

《日本農芸化学会功績賞》

枯草菌の遺伝・育種に関する先導的研究



立教大学理学部生命理学科 教授 河村 富士夫

枯草菌は、アミラーゼやタンパク質分解酵素などの有用タンパク質を効率よく細胞外に分泌することや、物理・化学的刺激に対して抵抗性の内生孢子を形成する現象が微生物細胞分化のモデルとして考えられることなど、産業分野、あるいは基礎生物学分野において重要なグラム陽性土壌細菌として古くから研究が行われてきた。1959年には、Spizizen博士により自然形質転換現象が枯草菌で発見され、分子遺伝学的解析に道が開かれたが、遺伝子工学の黎明期でもあった1970年代後半から1980年代前半において、産業への有効利用や、孢子形成を司る分子制御メカニズムの解明に向け、枯草菌における遺伝子工学技術を活用した分子遺伝学的解析技術の新規開発は必須命題であった。1973～1976年アメリカのScripps Clinic and Research Foundation (現 Scripps Research Institute) の伊藤純悦博士のもとで、枯草菌のファージと宿主である枯草菌との相互作用に関する分子遺伝学的な解析を行い、種々の先駆的な知見と技術を得る機会に恵まれた。このような研究背景から、帰国後東京大学応用微生物研究所 (現 分子細胞生物学研究所) の第二研究部 (遺伝・育種) において枯草菌のテンプレートファージを用いて「プロファージ形質転換法 (Prophage transformation)」を開発した。1990年代後半からは、枯草菌のリボソームを中心とした遺伝子発現制御ネットワークに関する分子遺伝学的解析を行い、リボソームタンパク質のプロテオーム解析を行うとともに、一部の構成タンパク質が亜鉛の欠乏により入れ替わりが行われる機構を実験的に明らかにした。

このように、枯草菌のファージ・孢子形成・リボソームに関する遺伝学的研究を継続する中で、1984年には菌体外プロテアーゼ欠損変異株の作製、2000年には日本の伝統発酵食品である納豆の生産に使用される納豆菌の自然形質転換可能な変異株を作製した。菌体外プロテアーゼ欠損変異株に対する海外からの菌株分与の要請は20年以上経た今日でも多く、有用酵素生産に向けた基礎研究等に活用されている。

1. 枯草菌における新規ファージベクター系の開発

枯草菌のテンプレートファージ $\rho 11$ の溶原菌を受容菌として、同じ制限酵素で切断したファージ $\rho 11$ DNA と目的とする DNA の両断片を T4 リガーゼで再結合したものを供与 DNA として形質転換することにより組換え体ファージを作製する「プロファージ形質転換法」を開発した。この方法は、細菌ゲノムに組み込まれたプロファージをベクターとして利用する方法であり、遺伝子のコピー数が 1~2 と少なく、多コピープラスミドベクターにおいてしばしば見られる遺伝子増幅効果による宿主細胞への影響を避けることができる独創的な方法として高く評価された。この新規に開発した「プロファージ形質転換法」を利用して、孢子形成開始遺伝子 *spoOB*, *spoOF*, *spoOH* に関するクローニング、およびその分子遺伝学的研究を1990年代前半まで行った。その中でも、*spoOF* 遺伝子のクローニングは

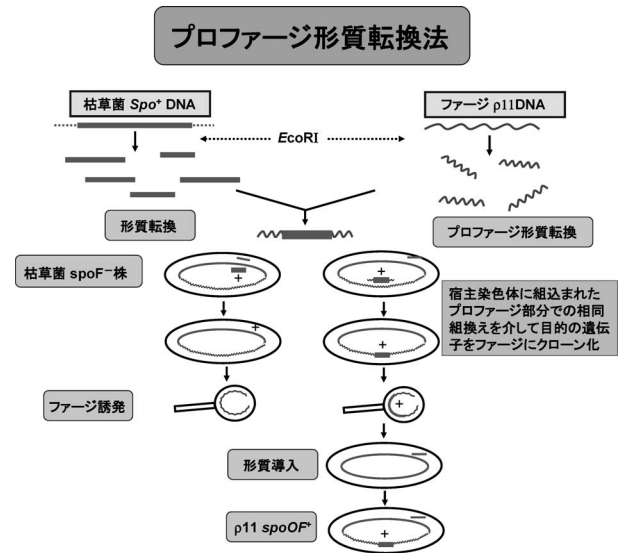


図 1

世界初であった一方、*spoOF* 欠失変異をサプレスする *sof-1* 変異の取得と解析は、アメリカ Scripps Research Institute の Hoch 博士のグループによる、孢子形成開始に機能する最も重要な情報伝達系であるホスホリレー系の発見にも少なからず貢献した。この独創的な「プロファージ形質転換法」は、国内ばかりでなく、欧米でも他の研究者に利用され、枯草菌の多数の遺伝子のクローニングに貢献した (図 1)。

2. 自然形質転換可能な納豆菌の創出

分類上納豆菌は現在枯草菌に含まれており、納豆菌の DNA を用いて 168 株のほぼすべての遺伝子マーカーを高頻度で形質転換できることから両者の DNA 配列における相同性は高いと考えられる。一方、同じ枯草菌でもマバーグ株 168 由来の菌株のみが高い自然形質転換 (コンピテンス) 活性を示し、納豆菌はほとんど形質転換活性を示さない。その原因を解析した結果、納豆菌では後期コンピテンス遺伝子群の正の転写因子である ComK が分解され続けているため形質転換能が低下していることを明らかにした。さらに、ComK の分解に関与する *mecA* 遺伝子の破壊もしくは ComK を誘導することにより納豆菌でも高い形質転換活性を示す変異株の構築を行った (図 2)。納豆菌の高形質転換株は、納豆菌の遺伝学的解析や遺伝子工学技術の導入により納豆菌の分子育種に大きく貢献できるものと考えられる。

3. リボソームタンパク質の亜鉛欠乏による置換機構

従来、タンパク質の合成装置であるリボソームは安定で、その構成タンパク質も安定に保持されているものと考えられてきた。リボソームタンパク質はほとんどの遺伝子は 1 コピーであるが、亜鉛結合型のリボソームタンパク質には非亜鉛結合型の重複遺伝子の存在が情報学的解析により報告されていた。これ

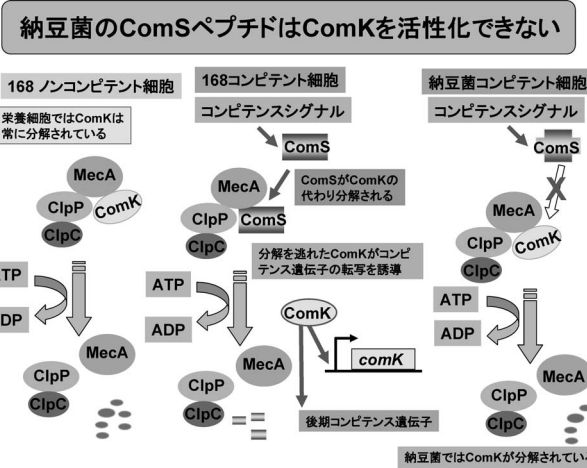
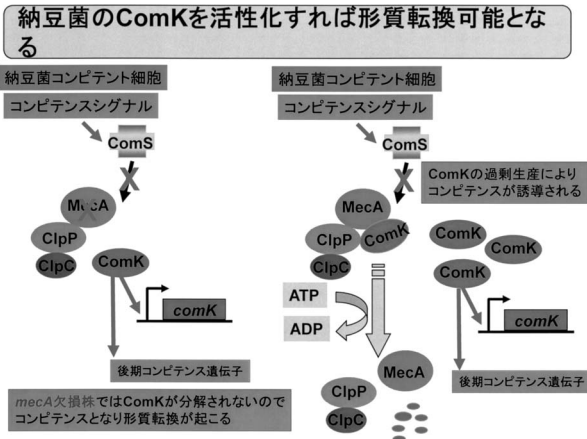


図 2

らのパラログ遺伝子の発現が亜鉛の充足・欠乏に依存して制御され、その結果リボソーム上で置換される分子メカニズムを明らかにした (図 3)。

亜鉛充足条件化では *rpmE* 遺伝子が発現し、亜鉛を 1 分子結合して安定化され 50S リボソームに結合し、亜鉛非結合型の遺伝子 *ytiA* は亜鉛を結合した Zur リプレッサーにより転写が抑制され発現しない。一方、亜鉛欠乏条件化では亜鉛を結合できなくなった Rpm は不安定となり分解されるが、*ytiA* 遺伝子は Zur リプレッサーによる抑制が解除され転写が誘導され YtiA

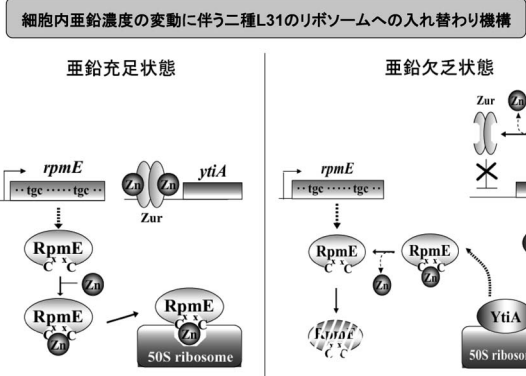


図 3

が合成され 50S リボソームに結合する。この結果は、リボソームに関するパラログ重複遺伝子の発現が亜鉛によってコントロールされるという初めての実験的な証明となった。

以上の研究成果は、多数の方々との共同研究で得られたものである。1970 年に応用微生物研究所第二研究部に大学院生として初めて枯草菌に接したときから、常に懇切丁寧にご指導いただいた東京大学名誉教授の齊藤日向先生に心から感謝いたします。また、同じく東京大学名誉教授の池田庸之助先生とアリゾナ大学の伊藤純悦教授には研究の厳しさと論文の書き方を丁寧にご指導いただき深く感謝いたします。研究面ばかりでなく人としての行き方を教えてくれたカリフォルニア大学デーヴィス校の Roy H. Doi 教授に感謝いたします。1996 年に立教大学理学部に赴任し、リボソームの研究を開始しましたが、「亜鉛欠乏によるリボソームタンパク質の置換」の研究は、七宮英晃博士 (現 愛媛大学無細胞工学センター助教)、赤沼元氣博士 (現 東京大学大学院農学生命科学研究科)、名取陽祐博士 (花王株式会社・安全性評価研究所) の大学院生の方々との共同研究により成し得たものであり、この場を借りて御礼申し上げます。その他多数の諸先輩、同僚、企業などの共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。最後に本賞にご推薦いただいた独立行政法人・食品総合研究所の越智幸三博士および選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。