

枯草菌の遺伝学プロフェージ形質転換法開発秘話

河村富士夫

この原稿を執筆しているとき(2012年4月15日)、東京大学名誉教授で筆者の恩師である齋藤日向先生が85歳で天に召された。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を語る際、齋藤先生の功績は計り知れない。限られた誌面でそれらを語り尽くすことは到底できないが、本稿では、齋藤先生とともに研究した時代を振り返りつつ、枯草菌でファージを用いた実験手法が確立されたところのトピックを中心に、そのユニークな遺伝学の手法を紹介したい。

枯草菌は、大腸菌や酵母と並んで組換え実験の安全性が認められている微生物である。われわれ日本人にとっては、納豆を作るための微生物として馴染み深い。また、アミラーゼを中心とする糖質関連酵素の多くは *Bacillus* 属細菌を生産菌としており、産業用微生物としても活躍している。他方、宿主という観点から見ると大腸菌にない分泌能も備えていることから、組換えタンパク質を培地中へ生産するための微生物としても注目された。

上記に関する研究成果は本学会でも多く報告されてきたが、他方で枯草菌は、遺伝学を行うためのモデル生物としても優れた特性も持ちあわせている。たとえば、外部のDNAを積極的に取り込む性質が利用され、枯草菌は、組換えDNA実験で盛んに使われてきた。特にバクテリオファージ(ファージ)を用いる手法は枯草菌で広く用いられ、胞子形成機構の解明で大いに活躍したことは広く知られている。今日では大腸菌でも多くの低コピープラスミドが開発され(本シリーズ2011年10号にて紹介)、利用されているが、プラスミドの多くは多コピーであり、遺伝子によってはクローニングできない場合があるためである。

枯草菌の遺伝学の歴史は、実は分子遺伝学の歴史でもある。そして黎明期の分子遺伝学の発展には、多くの日本人研究者の貢献があった。本シリーズ「生物工学基礎講座バイオよもやま話」は若手に向けた基礎知識と小ネタの提供を目的とされているが、ぜひ若い方々には、それら知識とあわせ、学問の歴史的背景も知っていただきたい。また年配の方々には、当時を懐かしんでいただければ幸いである。

黎明期の分子遺伝学

1969年度、筆者は京都大学農学部の4年生で常脇恒一郎教授が主宰される実験遺伝学講座に属していたが、農学部は大学紛争で封鎖されており、授業は行われていなかった。そのとき「細菌の形質転換」についての総説をいくつか読み、初めて齋藤先生のお名前を知るとともに、枯草菌という微生物も知った。また、京都大学ウイルス研究所の由良隆先生の「分子遺伝学」の講義を聞いたときに、微生物を使った実験ではここまで進んでいるのかと驚嘆し、微生物を材料とした研究がしたいと強く志すようになった。それらのことから1970年に東京大学理学系研究科生物化学専攻修士課程に進み、応用微生物研究所(現在の分子細胞生物学研究所)第二研究部で、齋藤先生のご指導のもと、枯草菌の研究を始めることとなった。大学紛争の煽りで先生方の応微研への出入りが困難になったこともあり、3年間休学し、米国カリフォルニア州のラホヤにあるスクリプス研究所(当時はScripps Clinic and Research Foundationと称していた)の伊藤純悦先生の研究室へ留学することとなった(1973年11月~1976年10月)。ここで、筆者は黎明期の分子遺伝学を肌で体験することとなる。

当時、一部の研究者を除いて、生命現象を理解するためにDNAを用いて研究を行う者にとっては一般的に、遺伝子をDNAとして自由に取り出し増やすこと(純化)など夢のような話だった。スタンフォード大学のバーク教授らがSV40 DNAに大腸菌の遺伝子を導入し、真核細胞で導入遺伝子が発現するという異種DNAのクローン化に初めて成功したのが1972年である。翌年、スタンフォード大学のコーエン教授とカリフォルニア大学サンフランシスコ校のボイヤール教授が、現在では広く使用されている制限酵素を使ってDNAを切断し、リガーゼによって再結合する方法を初めて試み、組換えDNAの実験に使用できるプラスミドベクターを開発した。また1974年に、大腸菌のλファージを用いたクローン化法が報告された。

1974年から1975年にかけて、スタンフォード大学のチャールズ・ヤノフスキー教授の長男であるスティープ・

ヤノフスキー氏が伊藤先生の研究室にテクニシャンとして在籍していた。彼とは年齢が近いせいもあり、1年のあいだ仲よく楽しく過ごせたのはよい思い出である。また当時は伊藤研究室で枯草菌のファージφ29を材料として研究を行っていたためφ29DNAの制限酵素地図の作成を考えていたが、DNAのアガロースゲル電気泳動もやったことがなかった筆者は、ステイブ君が前年まで在籍していたカリフォルニア大学サンディエゴ(UCSD)校のヘリンスキー教授の研究室へ習いに行くことができた。そこでアガロースのスラブゲル電気泳動のやり方や、泳動後のエチジウムブロマイドでの染色法、オレンジ色のフィルターを通してのポラロイド写真の撮影法などを学び、簡単にかつ短時間にDNAが分離・検出できることに大変感激したのを今でも覚えている。

そうすると、このφ29DNAが、当時ポイヤー研究室で精製された制限酵素EcoRIでも切断されるか否か、どうしても試してみたくなくなった。知人を通してEcoRIを入手できたが、そのEcoRIの入った極細試験管を入念に覗き込んでみても、ほとんど溶液が目視できない。それもそのはずで、「いくら入っているか？」と聞くと、知人はニコニコしながら「0.5 μl」と答えた。筆者と伊藤先生は互いに顔を見あわせて苦笑し、それほど貴重なものなのだ、あらためて認識させられた。というのも、当時はまだ制限酵素が市販されていない時代で、研究者が自分で調製した制限酵素を、他の研究者が調製した異なる制限酵素と交換しあうのが慣例だったのである。

このように入手できたEcoRIがきわめて微量であったため、その極細試験管に直接DNAを入れて切断するか、少し希釈していくつかのサンプルにテストするかで迷い、結局、後者を選んだ。結果として無事にφ29 DNAが切断されることがわかり、その後はEcoRIを自分たちで調製して、制限酵素地図を作製した。

1976年に入ると枯草菌でもベクター系の開発が行われ、*Staphylococcus aureus*のプラスミドが形質転換で枯草菌に導入でき、なおかつプラスミドベクターとして使えることが、スタンフォード大学のレーダーバーグ教授の研究室に滞在していたエリック博士により発見された。これらのプラスミドは薬剤耐性遺伝子を持ち、枯草菌でも発現し、選択マーカーとして使用できる。そこで枯草菌のファージベクター系の開発を目指すこととし、スクリプス研究所のホック博士が新たに単離した枯草菌のテンプレートファージp11を、ホック博士自身から譲り受けた。

このファージを選んだおもな理由は、*Bacillus amyloliquefaciens* Hの生産する制限酵素BamHIでその

DNAが切断されること、テンプレートファージとしては大型であることである。当時よく研究されていたテンプレートファージφ105をはじめφ1, φ2, φ15, φ29などのφシリーズはジョン・スピザイジン教授のもとでライリー博士が単離したファージであり、宿主は応微研の池田庸之助教授から譲渡された*B. amyloliquefaciens* Hであった。そのため、これらはすべてBamHIの認識配列を持たず、まったく切断されない。このことは、当時、筆者らにとって数少ない利用可能な制限酵素の一つであるBamHIで解析できないことを意味し、後々の解析に不便さを生じる可能性があったのである。

形質導入ファージの構築

外来DNAのクローニング法の開発を考えたとき、大学3年生で読んだ“*General Genetics, Srb and Owen*” (1967)¹⁾の、欠失変異を持つ染色体と正常な野生型の染色体の対合図が参考になった(当時、このような染色体対合の図は一般的に遺伝学の教科書に描かれていた)。

図1の左にある通常の野生型染色体と欠失型染色体の対合を逆に捉えることで、右図のように欠失染色体を野生型と考え、さらに野生型の染色体のループアウトした不対合の部分とその生物に無関係な外来DNAと仮定すれば、相同組換え活性の高い枯草菌の形質転換を利用することによって、細菌の染色体への外来遺伝子の挿入(付加)もさほど困難ではないと考えた。そして、枯草菌の染色体にクローン化したDNA断片をいかに取り出して増幅するかを考えたとき、テンプレートファージを用いること、つまり特殊形質導入ファージを構築すればいいのだと閃いた。

実験を始めるにあたり、枯草菌の染色体DNAに組込むテンプレートファージには、百数十kbのDNAを持つ大型のファージを用いることとした。先述した比較的小型(39 kb)のφ105を使うことも考えたが、この大型ファージでは、BamHI(先に述べたとおり筆者らにとって数少ない“持ち玉”の一つ)でp11 DNAが切断されて

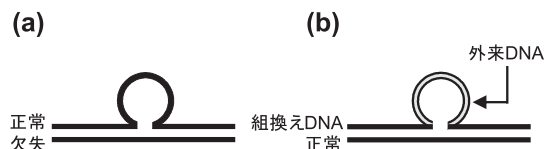


図1. 正常な野生型染色体と欠失染色体の減数分裂期における相同染色体の対合図。左図は通常の野生型染色体とその相同染色体の欠失型染色体が対合した図である。右図は欠失部分を外来DNA(染色体部分)と考えた時の対合図であり、対合した相同部分での組換えの結果外来遺伝子の組込み(クローニング)が起こるものと考えられる。

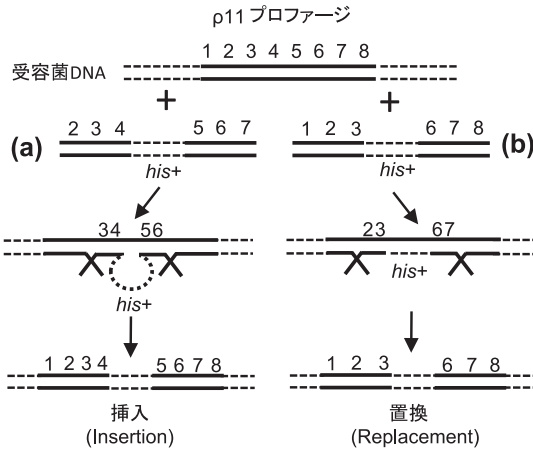


図2. ρ11 DNAのEcoRI断片に挟まれた枯草菌his遺伝子を含むDNA断片が、受容菌染色体DNAに組込まれたプロファージp11 DNAに、ρ11 DNAの相同部分の組換えによりクロニングされる際のモデル図。参考文献²⁾より一部改変。

その物理地図が作成されていたため、組換え体ファージDNAを解析するうえで有利だと考えたのである。また、外来DNA断片が挿入 (insertion or addition) (図2a) もしくは置換 (replacement or substitution) (図2b) される箇所は、そのプロファージDNAの増殖に必須な遺伝子が存在しない領域、つまり子ファージ粒子の形成に影響を与えない領域でなければならない(そうでないと、組換え体ファージが増殖できず組換え体DNAが回収できない)のだが、その可能性は大型ファージDNAを用いたほうが大きいと予想されたのも選択理由の一つである。もちろん、得られた組換え体DNA分子が大きければ大きいほど解析は難しくなるが、まずは組換え体ファージの構築が可能か否かを検証することが最重要課題であったため、便利で簡単なクロニング法の確立は後で考えることにした。

制限酵素は、選択の余地もなかったため、EcoRIに決めていた。再結合を行うT4リガーゼは、当時、応微研の第五研究部の助手をされていた山根國男先生と共同で、T4ファージ感染菌から調製した。筆者はスクリプス留学時代にUCSDのガイドシェック教授から貰い受けたT4ファージを使って大腸菌の感染菌からT4リガーゼを調製したことがあったため、その経験が大いに役立った。これで制限酵素とリガーゼ、そしてテンプレートファージは解決した。次は目的とする遺伝子である。それには、留学中にEcoRI処理により形質転換活性があまり低下しない栄養要求マーカーを調べていたので、躊躇なくLysとHisを選んだ。アミノ酸合成の変異の場合、野生型が変異型を相補して表現型として野生型が現

れ、容易に非栄養要求型として選択できるためである。

ここまでくれば何も問題ないように見えるが、この過程で何度も齋藤先生に相談し、議論を交わした。というのも、枯草菌の形質転換実験には難しいところがあり、ときには細胞が溶菌したりして形質転換頻度が大きく変動することがあったため、円滑に実験を遂行するには実験者の経験に依存せざるを得ない状況があったためである。そして当時、齋藤先生は日本で「枯草菌の形質転換の神様」と呼ばれるほど、枯草菌の形質転換について隔々まで熟知した研究者の一人であった。

テンプレートファージをプロファージとして染色体DNAに組込んだ溶原菌を受容菌として用いたときには、コンピテンス細胞ではプロファージが誘発されやすい生理条件下にあり、しばしば溶菌して形質転換の頻度を低下させることが知られていた(現在は、コンピテンス細胞でRecAの発現が誘導されるために相同組換え能の向上にあわせてプロファージ誘発が高まるのが分子レベルで証明されている)。こうした背景から、当時は、溶原菌を受容菌として用いるという発想はほとんどなかった。それらを考慮しつつ齋藤先生に相談したところ、「(そうしたデメリットが)分かっているのなら、(よけい)やってみないと分からないね」と言われ、無駄な実験だとは仰らなかった。いかに可能性が低くても、予測だけで結論は下せないということだろうか。実験がうまくいかないときに相談しても、否定的なことは決して仰らず、「ああしたらどうか?」「こうしたらどうか?」と、常に前向きな指針をお示しくださった。

実験のアイデアに関しても、「プロ野球のバッターだって、3割打者はたいしたもんなんだぜ。科学の分野でも、10個のアイデアを出して3個成功すればたいしたもんだろ? 出すアイデアすべて当たっていたら、今頃やるものがなくなっているかもな」と、べらんめえ調で励ましてくださった。このように、科学研究において、どこか人間臭さのある教えを授けてくださったことを、今でも大変感謝している。

先生のお言葉に勇気を得て、成功する可能性が低いことも承知の上で何回か実験を繰り返し、頻度に差はあるものの再現性よくHis⁺とLys⁺の形質転換体を得ることができ、さらに、これらの形質転換体から特殊形質導入ファージを得ることができた²⁾。ρ11 DNAはEcoRIで30以上のDNA断片を与えるため、残念ながら、これらの遺伝子を含むEcoRI断片の精製・純化はできなかったが、実験的に組換え体ファージが形成され、誘発により特殊形質導入ファージも形成されることは証明できた(図3)。

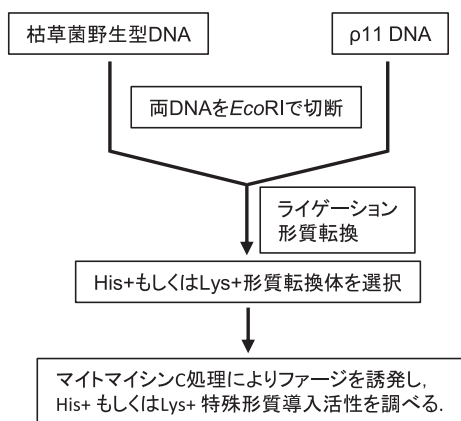


図3. His+もしくはLys+特殊形質導入ファージの構築法

プロファージ形質転換 (prophage transformation)

栄養要求マーカー遺伝子のクローニングができると判明したため、次に、枯草菌の孢子形成遺伝子のクローニングを試みた。その際、孢子形成遺伝子のなかでも多面的な表現型を示す、*spo0*と呼ばれる孢子形成開始遺伝子群に絞ることにした。枯草菌は、孢子形成遺伝子に変異が入ると孢子を形成できないので、容易に識別できる。当時、巨大な染色体の逆位変異体を用いた部分二倍体の研究から、枯草菌では*spo0A*遺伝子は野生型が優性（顕性）であること、また一方で*spo0F*遺伝子は高度にリン酸化されたアデノシンの合成酵素の可能性があるという報告があったため、広島大学理学部で枯草菌の孢子形成を研究されていた小林泰夫先生と共同で*spo0*遺伝子のクローニングを開始し、筆者が*spo0F*³⁾、小林研の広近洋彦さんが*spo0B*⁴⁾のクローニングに成功した。また、この系を用いて、山根國男先生はプラスミドでクローニングできなかった枯草菌の α -アミラーゼの遺伝子を、福山大学の藤田泰太郎教授はグルコン酸オペロンのクローニングを行った。

次に、筆者と同じ研究室の飯島忠子博士が比較的小型のテンプレートファージ $\phi 105$ を用い、*metB*遺伝子でも同様の方法が可能であり、かつ*EcoRI*断片として*metB*遺伝子を回収できることを明らかにした。さらに、電子顕微鏡を用いて組換え体ファージのDNAのヘテロデュプレックス解析を行い、コンピテンス細胞内で期待どおりの組換えがプロファージDNAとのあいだに起きていたことも証明した⁵⁾。

1979年かその翌年か記憶が定かではないが、スクリプス研究所の伊藤先生から久しぶりに電話をいただいた。ハーバード大学のロージック教授から、今年度の

ASM（アメリカ微生物学会）の会議のミニトークで「プロファージを用いたクローニング法」について話してほしいとの誘いがあるのでこれはないか？とのことだった。筆者はすぐ齋藤先生にこの話を伝え、「ぜひ(先生が)参加して、宣伝してきてください」とお願いした。その旨を伊藤先生に伝えると、少し不満なご様子うかがえた。先生にしてみれば、弟子の一人である筆者を久しぶりにアメリカへ呼んであげようという親心があったのではないかと推察している。ありがたいことである。

その後、両先生にお願いして無事に齋藤先生が招待されることとなり、齋藤先生によって、このクローニング法がASMで紹介された。帰国後の先生は非常にご機嫌で、「『Dr. 河村は、溶原菌の形質転換率が非常に低いという事実を無視するほど若かったから、この方法の開発に成功した』と紹介すると、どっと笑いがきてウケたよ」と話してくださった。このように先生はジョークも一流(?)だったが、続いて、「今後も、このクローニング系を口頭や論文などで発表して、より多くの研究者に理解してもらうためには、この方法について一言で理解できるような適切な名前を付ける必要を感じた。そこで考えたのが『プロファージ形質転換, Prophage transformation』だが、これでどうだ?」と仰った。筆者は即座に、「いいですね。それで結構です」と答えた。それが、このクローニング法の命名の瞬間であり⁶⁾ (図4)、つまり、“名付け親”は齋藤先生ということになる。

その後、効率のよいテンプレートファージシステムが、後輩の吉川博文博士（現東京農大教授）や英国ニューキャッスル大学のエリントン教授らによって開発されている。とりわけエリントン教授はこの方法を気に入ったのか、本手法を用いて数多くの孢子形成遺伝子のクローニングを行った。

この方法のメリットは、コピー数（遺伝子増幅）効果を排除できることにある。巧妙に制御されている遺伝子の多コピープラスミドへのクローニングは、細胞の代謝系などを乱し、結果として宿主細胞の増殖を阻害することがある。*spo0A+*、*spo0F+*遺伝子がともに1コピーの場合は、それぞれの変異を相補してSpo+の表現型を示すが、枯草菌の多コピープラスミドにクローニングした場合は、増殖阻害や孢子形成阻害を引き起こす。さらに、枯草菌の α -アミラーゼや*Spo0F*や*Spo0A*の遺伝子を大腸菌の多コピープラスミドにクローニングすることはできない。

現在ではPCR法も開発され、本手法は利用されることがなくなったが、この手法が枯草菌の分子遺伝学研究の黎明期において多くの知見の創出に貢献したと自負し

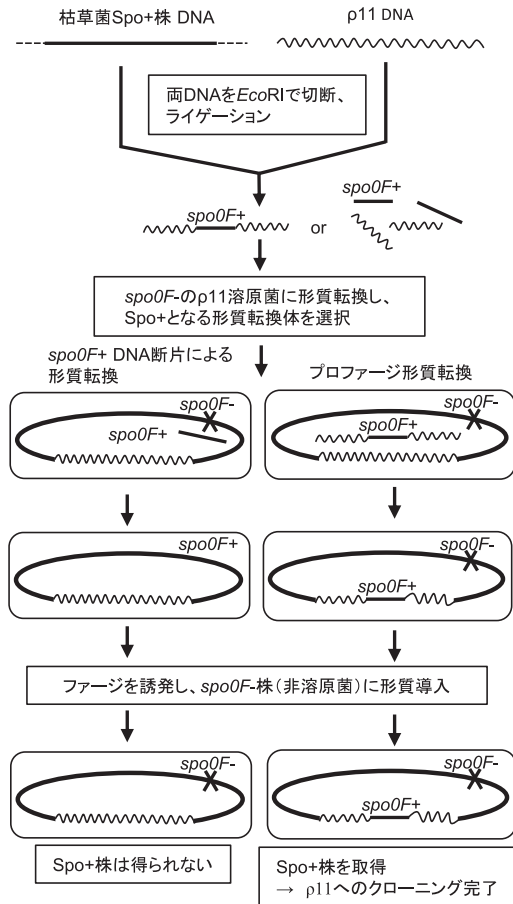


図4. プロファージ形質転換法による *spo0F+* 遺伝子のクローニング. 参考文献⁶⁾より一部改変. 胞子形成能を有する枯草菌 (*Spo+*株)のDNA, および $\rho 11$ DNA を酵素処理し, ライゲーションを行った反応液には, $\rho 11$ DNA 断片と標的遺伝子 (ここでは *spo0F*) を含むDNA断片が目的通り結合したDNAに加え, $\rho 11$ DNA断片と結合しなかった標的遺伝子断片なども存在する. そのため, この反応液を用いて胞子形成欠損株 (*Spo-*株)に形質転換し胞子形成能を回復した株を取得した場合, プロファージ形質転換体 (右パネル)に加え, 標的遺伝子断片のみが細胞内に取り込まれ, *Spo+*となった株 (左パネル)も取得される. そのため, 形質転換体を取得後, ファージを誘発し, *Spo-*を示す $\rho 11$ 非溶原菌に再度形質導入を行い, *Spo+*株の出現頻度を調べることにより, 目的とする遺伝子断片が $\rho 11$ にクローニングされた株のみを取得した.

ている. また, 土壌細菌叢のメタゲノム解析などにおいて, 多コピー化を介さずに目的遺伝子を固定化・増幅し利用することなど, 工夫次第で, 今後も活用する機会があるかもしれないと感じている.

おわりに

正直なところ, もともと文章執筆を得意とせず, 何かを依頼された日から苦痛が始まるというのが常であった. しかし今回は, 締切り間際に齋藤日向先生の訃報に接し, 先生を偲ぶ気持ちが筆者を机に向かわせ, 自身, 当時のことを懐かしく思い起こしながら筆を進めることができた.

院生や学生と接するとき, 齋藤先生なら何といわれるだろうかと考える. 先生はよく諺と諺もどきを交えて話をしてくださった. 「人見て法を説け」「去る者は追わず来るものは拒まず」「困った時の空元気」「火事場の馬鹿力」「捨てる神あれば拾う神あり」など, 門下生が聞けば懐かしく, きりが無いが, 常に希望を与えていただきながら楽しいお酒をご一緒した. 先生のご冥福を心よりお祈りいたします.

文 献

- 1) Srb, A. M. and Owen, R. D.: *General Genetics*, p.185, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1967).
- 2) Kawamura, F. *et al.*: *Gene*, **5**, 87 (1979).
- 3) Kawamura, F. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **26**, 345 (1980).
- 4) Hirochika, H. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **146**, 494 (1981).
- 5) Iijima, T. *et al.*: *Gene*, **9**, 115 (1980).
- 6) Kawamura, F. *et al.*: *Sporulation and Germination*, p.109, ASM (1981).