からのアプローチ

まず、胞子に含まれる蛋白質のプロテオミックス解析を試みた (図3、論文9)。枯草菌野生株の胞子からSDSとメルカプトエタノール存在下で蛋白質サンプルを調製しSDS-PAGEにより分離した。クマシ染色したゲルを64分割し、プロテアーゼ処理の後、LC/MS/MSにより204種類の蛋白質を同定した。それらのうち半数は機能未知蛋白質であった。枯草菌ゲノムプロジェクトにより作製されたlacZ融合遺伝子をもつ遺伝子ライブラリーを用いて、上記機能未知蛋白質をコードする遺伝子の発現パターンを解析した。42種類の蛋白質が栄養増殖期から、28種類の蛋白質が胞子形成期から生産されていることを明らかにした。また、胞子特異的プロテアーゼYabGの欠損株から胞子を調製し、その蛋白質をLC-MS/MSにより解析することでさらに27種類の蛋白質を同定した。

次に、シグナル配列及び膜貫通配列の有無と遺伝子の発現プロファイルから、各蛋白質の局在部位を推定した (図4)。枯草菌胞子は中心部から外側に向けて、コア・胞子内膜・コレテックス・胞子外膜・スポアコートと呼ばれる構造を持つ。しかし、遺伝子発現プロファイルから、コレテックスの蛋白質と胞子内膜・外膜タンパク質を正確に区別することができないため、本研究ではこれらを全てコレテックスの蛋白質として扱った。結果として、

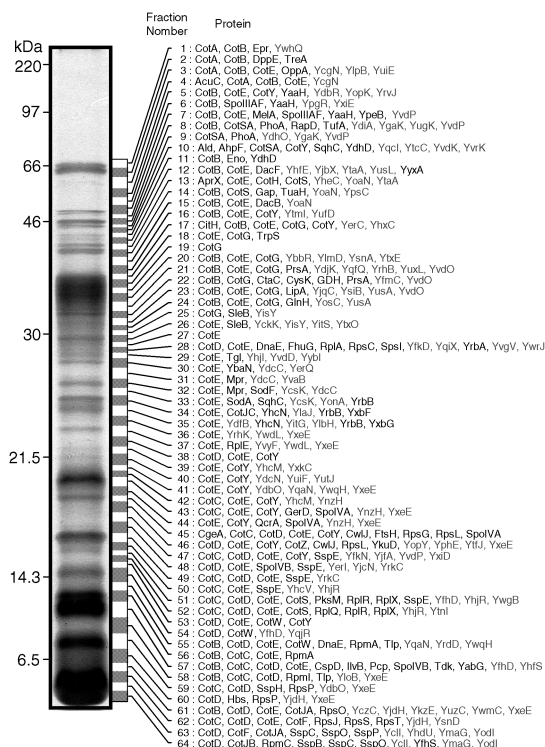


図3. 枯草菌胞子に含まれる蛋白質のLC-MS/MS解析

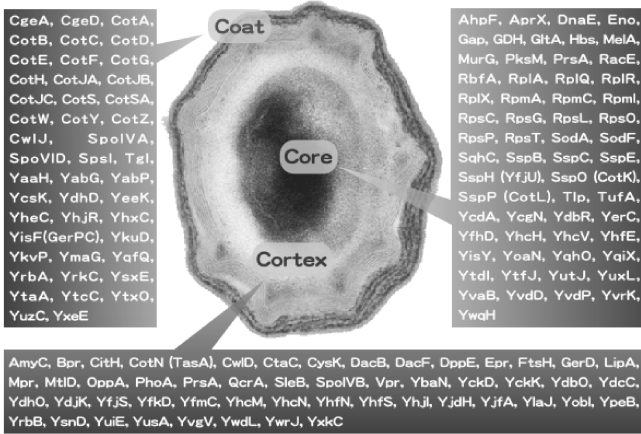


図 4. 孢子蛋白質の局在部位の解析

コアの蛋白質が予想以上に多く含まれていることが分かった。コアには孢子発芽後成長に必須の因子が含まれていると考えられるが、実際、リボゾーム蛋白質が多く同定されており、この結果はコア内部機能の解析に大いに役立つと期待される。その他、コア蛋白質として染色体DNAを保護するSASPsが検出された。既知コート蛋白質のほとんどを検出できたが、コルテックス蛋白質のうち、特に膜貫通型は検出されにくい傾向にあった。本研究で検出された機能未知蛋白質のうち、YcsK, YdcC, YloB, YtfJについて、遺伝子破壊株の孢子に発芽異常が認められた。本研究で同定された孢子蛋白質のアミノ酸残基について含有比率を求めたところ、特定アミノ酸残基を多く含む蛋白質グループの存在が明らかになった。これらは一次配列上の類似性をほとんど示さないことから、孢子の特性と関連して特定アミノ酸残基を多く含むように進化したと推定される。孢子の外層蛋白質の沈着に必須とされる4種類の蛋白質、SpoIVA, SpoVID, YrbA, CotEについて抗体を作製し、蛍光顕微鏡を用いた局在部位・局在化過程の解析を行った。野生株とそれぞれの変異株を用いることで、これらはSpoIVA, SpoVID, SafA (YrbA), CotEの順にフォアスポアへ局在化することが示唆された。

ここまで述べた孢子蛋白質のプロテオーム解析や、様々な研究室より報告されたDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、孢子形成関連遺伝子が700種類以上存在すると示唆された。これら遺伝子の多くが機能未知であった。統一手法を用いて作成された枯草菌遺伝子破壊株は、目的遺伝子の発現をLacZ活性により確認することが出来る。孢子形成期に発現することが示唆された遺伝子のうち、実験的に解析されていなかった663遺伝子について、独自に考案したハイスループットなレポーターアッセイ法を適用し、新たに175遺伝子がスポア形成期に特異的に発現することを明らかにし、その発現を制御するシグマ因子を同定した。この数はスポア形成期に特異的に発現することが、今までに報告されていた遺伝子数119を大きく上回るものである。その内、175種類の遺伝子破壊株について、SDS-PAGEによる孢子蛋白質解析を行った。その結果、孢子表層蛋白質の生産あるいは沈着に関与する因子としてyjcC, ykvV, ylbO遺伝子を同定した。これらのうち、既に解析が進められていたykvVを除き、yjcC (論文15) と ylbO (論文31) について詳細な解析を行った。

ノザンプロットにより、yjcCがSigK依存遺伝子であることを確認した。透過型電子顕微鏡観察により、yjcC変

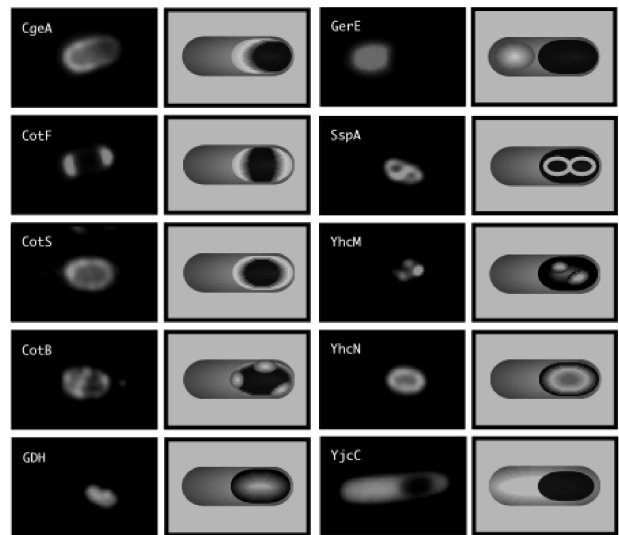


図 5. 孢子形成細胞における GFP 融合蛋白質の蛍光顕微鏡観察

異株の孢子にコート形成異常が認められたことから、これを孢子形成ステージVIの因子としてspoVIFと名付けた。SpoVIF蛋白質は既知のDNA結合蛋白質と類似性はないが、コート遺伝子の発現が抑制されていた。免疫プロテオミクスにより、spoVIF変異株では転写制御因子GerEが減少することが示唆された。SpoVIF-GFPを用いた解析から、SpoVIFが母細胞内に拡散していることが示唆された。これらの結果から、SpoVIFは孢子形成後期の母細胞に存在し、直接DNAに結合せず、転写因子GerEの活性を制御することによって、間接的にコート遺伝子の発現量を調節する新規因子であると考えられる。

ノザンプロテオミクスにより、ylbOがSigE依存遺伝子であることを確認した。透過型電子顕微鏡観察により、ylbO変異孢子にコート形成異常が認められた。YlbOのパラログであるRsfAは、プレスポア内でSigFに依存して発現し、転写制御因子として機能する。ylbO変異株におけるコート遺伝子の発現を検討したところ、cgeA, cotG, cotYの発現が抑制されることが示された。これらの結果から、YlbOも転写制御因子であると考えられる。他の研究者が、ほぼ同時期にylbOを発芽に関与する因子として報告し、gerRと名付けた。その論文によると、YlbOは多くのSigE依存遺伝子に対して抑制的に働くこと示唆されている。YlbOは同時期に機能する転写制御因子SpoIIIDとならんで、重要な因子であると考えられる。

また、本研究で同定された蛋白質を中心に、100種類の孢子タンパク質について、GFP融合蛋白質生産株の作製が終了した。蛍光顕微鏡により観察されたGFP融合蛋白質の局在部位は、遺伝子発現制御因子とタンパク質のアミノ酸配列をもとに推定されていた局在部位とほぼ一致することが示された。孢子形成期の枯草菌は、将来孢子になるフォアスポアと、それを包み込む母細胞に分化する。透過型電子顕微鏡観察にもとづいて、母細胞は細胞膜と細胞質から、フォアスポアは中心部からコア・孢子内膜・コルテックス・孢子外膜・コートから構成されると考えられている。GFPを用いた解析により、それぞれの細胞構造に局在化する蛋白質を確認することができた(図5)。また、孢子形成細胞において、GFP融合蛋白質が時間的・空間的に生産制御されることも確認できた。注目すべき結果として、成熟孢子における蛋白質の局在パ

ターンが予想以上に多いことがあげられる。たとえばコート蛋白質は、単に胞子外層に均一分布するものだけではなく、モザイク状（スポット状）や胞子端に偏在するなど、多様性が認められた。また、これまでほとんど明らかにされていなかったコア内部構造について、SASPsなど染色体結合蛋白質とそれ以外の細胞質蛋白質の分布が明らかに異なることを確認できた。栄養期から生産される蛋白質については、胞子形成期に消失するものと、成熟胞子に残存するものが認められた。この違いが、単に蛋白質の安定性に起因するものか、胞子形成期における機能を反映しているのか不明である。

〈国内外での成果の位置づけ〉

1) 枯草菌必須遺伝子の実験的解明

現在、細胞として増殖するための細菌の必須遺伝子セットの研究は、世界的にも注目されているが、その方法論はトランスポゾン変異ライブラリーの解析によるものであり、いくつかの問題点を含んでいる。それに対して、本研究の成果は、丁寧な遺伝学的解析に基づき、確かな結論を出したという点で、細菌細胞の増殖の根幹を担う遺伝子セットの普遍性と多様性の解明を大きく前進させるものである。大腸菌での必須遺伝子の解明が本特定領域研究で進められ、その結果とOstermanらのトランスポゾンによる網羅的破壊株作製の結果とから、大腸菌においても必須遺伝子の全体像がほぼ抽出できている。そして、枯草菌の必須遺伝子群について対応させたところ、必須遺伝子として両方で保存されているものは約65%にすぎないことがわかった（加藤班）。どちらか一方にしかない遺伝子、両方にあるが一方でのみ必須な遺伝子、一方では遺伝子が重複しているためにそれぞれは必須ではないものなど、その内容は様々である。機能別に分けた場合、特に細胞表層に関連するもの、細胞分裂に関与する遺伝子群などで違いが大きい。しかし、細胞表層、細胞分裂以外でも、種々の機能に関する必須遺伝子群に様々な違いが見られている。たとえばゲノム複製の開始調節に関して、大腸菌ではイニシエータータンパク質であるDnaAの不活性化に必須な遺伝子hdaが存在するが、枯草菌にはオルソログがない。リボソームタンパク質の遺伝子群など翻訳過程に必須な遺伝子群には共通なものが多いが、それでも大腸菌のリボソームタンパク質S1のオルソログが枯草菌にはないなど、いろいろと異なる点もある。今回、必須遺伝子群全体での比較ができてかなりの相違点が見つかったことは、同じ細菌でも、システムの基本的なメカニズムは共通であっても細かい点、特に調節機構などは多様であることを示しているものと考えられる。今後、細菌の必須遺伝子の普遍性と多様性の解明が興味深い。

また、いくつかの新規必須遺伝子の機能解明や、必須細胞機能にかかわる遺伝子の詳細な機能解明を進めることができた。その数はかならずしも多くはないが、質的には世界の第一線のレベルにある。

2) 新規胞子形成遺伝子の解析

この研究は、日欧共同プロジェクトである枯草菌の全塩基配列プロジェクトおよび全機能未知遺伝子破壊株作製プロジェクトの延長線上にある解析アプローチとして行なわれたものである。前述のように、胞子形成遺伝子を分離するためには、トランスポゾンなどによるゲノム内へのランダムな変異導入を行い、胞子形成欠損変異株をスクリーニングし、クローン化するという手法がとられてきた。しかし、全機能未知破壊株が作製され、本計

画研究によりそれらの胞子形成能が網羅的に調べられ、今までに分離されることのなかった多くの遺伝子が見出された。この手法による新たな胞子形成遺伝子の同定は世界的にも少なからずインパクトを与えた。このアプローチによる胞子形成遺伝子の分離は、世界的に認知され、本計画研究が中心として行い新規遺伝子の報告を行った。従って、この認識をもとに、旧来のトランスポゾンなどを用いた方法による新規胞子形成遺伝子の同定についての報告は、論文としてはほとんど見ることはなくなった。これは、時間はかかるが、確実に遺伝子セットを得る手法の有効性を示しており、今後、本プロジェクトの成果を基礎に遺伝子ネットワークの全解明が効率的に行われると確信された。

3) 胞子蛋白質の同定

本研究以前に行われた胞子蛋白質の同定は、非効率的なSDS-PAGEとエドマン分解の組み合わせや、抗体を用いた免疫ブロッティングにより行われていた。SDS-PAGEとLC-MS/MSを用いた本研究の解析法は画期的であり、論文発表を行った後、米国グループから関連する研究報告があったが、その内容的には本研究の成果に及ぶものではなかった。本研究が枯草菌胞子蛋白質の網羅的解析として大きなインパクトを与えたことは疑う余地がない。実際、本研究の成果と関連して、炭疽菌や*B. cereus*など病原性細菌の胞子蛋白質関連論文が欧米グループから発表されている。現在では分析技術の向上により、更に微量のサンプルでより多くの蛋白質を同定可能になっており、DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現プロファイル解析と併せて細菌研究の重要なツールとなっている。本研究では約200種類の胞子蛋白質が同定されたが、それらの大半は機能未知であった。今後の機能解析により、胞子の持つ耐久性・休眠性の分子メカニズムが明らかにされると期待される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1) 蛋白質間相互作用のシステムチックな解析

本研究で達成できなかった最大の問題は蛋白質間相互作用のシステムチックな解析である。酵母Two-hybrid法を用いた解析では、特定の蛋白質間の相互作用の評価については信頼性の高い結果を得ることができる。しかし、ゲノムDNAライブラリーを用いた相互作用する相手の探索においては、非特異的な相互作用の結果と思われる、蛋白質断片が数多く検出され信頼できる結果を得ることが困難であった。また、細胞内複合体の精製に関しても、そのバックを取り除くために様々な工夫を行ったが、ハイスループットな解析を可能にする方法論を確立することはできていない。対象とする蛋白質の性質に合わせた調整が必要であった。現在、いくつかの生物について大規模な蛋白質間相互作用の解析結果が報告されているが、既に指摘されていることではあるが、その結果の中にも多くのノイズが含まれていると考えられ、その結果の評価に注意が必要である。

2) 新規胞子形成遺伝子の解析

この解析手法は、全機能未知遺伝子破壊株を用いることで可能となるが、この計画研究当初は、この機能未知遺伝子破壊株バンクが作製途中の段階であった。そのため、当初は、全ての解析結果をまとめて公表し、その後個別遺伝子を解析する計画であったが、不完全なセットとしてでは論文発表できず、結果的に見出された個々の遺伝子について相当程度の解析を加え論文発表を行うに

至った。また、この期間、他国の研究者との競争もあり、17見出された遺伝子のうち本研究により論文発表されたのは7遺伝子（オペロンも含む）であった。しかし、信頼性と機能を導き出したという点では評価できるものと考えられる。また、今回用いた遺伝子破壊株は当初機能が未知であったもので、ゲノム中の全遺伝子の約半数で残りの半数は機能既知とされており、同一プロトコルでの破壊株の作製がなされていなかった。しかしながら、機能既知とされている遺伝子について、孢子形成への関与という点については、調べられていないものも多く存在する。このため細胞分化の遺伝子ネットワークの全体像を明らかにする上では、これらもリストに加えることも必要であり、本計画研究中に既知遺伝子変異株のセットを得る試みを行ったが、膨大な作業量を必要とするため実現には至らなかった。

3) 孢子蛋白質の同定

研究開始当初、二次元電気泳動により孢子蛋白質の分析を試みたが、可溶化が予想以上に困難で再現性に問題があったため、一次元のSDS-PAGEによる解析のみに変更した。これは孢子蛋白質同士がアミノ酸残基の共有結合などにより、強く結びついているためと考えられる。現在でも孢子蛋白質の二次元電気泳動は困難であるが、蛋白質修飾について解析するためには有力な手段団であり、界面活性剤の改良など今後の技術発展を期待したい。また、LC-MS/MS解析では同時に200種類を超える孢子蛋白質が同定されたが、他の実験法により孢子における存在を確認することが困難な場合があった。発現量が多い蛋白質については、GFPを用いた局在解析が可能であったが、微量な蛋白質については確認できなかった。新規に同定された孢子特異的蛋白質について、遺伝子破壊株を用いた解析を行ったが、ほとんどがはっきりとした表現型を示さず、分子機能を明らかにすることができたのはわずかであった。

〈今後の課題〉

1) 枯草菌基本遺伝子セットの機能のモデル化

本研究計画の最終的な目標は、枯草菌の細胞において、種々の必須細胞機能が協調的に働くように制御している結節点を見出し、さらに、そうした知識に基づき細胞を遺伝子・蛋白質のネットワークとしてモデル化することであった。残念ながら、その解明は今後の課題となった。有限とはいえ、約4000の枯草菌の遺伝子・蛋白質の個々の機能とその発現制御機構を、全て明らかにしていくことは困難である。また、必須機能を担う遺伝子の重複のために、必須遺伝子だけで枯草菌の増殖を担うことはできない。すなわち、必須遺伝子セットは細菌の増殖のための最小遺伝子セットではない。そのため、必須遺伝子を残しつつ、非必須遺伝子群をゲノムから欠失させ、ゲノムの縮小化をすることで、最小遺伝子セットを持つ細菌を作るという試みも始まっている。枯草菌についても、別プロジェクトの成果ではあるが、ゲノムの約1/4に当たる約1Mbを欠失しているが、富栄養培地及び最小培地での増殖に変化のない枯草菌を得ることができている。そして、Affymetrix社DNA chipを用いたゲノム縮小株の転写解析を行った結果、欠失している遺伝子は、LB培地では、野生株でもほとんど発現していないことが明らかになった。一方、最小培地では、LB培地に比べて多数の遺伝子の発現が誘導されるが、多くの遺伝子がLB培地と共通に発現している。それに加えて、小分子の合成遺伝子、トランスポーター遺伝子、鞭毛形成・運動性に関与

する遺伝子等の発現が誘導される。そして、それらの中にはゲノム縮小株で決めている領域に存在する遺伝子が、が多数含まれていた。しかし、それらの欠失が最小培地での増殖に影響を及ぼさなかったことは、その遺伝子機能が、鞭毛形成・運動性に関与する遺伝子等、細胞増殖に必須でないことを示している。また、トランスポーター遺伝子等については、遺伝子の重複により他の遺伝子により機能が相補されていることも考えられる。こうした結果を総合すると、LB培地と最小培地で共通に発現する遺伝子群が細胞の増殖に基本的なものであり、その上で、LBあるいは最小培地での増殖に特異的な代謝系の遺伝子が発現しているとモデル化できるように思われる。こうした、通常の枯草菌の増殖時に発現する遺伝子セットをまず明らかに、それらの機能、発現制御機構、そして、相互作用を明らかにすることで、細胞増殖のための基本システムのモデル化が可能となるのではないだろうか。その上で、各種ストレス対応等のシステム解析に進むことが可能となる。こうした、階層的なアプローチを今後行っていくための情報が蓄積できたと考えている。

2) 孢子形成のための遺伝子セットの全体像の解明

細胞分化のモデルとして、孢子形成のための遺伝子セットの全体像の解明に向けて、どのような遺伝子が発現するかということの解明については、その全貌の把握に向けて大きく前進することができた。

しかし、孢子形成過程は、極めて複雑かつ連続的であり、それらの遺伝子の発現調節機構の解明や遺伝子破壊による形態・細胞内の影響を調べるだけでは全体を把握できない。また、孢子は多くの蛋白質が複雑に関連した構造体である。このため、今後は、細胞分化の研究の最終目標である個々の蛋白質間のネットワークを明らかにするために、見出された遺伝子をもとに、1) できるだけ多くの孢子形成蛋白質についてGFP融合蛋白質を用いた解析を行う。2) 細胞を集団としてではなく、シングルセルでの遺伝子発現と蛋白質の動態を調べる。3) あるいは、孢子形成開始機構の解明など孢子形成のある段階に絞って解析を進めるなど新しい視点での研究計画が必要である。

内生孢子形成細菌には、炭疽菌や破傷風菌など公衆衛生上特に重要な細菌が含まれており、これらの完全ゲノム情報も既に報告されている。しかし、枯草菌以外の内生孢子形成細菌は、孢子形成機構がほとんど明らかにされていない。本研究の成果をもとに、内生孢子形成細菌の孢子形成遺伝子に関する新たな研究アプローチの展開が期待される。また、孢子形成遺伝子の中心システムを明らかにするためには、内生孢子形成細菌の比較ゲノム解析を行うことが重要と思われる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 110301443
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 Res.* 29, 683-692 (2001)
- 201311333
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. *J Bacteriol* 183, 7365-7370 (2001)
3. 202271807
Isezaki, M., Hosoya, S., Takeuchi, M., Sato, T. A putative ATP-binding cassette transporter YbdA involved in sporulation of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 239-245 (2001)
 4. 303301151
Ishigo-Oka, D., Ogasawara, N., and Moriya, S. DnaD protein of *Bacillus subtilis* interacts with DnaA, the initiator protein of replication. *J Bacteriol* 183, 2148-2150 (2001)
 5. 202271814
Murakami, T., Haga, K., Takeuchi, M., and Sato, T. Analysis of the *Bacillus subtilis* spoIIIJ gene and its paralogue gene, yqjG. *J. Bacteriol.* 184, 1998-2004 (2002)
 6. 204181002
Ogura, M., Yamaguchi, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Fujita, Y., and Tanaka, T. Whole-genome analysis of genes regulated by the *Bacillus subtilis* competence transcription factor ComK. *J Bacteriol* 184, 2344-2351 (2002)
 7. 302061554
Hosoya, S., Yamane, K., Takeuchi, M., and Sato, T. Identification and characterization of the *Bacillus subtilis* D-glucarate/galactarate utilization operon ybcDEFGHJ. *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 193-199 (2002)
 8. 302061559
Hosoya, S., Asai, K., Ogasawara, N., Takeuchi, M., and Sato, T. Mutation in yaaT leads to significant inhibition of phosphorelay during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 5545-5553 (2002)
 9. 303241511
Kuwana, R., Kasahara, Y., Fujibayashi, M., Takamatsu, H., Ogasawara, N., and Watabe, K. Proteomics characterization of novel spore proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 148, 3971-3982 (2002)
 10. 303301155
Soppa, J., Kobayashi, K., Noirot-Gros, M. F., Oesterhelt, D., Ehrlich, S. D., Dervyn, E., Ogasawara, N., and Moriya, S. (2002). Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB. *Mol Microbiol* 45, 59-71.
 11. 303301200
Reyes, D. Y., and Yoshikawa, H. DnaK chaperone machine and trigger factor are only partially required for normal growth of *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 1583-1586 (2002)
 12. 303301203
Morimoto, T., Loh, P. C., Hirai, T., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S., and Ogasawara, N. Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 148, 3539-3352 (2002)
 13. 303301207
Kawai, Y., Moriya, S., and Ogasawara, N. Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 47, 1113-1122 (2003)
 14. 303301214
Nanamiya, H., Shiomi, E., Ogura, M., Tanaka, T., Asai, K., and Kawamura, F. Involvement of ClpX protein in the post-transcriptional regulation of a competence specific transcription factor, ComK protein, of *Bacillus subtilis*. *J Biochem (Tokyo)* 133, 295-302 (2003)
 15. 403261433
Kuwana, R., Yamamura, S., Ikejiri, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Asai, K., Sadaie, Y., Takamatsu, H., and Watabe, K. *Bacillus subtilis* spoVIF (yjcC) gene, involved in coat assembly and spore resistance. *Microbiology* 149, 3011-3021 (2003).
 16. 403261611
Fukushima, T., Ishikawa, S., Yamamoto, H., Ogasawara, N., and Sekiguchi, J. Transcriptional, functional and cytochemical analyses of the veg gene in *Bacillus subtilis*. *J Biochem (Tokyo)* 133, 475-483 (2003)
 17. 0403301037
Amiteye, S., Kobayashi, K., Imamura, D., Hosoya, S., Ogasawara, N., and Sato, T. *Bacillus subtilis* diacylglycerol kinase (DgkA) enhances efficient sporulation. *J. Bacteriol.* 185, 5306-5309 (2003)
 18. 404011353
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*. *Mol Microbiol* 49, 1685-1697 (2003)
 19. 404061624
Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., et al. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4678-4683 (2003)
 20. 404061953
Tanaka, K., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. The *Bacillus subtilis* YufLM two-component system regulates the expression of the malate transporters MaeN (YufR) and YfIS, and is essential for utilization of malate in minimal medium. *Microbiology* 149, 2317-2329 (2003)
 21. 404061956
Ogura, Y., Ogasawara, N., Harry, E. J., and Moriya, S. Increasing the ratio of Soj to Spo0J promotes replication initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185, 6316-6324 (2003)
 22. 404062000
Ohki, R., Giyanto, Tateno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49, 1135-1144 (2003)
 23. 404071531
Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., and Suzuki, T. An RNA-modifying enzyme that governs both the codon and amino acid specificities of isoleucine tRNA. *Mol Cell* 12, 689-698 (2003)
 24. 401092349
Makita, Y., Nakao, M., Ogasawara, N., and Nakai, K. DBTBS: database of transcriptional regulation in

- Bacillus subtilis* and its contribution to comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 32, D75-77 (2004)
25. 403261447
 Kuwana, R., Ikejiri, H., Yamamura, S., Takamatsu, H., and Watabe, K. Functional relationship between SpoVIF and GerE in gene regulation during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 150, 163-170 (2004).
26. 403261757
 Serizawa, M., Yamamoto, H., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Sekiguchi, J. Systematic analysis of SigD-regulated genes in *Bacillus subtilis* by DNA microarray and Northern blotting analyses. *Gene* 329, 125-136 (2004)
27. 404021251
 Nanamiya, H., Akanuma, G., Natori, Y., Murayama, R., Kosono, S., Kudo, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Park, S. M., Ochi, K., and Kawamura, F. (2004). Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome. *Mol Microbiol* 52, 273-283.
28. 404021801
 Yoshimura, M., Asai, K., Sadaie, Y., and Yoshikawa, H. Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology* 150, 591-599 (2004)
29. 503091225
 I mamura, D., Kobayashi, K., Sekiguchi, J., Ogasawara, N., Takeuchi, M., and Sato, T. spoIVH (ykvV), a requisite cortex formation gene, is expressed in both sporulating compartments of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186, 5450-5459 (2004)
30. 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*. *J Biochem.* 136, 283-291. (2004).
31. 503081536
 Kuwana R., Okumura T., Takamatsu H., and Watabe K. The ylbO gene product of *Bacillus subtilis* is involved in the coat development and lysozyme resistance of spore. *FEMS Microbiol Lett.* 242, 51-57 (2005)
32. 未登録
 Bongiorno, C., Ishikawa, S., Stephenson, S., Ogasawara, N., and Perego, M. Synergistic regulation of competence development in *Bacillus subtilis* by two Rap-Phr systems. *J Bacteriol* 187, 4353-4361 (2005)
33. 未登録
 Noirot-Gros, M. F., Velten, M., Yoshimura, M., McGovern, S., Morimoto, T., Ehrlich, S. D., Ogasawara, N., Polard, P., and Noirot, P. Functional dissection of YabA, a negative regulator of DNA replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* in press (2006)
34. 未登録
 Matsuo, Y., Morimoto, T., Kuwano, M., Loh, P. C., Oshima, T., and Ogasawara, N. The GTP-binding protein, YlqF, participates in the late step of 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* in press (2006)
35. 未登録
 Fukushima, S., Yoshimura, M., Chibazakura, T., Sato, T., and Yoshikawa, H. The putative ABC transporter YheH/YheI is involved in the signaling pathway that activates KinA during sporulation initiation. *FEMS Microbiol Lett.* in press (2006)
36. 未登録
 Kawai, Y. and Ogasawara, N. *Bacillus subtilis* EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology.* in press (2006)