

枯草菌における標的遺伝子の高発現翻訳系の開発

河村 富士夫
(立教大学 理学部)

研究の目的

有用物質の高生産系を開発することは発酵産業において極めて重要な課題である。その解決策の一つには、タンパク質の合成装置であるリボソームを改変し、有用物質のみを長時間にわたり高生産可能な翻訳系の構築が挙げられる。この翻訳系を構築するには、細胞内におけるリボソーム量の制御機構や翻訳制御機構を把握した上で標的遺伝子の高発現系を構築する必要がある。しかしながら、このような知見は殆ど得られていない。この機構には、リボソームの主な構成成分であるrRNAが深く関与していると考えられることから、本研究では、枯草菌の各rRNAオペロンの転写活性、緊縮応答に重要な役割を果たす3種のppGpp合成酵素をコードする*relA*, *yjbM*, *ywaC*遺伝子の欠失変異が与えるrRNAオペロン転写活性への影響、ならびにリボソーム形成量への効果を定量的に測定した¹⁾。

方法

本研究では、*Bacillus subtilis* 168株を親株(野生株)として使用し、7つのrRNAオペロン(*rrnO*, *-A*, *-J*, *-I*, *-D*, *-B*, *-E*)のプロモーターの下流にプロモーターとターミネーターを欠く*cat*遺伝子を導入した変異株を構築した(図1)。これらの変異株への*relA*欠失はRIK900(*trpC2 relA::erm*)のDNAを用いてエリスロマイシン形質転換体を選択することにより行った。同様に、RIK908(*trpC2 ywaC::spc*)とRIK1000(*trpC2 ΔyjbM*)に*catpt1*を形質転換で導入し、さらに*relA::erm*を導入して二重変異株を構築した。*rrn*オペロンの下流に*catpt1*をもつ三重欠失変異株はRIK1002(*trpC2 ΔyjbM*

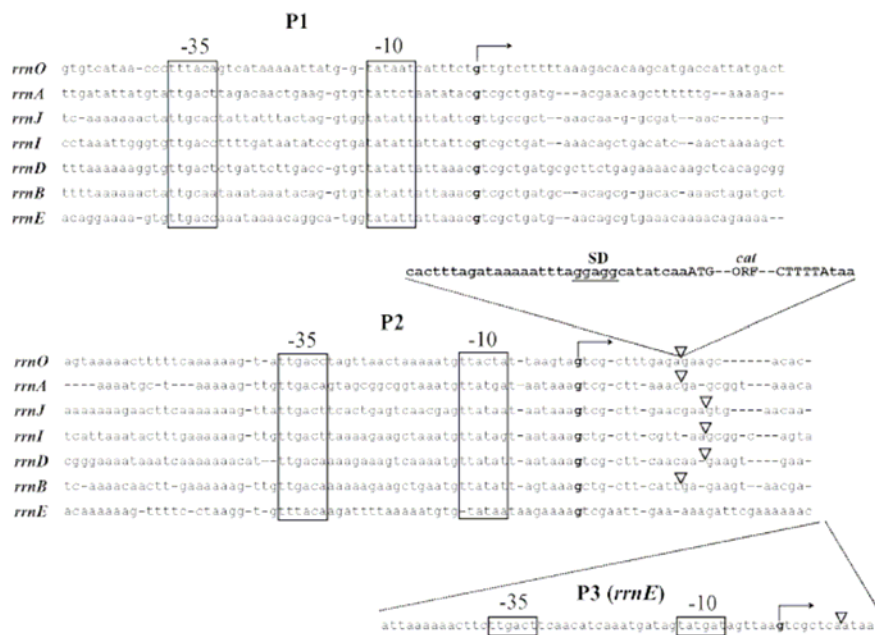


図1. *rrn* オペロンのプロモーター領域の塩基配列

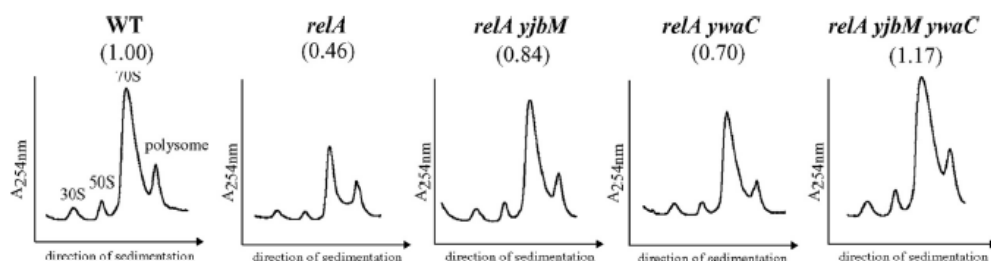
*ywaC::spc*から同様にして構築した。

リボソームの形成量はシヨ糖密度勾配超遠心法により解析した。37 LB液体培地で OD₆₀₀ = 0.2 まで振とう培養で増殖させた細胞を遠心で集め、フレンチプレス(Aminco)で細胞を破壊した後、低速遠心により細胞残渣を除きその上澄を粗抽出液とした²⁾。培養液のOD₆₀₀値が 3.09 に相当する粗抽出液を 10%-40%のシヨ糖密度勾配超遠心 (Hitachi P40ST ローター, 65,000 x g, 17.5 時間, 4)でリボソームを分離した。

結果

relA欠失変異をサプレッサーする2種類の変異の単離と同定。 *relA*の欠失変異株はLB培地で培養した時に親株に比べて増殖速度がかなり低下していたが、新たな(p)ppGpp合成酵素をコードする *yjbM* や *ywaC*の遺伝子の変異を導入するとその増殖速度が回復した¹⁾。 *relA*欠失変異株からしばしば増殖速度の回復した2種類のサプレッサー変異株が出現する。我々は35のサプレッサー変異株を単離し、遺伝解析ならびに塩基配列の決定を行った結果、16株が *yjbM* 遺伝子、残りの19株が *ywaC* 遺伝子の突然変異であることが判明した。点変異、付加や欠失変異など様々な突然変異が観察されたが、付加変異は *yjbM* にのみ、また欠失変異は *ywaC* にのみ見られた。これらのサプレッサー変異は *relA* 変異株の増殖速度を完全に回復させることはなかった。このことは、 *relA* 変異株の完全な増殖回復が *relA yjbM ywaC* の三重変異株でのみ認められた以前の報告と一致する³⁾。さらに、 *relA* 欠失変異株から得られたサプレッサーはすべて *yjbM* か *ywaC* のいずれかの突然変異であったことは、枯草菌には RelA, YjbM, YwaC 以外には (p)ppGpp 合成酵素が存在しないということを強く示唆する。Srivatsanらも *relA* のサプレッサー変異の同定に関する実験では同じような結果を報告している⁴⁾。

70S リボソーム形成への *relA* 変異とそのサプレッサー変異の効果。 *relA* 変異株における増殖阻害は *rrn* オペロンの転写が低下しているために起きている可能性を探るため、 *relA* 変異株と *yjbM* か *ywaC*、もしくは *yjbM* と *ywaC* の両方の変異を導入した *relA* 変異株における 70S リボソームの形成能を 10%-40%のシヨ糖密度勾配超遠心法で調べ親株と比較した(図2)。 *relA* 変異株の 70S リボソームの量は親株に比べて明らかに少なくなっていた。 *relA* 変異株で見られる 30S, 50S, 70S 粒子のプロファイルから判断すると、リボソームの形成過程ではなく rRNA オペロンの転写活性が低下することにより、リボソーム量の低下が引き起こされているものと考えられる。 *relA* 変異株の 70S リボソームの量は、 *yjbM* もしくは *ywaC* との二重変異株では部分的に回復しているが、 *yjbM* と *ywaC* の両方をもつ三重変異株ではほぼ完全に回復していた(図2)。このこ



とは、*relA* 変異株に *yjbM* と *ywaC* の変異が入ると rRNA オペロンの転写活性が回復し、その結果増殖速度も回復したことを示唆するものと思われる。

relA 変異株において転写活性を失った各 *rrn*P1 プロモーターからの転写がサブレッサー変異により回復する。各 *rrn* オペロンのプロモーターの下流に *catpt1* を導入した株を用いて、まず *relA* 変異における各 *rrn* オペロンの転写活性を調べた。すべての *rrn* オペロンのプロモーターは GTP で転写が開始されていた。また *relA* 変異株では調べたすべての *rrn* オペロンの P1 プロモーターからの転写が阻害され、さらに *rrn*-*A*, *-D*, *-E*, *-J* オペロンの P2 プロモーターからの転写もかなり阻害されていた (図3)。一方、その他の *rrn* オペロンの P2 プロモーターおよび *rrnE* の P3 からの転写活性はほとんど影響を受けていなかった。*yjbM* もしくは *ywaC* の変異が導入された *relA* 変異株では各 *rrn* オペロンの P1 プロモーターからの転写活性が部分的に回復しており、さらに *yjbM* と *ywaC* の両方をもつ三重変異株ではすべての *rrn* オペロンのプロモーターからの転写活性は親株と同じくらいに回復していた (図3)。

結論

relA 変異株における 7 つの *rrn* オペロン (*rrnO*, *-A*, *-J*, *-I*, *-E*, *D*, *-B*) の転写活性を、プロモーターとターミネーターを欠く *cat* 遺伝子を *rrn* プロモーターの下流に導入して調べた。その結果、各 *rrn* オペロンのすべてのプロモーターからの転写は GTP で開始されており、P1 プロモーターからの転写が劇的に低下していた。この転写阻害は *relA yjbM ywaC* の三重変異株でほぼ完全に回復していた。これらの結果と以前の報告を考慮に入れて考えると、*relA* 変異株では ppGpp の合成酵素である YjbM や YwaC が機能し GTP 濃度が低下し、*rrn* オペロンからの転写の低下を引き起こすものと考えられる。

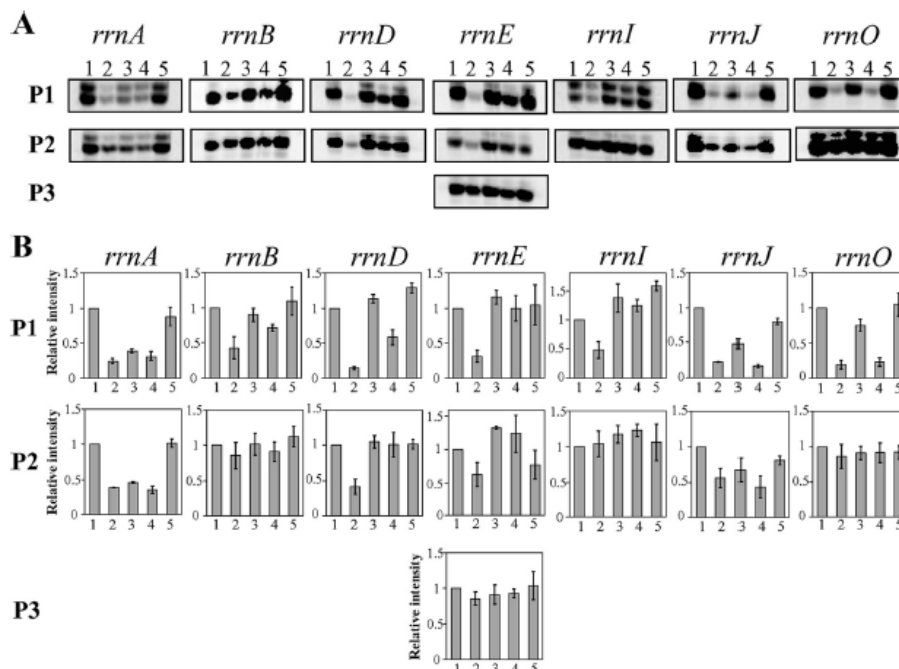


図3 . 各変異体における *rrn* オペロンの転写活性

文献

- 1) Natori, Y., Tagami, K., Murakami K., Yoshida S., Tanigawa, O., Moh, Y., Masuda, K., Wada, T., Suzuki, S., Nanamiya, H., Tozawa, Y., and Kawamura, F. Transcription activity of individual *rrn* operons in *Bacillus subtilis* mutants deficient in (p)ppGpp synthetase genes, *relA*, *yjbM*, and *ywaC*. **J. Bacteriol.**, 191: 4555-4561 (2009).
- 2) Natori, Y., Nanamiya, H., Akanuma, G., Kosono, S., Kudo, T., Ochi, K., and Kawamura, F. A fail-safe system for the ribosome under zinc-limiting conditions in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.** 63: 294-307 (2007).
- 3) Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C. S., Narisawa, T., Murakami, K., Natori, Y., Kawamura, F., and Tozawa, Y. Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.** 67: 291-304 (2008).
- 4) Srivatsan, A., Han, Y., Peng, J., Tehranchi, A. K., Gibbs, R., Wang, J. D., and Chen, R. High-precision, whole-genome sequencing of laboratory strains facilitates genetic studies. **PLoS Genet.** 4: e1000139 (2008).