2012年度 生物工学賞 受賞



細菌細胞壁溶解・修飾酵素群の 総合的研究

関口 順一



Comprehensive research on bacterial cell wall degradation and modification enzymes

Junichi Sekiguchi (Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda, Nagano 386-8567) Seibutsu-kogaku 91: 50-72, 2013.

一般に生物は外界の環境変化を細胞壁や細胞膜に局在 するタンパク質に伝え,さらにその情報は細胞内に伝え られることにより,複製,転写,翻訳,物質透過などを 変化させ,細胞増殖,細胞形態,細胞分化を行っている.

細菌細胞壁の構造はグラム陰性細菌とグラム陽性細菌 で大きく異なり,前者が2つの膜(細胞質膜に対応する 内膜と外膜)に挟まれたペリプラズミックスペースに2 層程度からなるペプチドグリカンが存在するのに対し, グラム陽性菌では外膜はなく,そのかわり細胞質膜の上 に,大腸菌の10倍にもなる厚いペプチドグリカン層か らなる細胞壁が存在している.グラム陽性細菌ではペプ チドグリカンは陰イオン性のポリマーであるタイコ酸, タイコウロン酸で修飾されている(図1).ペプチドグリ カンの構造はN-アセチルムラミン酸とN-アセチルグル コサミンの繰り返しからなるグリカン部分に,4つまた



図1. 枯草菌細胞壁の構造

は5つのアミノ酸残基からなるペプチドステムがN-アセ チルムラミン酸のラクチル基に結合しており、さらにペ プチドステムは隣接するペプチドステムとクロスリンク をして強固な3次元の網目構造を形成している(図2). 枯草菌(*Bacillus subtilis*)や大腸菌(*Escherichia coli*) におけるペプチドステムの構造は、N-アセチルムラミ ン酸に近いアミノ酸残基から、L-アラニン、D-グルタミ ン酸、meso-ジアミノピメリン酸、D-アラニン、D-アラ ニンであり、クロスリンクは4番目のD-アラニンと3番 目のmeso-ジアミノピメリン酸間で生じている(図2). 尚、2番目と3番目の結合は通常のペプチド結合ではな く、グルタミン酸のγ位のカルボキシル基がmeso-ジア ミノピメリン酸のアミノ基と結合したγ-グルタミル結合 で、一般のプロテアーゼはこの結合を加水分解できない.

細菌細胞の細胞壁を溶解する酵素は, 歴史的にはペニ シリンを発見したA. Flemingによる1921年のリゾチー ムの発見が始まりとされている(Nobelprize.orgの Biography参照). 1950年代から細菌の生産する数多く の溶菌酵素が報告され¹⁾, 1957年自己溶解酵素(オート リシン)が細胞増殖, 分裂に重要な役割を果たしている らしいことがP. MichellとJ. Moyleにより指摘され, 微 生物生理学者の興味を集めるようになった²⁾. 1975年枯 草菌に於いて単一精製された自己溶解酵素(*N*-アセチ ルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ)の酵素化学的性 質が報告された³⁾. 自己溶解酵素の詳細な分子生物学的 研究には自己溶解酵素遺伝子のクローニングが必要とな るが, クローニングについてはバクテリオファージが持



図2. ペプチドグリカンの構造と溶解酵素(オートリシン)の 作用部位. 1, *N*-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ:2, L, D-エンドペプチダーゼ:3, D,L-エンドペプチダーゼ:4, カル ボキシペプチダーゼ:5, D,D-エンドペプチダーゼ:6, エンド-*N*-アセチルムラミダーゼおよびリティックトランスグリコシ ダーゼ:7, エンド-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ.

つ細胞壁溶解酵素(T4, T7リゾチームなど)遺伝子の研 究が精力的に行われてきた反面⁴⁾,微生物の自分溶解酵 素遺伝子の解析は1980年代まで,ほとんど行われてい なかった⁵⁾.なお,細胞壁溶解とは細胞壁のなかで,強 固な網目状構造を示すペプチドグリカンの溶解を意味し ており,それゆえペプチドグリカン溶解酵素とも呼ばれ ている.現在ではペプチドステムの各アミド結合(ペプ チド結合)や糖鎖間を切る酵素が知られてきている.

バチルス属細菌からの自己溶解酵素のクローニング

筆者らは細菌として枯草菌を中心にとりあげ,細胞壁 溶解酵素群とそれら遺伝子の研究を行ってきた.枯草菌 はグラム陽性菌に属し,胞子を形成し,形質転換能を持 つとともに,分子生物学的研究も広く行われてきている モデル微生物である.一方アミノ酸・核酸発酵,界面活 性剤や最近では異種タンパク質の生産宿主として利用さ れている工業微生物でもある⁶⁾.また同じ種に属する納 豆菌は納豆生産に広く使われている⁷⁾.筆者らは1990 年に枯草菌で初めてオートリシン遺伝子CwlAを大腸菌 へのショットガンクローニング法で成功させ⁸⁾,その遺 伝子産物はL-アラニンアミダーゼであることを報告し

た⁹. 1991年には主自己溶解酵素を枯草菌表面から高い 塩濃度で抽出し、精製の後、N末端アミノ酸配列、CNBr 切断断片の配列を決定し、その結果をもとに核酸オリゴ マーを合成し、コロニーハイブリダイゼーション法によ り遺伝子*cwlBを*クローニングすることができた¹⁰⁾.次に cwlBの遺伝子を薬剤耐性マーカーで破壊したところ. 今まで主自己溶解酵素の機能として推定されていた細胞 形態、運動性、コンピテンス能、胞子形成・発芽に何ら の影響も与えなかったが、定常期後期で起きる自己溶解 には強く関与していた¹⁰⁾. さらにCwlB活性を修飾する 遺伝子 cwbA が cwlB の上流に存在していた^{11,12)}. CwlB は CwlAと異なるアミノ酸配列を示しているが、ともにN-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼであった^{9,10)}. Lausanne大学のD. Karamata教授らも筆者らの発表の 翌年cwlB, cwbA遺伝子のクローニングを報告し、それ ぞれ*lvtC*, *lvtB*と名付けている¹³⁾. さらにLvtC (CwlB) は細胞壁のリサイクリングに関与していた¹⁴⁾.一方 LytC変異株はコールドショックによる溶菌にもかなりの 耐性を示した¹⁵⁾. その後筆者らはBacillus licheniformisか らも*cwlM, cwlL*をクローニングすることができた^{16,17)}.

B. licheniformisからの遺伝子xpaG2を大腸菌にクローン化した時、オートリシンと共存すると細胞が顕著に溶解することより、細胞溶解は細胞壁溶解酵素だけが担っているわけではなく、ホーリン(XpaG2)と呼ばれるタンパク質も関与していることがわかった¹⁸⁾. このようなホーリンの例は枯草菌ファージφ29や欠損ファージ PBSX でも見られている^{4,19}.

枯草菌の主自己溶解酵素は前述のLytC (CwlB) とと もに, *N*-アセチルグルコサミニダーゼLytD (CwlG) がある^{20,21)}. この遺伝子を*lytC*とともに同時破壊すると 運動性が著しく低下することを明らかにした²²⁾. 主自己 溶解酵素以外のマイナーなオートリシンについてもザイ モグラフィーで解析を行った²³⁾.

枯草菌ゲノム研究と細胞壁溶解酵素遺伝子

枯草菌の全ゲノム配列決定と細胞壁溶解酵素遺伝子 枯草菌の全ゲノム配列決定は1990年代になってEUと 日本との国際プロジェクトとして実施されるようにな り、筆者のグループもその一端を担うことになった.枯 草菌の環状地図で言えば、時計の3時頃のわずか140 kbpの領域の塩基配列決定であったが、アプライドバイ オシステム社の蛍光シクエンサー373Aとショットガン シークエンス法が開発されていない時代では大変な努力 が必要であった.最終的に1997年EU・日本の多数の共 同研究者と共著で論文に発表した²⁴⁾.枯草菌ゲノムは 4,214,810 bpからなり、4100 ORFを含み、細胞壁関連 として93遺伝子が推定された.さらに同時にデータベースとしてBS ORFを公表した.また筆者らが関係したシクエンスデータとORFの解析は,別途いくつかの雑誌に発表し²⁵⁻²⁹,総説としても報告した³⁰⁻³⁰.

枯草菌プロテオーム解析と表層局在タンパク質の網羅 的解析 枯草菌全ゲノム塩基配列決定の研究は、推定 されるORFすべての機能解析に引き継がれて展開した. とりわけプロテオーム解析は、トランスクリプトーム解 析とともに積極的に行われ、筆者らは細胞表層タンパク 質のプロテオーム解析を報告した。1次元を等電点電気 泳動で分離し、2次元をSDS-PAGEによる分子量で分 ける方法である。タンパク質のバンドの同定は、最初は N-末端配列を決定しゲノムデータから遺伝子を特定す る方法で行ったが、後には質量分析に取って代わられ た. 図3にドイツGreifswald Ernst-Moritz-Arndt大学の M. Hecker 教授の研究室と共同研究を行った際のデータ を示す³⁷⁾. LB培地で細胞増殖が定常期に達して1時間 目の細胞から1.5 MのLiClで抽出したタンパク質をサ ンプルとしている. 培養条件を変えて行った結果をまと めたのが表1である。栄養細胞増殖時に発現する細胞壁 溶解酵素とともにプロテアーゼも認められた. IseA (YoeB) はこの結果をもとに詳しく解析された(後述). ただし、本解析法での問題点は、細胞壁に強く結合して いる場合(共有結合で細胞壁に結合するなど)や細胞膜

表1. プロテオーム解析による枯草菌細胞表層タンパク質の一覧

にアンカリングして細胞壁に局在する場合には,LiCl で抽出されないため、この研究では表層局在タンパク質 に含まれないことになる.



図3. 枯草菌細胞表層タンパク質の2次元電気泳動. LB培地 で培養し、定常期1時間目の菌体から高塩濃度で抽出したタン パク質をサンプルに用いた.

遺伝子産物	機能	M.W.	pI	DSM	LB	ECP (LB)#
WapA	細胞壁結合タンパク質	258,332	6.2	0	0	0
CwbA (LytB)	CwlB (LytC)修飾酵素	76,710	10.3	\bigcirc	\bigcirc	—
Vpr	マイナー分泌性セリンプロテアーゼ	85,590	6.1	\bigcirc	—	\bigcirc
Bpr	バチロペプチダーゼF	154,577	5	\bigcirc	—	\bigcirc
WprA	細胞壁結合プロテアーゼ	96,487	10	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc
CwlB (LytC)	主自己溶解酵素アミダーゼ	52,608	9.8	\bigcirc	\bigcirc	—
Pel	ペクチン酸リアーゼ	45,498	8.9	\bigcirc	—	\bigcirc
Hag	鞭毛モノマー	32,626	4.8	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc
YvbX	機能未知	38,951	9.6	\bigcirc	—	—
Csn	キトサナーゼ	31,496	9.4	\bigcirc	—	\bigcirc
YncM	機能未知	26,597	9.6	\bigcirc	—	\bigcirc
YwsB	機能未知	19,109	9.5	\bigcirc	\bigcirc	—
IseA (YoeB)	オートリシン阻害タンパク質	20,130	9.8	\bigcirc	—	—
YybN	機能未知	16,160	10.1	\bigcirc	—	—
YqgA	機能未知	15,281	9.9	\bigcirc	\bigcirc	—
CwlF (LytE)	D, L-エンドペプチダーゼ	35,455	10.1	\bigcirc		—
CwlO (YvcE)	D, L-エンドペプチダーゼ	50,865	5.3	\bigcirc	\bigcirc	—
PgdS(YwtD)	D, L-エンドペプチダーゼホモログ	45,087	8.7	—	\bigcirc	—
YjcM	機能未知	46,576	8.9	\bigcirc	—	\bigcirc
CwlG(LytD)	<i>N</i> -アセチルグルコサミニダーゼ	95,357	9.9	\bigcirc	\bigcirc	—
YocH	細胞壁結合タンパク質	30,025	8.3	—	\bigcirc	—

#;LB培地での培養で分泌タンパク質のプロテオーム解析で認められるスポット(ECP)



図4. 枯草菌野生株とpdaA (yfjS)変異株の胞子の透過型電子顕 微鏡像(名古屋市立大学安田陽子博士より提供)

r coat

core

枯草菌細胞分化と細胞壁溶解酵素修飾酵素の機能

枯草菌は栄養源が枯渇する等環境が悪化すると、細胞 内に胞子(芽胞;スポア)を形成する³²⁾(図4). 胞子 は一番内側に将来の栄養細胞になるコアと、その外側に 厚いペプチドグリカンと類似の成分からなるコルテック ス, さらにその外側には30種近いタンパク質からなる スポアコートが結合している。胞子は熱、薬剤、化学物 質に高い耐性を示し休眠状態にあるが、L-アラニンなど の発芽促進剤にさらされると位相差顕微鏡のもとで光っ て見える胞子が時間の経過とともに灰色から黒色に変わ り、胞子が膨潤する、この過程を発芽と呼ぶが、発芽は L-アラニンのみを含む緩衝液中でも進行する一方,栄養 培地中では胞子の殻を破って栄養細胞が現れてくる.こ の現象は発芽後成長といい、培地中に栄養源を含まなけ れば進行しない(図5). 胞子形成は厳密にRNA合成酵 素の σ サブユニットによって制御されており、 $E\sigma^{F}, E\sigma^{E}$ 、 $E\sigma^{G}$, $E\sigma^{K}$ の順に活性化が起こり, 前のシグマサブユニッ トが働かなくなると、それ以降のすべての胞子形成シグ マの発現または活性がなくなってしまう、この現象はシ グマカスケードとして知られている³⁸⁾.

胞子コルテックスの生合成と細胞壁溶解酵素・修飾酵 胞子コルテックスの構造を図6に示す. ペプチド 素 グリカンと比較してもっとも大きな違いは、N-アセチ ルムラミン酸がムラミン酸δ-ラクタムに代わっているも のがムラミン酸の半数を占め、さらにペプチドステムが L-アラニンだけのものが多くみられる. ゲノム塩基配列 決定の最中、当時 Max-Planck 研究所の J. C. Alonso 博士 から細胞壁溶解酵素のアミダーゼLytCと類似の配列を 持つcwlDの解析を依頼された. そこでこの遺伝子を破 壊すると発芽がほとんど起こらなくなり、発芽後成長に 至っては完全に阻害されていた(図7). さらにコルテッ クス分解成分であるヘキソサミンが液中に遊離するかで 判定したところ、まったく分解は認められなかった.こ のような顕著な発芽欠損を示す例は胞子形成菌で初めて の報告であった³⁹⁾.報告の翌年Connecticut Health Center



図5. 枯草菌胞子の発芽と発芽後成長. 上段のグラフは, 発芽 開始からの時間と吸光度の変化を示す。中・下段は位相差顕 微鏡像を示す.



図6. 野生株 (A) および *cwlD* 変異株 (B) 胞子のコルテック スの構造



図7. 野生株, *cwlD*変異株, *pdaA* (*yfjS*) 変異株胞子の発芽, 発芽後成長時のヘキソサミンの遊離(A)と吸光度変化(B). ●, ▲, ■はそれぞれ野生株, *cwlD*変異株, *pdaA* (*yfjS*)変異株を 示す.

大学のP. Setlow 教授らと Sheffield 大学のS. J. Foster 教 授らは *cwlD* 破壊株の胞子はムラミン酸δ-ラクタムを欠 損していることを報告した^{40,41)}. 2002年になって筆者 らが報告した多糖デアセチラーゼ遺伝子のホモログであ る *pdaA* (*yfjS*)の欠損胞子は,野生株や *cwlD* 変異株胞 子と同様に一見屈折性のある形態的に差がない胞子を作 るが (図4),さらに解析すると *cwlD* 変異とまったく同 じ胞子欠損の表現型をとることを認めた.そこでS. J. Foster 教授の協力のもと,*pdaA* 変異株胞子のコルテック スの構造を調べ,この変異もまたムラミン酸δ-ラクタム を欠損していることを明らかにした⁴²⁾ (図8).

さらにムラミン酸δ-ラクタムの生合成メカニズムを明 らかにするため、細胞壁溶解酵素であるアミダーゼの1 つCwlH(後述), D,L-エンドペプチダーゼであるLytF (CwlE), N末端シグナルを持つPdaAと,N末端シグナ ルを削除したPdaAをHis-tag融合タンパク質として大 腸菌にクローン化し、ニッケルカラムで精製を行った⁴³⁾

(図9). ペプチドグリカンおよびCwlH, LytF (CwlE) でそれぞれ切断したものを基質として反応させ、脱アセ チル化活性を酢酸の遊離で測定したところ, CwlHで切 断した基質のみ, 脱アセチル化活性が認められた(図10; ペプチドグリカンのみのデータは略). この結果は最初 にアミダーゼによりペプチドグリカンが切断され、その 構造を厳格に認識してPdaAがN-アセチルムラミン酸か ら酢酸を脱アセチル化し、その後遊離のアミノ基とムラ ミン酸のカルボキシル基の間でδ-ラクタム環が形成され ることを示している⁴³⁾ (図11). N-アセチルグルコサミ ンの脱アセチル化酵素はStreptococcus pneumoniaeにお いてのPgdAの例が報告されていたが⁴⁴⁾, N-アセチルム ラミン酸の脱アセチル化酵素の報告は今回が初めてで あった⁴³⁾.尚,アミダーゼとしてCwlDの代わりに CwlHを使ったのは、CwlDの細胞壁溶解活性が認めら れなかったためで、その理由として胞子中ではタンパク 質のプロセシングが必要で, in vitroで調製したCwlDは 適切なプロセシングが行われていないのが原因と考えて いる.

PdaA (YfjS) ホモログは枯草菌では他に4つ (YlxY, YjeA, YbaN, YheN)存在するが、そのうちYbaN (PdaB) は胞子特異的シグマサブユニットであるの^Eで転写され、 その欠損は一度できた胞子の構造が維持できず、時間経 過とともに胞子の内部が分解してしまう⁴⁵⁾ (図12). 最 近になってYjeA (PdaC) がやはり*N*-アセチルムラミ ン酸を脱アセチル化する酵素であること、この酵素は栄 養細胞のペプチドグリカンに対し高い活性を示すこと、 *yjeA* (*pdaC*) 変異株はリゾチームに対して感受性にな ることより、栄養細胞増殖時にペプチドグリカンの脱ア セチル化修飾に働いていることが解った⁴⁶⁾.

非対称隔壁の分解と細胞壁溶解酵素 胞子形成の最 初の形態的変化は、非対称隔壁の形成である、その後隔 壁が小空間の部分を包み込むようになり (engulfment stage),細胞(母細胞)中にフォアスポアが形成される (図13). フォアスポアをもとの母細胞から分けるには 細胞壁溶解酵素が必要で、さらにフォアスポアのペプチ ドグリカン層が完全に分解された構造(スポアプロトプ ラスト) に至る⁴⁷⁾. この過程ではSpoIID, SpoIIPの2 つの細胞壁溶解酵素と膜結合タンパク質 SpoIIM が必要 であることが報告された⁴⁷⁻⁴⁹⁾.興味あることには SpoIIDはMurNAcとGlcNAcの間を切断するリティック トランスグリコシダーゼで、SpoIIPはアミダーゼ活性 とD, D-エンドペプチダーゼ活性を示す2機能酵素であっ た⁴⁸⁾. またフォアスポアの膜タンパク質として知られて いるSpoIIQの欠損もまたengulfmentを阻害する⁵⁰. SpoIIQはD, D-エンドペプチダーゼであるリソスタフィ



図8. 枯草菌野生株, cwlD変異株, pdaA (yfjS)変異株の胞子コルテックス成分の逆相HPLC分析. ピーク番号に対応する構造を四角の枠内に示す.



図9. 酵素反応実験のためのPdaA (YfjS), CwlH, CwlE (LytF) タンパク質の精製とSDS-PAGE. すべてのタンパク質の末端 にHis-tagを付加し(h-をタンパク名に付与), ニッケルカラム で精製したサンプルを用いた. ΔYfjSとはYfjSのN末端シグ ナル配列を除去したタンパク質で, Δの記載が無いものはシグナ ル配列を含むペプチドを示す. CwlE (LytF)は活性ドメインの みをクローン化して使用した. 矢印は活性タンパク質を示す.

ンと高いアミノ酸配列の類似性を示している⁵¹⁾. SpoIID, SpoIIP, SpoIIQはそれぞれRNA合成酵素 Eo^E, Eo^E, Eo^Fで転写される⁵¹⁾.

母細胞の溶解と細胞壁溶解酵素 スポアプロトプラ スト形成の後, その2重の膜の間にコルテックスが形成



図10. PdaAのペプチドグリカン脱アセチル化活性と基質特異性. Aは脱アセチル化活性. B, C, DはそれぞれPdaA反応の 基質として使った栄養細胞ペプチドグリカン, CwlH処理した ペプチドグリカン, LytF (CwlE)処理したペプチドグリカンの 構造を示す. Aのサンプル1から3はCの基質, 4から6はD の基質を使った. 1と4はh-YfjS添加の4時間反応; 2と5は h-∆YfjSの4時間反応; 3と6はh-∆YfjSの16時間反応. 生成 した酢酸をF-キットで定量した.



図11. 胞子ムラミン酸δ-ラクタムの生合成経路



図12. 野生株とpdaB欠損株胞子の透過型電子顕微鏡像

され、続いて30種近いタンパク質が外側に積層してス ポアコートが作られる⁵²⁾. この段階を過ぎると母細胞が 溶解し、細胞内にある成熟した胞子がステージVIIで遊 離してくる (図13). この遊離にもまた細胞壁溶解酵素 が用いられる. この時期に発現する $E\sigma^{K}$ で転写される CwlHとCwlCがその役割を担っており、たとえば CwlHが欠損すると胞子の周りに母細胞の細胞膜・壁が 付着して残ってしまう⁵³⁻⁵⁵⁾. さらに $E\sigma^{A}$, $E\sigma^{D}$ で転写さ れる*hytC* (*cwlB*) タンパク質も細胞溶解に関与している.



図13. 枯草菌の生活環と細胞壁溶解酵素の役割を示す模式図



図14. 母細胞の溶解を示す野生株と細胞壁溶解酵素変異株の 位相差顕微鏡写真. DSM培地24時間培養後の胞子の写真を示 す. AC327, 野生株; ANB1, *cwlB* (*lytC*)欠損株; ANC1, *cwlC*; CWLHd, *cwlH*; ABH, *cwlB cwlH*; ACH, *cwlC cwlH*; ABC, *cwlB cwlC*; ABCH, *cwlB cwlC cwlH*. バーは10 µm.

おそらくLytCはかなり安定な自己溶解酵素で,胞子形成 の最終段階まで母細胞の表層に残っていたのであろう⁵³⁾ (図14).なお,CwlH,CwlCを用いた母細胞溶解はバ クテリアにおけるプログラムされた細胞死の例となって いる⁵⁶.

胞子発芽と細胞壁溶解酵素 コルテックスのムラミ ン酸δ-ラクタム合成に関与するアミダーゼホモログで あるCwlDが発芽能を失うことはすでに述べたが³⁹⁾. cwlD遺伝子発表の翌年,名古屋大学の牧野志雄教授の 研究室からBacillus cereus 菌でsleB遺伝子欠損株が発芽 を欠損することが報告され、そのオルソログ (sleB) は 枯草菌にも存在していた⁵⁷⁾.興味あることにB. cereusの SleBはコートを除いた胞子に対しコルテックス溶解活 性を示し、精製したコルテックスには作用しない酵素で あった.一方枯草菌のSleBには活性は認められていな いが、変異株はB. cereus 同様完全な発芽欠損を示した⁵⁸⁾. 本酵素は当初アミダーゼと考えられていたが、S.J. Foster 教授らの報告ではリティックトランスグリコシダーゼと 考えられている⁵⁹⁾.枯草菌*sleB*のパラログとして. cwUが存在していた. この遺伝子は $E\sigma^{E}$ で転写され, cwlJ変異胞子は発芽において胞子の吸光度の変化やジ ピコリン酸の放出が野生株より遅れていた. しかしコル テックスの分解を示すヘキソサミンの遊離は野生株と同 じであった⁶⁰⁾. cwlJ sleB二重変異はほぼ完全に発芽が 阻害された(図15, 16). CwlJタンパク質の酵素活性は 明らかになっていないが、今ではCwlJは発芽の初期に 作用するコルテックス分解酵素と考えられている⁶¹⁾.

その他の細胞壁溶解酵素候補遺伝子と機能 B. cereus のコルテックス断片を切断する N-アセチルグルコサミ



図15. 枯草菌各種変異株胞子の発芽時の吸光度(A), ジピコ リン酸の遊離(B), 還元物質(ヘキソサミン)の遊離(C). ■, ◆, ●, ▲はそれぞれ野生株, *cwlJ*, *sleB*, *cwlJ sleB*変異株を 示す.



図16. 枯草菌各種変異株胞子の発芽処理後6時間目の位相差 顕微鏡写真. バーは5 μm.

ニダーゼSleL⁶²⁾と高いアミノ酸配列の類似性を示す ydhD, yaaHの遺伝子は、ともにEo^Eで転写されるが^{63,64)}, ydhD変異株は野生株と比べても休眠胞子,発芽のコル テックスの構造に変化は認められず,発芽も正常であっ た.一方yaaHの変異株はL-アラニンによる発芽能を欠 損していた⁶⁴⁾.

 $E\sigma^{K}$ で転写されるlytH(yunA)はコルテックスの構

造と関係し,破壊株は胞子に特徴的な*N*-アセチルムラ ミン酸にL-アラニンのみが結合した構造が認められなく なり,テトラペプチドからなるステムが*N*-アセチルム ラミン酸に多く結合していた⁶⁵⁾.そのためLytHはL-ア ラニンとD-グルタミン酸の間を切るL,D-エンドペプチ ダーゼと考えられる.変異株胞子は耐熱性が低下してお り,電子顕微鏡像も野生株と異なっていた⁶⁵⁾.

枯草菌栄養増殖期と細胞壁溶解酵素

細胞分離に関与する自己溶解酵素群 枯草菌の栄養 細胞の時期にはすでに述べた主自己溶解酵素アミダーゼ LvtC (CwlB) 以外にも、グルコサミニダーゼLvtD (CwlG)^{20,21)}, LytG⁶⁶⁾とともに, D-グルタミン酸とmeso-ジアミノピメリン酸の間を切断するD.L-エンドペプチ ダーゼが数種,L-アラニンとD-グルタミン酸の間を切断 するL,D-エンドペプチダーゼが1種知られている. その うちD,L-エンドペプチダーゼの3種LytE (CwlF)^{67,68)}, CwlS⁶⁹⁾. LvtF (CwlE)^{70,71)}は全体的にアミノ酸配列類 似性がきわめて高く, N末端側にはLysMモチーフをそ れぞれ3回、4回、5回含む細胞壁結合性LysMドメイン、 C-末端側には活性ドメインが存在する(図17). これら の遺伝子を転写するシグマ因子は異なっており、 lvtEは $\sigma^{A} \geq \sigma^{H}$, *cwlS*は σ^{H} , *lvtF*は σ^{D} で転写される^{67,69,71)}. 栄 養増殖期のσ因子は、ハウスキーピングシグマと呼ばれ 転写の切り替えが行われている⁷²⁾.そのため同じ基質特



図17. 栄養細胞増殖期の細胞壁溶解酵素変異株の位相差顕微 鏡像. 1から3は168野生株, 4から6は*lytE cwlS lytF* 3重変 異株の形態を示す. 写真の上部には3つの細胞壁溶解酵素のド メイン構造を示した.

異性を示し、一見重複した機能のように思える3つの酵素は、転写の段階で微妙に調節されていることが解る. これらのタンパク質の末端にFLAGタグを付け、免疫 蛍光顕微鏡で細胞への局在部位を調べたところ、細胞の 両極と細胞の分裂部位^{69,73)}に局在するとともに、局在場 所はLysMドメインに完全に依存していた(図18).こ れら単独変異では細胞が若干長くなる程度であったが、 2種の欠損でかなり細胞は長くなり、同時に3種を欠損

WEE3FL(wprA epr lytF-3xflag)



WECWBE3FL(wprA epr CWB-3xflag)



図18. 細胞壁溶解酵素LytF, そのN末端ドメインの細胞表層 局在を示す免疫蛍光顕微鏡像. FLAG抗体とFITCコンジュゲー ト2次抗体を使い, FLAGタンパク質を緑色に発色させている. 青色はDAPIによるDNA染色を示す.



図19. *minCD*変異株におけるLytF-3xFLAGの局在を示す免 疫蛍光顕微鏡像. 矢印がミニセル生成に伴う細胞切断部位(A) とLytF-3xFLAG酵素の局在部位(B)を示す.

すると著しい繊維状化を呈する(図17). 繊維状化した 細胞も、セプタムの存在が認められることより、LytE、 CwlS、LytFは細胞の分離する部位を認識して結合し、 細胞を分けていることが解った⁶⁹⁾. これら細胞分離酵素 はミニセルを形成する*minC、minD*変異においても、ミ ニセルを分離する部位に局在していた(図19).

筆者らのグループは*in vitro*の実験より,細胞壁のペ プチドグリカン以外の主要成分であるタイコ酸がLytF の細胞壁への結合を阻害しており,テイコイン酸量を減 少させた時,LytFの局在部位も変化し,細胞の側面に らせん状に存在することを示した⁷⁴.

合成致死変異を示す2つの細胞壁溶解酵素遺伝子 2007年Trinity CollegeのK. M. Devine教授のグループ は細胞壁溶解酵素CwlOとLytEの2重変異株が合成致 死を示すことを報告した⁷⁵⁾. そこで筆者らも*lytE*をテト ラサイクリン耐性遺伝子で破壊し、cwlOをキシロース プロモーターで制御した株を構築し、キシロースを枯渇 させると細胞増殖が停止することが解った(図20).こ のcwlO遺伝子産物の細胞壁溶解酵素活性は、以前筆者 らがD,L-エンドペプチダーゼであると報告した酵素で、 LvtE, LvtF, CwlSと比べ、活性ドメインの配列類似性は 高いが、N-末端側のドメインはLysMとはまったく異な るドメインを持つ酵素であった⁷⁶⁾(図21). CwlOの細 胞表層局在部位は細胞の分離部位や両極には存在せず, 側面にらせん状に局在していた77). LytEの局在につい ては前述したように細胞分離部位と両極に局在する酵素 であったので、より詳細にLytEの局在を調べたところ、 一部が細胞側面にらせん状に存在することが解った⁷⁷⁾ (図22). LysMリピートの数が異なるだけで、細胞表層 局在部位が変わることは非常に興味深い. 合成致死変異 を示すLytEの代わりに局在部位の異なるLytF, CwlS を発現させても合成致死変異の欠損を補うことはでき ず,さらにCwlO, LytEの細胞壁溶解酵素活性を点変異 で破壊した酵素でも合成致死変異の欠損を補うことはで きなかった⁷⁷⁾.次にドメインスワッピングにより, LytEのLysMドメインに,LytFまたはCwlSの触媒活性 ドメインを融合した酵素,またコントロールとしてLytF のLysMドメインにLytEの触媒活性ドメインを融合し たD,L-エンドペプチダーゼを構築し,合成致死変異の 増殖欠損を相補するか調べたところ,N末端にLytEの 細胞壁結合ドメイン(3回のLysMリピート)を持つ酵 素のみ,合成致死変異の欠損を相補し,増殖が回復する ことを示した(図23,24).これらの結果からD,L-エン

Strain : P_{xvl}-cwlO lytE::tet



図20. LytE欠損, CwlO枯渇下での細胞増殖阻害. 横軸は培 養時間, 縦軸は細胞濁度を示す.



図21. 枯草菌のD, L-エンドペプチダーゼ2族に属するタンパク質の構造と機能



図22. 栄養細胞増殖時に発現する4種の細胞壁溶解酵素の細胞表層局在部位. 上部写真は位相差顕微鏡像, 下部はFLAG 融合タンパク質の局在部位を示す免疫蛍光顕微鏡像, 矢印は 細胞分離部位を示す.



図23. ドメイン交換による融合タンパク質のザイモグラムと 局在部位を示す免疫蛍光顕微鏡像. ザイモグラムは左から N_{btt}C_{buf}, N_{btt}C_{cvts}, N_{btt}C_{byt}の活性を示す. 細い矢印が当該酵 素のバンドを示す. 下部の写真は免疫蛍光顕微鏡像.



図24. N_{btE}C_{htF}, N_{btE}C_{cvtS}, N_{btF}C_{btE}融合タンパク質のLytE欠損 の相補性. *lytE*は融合酵素遺伝子で置き換えられている. 図20 で示した合成致死変異を示す*cwlO*はキシロース制御下にあり, キシロースを枯渇した条件での増殖を観察している(●). 下部 の写真はキシロース枯渇下で増殖した細胞の位相差顕微鏡像.

ドペプチダーゼの局在部位が重要で,酵素活性はD,L-エンドペプチダーゼならどのタンパク質由来でもよいこ とを示している⁷⁷⁾.

その他の細胞壁溶解酵素 枯草菌細胞の栄養増殖期 にはエンド-N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダー ゼのLvtC (CwlB)^{10,13)}. エンド-*N*-アセチルグルコサミニ ダーゼのLytD (CwlG)^{20,21)}, エキソ-*N*-アセチルグルコ サミニダーゼのLytG (YubE)⁶⁶⁾とNagZ (YbbD)⁷⁸⁾が 知られている.同じグルコサミニダーゼでもアミノ酸配 列は3種とも異なっており、LytDはEσ^D、LytGはEσ^A で転写される.LvtDは自己溶解とともに、運動性、細 胞壁のリサイクルに^{20-22,79)}, LytGはエキソ型酵素で細 胞分裂,細胞溶解,運動性に関与している⁶⁰. NagZも またエキソ型酵素であり、細胞壁のリサイクルに用いら れている⁷⁸⁾. 一方CwlK(YcdD)は栄養細胞増殖時のL, D-エンドペプチダーゼであった⁸⁰⁾.またD,L-エンドペプチ ダーゼのパラログである YkfCの機能が推測され、糖鎖 の部分から脱離したペプチドステム中のD-グルタミン 酸とmeso-ジアミノピメリン酸の間を切断する細胞壁リ サイクル酵素であると考えられている⁸¹⁾

枯草菌バクテリオファージ,接合伝達因子と 細胞壁溶解酵素

枯草菌のCwlA族(アミダーゼ2ドメイン)には5種 類の酵素が含まれ⁵¹⁾、枯草菌欠損ファージPBSXにコー ドされる *xlyA*, *xlyB* 遺伝子^{19,82)}, プロファージ SPβ にコー ドされるblvA⁸³⁾のほか.skin領域に位置する前述の *cwlA*⁸⁾. 母細胞の溶解に関与する*cwlH*⁵³⁾がある. 最近 筆者らはSPβファージ領域に2つの細胞壁溶解酵素ドメ インを持つ*cwlP*遺伝子産物を報告した. *cwlP*は2285 アミノ酸からなる巨大なペプチドをコードする遺伝子 で、中央部にはSLTドメイン、C-末端部分にはD,D-エ ンドペプチダーゼドメインが存在する⁸⁴⁾. これらドメイ ンは単独で細胞壁溶解活性を示す⁸⁴⁾. BlyAがファージ 誘発に続いて起こる細胞溶解のオートリシンと考えられ ているため⁸³⁾、CwlPはそれ以外の過程、たとえば感染 の過程などに関係しているのかもしれない. ドメイン構 造からCwlPは糖鎖部分とペプチド部分を溶解する酵素 であるため、きわめて効率よく細胞壁ペプチドグリカン を溶解できるのであろう⁸⁴⁾.一方枯草菌挿入型接合伝達 性因子ICEBs1領域にコードされるCwlTのN末領域に はSLTドメイン、C末領域にはD,L-エンドペプチダーゼ ドメインが存在し、各ドメイン単独で活性を示す⁸⁵⁾. CwlP. CwlTの各ドメインのペプチドグリカン分解の基 質特異性を決定したところ、CwlP、CwlTともC末端の 活性はそれぞれD,D-エンドペプチダーゼ、D,L-エンドペ



図25. リティックトランスグリコシダーゼ (SLT) により生成する1,6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸誘導体

プチダーゼであったが、一方それら溶解酵素で予想され たSLTドメインはリティックトランスグリコシダーゼで はなく、エンド-N-アセチルムラミダーゼであった^{84,85)}. リティックグリコシダーゼとムラミダーゼでは反応生成 物に大きな違いがあり、前者がN-アセチルムラミン酸 残基から1.6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸を与え るのに対し(図25)、ムラミダーゼはリゾチーム作用で よく知られる加水分解物N-アセチルムラミン酸を生じ る. ガチョウのリゾチームもやはりSLTのアミノ酸配 列と類似していた⁸⁵⁾. さらに興味あることには、SLTド メインを持つ枯草菌CwlQをペプチドグリカンおよびそ のオリゴマーに作用させ、反応物を質量分析で詳細に解 析したところ、1.6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸と N-アセチルムラミン酸の両方が同時に生成していた⁸⁶⁾. このことは現時点でタンパク質のアミノ酸配列から酵素 活性を類推することが困難であることを意味している. さらにCwlOは触媒活性ドメインが1つしかなく、2機 能酵素ということができる⁸⁶⁾.

枯草菌細胞壁溶解酵素の転写制御

RNAポリメラーゼシグマDサブユニットによる自 己溶解酵素の制御 枯草菌のRNAポリメラーゼのシ グマ因子は19あり、その内訳は σ^A 、 σ^D や胞子形成シグ マを含む σ^{70} タイプが10、 σ^{54} タイプが1、ECFタイプが 8つである³¹⁾.そのうち細胞表層関連遺伝子の転写には σ^D が大きく関与している、E σ^D は対数増殖から定常期 へのトランジションステージに働き、よく知られた遺伝 子として鞭毛の成分であるフラジェリンタンパク質(Hag) や運動性に関係する遺伝子オペロンを転写する²²⁾.主細 胞壁溶解酵素遺伝子を含むLytCオペロンはE σ^D とE σ^A で転写され、転写量は前者が約90%を占めている⁸⁷⁾.



図26. 2成分制御系DegS, DegUとMecA, MecB (ClpC), SinR (FlaD)の作用の模式図. →, ポジティブ効果; 干, ネガティブ効果.

細胞壁溶解酵素 LytD, LytF も $E\sigma^D$ で転写される^{21,71)}.

対数増殖期のコンピテンス (comGなど) やレバンシュ クラーゼ遺伝子 (sacB) 発現に対する負の制御タンパ ク質 MecA, MecB (ClpC) の変異もまた自己溶解酵素 (LytC, LytD) 量を減少させ,鞭毛合成を阻害した. こ の原因として MecA, MecBの変異が sigD発現を低下さ せ, E σ^{D} で転写される主自己溶解酵素群の低下に至った ことが解った^{88,89} (図26).

一方2004年,筆者らは多数の表層タンパク質遺伝子 がシグマDによって制御されているため、さらに新規遺 伝子を求めてシグマD制御下にある遺伝子の網羅的解析 をマイクロアレイとノーザンブロットを用いて行った. 既知のSigD依存遺伝子以外に18の新規な遺伝子を見つ けた.そのうち11遺伝子(9オペロン)にはSigDコン センサス配列が認められた.その中では2遺伝子がケモ タキシス関連遺伝子と推定されたが、7遺伝子について はまったく機能が予測できなかった⁹⁰⁾.

2成分制御系などによる細胞壁溶解酵素遺伝子の制御 2成分制御系は細胞増殖,胞子形成,運動性など多様な 役割を担う制御系で,枯草菌ではセンサーキナーゼが 36種,レスポンスレギュレターが34種知られている⁹¹⁾. その1つdegS-degUの変異はプレオトロピックな性質を 示し,なかでもdegU32(Hy)変異は分解酵素遺伝子群 (aprE, nprE, amyEなどの遺伝子)の転写量を増加させ, コンピテンスの低下を示す^{87,92)}.またdegU32(Hy)変 異はリン酸化DegUの安定化(増加)に導き,sigDの 転写を抑え,それにより主自己溶解酵素を含む少なくと も3つの自己溶解酵素遺伝子(lytC, lytD, lytF)の転 写を著しく低下させる^{93,94)}.それとともにhagの転写や 運動性の遺伝子群の転写が減少し,変異株は細胞分離部 位で切断されず,繊維状化し,運動性も欠失する.

表2. 枯草菌,ブドウ球菌における細胞壁代謝,脂肪酸代謝,ビルレンスに関与する WalKR (YycGF)依存性遺伝子

				枯草菌	ブドウ球菌			
	遺伝子	WalR による 制御 形式#	直接 制御	機能	遺伝子	WalR による 制御 形式#	直接 制御	機能
細胞壁代謝	yocH	+	Yes	細胞壁溶解酵素	altA	+	ND	細胞壁アミダーゼ、グルコサミニダーゼ
	lytE (cwlF)	+	Yes	細胞壁 D, L-エンドペプチダーゼ	lytM	+	Yes	細胞壁 Gly-Gly エンドペプチダーゼ
	cwlO (yvcE)) +	Yes	細胞壁 D, L-エンドペプチダーゼ	isaA	+	Yes	細胞壁トランスグリコシダーゼ
	tagAB	-	Yes	タイコ酸合成酵素	sceD	+	ND	細胞壁トランスグリコシダーゼ
	tagDEF	-	Yes	タイコ酸合成酵素	ssaA	+	Yes	細胞壁アミダーゼ
	pdaA(yjeA)	-	Yes	ペプチドグリカン脱アセチル化酵素	SA0620	+	ND	細胞壁アミダーゼ
	IseA (yoeB)	-	Yes	自己溶解酵素阻害タンパク質	SA2097	+	ND	細胞壁アミダーゼ
	ykvT	ND	Yes	細胞壁溶解酵素パラログ	SA2353	+	ND	細胞壁アミダーゼ
	ydjM	+	Yes	細胞壁関連タンパク質	SA0710	+	ND	細胞壁アミダーゼ
脂肪酸代謝	des	-	No	脂肪酸不飽和化酵素				
ビルレンス					ebpS	+	ND	エラスチン結合タンパク質
					sdrD	+	ND	フィブリノーゲン結合タンパク質

#:+, ポジティブ制御:-, ネガティブ制御 ND, 未決定 Mol. Microbiol., **70**, 1307-1322の表1を改変して掲載

*degSU*遺伝子は、1970年初頭筆者が在籍した大阪大学 岡田弘輔教授の研究室のグループ、東京大学丸尾文治教 授の研究室のグループ、パスツール研のR. Dedonder 教 授の研究室のグループの3グループがアミラーゼ、プロ テアーゼ、レバンシュクラーゼ生産に関わる変異遺伝子 として、それぞれ*amyB、pap、sacUh*と名付けていた 遺伝子であった⁹⁵⁻⁹⁷⁾.

細胞増殖に必須の2成分制御系は枯草菌では唯一つ WalKR (YycGF) が知られている⁷⁵⁾. この2成分系は細 胞壁溶解酵素 YocH⁹⁸⁾, LytE (CwlF)⁶⁷⁾, CwlO (YvcE)^{51,76)}, YkvT (リティックトランスグリコシダーゼのパラログ)⁵¹⁾. 細胞壁結合タンパク質YdjMの遺伝子を正に制御し、後 述するD,L-エンドペプチダーゼ阻害タンパク質IseA (YoeB)⁹⁹⁾、ペプチドグリカン脱アセチル化酵素PdaC (YjeA)⁴⁶⁾, タイコ酸生合成酵素 TagAB¹⁰⁰⁾, TagDEF¹⁰¹⁾, 脂肪酸不飽和化酵素Desの遺伝子¹⁰²⁾を負に制御する¹⁰³⁾ (表2). WalKRのホモログは*Staphylococcus aureus*に も存在し、細胞壁分解、脂質代謝以外にも病原性と関係 していることは興味深い. また細胞壁溶解酵素群と細胞 壁の溶解を防止する IseA, PdaC, TagAB, TagDEF が逆 の制御になっているのは注目に値する. なお、前述した がLytE, CwlOは同時に両方を欠失すると細胞増殖がで きなくなる合成致死遺伝子産物である⁷⁵⁾. YocHはザイ モグラフィーで細胞壁溶解活性が有ると判定された酵素 であるが、精製した酵素でのペプチドグリカン分解性や 基質特異性の報告はない⁹⁸⁾.

YvrGHもまた2成分制御系の1つで⁹¹⁾,細胞壁結合プ ロテアーゼ遺伝子wprA,細胞壁結合タンパク質遺伝子 wapA,細胞壁タイコ酸などの成分であるD-アラニンの



図27. 2成分制御系YvrGHの欠損株と野生株が持つ表層タン パク質のSDS-PAGE. Iは未同定タンパク質. 1,分子量マー カー;2,野生株の表層タンパク質;3,YvrGH欠損株の表層 タンパク質. ▶,YvrGH欠損で影響を受けた表層タンパク質.

合成に関与するdltオペロンを正に制御し、lytCオペロ ンを負に調節していた¹⁰⁴⁾(図27).またECFシグマ因 子である σ^{x} はyvrGH制御系で正に調節されていた.そ れゆえ YvrGHは栄養増殖時の細胞表層全体の恒常性を 維持するのに必要なものと考えている¹⁰⁴⁾.

HTHモチーフを持つ制御タンパク質SinRは、多コピー で胞子形成を阻害するタンパク質としてクローン化され た¹⁰⁵⁾. さらにこの遺伝子変異はプレオトロピックな性 質を示し¹⁰⁶⁾, とくに*sinR*変異株である*sin*(*flaD1*)変 異は*sigD*の転写を劇的に低下させ、自己溶解酵素群の 低下を示した^{87,107,108)}. この*sin*(*flaD1*)遺伝子は、1988 年筆者らにより自己溶解酵素と鞭毛形成に関わる遺伝子 としてクローニングしたものであったが、塩基配列決定 した結果*sinR*と同一の遺伝子であった^{107,109}.

細胞壁溶解酵素遺伝子は,数種の2成分制御系やHTH 転写制御因子で多重に制御されていることになり,この 理由として不完全な制御下ではこれらの酵素は自殺酵素 となってしまうため厳格に制御されていると考えている.

細胞壁溶解酵素の応用的展開

細胞壁結合ドメインを用いた表層工学への応用 細 胞壁結合ドメインとの融合タンパク質を構築し、人工的 に細菌細胞の表層に局在させる方法は、非共有結合によ る結合のため、高い塩濃度で細胞表層から遊離させるこ とができるという特徴を持つ¹¹⁰⁾. そこで栄養細胞時に 発現する細胞壁溶解酵素の細胞壁結合ドメインを比較す ると、細胞分離個所と両極に局在するLvsMドメインタ イプの酵素 (LytE, LytF) と、細胞表層全体に局在す るLytCタイプがあり、表層に多量に局在させるために は、LytCの細胞壁局在ドメインが適していると考えら れる(図28). そこで細胞壁結合ドメイン遺伝子を持つ 大腸菌・枯草菌のシャトルプラスミドに枯草菌のリパー ゼB遺伝子を挿入し(図29),大腸菌を経由して枯草菌 で発現させた。その細胞から高塩溶液で表層タンパク質 を遊離させ(Extract A),トリオレインとローダミンB を含む寒天のウエルに加え、インキュベートすると、 UV 照射条件下でオレンジ~赤の蛍光を発し、リパーゼ 活性を示すことが解った(図30). 遊離した酵素溶液の 塩濃度を下げ、次に細胞壁を加えて再結合させ、再度高 い塩濃度で抽出した溶液(Extract B)もまたリパーゼ 活性を示した¹¹¹⁾(図30).この結果は枯草菌の栄養細胞 表層に酵素タンパク質を人工局在させた初めての例と なった.次に表層に融合タンパク質を多量に安定に局在 させるにはプロテアーゼ欠損株が有効と考えられたた め、細胞壁結合性のプロテアーゼである WprAの欠損株 と、プレオトロピック効果を示すSigD変異株を使って 検討したところ,これらの遺伝子の同時欠失株(WASD) では表層蓄積量が顕著に増加していた¹¹²⁾.続いて麹カ ビのリパーゼ (クチナーゼ) である CutL¹¹³⁾を細胞壁結 合ドメインに融合させた場合,野生株に比べてWASD 株では表層局在量が顕著に増加した、この理由として異 種遺伝子産物であるCutLは同種の分泌タンパク質と比 べてプロテアーゼ感受性が高いため、野生株では分解さ れたものと考えられる114).油脂分解においては、長鎖 脂肪酸エステル、短鎖脂肪酸エステルなど異なる分子量 の脂肪酸エステルの混合物からできているのが一般的で ある. そこで上で示したCutL融合リパーゼ(短鎖脂肪 酸エステル分解能)以外に、細胞壁溶解酵素CwlCの細 胞壁結合ドメインに枯草菌LipBリパーゼ(長鎖から中 鎖の脂肪酸に比較的高い分解能)を融合させたタンパク 質を枯草菌細胞表層に同時発現させた. WASD株を宿 主に使った場合,両リパーゼ融合タンパク質とも細胞表



図28. 主自己溶解酵素LytC (CwlB)のドメイン構造と表層局在



図29. LytC (CwlB)の細胞壁結合ドメインと枯草菌リパー ゼLipBとの融合タンパク質の構築. pHCB3RLBは大腸菌, 枯草菌間のシャトルベクターである.



図30. pHCB3RLBを持つ枯草菌表層タンパク質のリパーゼ活性. 細胞より高濃度LiClで抽出し(Extract A), リパーゼ活性測定 ゲルのウエルに加え,活性を判定した.さらにExtract Aに細胞 壁を加えて再結合させ,再度LiClで抽出したサンプルが Extract Bである.写真で白く見える部分がリパーゼ活性に対応す る.pHY300PLK,コントロールシャトルプラスミド;pHCB3R, LytCの細胞壁結合ドメインのみを含むpHY300PLK; pHCB3RLB, LipBを含むpHCB3R.

層に局在し(図31),液体培養において生細胞をそのま ま用いたリパーゼ活性においても、もっとも高いリパー ゼ活性を示した¹¹⁵⁾(図32).この結果を模式的に表した のが図33である.これらの結果より、複数タンパク質



図31. リパーゼ - 細胞壁結合ドメイン融合プラスミドを持つ 枯草菌の表層タンパク質のSDS-PAGE. ◀,インタクトな酵素; <>...,プロテアーゼ分解を受けた酵素.



図 32. 2種類のリパーゼ - 細胞壁結合ドメイン融合タンパク質 を表層に持つ枯草菌のリパーゼ分解性. 宿主はWASD (*wprA sigD*) 株を用いた. 白色の記号はA₆₀₀. 灰色の記号は活性を 示す. □, I, pHY300PLK; \diamondsuit , \diamondsuit , pHYLBCC(*lipB-CWBcwlC*); \bigcirc , o, pHCB3RCL (*CWBlytC-cutL*); \triangle , o, pHLBC-BCL (*lipB-CWBcwlC*-*CWBlytC-cutL*); \bigtriangledown , \bigtriangledown , pHLBC-BCL (*lipB-CWBcwlC*). *CWBcwlC*, *CWBlytC*-とは細胞壁結合ドメインの 種類がそれぞれCwlC, LytC由来であることを示し、pHLBC-BCL と pHBCL-LBCではプロモーター下流に連結された遺伝子の 順番が逆で, 括弧内の左がプロモータに近いことを表している.



図33. 細胞表層工学による油脂分解の模式図

を枯草菌細胞表層に局在させ、表層工学として用いる基 礎的知見が確立できたと考えている。

分泌プロテアーゼ多重変異株と細胞壁溶解酵素枯 草菌には分泌性プロテアーゼとしてAprE,Bpr,Epr, MprB,NprB,NprE,Vpr,WprAの8種類が知られて いるが,そのうち主プロテアーゼはAprEである^{37,116} (図34).一方細胞壁結合性プロテアーゼWprAはEpr とともに細胞壁結合タンパク質の分解に大きな影響を与 える^{37,73)}.プロテアーゼのザイモグラフィーからいくつ かの枯草菌プロテアーゼ変異株のプロテアーゼ生産のザイ モグラフィーを図35に示した. 培養50時間目の定常期 に著しいプロテアーゼ生産が認められる. そこで上述の 8つのプロテアーゼ遺伝子を欠損したDpr8株を構築し たところ, 75時間目のサンプルでは大部分のバンドは 消失したが, 一つのプロテアーゼ活性を示すバンドは消 失しなかった. すべての分泌性プロテアーゼ遺伝子を削 除したはずにもかかわらずこのようにバンドが見られ, このバンドはまた野生株の75時間目のサンプルでも認 められたが,50時間目のサンプルでは認められなかった. このことより細胞溶解により細胞内のプロテアーゼが溶 出したと考え, 細胞内の主プロテアーゼである AprXを



図34. 枯草菌における異種タンパク質生産と分泌プロテアー ゼによる分解の模式図. 8種類の分泌プロテアーゼと細胞壁溶 解酵素,分泌システムに関わるタンパク質が記載されている. ●が異種タンパク質を示す.

破壊したところ,そのバンドが消失したことより細胞内 AprXが定常期後期の溶菌に伴い漏出したものと考えら れた(図35).そこでDpr8からさらにAprXを欠損した Dpr8AX(KA8AX)株を構築した.この株はDpr8株 よりさらに安定にアミラーゼ-PreS2融合タンパク質を 生産することができた(図36).このように異種タンパ ク質を分泌生産させるときには、培養液中の少量のプロ テアーゼの存在も無視できないことを示している¹¹⁷⁾.

プロテアーゼ生産が低下した株に*spoOA*変異株が知られている.この変異株において8つの分泌性プロテ アーゼ遺伝子の転写を測定したところ,すべての遺伝子 において著しく転写が低下していた¹¹⁸⁾(図37).プロテ アーゼ活性の低下した株は,特に異種タンパク質の生産 に都合がよい宿主となると考えられたが,培養してみる と図38で示すように培養40時間目から著しい溶菌が認 められ,Dpr8もまた溶菌を示した.それら35時間培養 細胞の細胞壁溶解活性をザイモグラフィーで解析したと



図36. 枯草菌分泌プロテアーゼ多重変異株に於けるPreS2抗 原- α -アミラーゼ融合タンパク質の生産. HBV ウイルスのPreS2 抗原を α -アミラーゼのN末端ペプチドと融合し、枯草菌で生産 させた. A, SDS-PAGE; B, 融合タンパク質の生産量. Dpr7, AprE以外の7重分泌プロテアーゼ欠損株; Dpr8, 8重プロテアー ゼ欠損株; KA8AX, 8重欠損にさらにAprXを欠損した変異株.

ころ,野生株と比べて著しい溶解酵素の存在を認めた (図38).そこで細胞溶解を防止するため,いくつかの 細胞壁溶解酵素遺伝子を転写するシグマD因子の破壊株, 主自己溶解酵素LytC破壊株などを構築した¹¹⁸⁾.その結 果シグマD破壊株もかなりの溶菌を防止することができ たが,LytC破壊株の効果が顕著で,野生株と変わらな い増殖を示した(図39).このように枯草菌ではLytCの 破壊が最も有効であったが,微生物全般においてタンパ ク質の分泌生産を行う場合には,プロテアーゼとともに



図35.8種類の分泌プロテアーゼ遺伝子多重欠損株と細胞内プロテアーゼAprX欠損株のプロテアーゼザイモグラム.168,野生株; Dpr8,8重プロテアーゼ欠損株;AprXdd,AprX欠損株;Dp8AX,Dpr8株からさらにAprXを欠損させた株.



図37. 野生株, spoOA変異株における8種類の分泌プロテアー ゼ遺伝子のノーザン解析. 矢印が分解を受けない場合の転写 サイズを示す.



図38. spoOA変異株,8重分泌プロテアーゼ欠損株の培養経過と細胞壁溶解酵素のザイモグラム、矢印は培養35時間目を示す.

細胞壁溶解酵素についても検討する必要があることを示 している.これらの結果と、さらに発展させた溶菌阻止 の技術は以下の総説にまとめている¹¹⁹⁻¹²¹.

コリスチン生産菌,納豆菌と細胞壁溶解酵素遺伝子 Paenibacillus (Bacillus) polymyxa var. colistinus は抗生 物質コリスチンを生産する微生物であるが、生産期に顕 著な溶菌が生じる。そこでオートリシン (CwIV) を精 製したところ、それまで知られていたアルカリ側に活性 を持つL-アラニンアミダーゼとは異なり、pH 4付近で 最適pHを示すユニークなオートリシンであった¹²²⁾.さ らにcwlV, cwlUのアミダーゼ遺伝子をクローニングし、



図39. spoOA変異株の自己溶解に関わる細胞壁溶解酵素とシ グマD変異の効果. 矢印の75時間目のサンプルをSDS-PAGE で解析した. SecAは細胞内タンパク質のコントロールとして 用いた.

活性を示すことを報告した¹²³⁾. このCwlV, CwlUは CwlCと同じくLytCアミダーゼ型のオートリシンで, 2 つのグルタミン酸残基が活性発現に必須で, さらに亜鉛 を要求する酵素であった¹²⁴⁾.

B. subtilis (natto)は枯草菌に属する微生物であるが, 広く納豆生産に用いられているため納豆菌といわれてい る.納豆製造においては,出荷時の胞子が発芽により栄 養細胞に移行する過程で異臭を生じ品質低下につながる ため,発芽欠損株の必要性が生まれた.そこで枯草菌で 知られている胞子発芽関連遺伝子 (pdaA, sleB, cwlD) の単独および多重変異株を納豆菌NANF5で構築し,発 芽率を調べた結果, sleB, cwlDの2重破壊株が10⁻⁸ま で発芽率を低下させることができた¹²⁵.

 γ -ポリグルタミン酸を加水分解する酵素にYwtDが知られている.このタンパク質のアミノ酸配列はLytE, LytF, CwlO, CwlSと類似しており, D,L-エンドペプチ ダーゼ2族に分類されるが, YwtDは細胞壁分解酵素活 性を示さない.最近の筆者らの研究でLytE, LytF, CwlO, CwlSとも γ -ポリグルタミン酸分解活性を示した (未発表).そこで γ -ポリグルタミン酸を高生産させるた めに納豆菌の*lytE*, *lytF*, *cwlO*, *cwlS*, *ywtD*遺伝子を破 壊することを試みた.ここでggtとは γ -グルタミルトラ ンスフェラーゼ遺伝子のことである.その結果*cwlO*遺 伝子破壊株がもっとも高い生産性を示すとともに, γ -ポ リグルタミン酸の分子量も増加していることが解った¹²⁶.

細胞壁溶解酵素阻害タンパク質の発見と立体構造解析

表層結合タンパク質のプロテオーム解析より、YoeB (IseA) タンパク質がかなりの量存在することを認めた³⁷⁾.

YoeB (IseA) は181アミノ酸残基からなるポリペプチ ドで、シグナル配列と想定される23アミノ酸残基を含 んでいる.このタンパク質にFLAG配列を融合し、枯 草菌での局在を調べたところ, LytF, LytE, CwlSのい わゆる細胞分離酵素と同じ局在を認めた(図40).そこ でIseAが直接D.L-エンドペプチダーゼと相互作用し. 阻害を示すかどうか調べたところ、2倍量のモル比の IseA を加えた場合にはLytFとともにCwlS, LytE, CwlO の活性も完全に阻害された(図41). In vivoでIseAを高 発現した場合には、細胞分離の酵素が阻害され細胞は本 来の短桿状から繊維状に形態変化を起こした(図42). ただし、膜染色剤であるFM464で染色した場合は、セ プタムが正常に形成されており、細胞分裂は正常である が、細胞分離ができない表現型であった、この結果は LytF, LytE, CwlSの3重欠損株の表現型と類似し, 3 種とも IseA で阻害されていることを示している⁹⁹⁾.

筆者らは最近IseAタンパク質の立体構造をNMRに より決定した¹²⁷⁾.3つのヘリックスと8つのβ-ストラン ドからなる、いわゆる弓のこの構造を示した.この新奇 な構造において、阻害活性を示すアミノ酸残基はのこぎ り(弦)の部分に局在していた(図43).次にLytFの3 次構造モデルを使いIseAとの結合を推測したところ、 のこぎり(弦)の部分がLytFの触媒活性部位の溝に フィットしていた(図44).さらにIseAの結合部分付近 は酸性アミノ酸が多く、LytFの結合部位は塩基性アミ ノ酸が多いため、これらの相互作用により、CwlFと IseAが安定な阻害複合体を形成しているものと考えら れる¹²⁷⁾.

胞子形成の母細胞の溶解に関わるCwlCはN-末端に 触媒活性を示すアミダーゼドメイン, C-末端に2回の繰



前述したコリスチン生産菌 Paenibacillus (Bacillus) polymyxaのCwlVの触媒活性ドメイン (アミダーゼ)



図41. 精製 IseA による D, L-エンドペプチダーゼ活性阻害. 横軸は反応時間を示す. LytF, CwlS, LytE, CwlO はすべて D, L-エンドペプチダーゼ2族に属する. A:LytF:IseAのモル比を1:0, 1:1, 1:2で加えて測定; B:溶解酵素:IseAのモル比を1:0, 1:2 で加えて測定した.



Bars = $2\mu m$

図40. 枯草菌 IseA タンパク質の表層局在. IseA(YoeB)-3xFLAG を枯草菌で発現させ、FLAG 抗体、FITC-コンジュゲート2次 抗体を用い,免疫蛍光顕微鏡で観察した. A,光学顕微鏡像;B, 免疫蛍光顕微鏡像.



図42. IseA高発現プラスミド導入による枯草菌の細胞形態の 変化. *iseA*遺伝子はIPTG制御下にあり、IPTG +, -の条件下 で増殖させた細胞を位相差顕微鏡で撮影.





図45. X線構造解析によるCwlV細胞壁溶解L-アラニンアミダー ゼの立体構造 (ステレオ図). 球は亜鉛原子を示す.

図43. NMRによるIseAの立体構造. リボンモデルで描画. 右上の四角内にはIseAのバックボーンのトレイス像を示す.



図44. IseAとLytFの触媒ドメインとのドッキングシミレーション. A:リボンモデルで示す. 赤, IseA;水色, LytF触媒ドメイン. B:右側の灰色の構造はIseAの構造をリボンモデルで表し, 阻害活性に関わる残基をピンク色で示した. 左のLytFの触媒ドメイン 構造では, 青色は塩基性表面, 赤色が酸性表面を示す.

のX線による立体構造を,名古屋大学の山根 隆研究室 との共同研究で決定した(図45).6つのα-ヘリックス と6つのβ-シートからなり,亜鉛が触媒部位に存在して いた(MMDB ID: 25214; PDB ID: 1JWQ).

まとめ

現在では細菌細胞壁溶解酵素遺伝子数はFirmicutesに 属する胞子形成細菌では約30遺伝子,胞子非形成細菌 でも10-20遺伝子程度は持っている¹²⁹⁾.これらの酵素 は種々の微生物において多様な役割を果たし、今では多 くのレビューでも取り上げられており,筆者らもいくつ かの総説にまとめている^{5,30,51,130)}.図13には枯草菌にお ける細胞壁溶解酵素遺伝子の役割を図式している.表3 に枯草菌の細胞壁溶解酵素群の種類と名称(候補遺伝子 産物も含む)を示す.このなかで半数ほどの細胞壁溶解 酵素遺伝子を筆者らの研究室が最初に報告した.解析も 多岐にわたり,初期の細胞壁溶解酵素遺伝子クローニン グから始まり,枯草菌全塩基配列決定後は逆遺伝学的手 法を取り入れ,さらに転写制御としてシグマ因子,2成 分制御系,HTH制御因子からの解析,細胞の胞子形成・

表3. 枯草菌の細胞壁溶解酵素及びパラログ

種類	アミノ酸 残基数	遺伝子領域/機能/アミノ酸配列類似性
<i>N</i> -アセチルムラモイル-L-	アラニンアミダ	ーゼ(アミダーゼ)
CwlA族		
CwlA	272	Skin element 領域
CwlH (YqeE)	250	母細胞溶解
XlyA	297	PBSXファージ
XlyB	317	PBSXファージ
BlyA (YomC)	367	SPβファージ
LvtC族		
LvtC (CwlB)	496	主自己溶解酵素;細胞壁代謝、母細胞溶解、コールドショック溶解
CwlC	255	田田市 (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)
CwlD	233	コルテックス生合成
SpollP	401	- アノノノンエロペ 胞子エンガルフメントの完成 エンドペプチダーゼ活性有り
VrvI	518	機能表知
Vail	206	機能未知
	200	1及 把 不 为1
SleB族	205	
SleB	305	胞子発芽
CwlJ	142	胞子発芽
YkvT	208	機能未知
エンド <i>-N</i> -アセチルグルコ	サミニダーゼ	
LytD族		
LytD (CwlG)	880	自己溶解酵素,運動性
LutC佐		
Lyte (Yehr)	282	百丁次姆逊圭 如收八列 浑動州
Lyig (Yude)	282	日乚祒胜辟系,和旭刀农,連期性
SleL族(Bacillus cereu	s CFLE)	
YaaH	427	胞子発芽
YdhD	439	胞子内タンパク質
エンド <i>-N</i> -アセチルムラミ	ダーゼ	
CwlT-N (YddH-N)	329	CwlT のN末端領域;マイトマイシンC誘導;ICEBs1 領域
エンド-N-アヤチルムラミ	ダーゼ&リティ	ィックトランスグリコシダーゼ
CwlO (YihI)	181	2機能醛素
	シターセ	C ID a t t 左 t t OPa t · · · · ·
CwIP-M (YomI-M)	2285	CwlPの中央領域;SPβファーシ
エンドペプチダーゼ		
リソスタフィン族(D, D	-エンドペプチタ	ブーゼ)
SpoIIQ	283	胞子エンガルフメントの完成
CwlP-C	2285	CwlPのC-末端領域;SPβファージ
L D-エンドペプチダー+	ž族	
LytH (YunA)	349	胞子フォアスポア―形成
	···· · · ·	
L, D-エンドペブチダーセ	2族(Listeria m	onocytogenes phage AcpA)
CwlK (YcdD)	167	宋香粬胞増殖時期
D, L-エンドペプチダーt	ヹ1族(<i>Bacillus</i>	sphaericus エンドペプチダーゼ1)
YqgT	376	Bacillus sphaericus エンドペプチダーゼ1のオルソログ
n ェ-エンドペプチダー Ⴕ	デ 2 佐	
LytF (CwlE)	488	細胞分離
LytE (CwlE)	334	細胞分離 細胞増殖
CwlS (Voil)	<u>41</u> 1	1997年, 1997年, 1997年 細的分離
$C_{WIO}(10JL)$ $C_{WIO}(V_{VOE})$	172	muneのme
D_{adS} (V+D)	4/3	州市市市
rgus(IWU)	415	小リフルクミメ 欧加小刀肝時糸 CwlT のC 主要領域・マイトマイシンC 秝道・ICE Del 역球
VI-C (Y ddH-C)	329	しWII のし不価限域,メイトメインノし誘导,IUEBSI 視域 ペプチドゲリカンの仕掛同転・购了平式比明の発現
IKIU	∠90	ハノノドクリカイの1、副転,旭丁形成時期の第現

発芽に必要な細胞壁溶解酵素,栄養細胞増殖や細胞形態, 細胞分離に必要な細胞壁溶解酵素、修飾酵素群の役割と タンパク質ドメインの解析、細胞壁溶解酵素を阻害する タンパク質の発見とその立体構造,細胞壁溶解酵素の基 質特異性の解析を行った. そして枯草菌で発見した知見 が、今ではそれが礎となり、世界中で多様な微生物を用 いて研究が進められている. 今後は一層多様な微生物で の研究が進むと思われるが、とりわけ病原性と関連する 細胞壁溶解酵素や細胞伸長のメカニズムをはじめとした 増殖の根幹に関わるメカニズム解析、細胞壁の非ペプチ ドグリカン成分の役割、接合伝達などにおける細胞壁の 部分分解などが研究の焦点になるのであろう.一方ここ で示した細胞壁溶解酵素遺伝子破壊や,多重プロテアー ゼ遺伝子破壊を通じた細胞の自己溶解の防止と分泌タン パク質の高生産は、細胞外にタンパク質を分泌し、蓄積 させる基本技術でもある.非共有結合で細胞表層を人工 的に操作する方法は共有結合に比べて実施例が乏しい が、逆に細胞表層タンパク質に結合した物質を簡単に結 合タンパクごと遊離させることができるため、 有害物質 の除去にも利用可能で、環境分野での利用が期待できる.

ここで紹介した研究は, 熊本工業大学(現崇城大学)時代 から始まり、信州大学での26年間の研究が基になっている. 枯草菌全ゲノム塩基配列決定と機能解析に関し、お世話いた だいた奈良先端科学技術大学院大学小笠原直毅教授、元筑波 大学の山根國男教授、福山大学藤田泰太郎教授および枯草菌 ゲノム研究の共同研究者であるEU,国内の多数の研究者の皆 様. 熊本工業大学(現崇城大学)時代に同研究室で協力戴い た崇城大学の赤松 隆教授,元信州大学繊維学部細胞工学講 座の教員で、現広島大学の黒田章夫教授、現信州大学の志田 敏夫教授,山本博規准教授,当時遺伝子実験部門におられた 福島達也博士と若手研究者育成拠点の橋本昌征博士、現応用 生物学系の新井亮一博士、そして本研究に協力戴いた多数の 卒業生諸君に深く感謝の意を表します. また海外共同研究者と してSheffield大学S. J. Foster教授, Greifswald Ernst-Moritz-Arndt大学のM. Hecker 教授とH. Antelmann博士, さらに研 究の競争相手でもあり、後には情報交換でお世話になった Lausanne大学のD. Karamata教授に深謝致します. 一方プロ テアーゼ欠損株の解析など応用に関する研究は花王(株)か ら出向された児玉武子博士と栃木研究所の研究員の皆様、納 豆菌の研究では旭松食品(株)の三ツ井陳雄博士、細胞表層 工学では長野県食品工業試験場の戸井田仁一博士, コリスチ ン生産菌の自己溶解酵素の研究では旭化成(株)の河原伸二 研究員に深謝致します.本研究の基礎分野は主として科学研 究費補助金、応用分野は経済産業省・NEDOのサポートを受 けて実施したものであり、ここに謝意を表します.

文 献

- 1) 鶴 大典:溶菌酵素(船津 勝, 鶴 大典編), p. 1-13, 講談社 (1977).
- 2) Mitchell, P. and Moyle, J.: J. Gen. Microbiol., 16, 184-

194 (1957).

- Herbold, D. and Glaser, L.: J. Biol. Chem., 250, 1676– 1682 (1975).
- 4) Young, R.: Microbiol. Rev., 56, 430-481 (1992).
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S.: *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 259–286 (2008).
- 6) Priest, F. G.: *Bacillus* (Harwood, C. R., ed.), p. 293–320, Prenum Publishing (1989).
- Ashiuchi, M. and Misono, H.: Biochem. Biophy. Res. Commun., 263, 6–12 (1999).
- Kuroda, A. and Sekiguchi, J.: J. Gen. Microbiol., 136, 2209–2216 (1990).
- Kuroda, A., Imazeki, M., and Sekiguchi, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 81, 9–14 (1991).
- Kuroda, A. and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 173, 7304– 7312 (1991).
- Kuroda, A., Rashid, M. H., and Sekiguchi, J.: J. Gen. Microbiol., 138, 1067–1076 (1992).
- 12) Kuroda, A. and Sekiguchi J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **95**, 109–114 (1992).
- 13) Lazarevic, V., Margot, P., Soldo, B., and Karamata, D.: *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 1949–1961 (1992).
- Margot, P. and Karamata, D.: Mol. Gen. Genet., 232, 359–366 (1992).
- 15) Yamanaka, K., Araki, J., Takano, M., and Sekiguchi, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **150**, 269–275 (1997).
- Kuroda, A., Sugimoto, Y., Funahashi, T., and Sekiguchi, J.: *Mol. Gen. Genet.*, 234, 129–137 (1992).
- 17) Oda, Y., Nakayama, R., Kuroda, A., and Sekiguchi, J.: *Mol. Gen. Genet.*, **241**, 380–388 (1993).
- 18) Kyogoku, K. and Sekiguchi, J.: *Gene*, **168**, 61–65 (1996).
- 19) Longchamp, P. F., Mauël, C., and Karamata, D.: *Microbiology*, **140**, 1855–1867 (1994).
- Margot, P., Mauël, C., and Karamata, D.: *Mol. Microbiol.*, 12, 535–545 (1994).
- Rashid, M. H., Mori, M., and Sekiguchi, J.: *Microbiology*, 141, 2391–2404 (1995).
- 22) Rashid, M. H., Kuroda, A. and Sekiguchi, J.: FEMS Microbiol. Lett., 112, 135–140 (1993).
- Rashid, M. H., Sato, N., and Sekiguchi, J.: FEMS Microbiol. Lett., 132, 131–137 (1995).
- 24) Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., and Danchin, A., *et al.*: *Nature*, **390**, 249–256 (1997).
- 25) Yamamoto, H., Uchiyama, S., and Sekiguchi, J.: DNA Res., 3, 257–262 (1996).
- 26) Yamamoto, H., Uchiyama, S., and Sekiguchi, J.: *Microbiology*, **142**, 3057–3065 (1996).
- Yamamoto, H., Uchiyama, S., and Sekiguchi, J.: *Gene*, 181, 147–151 (1996).
- 28) Yamamoto, H., Uchiyama, S., Nugroho, F. A., and Sekiguchi, J.: *Microbiology*, **143**, 1317–1320 (1997).
- 29) Yamamoto, H., Uchiyama, S., Nugroho, F. A., and Sekiguchi, J.: *Gene*, **194**, 191–199 (1997).
- 30) 関口順一: J. Antibact. Antifung. Agents, 27, 19-32 (1999).
- 31) 小笠原直毅, 定家義人, 藤田昌也, 吉田健一, 藤田泰

太郎, 吉川博文, 三輪泰彦, 山本博規, 関口順一, 熊 野みゆき, 山根國男, 村田麻喜子, 大木玲子: 蛋白質 核酸 酵素, **44**, 1449–1459 (1999).

- 32) 佐藤 勉,七宮英晃,大橋由明,河村富士夫,高松宏治, 児玉武子,渡部一仁,石川 周,関口順一:蛋白質 核酸 酵素,44,1460–1466 (1999).
- 33) 関口順一,山本博規:生物工学,77,399-402 (1999).
- 34) Sekiguchi, J., Fukushima, T., and Ishikawa, S.: Functional Analysis of Bacterial Genes: A Practical Manual (Schumann, W., Ehrlich, S. D., and Ogasawara, N., eds.), p. 211–213, John Wiley & Sons (2001).
- 35) 関口順一,小笠原直毅:ゲノミクス・プロテオミクスの新展開―生物情報の解析と応用―(今中忠行監修), p. 78-87, エヌ・ティー・エス (2004).
- 36) 関口順一,小笠原直毅:ゲノミクス・プロテオミクスの 新展開―生物情報の解析と応用―(今中忠行監修),p. 773-777,エヌ・ティー・エス (2004).
- 37) Antelmann, H., Yamamoto, H., Sekiguchi, J., and Hecker, M.: *Proteomics*, 2, 591–602 (2002).
- 38) Stragier, P. and Losick, R.: Mol. Microbiol., 4, 1801– 1806 (1990).
- 39) Sekiguchi, J., Akeo, K., Yamamoto, H., Khasanov, F. K., Alonso, J. C., and Kuroda, A.: *J. Bacteriol.*, 177, 5582– 5589 (1995).
- 40) Popham, D. L., Helin, J., Costello, C. E., and Setlow, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15405–15440 (1996).
- 41) Atrih, A., Zöllner, P., Allmaier, G., and Foster, S. J.: *J. Bacteriol.*, **178**, 6173–6183 (1996).
- 42) Fukushima, T., Yamamoto, H., Atrih, A., Foster, S. J., and Sekiguchi, J.: *J. Bacteriol.*, **184**, 6007–6015 (2002).
- Fukushima, T., Kitajima, T., and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 187, 1287–1292 (2005).
- Vollmer, W. and Tomasz, A.: J. Biol. Chem., 275, 20496
 –20501 (2000).
- Fukushima, T., Tanabe, T., Yamamoto, H., Hosoya, S., Sato, T., Yoshikawa, H., and Sekiguchi, J.: *J. Biochemistry* (Tokyo), **136**, 283–291 (2004).
- Kobayashi, K., Sudiarta, I. P., Kodama, T., Fukushima, T., Ara, K., Ozaki, K., and Sekiguchi, J.: *J. Biol. Chem.*, 287, 9765–9776 (2012).
- 47) Chastanet, A. and Losick, R.: *Mol. Microbiol.*, 64, 139– 152 (2007).
- 48) Morlot, C., Uehara, T., Marquis, K. A., Bernhardt, T. G., and Rudner, D. Z.: *Genes Dev.*, 24, 411–422 (2010).
- Gutierrez, J., Smith, R., and Pogliano, K.: *J. Bacteriol.*, 192, 3174–3186 (2010).
- Sun, Y. L., Sharp, M. D., and Pogliano, K.: J. Bacteriol., 182, 2919–2927 (2000).
- 51) Sekiguchi J. and Yamamoto, H.: Escherichia coli and Bacillus subtilis: the frontiers of molecular microbiology revisited (Matsumoto, K. and Sadaie, Y., eds.), p.115– 148, Research Signpost (2012).
- 52) Driks, A.: Bacillus subtilis and Its Closest Relatives (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds.), p.527–535, ASM Press (2002).
- Nugroho, F. A., Yamamoto, H., Kobayashi, Y., and Sekiguchi, J.: *J. Bacteriol.*, 181, 6230–6237 (1999).
- 54) Kuroda, A., Asami, Y., and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 175, 6260–6268 (1993).
- Smith, T. J. and Foster, S. J.: J. Bacteriol., 177, 3855– 3862 (1995).

- 56) Lewis, K.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 503–514 (2000).
- 57) Moriyama, R., Kudoh, S., Miyata, S., Nonobe, S., Hattori, A., and Makino, S.: *J. Bacteriol.*, **178**, 5330–5332 (1996).
- 58) Moriyama, R., Hattori, A., Miyata, S., Kudoh, S., and Makino, S.: J. Bacteriol., 178, 6059–6063 (1996).
- 59) Botland, F. M., Atrih, A., Chirakkal, H., Foster, S. J., and Moir, A.: *Microbiology*, **146**, 57–64 (2000).
- 60) Ishikawa, S., Yamane, K., and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 180, 1375–1380 (1998).
- 61) Paidhungat, M. and Setlow, P.: *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives* (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds.), p.537–548, ASM Press (2002).
- Chen, Y., Fukuoka, S., and Makino, S.: J. Bacteriol., 182, 1499–1506 (2000).
- 63) Kodama, T., Takamatsu, H., Asai, K., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Watabe, K.: *J. Biochem.*, **128**, 655– 663 (2000).
- 64) Kodama, T., Takamatsu, H., Asai, K., Ogasawara, N., Sadaie, Y., and Watabe, K.: J. Bacteriol., 181, 4584– 4591 (1999).
- 65) Horsburgh, G. J., Atrih, A., and Foster, S. J.: J. *Bacteriol.*, **185**, 3813–3820 (2003).
- 66) Horsburgh, G. J., Atrih, A., Williamson, M. P., and Foster, S. J.: *Biochemistry*, **42**, 257–264 (2003).
- Ishikawa, S., Hara, Y., Ohnishi, R., and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 180, 2549–2555 (1998).
- 68) Margot, P., Wahlen, M., Gholamhosenian, A., Piggot, P., and Karamata, D.: *J. Bacteriol.*, **180**, 749–752 (1998).
- Fukushima, T., Afkham, A., Kurosawa, S., Tanabe, T., Yamamoto, H., and Sekiguchi, J.: *J. Bacteriol.*, 188, 5541–5550 (2006).
- 70) Margot, P., Pagni, M., and Karamata, D.: *Microbiology*, 145, 57–65 (1999).
- 71) Ohnishi, R., Ishikawa, S., and Sekiguchi, J.: *J. Bacteriol.*, **181**, 3178–3184 (1999).
- 72) Helmann, J. D. and Moran, Jr., C. P.: *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives* (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds.), p.289–312, ASM Press (2002).
- 73) Yamamoto, H., Kurosawa, S., and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 185, 6666–6677 (2003).
- 74) Yamamoto, H., Miyake, Y., Hisaoka, M., Kurosawa, S., and Sekiguchi, J.: *Mol. Microbiol.*, **70**, 297–310 (2008).
- 75) Bisicchia, P., Noone, D., Lioliou, E., Howell, A., Quigley, S., Jensen, T., Jarmer, H., and Devine, K. M.: *Mol. Microbiol.*, 65, 180–200 (2007).
- 76) Yamaguchi, H., Furuhata, K., Fukushima, T., Yamamoto, H., and Sekiguchi, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 174–181 (2004).
- Hashimoto, M., Ooiwa, S., and Sekiguchi, J.: *J. Bacteriol.*, 194, 796–803 (2012).
- 78) Litzinger, S., Duckworth, A., Nitzsche, K., Risinger, C., Wittmann, V., and Mayer, C.: *J. Bacteriol.*, **192**, 3132– 3143 (2010).
- 79) Blackman, S. A., Smith, T. J., and Foster, S. J.: *Microbiology*, 144, 73–82 (1998).
- Fukushima, T., Yao, Y., Kitajima, T., Yamamoto, H., and Sekiguchi, J.: *Mol. Genet. Genomics*, **278**, 371–383 (2007).
- Schmidt, D. M. Z., Hubbard, B. K., and Gerlt, J. A.: *Biochemistry*, 40, 15707–15715 (2001).

- 82) Foster, S. J. and Popham, D. L.: *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives* (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds.), p.21–41, ASM Press (2002).
- Regamey, A. and Karamata, D.: *Microbiology*, 144, 885–893 (1998).
- 84) Sudiarta, I. P., Fukushima, T., and Sekiguchi, J.: J. Biol. Chem., 285, 41232–41243 (2010).
- Fukushima, T., Kitajima, T., Yamaguchi, H., Ouyang, Q., Furuhata, K., Yamamoto, H., Shida, T., and Sekiguchi, J.: J. Biol. Chem., 283, 11117–11125 (2008).
- Sudiarta, I. P., Fukushima, T., and Sekiguchi, J.: Biochem. Biophy. Res. Commun., 398, 606–612 (2010).
- Kuroda, A. and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 175, 795– 801 (1993).
- 88) Rashid, M. H., Tamakoshi, A., and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 178, 4861–4869 (1996).
- 89) Kunst, F., Msadek, T., and Rapoport, G.: *Regulation of Bacterial Differentiation* (Piggot, P. J., Moran, Jr., C. P., and Youngman, P., eds.), p.1–20, ASM Press (1994).
- 90) Serizawa, M., Yamamoto, H., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Sekiguchi, J.: *Gene*, 329, 125–136 (2004).
- 91) Perego, M. and Hoch, J. A.: *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives* (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds.), p.473–481, ASM Press (2002).
- 92) Msadek, T., Kunst, F., and Rapoport, G.: Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds.) p.729–745, ASM Press (1993).
- 93) Msadek, T., Kunst, F., Henner, D., Klier, A., Rapoport, G., and Dedonder, R.: *J. Bacteriol.*, **172**, 824–834 (1990).
- 94) Tokunaga, T., Rashid, M. H., Kuroda, A., and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 176, 5177–5180 (1994).
- Sekiguchi, J., Takada, N., and Okada, H.: *J. Bacteriol.*, 121, 688–694 (1975).
- 96) Yoneda, Y. and Maruo, B.: J. Bacteriol., 124, 48-54 (1975).
- 97) Steinmetz, M., Kunst, F., and Dedonder, R.: *Mol. Gen. Genet.*, 148, 281–285 (1976).
- 98) Shah, I. M. and Dworkin, J.: Mol. Microbiol., 75, 1232– 1243 (2010).
- 99) Yamamoto, H., Hashimoto, M., Higashitsuji, Y., Harada, H., Hariyama, N., Takahashi, L., Iwashita, T., Ooiwa, S., and Sekiguchi, J.: *Mol. Microbiol.*, **70**, 168–182 (2008).
- 100) Mauël, C., Young, M., Margot, P., and Karamata, D.: *Mol. Gen. Genet.*, **215**, 388–394 (1989).
- 101) Mauël, C., Young, M., Monsutti-Grecescu, A., Marriott, S. A., and Karamata, D.: *Microbiology*, **140**, 2279–2288 (1994).
- 102) Aguilar, P. S., Cronan, Jr., J. E., and de Mondoza, D.: J. Bacteriol., 180, 2194–2200 (1998).
- 103) Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K. M., and Msadek, T.: *Mol. Microbiol.*, **70**, 1307–1322 (2008).
- 104) Serizawa, M., Kodama, K., Yamamoto, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Sekiguchi, J.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 69, 2155–2169 (2005).
- 105) Gaur, N. K., Dubnau, E. and Smith, I.: J. Bacteriol., 168, 860–869 (1986).
- 106) Smith, I.: *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R.,

eds.) p.785-800, ASM Press (1993).

- 107) Sekiguchi, J., Ezaki, B., Kodama, K., and Akamatsu, T.: J. Gen. Microbiol., 134, 1611–1621 (1988).
- 108) Rashid, M. H. and Sekiguchi, J.: J. Bacteriol., 178, 6640–6643 (1996).
- 109) Sekiguchi, J., Ohsu, H., Kuroda, A., Moriyama, H. and Akamatsu, T.: J. Gen. Microbiol., 136, 1223–1230 (1990).
- 110) 関口順一: 生物工学, 76, 501-505 (1998).
- 111) Tsuchiya, A., Kobayashi, G., Yamamoto, H., and Sekiguchi, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **176**, 373–378 (1999).
- 112) Kobayashi, G., Toida, J., Akamatsu, T., Yamamoto, H., Shida, T., and Sekiguchi, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **188**, 165–169 (2000).
- 113) Ohnishi, K., Toida, J., Nakazawa, H., and Sekiguchi, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **126**, 145–150 (1995).
- 114) Kobayashi, G., Toida, J., Akamatsu, T., Yamamoto, H., Shida, T., and Sekiguchi, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 422– 425 (2000).
- 115) Kobayashi, G., Fujii, K., Serizawa, M., Yamamoto, H., and Sekiguchi, J.: J. Biosci. Bioeng., 93, 15–19 (2002).
- 116) He, X. -S., Shyu, Y. –T., Nathoo, S., Wong, S. –L., and Doi, R. H.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 646, 69–77 (1991).
- 117) Kodama, T., Endo, K., Sawada, K., Ara, K., Ozaki, K., Kakeshita, H., Yamane, K. and Sekiguchi, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 135–143 (2007).
- 118) Kodama, T., Endo, K., Ara, K., Ozaki, K., Kakeshita, H., Yamane, K. and Sekiguchi, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 13–21 (2007).
- 119) 荒 勝俊,尾崎克也,掛下大視,中村幸治,山根國男, 児玉武子,関口順一,門屋享介,森本拓也,小笠原直毅: 微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線(清水 晶他編), p. 32-48,シーエムシー出版 (2007).
- 120) Kodama, T., Manabe, K., Kageyama, Y., Liu, S., Ara, K., Ozaki, K., and Sekiguchi, J.: *Advances in Applied Biotechnology* (Petre, M., ed.), p. 163–176, InTech (2012).
- 121) 関口順一, 眞鍋憲二, 児玉武子: 微生物を活用した新 世代の有用物質生産技術(穴澤秀治監修), p. 107–114, シーエムシー出版 (2012).
- 122) Kawahara, S., Utsunomiya, C., Ishikawa, S., and Sekiguchi, J.: *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 419–422 (1997).
- 123) Ishikawa, S., Kawahara, S., and Sekiguchi, J.: Mol. General. Genet., 262, 738–748 (1999).
- 124) Shida, T., Hattori, H., Ise, F., and Sekiguchi, J.: J. Biol. Chem., 276, 28140–28146 (2001).
- 125) Mitsui, N., Murasawa, H., and Sekiguchi, J.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 82, 741–748 (2009).
- 126) Mitsui, N., Murasawa, H., and Sekiguchi, J.: J. Gen. Appl. Microbiol., 57, 35–43 (2011).
- 127) Arai, R., Fukui, S., Kobayashi, N., and Sekiguchi, J.: J. Biol. Chem. 287, 44736–44748 (2012).
- 128) Mishima, M., Shida, T., Yabuki, K., Kato, K., Sekiguchi, J., and Kojima, C.: *Biochemistry*, **44**, 10153–10163 (2005).
- 129) Layec, S., Decaris, B., and Leblond-Bourget, N.: *Res. Microbiol.*, **159**, 507–515 (2008).
- 130) Shida, T. and Sekiguchi, J.: Survival and Death in Bacteria (Yamada, M., ed.), p. 117–142, Research Signpost (2005).