

枯草菌における GTP 生合成を中心とした
増殖制御ネットワークの解析

東京農業大学大学院農学研究科

バイオサイエンス専攻

令和元年度 博士課程修了

大坂 夏木

指導教授 朝井 計

目 次

序章	5
第 1 章 (p)ppGpp ⁰ 株の最少培地における生育阻害を抑制する変異株の取得と解析	
第1節 序	11
第2節 材料と方法	12
第3節 結果	
1 (p)ppGpp ⁰ 株(NBS1440)の表現型の確認	16
2 (p)ppGpp ⁰ 抑制変異株の取得とタイプ分類	18
3 Mapping 解析及び新規抑制変異の同定	20
第4節 考察	24
第 2 章 新規抑制変異(<i>prs</i> , <i>rpoB/C</i>)による(p)ppGpp ⁰ 株の生育阻害抑制メカニズムの解析	
第1節 序	25
第2節 材料と方法	26
第3節 結果	
1 抑制変異株におけるアミノ酸飢餓条件に対する適応性と細胞内 GTP 量との関連性の解析	28
2 新規抑制変異が遺伝子発現にもたらす影響の網羅的な解析	32
第4節 考察	37
第 3 章 (p)ppGpp ⁰ 株の生育回復をメチオニンが阻害する効果(メチオニン感受性)とその原因の解析	
第1節 序	43
第2節 材料と方法	44
第3節 結果	

1	最少培地における新規抑圧変異株の生育に対するメチオニン添加の効果の検証	47
2	メチオニン要求性(<i>metB10</i>)を持つ(p)ppGpp ⁰ 株に対する新規抑圧変異による効果の検証	49
3	(p)ppGpp ⁰ <i>rpoB</i> 抑圧変異株が示すメチオニン感受性を相補する変異株の取得と解析	51
4	メチオニン感受性と細胞内 GTP 量との関連性の解析	53
5	(p)ppGpp ⁰ 株の生育可能条件におけるメチオニンの影響の解析	55
6	メチオニン以外の緊縮応答に関連するアミノ酸の影響の解析	57
	第4節 考察	59
第4章	メチオニン代謝が関与する GTP 生合成の新規制御機構の解析	
	第1節 序	60
	第2節 材料と方法	63
	第3節 結果	
	1 <i>guaB</i> CBS domain 変異株の解析	67
	2 最少培地における SAM 蓄積量の S-box レポーター系を用いた評価	71
	3 <i>in vitro</i> における SAM/MTA が GuaB 酵素活性に与える影響の解析	73
	4 (p)ppGpp と SAM 合成酵素遺伝子 <i>metK</i> の発現レベルとの関連性の解析	75
	第4節 考察	77
第5章	総合討論	79
	巻末	81

Lists of abbreviations

- GTP: Guanosine-tri-phosphate
- ATP: Adenosine-tri-phosphate
- IMP: Inosine-mono-phosphate
- XMP: Xanthosine-mono-phosphate
- (p)ppGpp: Guanosine-(penta)tetra-phosphate
- PRPP: 5-phospho- α -D-ribosyl-1-pyrophosphate
- RNAP: RNA polymerase
- iNTP: initiating nucleoside-tri-phosphate

序章

枯草菌について

土壌などに広く存在するグラム陽性菌を代表するモデル生物である。全ゲノムが解読されており、バクテリアの中でもグラム陰性菌を代表するモデル生物である大腸菌と共に、セントラルドグマ・細胞形態・物質代謝など、生命の根本を司るメカニズムの解明に大きく貢献してきた。特に枯草菌は孢子形成の分化モデルであり、先に分子生物学のモデル生物として詳細に研究されてきた大腸菌では研究できなかった分野であるため、孢子形成のメカニズムは枯草菌の中でその詳細が明らかとされてきた。また、分子生物学の研究のみならず、自然形質転換能と優れた菌体外酵素及び抗生物質の分泌能を有していることから、有用な物質生産のための生命工場としても注目されている。近年では、今まで個別に研究されてきた分野の知識を統合する微生物分子遺伝学の集大成の実験場としての相様を呈してきており、転写制御ネットワーク、蛋白質相互作用ネットワーク、細胞膜・表層を介した環境との相互作用ネットワーク、細胞分化遺伝子ネットワークにおける全体像の解明のため、蛋白質-DNA 相互作用、蛋白質-蛋白質相互作用、蛋白質-小分子相互作用の実体をシステマチックに明らかにすることが求められている。

1: 生物における GTP の生理的役割

Guanosine-tri-phosphate (GTP)は高エネルギーを持つ化合物であり、細胞の増殖・分化に関わる多くの生体分子の生合成、反応に利用される核酸分子である。故に細胞内における GTP 量を適切に制御・維持することは生存に必須な細胞機能を維持するのに不可欠である。こうした細胞が増殖する上での重要性から、細胞内の GTP 量は栄養状態に依存して変化すると考えられてきた。実際にアカパンカビにおいては、細胞内窒素原・硫黄原の減少に伴って GTP 量が低下することが示されている (Paul and Robertson, 1988)。枯草菌においては、栄養状態に応じた増殖速度の変化と細胞内 GTP 量に相関関係が存在し、栄養枯渇に伴い孢子形成を行う際には GTP 量の低下が引き起こされることが知られている (Lopez, 1982)。このメカニズムが、後述する (p)ppGpp による緊縮応答であり (Lopez, 1981)、さらに GTP 量の低下は細胞の増殖する上で必須なリボソームの骨格となる rRNA の転写を抑制することが知られている (Krásný & Gourse, 2004)。枯草菌に限らず、GTP 量の低下がこうした細胞の分化に関与する例は多くの生物において知られている。枯草菌と同様に、細胞内 GTP 量の低下は、酵母においても孢子形成のトリガーとなることが知られている (Lopes *et al.*, 1981; Varma *et al.*, 1985)。また、放線菌においては気菌糸形成に関与することも知られている (Ochi, 1986)。さらに、哺乳類においても、細胞内 GTP 量の減少が脊髄細胞の終末分化のトリガーとなることが示唆されている (Lucas *et al.*, 1983; Knight *et al.*, 1987)。GTP はガン細胞のような

増殖が活発な細胞において合成が盛んであり、脳の悪性腫瘍細胞(Glioblastoma)では、*de novo* GTP 合成の律速酵素である IMPDH2 が高発現であることも報告されている(Kofuji et al., 2019)。生物普遍的に、細胞が栄養状態を感知し、恒常性を維持したり、そのふるまいを変化させたりする上で、GTP の量は重要な役割を持つといえる。

2: ネットワーク解析の重要性

細菌は環境変化に応じて、細胞内の代謝を変化させる。グラム陽性菌のモデル生物として古くから研究されてきた枯草菌は、富栄養条件においては約 20 分で倍加する一方、栄養が枯渇するとすみやかに増殖を停止させ、孢子形成へのプロセスへ移行するといった代謝の切り替えを行う。このように速い増殖を行う中で、栄養状態に応じて増殖の適応・細胞の分化を行うことは、細胞分裂・DNA 複製・転写・翻訳といったあらゆる生体反応を秩序立って制御することができなければ実現できないはずであり、一連の生体反応を栄養状態に応じて共役させるネットワークが存在することが想像される。普遍的な生命システムの根幹を担う生体反応は、個々については詳細にメカニズムが解析され、全ゲノムが解読されて以降は、遺伝子レベルで解明がされてきたものの、実際の細胞を維持・増殖する上での個々の関係性、即ち、栄養状態に応じて細胞内の代謝、生体反応を秩序立って制御するネットワーク構造については今なお研究の余地がある。

3: バクテリア一般に保存される環境適応機構「緊縮応答」

細菌一般において保存される環境適応機構の一つとして、緊縮応答が知られている。緊縮応答ではアミノ酸飢餓等のストレスによって GTP(GDP)から警告物質(p)ppGpp が合成・蓄積し、環境変化、抗生物質への適応性の他、病原性の発揮に寄与していることが知られている。

3-1. (p)ppGpp の標的(グラム陰性細菌とグラム陽性細菌との比較)

(p)ppGpp は rRNA 合成、DNA 複製、翻訳などのあらゆる生体反応に関わる機構を阻害し、生体分子の無駄な消費を抑制する一方で、アミノ酸生合成を促進することで細胞の生存を可能とする。(p)ppGpp の標的因子は複数存在しており、大腸菌において研究が先行していたが、主にグラム陽性細菌とグラム陰性細菌との間で多様性があることが徐々に明らかとなってきた。まず転写を制御する上での標的としては、大腸菌では、(p)ppGpp は RNAP の活性中心近傍の secondary channel へ直接結合し、転写因子 DksA と協調的に、アミノ酸飢餓応答に必要とする遺伝子群の転写を変化させることが知られている(Barker et al., 2001a, b; Zhou and Jin, 1998; Paul et al., 2005)。一方で、枯草菌を始めとするグラム陽性細菌では、(p)ppGpp は RNAP に直接作用しない。枯草菌が有している 3 つの DksA ホモログ(YlyA, YteA, YocK)も大腸菌のものと相同性が低く、いずれも大腸菌のような緊縮応答に関わる機能を有していないことが報告されている

(Krásný and Gourse, 2004; Traag et al., 2013)。それに代わって、枯草菌では、(p)ppGpp が GTP 生合成経路の酵素を阻害し、細胞内における GTP/ATP 濃度を低下させることで、間接的に緊縮応答時の遺伝子発現を制御していることが知られている(3-2. (p)ppGpp による GTP 生合成の制御と枯草菌における生理的役割を参照)。

翻訳を制御する上での標的としては、グラム陰性細菌において、initiation factor 2 (IF2)及び、elongation factor G (EF-G)の活性を阻害し、翻訳の開始、伸長の反応を負に制御している(Milon et al., 2006; Mitchevich et al., 2010)。IF2 は枯草菌でも (p)ppGpp が阻害することが報告されており、これら 2 つの他、リボソームアセンブリーに参与する GTPase がグラム陰性細菌、グラム陽性細菌いずれにおいても (p)ppGpp が活性を阻害することが知られている。

DNA 複製を制御する上での標的としては、グラム陰性細菌、陽性細菌いずれにおいても、primase の活性に作用することが知られている。しかし、大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌では DNA 複製の開始段階を (p)ppGpp が阻害するのに対し、枯草菌をはじめとするグラム陽性細菌では伸長段階を阻害することが知られており、(p)ppGpp の作用機序が異なることが示唆されているものの、詳細なメカニズムまでは明らかとなっていない(Levine et al., 1991; Wang et al., 2007)。

3-2. (p)ppGpp による GTP 生合成の制御と枯草菌における生理的役割

上述した転写、翻訳、DNA 複製に関わる標的に加えて、最も古くに同定された (p)ppGpp の主たる標的として、GTP 生合成が挙げられる(Gallant et al., 1971; Pao et al., 1981)。GTP 生合成経路の酵素の中で、大腸菌、枯草菌共に (p)ppGpp が阻害することが知られている。しかし、大腸菌において (p)ppGpp がこの 2 酵素を阻害する活性は枯草菌と比較して低く、枯草菌では、Gmk, HprT に対して高い阻害活性を示すことが知られている(Liu et al., 2015; Anderson et al., 2019)。これらの機構によって (p)ppGpp が細胞内 GTP 量を制御することが、環境変化に対する適応に必須な役割を担っていることが示唆されている (Kriel et al., 2012)。

枯草菌では、緊縮応答による GTP 量を介した遺伝子発現への影響は、GTP 量の減少と ATP 量の上昇による転写開始点の塩基に依存した遺伝子発現の変化と、GTP 結合性転写制御因子 CodY の不活性化による遺伝子発現変化の 2 通りがある。枯草菌遺伝子の多くの転写開始の効率、転写開始点+1 の塩基に利用されるヌクレオチド (iNTP)の細胞内濃度に依存している。分岐鎖アミノ酸を始めとする多くのアミノ酸生合成関連遺伝子群は、ATP を iNTP に利用するため、(p)ppGpp による GTP 生合成経路の阻害によって、ATP 量が上昇することで、転写は促進されることが分かっている(Tojo et al., 2008, Krásný et al., 2008, Sojka et al., 2011)。一方で、GTP 量の低下は、iNTP に GTP を利用する rRNA、翻訳関連遺伝子の転写の抑制を引き起こす(Krásný & Gourse, 2004)。CodY は GTP が結合することによって活性化する転写の

repressor であり、分岐鎖アミノ酸(BCAA)等のアミノ酸生合成などに関わる遺伝子群の転写を負に制御する(Ratnayake-Lecamwasam et al. 2001, Molle et al., 2003, Handke et al., 2008) (Fig. 0)。

3-3: (p)ppGpp 合成酵素遺伝子欠損株の遺伝学的解析

(p)ppGpp についての研究が先行していた大腸菌においては、(p)ppGpp の細胞内濃度は合成に中心に働く RelA と、分解に中心に働く SpoT の二つの酵素により維持されている(Atkinson et al., 2011)。これらの欠損株[(p)ppGpp⁰株]は、11 種のアミノ酸に対して要求性を示し、最少培地では生育阻害を示すことが知られている(Xiao et al., 1991; Murphy et al., 2003)。この生育阻害は、RNAP のコア酵素 β/β' サブユニットをコードする *rpoB/C* の変異により相補されることが知られている(Murphy et al., 2003)。大腸菌において(p)ppGpp は、DksA と協調的に RNAP の機能に作用し、rRNA 等の半減期の短い RNA のプロモーターの転写活性を負に制御する一方で、アミノ酸生合成関連遺伝子群のプロモーターの転写活性を促進する(Barker et al., 2001a, b; Zhou and Jin, 1998; Paul et al., 2005)。大腸菌 (p)ppGpp⁰ 株の抑圧変異 *rpoB/C* は、こうした緊縮応答時に(p)ppGpp 及び DksA が作用した RNAP を模倣した性質を持っていることが *in vitro* における解析で明らかとなっている(stringent RNAP; Bartlett et al., 1998; Zhou and Jin, 1998)。以上の背景から、大腸菌において RNAP は、緊縮応答において細胞の生存性に関わる生理的影響を与える主たる標的であるとされている。

枯草菌(p)ppGpp 合成酵素は合成・分解両活性を持つ RelA, 合成活性のみ持つ YjbM, YwaC の 3 つが存在する(Nanamiya et al., 2008)。枯草菌におけるこれら 3 つの酵素を全て欠失させた (p)ppGpp⁰ 株は、大腸菌の場合と同様に、最少培地において生育阻害を示す(Kriel et al., 2012)。この直接的な要因として枯草菌(p)ppGpp⁰ 株が、BCAA, Thr, Met を含む 8 つのアミノ酸に対して要求性を示すことに加え、急激なアミノ酸の downshift に対する Fitness が失われることが報告されている(Kriel et al., 2014)。また、大腸菌(p)ppGpp⁰ 株と同様に最少培地において生育回復する株のスクリーニングが行われた結果、大腸菌の例と異なり、抑圧変異は *rpoB/C* といった RNAP をコードする遺伝子には同定されず、*de novo* GTP 生合成経路関連遺伝子 *guaA*, *guaB*, *gmk*, 及び GTP 結合性転写制御因子 *codY* に抑圧変異が同定された (Kriel et al., 2012)。一連の解析から、枯草菌(p)ppGpp⁰ 株では、アミノ酸飢餓条件における細胞内 GTP 量の制御が失われており、枯草菌においては(p)ppGpp が GTP 生合成を阻害し、GTP 量を低下させることが、アミノ酸飢餓条件における適応に必須であることが示唆された(Kriel et al., 2012)。こうした(p)ppGpp による GTP 生合成経路の直接的な制御は、枯草菌に留まらず、グラム陽性細菌に広く保存されていることも示唆されている(Gaca et al., 2013, Lui K. et al., 2015)。

<Purine nucleotide *de novo* biosynthetic pathway>

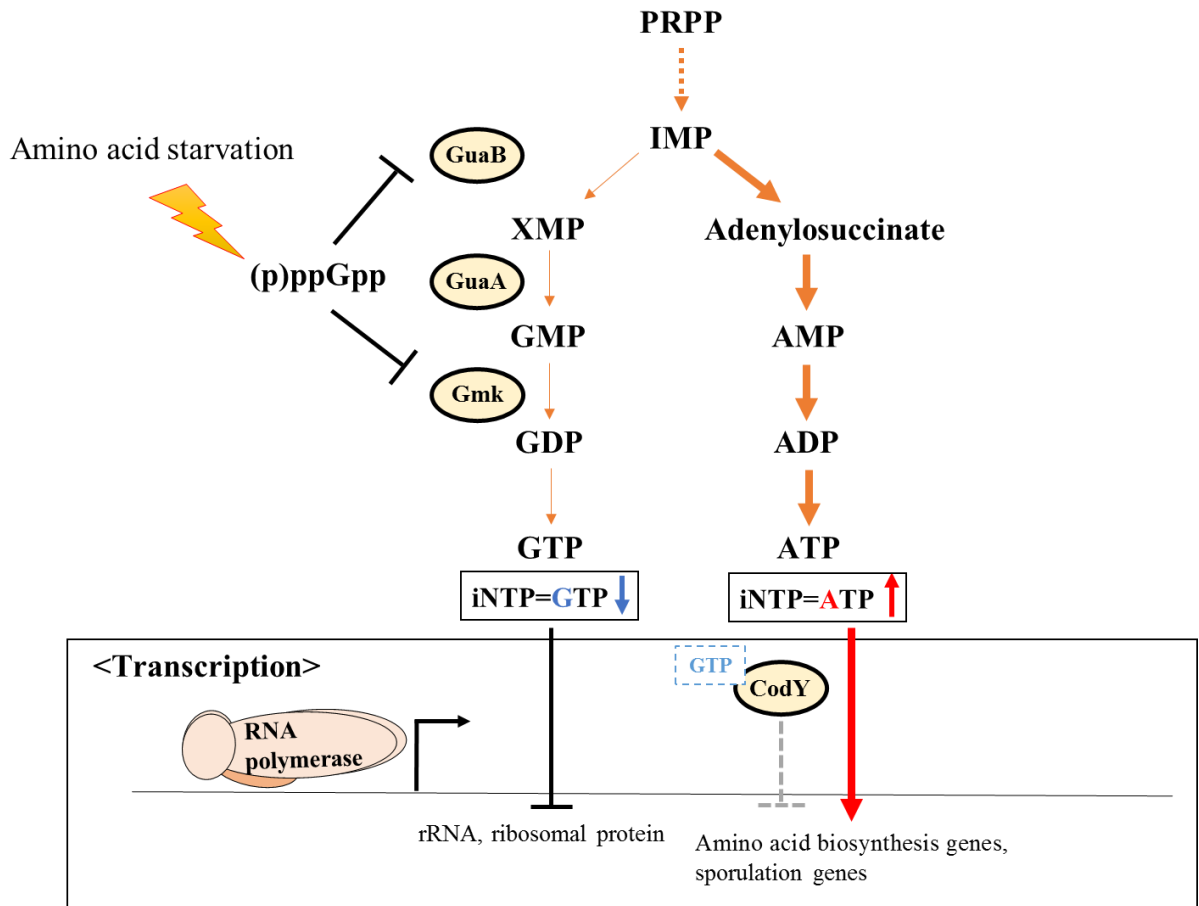


Fig. 0 枯草菌における(p)ppGppによる遺伝子発現制御モデル

アミノ酸飢餓等のストレスによって(p)ppGppが合成・蓄積し、GTP生合成経路の酵素(Gmk, GuaB, HprT)の活性を阻害する。その結果、細胞内におけるGTP量が上昇する一方で、ATP量は上昇する。GTP/ATP量の低下が生じたことで、転写開始点に利用されるNTP(iNTP)濃度に転写開始効率が依存する遺伝子のうち、iNTPにGTPを利用するrRNA、リボソームタンパク質コード遺伝子等の発現が抑制される一方で、iNTPにATPを利用するアミノ酸生合成関連遺伝子、孢子形成関連遺伝子の発現が促進される。また、細胞内GTP量の低下によって、GTP結合性転写制御因子CodYが不活性化し、CodYレギュロンに含まれるアミノ酸生合成関連遺伝子群の転写が脱抑制される。

4: 本研究の目的

(p)ppGpp による GTP の量的制御は、アミノ酸飢餓をはじめとする環境ストレスに対する適応において必須であることが示唆されており、GTP は細胞が栄養状態を感知し、増殖を制御する上でのシグナルとしての役割を担っているといえる。栄養状態に応じて厳密に制御されている GTP の生合成が、細胞における他の代謝と共役的に制御されていることは想像できるが、これまでの GTP 量制御に関わる研究は、主に前述した (p)ppGpp による制御と、*de novo* 生合成経路上流の酵素に対するフィードバック制御等に焦点が当てられており (Ebbolle and Zalkin, 1989; Weng et al., 1995; Meyer and Switzer, 1979; Arnvig et al., 1990)、異なる代謝が GTP 生合成に対する制御に関与しているのかは未検証である。

GTP の量的制御に関与する新たな因子を同定するためには、GTP 量を制御する主要な因子として知られる (p)ppGpp を欠失させた (p)ppGpp⁰ 株において、どういった遺伝子変異がアミノ酸飢餓への適応性を回復させるのかを解析していくことがまずは重要であると考えられる。過去に枯草菌 (p)ppGpp⁰ 株の最少培地において生育回復する抑圧変異が、*de novo* GTP 生合成経路関連遺伝子に同定され、この結果は、枯草菌がアミノ酸飢餓条件に適応する上で、(p)ppGpp が GTP 生合成を制御することの重要性を裏付けるものであった (Kriel et al., 2012)。しかし、これらの抑圧変異株のスクリーニングには、メチオニン要求性を持つ株が用いられており、最少培地にメチオニンを添加した条件でスクリーニングが行われていた。メチオニンは緊縮応答時に生合成が促進されるアミノ酸の一つであることから、過去のスクリーニングでは (p)ppGpp による制御機構、アミノ酸飢餓への適応において GTP 量の変化が持つ生理的意義について、見落とされている側面が存在する可能性が考えられた。そこで本研究では、栄養状態の変化に適応する上で重要な細胞内 GTP の量的制御の全体像を解明することを目指し、まずはメチオニン要求性を持たない (p)ppGpp⁰ 株を用いて、最少培地において生育回復に関わる遺伝子の解析を改めて行うこととした。

第一章 (p)ppGpp⁰ 株の最少培地における生育阻害を抑圧する変異株 の取得と解析

第一節 序

2012年に Kriel らは、枯草菌において (p)ppGpp による細胞内 GTP の量的制御が、環境変化に適応するための代謝変化に必須であることを報告した(Kriel et al., 2012)。これを裏付ける結果の一つに、枯草菌(p)ppGpp⁰株の最少培地における生育阻害を抑圧する遺伝子変異が、*de novo* GTP 生合成経路に関与する遺伝子群に同定された背景がある。その後、枯草菌(p)ppGpp⁰株は 8つのアミノ酸に対して要求性を示し、(p)ppGpp が GTP 量を制御することでそれら 8つのアミノ酸(Val, Leu, Ile, Thr, Met, His, Arg, Trp)の生合成に関わる遺伝子の転写を正に制御していることが示唆された(Kriel et al., 2014)。しかし、ここでアミノ酸飢餓への適応において(p)ppGpp が GTP 量を制御することの必須性は、これらのアミノ酸の生合成を転写レベルで促進することだけでは説明できないとされており、環境変化への適応において GTP 量を制御することの生理的意義は真には追及されていない。さらに、過去の(p)ppGpp⁰株の抑圧変異株の取得においては、メチオニンに対して要求性を持つ background strain を元に作製された(p)ppGpp⁰株が用いられており、抑圧変異株のスクリーニングにはメチオニンを添加した最少培地が使用されていた。メチオニンは前述したように、(p)ppGpp による GTP の量的制御が関与するアミノ酸の一つである。即ち、このスクリーニングはいわば、「(p)ppGpp による GTP の量的制御が担う機能の一部が相補された条件」であり、GTP の量的制御自体、またはその必須性に関わる因子が見落とされている可能性が考えられた。そこで本研究では、メチオニン非要求性の background strain から作製された枯草菌(p)ppGpp⁰株 (NBS1440) を用いて、最少培地において生育回復する抑圧変異株を取得し、(p)ppGpp、GTP の量的制御の必須性、それに関与する因子について、改めて解析することにした。

第二節 材料と方法

1. Strains

Strain Name	Genotype	Source
wt168	<i>trpC2</i>	Laboratory stock
NBS1440	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2408	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC</i>	This study
NBS2396	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i> <i>prs913C>T-cat</i>	This study
NBS2397	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i> <i>prs443T>G-cat</i>	This study
NBS2895	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i> <i>gmk104A>C-cat</i>	This study
NBS2391	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i> <i>hprT209A>G-cat</i>	This study
NBS2464	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i> <i>purF32A>G-cat</i>	This study
NBS3477	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC ΔyxB::cat</i> <i>rpoB1865C>T</i>	This study
NBS3478	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC rpoC1276T>C-cat</i>	This study
NBS3479	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC rpoC968A>G-cat</i>	This study

*次世代シーケンサーによる Mapping 解析を行った抑圧変異株は Table 1 に示している。

2. Primers

Primer	Primer Sequence (5'-3')
guaA 5'UTR seqfor	ACTCTGGCAGCGATAGCAGC
guaA seqfor	TGACTCCGGCAAACGGCC
guaA seqrev	CGCGCAAATCGGATTTTGTTCG
guaB 5'UTR seqfor	ACGCATAGGCCATTCCGTTGT
guaB seqfor	GCTTCCTTGACATGCTCTTGGC
guaB seqfor2	GTCTTTCCACTCATGATATGTCATGT
guaB seqrev	TCTTGATGTTCAATCGTACGACCTC
gmk 5'UTR seqfor	CCGGCTTGTAACAGAATGCGC
gmk seqfor	TCCAGCCTGAGACAGTTGCA
gmk seqrev	CGCAGAAACAGTCACCAGCG

codY 5'UTR seqfor	GAGAAGGTGTTTCAGCGGGATATCC
codY seqfor	TGTCGAAGAAAAGCTCGGAACG
codY seqrev	GAAAGACTTTCAACCCAGGAAATAAAGC
ywaC upfor	GATGACGTCATTCGTAATTTCAACCG
ywaC uprev(ML)	TAATCCCCAGGTTTCGTCATCTCCTTTAACGGAAC
ywaC downfor(ML)	CTGGGGATTAAGAAAAGAAGTGGATTAATAAGACGGC
ywaC downrev	GATTTACAGGAAAAATTGGTGATCCG
relA for(2.5kb)	CGATTGCTGCCATCGCCTCA
relA rev(2.5kb)	CACCTTCGTGCACACGGCTC
yjbM for(200bp)	GCCTGCATGAGGAGCTGGAA
yjbM rev(200bp)	CAGATGACCTGTGTGAACGCC
ywaC for(200bp)	ATTTTTTCGGATTCCTGCTCTCGA
ywaC rev(200bp)	TATCATAACCCTGAAGACTCGATCG
prs upfor	ATGGTATGATTAACCTGTTGGATGAG
prs uprev	AGCTGTTACCTCACCAATATGAACTGCATCTTTGAC
prs for	AGGTAACAGCTGACGGAATTCTGGCGATTCA
prs rev	TAAAGTGTTAACTGCGCTGCCTTTATGTCA
prs Plesscatfor	GCAGCGCAGTTAACTTTAGATAAAAAATTTAGGAGGC
prs Plesscatrev	AGGCAGCCGATATAAAAAGCCAGTCATTAGGCC
prs downfor	GGCTTTTATATCGGCTGCCTTTCTCTTTCTG
prs downrev	CAACAGCAGCCGGTTCAGTG
prs seqfor	GGTTCAACTGTTACGGAAGATGTACC
purF upfor	GCCGTCCGGTTGAATTGATTGT
purF uprev	AGCTGTTACCTCACCAATATGAACTGCATCTTTGAC
purF for	AGGTAACAGCTGACGGAATTCTGGCGATTCA
purF rev	TAAAGTGTTAACTGCGCTGCCTTTATGTCA
purF catfor	GCAGCGCAGTTAACTTTAGATAAAAAATTTAGGAGGC
purF catrev	AGGCAGCCGATATAAAAAGCCAGTCATTAGGCC
purF downfor	GGCTTTTATATCGGCTGCCTTTCTCTTTCTG
purF downrev	CAACAGCAGCCGGTTCAGTG
purF 11	GACAGACTGTAACGCGCGTTAT
purF 12	TAAAGTGTTATCACCAATATGAACTGCATCTTTGAC
ΔpurF catfor	ATATTGGTGATAAACTTTAGATAAAAAATTTAGGAGGC
ΔpurF catrev	GCCTTTTATGTTATAAAAAGCCAGTCATTAGGCC
purF 23	GGCTTTTATAACCAGGATACAGTGCTTCCTCAC
purF 24	AAGCACAGGCTTCACGTAAATCC

purF seqfor	GAATCTCAATCTCGCTTCGTCGT
hprT 11	GAATGCAGCCGGTTAGACGTTT
hprT 12	TAAAGTGTTACATGTTTCATCATGATTTTGCTTGCC
ΔhprT Plesscatfor	ATGAAACATGTAACACTTTAGATAAAAAATTTAGGAGGC
ΔhprT Plesscatrev	GAAGCAGGCTTTATAAAAGCCAGTCATTAGGCC
hprT 23	GCTTTTATAAAGCCTGCTTCCGAGATGGTTAT
hprT 24	ATTTCAACAAGCAATTGGTTGTCCA
hprT for	CAAGCAAATCATGATGAAACATGATATCGAGAAAGTACTG
hprT rev	TAAAGTGTTAGATCAGCTTTCATAAACTGCCGG
hprT Plesscatfor	AAAGCTGATCTAACACTTTAGATAAAAAATTTAGGAGGC
hprT Plesscatrev	GCAGGCTGCCTATAAAAGCCAGTCATTAGGCC
hprT downfor	GGCTTTTATAGGCAGCCTGCTTCCGAGATG
hprT downrev	GCTTCTCCTGCACAAGCCTT
hprT seqfor	ATTCCAAACAGCGACCGCATTGTA
rpoB upfor	GAAGCTGCTAAGCTTGTAGACCG
yxB 12	CTAAAGTGTTACGAAGCCTAAAAGACCAGGT
yxB Plesscatfor	TTAGGCTTCGTAACAATAAAAAATTTAGGAG
yxB Plesscatrev	TTCATCGAACTTATAGCCAGTCATTAGGCC
yxB 23	GCTTTTATAAGTTCGATGAAGTTTCCGTCGT
rpoB uprev	GACCTGTCAACTGATTCACCCCTCAAATCATGC
rpoB upfor	GGTGAATCAGTTGACAGGTCAACTAGTTCAGTATG
rpoB rev	TAAC TAGAGATTATTCTTTTGT TACTACATCGCGT
rpoB seqfor1	TCCGGTATTTGTTTTTGGATGTGGT
rpoB seqrev1	ACCGATACGGAATTGGTTCTGG
rpoB seqfor2	CGGCAATGCTTACATCGAAGAAGAG
rpoB seqrev2	CGGATGATTCCGCGGTCATCAAG
rpoB seqfor3	GAGTGAACGCCTAGTGAAGGATG
rpoB seqrev3	GACCATGAACGGATTTTATCTGGTG
rpoC upfor	CATCACGCCTGCTGATATTATTTCTTC
rpoC rev	TCTTCATCACCTGATAATGCCAGGCCGTCAGC
rpoC Plesscatfor	GGTTGAATAATAACACTTTAGATAAAAAATTTAGGAGGC
rpoC Plesscatrev	GTAAATCAGTTATAAAAGCCAGTCATTAGGCC
rpoC downfor	GCTTTTATAACTGATTTAACTCTGCTGAAAGACTGC
rpoC downrev	GTACACACGGAAGAACGTCAACTTAC
rpoC seqfor1	CATTATCAGGTGATGAAGAGCCGGA
rpoC seqrev1	CCTAATCTGTGAAGTGTAGGGGCAC

rpoC seqfor2	GTCCTCATTGAAAATGTACCAATGCG
rpoC seqrev2	TAACATCCTGAGCAACGTCAACGA
rpoC seqfor3	CCGATCAAATCAAGTTTCCGTGAAGG
rpoC seqrev3	CATTCTAGGAGACGAATGTCAACAAGG
Cm seqrev	GTGTTATACTAAAAGTCGTTTGTGGT

3. 酵素及びキット試薬

Ex Taq DNA polymerase	(タカラバイオ株式会社)
KOD-plus- DNA polymerase	(東洋紡績株式会社)
Prime Star DNA polymerase	(タカラバイオ株式会社)

4. 培地

- ・LB 培地 : 枯草菌の培養 (巻末参照)
- ・最少培地(Spizizen's minimal salts medium) : (p)ppGpp⁰ 抑圧変異株の取得、back-cross 株における生育回復の確認 (巻末参照)

5. 枯草菌からのゲノム抽出 (巻末参照)

6. 最少培地における spot test (巻末参照)

7. (p)ppGpp⁰ 抑圧変異株における *de novo* GTP 生合成関連遺伝子のシーケンス確認
抑圧変異株のゲノムを鋳型に、*guaA/B*, *gmk*, *codY* の ORF、及び 5'UTR 約 500bp の領域を r-taq DNA polymerase を用いて増幅した(2. Primers 参照)。PCR 産物をシーケンスに提出し、変異の有無を確認した。

8. back-cross 株、抑圧変異を同定した遺伝子の破壊株の作製

抑圧変異を back-cross するための断片作製は Prime Star DNA polymerase もしくは KOD-plus-DNA polymerase を用いて増幅した。一方で遺伝子破壊用の断片の作製は、Prime Star DNA polymerase もしくは Ex taq DNA polymerase を用いて増幅した。作製した断片はを枯草菌コンピテントセルに形質転換した (巻末参照)。Back-cross 株は、得られた形質転換体の中で、元の抑圧変異株と類似した表現型を持つコロニーと、持たないコロニーの両者を計 6-8 コロニー pick up し、前者の表現型を示した形質転換体が最少培地において生育回復することを確認した。生育回復することを確認した株について、抑圧変異が正しく導入されていることをシーケンスにて確認し、確認できた株を back-cross 株としてその後の実験に使用した。

第三節 結果

1. (p)ppGpp⁰株(NBS1440)の表現型の確認

まず当研究室において作成された(p)ppGpp⁰株(NBS1440)が、過去の報告と同様の表現型を示すかを確認した。NBS1440は、最少培地において生育阻害を示すことが確認された(Fig. 1A)。さらに Kriel らの 2012 年、2014 年の報告通り(Kriel et al., 2012; Kriel et al., 2014)、この生育阻害は、(p)ppGpp⁰株は要求性を示すとされる 7 つのアミノ酸の添加、または GTP 生合成経路の GMP synthetase (GuaA)の阻害剤: decoyinine を添加することで相補されることを確認した(Fig. 1-1A)。さらに、アミノ酸条件に関わらず、(p)ppGpp⁰株においては細胞内 GTP 量の上昇は細胞死を生じさせるとする知見の通り、MM+7aa 条件において、GTP salvage 合成の基質である guanosine を添加することで生育阻害を示すことを確認した(Fig. 1-1B)。以上の結果から、当研究室の(p)ppGpp⁰株は過去の報告と一致した表現型を示しており、Kriel らの論文で用いられていた株と、メチオニン要求性の変異(*metB10*)を持たないという点を除いて、同じ(p)ppGpp 合成欠損による影響を持つ株であることが確認された。

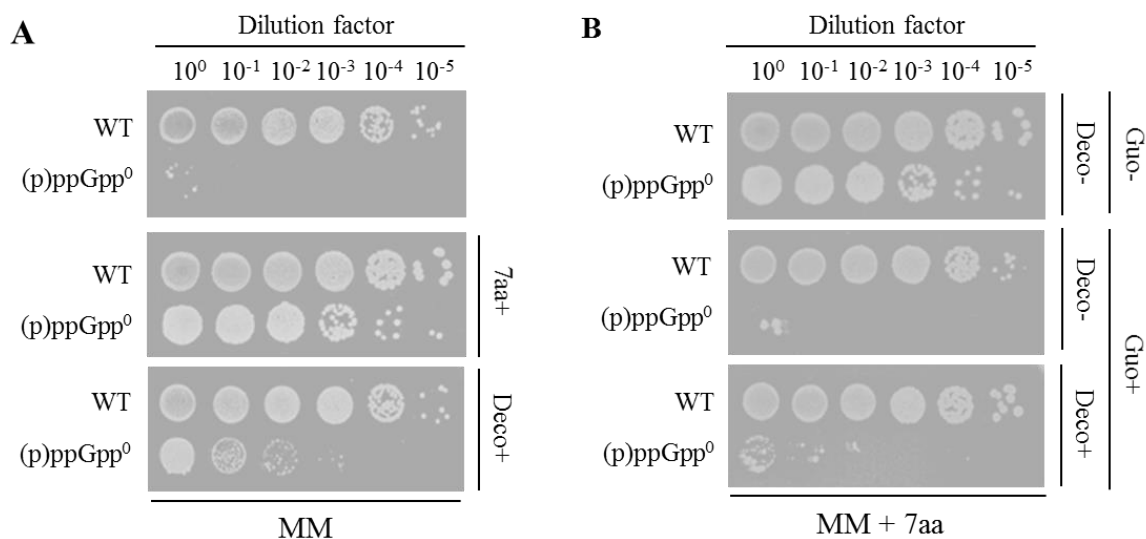


Fig. 1-1 (p)ppGpp 合成欠損による最少培地における生育への影響

A, B. 野生株、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)の生菌率:

A. 最少培地(MM)、最少培地 +0.01mg/ml 7aa*、最少培地 +0.01mg/ml 7aa/ 0.01 mg/ml decoyinine (Deco)

B. 最少培地 +0.01mg/ml 7aa、最少培地 +0.01mg/ml 7aa/ 0.1mM guanosine (Guo)、最少培地 +0.01mg/ml 7aa/ 0.1mM guanosine/ 0.01 mg/ml decoyinine。

*7aa: Val, Leu, Ile, Thr, Met, His, Arg

2. (p)ppGpp⁰ 抑圧変異株の取得とタイプ分類

(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)から、最少培地において生育回復する抑圧変異株を約 70 株取得した。それらの株について、過去に抑圧変異が同定された *de novo* GTP に直接関与する遺伝子 *guaA/B*, *gmk* 及び *codY* に変異が落ちていないかを、サンガーシーケンスにより確認した。該当する株は除外した計 21 株について、以下の指標を基に、次世代シーケンサーを用いた mapping 解析を行う株を選定した。

過去の知見において、(p)ppGpp⁰ 株の *de novo* GTP 生合成に関与する遺伝子の抑圧変異は、LB 培地のような富栄養条件における生育速度に影響を与えることが報告されている(Bittner et al., 2014)。さらに当研究において、LB 培地において(p)ppGpp⁰ 株は、対数増殖期では野生株と同等の生育を示すのに対し、定常期移行時期には生育阻害を示すことを見出した(本研究では詳細な解析にまでは至らなかったが、この生育阻害は GTP 生合成経路の阻害剤: decoyinine の添加によって相補されることが確認された(Fig. 1-2A)。この知見を踏まえ、LB 培地における(p)ppGpp⁰ 株の表現型を基準とし、抑圧変異株のタイプ分類を行った。その結果、抑圧変異株は以下の 3 つのタイプに分類された。A) 定常期移行時期の生育阻害が回復する株 (9 株) B) (p)ppGpp⁰ 株と比較して殆ど生育に差が見られない株 (9 株)、C) 定常期移行時期の生育阻害が増大する株 (3 株) (Fig. 1-2B)。これら 3 タイプのうち、タイプ A から 9 株、タイプ B から 2 株、タイプ C から 2 株を選定し、次世代シーケンサーを用いた mapping 解析を行った。

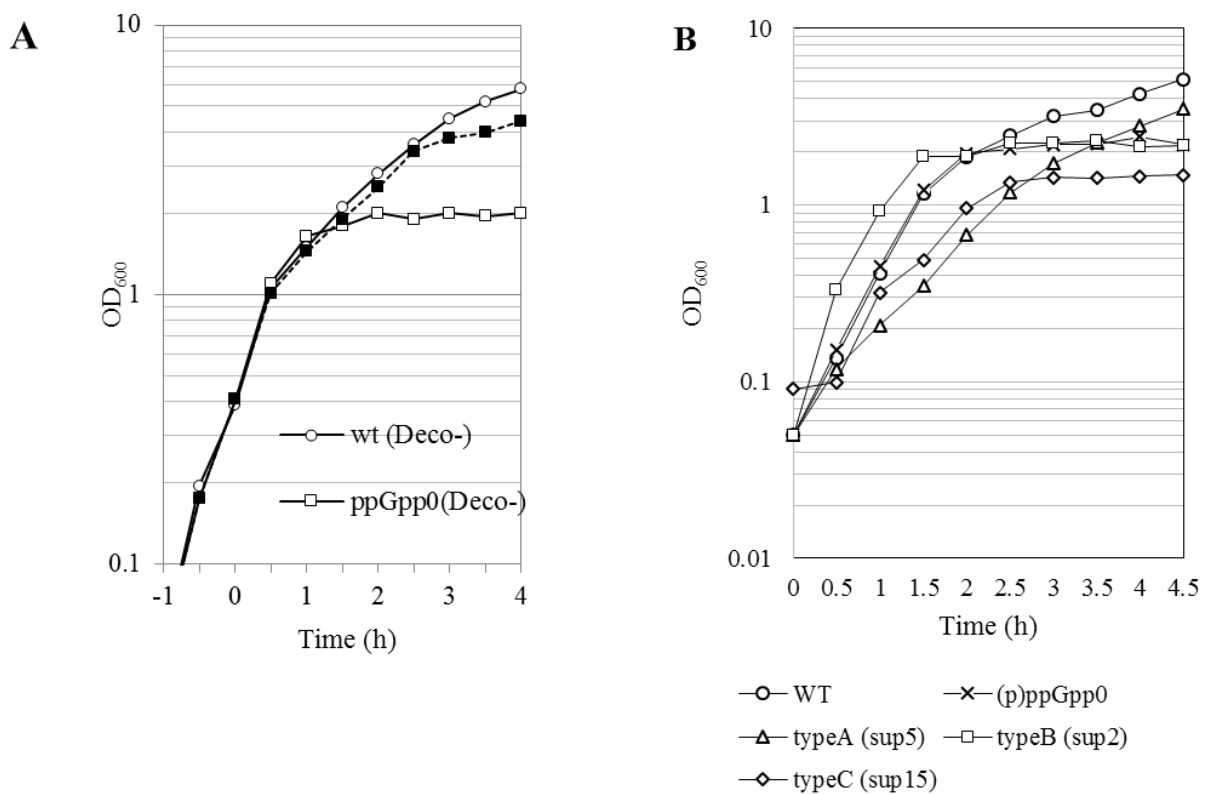


Fig. 1-2 LB 培地における(p)ppGpp⁰ 株及びタイプ A-C における代表的な抑圧変異株の生育

A. 野生株(WT)と(p)ppGpp⁰ 株(NBS 1440) (0.1 mg/mL decoyinine^{-/+})との増殖曲線の比較。

○: 野生株(WT), □: (p)ppGpp⁰(NBS1440) decoyinine⁻, ■: (p)ppGpp⁰(NBS1440) decoyinine⁺

B. 野生株(WT)、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)及び、(p)ppGpp⁰ 抑圧変異株: *sup5*(NBS2378)、*sup2*(NBS2377)、*sup15*(NBS2379)の増殖曲線。

3. Mapping 解析及び新規抑圧変異の同定

Mapping 解析にて同定された変異のうち、いくつか生育阻害の抑圧に寄与している可能性があるとして推定した遺伝子変異について、薬剤マーカーを導入したコンストラクトを作製し、元の(p)ppGpp⁰株(NBS1440)または、新たに作製した *relA* 以外の(p)ppGpp 合成酵素遺伝子 2 つをマーカーレス破壊した(p)ppGpp⁰株(NBS2408)に導入した back-cross 株を作製し、その遺伝子変異が抑圧変異であることを確認した (第二節 7. back-cross 株、抑圧変異を同定した遺伝子の破壊株の作製を参照)。Mapping 解析及びそれに続く以上の行程から同定した抑圧変異を Table. 1 に示した。

Mapping 解析の結果、GTP 生合成経路より上流に位置するプリンヌクレオチド生合成経路に関与する遺伝子 *prs*, *purF* に抑圧変異を同定した(*prs*: *sup35*, *sup65*, *purF*: *sup2*) (Fig. 1-3)。*prs* は、プリンヌクレオチド生合成の初発酵素(Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase)をコードしており、この酵素は Ribose-5P からプリンヌクレオチド生合成経路における初発物質である phosphoribosyl pyrophosphate (5-phospho- α -D-ribose-1-pyrophosphate: PRPP)を合成する反応を担っている。一方で *purF* は、glutamine PRPP amido transferase をコードしており、この酵素はプリンヌクレオチド *de novo* 生合成経路において最初に働く律速酵素である。さらに興味深いことに、過去の報告では、枯草菌(p)ppGpp⁰株の生育阻害の抑圧には寄与しないと考えられていた、RNA polymerase (RNAP)コア酵素 β , β' subunit をコードする *rpoB*, *rpoC* にも抑圧変異を同定した。*sup1*, *sup15*, *sup17*においては、*rpoB*, または *rpoC* の ORF 内にミスセンス変異が確認された。一方で、*sup42*においては、*rpoB* の 5' UTR に 1 塩基の挿入変異が確認された(-13A after G) (Table 1)。それぞれの抑圧変異を(p)ppGpp⁰株(NBS1440, NBS2408)へと back-cross した株も、最少培地における生育回復が見られた (Fig. 1-4)

Table1. Mapping 解析にて同定した(p)ppGpp⁰ 抑圧変異の位置

Strain Name	Suppressor Number	Gene	Position of mutation ^a	Amino acid substitution or description of the mutation	Suppressor Type
NBS2380	<i>sup16</i>	<i>guaB</i>	1310 G>A ^b	G437E	A
NBS2387	<i>sup67</i>	<i>gmk</i>	164 A>C ^b	Y35S	A
NBS2377	<i>sup2</i>	<i>purF</i>	32 A>G	E11G	B
NBS2384	<i>sup35</i>	<i>prs</i>	913 C>T	R305C	A
NBS2386	<i>sup65</i>	<i>prs</i>	443 T>G	I148S	A
NBS2376	<i>sup1</i>	<i>rpoC</i>	1276 T>C	F426L	B
NBS2379	<i>sup15</i>	<i>rpoC</i>	968 A>G	K323R	C
NBS2381	<i>sup17</i>	<i>rpoB</i>	1865 C>T	A622V	C
NBS2385	<i>sup42</i>	<i>rpoB</i>	-13G insA	SD sequence	A
NBS2378	<i>sup5</i>	<i>hprT</i>	209 A>G	A70C	A
NBS2382	<i>sup19</i>	<i>hprT</i>	210 C>A	Frameshift	A
NBS2383	<i>sup21</i>	<i>hprT</i>	210 C>A	Frameshift	A
-	<i>sup66</i>	-	N.D. ^c	-	A

All the strains listed are the derivatives of the strain NBS1440 (*trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc*).

^aNumbering from the start codon (ATG) from the open reading frame.

^bThe suppressor mutations identified previously (Kriel et al., 2012).

^cN.D: The responsible mutation for suppression was not determined by back-crossing experiments.

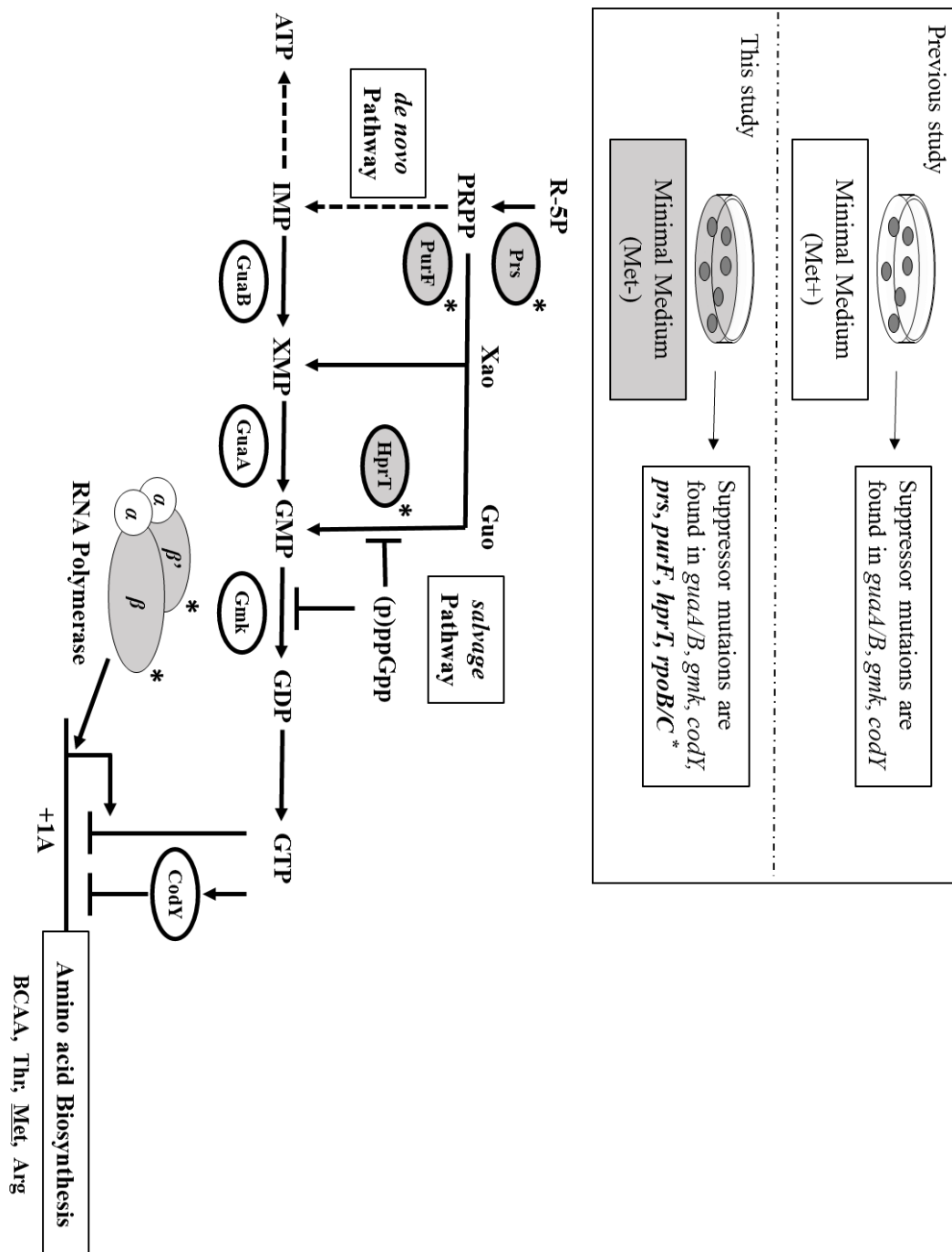


Fig. 1-3 (p)ppGpp⁰株の抑圧変異が同定された遺伝子について

過去の研究(Kriel et al., 2012)と本研究における抑圧変異株のスクリーニング条件及び、その結果同定された抑圧変異遺伝子について、コードされる酵素が関与するプリンヌクレオチド合成経路、及び緊縮応答において遺伝子発現を制御する経路を一つにまとめた模式図。

*: 本研究において新規に同定した抑圧変異

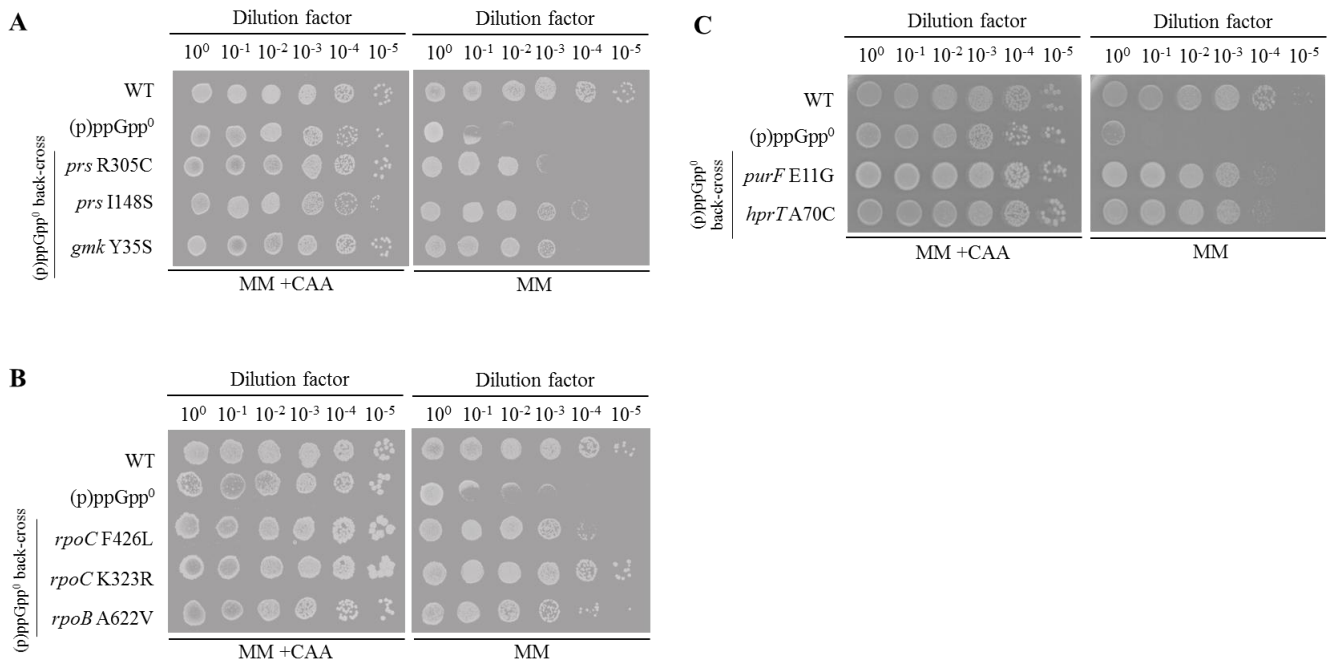


Fig. 1-4: 最少培地における back-cross 株の生菌率

左: 最少培地(MM) +0.2% casamino acid (CAA)、右: 最少培地

各プレートにおいて control として野生株(WT)、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440 または NBS2408)の生菌率も示している。

A: NBS2396: *prs*(R305C), NBS2397: *prs*(I148S), and NBS2895: *gmk*(Y35S)

B: NBS3477: *rpoB*(A622V), NBS3478: *rpoC*(F426L), and NBS3479: *rpoC*(K323R)

C: NBS2377: *purF*(E11G) and NBS2378: *hprT*(A70C)

第四節 考察

本研究において、メチオニン非添加の最少培地における(p)ppGpp⁰株の抑圧変異株のスクリーニングの結果、*prs*, *purF*, *rpoB/C*といった、過去のスクリーニングで同定された *de novo* GTP 生合成に直接関与する遺伝子(*guaA/B*, *gmk*, *codY*)に加えて、GTP 生合成に直接関与しない遺伝子に新規な抑圧変異を多数同定した。この結果は、(p)ppGpp が GTP 生合成を直接制御することが、アミノ酸飢餓への適応に必須であるとする過去の研究で示された定説には当てはまらない、アミノ酸飢餓への適応に関わる要因が存在することを示唆するものであると考えられる。逆に、過去の研究におけるメチオニン添加条件でのスクリーニングで、本研究における新規抑圧変異が見落とされていたのには、メチオニンの存在は、(p)ppGpp を欠失した background におけるアミノ酸飢餓へ適応する経路に、影響を及ぼしていたことが示唆される。この詳細については第 3 章、第 4 章にて述べる。

過去に同定されなかった新規抑圧変異の中には、*hprT* も存在した(*sup5*, *sup19*, *sup21*)。 *hprT* は、プリンヌクレオチド (IMP, XMP, GMP) を *salvage* 合成する hypoxanthine phosphoribosyltransferase をコードしている。HprT は、枯草菌において(p)ppGpp によって活性が阻害されることが報告されており (Kriel et al., 2012; Anderson et al., 2019)、この結果は、(p)ppGpp による GTP *salvage* 合成の制御が、環境変化に応じて細胞内 GTP 量を調節する上で重要な役割を担っていることを示唆するものであると考えられる。

第二章 新規抑圧変異(*prs*, *rpoB/C*)による(p)ppGpp⁰株の生育阻害抑 圧メカニズムの解析

第一節 序

過去の報告では、枯草菌(p)ppGpp⁰株のアミノ酸飢餓への適応性の回復には、GTP 量あるいは GTP/ATP の相対量比の低下が重要であるとされていた(Kriel et al., 2012)。これを可能とする抑圧変異はいずれも(p)ppGpp によって制御される *de novo* GTP に直接関与する遺伝子の変異によって GTP 量が低下するものであり、緊縮応答における(p)ppGpp による制御メカニズムを考えると、理に合っているものであるといえる。これに対し、第一章にて新規に同定した抑圧変異のうち、*prs* にコードされる PRPP synthetase は GTP の生合成だけでなく、ATP を含めたプリンヌクレオチド生合成の初発物質の合成に関与しており、過去に提唱された GTP 量あるいは GTP/ATP 相対量比が低下することが(p)ppGpp⁰ 株の生育阻害の抑圧、即ち(p)ppGpp による環境変化への適応に重要であるとするセオリーに当てはまらない。*rpoB/C*についても同様であり、RNAP コア酵素の変異が、GTP 生合成に特異的に影響するということは想定し難い。そこで、新規抑圧変異 *prs*, *rpoB/C* が、アミノ酸飢餓への適応性をどのようにして回復させたのかを、細胞内 GTP・ATP 量との関連性に焦点を当てて調べることにした。さらに、RNA-seq を用いて mRNA 量の変化を網羅的に解析することで、抑圧変異 *prs*, *rpoB/C* が転写レベルで及ぼす影響について迫ることとした。

第二節 材料と方法

1. Strains

Strain Name	Suppressor Number	Genotype*	Source
wt168		<i>trpC2</i>	Laboratory stock
NBS1440		<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2384	<i>sup35</i>	<i>trpC2 prs R305C ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2385	<i>sup65</i>	<i>trpC2 prs I148S ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2376	<i>sup1</i>	<i>trpC2 rpoC F426L ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2379	<i>sup15</i>	<i>trpC2 rpoC K323R ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2381	<i>sup17</i>	<i>trpC2 rpoB A622V nasDV16G coaA A 86G ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2387	<i>sup67</i>	<i>trpC2 gmk Y35S ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study

*suppressor strain の Genotype については、次世代シーケンサーによる Mapping 解析において、元株である NBS1440 の mapping 結果との比較に基づいて記載している。また、遺伝子の ORF、promoter 領域いずれにも当てはまらないゲノム領域にあった変異については記載していない。

2. 試薬及び実験器具

Arginine hydroxamate	(Sigma Aldrich)
ATP	(Sigma Aldrich)
GTP	(Sigma Aldrich)
Kinetix 2.6μm 分析カラム C18 150 4.6×2.6um	(株式会社島津ジーエルシー)

3. 培地

・LB 培地：枯草菌の培養（巻末参照）

LB 培地(tryptone 0.03%)：RHX 添加によるアミノ酸飢餓誘導条件において使用（巻末参照）

CI 培地(0.004% casamino acid)：最少培地への spot test の前培養に使用（巻末参照）

最少培地(Spizizen's minimal salts medium)：spot test に使用（巻末参照）

4. RHX 添加後の生菌率測定 (巻末参照)

枯草菌を LB 培地(tryptone 0.03%)に $OD_{600}=0.03$ になるよう植菌。培養後 $OD_{600}=0.15\sim 0.2$ になった時点で、菌体液を $100\ \mu\text{L}$ 分取し、試験管に分注した LB 培地にて 10 倍ずつ段階希釈、 $10^{-1}\sim 10^{-5}$ の希釈系列を作製し、それぞれ $100\ \mu\text{l}$ ずつ LB 培地にプレーティングする…①。一方で培養している菌体に RHX を終濃度 $500\ \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加する。RHX 添加 20 分後、添加前と同様に菌体液を $100\ \mu\text{l}$ 分取、 $10^{-1}\sim 10^{-5}$ の希釈系列を作製し、それぞれ $100\ \mu\text{l}$ ずつ LB 培地にプレーティングする…②。①②の LB 培地を 37°C にて一晩培養し、翌日生えてきたコロニーをカウントし、それぞれの生菌数を算出、②の生菌数/①の生菌数を生菌率とした。

5. 最少培地における spot test (巻末参照)

6. ATP・GTP 量の HPLC 解析 (巻末参照)

7. 枯草菌からの RNA 抽出 (巻末参照)

8. RNA-seq 解析

rRNA を Ribo-Zero rRNA Removal Kit にて除去し、cDNA library を作成した。シーケンスタデータの解析は CLC Genomics Workbench ver. 9.5 を用いて行った。

< Induction factor (IF) 及び Repression factor (RF) の算出 >

解析結果における各遺伝子の RPKM 値の比を以下のように算出した。

$$\text{IF} = \text{RPKM 値 (RHX+)} / \text{RPKM 値 (RHX-)}$$

$$\text{RF} = \text{RPKM 値 (RHX-)} / \text{RPKM 値 (RHX+)}$$

IF(RF) の算出において、次のような場合は、例外的な計算を行った

- ・ RPKM 値(分母)が”0”で尚且つ、RPKM 値(分子) ≥ 3.0 であった場合、IF(RF)=3.0 とした。
- ・ RPKM 値(分母)が”0”で尚且つ、 $2.0 \leq \text{RPKM 値(分子)} < 3.0$ であった場合、IF(RF)=1.0 とした。
- ・ RPKM 値(分母)が”0”で尚且つ、RPKM 値(分子) < 3.0 であった場合、IF(RF)=0 とした。
- ・ RPKM 値(分母) < 3.0 の時、IF(RF)は”N.D.”とした。

本研究における RNA-seq 解析のデータは DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録している (accession number: PRJDB8780)。

第三節 結果

1. 抑圧変異株におけるアミノ酸飢餓条件に対する適応性と細胞内 GTP 量との関連性の解析

最少培地において、いずれの抑圧変異株も (p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)と比較して生菌率の回復が見られた(Fig. 2-1A, B)。また、抑圧変異株におけるアミノ酸飢餓に対する適応性についてより詳細な解析を行うために、富栄養条件において急激なアミノ酸飢餓条件を誘導できる RHX を用いて検証することにした。RHX はアルギニンのアナログであり、細胞内の *ArgtRNA* を枯渇させ、翻訳が停滞したアミノ酸飢餓状態にする。まず野生株及び (p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)において、RHX 添加後の生菌率を継時的に測定したところ、野生株では添加 0~40min にかけてほぼ 100%の生菌率を維持する一方で、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)では、添加 10min から生菌率が顕著に低下し、20min 以降は 1%未満にまで低下することが確認された(Fig. 2-2A)。この結果を踏まえ、各抑圧変異株の RHX 添加 40min の時点での生菌率、及び添加 10min の時点での GTP・ATP 量を HPLC にて解析した。

いずれの抑圧変異株も RHX 添加後の生菌率は最少培地と同様に回復することが確認された(Fig. 2-2B)。また、RHX 添加後の生菌率と GTP/ATP 相対値との関係性を見ると、生菌率が維持された野生株では RHX 添加後に GTP/ATP 相対値は顕著に低下する一方で、生菌率が低下した (p)ppGpp⁰ 株では GTP/ATP 相対値は上昇することが確認された(Fig. 2-2C)。この結果は、GTP 量を低下させることがアミノ酸飢餓への適応に必須であるとする過去の報告を支持するものである(Kriel et al., 2012)。この一方で、抑圧変異株 *prs*(NBS2384, NBS2386)では、RHX 添加後の生菌率は (p)ppGpp⁰ 株と比較して有意に回復していたにもかかわらず、GTP/ATP 相対値は (p)ppGpp⁰ 株と同等であることが確認された。過去の報告においても本研究と同様に、RHX 添加後の生菌率と GTP/ATP 相対値の解析が行われていた(Kriel et al., 2012)。そこでは抑圧変異株では GTP/ATP 相対値が低下し、その低下度合いが生菌率に比例するとされており、従って抑圧変異株 *prs* にこの法則は当てはまらないということになる。そこで GTP/ATP 相対値ではなく ATP・GTP それぞれの絶対値を、sampling 時の OD で補正することで算出したところ(巻末参照)、NBS2386(*prs* I148S)では、(p)ppGpp⁰ 株を含めた他の株と比較して ATP・GTP いずれの絶対量も低い傾向にあることが確認された(Fig. 2-2D, 2-2E)。

ここで示した ATP・GTP 絶対値は HPLC 解析の面積値を sampling 時の OD で補正した値であり、サンプル調整時の抽出効率の不均一性等を鑑みると、正確なものではないも

の、この結果は、抑圧変異株 *prs* では、ATP・GTP 両者の絶対量が低下しており、故に GTP/ATP 量比については(p)ppGpp⁰ 株との間に差が見られなかったと考えられる。

抑圧変異株 *rpoB/C*(NBS2376, NBS2379, NBS2381)では、RHX 添加後の GTP/ATP 相対値が(p)ppGpp⁰ 株と比較して減少する傾向が見られた(Fig. 2-2C)。一方で、GTP 絶対値は、いずれも(p)ppGpp⁰ 株と同等か、高い傾向にあることが確認された(Fig. 2-2E)。以上の結果から、抑圧変異 *rpoB/C* は GTP 生合成に対して有意な影響を与えることなく、アミノ酸飢餓への適応性が回復させていることが示唆された。

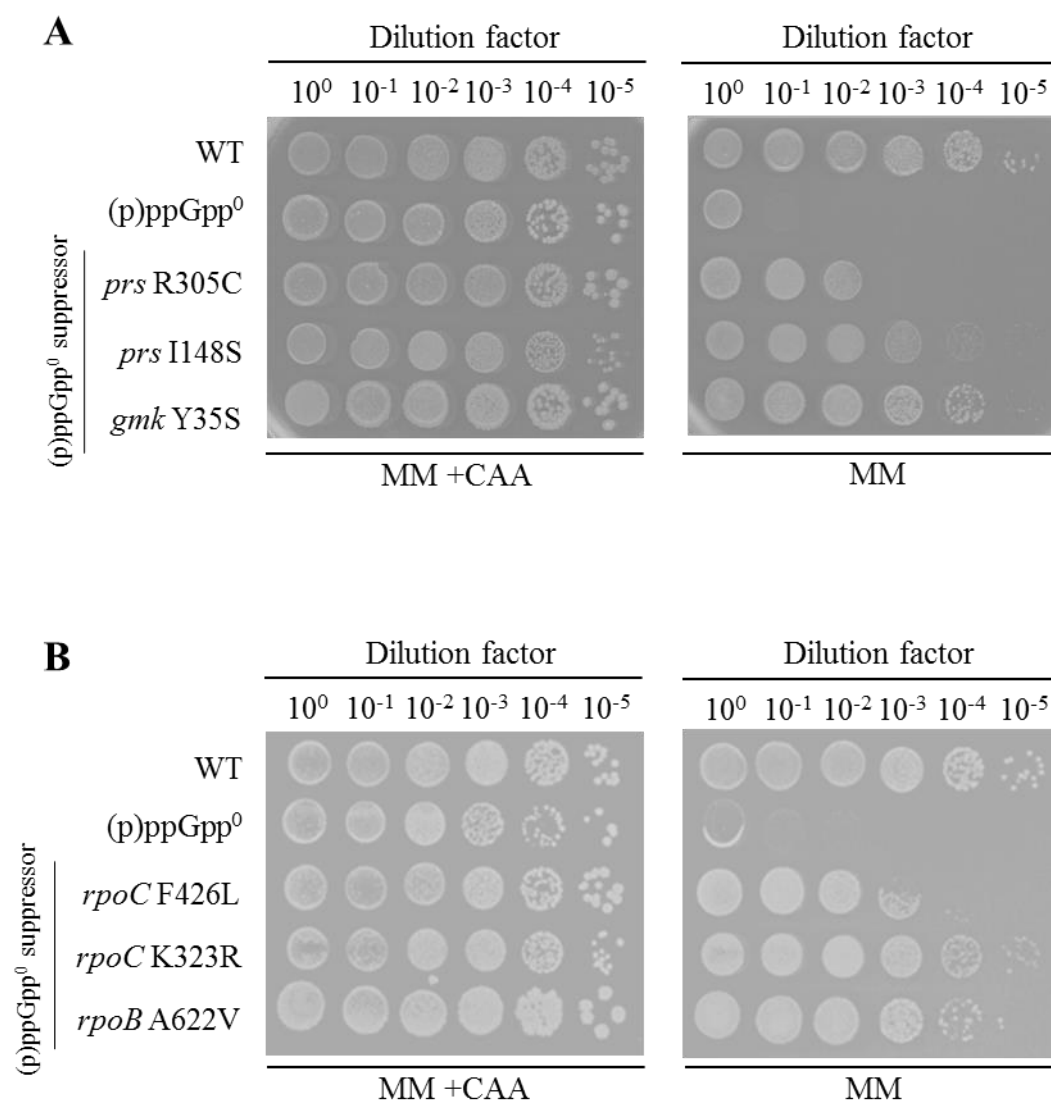


Fig. 2-1 最少培地における(p)ppGpp⁰ 抑圧変異株の生菌率

左: 最少培地(MM) +0.2% casamino acid (CAA)、右: 最少培地

各プレートにおいて control として野生株(WT)、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440 または NBS2408)の生菌率も示している。

A: NBS2384: *prs*(R305C), NBS2386: *prs*(I148S), and NBS2387: *gmk*(Y35S)

B: NBS2376: *rpoC*(F426L), NBS2379: *rpoC*(K323R), and NBS2381: *rpoB*(A622V)

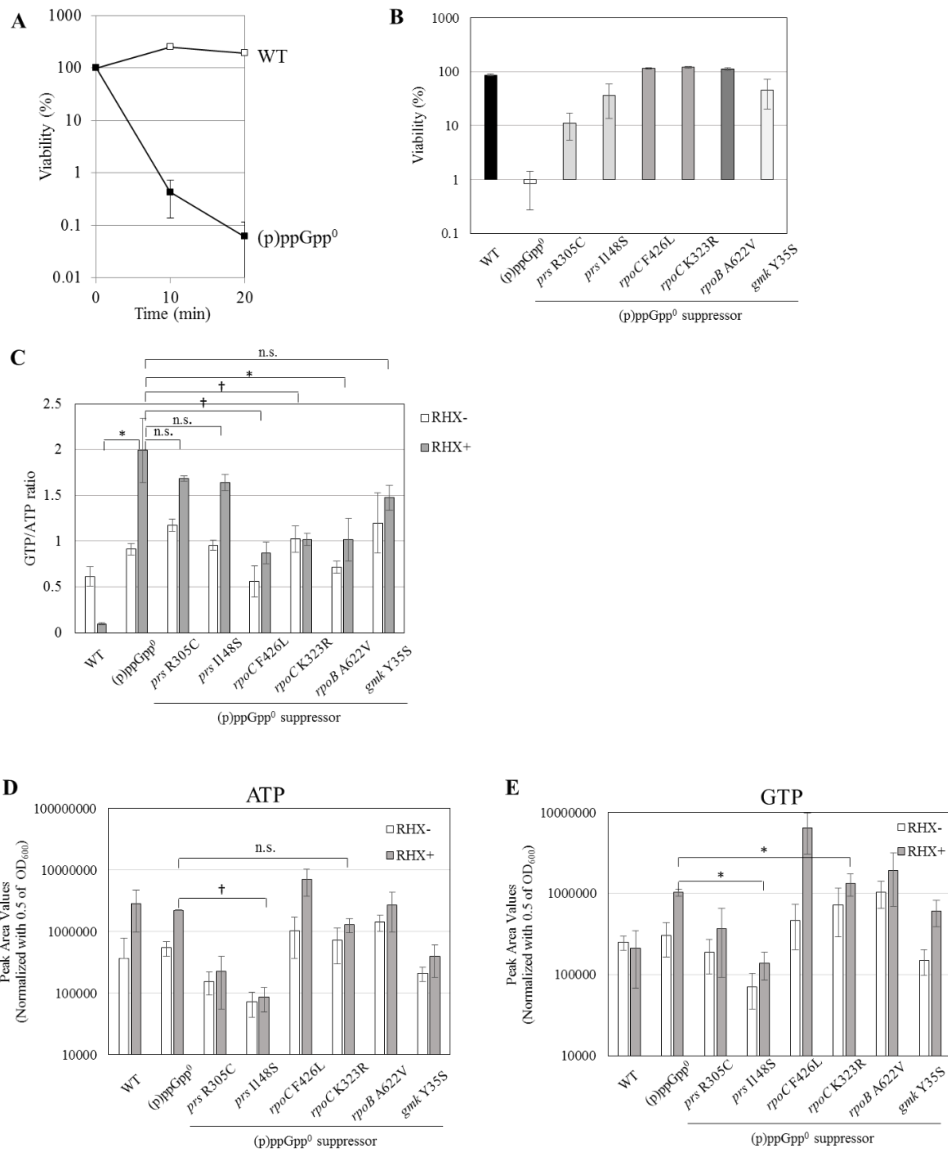


Fig. 2-2 RHX 添加条件における生菌率と GTP・ATP 量との関係性

- A. 野生株(WT)と(p)ppGpp 株(NBS1440)の RHX 添加後 10, 20 分における生菌率。
- B. RHX 添加後 40 分における生菌率。野生株(WT)、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)、(p)ppGpp⁰ 抑圧変異株(Fig. 2-1 にて示した株と同じ)の結果を示した。グラフは n=3 の平均値、エラーバーは標準偏差を示している。t 検定(両側検定)にて有意差を判定した。†, 0.05 < p < 1.0; *, p < 0.05; n.s., not significant (p > 1.0).
- C. B の株における 0.5 mg/ml RHX 添加(+)^{*}・非添加(-) 10 分後の GTP/ATP 相対値 (HPLC 解析、巻末参照)。RHX は OD₆₀₀=0.5-0.6 の時点で添加している。グラフは n=3 の平均値、エラーバーは標準偏差を示している。
- D, E. C と同じ HPLC 解析の結果から算出した ATP 絶対値(D)、及び GTP 絶対値(E)。絶対値の算出方法については巻末参照。グラフは n=3 の平均値、エラーバーは標準偏差を示している。t 検定(両側検定)にて有意差を判定した。*, 0.01 < p < 0.05; †, 0.05 < p < 1.0; n.s., not significant (p > 1.0).

2. 新規抑圧変異が遺伝子発現にもたらす影響の網羅的な解析

野生株、(p)ppGpp⁰株(NBS1440)、そして抑圧変異株 *prs*, *rpoB/C*のうち、Fig.2-1, 2-2 の結果を踏まえて生育回復効果が高い NBS2386(*prs* I148S)及び NBS2381(*rpoB* A622V)について、RHX 添加前(T0)、添加後 10 min、非添加 10 min の 3 つの条件において、RNA-seq による mRNA 量の網羅的な解析を行った。RPKM 値を指標に、この値がいずれの株でも 2.0 未満であった遺伝子(全体の約 10%)を除外した計 4089 遺伝子について、まずは野生株と(p)ppGpp⁰株とで mRNA 量の比較を行った。RHX 添加条件において、計 4089 遺伝子中、(p)ppGpp⁰株と比較して野生株で 3 倍以上 RPKM 値が高い遺伝子は、計 707 遺伝子存在した(以下、(p)ppGpp-dependent induction cluster)。一方で、同条件において、(p)ppGpp⁰株で野生株より RPKM 値が 1/3 未満に低下していた遺伝子は計 770 遺伝子存在した(以下、(p)ppGpp-dependent repression cluster)。(p)ppGpp-dependent induction cluster には、過去の報告(Eymann *et al.*, 2002; Kriel *et al.*, 2014)におけるトランスクリプトーム解析において、(p)ppGpp に依存して転写が上昇するとされていた、分岐差アミノ酸(BCAA)生合成関連遺伝子群(*ilvBHC-leuABCD*)やスレオニン生合成関連遺伝子群(*hom-thrCB*)などが含まれていた(Fig. 2-3A)。一方で、(p)ppGpp-dependent repression cluster には、過去の報告(Eymann *et al.*, 2002; Kriel *et al.*, 2014)におけるトランスクリプトーム解析において、(p)ppGpp に依存して転写が減少するとされていたリボソームタンパクコード遺伝子群(*rpsI*, *rplA*, *rplJKLM*, *rplT*, *rpmI*)が含まれていた。以上の結果から、本研究における RNA-seq 解析結果は、過去の報告とも整合性が取れる緊縮応答[(p)ppGpp]に依存した遺伝子発現変化を見ることができていると考えられる。

NBS2381(*rpoB* A622V)では、(p)ppGpp⁰株と比較して RPKM 値が 2 倍以上上昇している遺伝子が計 914 遺伝子存在した(以下、induction cluster in *rpoB* suppressor)。この中には BCAA 生合成関連遺伝子 *ilvBHC* も含まれていた。さらに、(p)ppGpp-dependent induction cluster のうち、約半分(334 遺伝子)は、induction cluster in *rpoB* suppressor と一致していた(Fig. 2-3A)。一方で、(p)ppGpp⁰株と比較して RPKM 値が 1/2 未満に減少している遺伝子は計 359 遺伝子存在した(以下、repression cluster in *rpoB* suppressor)。そして、(p)ppGpp-dependent repression cluster のうち、約 20%(182 遺伝子)は、repression cluster in *rpoB* suppressor と一致していた(Fig. 2-3B)。

さらに、過去に枯草菌において(p)ppGpp に依存して発現が促進・抑制されることが報告されていた代表的な遺伝子群について(Eymann *et al.*, 2002)、野生株・(p)ppGpp⁰株(NBS1440)、NBS2381(*rpoB*A622V)の RHX 添加・非添加条件における RPKM 値を Heat Map にて比較した。RHX 添加条件では、過去に報告されていた(p)ppGpp 依存的に発現上昇する遺伝子群は野生株では高く、(p)ppGpp⁰株では低い傾向が見られた。NBS2381(*rpoB* A622V)では、これらのうち、ほぼ全ての遺伝子が(p)ppGpp⁰株よりも

高い傾向が見られた(Fig. 2-4A)。一方で、同条件において、過去に報告されていた (p)ppGpp 依存的に発現上昇する遺伝子群は、野生株では低く、(p)ppGpp⁰ 株では高い傾向が見られた。NBS2381(*rpoB* A622V)では、(p)ppGpp⁰ 株よりも発現が減少している遺伝子が多く見られた(Fig. 2-4B)。以上の結果から、抑圧変異 *rpoB* は、緊縮応答を部分的に模倣する遺伝子発現変化を生じさせていることが示唆される。

さらに、RHX 非添加条件においても NBS2381(*rpoB* A622V)では、(p)ppGpp 依存的に発現上昇する遺伝子群の多くは、野生株、(p)ppGpp⁰ 株と比較して顕著に高く、一方で(p)ppGpp 依存的に発現減少する遺伝子群の殆どが、野生株、(p)ppGpp⁰ 株と比較して顕著に低い傾向が見られた(Fig. 2-4C and 2-4D)。このことから、抑圧変異 *rpoB* による緊縮応答を部分的に模倣する遺伝子発現変化は、恒常的に生じていることが示唆された。

NBS2386(*prs* I148S)では、(p)ppGpp⁰ 株と比較して RPKM 値が 2 倍以上上昇している遺伝子が計 599 遺伝子存在した(以下、induction cluster in *prs* suppressor)。この中には BCAA 生合成関連遺伝子 *ilvA*, *leuC* も含まれていた。さらに、(p)ppGpp-dependent induction cluster のうち、約 30%(230 遺伝子)は、induction cluster in *prs* suppressor と一致していた(Fig. 2-3C)。一方で、(p)ppGpp⁰ 株と比較して RPKM 値が 1/2 未満に減少している遺伝子は計 448 遺伝子存在した(以下、repression cluster in *prs* suppressor)。そして、(p)ppGpp-dependent repression cluster のうち、約 15%(110 遺伝子)は repression cluster in *prs* suppressor と一致していた(Fig. 2-3C)。以上の結果から、NBS2381(*rpoB* A622V)ほど強い傾向ではないものの、NBS2386(*prs* I148S)においても緊縮応答を一部模倣する遺伝子発現変化が生じていることが示唆される。Fig. 2-2C-E における HPLC 解析の結果を踏まえると、NBS2386 において見られた緊縮応答を一部模倣する遺伝子発現変化は、抑圧変異 *prs* による GTP 絶対量の低下に起因することが考えられる。

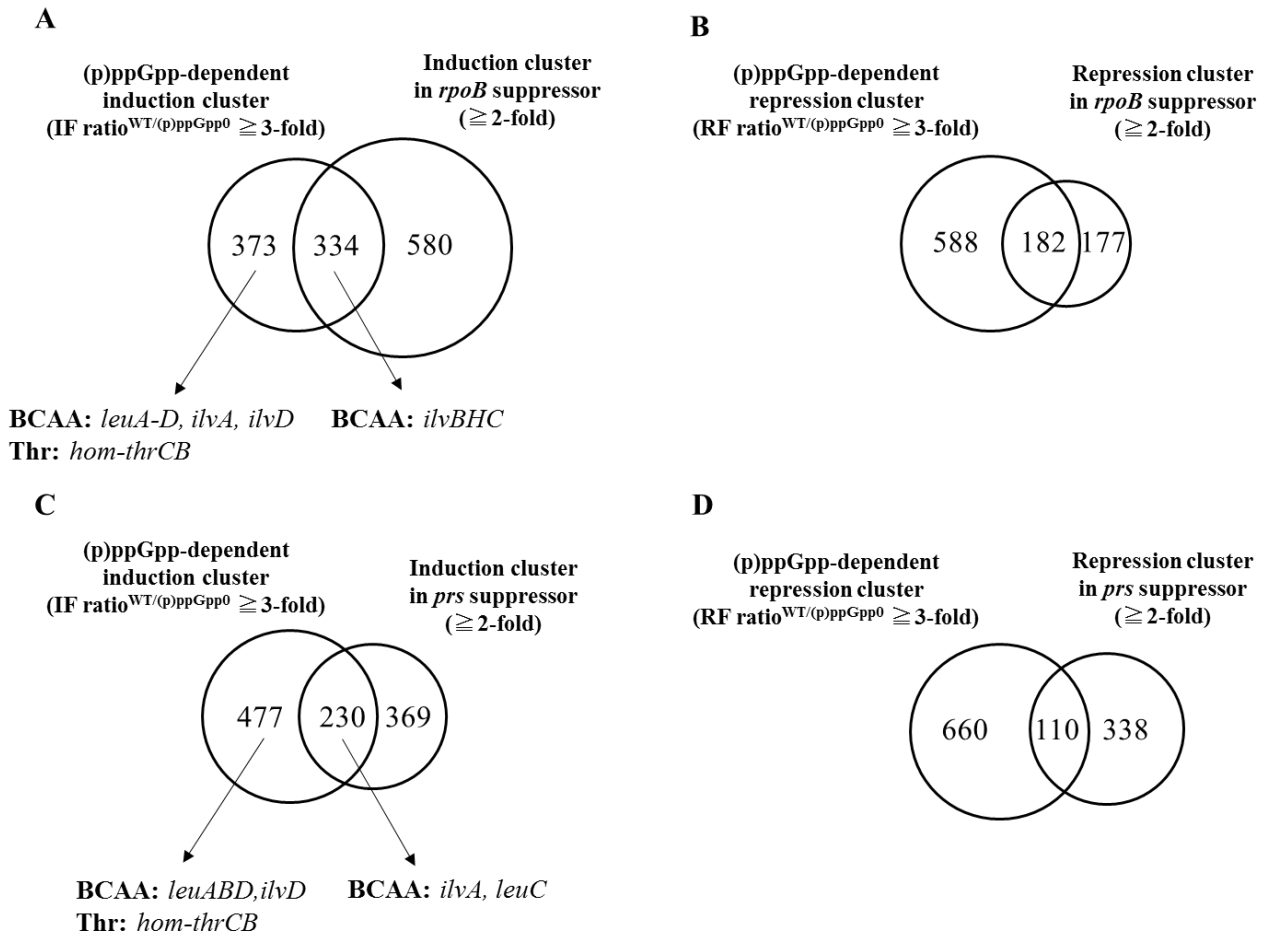


Fig. 2-3 アミノ酸飢餓誘導条件(RHX+ 10 min)における(p)ppGpp、抑圧変異 *rpoB*, *prs* (NBS2481[*rpoB* A622V], NBS2486[*prs* I148S])によって mRNA 量に変化していた遺伝子クラスターの比較

- A. (p)ppGpp-dependent induction cluster と induction cluster in *rpoB* suppressor との比較。
- B. (p)ppGpp-dependent repression cluster と repression cluster in *rpoB* suppressor との比較。
- C. (p)ppGpp-dependent induction cluster と induction cluster in *prs* suppressor との比較。
- D. (p)ppGpp-dependent repression cluster と repression cluster in *prs* suppressor との比較。

*IF ratio, RF ratio の算出方法は巻末参照。

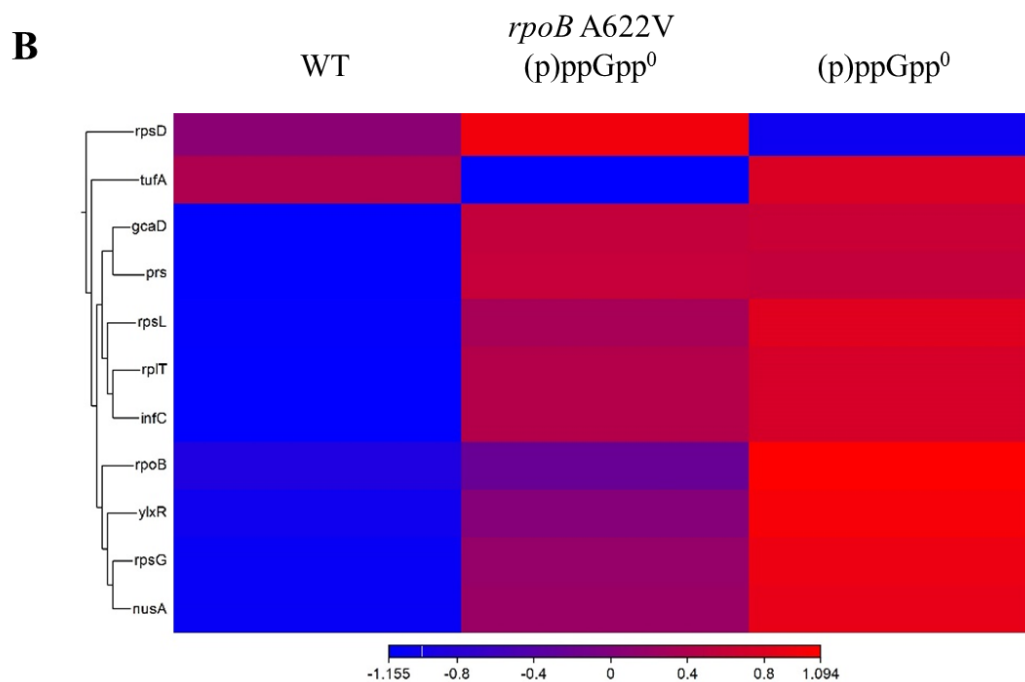
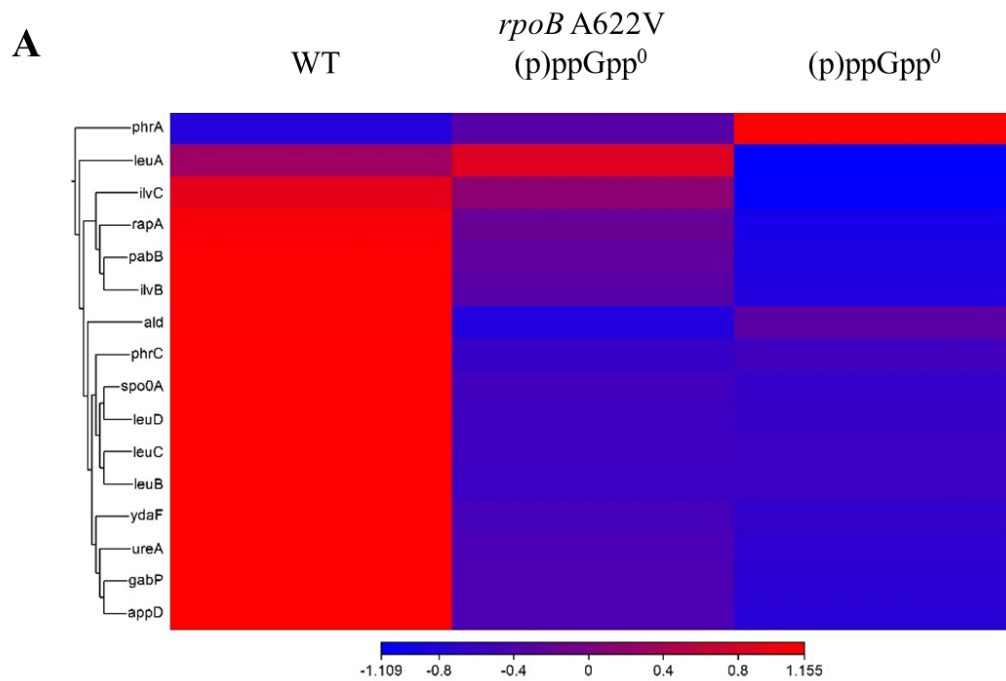


Fig. 2-4 (A, B) アミノ酸飢餓誘導条件(RHX+ 10 min)における(p)ppGpp 依存的に顕著に発現変化する遺伝子群(Eymann et al., 2002)の Heat Map: 野生株(WT)、(p)ppGpp 株(NBS1440)、*rpoB*(A622V) (p)ppGpp⁰ 株(NBS2481)

A: (p)ppGpp 依存的に顕著に発現促進されることが報告されている遺伝子群。

B: (p)ppGpp 依存的に顕著に発現抑制されることが報告されている遺伝子群。

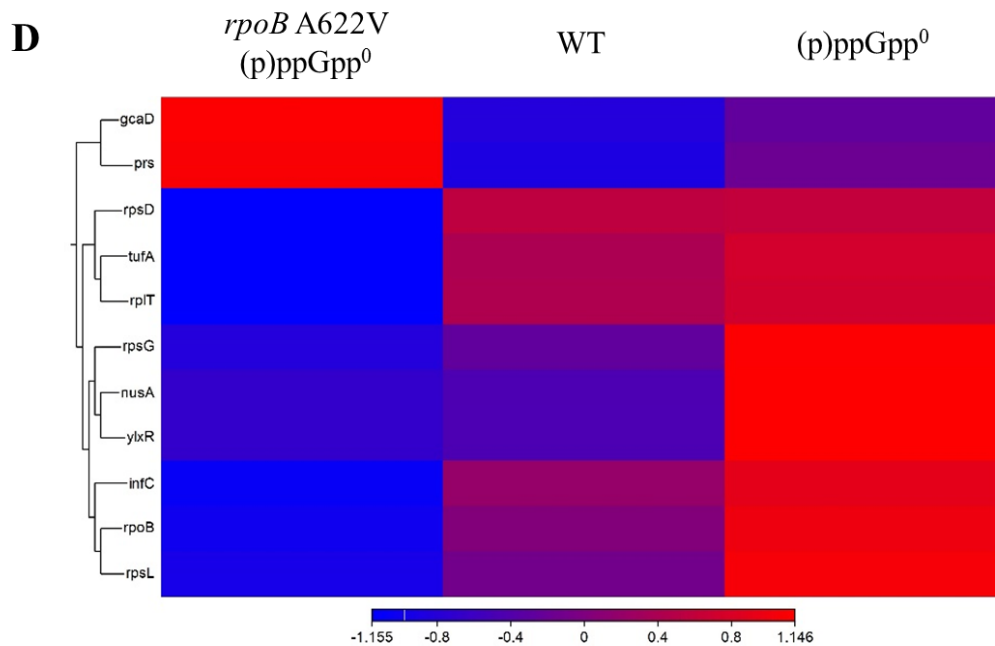
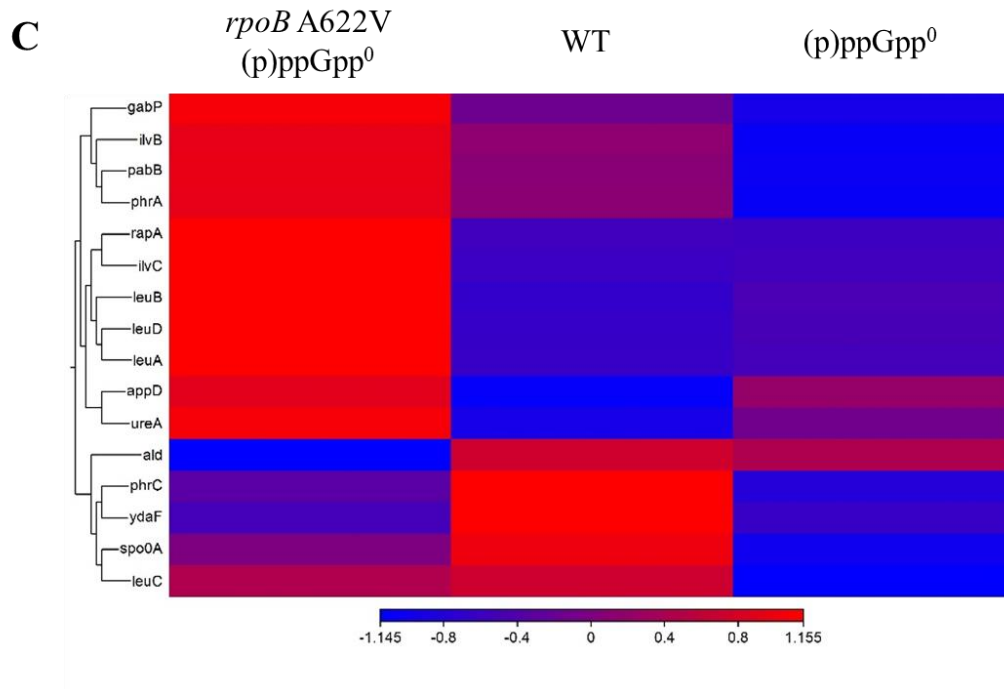


Fig. 2-4 (C, D) アミノ酸飢餓非誘導条件(RHX- 10 min)における(p)ppGpp 依存的に顕著に発現変化する遺伝子群(Eymann et al., 2002)の Heat Map: 野生株(WT)、(p)ppGpp 株(NBS1440)、*rpoB*(A622V) (p)ppGpp⁰ 株(NBS2481)

C: (p)ppGpp 依存的に顕著に発現促進されることが報告されている遺伝子群。

D: (p)ppGpp 依存的に顕著に発現抑制されることが報告されている遺伝子群。

第四節 考察

1. 抑圧変異 *prs* について

Prs は ribose-5P からプリンヌクレオチド生合成の *de novo* 経路、*salvage* 経路、両方の経路の基質である PRPP を合成する反応を担っている (Fig. 1-3)。本研究において同定した抑圧変異 *prs*(R305C, I148S) を野生株に導入した株 (NBS2394, NBS2395) では、*Prs* の発現量が野生株と比較して同等か上昇していた (Fig. S1A and S1B)。このことから、抑圧変異は *Prs* の質的に影響するものであったことが示唆される。さらに、抑圧変異が同定されたアミノ酸残基 (Arg305, Ile148) は、いずれも *Prs* の酵素活性に重要な regulatory site の近傍に位置するものであった (Eriksen *et al.*, 2000; Fig. 2-5A)。以上のことから、抑圧変異 *prs* は *Prs* の機能を低下させるものであったことが考えられる。そして、プリンヌクレオチド生合成の大元の基質である PRPP が減少したことにより、GTP 生合成に対して間接的に影響を及ぼしていたと推察される。即ち、抑圧変異 *prs* によって GTP を含むプリンヌクレオチド生合成全体の生合成が低下したことが、(p)ppGpp 合成を欠失した background におけるアミノ酸飢餓への適応性の回復に寄与していたことが考えられる。細胞内 GTP 量が低下するという点では、既知の GTP 生合成経路関連遺伝子の抑圧変異と、(p)ppGpp⁰ 株の生育阻害を抑圧するメカニズムと同じであるが、抑圧変異 *prs* の場合、GTP 生合成のみならず ATP 生合成にも影響を及ぼすこと、緊縮応答における枯草菌での知見で、(p)ppGpp の標的とされる GTP 生合成とは異なる対象が変化した結果、アミノ酸飢餓への適応性を回復させたといった点が、異なっている。即ち、過去の知見における「(p)ppGpp が GTP 生合成を直接制御することが環境変化への適応に重要である」とする定説では、抑圧変異 *prs* によってアミノ酸飢餓へ適応したメカニズムは、完全には説明できない。さらに、過去に行われたアミノ酸飢餓誘導条件におけるメタボローム解析の結果では、(p)ppGpp は GTP 生合成経路の中間代謝産物のみならず、その上流のプリンヌクレオチド生合成経路における中間代謝産物の量にも影響を与えていることが示されている (Kriel *et al.*, 2012)。これらを踏まえると、緊縮応答において (p)ppGpp は、GTP 生合成を直接制御するだけでなく、その上流のプリンヌクレオチド生合成も制御しており、アミノ酸飢餓等の環境変化へ適応するための生理的機能を持っていることが推察される。実際に、近年大腸菌において、(p)ppGpp の新たな標的として、プリンヌクレオチド生合成 *de novo* 経路の初発酵素 PurF が同定されており、(p)ppGpp による PurF の活性制御は、RNAP に対するし制御と同様に、増殖に対して生理的影響を及ぼすものであることが示唆されている (Wang *et al.*, 2018)。本研究では *purF* にも抑圧変異を同定しており (NBS2377: *sup2*)、この変異は PurF の活性中心である Cys12 に隣接する Glu11 が Gly へと変化するものであつ

た(Table 1)。このことから、本研究で同定した抑圧変異 *purF* は、PurF の酵素活性を低下させるものであることが推察される。以上の事実を統合すると、大腸菌と同様に枯草菌においても、(p)ppGpp は PurF(または Prs)を標的としてプリンヌクレオチド生合成を制御しており、GTP 生合成の直接的な制御に加えて、環境変化に対する適応に重要な機能を担っていることが考えられる。

2. 抑圧変異 *rpoB/C* について

大腸菌とは異なり、枯草菌では(p)ppGpp は RNAP に作用しないことが示唆されており(Krásný and Gourse, 2004)、過去の報告でも大腸菌で(p)ppGpp⁰株の抑圧変異として同定されていた *rpoB/C* は、枯草菌(p)ppGpp⁰株の場合は同定されなかった(Kriel et al., 2012)。これらのことから、大腸菌における(p)ppGpp による RNAP の制御に代わって、枯草菌では、(p)ppGpp は GTP 生合成を制御することが環境変化への適応に重要であると考えられていた。これに対して、本研究では、枯草菌(p)ppGpp⁰株においても、*rpoB/C* に抑圧変異が同定された。RNAP β/β' subunit のアミノ酸配列において、過去に大腸菌にて(p)ppGpp⁰株の抑圧変異が同定されたアミノ酸残基と、本研究にて同定した枯草菌(p)ppGpp⁰株の抑圧変異とを比較すると、いずれも一致するものは存在しなかった(Fig. 2-7)。大腸菌において緊縮応答時に転写因子 DksA は(p)ppGpp と協調的に働くことが報告されているが(Paul et al., 2004)、枯草菌は大腸菌 DksA と低い相同性を持つホモログしか持っておらず、緊縮応答に関わる機能を有していないことが報告されている(Krásný and Gourse, 2004; Traag et al., 2013)。これらの事実と本研究の結果を踏まえると、(p)ppGpp⁰株の生育阻害が *rpoB/C* 変異によって抑圧されるメカニズムは大腸菌と枯草菌とで、根本的には異なるものの、緊縮応答において遺伝子発現を転写レベルで大規模に変化させることは、環境変化に適応する上で両種に共通して重要であると考えられる。

RNA-seq 解析の結果から、抑圧変異株 *rpoB*(NBS2381)では、緊縮応答を部分的に模倣する遺伝子発現変化が生じており、抑圧変異による RNAP の質的变化が、細胞内 GTP 量に有意な影響を及ぼすことなく、アミノ酸飢餓への適応性を回復させることが示唆された。抑圧変異株 *rpoB/C*(NBS2376, NBS2379, NBS2381)はいずれも細胞内 GTP 量の有意な低下は見られなかったことを踏まえると(Fig. 2-2E)、解析は行っていないものの、抑圧変異株 *rpoB*(NBS2381)における RNAP の質的变化による緊縮応答を部分的に模倣する遺伝子発現は、抑圧変異株 *rpoC*(NBS2376, NBS2379)においても生じていることが推察される。本研究において同定した抑圧変異 *rpoB/C*(β A622V, β' F426L, β' K323R)は、いずれも RNAP の活性に関わるアミノ酸残基の近傍に位置していた(Lane and Darst, 2010; Fig. 2-6)。これを RNA-seq 解析の結果と照らし合わせて考えると、抑圧変異 *rpoB/C* は、枯草菌における緊縮応答に応答した RNAP の状態を模倣するような質的变化が生じていることが考えられる。具体的には、GTP/ATP 濃度が変化した

際の転写開始点+1の塩基に利用されるヌクレオチド(iNTP)に依存した遺伝子発現変化を模倣する、即ち転写開始点に ATP を利用するプロモーターの転写活性は高くなる一方で、GTP を利用するプロモーターの転写活性は低くなるといった iNTP への嗜好性が生じているのではないかと予想している。実際に iNTP に依存する promoter を用いた *in vivo* での転写解析を行った結果、抑圧変異 *rpoB/C* を導入した株では、野生株と比較して、同一プロモーターであっても転写開始点+1G のものより+1A のものの転写活性が有意に高くなる結果が得られている(令和元年度 渡邊愛美 修士論文)。今後はこのような RNAP の質的变化が起きていることを *in vitro* において検証することが必要であると考えている。

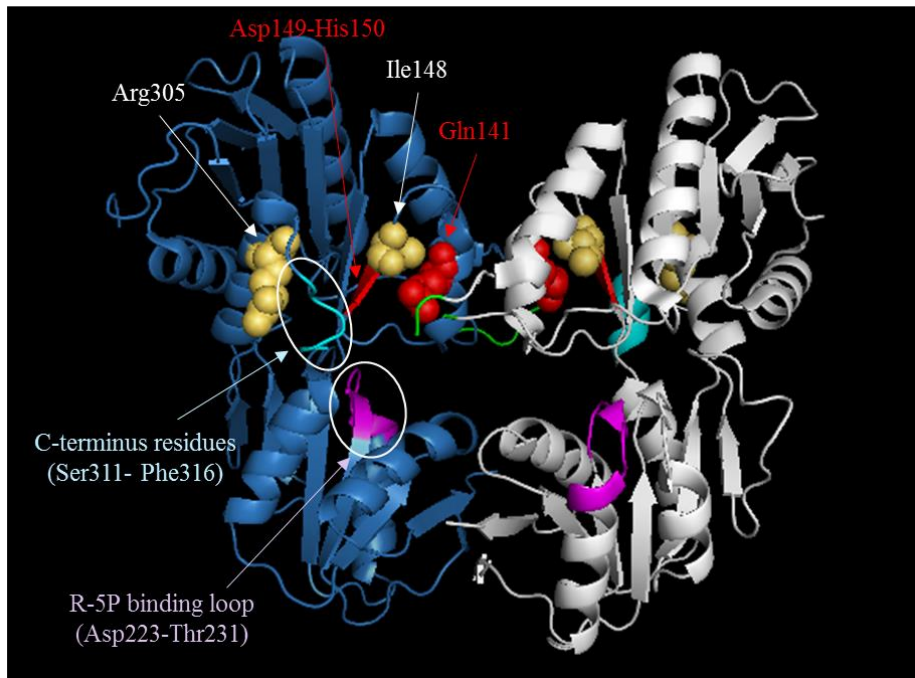


Fig. 2-5 Prs ホモ二量体構造(PDB: 1DKR)における抑圧変異(I148S, R305C)の位置
各サブユニットを青色、白色で示した。抑圧変異が生じたアミノ酸残基は黄色の分子構造で示した。酵素活性、ADP によるアロステリック制御に関与する構造(Eriksen et al., 2000)は以下の色の分子構造で示している。

- ・ マゼンタ: Ribose 5-phosphate (R5P) binding loop (Asp223-Thr231)
- ・ 緑: Flexible loop (Lys106-Arg110)
- ・ 赤: ADP の結合に関与する regulatory site(Gln141, Asp149, and His150)及び Gln141 と相互作用することが予想される Ile148

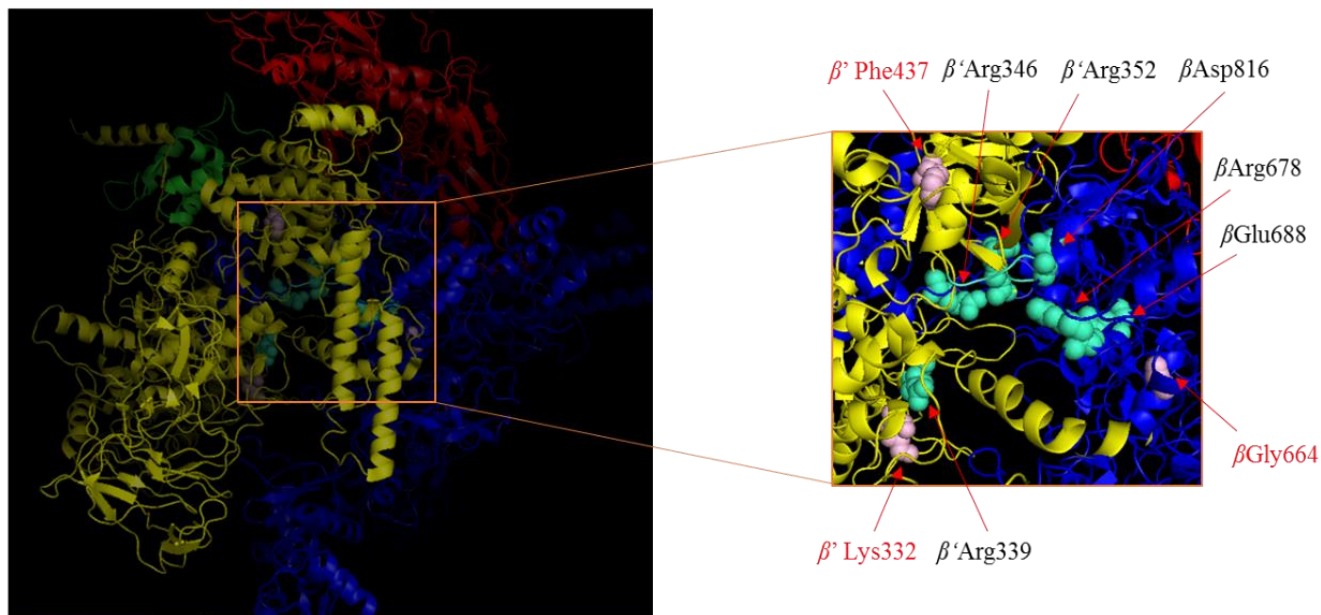


Fig. 2-6 大腸菌 RNAP 結晶構造における抑圧変異(β A622V, β' K323R, β' F426L)の位置
RNAP の各サブユニットを以下の色で示している。

赤: α subunit、青: β subunit、黄: β' subunit、緑: ω subunit

抑圧変異が生じたアミノ酸残基は light pink の分子構造で示している。加えて以下の構造また機能に関わる重要なアミノ酸残基については、green cyan の分子構造で示している (アミノ酸はいずれも大腸菌 RNAP のものを表している)。

- β' Arg339、 β' Arg346、 β' Arg352: Switch2 ドメインに位置し、鋳型 DNA のリン酸骨格と直接相互作用する(Lane and Darst, 2010)
- β Arg678、 β Gln688: RNAP 活性中心を構成する必須なアミノ酸残基。 β Arg678 は新規 RNA 鎖を合成するために取り込まれた NTP と直接相互作用する。一方で、 β Gln688 は転写産物の RNA 骨格と相互作用する(Basu et al., 2014)。
- β Asp460: Mg^{2+} が結合する。

A

H447R, L448I
ΔD446-L448 R454H,L

367	AYIEEEIKN---ITPADIISISYFFNLLHGVGDTDDIDHLGNRRIRSVGELLQNFQFRIG	423
	+ + EEI+ ++ DII + ++ +G G+ DDIDHLGNRR+RSVGE+ +NQFR+G	
408	SLLRREEIEGSGIISKDDIIDVMKKLIDIRNGKGEVDDIDHLGNRRIRSVGEMAENQFRVG	467
	L420R R451C	
424	LSRMERVVRRERMSIQDTNTITPQQLINIRPVIASIKEFFGSSQLSQFMDQTNPLAELTHK	483
	L R+ER V+ER+S+ D +T+ PQ +IN +P+ A++KEFFGSSQLSQFMDQ NPL+E+THK	
468	LVRVERAVKERLSLGDLDLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHK	527
	S531F, A532E, L533P, G534S S522F	
484	RRISALGEGGLTRERAGMEVRDVHYSHYGRMCPIETPEGPNIGLINSLSYAKVNRFGFI	543
	RR+SALGEGGLTRERAG EVRIVH +HYGR+CPIETPEGPNIGLINSLS YA+ N +GF+	
528	RRISALGEGGLTRERAGFEVRDVHPTHYGRVCPPIETPEGPNIGLINSLSVYAQTNEYGFL	587
	G536V, G537D V550E, H551P, Y.L T563P, P564L L571Q, I572S	
544	ETPYRRVDPETGKVTGRIDYLTAEEDNYVVAQANARLDDEGAFIDDSIVARFRGENTVV	603
	ETPYR+V G VT I YL+A EE NYV+AQAN+ LD+EG F++D + R +GE+++	
588	ETPYRKV--TDGVVTDEIHYLSAIEEGNYVIAQANSNLDEEGHFVEDLVTCSRKSGESSLF	645
	A622V	
604	SRNRVDYMDVSPKQVVSAAITACIPFLENDNSNRALMGANMQRQAVPLMQPEAPFVGTGME	663
	SR++VDYMDVS +QVVS + IPFLE+DD+NRALMGANMQRQAVP ++ + P VGTGME	
646	SRDQVDYMDVSTQQVVSVCASLIIPFLEHDDANRALMGANMQRQAVPTLRADKPLVGTGME	705

B

ΔT212-A217,
ΔK215-R220

187	EVDMLKEEL-KTSQQRRTRAIKRLEVLEAFRNSGNKPSWMILDVLPVIPPRLPMVQLD	245
	E + L+EEL +T+ +R + KR+++LEAF SGNKP WMIL VLPV+PP+LRP+V LD	
197	ECEQLREELNETNSETKRKKLTKRIKLEAFVQSGNKPEWMILTLPVLPDLRPLVPLD	256
	ΔL201-E204	
246	GGRFATSDLNDLYRRVINRNNRLKRLDLGAPSIIVQNEKRMLQEAVDALIDNGRRGRPV	305
	GGRFATSDLNDLYRRVINRNNRLKRLDL AP IIV+NEKRMLQEAVDAL+DNGRRGR +	
257	GGRFATSDLNDLYRRVINRNNRLKRLDLAAPDIIVRNEKRMLQEAVDALLDNGRRGRAI	316
	D264Y K323R	
306	TGPGNRPLKSLSHMLKQGRFRQNLGKRVDSGRSVIVVGPPLKMYQCGLPKEMALEL	365
	TG RPLKSL+ M+KQGRFRQNLGKRVDSGRSVI VGP+L+++QCGLPK+MALEL	
317	TGSKNRPLKSLADMIKQGRFRQNLGKRVDSGRSVITVGPYLRLHQCGLPKMALEL	376
	ΔR312-R314	
366	FKPFVMKELVEKGLAHNIKSAKRKIERVQPEVWDVLESVIKEHPVLLNRAPTLHRLGIQA	425
	FKPF+ +L +GLA IK+AK+ +ER + VWD+L+ VI+EHPVLLNRAPTLHRLGIQA	
377	FKPFIYGKLELRGLATTIKAAKMVEREEAVVWDILDEVIREHPVLLNRAPTLHRLGIQA	436
	F426L L432R	
426	FEPFTLVEGRAIRLHPLVCTAYNADFQDQMAVHVPLSAEAQAEARILMLAAQNILNPKDG	485
	FEP L+EG+AI+LHPLVC AYNADFQDQMAVHVPL+ EAQ EAR LM++ NIL+P +G	
437	FEPVLTIEGKAIQLHPLVCAAYNADFQDQMAVHVPLTLEAQLERALMMSTNNILSPANG	496
	A494E,V	
486	KPVVTPSQDMVLGNYLTLERAGAVGEGMVFKNTEALLAYQNGYVHLHTRVAVAAANSL-	544
	+P++ PSQD+VLG YY+T + A GEGMV EA Y++G LH RV V	
497	EPIIIVPSQDVVLGLYMTTRDCVNAKGEGMVLTPGKEAERLYRSGLASLHARVKVRITEYE	556
	P502L	

Fig. 2-7 枯草菌及び大腸菌の RNAP コア酵素β/β' subunit のアミノ酸配列と(p)ppGpp⁰株の抑圧変異として同定されたアミノ酸残基の比較

アミノ酸配列のアライメントは BLASTP を用いて行い、β subunit については A、β' subunit については B に結果を示した(<https://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>)。

各アライメントの上段は *B. subtilis*、下段は *E. coli* のアミノ酸配列を示している。過去に大腸菌(p)ppGpp⁰株の最少培地で示す生育阻害を抑圧する変異として同定されたアミノ酸残基(Bartlett *et al.*, 1998; Hernandez and Cashel, 1995; Laurie *et al.*, 2003; Murphy and Cashel, 2003; Rutherford *et al.*, 2009; Szalewska-Palaza *et al.*, 2007; Trautinger and Lloyd, 2002; Zhou and Jin, 1998)を青枠で示し、上部に同定されたアミノ酸変異を表記している。一方で、枯草菌 (p)ppGpp⁰株の最少培地で示す生育阻害を抑圧する変異を同定したアミノ酸残基を赤枠で示し、上部にアミノ酸変異を表記している。

第三章 (p)ppGpp⁰ 株の生育回復をメチオニンが阻害する効果(メチオニン感受性)とその原因の解析

第一節 序

第一章において、(p)ppGpp⁰ 株の最少培地における生育阻害を抑圧する変異株をスクリーニングした結果、過去の報告では同定されなかった *de novo* GTP 生合成には直接関与しない新規な抑圧変異を同定した。その原因について、本研究と過去の研究との相違点を考えると、過去の抑圧変異株のスクリーニング条件では、**background strain** が持つ要求性から、メチオニンを添加した最少培地が用いられていたことが挙げられる。この相違点を踏まえて、本章では、細胞内 GTP の量的制御に関わる新たな知見に繋がると考え、メチオニンが新規抑圧変異による生育回復効果に対して阻害的に作用する可能性について検証した。

第二節 材料と方法

1. Strains

Strain Name	Genotype*	Source
wt168	<i>trpC2</i>	Laboratory stock
NBS1440	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2384	<i>trpC2 prs R305C ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2385	<i>trpC2 prs I148S ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2376	<i>trpC2 rpoC F426L ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2379	<i>trpC2 rpoC K323R ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2381	<i>trpC2 rpoB A622V nasD V16G coaA A 86G ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2387	<i>trpC2 gmk Y35S ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS3474	<i>trpC2 ΔyxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study
NBS3475	<i>trpC2 rpoC1276T>C-cat</i>	This study
NBS3476	<i>rpoC968A>G-cat</i>	This study
NBS3477	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC ΔyxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study
NBS3478	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC rpoC1276T>C-cat</i>	This study
NBS3479	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC rpoC968A>G-cat</i>	This study
NBS2337	<i>trpC2 ΔcodY::spc</i>	This study
NBS3486	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC ΔcodY::spc</i>	This study
NBS3487	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC ΔcodY::spc ΔyxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study
NBS2409	<i>trpC2 metB10 xin-1, SPβ ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study ^a
NBS3488	<i>trpC2 metB10 xin-1, SPβ ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc prs913C>T-cat</i>	This study
NBS2410	<i>trpC2 metB10 xin-1, SPβ ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc prs443T>G-cat</i>	This study
NBS3489	<i>trpC2 metB10 xin-1, SPβ ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc gmk104A>C-cat</i>	This study
NBS3490	<i>trpC2 metB10 xin-1, SPβ ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc ΔyxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study
NBS3491	<i>trpC2 metB10 xin-1, SPβ ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc rpoC1276T>C-cat</i>	This study
NBS3492	<i>trpC2 metB10 xin-1, SPβ ΔrelA::erm ΔyjbM::tet</i>	This study

	<i>ΔywaC::spc rpoC968A>G- cat</i>	
NBS2375	<i>trpC2 amyE::P_{ilvBHC-leuABCD-lacZ} cat</i>	※1
NBS2507	<i>trpC2 amyE::P_{ilvBHC-leuABCD-lacZ} cat::spc ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC ΔybxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study

*NBS2477 より取得したメチオニン感受性を相補する抑圧変異株のうち、次世代シーケンサーによる Mapping 解析またサンガーシーケンスにより抑圧変異(*codY*)を同定した株は、Table2 に載せている。

^aNBS2409 の親株(*trpC2 metB10 xin-1, SPβ*)は、立教大学・河村富士夫名誉教授より分与いただいた。

※1 立教大学・河村富士夫名誉教授より分与いただいた。NBS2505 もこの株を元に作成。

2. Primers

Primer	Primer Sequence (5'-3')
codY 11	TGGAGCAGATGGGTATGAACA
codY 12	TTTGAATTTAGATAAATAATCCTCCTAAACATTCCTCAT
codY Plessspcfor	ATTATTTATCTAAATTCAAAAATTATATGG
codY Plessspcprev	ATTAATGAGATTACTAGGCCTAATTGAGAGAAG
codY 23	GGCCTAGTAATCTCATTAATCACAAAAGAACCCTT
codY 24	GCCGATGCTGAAACATTTAAGC
codY seqfor	TGTCGAAGAAAAGCTCGGAACG
codY seqrev	GAAAGACTTTCAACCCAGGAAATAAAGC

3. 酵素及びキット試薬・実験器具

Ex Taq DNA polymerase	(タカラバイオ株式会社)
KOD-plus- DNA polymerase	(東洋紡績株式会社)
Prime Star DNA polymerase	(タカラバイオ株式会社)
ATP	(Sigma Aldrich)
GTP	(Sigma Aldrich)
Kinetix 2.6μm 分析カラム C18 150 4.6×2.6um	(株式会社島津ジーエルシー)

4. 培地

CI 培地(0.004% casamino acid) : 枯草菌の前培養 (巻末参照)

*(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)を MM+7aa 培地にて培養する前の前培養をする時のみ 0.001% casamino acid に変更した。

最少培地(Spizizen's minimal salts medium) (巻末参照)

*メチオニンをはじめとするアミノ酸を添加するなどした、最少培地の派生培地を本章では多数使用しているが、組成は各 Figure の legend にて記載しているため割愛する。

5. 枯草菌からのゲノム抽出 (巻末参照)

6. 遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊用の断片の作製は、全て Ex taq DNA polymerase を用いて増幅した。作製した遺伝子破壊用断片を枯草菌コンピテントセルに形質転換した (巻末参照)。

7. 最少培地における spot test (巻末参照)

8. ATP・GTP 量の HPLC 解析 (巻末参照)

第三節 結果

1. 最少培地における新規抑圧変異株の生育に対するメチオニン添加の効果の検証

抑圧変異株 *prs*(NBS2384, NBS2386)、*gmk*(NBS2387)、*rpoB/C*(NBS2376, NBS2379, NBS2381)について、最少培地メチオニン添加、非添加条件における生菌率を比較した。その結果、抑圧変異株 *rpoB/C*(NBS2376, NBS2379, NBS2381)において、メチオニン添加によって生菌率は(p)ppGpp⁰株(NBS1440)と同様に 10⁻¹未満に低下した(Fig. 3-1A left and middle)。一方で、抑圧変異株 *prs*, *gmk*では、メチオニンの有無によって生菌率に殆ど差が見られなかった(Fig. 3-1B left and middle)。さらに、メチオニン添加による生育阻害は、野生株に抑圧変異 *rpoB/C*を導入した株(NBS3474, NBS3475, NBS3476)では見られなかった(Fig. 3-1C)。以上の結果はメチオニン添加による生育阻害は、*rpoB/C*に変異が生じたことで誘発されたものではなく、抑圧変異 *rpoB/C*による(p)ppGpp⁰株の最少培地における生育回復効果を打ち消すものであることが示唆された。以下、この阻害効果をメチオニン感受性とする。

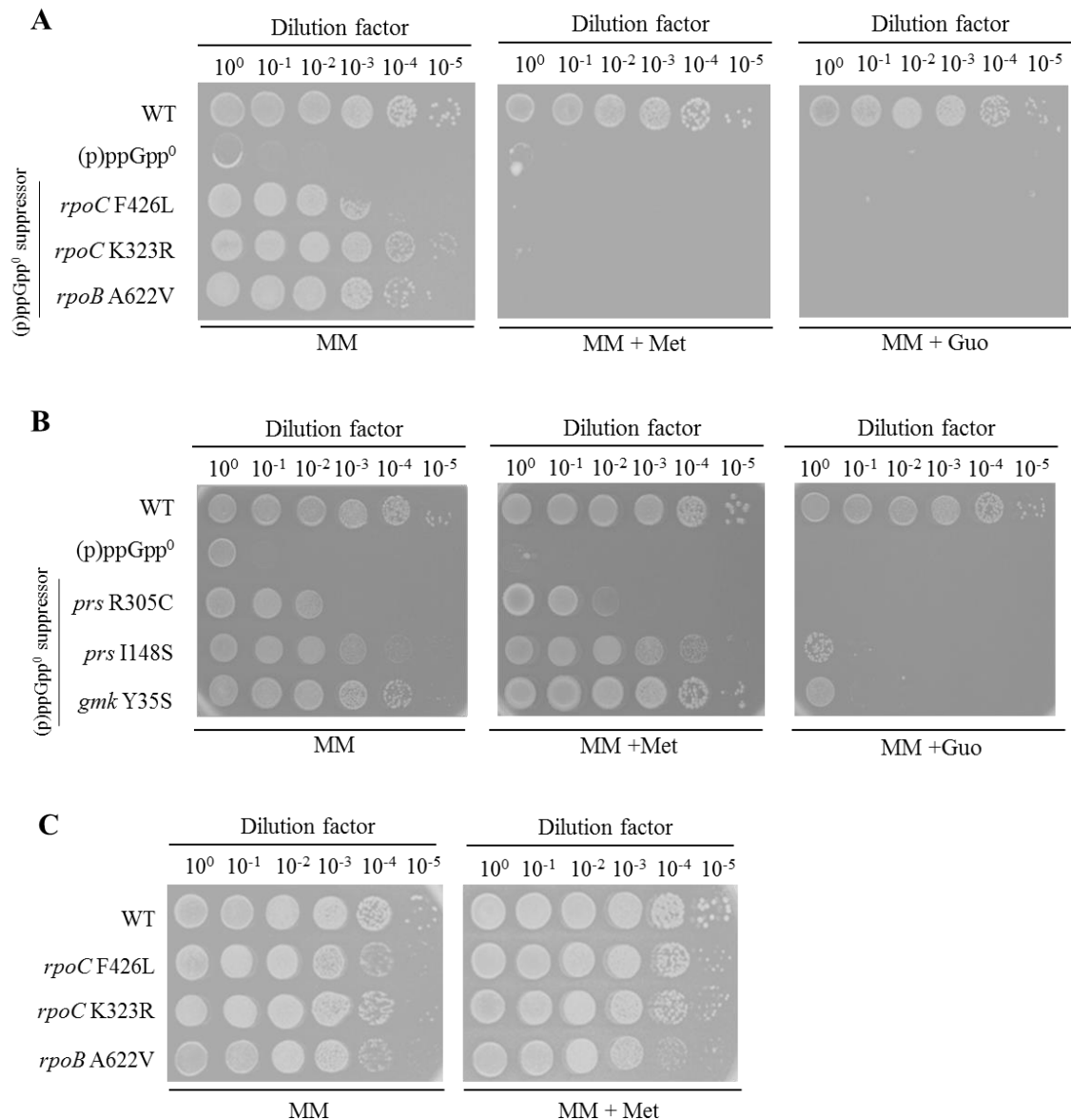


Fig.3-1 最少培地メチオニン添加・非添加(guanosine 添加)条件における生菌率

A, B. (p)ppGpp⁰ 抑圧変異株の生菌率。左：最少培地(MM) +0.2% casamino acid (CAA)、中央：最少培地 +0.05 mg/ml Met 右：最少培地 +0.1mM guanosine(Guo)。

A. NBS2376: *rpoC*(F426L), NBS2379: *rpoC*(K323R), and NBS2381: *rpoB*(A622V)

B. NBS2384: *prs*(R305C), NBS2386: *prs*(I148S), and NBS2387: *gmk*(Y35S)

各プレートにおいて control として野生株(WT)、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)の生菌率も示している。

C. 抑圧変異 *rpoB/C* を野生株に形質転換した株[NBS3474 (*rpoB* A622V), NBS3475 (*rpoC* F426L), and NBS3476 (*rpoC* K323R)]の生菌率。左：最少培地(MM)、右：最少培地 +0.05 mg/ml Met

2 メチオニン要求性(*metB10*)を持つ(p)ppGpp⁰ 株に対する新規抑圧変異による効果の検証

過去の研究において、抑圧変異株のスクリーニングに用いられものと同じメチオニン要求性の変異(*metB10*)を持つ(p)ppGpp⁰ 株(NBS2409)を作製した。この株に本研究にて同定した抑圧変異を back-cross した株において最少培地メチオニン添加条件(MM+Met)において、(p)ppGpp⁰ 株の生育阻害を抑圧する効果が見られるかを検証した。Fig. 3-1 におけるメチオニン非要求性株における結果と同様に、抑圧変異 *rpoB/C* を NBS2409 へ back-cross した株(NBS3490, NBS3491, NBS3492)は、生育回復が全く見られなかった(Fig. 3-2A)。一方で、抑圧変異 *prs* を NBS2409 へ back-cross した株のうち、*prs*(R305C)変異を back-cross した株(NBS3488)はメチオニン非要求性株の場合と異なり、生育回復を示さなかった。一方で、*prs*(I148S)変異、*gmk*(Y35S)変異を back-cross した株(NBS2410, NBS3489)は、メチオニン非要求性株の場合と同等の生菌率の回復が見られた(Fig. 3-2B)。以上の結果から、本研究にて同定した新規抑圧変異のうち、少なくとも *rpoB/C* における抑圧変異が同定されなかったのは、抑圧変異 *rpoB/C* は MM+Met 条件では(p)ppGpp⁰ 株の生育阻害抑圧する効果がマスクされるためであることが示唆された。また、本研究にて同定した抑圧変異 *prs* のうち一方(R305C)は、メチオニン要求性株では抑圧効果を示さなかったことから、完全には説明できないものの、*prs* の変異による(p)ppGpp⁰ 株の生育阻害を抑圧する効果も、メチオニン要求性をもつ(p)ppGpp⁰ 株では一部マスクされることが考えられる。

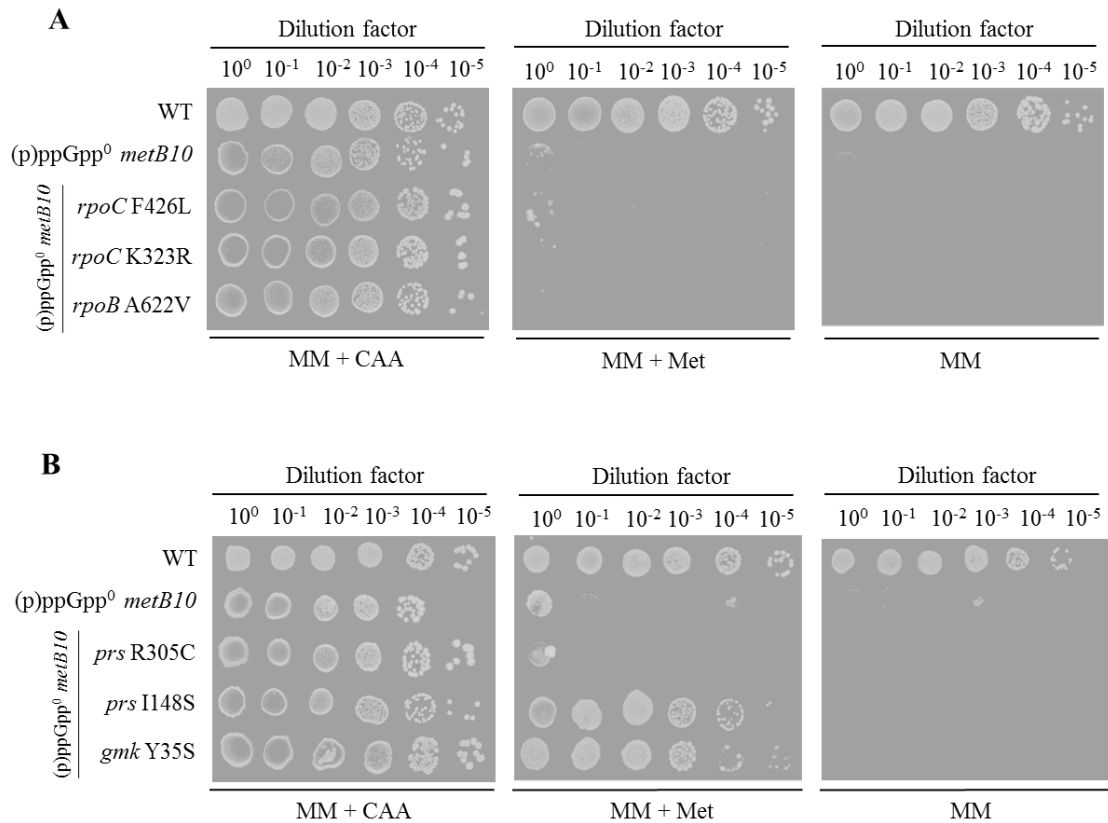


Fig.3-2 メチオニン要求性株(NBS2409 及び派生株)の最少培地における生菌率
抑圧変異 *rpoB/C*, *prs* を NBS2409 に導入した株の生菌率。左: 最少培地(MM) +0.2%
casamino acid (CAA)、中央: 最少培地 +0.05 mg/ml Met 右: 最少培地。
A. NBS3490 (*rpoBA622V*), NBS3491 (*rpoCF426L*), and NBS3492 (*rpoCK323R*)
B. NBS3488: *prs*(R305C), NBS2410: *prs*(I148S), and NBS3489: *gmk*(Y35S)
各プレートにおいて control として野生株(WT)、メチオニン要求性を持つ(p)ppGpp⁰ 株
(NBS2409)の生菌率も示している。

3 (p)ppGpp⁰ *rpoB* 抑圧変異株が示すメチオニン感受性を相補する変異株の取得と解析

抑圧変異株 *rpoB/C* が示すメチオニン感受性について、抑圧変異 *rpoB* を(p)ppGpp⁰ 株 (NBS2408)に back-cross した株(NBS3477)から、それを相補する抑圧変異株を取得することで、この原因を遺伝学的に解明することを試みた。メチオニン感受性を相補する抑圧変異株を計 27 株取得し、そのうち 4 株について次世代シーケンサーを用いた mapping 解析を行った。その結果、4 株中 3 株において、GTP 結合性転写制御因子をコードする *codY* の遺伝子内に変異が同定された。3 株に同定された変異はいずれも frameshift による事実上の遺伝子破壊が生じるものであった。さらに、この後に mapping 解析を行っていない抑圧変異株についても計 2 株、サンガーシーケンスにより *codY* ORF 内にミスセンス変異を同定した(Table 2)。codY の変異がメチオニン感受性の相補に寄与することの確認を得るために、codY を薬剤マーカーで置換するカセットを NBS3477 に導入した株(NBS3487)を作製し、MM+Met 条件における生菌率を確認した。その結果、NBS3487 株は、MM+Met 条件においても、MM Met-条件における NBS3477 株と同等の生育を示した(Fig. 2-3)。以上の結果から *codY* の欠損がメチオニン感受性を相補することが示唆された。

Table 2 Mapping 解析にて同定された *rpoB*(A622V) (p)ppGpp⁰ 株(NBS3477)のメチオニン感受性を相補する抑圧変異

Gene	Position of mutation ^a	Amino acid substitution or description of mutation
<i>codY</i>	19-20 insA	Frameshift
<i>codY</i>	193 delA	Frameshift
<i>codY</i>	226-227 insTA	Frameshift
<i>codY</i>	A277C	S93R
<i>codY</i>	T197C	L66P

^aNumbering from the start codon (ATG) from the open reading frame..

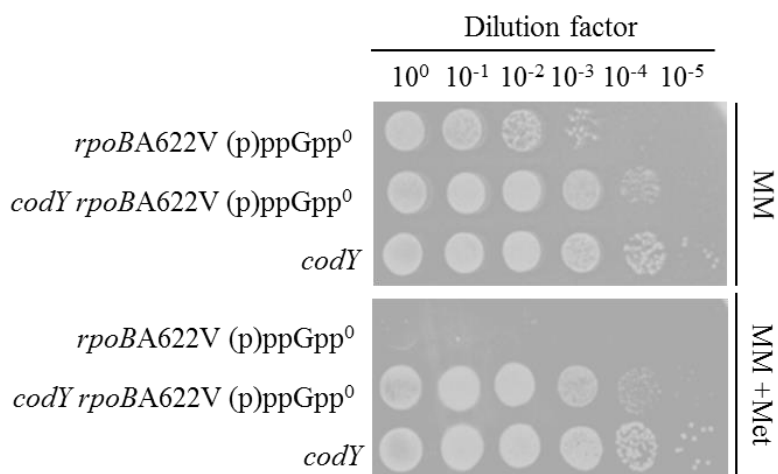


Fig. 3-3 最少培地における *codY*欠損を NBS3477 に導入した株(NBS3487)の生菌率

上段：最少培地(MM) 下段：最少培地 +0.05 mg/ml Met。

controlとして *rpoB*(A622V) (p)ppGpp⁰ 株(NBS3477)、*codY*破壊株(NBS2337)の生菌率も示している。

4 メチオニン感受性と細胞内 GTP 量との関連性の解析

Fig. 3-3 の結果から、抑圧変異株 *rpoB/C* が示すメチオニン感受性の一因として、CodY の活性化が関与していることが考えられる。CodY は GTP がエフェクターとして作用することで活性化することが知られている(Ratnayake-Lecamwasam et al., 2001; Handke et al., 2008)。このことから、メチオニン添加によって CodY が活性化するためには、細胞内 GTP 量の上昇が起きていたはずである。さらに、抑圧変異株 *rpoB/C*(NBS2376, NBS2379, NBS2381)は、いずれも最少培地に GTP salvage 合成の基質である guanosine を添加した条件では、生育阻害を示す結果が得られていた(Fig. 3-1A right)。即ち、抑圧変異株 *rpoB/C* は、細胞内 GTP 量が上昇する外的要因に対して sensitive であると考えられる。以上のことを踏まえると、メチオニン感受性が抑圧変異株 *rpoB/C* にて生じていた要因は、GTP 量の上昇に対して sensitive であるこれらの株において、メチオニン添加が細胞内 GTP 量の上昇を引き起こしていたためであることが考えられる。そこで、GTP 生合成経路における GMP 合成酵素の阻害剤 decoyinine を MM+Met 条件に添加したところ、NBS3477 が示していたメチオニン感受性は部分的に相補された(Fig. 3-4A)。さらに、最少培地・液体培養条件において、NBS3477 はメチオニン添加 4 時間後に生育阻害が見られることが確認されたため(Fig. 3-4B)、この Time point にてメチオニン添加・非添加条件における細胞内 GTP 量を HPLC にて解析したところ、野生株ではいずれの条件においても GTP/ATP 相対値に有意な差が見られなかったのに対し、NBS3477 においては、メチオニン添加条件で GTP/ATP 相対値の有意な上昇が確認された(Fig. 3-4C)。また、ここでは Fig. 2-2C における RHX+条件について NBS2381 で示された結果と同様に、NBS3477 では GTP/ATP 相対値の基レベルが野生株より高い傾向が見られた。以上の結果から、メチオニンが細胞内 GTP 量を上昇させることが、抑圧変異株 *rpoB/C* がメチオニン感受性を示す原因であることが示唆された。

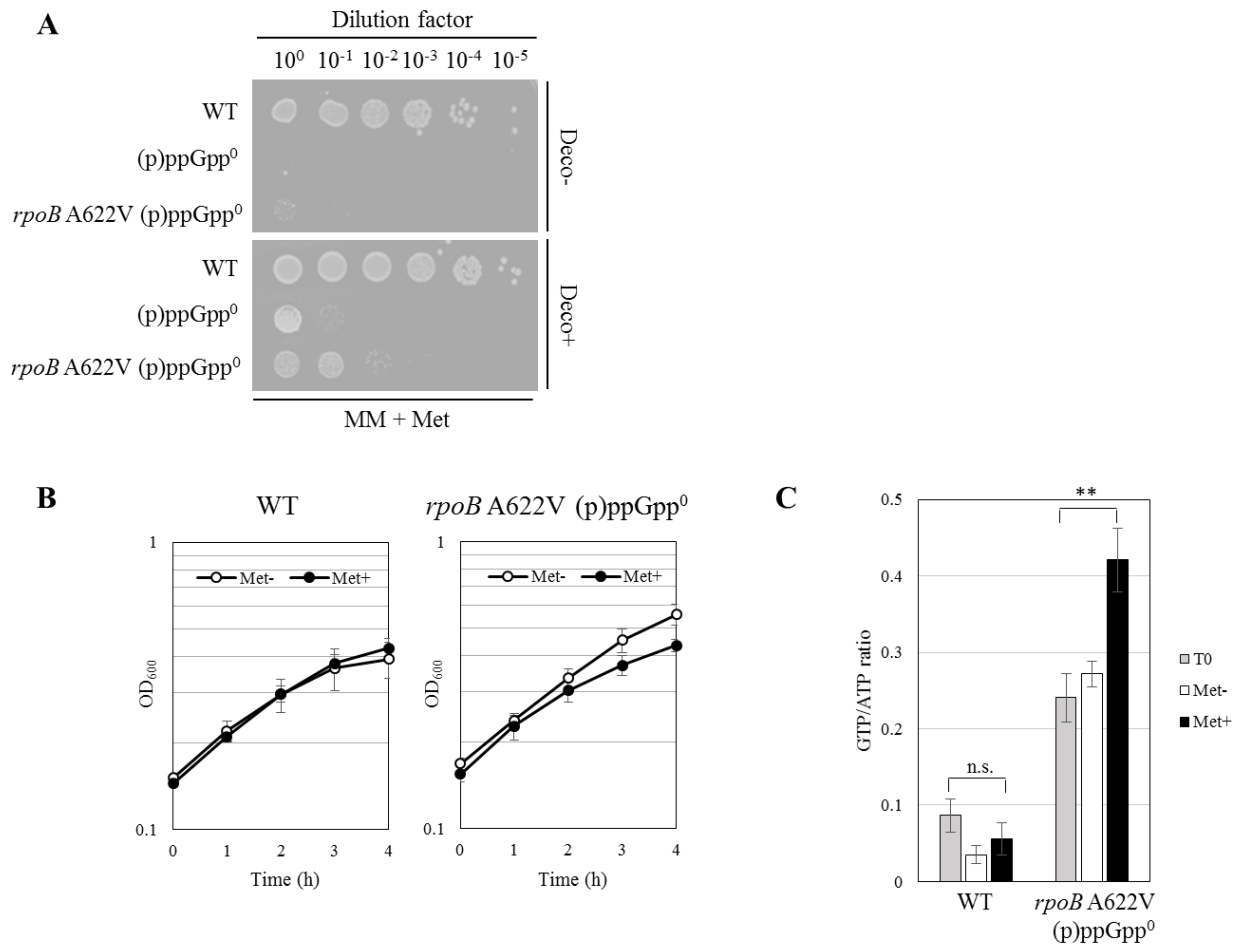


Fig. 3-4 *rpoBA622V* (p)ppGpp⁰ 株(NBS3477)におけるメチオニン感受性と細胞内 GTP との関連性

A. 最少培地(MM) + 0.05 mg/ml Met/ 0.01 mg/ml decoyinine(Deco) -/+における生菌率(野生株、(p)ppGpp⁰ 株[NBS1440]、*rpoBA622V* (p)ppGpp⁰ 株[NBS3477])。

B. 野生株(WT)、*rpoBA622V* (p)ppGpp⁰ 株(NBS3477)について、最少培地 OD₆₀₀=0.15 の時点を T0 とし、この時点で 0.05 mg/ml Met を添加(+)・非添加(-)して以降の増殖曲線を示した。

C B と同じ株と条件で T0, T4 (Met-, Met+)における GTP/ATP 相対値を HPLC で解析した結果を示した。グラフは n=3 の平均値、エラーバーは標準偏差を示している。t 検定(両側検定)にて有意差を判定した。**, $p < 0.01$; n.s., not significant ($p > 1.0$)。

5 (p)ppGpp⁰株の生育可能条件におけるメチオニンの影響の解析

次に、メチオニンが細胞内 GTP 量を上昇させることで生育を阻害する効果が、抑圧変異株特異的なものではなく、(p)ppGpp 合成能を欠失させた background において生じるものであるかを検証することとした。Fig. 1-1A にて示したように、(p)ppGpp⁰株(NBS1440)の最少培地における生育は、要求性を示す 7 つのアミノ酸(Val, Leu, Ile, Thr, Met, Arg, His,)を添加することで相補されるが、この効果は GTP *salvage* 合成の基質である guanosine の添加、即ち細胞内 GTP 量の上昇によって打ち消される(Fig. 1-1B)。同条件でメチオニンのみ添加量を過剰にした場合に、細胞内 GTP 量の上昇に起因する生育阻害が生じるかを検証した。その結果、7 つのアミノ酸を Met のみ 1000 µg/mL 添加した条件において、生菌率の有意な低下が確認された(Fig. 3-5)。この生菌率の低下は、GTP 生合成を阻害剤する decoyinine の添加によって回復したことから、メチオニン過剰添加による生育阻害は、細胞内 GTP 量の上昇に起因することが示唆された(図 5)。以上の結果から、(p)ppGpp による細胞内 GTP の量的制御の欠損が、メチオニン添加によって細胞内 GTP 量を上昇させ、生育を阻害する現象を生み出す要因であることが示唆された。

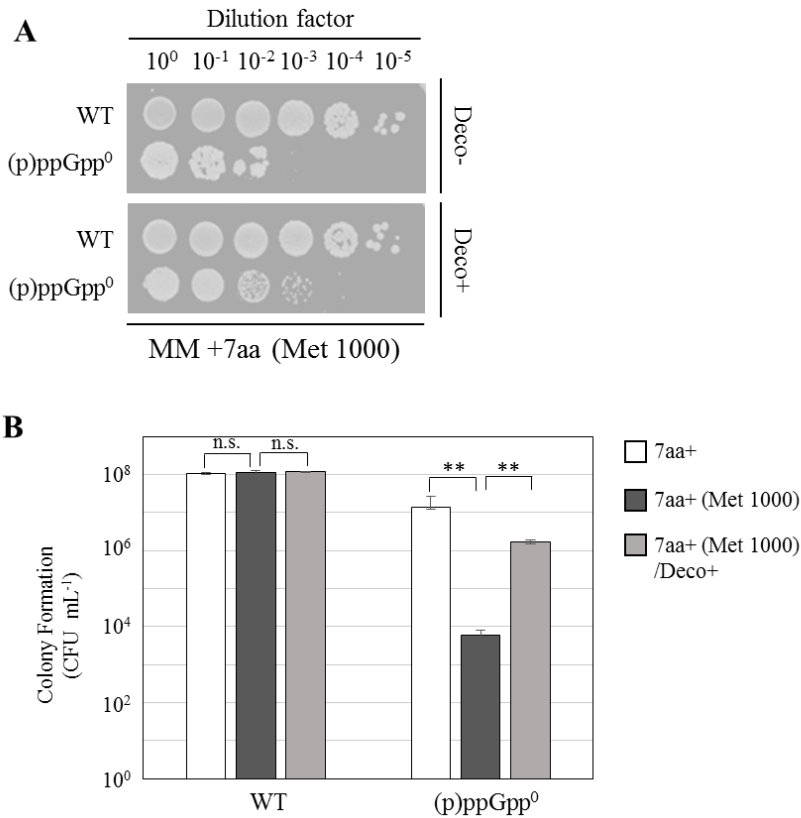


Fig. 3-5 (p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)の生育に対するメチオニン過剰添加による影響

A. 野生株、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)の生菌率: 最少培地(MM) + 0.01 mg/ml 6aa*/ 1000 mg/ml Met、最少培地 + 0.01 mg/ml 6aa*/ 1000 mg/ml Met/ 0.01 mg/ml decoyinine(Deco)。

*6aa: Val, Leu, Ile, Thr, His, Arg

B. 野生株、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)の colony forming unit (CFU /ml): 最少培地 +0.01mg/ml 7aa、最少培地 + 0.01 mg/ml 6aa*/ 1000 mg/ml Met、最少培地 + 0.01 mg/ml 6aa*/ 1000 mg/ml Met/ 0.01 mg/ml decoyinine(Deco)。t 検定(両側検定)にて有意差を判定した。**, $p < 0.01$; n.s., not significant ($p > 1.0$)。

6 メチオニン以外の緊縮応答に関連するアミノ酸の影響の解析

これまでメチオニンが(p)ppGpp⁰株または抑圧変異株 *rpoB/C*において細胞内 GTP 量の上昇に起因する生育阻害を引き起こすことを示してきたが、この効果がメチオニン特異的なものであるかは未解明である。そこで、メチオニンの他の緊縮応答において生合成が促進されるアミノ酸 6 種(Val, Leu, Ile, Thr, His, Arg)について、Fig. 3-5 と同様の過剰添加による(p)ppGpp⁰株(NBS1440)の生育に対する影響を検証した。その結果、Val, Leu, Ile(以下、BCAA)それぞれを過剰添加することでも(p)ppGpp⁰株(NBS1440)の生育は阻害され、このうち Val, Leu についてはメチオニン同様に decoyinine の添加によって生育阻害が部分的に相補された(Fig. 3-6A-C)。一方で、他のアミノ酸(Thr, His, Arg)を過剰添加した場合は影響が見られなかった(Fig. 3-6D-F)。BCAA は、GTP と同様に CodY のエフェクターとして作用することが報告されている(Shivers and sonenshein, 2004)。また、BCAA 過剰添加による生育阻害は、*codY*欠損によって相補されることが確認された(Fig. S3)。CodY の活性が(p)ppGpp⁰株においてアミノ酸飢餓への適応性に寄与することも示唆されており(Kriel et al., 2014)、これらのことを踏まえると、BCAA 過剰添加による(p)ppGpp⁰株の生育阻害は、CodY の過剰な活性化に起因することが考えられる。

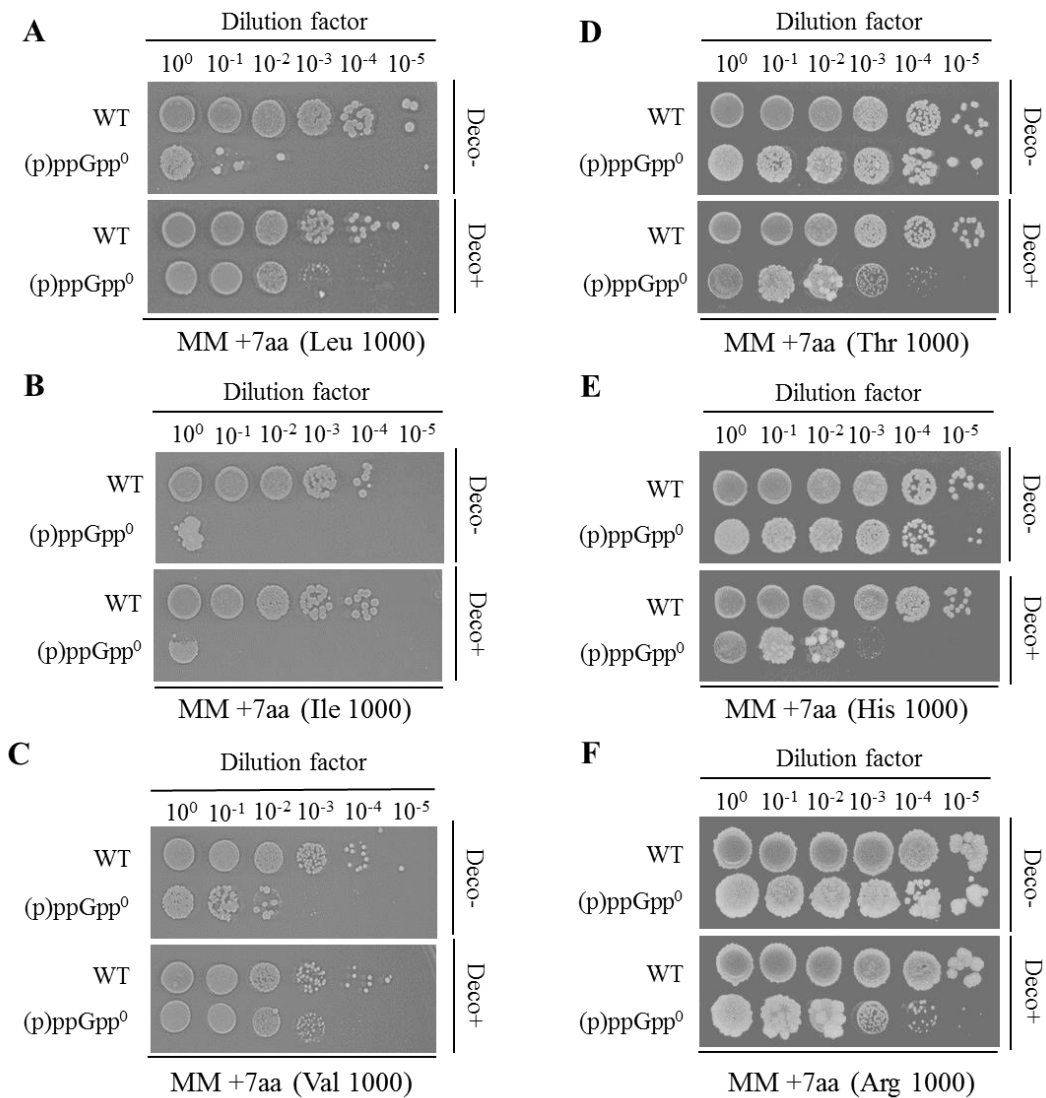


Fig. 3-6 (p)ppGpp 合成欠損によって要求性となるアミノ酸過剰添加が(p)ppGpp⁰ 株 (NBS1440)の生育に与える影響の検証

最少培地+ 7aa (Fig. 3-5 参照)において、Met を除く 6aa それぞれの培地組成を 1000 mg/ml に変更した条件における野生株、(p)ppGpp⁰ 株(NBS1440)の生菌率を示した。上段: decoyinine 非添加(Deco-)、下段: 0.01 mg/ml decoyinine 添加(Deco+)。A-F の図において、最少培地 +0.01mg/mL 7aa を基準として以下の通り培地組成を変更している

- A. 1000mg/ml Leu, B. 1000mg/ml Ile, C. 1000mg/ml Val, D. 1000mg/ml Thr,
- E. 1000mg/ml His, F. 1000mg/ml Arg

第四節 考察

本章における結果から、(p)ppGpp による細胞内 GTP の量的制御が欠失すると、メチオニンは細胞内 GTP 量を上昇させる効果を持つことが示唆された。抑圧変異 *rpoB/C* による (p)ppGpp⁰ 株の生育阻害抑圧効果は、細胞内 GTP 量に有意な影響を及ぼさないものであり、尚且つ、細胞内 GTP 量を上昇させる外的要因 (guanosine など) に対して感受性があることが分かった。以上のことから、抑圧変異 *rpoB/C* による生育回復効果はメチオニン添加による細胞内 GTP 量の上昇によってマスクされたと考えられる (細胞内 GTP 量の上昇がなぜ最少培地における生育を阻害するのかについては後述する)。一方で、*rpoB/C* 以外の抑圧変異はいずれも(間接的にでも)細胞内 GTP 量を有意に低下させるものであることから、生育阻害抑圧効果はマスクされなかったと考えられる。これらのことを踏まえると、過去のメチオニン添加条件において行われた (p)ppGpp⁰ 株の抑圧変異株のスクリーニングでは、メチオニンによる細胞内 GTP 量の上昇する効果が生じない、*de novo* GTP 生合成に直接関与する遺伝子においてのみ抑圧変異が同定された一方で、メチオニン非添加条件にて行われた本研究ではそれに直接関与しない、アミノ酸飢餓への適応性に寄与する遺伝子にも抑圧変異が同定されたということは辻褃が合う。

抑圧変異株 *rpoB* が示すメチオニン感受性は GTP 結合性転写制御因子 CodY の欠損によって完全に相補された (Fig. 3-3)。(p)ppGpp⁰ 株が最少培地において BCAA など複数のアミノ酸に対して要求性持つ一因は、細胞内 GTP 量を低下させることができないことで、CodY が活性化し、これらのアミノ酸生合成関連遺伝子の転写を負に制御するためであることが示唆されている (Kriel et al., 2014)。さらに、CodY レギュロンに属する *ilvBHC-leuABCD* オペロンのプロモーターの転写活性は、抑圧変異株 *rpoB* においてメチオニン添加後、減少することが確認された (Fig. S2)。これらのことを踏まえると、メチオニン添加による細胞内 GTP 量の上昇が最少培地における生育を阻害する主因は、CodY レギュロンに属するアミノ酸生合成関連遺伝子など、最少培地における生育に必須となる遺伝子群の発現が抑制されたことであると考えられる。

(p)ppGpp による細胞内 GTP の量的制御を失った細胞において、なぜメチオニンが GTP 量を上昇させるかについては、そのメカニズムを含めて次章から追及していく。

第4章 メチオニン代謝が関与する GTP 生合成の新規制御機構の解

析

第一節 序

第三章において、メチオニンがアミノ酸飢餓条件に適応する上で、細胞内 GTP の量的制御に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。抑圧変異株 *rpoB/C* がメチオニン感受性を示す一方で、これらの抑圧変異を野生株に導入した株 (NBS3474, NBS3475, NBS3476)、または *de novo* GTP 生合成に直接関与する遺伝子 *gmk* の抑圧変異株 (NBS2387) ではメチオニン感受性を示さなかった (Fig. 3-1)。さらに、GMP 合成酵素 (GuaA) の阻害剤 decoyinine の添加は、GTP *salvage* 経路を介して GTP 生合成を活性化させる guanosine の添加が 7 アミノ酸添加条件における (p)ppGpp⁰ 株の生育を阻害する効果に対しては相補しない一方で (Fig. 1-1B)、*rpoB* A622V (p)ppGpp⁰ 株 (NBS3477) が示すメチオニン感受性に対しては部分的に相補する効果が確認された (Fig. 3-4A)。そして、そもそも過去のメチオニン添加において行われた (p)ppGpp⁰ 株の抑圧変異株のスクリーニングでは、*de novo* GTP 生合成に直接関与する遺伝子にのみ、抑圧変異が同定された (Kriel *et al.*, 2012)。これらの結果を統合すると、「*de novo* GTP 生合成が何かしらの形で抑制されている条件 (抑圧変異 *guaA/B*, *gmk*, decoyinine 添加、(p)ppGpp+) では、メチオニンが細胞内 GTP 量を上昇させる効果が生じない」ということになる。これを踏まえると、メチオニンは *de novo* GTP 生合成経路上の、いずれかの律速段階 (少なくとも decoyinine が標的とする GuaA もしくはその上流) を活性化していた可能性が考えられる (Fig. 4-1)。

そこで、*de novo* GTP 生合成経路上の各酵素のドメイン構造について調べたところ、*de novo* GTP 生合成における最初の反応である IMP から GMP への変換を触媒する IMP dehydrogenase (GuaB) に、CBS ドメインと呼ばれるサブドメインが保存されていることが分かった (Bateman, 1997; Fig. 4-2A)。CBS ドメインは二つのタンデムリピート配列から構成されており (CBS1, CBS2)、バクテリアからヒトまで、ほぼ全ての生物の IMP dehydrogenase (IMPDH) に保存されている。しかし、作用するリガンドや機能はあまり理解されておらず、IMPDH 本来の酵素活性には関与しないことが報告されている (Nimmegern, 1999)。CBS ドメインは、IMPDH 以外の酵素にも保存されている例が多数ある。そこで、CBS ドメインについてメチオニンまたはメチオニン代謝産物が制御に関与しているような知見を調べたところ、超高温性細菌の一種 *Methanocaldococcus jannaschii* が持つ機能未知酵素 Mj0100 の CBS domain に対し、

メチオニン代謝産物である S-adenosyl methionine (SAM)、及び S-methyl-5'-thioadenosine (MTA)がリガンドとして作用し、この酵素のコンフォメーションの安定化に寄与している知見が見つかった(Lucas et al., 2010)。Mj0100 CBS ドメインと SAM/MTA との共結晶構造から、CBS ドメインにおける SAM/MTA との結合に直接関与するアミノ酸残基が明らかとなっていた。*M. jannaschii* の Mj0100 と、*B. subtilis* との CBS domain のアミノ酸配列を比較したところ、興味深いことに、前述した SAM/MTA との結合安定性に直接関与するアミノ酸残基は全て、*B. subtilis* GuaB においても、同じか同性質のアミノ酸として保存されていた (Leu114, Ile120, Val 123, Ile137, Thr139, V1163, Leu198; Fig. 4-2)。

以上の事実を踏まえて、本章では GuaB の CBS domain と SAM/MTA との関係性について、遺伝学的手法・生化学的手法を用いて解析し、メチオニン代謝が関与する GTP 生合成の新規制御機構の解明を目指した。さらに、細胞内 GTP を制御する主要な機構である緊縮応答と、メチオニン代謝との関連性について、SAM 合成酵素 MetK の発現制御に着目して解析を行った。

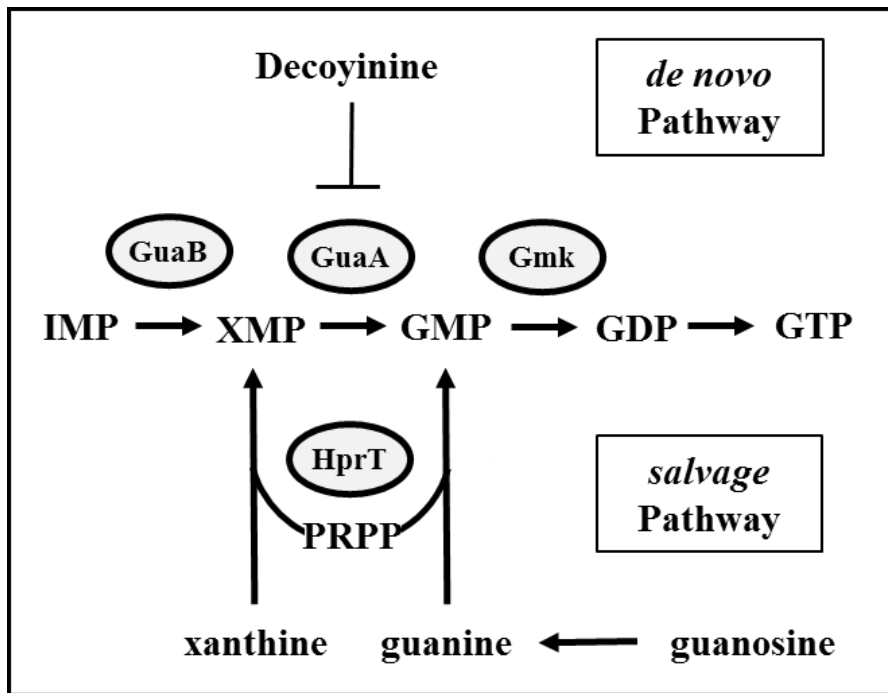


Fig. 4-1 枯草菌における GTP 生合成経路の概略図
 PRPP: 5-phospho- α -D-ribosyl-1-pyrophosphate

第二節 材料と方法

1. Strains · Plasmid

Strain (plasmid) Name	Genotype	Source
wt168	<i>trpC2</i>	Laboratory stock
NBS1440	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM::tet ΔywaC::spc</i>	This study
NBS2408	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC</i>	This study
NBS3477	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC ΔybxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study
NBS3478	<i>trpC2 ΔguaB::tet</i>	This study
NBS3480	<i>trpC2 guaB416T>C-spc</i>	This study
NBS3481	<i>trpC2 guaB362C>T-spc</i>	This study
NBS3493	<i>trpC2 guaB586A>G-spc</i>	This study
NBS3482	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC guaB416T>C-spc</i>	This study
NBS3483	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC guaB362C>T-spc</i>	This study
NBS3494	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC guaB586A>G-spc</i>	This study
NBS3484	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC guaB416T>C-spc ΔybxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study
NBS3485	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC guaB362C>T-spc ΔybxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study
NBS3495	<i>trpC2 ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC guaB586A>G-spc ΔybxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study
NBS3496	<i>trpC2 amyE::P_{yitJ}-lacZ cat::tet</i>	This study
NBS3497	<i>trpC2 amyE::P_{yitJ}-lacZ cat::tet ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC ΔybxB::cat-rpoB1865C>T</i>	This study
NBS3501	<i>trpC2 amyE::P_{metK}-lacZ cat</i>	This study
NBS3502	<i>trpC2 amyE::P_{metK}-lacZ cat ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC</i>	This study
NBS3503	<i>trpC2 amyE::P_{metK} ΔS-box-lacZ cat</i>	This study
NBS3504	<i>trpC2 amyE::P_{metK} ΔS-box-lacZ cat ΔrelA::erm ΔyjbM ΔywaC</i>	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α		Laboratory stock
RosettaII		Laboratory stock
Plasmid		
pET28a		※1

pDL2	Laboratory stock
pET28a- <i>guaB</i>	This study
pDL2- <i>PyitJ</i>	※2
pDL2- <i>PyitJ</i> <i>ΔS-box</i>	This study
pDL2- <i>PmetK</i>	※3
pDL2- <i>PmetK</i> <i>ΔS-box</i>	※3
pCat::Tet <i>cat::tet amp</i>	Laboratory stock

※1 東京農業大学 分子微生物学科 笠原浩司准教授より分与

※2 令和元年度 磯崎 卒業論文にて作製

※3 Umea University 高田啓博士より分与

Primer	Primer Sequence (5'-3')
<i>guaB</i> 11	CTTGTGGTGAAATTTCTGAACA
<i>guaB</i> 12	TTCATAACCGTTACACATTAGTAAATCCCCCTCTTTTCG
<i>guaB</i> Plesstetfor	TACTAATGTGTAACGGTTATGAAGTGAAATTGA
<i>guaB</i> Plesstetrev	GTGATTCTTTTTACTAGAAATCCCTTTGAGAATG
<i>guaB</i> 23	AGGGATTTCTAGTAAAAAGAATCACCTAACTATAACAATTTTCATAA
<i>guaB</i> 24	CTCCAGTATCTCAGGGTAGT
<i>guaB</i> seqfor	GTCTTTCCACTCATGATATGTCATGT
<i>guaB</i> seqfor2	GGAACTACTCTGGATG
<i>spc</i> seqrev	CCACCATTTACTGCTGAACC
<i>guaB</i> - <i>spc</i> rev	CCACCATTTACTGCTGAACC
<i>guaB</i> - <i>spc</i> Plessspcfor	CTCGTTGTTATTATGAAATTGTATAGTTAGGTGATTCTT
<i>guaB</i> - <i>spc</i> Plessspcrev	CAATTTTCATAATAACAACGAGGTGAAATCATGAG
<i>guaB</i> - <i>spc</i> downfor	GTAACAATTTATTACTAGGCCTAATTGAGAGAAG
<i>guaB</i> C362T uprev	CAATTAGGCCTAGTAATAAATTGTTACAAATTA AAAACATTTGA
<i>guaB</i> C362T downfor	ACAATCGGAACACCGAAAATTCTGTATTTTC
<i>guaB</i> T416C uprev	ATTTTCGGTGTTCGGATTGTAATAACGAA
<i>guaB</i> T416C downfor	AAGGTCACGGTTTATAATAATTCCAACAAG
<i>guaB</i> for(BamHI)	GCGGATCCATGTGGGAAAGTAAATTTTCAAAGAAG
<i>guaB</i> rev(SacI)	GCGAGCTCTTATGAAATTGTATAGTTAGGTGATTC
<i>PyitJ</i> <i>ΔS-box</i> uprev	CGTGTCAGGAAGTGCCAAAA
<i>PyitJ</i> <i>ΔS-box</i> downfor	GCTGATGTGAATAAAGGAGGCAGAC
<i>lacZ</i> N-ter rev	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAG

3. 酵素及びキット試薬

Ex Taq DNA polymerase	(タカラバイオ株式会社)
KOD-plus- DNA polymerase	(東洋紡績株式会社)
Prime Star DNA polymerase	(タカラバイオ株式会社)
FastDigest SacI	(Thermo Fisher SCIENTIFIC)
FastDigest BamHI	(Thermo Fisher SCIENTIFIC)
Kinase	

4. 培地

- LB 培地：枯草菌及び大腸菌の培養（巻末参照）
 CI 培地(0.004% casamino acid)：枯草菌の前培養（巻末参照）
 最少培地(Spizizen's minimal salts medium) （巻末参照）

5. 枯草菌からのゲノム抽出（巻末参照）

6. 最少培地における spot test（巻末参照）

7. クローニング条件

クローニング PCR は全て KOD-plus-DNA polymerase を用いて増幅した。また、ライゲーションは全て T4 DNA ligase kit を用いて行い、DH5 α カルシウムコンピを用いて形質転換を行った（巻末参照）。pDL2-*PyitJ* Δ S-box に関しては、inverse PCR を KOD-plus-DNA polymerase を用いて行い、その後 T4 Polynucleotide Kinase , 2 \times Ligation Mix (ニッポンジーン)を用いて作製した。作製した plasmid を枯草菌のコンピテントセルに形質転換した（巻末参照）以下に完成した plasmid、使用した primer、template、制限酵素を表記する。

作製した plasmid	Primer	template	plasmid	制限酵素
pET28a-guaB	guaB for(BamHI)/guaB rev(SacI)	wt168 genome	pET28a	SacI, BamHI
pDL2- <i>PyitJ</i> Δ S-box	<i>PyitJ</i> Δ S-box uprev/downfor	pDL2- <i>PyitJ</i>	*inverse PCR にて作製	

8. 遺伝子破壊株、遺伝子変異株の作製

遺伝子破壊用の断片の作製は、全て Ex taq DNA polymerase を用いて増幅した。一方で、遺伝子変異導入用の断片の作製は、全て Prime Star DNA polymerase を用いて

作製した断片を枯草菌コンピテントセルに形質転換した（巻末参照）。

9. *guaB* 変異株の取得

リコンビナント PCR を用いて取得を試みた。使用した primer を以下に表記する。PCR は全て Ex Taq DNA polymerase を用いて行った。作製したリコンビナント断片を枯草菌コンピテントセルに形質転換し（巻末参照）、LB 培地（終濃度 100 μ g/ml スペクチノマイシン）にプレーティングし、37 $^{\circ}$ C で O/N。翌日、生育が悪い形質転換体を選択し、単離後、スペクチノマイシン非添加 LB 培地で生育遅延を示すことを確認した。ゲノム抽出（巻末参照）後、再度枯草菌に形質転換し、スペクチノマイシン耐性の形質が遺伝学的にリンクしていることを確認した。

	Primer	template	PCR 条件
<i>guaB</i> up+ORF	<i>guaB</i> 11/ <i>guaB</i> -spc rev	wt168 genome	終濃度 2.5mM MgCl ₂ を添加、伸長時間: 2min
<i>guaB</i> spc +down	<i>guaB</i> plessspc for/ <i>guaB</i> 24	<i>guaB</i> -spc genome	通常 PCR、伸長時間: 1.5min

※通常 PCR は巻末参照

10. GuaB タンパク精製（巻末参照）

11. *in vitro* における GuaB 酵素活性測定（巻末参照）

12. SDS-western 解析（巻末参照）

13. LacZ assay（巻末参照）

第三節 結果

1. *guaB* CBS domain 変異株の解析

GuaB CBS ドメインにも保存されていた SAM/MTA との結合に関与するアミノ酸残基のうち、Thr139 の変異(T139I)、Ile120 に隣接するアミノ酸残基の変異(S121F)が、過去に(p)ppGpp⁰ 株の最少培地における生育阻害を抑圧する変異として同定されていた(Kriel et al., 2012)。さらに、本研究でも LB 培地において生育遅延を示す *guaB* 変異株の取得を試みた結果、同様に SAM/MTA との結合に関与するアミノ酸残基 Leu198 の近傍のアミノ酸残基である Lys196 が Glu に変異した株が取得された(NBS3493)。以上のアミノ酸残基の位置を、Fig. 4-2 に示した。3つの *GuaB* CBS ドメインのアミノ酸変異: T139I, S121F, K196E をそれぞれ野生株に導入した株(NBS3480, NBS3481, NBS3493)は、いずれも LB 培地において生育遅延を示した(Fig. 4-3)。 *guaB* 破壊株(NBS3478)は LB 培地において顕著な生育遅延を示すことから(Fig. 4-3)、上記の3つの *GuaB* CBS ドメイン内のアミノ酸変異は、それぞれ *GuaB* の機能に大きく影響を与えていることが考えられる。さらに、これらのアミノ酸変異を、それぞれ(p)ppGpp⁰ 株(NBS2408)に導入した株(NBS3482, NBS3483, NBS3494)、*rpoBA622V* (p)ppGpp⁰ 株(NBS3477)に導入した株(NBS3484, NBS3485, NBS3495)を作製し、最少培地メチオニン添加・非添加条件における生菌率を調べた。(p)ppGpp⁰ 株に CBS domain の変異を導入した NBS3482, NBS3483, NBS3494)は、(*guaB* T139I, S121F については過去の報告通り)最少培地における生菌率の回復が見られ、メチオニン添加条件においても同等の生菌率を示した(Fig. 4-4A)。さらに、*rpoBA622V* (p)ppGpp⁰ 株(NBS3477) が示す、メチオニン感受性は、この株に *guaB* CBS domain の変異を導入したことで、完全に相補された(Fig. 4-4B)。

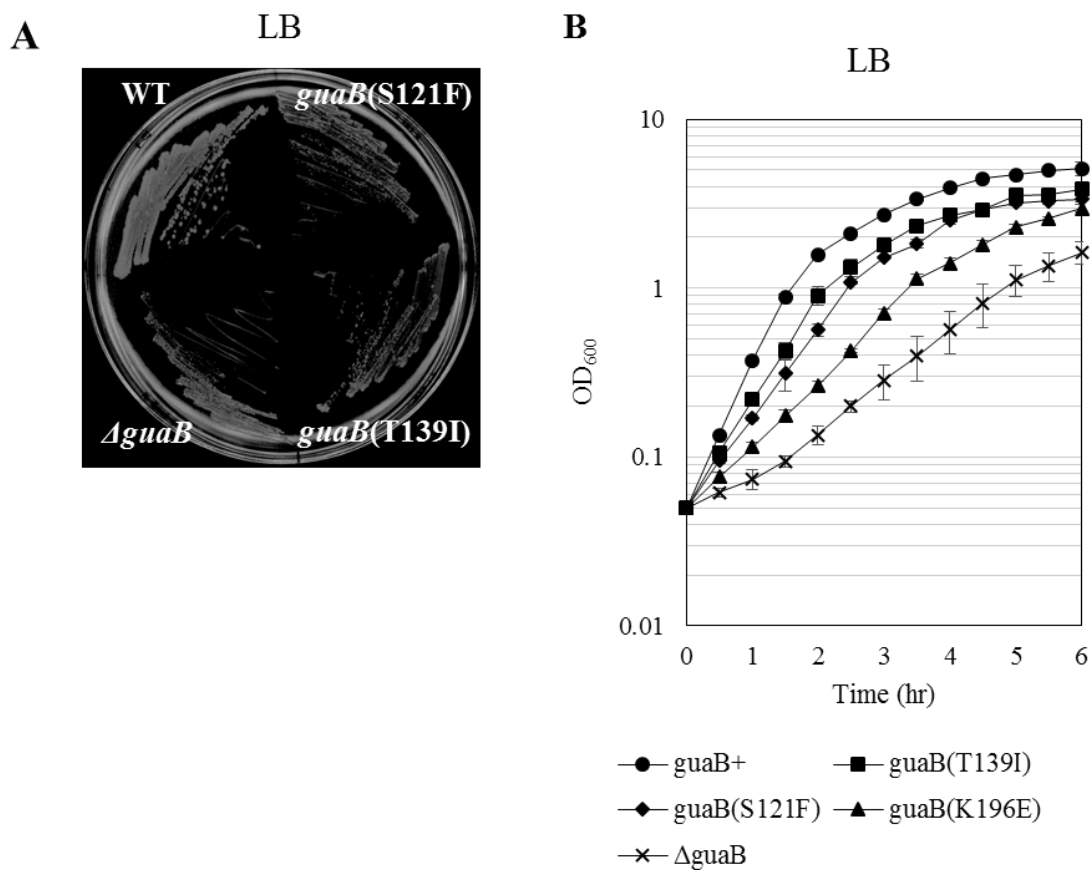


Fig. 4-3 LB 培地における *guaB* 変異株の生育

A. 寒天培地上での生育。野生株(WT)、*guaB*破壊株(Δ *guaB* NBS2878)、*guaB* I139I 変異株(NBS3480)、*guaB*S121F 変異株(NBS3481)を LB 寒天培地に塗抹植菌し、37°C、約 20 時間培養した結果を示す。

B. 野生株(WT)、*guaB*破壊株(Δ *guaB* NBS2878)、*guaB*I139I 変異株(NBS3480)、*guaB* S121F 変異株(NBS3481)、*guaB* K196E 変異株(NBS3493)の増殖曲線。グラフは n=3 の平均値、エラーバーは標準偏差を示している。

2 最少培地における SAM 蓄積量の S-box レポーター系を用いた評価

SAM がメチオニン添加による GTP 生合成の活性化に寄与している可能性を裏付ける第一歩として、最少培地にメチオニン添加条件において細胞内 SAM 量が有意に上昇するかを、検証することとした。メチオニン・システイン代謝経路に関わる遺伝子の多くはプロモーター領域には S-box と呼ばれる配列が存在する。S-box は、SAM が結合することで転写の終結を誘導する riboswitch として機能しており、これらの遺伝子の発現は、SAM によって厳密に制御されている(Grundy and Henkin, 1998; Tomsic et al., 2007)。S-box をもつプロモーター領域の中でも、メチオニン *de novo* 合成に関与する遺伝子:*yitJ*のプロモーター領域は、S-box による発現調節が厳密であり、*yitJ*プロモーターの転写活性は細胞内 SAM 量と負に相関することが示されている(Tomsic et al., 2007)。そこで、*yitJ*プロモーターを *lacZ* レポーター遺伝子の上流に組み込んだコンストラクトを作製し(Fig. 4-5A)、野生株、及び *rpoBA622V* (p)ppGpp⁰株(NBS3477)へと導入した株(NBS3496, NBS3497)を用いて、各株の細胞内 SAM 量を間接的に評価することとした。

SAM レポーター系導入株(NBS3496, NNBS3497)は、いずれも X-gal を添加した最少培地においてコロニーの呈色を示した(Fig. 4-5B)。しかし、メチオニンを添加した条件では野生株に SAM レポーター系を導入した NBS3496 は、コロニーの呈色を示さなくなった(Fig. 5-5C)。NBS3497 はメチオニン感受性により最少培地においてコロニーを確認できないため、メチオニン添加条件における SAM 量の評価ができなかったが、NBS3496 における結果から、この条件において、細胞内 SAM 量は有意に上昇することが示唆された。また、SAM を 50µg/ml 添加した条件では、NBS3497 株はコロニーを形成できた上に、NBS3496, NBS3497 いずれの株においてもコロニーの呈色は見られなかった(Fig. 4-5D)。殆どのバクテリアにおいて、SAM を取り込むトランスポーターが見つかっておらず、この結果から、枯草菌も SAM を取り込むトランスポーターを持っておらず、基本的には細胞外の SAM を取り込む能力を持っていないことが推察される。

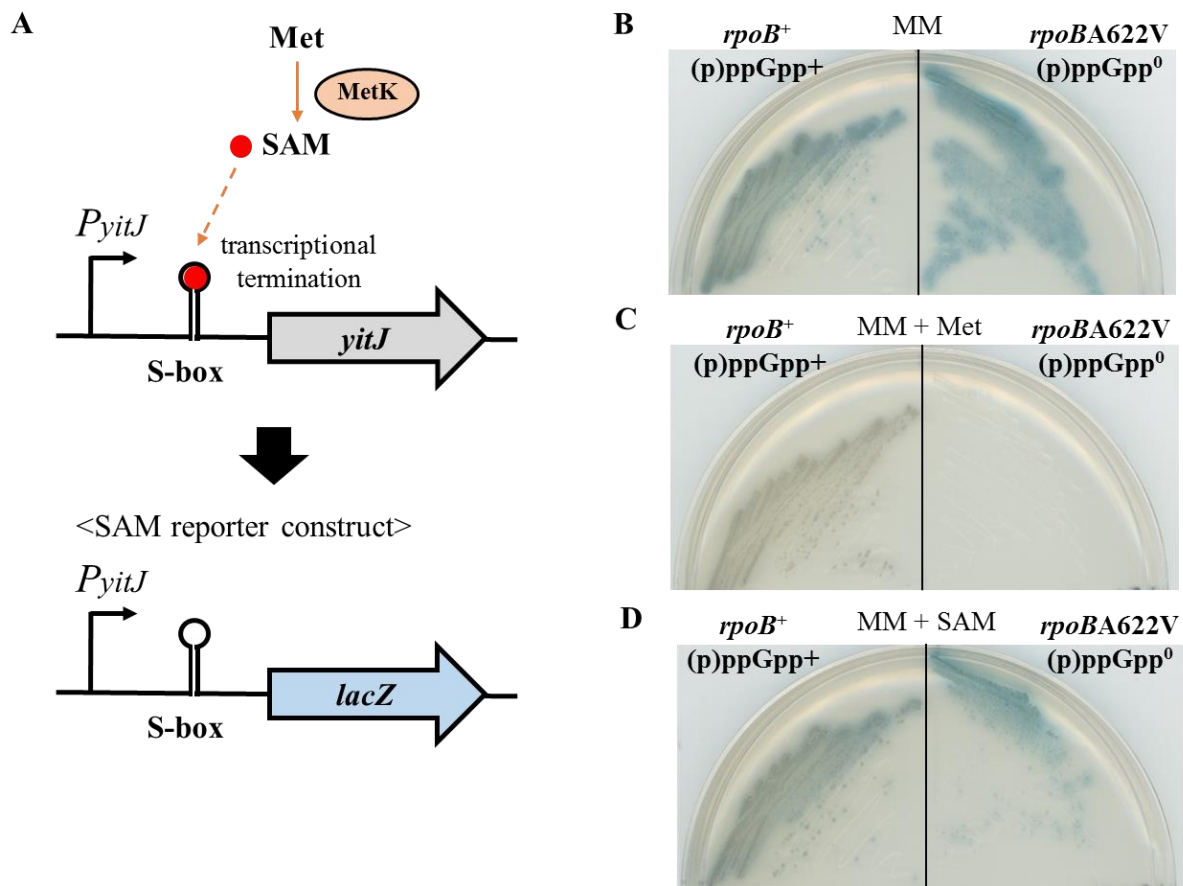


Fig. 4-5 最少培地 X-gal 添加プレートにおける SAM レポーター系導入株(NBS3496, NBS3497)のコロニー呈色の様子

A. SAM による S-box リボスイッチに対する制御のモデル図 (*yitJ* プロモーター) 及び *lacZ* 遺伝子を用いた SAM レポーター系のコンストラクト。

B-D. SAM レポーター系導入株(*rpoB*⁺(p)ppGpp⁺: NBS3496, *rpoB*(A622V) (p)ppGpp⁰: NBS3497)。各株を寒天培地に塗抹植菌し、37°C、約 48 時間培養した結果を示す。

B: 最少培地(MM) +40 mg/ml X-gal

C: 最少培地(MM) +0.05 mg/ml Met/ 40 mg/ml X-gal

D: 最少培地(MM) +0.05 mg/ml SAM/ 40 mg/ml X-gal

3 *in vitro*における SAM/MTA が GuaB 酵素活性に与える影響の解析

SAM/MTA が GuaB の酵素活性を正に制御していることを、*in vitro*における GuaB の酵素活性測定を用いて証明しようと試みた。GuaB は、IMP から XMP を合成する反応において、NAD⁺から NADH へ変換する反応を伴うため、生成された NADH を 340nm の吸収波長によって測定することで、酵素活性を測定可能である (Kriel A. et al., 2012; 巻末参照)。この実験系を利用して、SAM/MTA が GuaB の酵素活性に及ぼす影響を解析することとした。まず、pET28a ベクターに *guaB* をクローニングした plasmid を作製し、大腸菌 RosettaII を宿主として GuaB を発現させ、His タグによるアフィニティー精製を行った(Fig. 4-6A)。精製した GuaB タンパクを用いて、前述した活性測定を行ったところ、活性が確認されたため、まずはコントロール実験として、過去に本実験系において GuaB の活性を阻害することが報告されている、GMP を添加した条件における活性を測定した。その結果、GuaB の活性の有意な低下が確認され、過去の報告の再現性を取ることができた(Fig. 4-6B)。そこで、本実験系を用いて SAM/MTA 添加による GuaB 酵素活性に対する影響を検証した。その結果、今回検証したいずれの添加濃度においても、SAM/MTA による GuaB 酵素活性に対して有意な影響は見られなかった(Fig. 4-6C, 5-6D)。その後、基質である IMP、塩濃度についてもパラメーターを変えて実験を行ったが、いずれの場合においても、SAM/MTA 添加による酵素活性への影響は見られなかった(data not shown)。IMPDH の CBS domain を欠失させても、今回と同様の *in vitro* における酵素活性測定では、活性に影響が見られないことが報告されており (Wang et al., 2014)、SAM/MTA が確かに GuaB の酵素活性の制御に関与していたとしても、*in vitro* においては何らかの因子が不足しているなどの理由から、影響が見られないのではないかと考えている。

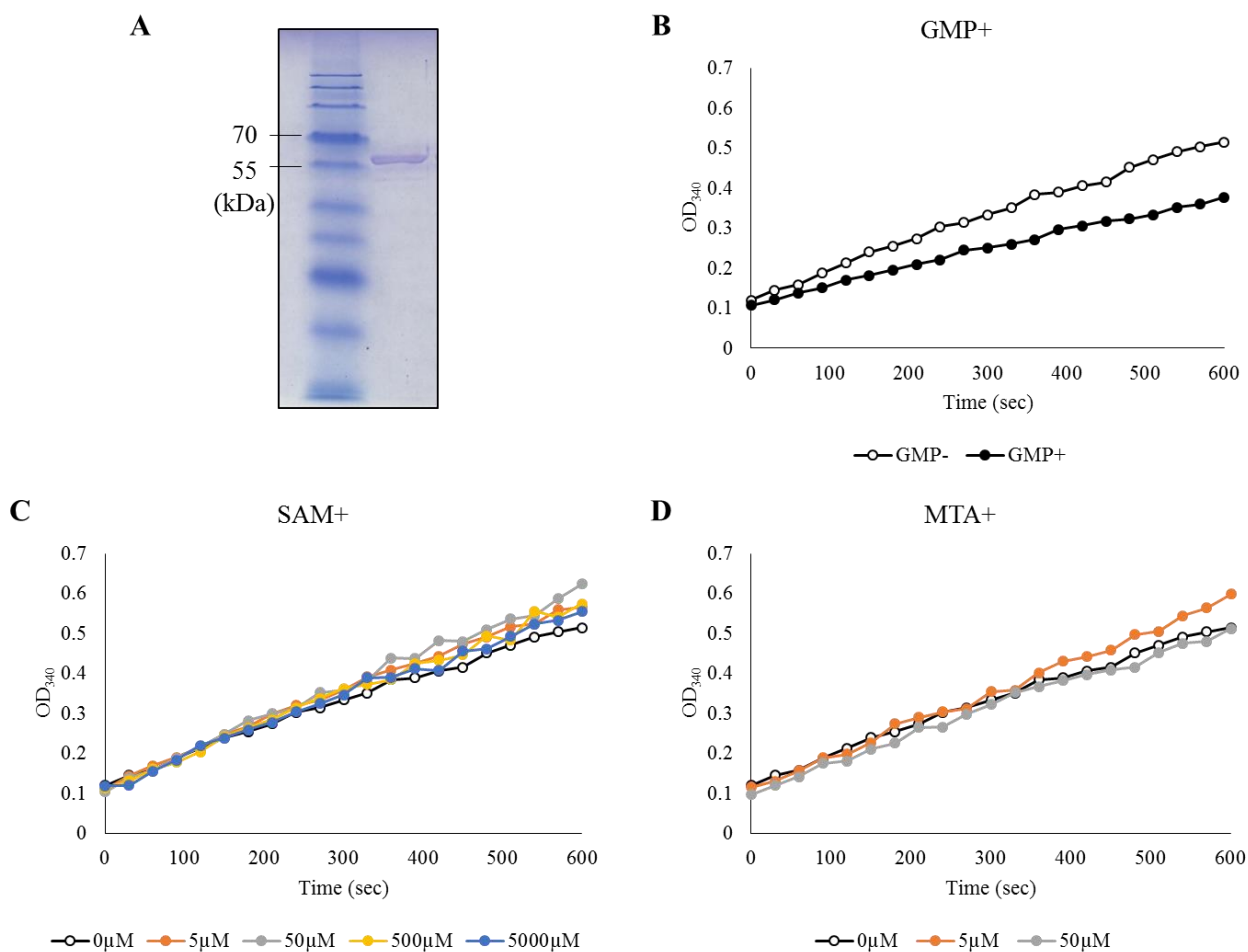


Fig. 4-6 *in vitro*における SAM/MTA の GUA B 酵素活性に対する影響

A. 精製した GUA B タンパクについて、SDS-PAGE・CBB 染色を行った結果を示す(巻末参照)。GUA B: 55.3 kDa

B-D. GUA B 活性測定 (巻末参照) の結果。NAD⁺添加による酵素反応開始後の OD₃₄₀ の値をグラフで示している。全ての control 条件(GMP-, 0μM SAM, 0μM MTA)のグラフは n=4 の平均値を示した。

B. 2mM GMP 添加条件。グラフは n=3 の平均値を示した。

C. SAM 添加条件。SAM 5μM 添加条件は、n=3 の平均値、それ以外の条件は n=3 の代表的な結果を示した。

D. MTA 添加条件。MTA 5μM 添加条件は、n=3 の平均値、50μM 添加条件は、n=3 の代表的な結果を示した。

4 (p)ppGpp と SAM 合成酵素遺伝子 *metK* の発現レベルとの関連性の解析

これまでの(p)ppGpp⁰株を用いた解析から、SAM(MTA)がGuaBを介して細胞内GTP生合成を制御している可能性が示唆され、メチオニン代謝と細胞内GTPの量的制御との関連性が見えてきた。このことから、緊縮応答におけるGTP量の制御とメチオニン代謝とも何らかの関係性があることが考えられる。そこで本章の最後に、これらの関係性についてSAM合成酵素MetKに着目し、(p)ppGppの有無がその発現レベルに与える影響について解析することとした。

まず、LB培地において、野生株と(p)ppGpp⁰株(NBS1440)のMetKタンパク発現量を α -MetK抗体を用いたウェスタンブロッティング解析により継時的に調べた(Fig. 4-7A)。その結果、野生株では対数増殖後期以降、MetKタンパク発現量が継時的に減少する傾向が見られたのに対し、(p)ppGpp⁰株(NBS1440)では、殆ど減少が見られなかった(Fig. 4-7B)。(p)ppGpp合成酵素YjbM, YwaCは対数増殖後期から定常期にかけてタンパクレベルでの発現が上昇することが報告されており(Nanamiya et al., 2008)、これは即ち、定常期以降時期に(p)ppGppが蓄積する時期とMetK発現量が減少した時期とがおおむねリンクしていると考えられる。(p)ppGpp⁰株においてこの減少が抑制されたことから、(p)ppGppがMetKの発現に対してネガティブに作用していることが示唆される。さらに(p)ppGppの蓄積に依存したMetK発現量の影響を、転写レベルで検証するため、*lacZ*レポーターを用いて*metK*プロモーターの転写活性を解析した。その結果、野生株において*metK*プロモーターの転写活性は、対数増殖後期以降に減少する一方で、(p)ppGpp⁰株では転写活性の減少は緩和されるというウェスタンブロッティング解析における結果と一致した傾向が見られた(Fig. 4-7C)。さらに、この傾向は、*metK*プロモーターに存在するS-boxを欠失させたコンストラクト(Δ S-box)を用いた場合にも見られた(Fig. 4-7D)。以上の結果から、(p)ppGppはMetKの発現をS-boxによる既知の制御とは異なる経路で、転写レベルで負に制御していることが示唆された。

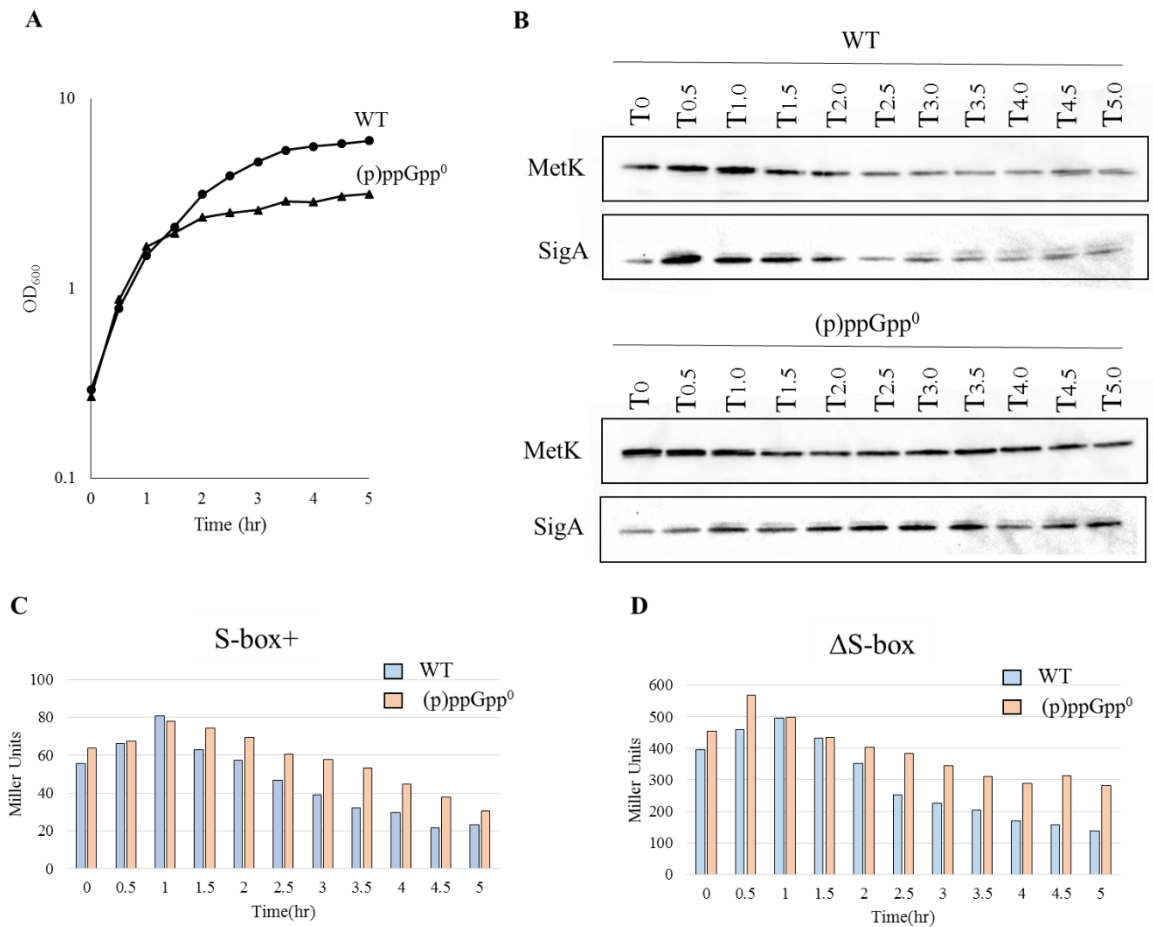


Fig. 4-7 LB 培地における *MetK* のタンパク・転写レベルでの発現量の解析

A. ウェスタンブロッティング解析を行った条件(Fig. 4-7B)における野生株(WT)と(p)ppGpp⁰株(NBS 1440)の増殖曲線。OD₆₀₀=0.3をT₀とし、継時的にサンプリングを行った。

B. Fig. 4-7A のサンプリング条件におけるウェスタンブロッティング解析(巻末参照)の結果。野生株(WT)と(p)ppGpp⁰株(NBS1440)について、 α -*MetK*抗体、及びインターナルコントロールとして α -*SigA*抗体にて各タンパクのシグナルを検出した結果を示した。

C, D. Fig. 4-7Bと同じ条件における *metK*プロモーター活性の *LacZ* assay(巻末参照)による解析結果。*LacZ* assayにおける反応時間は15 minとした。

C. 野生型 *metK* プロモーター(S-box+)の転写活性(WT: NBS3501, (p)ppGpp⁰: NBS3502)

D. S-box 欠損型 *metK* プロモーター(Δ S-box)の転写活性(WT: NBS3503, (p)ppGpp⁰: NBS3504)

第四節 考察

前章までで、メチオニンが GTP 生合成を活性化させる機構の存在が示唆されたが、そのメカニズムとして、本章において GuaB のメチオニンの代謝産物 SAM/MTA が CBS ドメインを介してリガンドとして結合する可能性があること、CBS ドメイン内の SAM/MTA との結合に関与すると推定されるアミノ酸残基の変異が、メチオニン添加による生育阻害効果を完全に解消することを示した。生化学的なアプローチによる証明にまでは至らなかったものの、ここまでの結果を統合すると、(p)ppGpp⁰ 株の抑圧変異解析によって見出された、メチオニンと細胞内 GTP 量との関係性を説明するモデルとしてメチオニンの代謝産物である SAM/MTA が GTP 生合成経路の律速酵素 GuaB の活性を正に制御するモデルが最も確からしいものであると考えられる。CBS ドメインは、元々アデニンを骨格に持つ化合物がエフェクターとして結合するとされるドメインである。そのリガンドの特異性を決定する認識モチーフが CBS ドメインには存在する。*M. jannaschii* Mj0100 の CBS1 には MTA の認識モチーフ(residue 433-439: GIITSWD; G_hxS/T_xED)、CBS2 には SAM の認識モチーフ(residue 494-500: GIVTSED; G_hxS/T_xhD/E)がそれぞれ存在する。枯草菌 GuaB の CBS ドメインには、このうち、SAM の認識モチーフとほぼ合致する配列が存在した(residue 136-142: GIITNRD, residue 197-203: GLITIKD)。このことから、SAM が枯草菌 GuaB CBS ドメインのリガンドである可能性が高いと考えられる。

CBS ドメインは、原核生物から真核生物まで IMPDH に共通して保存されているにも関わらず、その機能についてはあまり理解されていない。真核生物においては、GTP/GDP が IMPDH のリガンドとして結合し、酵素活性をアロステリックに制御することが証明されている(Buey et al., 2015; Buey et al., 2017)。さらに、IMPDH は CBS ドメインを介して、一本鎖 DNA に結合することも報告されている(Mclean et al., 2004)。一方で原核生物においては、Mg²⁺と錯体を形成した ATP が大腸菌をはじめとする一部のグラム陰性細菌において IMPDH CBS ドメインのエフェクターとして機能することが報告されている(Labesse et al., 2013; Alexandre et al., 2015)。しかし、枯草菌をはじめとするグラム陽性細菌においては、IMPDH(GuaB)における CBS ドメインの機能はリガンドを含めて未だ明らかとなっていない。このことを踏まえると、本研究において SAM/MTA が枯草菌 GuaB の活性を正に制御することを示唆する結果は、原核生物における IMPDH の制御機構を解明するための足掛かりとなるのではないかと考えている。

大腸菌では、GuaB の CBS ドメインを欠失させると、ATP 生合成の代謝フラックスが上昇し、このことに起因してプリンヌクレオチド全体の生合成のインバランスが生じ、

生育が阻害されることが示されている。このことから、GuaB の CBS ドメインは、プリンヌクレオチド生合成全体の恒常性を維持する役割を担っていると考えられている (Pimkin and Markham et al., 2008; Pimkin et al., 2009)。枯草菌においても同様の機能を有しているかを検証するために、枯草菌 *guaB* CBS ドメインの欠損株を作製したが、この株は *guaB* 欠損株と同様に、最少培地において全くコロニー形成しなかった (Fig. S4)。このことから、GuaB 自体の機能が完全に失われていることが考えられたため、これ以上の解析はできなかった。今後は SAM/MTA が枯草菌 GuaB CBS ドメインを介した機能について、大腸菌における知見を踏まえて、GTP 生合成のみならず、プリンヌクレオチド生合成全体における意義を考えていく必要がある。

Fig. 4-5 の結果より、枯草菌において SAM は基本的には取り込まれないことが示唆されたため、本研究では最少培地における生育に対する SAM の直接的な影響を検証するまでには至らなかった。枯草菌をはじめとする殆どのバクテリアは SAM 特異的なトランスポーターを持たない。*Rickettsia prowazekii* において、SAM のトランスポーターが同定されており (Tucker et al., 2003)、その近縁種である *Rickettsia japonica* の SAM トランスポーターを枯草菌へと導入したところ、その機能が確認され、外界の SAM を取り込ませることで、自身で SAM を合成せずとも生育することが可能となった (令和元年度磯崎卒論)。今後はこの SAM トランスポーターによる細胞内 SAM 量を制御する系を用いることで、SAM の直接的な影響を解析していくことが展望である。

本章の最後に、(p)ppGpp が *metK* の発現を転写レベルで負に制御している可能性が示した。これまで考えてきたモデルと合わせると、栄養豊富な条件では SAM は GuaB を介して GTP 生合成を活性化する一方で、栄養飢餓条件では、(p)ppGpp は GTP 量を低下させるために、GTP の生合成に関わる酵素 (GuaB, Gmk, HprT) の活性を阻害するだけでなく、GTP 生合成の活性化に関わる SAM の合成も抑制しているということが考えられる。メチオニンが GTP 生合成を活性化させる現象は、(p)ppGpp 合成を欠失させた株において見いだされたが、本来は、緊縮応答における (p)ppGpp による GTP 生合成の直接的な制御と協調的に、細胞内 GTP の恒常性を維持する生理的役割を担っていると考えられる。今後は細胞内における SAM 量と GTP 量との関係性をより詳細に明らかにしていくと共に、メチオニン代謝を介した GTP 生合成の制御の緊縮応答との関係性について検証していく余地がある。

第5章 総合討論

本研究において、枯草菌(p)ppGpp⁰株の最少培地における新規生育阻害抑圧変異の同定から、アミノ酸飢餓への適応性に関わる因子が、GTP 生合成経路の直接的な制御に限定されず、GTP 生合成より代謝経路上、上流に位置するプリンヌクレオチド生合成(*prs*, *purF*)、GTP の量的変化によって、その下流で変化する遺伝子発現の根幹を担う RNA ポリメラーゼコア酵素(*rpoB/C*)にまで適応されることを見出した。これらの結果から、細菌が環境変化に適応する上で(少なくともアミノ酸飢餓への適応において)、GTP 生合成経路に限らず、プリンヌクレオチド生合成全体を制御することの重要性、GTP 量を制御した下流で、遺伝子発現を転写レベルで変化させることの必須性といったものが見えてきた。さらに、細胞内 GTP の量的制御にメチオニン代謝が関与する新規な関係性を見出した。これは一つのアミノ酸の代謝系が、環境変化の適応に必須な GTP の生合成を直接制御していることを示唆した初めての知見であり、細菌が栄養状態に応じて増殖を適応・細胞を生存させる上での代謝のネットワーク構造の解明に繋がるものであると考えられる。

GTP は栄養状態に応じて増殖の適応・分化の誘導を行う上でその量が厳密に制御されていることが示唆されている(Lopez et al., 1981)。このことから、(p)ppGpp のようなシグナル分子とはまた別に、細胞内における栄養状態の指標として、GTP 量調節の律速となるような代謝産物の存在が想像される。メチオニンは原核生物、真核生物、共通して翻訳の開始に利用される重要なアミノ酸である。さらに、メチオニンが代謝されてできる SAM は、細胞内における唯一のメチル基供与体として、DNA, tRNA, rRNA, mRNA などの多くの生体分子のメチル化に働いている。また、メチオニン代謝系はポリアミンの合成にも関与しているが、ポリアミンが細胞増殖・分化の制御に関与していることも報告されている(Sturgill and Rather, 2004)。このように細胞が増殖する上での重要性を持つメチオニン代謝が、環境変化の適応に必須な GTP の量的制御に関与することは、生物学的に理に適っていると考えられる。故に上述した GTP 量を調節する上での栄養状態の指標としての役割を、メチオニンの代謝産物が担っているのではないかと考えている。

SAM はメチオニン代謝系における重要な代謝産物であり、S-box リボスイッチとして硫黄代謝を制御している(Tomsic et al., 2007)。特にメチオニン *salvage* 経路の酵素遺伝子の大半は、S-box を持っており、この経路を介したメチオニンの合成は SAM の量に応じて厳密に制御されている。即ち、メチオニン代謝系において SAM は栄養状態をモニターする役割を担っているといえる。これらの事実と本研究における結果とを統合して考えると、SAM がメチオニン代謝のモニターとして機能するだけでなく、栄養

状態の変化を感知して、細胞内 GTP 量を介して増殖を制御する上での一つのシグナルとしての役割を担っていることが考えられる。

大腸菌においては、(p)ppGpp 合成酵素 RelA は、リボソームに結合し、アミノ酸飢餓時に蓄積したアミノアシル化されていない tRNA を認識して活性化し、(p)ppGpp を合成することが知られている(Agirrezabala et al., 2013)。枯草菌においては証明されていないものの、同様のモデルが適応されうると考えられる。緊縮応答における(p)ppGpp による制御機構を踏まえると、本研究で見出したメチオニン代謝が関与する新規 GTP 制御機構は以下のような生理的意義が存在すると考えられる。

栄養飢餓時には、(p)ppGpp が合成・蓄積し、GTP 生合成を抑制する。この際、細胞内において SAM 量も減少しており、これによって SAM を介した GTP 生合成の活性化も起こらないことで、二重に GTP 生合成は抑制されている。一方で、富栄養条件になると、細胞増殖は活発になり、それに伴ってリボソームはタンパク質合成を盛んに行うようになる。こうしたタンパク質合成をはじめ、増殖においては多くの GTP が必要となる。この時に、細胞内の SAM 量は増加し、GTP 生合成を活性化し、細胞増殖に共役して細胞内 GTP 量を高く維持する役割を担うと考えられる。即ち、栄養状態に応じて、細胞増殖に関わる生体反応を効率的に制御する上で、メチオニン代謝が GTP 生合成を制御することは重要であると考えられる。

細胞内 GTP 量を制御することは、全ての生物において重要である。(p)ppGpp は、その合成酵素の保存性から、バクテリア、植物の細胞質において GTP の恒常性を維持するのに重要な役割を担っていると考えられる(Atkinson et al., 2011)。一方で、真核生物においてはその存在は未だ証明されていない。本研究を通して、細胞内 GTP の量的制御に関して、種を超えて広く適応されうる以下の 3 つの側面を新たに見出した: (1) プリンヌクレオチド生合成全体の調節が環境変化に対する適応に重要性 (2) 環境変化への適応における遺伝子発現を転写レベルで調節することの必須性 (3) メチオニン代謝と共役した細胞内 GTP の量的制御機構の存在。以上の 3 つの側面は、既知の(p)ppGpp による GTP の量的制御に留まらない、生理的な重要性を持っていると考えられる。特に、メチオニン代謝と GTP 生合成との関連性については、(p)ppGpp を持たないとされている真核生物にも適応されうると考えている。実際に SAM は生物一般においてメチル化などの役割を担う重要な分子であり、さらに IMPDH は CBS ドメインと共にヒトにまで保存されている。本研究において見出したメチオニン代謝が関与する GTP 生合成制御が枯草菌を超えて適応されるのかを、検証していくことが今後の課題である。

巻末

Supplemental data

Figure S1-S4

プロトコール集

1. 枯草菌の培養
2. 枯草菌の形質転換
3. 枯草菌からのゲノム抽出
4. PCR を用いた目的遺伝子断片の増幅
5. 大腸菌の形質転換(Ca 法)
6. 大腸菌からのプラスミド抽出
7. 最少培地における spot test
8. RHX 添加後の生菌率測定
9. ATP・GTP 量の HPLC 解析
10. 枯草菌からの RNA 抽出
11. GuaB タンパク精製
12. GuaB *in vitro* 活性測定
13. ウェスタンブロッティング解析
14. LacZ assay

試薬

引用・参考文献

謝辞

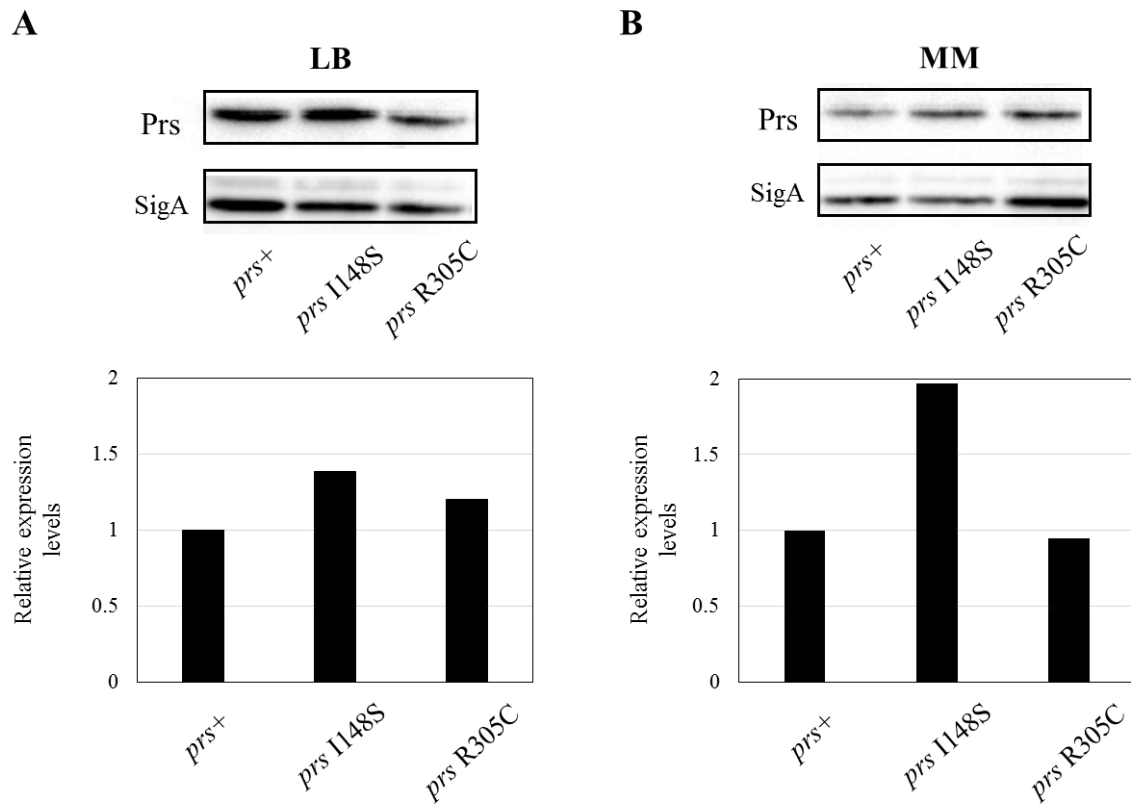


Fig. S1 Prs タンパク質発現量

野生株(*prs+*)、*prs I148S* 変異株(NBS2395)、*prs R305C* 変異株(NBS2394)におけるタンパク質発現量を α -Prs 抗体 (インターナルコントロールとして α -SigA 抗体) を用いたウェスタンブロッティング解析にて比較した結果を示した (上段)。各株における Prs タンパク質発現量を SigA タンパク質発現量で補正し、野生株を 1 とした相対値をグラフに示した(下段)。

A: LB 培地($OD_{600} \doteq 0.5$)にてサンプリング。

B: 最少培地(MM)($OD_{600} \doteq 0.3$)にてサンプリング。

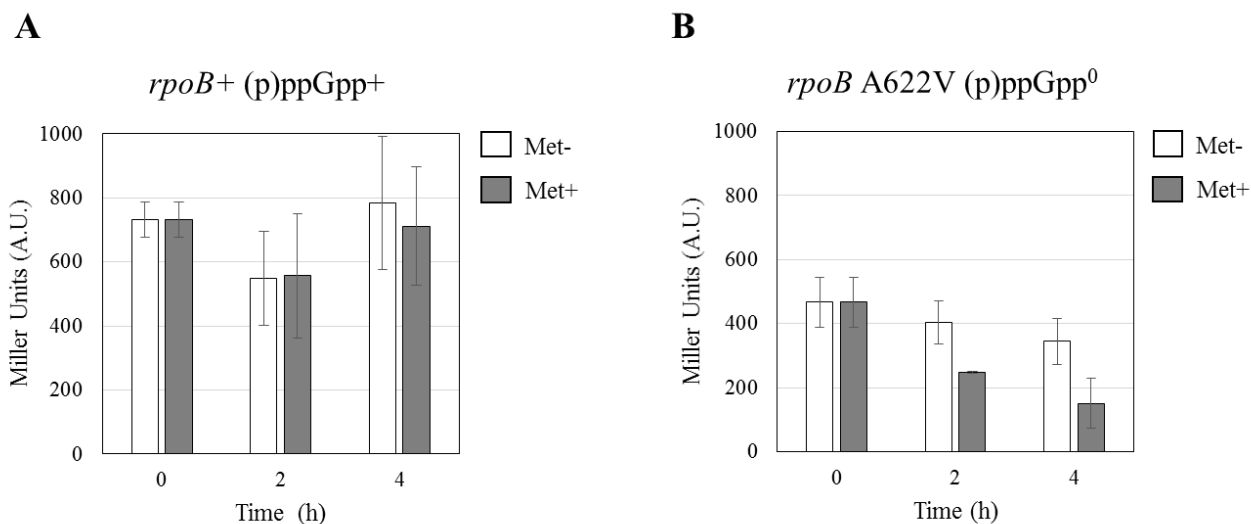


Fig. S2 最少培地メチオニン添加（非添加）後の *P_{ilvBHC-leuABCD}* の転写活性の LacZ assay による解析結果

最少培地 OD₆₀₀=0.15 の時点を T0 とし、この時点で 0.05 mg/ml Met を添加(+)・非添加(-)して以降、T2、T4 の時点での転写活性を解析した。LacZ assay における反応時間は 10 min とした。グラフは n=3 の平均値、エラーバーは標準偏差を示している。

A. 野生株(*rpoB+* (p)ppGpp+: NBS2375)

B. 抑圧変異株 *rpoB*(*rpoBA622V* (p)ppGpp⁰: NBS3507)

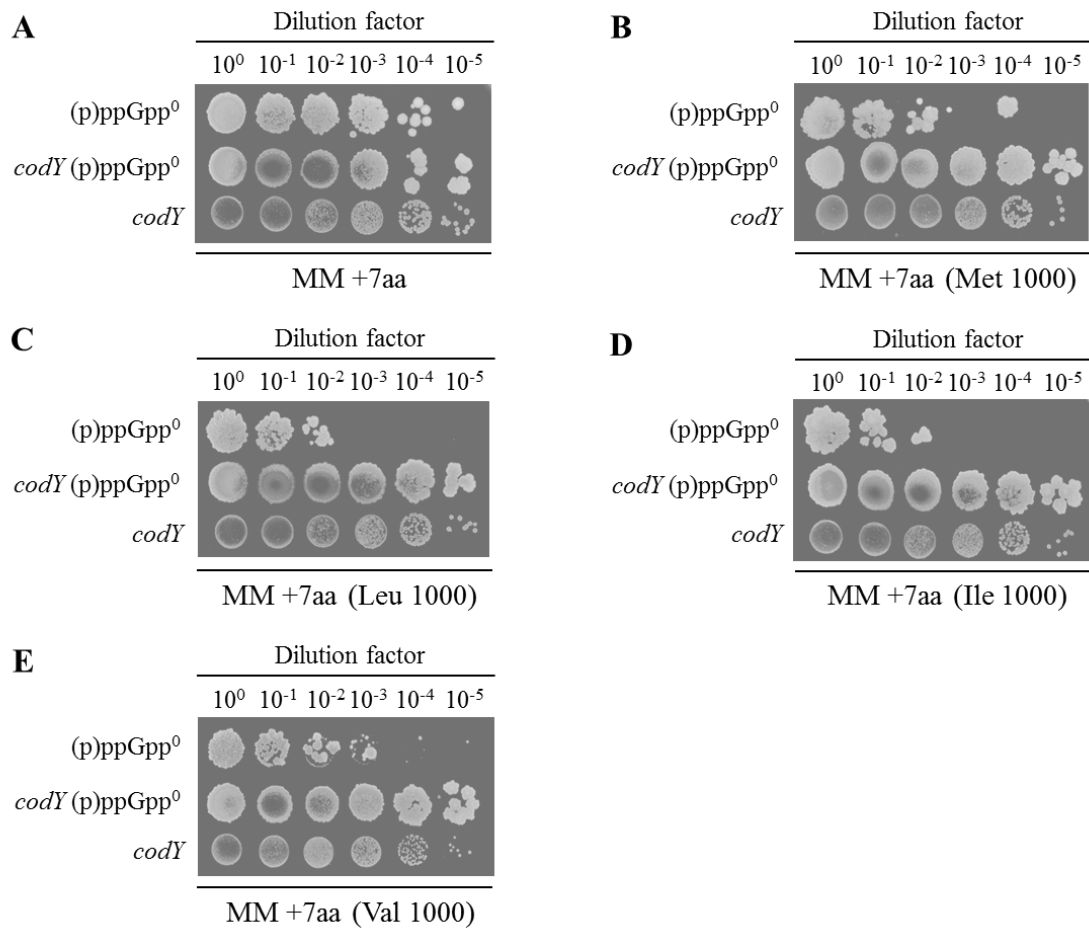


Fig. S3 (p)ppGpp 合成欠損によって要求性となるアミノ酸過剰添加条件における生菌率
 最少培地+ 7aa(Fig. 3-5 参照)において、Met, Leu, Ile, Val それぞれの培地組成を 1000
 mg/ml に変更した条件における (p)ppGpp⁰ 株(NBS2408)、 $\Delta codY$ 株(NBS2337)、 $\Delta codY$
 (p)ppGpp⁰ 株(NBS3486)の生菌率を示した。A. 最少培地 +0.01mg/mL 7aa を基準として
 B-E は以下の通り培地組成を変更している
 B. 1000mg/ml Met, C. 1000mg/ml Leu, D. 1000mg/ml Ile, E. 1000mg/ml Val

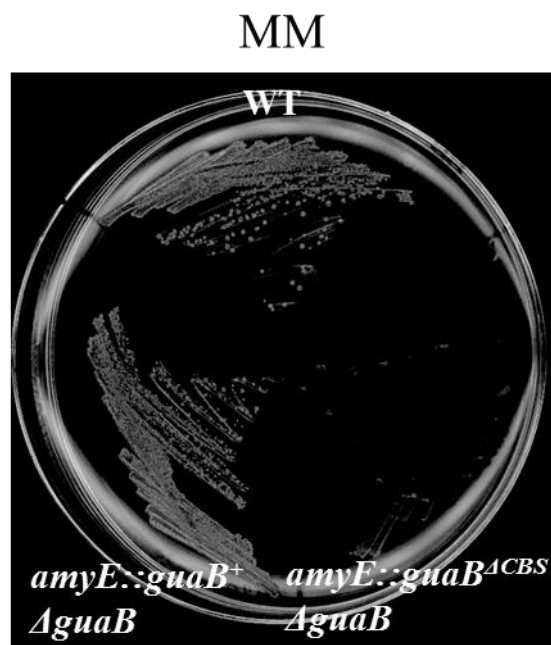


Fig. S4 *guaB* CBS ドメイン欠損株の最少培地(MM)における生育
野生株(WT)、*guaB^{ΔCBS}* 株(*amyE::guaB^{ΔCBS} ΔguaB* NBS3511)、*guaB* 相補株
(*amyE::guaB⁺ ΔguaB* NBS3509)を最少培地に塗抹植菌し、37°C、約 60 時間培養した
結果を示す。

1. 枯草菌の培養

使用する液体培地を L 字管に分注する。(液量は 3~7 ml の範囲が適当)

目的の濁度となるよう植菌し、継時的に吸光度 (OD₆₀₀) を測定し、片対数グラフに記録する。

基本的に 37°C, 48rpm で 30 分おきに測定する。

条件は目的に応じて変化させる。

目的の枯草菌は LB 寒天培地に薄く塗り広げ、培養後若い菌体のみを使用する。

植菌方法の例

L 字管に目的液量 - (目的液量の 1/10) の培地を分注する。

小試験管に (目的液量の 1/10) + 200 μl 前後の培地を分注する。

小試験管に枯草菌の若いコロニーを多めに溶かす。

濁度を測定し植菌量と追加する培地量を計算する。

例)

LB 液体培地 5 ml, 目的濁度 O.D.₆₀₀=0.05 の場合

植菌量 = 0.5 / 測定値 × 500 (μl)

追加の培地量 = 500 - 植菌量

2. 枯草菌の形質転換

・枯草菌コンピテントセルの作成

枯草菌を LB プレートへ前培しておく。

L 字管に CI と CII を 5 ml ずつ調整する。

バクトモニターを用いて、OD を測定し、 $OD_{600}=0.05$ 付近となるように枯草菌を植菌する。この時、菌体の塊ができないよう注意する。また、バクトモニターは起動に時間がかかるため 1 時間くらい前にあらかじめ起動しておく。

振とう培養器で 48 rpm, 37°C で培養し、1 時間おきに OD を測定する。

枯草菌が対数増殖期後期に入り、OD が寝る直前となったら、CII へ菌を移行する。CII へ移すときは CI 培養液を 1.5 ml チューブへ分注し、8,000 rpm, 1 分, 25°C で遠心を行い、上清を捨てる。形質転換能のある菌体は浮きやすいため上清は少し残して捨てる。

その後、CII 約 1 ml でチューブ内の菌体を懸濁し、CII の入った L 字管へ移す。このときの OD を測定しておく。

再び上記の条件で培養を行い、30 分後に OD を測定して OD が伸びていることを確認できたら形質転換に使用する。

・形質転換

CII 培養液 200 μ l を小試験管へ分注し、形質転換する DNA を加える。加える DNA は、PCR 産物ならば CII 培養液の 1/10 以下。プラスミドやゲノム DNA ならば、0.1 ~ 1 μ g / μ l の濃度のものを 1 μ l 前後とする。

振とう培養器で 37°C, 1h 培養し、プレーティングする。プレーティングする量は、PCR 産物なら 100 μ l、プラスミドやゲノム DNA なら 50 μ l 程度使用すれば 200 個前後のコロニーが得られる。

プレーティング後のプレートは 37°C で O/N 培養する。

・コンピテントセルの保存

コンピテントセルを保存する場合は、CII 培養液に 10% glycerol を終濃度が 10% となるように加え、チューブに 200 μ l ずつ分注し、-80°C で保管する。

	CI	CII
1×MM buffer	5 ml	5 ml
50% Glucose	50 μ l	50 μ l
1M MgSO ₄	25 μ l	25 μ l
5% CAA	50 μ l	10 μ l
2.5mg/ ml Tryptophan	100 μ l	10 μ l

枯草菌のゲノム抽出

枯草菌の前培養

選択薬剤添加プレートにシングルになるように塗り広げ、30°C(25°C) O/N

ゲノム抽出

1.5 ml チューブ

TES Buffer 200 μ l

Lysozyme (10 mg/ml) 20 μ l

RNase (2.5 mg/ml) 2.5 μ l

プレートから若いコロニーを取り溶かす

37°C 5min で反応

10% SDS 70 μ l

TE Buffer 480 μ l

転倒攪拌で均一になるように混ぜる

3M NaOAc 35 μ l

ゲノムが出るので転倒攪拌で均一になるように混ぜる

フェノクロ 700 μ l

手で 200 回激しく振り混ぜる

10,000 rpm 8 min

パスツールピペットを用いて上層を新しいチューブに回収する

フェノクロ 700 μ l

手で 200 回激しく振り混ぜる

13,000 rpm 8 min

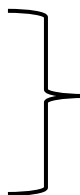
パスツールピペットを用いて上層を新しいチューブに回収する

99 % EtOH 800 μ l

15 回ほど転倒攪拌すると DNA が見えてくる

15,000 rpm 10 min

70 % EtOH 800 μ l
転倒攪拌でチューブ内を洗う
15,000 rpm 5 min
EtOH を取り除き乾燥させる
TE Buffer 200 μ l に溶解させる



2 回くり返す

4. PCR を用いた目的遺伝子断片の増幅

Ex Taq DNA polymerase による増幅

反応組成 / sample

10×Ex Taq Buffer 5 μ l

dNTPs (2.5 mM each) 4 μ l

Primer 5' (10 pmol/ μ l) 1 μ l

Primer 3' (10 pmol/ μ l) 1 μ l

枯草菌染色体鋳型 DNA* 1 μ l

H₂O 37.8 μ l

Ex Taq 0.2 μ l

Total 50 μ l

PCR サイクル

94°C, 1 min

↓

94°C, 30 sec

↓

55°C, 30 sec 25-30 cycles

↓

72°C, 1 min /kb

↓

72°C, 7 min

↓

4°C ∞

PCR 反応後、産物を 1 μ l 電気泳動することで、目的断片の増幅を確認する。

5. 大腸菌の形質転換 (Ca 法)

Competent cells (100 μ l)

↓← plasmid (10 μ l *1)

On ice 10-30min

↓

Incubation 1min at 42°C by heat block

↓

On ice 1min

↓← SOC (r.t.) 1ml

Incubation for 1hr at 37°C (静置) *2

↓

6000rpm 1min *3

↓→ sup *4

Spread LB/amp

↓37°C O/N

Streak for replica LB/amp

↓37°C O/N

パラフィルムを巻き 4°Cで保存

*1 Competent cell に対して plasmid は 1/10 vol.が max vol.になる。

*2 熱伝導を考慮して紙ラックに立てる。

*3 4°Cでも r.t.でも良い。

*4 濃縮する。ピペッティングで懸濁する。

6. 大腸菌からのプラスミド抽出

目的のプラスミドを保持する大腸菌を培養する。

(LB Amp100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 2ml 37°C O/N shake)

↓

2 mL tube に移す

↓

15000 rpm 1 min 4°C

↓

上清を除き SolI を 100 μl 添加する

↓

Vortex で完全にペレットを溶かす

↓

SolIII を 200 μl 添加する。

添加後すぐに転倒攪拌する。

↓

On ice 5 min (正確に)

↓

SolIII 150 μl を添加する。

添加後手首を使って 2 回強く振る。

↓

On ice 5min 以上

↓

15000 rpm 5 min 4°C

新しいチューブに上清を移し、上清と等量の PCI を加える (短く Vortex して混和)。

↓

15000 rpm 5 min 4°C

↓

新しいチューブに水層を移し、1/10 量の 3 M NaOAc を加える。

↓

99 % EtOH を 1 mL 加え、vortex で攪拌。

↓

15000 rpm 5 min 4°C

↓

上清を捨て、70 % EtOH を 500 μl 加え、vortex で攪拌。

↓

15000 rpm 5 min 4°C

↓

上清を完全に捨て、dry up 3-5 min

↓

milliQ 50 μ l に溶解

<RNase 処理>

RNase (2.5 mg/ml) 0.5 μ l を添加

↓

Incubate 37°C 10-15 min

↓

電気泳動で RNA が完全に消失していることを確認

7. 最少培地における spot test

- ① C1 液体培地(Casaminoacid0.004%)にて前培養(37°C)
- ② $OD_{600}=0.3\sim 0.5$ の時点で菌体培養液 1ml を回収
- ③ 遠心分離 8000rpm, 25°C, 1min
- ④ 上清を 50~100 μ l 残して捨て、1×MM(室温)を加えて懸濁する
- ⑤ 遠心分離 8000rpm, 25°C, 1min
- ⑥ ③,④,⑤の工程をもう一度行う
- ⑦ 上清を約 50 μ l 残して捨て、1×MM を 200 μ l 加える
- ⑧ ⑦の菌体液を 10 倍希釈して OD_{600} の吸光度を測定する
- ⑨ $OD_{600}=0.5$ になるように菌体液を調整する(Total Volume 100 μ l)
- ⑩ $OD_{600}=0.5$ に調整した菌体液を 1×MM で $10^{-1}\sim 10^{-5}$ まで希釈する
- ⑪ 原液、 $10^{-1}\sim 10^{-5}$ の希釈液を 10 μ l ずつ培地に spot する

8. RHX 添加後の生菌率測定

LB 培地(Tryptone 0.03%)で $OD_{600}=0.03$ に植菌し、培養開始

↓

$OD_{600}=0.15-0.25$ で菌液 100 μl 分取し、LB 培地で 10^{-1} に希釈、その直後に RHX を添加(終濃度 500 $\mu\text{g/ml}$)

10^{-1} に希釈した菌液をさらに LB 培地で $10^{-2\sim 5}$ の各段階に希釈し、各希釈液を LB プレートに 100 μl ずつプレーティング。

↓

RHX 添加 40min 後に LB 培地で $10^{-1\sim 5}$ の各段階に希釈し、各希釈液を LB プレートに 100 μl ずつプレーティング。

↓

プレートを 37°C で一晩培養し、翌日コロニー数をカウントした後、RHX 添加後/RHX 添加前のコロニー数を *viability* として算出。

9. ATP・GTP 量の HPLC 解析

<sampling>

1) OD₆₀₀ ≒ 0.15~0.5 まで培養した菌体を 20mL ずつ sampling

※分取菌体は直ちに減圧乾燥器に接続したフィルター(MF™ Membrane Filters, 孔径：0.45 μm, Millipore 製)をセットしたメンブランフィルター(NALGENE Filter with Receiver, Nalge Nunc International 製)を減圧乾燥器に接続して吸引

2) フィルター上に吸着させた後、氷冷した滅菌水 20mL で吸引しながら洗浄。菌を吸着した面を下側にしてフィルターを氷上でコーニングチューブ(15 mL)に入れて氷冷した 1 M 酢酸 5 mL に浸す。

3) Vortex(約 5sec)後、液体窒素で凍結

4) 氷上で融解(約 90min)

5) 時折 vortex をしながら氷上で incubate(30 min)

6) 遠心 8000G, 5min

7) フィルターを取り除き、上清をコーニングチューブに入れた水飽和フェノール 5 mL に移す

8) Vortex 30 sec した後に遠心(8000G, 5min)

9) コーニングチューブに入れたクロロホルム 5 mL に上清(約 4.5 mL)を移す

10) Vortex, 10 sec した後に遠心(8000G, 5 min)

11) 10-11 の操作をもう 1 度行う。(上清約 4.0 mL 分取)

12) 上清をエッペンチューブ(1.5 mL)に 4 本に分けて分注(約 3.5 mL)

13) 凍結乾燥(O/N)

14) 滅菌蒸留水 100 μl でサンプルを溶かす。(分けた 5 本を 1 本に集約)

15) サンプル(100 μl)を遠心フィルター(Ultrafree-MC-PLHCC Centrifugal Filters For Metabolome Analysis, Millipore 製)に乗せ 15000rpm, 60 min 処理

※ここまでの工程を経たら、sample は -30°C にて保存する。

<HPLCによる核酸プロファイル解析>

- ・ A buffer: 30 mM KH₂PO₄, 5 mM TBA-OH;H₃PO₄を用いて pH6.0 に調整)
- ・ B buffer: アセトニトリル

使用カラム: Kinetex C18 ion-paired reversed-phase column (株式会社島津ジーエルシー)

使用装置: Prominence HPLC system (SPD-20A) (島津製作所)

解析条件

Gradient mode, flow rate 0.8 mL/min にて、Buffer A:B =95: 5 で開始し、0~40 min の間に Buffer B を 5%-35%の濃度勾配で変化させる。

→Buffer B 35%で 10 min 維持し、解析を修了

<ATP・GTP量の解析・定量方法>

得られたピークの解析は、LabSolution analysis software (島津製作所) を用いて行った、ATP、GTP のピークはそれぞれの核酸 standard を流した際の retention time に基づき同定した。

・ GTP/ATP 相対値: GTP の Peak area の面積値/ATP のピーク的面積値を算出し、相対値とした。

・ GTP(ATP)絶対値: GTP(ATP)の Peak area の面積値を、sampling 時の OD₆₀₀ の値で補正した値を絶対値とした。算出には以下の計算式を用いた。

$$0.5/OD_{600} \times (\text{peak area value of GTP [ATP]})$$

10. 枯草菌からの RNA 抽出

※QIAGEN RNase mini Kit を使用

①-80°Cにて保存したサンプルを、氷上で溶かす。

②リゾチーム(10 mg/ml) 100 μ l を加え、vortex で完全に溶かす。

※リゾチームは用事調整、RNase Free のものでなくてよい。

③37°Cで 10 min 静置

④RLT 350 μ l (β -Mercapt EtOH)を加え、10-15sec 程度、長めに vortex

※ β -Mercapt EtOH は実験を行う際に添加する。

⑤99% EtOH 250 μ l を加え、シリンジを用いて泡立たないようにピペッティングし、ゲノムを剪断 (約 10 回)。その後に付属のカラムに入れる。

⑥室温 15000rpm 10 sec フラッシュ

※⑦の操作の前に、DNase 処理 (次ページ参照) を行う。

⑦付属の新しい 2 ml エッペンチューブにカラムをセットし、RPE を 500 μ l 加える。

⑧室温 8000G 15 sec フラッシュ

⑨下の廃液を捨て、RPE を 500 μ l 加える。

⑩室温 8000G 15 sec フラッシュ

⑨下の廃液を捨て、室温 8000G 2 min 遠心

⑪カラムを新しい 1.5 ml エッペンチューブにセットし、DEPC 処理水(もしくは滅菌蒸留水)を 50 μ l 加え、室温 8000G 2 min 遠心

↓

-80°Cに保存

<DNase 処理>

※QIAGEN DNase Kit を使用

(⑥の続きから)

①RW1 を 350 μ l 加える

②室温 8000G 15 sec フラッシュ

③下の廃液を捨てる

④別の 1.5 ml エッペンチューブで、RDD 70 μ l に DNase 10 μ l 加えてゆっくり混和させる : DNase Mixture

⑤DNase Mixture 80 μ l をからカラムに加える。

⑥室温で 15 min 静置

⑦RW1 を 350 μ l 加えて、室温 8000G 15sec

↓

RNA 抽出プロトコル⑦へ戻る

11. GuaB タンパク精製

<大量培養・菌体回収>

冷凍ストックから、大腸菌 RosettaII に pET28a-*guaB* を導入した株を LB 寒天培地 (Km50) に株おこし(37°C、O/N)

↓

コロニーを LB(Km50) 5 ml に植菌

↓ 37°C、110 rpm

OD₆₀₀=0.5 程度になったら、培養液を全て LB(Km50) 50 ml に移す

↓ 37°C、110 rpm

OD₆₀₀=0.5 程度になったら、培養液を全て LB(Km50) 1L に移す

↓ 37°C、110 rpm

OD₆₀₀=0.5 の時点で、IPTG(終濃度 1mM)を添加

↓ 37°C、110 rpm、1 h

培養液 1L を 500 ml ずつ遠沈管 2 本に分けて分注

↓

*発現確認(遠心前にエッペンに 1 ml 移す→遠心 15000rpm 4°C 1 min

→上清を除き、1×sample buffer 50 µl 加える→vortex 後、100°C10 min Heat)

↓

cfg 6000rpm, 4°C, 10 min

↓

上清を捨て、Binding Buffer 15 ml で懸濁して完全に溶かす

↓

cfg 3100rpm, 4°C, 10 min

↓

上清を完全に捨て、-80°Cに保存

※500 mL を精製一回分として使用

<ビーズの平衡化(精製の前日に行う)>

15 ml TPP×2

Ni-NTA Agarose を容器ごと vortex

↓

青チップの先端を切り、Ni-NTA を 2 mL とる

↓

3100rpm, 4°C, 1 min 遠心

↓
上清のエタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して捨てる
↓
捨てた量と等量の **Binding buffer** を加え、懸濁する
↓
3100rpm, 4°C, 1 min 遠心
ビーズの量が 0.75～1 ml になるまでこの操作を繰り返す
↓
Binding buffer を 2 ml 加え、**vortex** し洗浄
↓
3100rpm, 4°C, 1 min 遠心
↓
ビーズを吸い込まないように注意し、少し余裕を残して上清を捨てる
↓
Binding buffer を 1 ml 加え、4°Cに静置して保存(O/N)

<精製>

80°Cで保存していた菌体(1L分)に **Binding Buffer** を 20 ml、**PMSF** 80 μ l*で溶かす
***PMSF** は調整後、半減期である 30 min 以内に使用する

↓
Sonication
(**BROONSON Duty 50%, 30sec, Dial4, 12cycle**)
↓
破砕液を遠沈管(小)にデカンタで移す
↓
遠心 **15000rpm, 4°C, 45 min**
↓
上清をデカンタで、平衡化处理した **Ni-NTA Resin** に全量加える
*発現確認用に **sup(ppt)**を 50 μ l 分取
↓
4°C 1 h rotate
↓
*以降は 4°Cチャンバー、低温室にて実験
↓
軽く **vortex** しビーズを懸濁させ、オープンカラムに加える
※オープンカラム、ペリスタポンプを組み立て、カラム内溶液は蓋つき試験管で受け

る

↓

カラム内溶液を全て排出(Flow Through Fraction1)

↓

TPP チューブに残ったビーズを Wash Buffer 0 (イミダゾール 10 mM) 10 ml で洗いこみ、ペリスタポンプで全て排出する(Flow through Fraction2)

↓

Wash buffer 2 ml で Elute×5(→Wash fraction1, 2, 3, 4, 5)

↓

wash Buffer 1(イミダゾール 80 mM) 15 ml で Elute(→Wash Fraction1)

↓

Elution Buffer 1(イミダゾール 100 mM) 15 ml で Elute×5(→Wash Fraction2)

↓

Elution Buffer 2(イミダゾール 250 mM) 2 ml ずつ 5つの画分に分けて Elute×5(→ Elute Fraction)

↓

*各 Fraction 30 μ L を分取し、4×Sample buffer を 10 μ l 加える

→発現確認(精製タンパクが含まれる Fraction を確認)

↓

Strage Buffer に置換

Amicon Ultra-15(10K)に Elute した画分(最も目的タンパクが多かった Fraction を 2画分)を乗せ、遠心(5000g, 4°C, 20-50 min*)

↓

Strage Buffer 10 ml 加え、遠心(5000G, 4°C, 20-50 min*)

↓

* Buffer が 500-1000 μ l 程度残るように時間を設定

この操作を 4 回ほど繰り返す

↓

約 500 μ l 前後に濃縮されたタンパクを 15 μ l ずつ分注して、液体窒素で凍結、-30°Cにて保存

Lowry 法にてタンパク濃度を定量し、活性測定に使用

<GuaB タンパク精製に用いる Buffer>

Binding Buffer (100mL)		
		Final
1M Tris-HCl(pH8.0*KOH)	2mL	20mM
2.5M KCl	14mL	350mM
β -Mercapt Ethanol	※1	4mM
1M Imidazole	1mL	10mM
Glycerol	10mL	10%
milliQ	up to 100mL(73mL)	

※1: 使用する際に入れる (0.3 μ l/ml)。

Wash Buffer (100mL)		
		Final
1M Tris-HCl(pH8.0*KOH)	2mL	20mM
2.5M KCl	20mL	500mM
β -Mercapt Ethanol	※1	4mM
1M Imidazole	※2	X mM
Glycerol	10mL	10%
milliQ	up to 100mL	

※1: 使用する際に入れる (0.3 μ l/ml)。

※2: GuaB の精製においては Wash Buffer 0: 10mM, Wash Buffer 1: 80mM, Wash Buffer 2: 100mM, の 3 種類を使用。

Elution Buffer (100mL)		
		Final
1M Tris-HCl(pH8.0*KOH)	2mL	20mM
2.5M KCl	14mL	350mM
β -Mercapt Ethanol	※1	4mM
1M Imidazole	25mL	250mM
Glycerol	10mL	10%
milliQ	up to 100mL(73mL)	

※1: 使用する際に入れる (0.3 μ l/ml)。

Storage Buffer (100mL)		
1M Tris-HCl(pH8.0*KOH)	4mL	40mM
2.5M KCl	4mL	100mM
0.5M EDTA	0.2mL	1mM
1M DTT	※1	1mM
10% Glycerol	10mL	10%
milliQ	up to 100mL	

※1: 使用する際に入れる (1 μ l/ml)。

12. GuaB *in vitro* 活性測定

Reaction Mixture を以下の組成にて調整(Total 50 μ l)

- 50 mM Tris-HCl (pH8.0)
 - 100 mM KCl
 - 1 mM DTT (1M DTT を用事調整して使用)
 - 50 nM GuaB ※最後に加える
- } 5 \times Reaction Buffer として保存しておいたものを使用

↓

吸光度計(U-1800 spectrophotometer, 日立製作所)にセルを入れた後に、IMP を終濃度 400 μ M 添加し、優しくピペッティング(10回)

↓

NAD⁺を終濃度 2.5 mM 添加し、優しくピペッティング(10回)、この 10 sec 後を T0 として継時的に OD₃₄₀ を測定

13. ウェスタンブロットティング解析

Lysis buffer を用いたサンプル調整

<Lysis buffer 組成>

20 mM Tris, pH7.5

10 mM EDTA

1 mg/ml lysozyme

10 µg/ml DNaseI

100 µg/ml RNaseA

1 mM PMSF

10 µg/ml leupeptin

10 µg/ml pepstatin

※

※PMSF, leupeptin, pepstatin は Protease Inhibitor Cocktail Tablet (1 個/10 ml) で代用可能。

1. 枯草菌の細胞を回収し、遠心をかけ上清をぎりぎりまで取り除く。細胞は -80°C で保存する。
2. 細胞に Lysis buffer を加え、均一に溶かしてから 37°C で 10 分間反応させる。
Lysis buffer は菌体密度によって添加量を調整する。
3. Sample buffer を適量加え、 100°C で 5 分間反応させる。
4. 完成したサンプルは 4°C で保存する。

枯草菌の細胞回収は $\text{OD}_{600} = 0.5$ の時点で 1 ml を目安に回収し、Lysis buffer は 50 µl 添加する。その後は OD の増加にしたがって回収量を調整する。継時的に回収するなどで OD の差が大きいつきは、後半回収量が少ないと集めにくいため最初の回収量を増やす。

回収例

OD ₆₀₀	Volume (ml)	Lysis buffer (µl)	4×SB (µl)
0.5	4.0	150.00	50.00
1.0	2.0	150.00	50.00
1.5	1.4	157.50	52.50
2.0	1.0	150.00	50.00
2.5	0.8	150.00	50.00

3.0	0.7	157.50	52.50
3.5	0.6	157.50	52.50
4.0	0.5	150.00	50.00
4.5	0.5	168.75	56.25
5.0	0.5	187.50	62.50

SDS-PAGE

1. あらかじめ目的の菌体を回収し、サンプルを調整しておく。
2. ゲル版を組み立て、ポリアクリルアミドゲルを作製する。この時、Western blotting で使用するメンブレンとゲルのサイズが同じになるように、ガラス版にゲルの高さが 5 cm となるように印をつける。
3. Lower gel をゲル版の印まで注ぎ、パスツールピペットを用いて水を重層し、乾燥を防ぐ。
4. 約 30 min ほどでゲルが固まるので、十分に固まったことを確認したら重層した水をろ紙などを用いて十分に除き、Upper gel を注ぐ。コームを挿し十分に固まるまで静置する。
5. ゲルが十分に固まったら静かにコームを抜き、レーンを洗浄瓶の水で洗い流す。
6. 泳動槽を組み立て、SDS running buffer をレーンが十分に沈むまで泳動槽に入れる。この時ゲルの下に入り込んだ空気を、先端の針を曲げたシリンジなどを利用して取り除く。
7. レーンにサイズマーカーとサンプルを入れる。一番端のレーンは曲がるため使用しない。サンプルを入れないレーンにはすべて 1×SB を入れ、各レーンに等量のサンプルもしくは SB が入っているようにする。
8. 150 V で泳動を行う。サンプルのサイズによって泳動時間は変化するが、30~100kDa ほどのサイズであれば SB による青い線がゲルから抜ける程度の時間である 80 min が目安となる。

Upper gel

	1 枚	2 枚	3 枚	4 枚
4×Upper buffer	0.75 ml	1.5 ml	2.25 ml	3.0 ml
30% アクリルアミド	0.39 ml	0.78 ml	1.17 ml	1.56ml
H ₂ O	1.86 ml	3.72 ml	5.58 ml	7.44 ml
TEMED	3 μl	6 μl	9 μl	12 μl
10% APS	30 μl	60 μl	90 μl	120 μl

Lower gel

	1 枚	2 枚	3 枚	4 枚
4×Lower buffer	1.5 ml	3.0 ml	4.5 ml	6.0 ml
30% アクリルアミド	2 ml	4 ml	6 ml	8 ml
10%				
12%	2.4 ml	4.8 ml	7.2 ml	9.6 ml
8%	1.6 ml	3.2 ml	4.8 ml	6.4 ml
H ₂ O	2.5 ml	5 ml	7.5 ml	10 ml
10%				
12%	2.1 ml	4.2 ml	6.3 ml	8.4 ml
8%	2.9 ml	5.8 ml	8.7 ml	11.6 ml
TEMED	6 μl	12 μl	18 μl	24 μl
10% APS	60 μl	120 μl	180 μl	240 μl

Western blotting

1. サンプルを SDS-PAGE によって展開する。
2. SDS-PAGE を流している間に、メンブレンをメタノールに 5 分間浸し、その後 Transfer buffer に浸し、SDS-PAGE が終了するまで入れておく。
3. Blotting 盤を用意し、メンブレンと同サイズに切ったろ紙を 6 枚 Transfer buffer に浸す。
4. Blotting 盤にろ紙 3 枚、ゲル、メンブレン、ろ紙 3 枚の順に乗せる。この時ろ紙は固く絞る。この時、重ねたものの間に空気が入らないように気を付け、もし入ったらピンセットやスパーテルを用いて取り除く。
5. メンブレン 1 cm² あたり 1 mA の電流で Blotting を行う。Blotting の時間は基本

- を 60 分とし、サイズの大きなタンパクや、転写の具合等に合わせて時間を設定する。
6. Blotting の間に Blocking 用のスキムミルクと TNT buffer 5% になるように溶かす。
 7. Blotting が終了したらメンブレンをスキムミルクに入れ 30 分浸透し Blocking を行う。
 8. Blocking 後のメンブレンを TNT buffer で軽くすすぎ、一次抗体に漬け振とうする。
 9. 抗体反応が終了したらメンブレンを TNT buffer で 10 分×3 回すすぎ、二次抗体に漬ける。(現在微研で使用している rabbit, mouse 両抗体は 1 万倍希釈で使用し、反応は 1 時間で良い)
 10. 二次抗体の反応が終了したら TNT buffer で 10 分×3 回すすぎ、メンブレンを空気が入らないようにラップの上に乗せる。
 11. Lumi GLO 300 μ l (solA:100 μ l + solB:200 μ l) をメンブレン全体に行き渡るようにピペットマンで滴下し、空気が入らないようにラップで包む。
 12. BIO-RAD 社の Molecular Image ChemiDoc™ XRS+ Imaging System にメンブレンをセットし画像を取得及び解析を行う。画像の取得及び解析は BIO-RAD 社の解析ソフトウェア Image Lab を使用。
 13. 同一メンブレンで再度別の抗体を反応させる場合は TNT buffer で 5 分間すすいだ後、SDS running buffer で 3 分間すすぎその後 TNT buffer で 5 分間×3 回すすぐ。
 14. スキムミルクで Blocking を 30 分行う。
 15. Blocking 後、メンブレンを TNT buffer で軽くすすぎ、次の一次抗体に漬け振とうする。
 16. 以降の作業は最初の抗体を反応させた時と同様に行う。

14. LacZ assay

ウォーターバスを 28°C にセット

<用意するもの>

- Zbuffer 60mM NaHPO₄ · 7H₂O
- 40mM NaH₂PO₄ · 7H₂O
- 10mM KCl (以上ストック作成可能)
- 1mM MgSO₄ · 7H₂O
- 1mM DTT (使用時に加える)

- 4mg/ml ONPG in Z buffer (基質)

Z buffer に溶かす際には、エッペンに ONPG を測りとり、Z buffer を加えては溶かしてを繰り返し、少しずつ Z buffer に溶かし込んでいく。ONPG を溶かす Z buffer には MgSO₄ や DTT は入っていないもので良い。

- 1M Na₂CO₃ (stop solution)

- トルエン

菌体を目的の培地・stage で分取(0.03~1 ml 活性の強さにより調整)

↓ add 500 µl Z buffer

ボルテックス or ピペッティングで suspend

↓

ボルテックス後、28°C ウォーターバス 2 min incubate ※温度平衡化

↓ add 200 µl 基質

ストップウォッチスタート
すぐに手で振って攪拌

※ サンプルが複数ある場合は
15sec おきに基質を加えていく

28°C に戻す

↓

適度に黄色になったら

↓ add 500 µl stop solution

すぐに手で振って攪拌

氷中へ

↓

全てのサンプル反応停止後

↓ 15000rpm 5 min 遠心

表面のトルエンと沈殿した菌体の中の sup を新たなエッペンに分取

↓

Sup は氷中へ (約 1 ml)

↓

Abs 420nm を測定

活性 (U) = $1000 \times \text{Abs } 420\text{nm} / T(\text{min}) / V(\text{ml}) / \text{OD}600\text{nm}$

試薬

1. 培地

・ LB 寒天培地 (100 mL)

Tryptone peptone (Difco Laboratories)	1 g
Yeast extract (Difco Laboratories)	0.5 g
NaCl (関東化学株式会社)	0.5 g
細菌用粉末寒天	1.5 g
H ₂ O (milliQ water)	100 mL

上記の材料を三角フラスコに混ぜ、均一になるように攪拌する。その後、オートクレーブ滅菌 (121°C, 20min) し、手で持てる程度まで冷めたところで必要に応じて抗生物質等の試薬を添加する。よく攪拌し無菌空間内でプレートを作成する。

・ LB 液体培地 (100 mL)

Tryptone peptone (Difco Laboratories)	1 g
Yeast extract (Difco Laboratories)	0.5 g
NaCl (関東化学株式会社)	0.5 g
H ₂ O (milliQ water)	100 mL

上記の材料を試薬瓶に混ぜ、均一になるように攪拌し、オートクレーブ滅菌 (121°C, 20min) する。

・ LB 液体培地(Tryptone0.03%) (100 mL)

Tryptone peptone (Difco Laboratories)	0.03 g
Yeast extract (Difco Laboratories)	0.5 g
NaCl (関東化学株式会社)	0.5 g
H ₂ O (milliQ water)	100 mL
L-Tryptophan	2ml

上記の材料を L-Tryptophan 以外、試薬瓶に混ぜ、均一になるように攪拌し、オートクレーブ滅菌 (121°C, 20min) する。L-Tryptophan を後入れし、遮光して 4°Cにて保存。

・ 最少培地((Spizizen's minimal salts medium) (100ml)

細菌用粉末寒天	1.5g
10×MM	10ml

細菌用粉末寒天を H₂O 85 ml に溶かし、10×MM は別の容器に分注し、オートクレーブで 121°C,20 分滅菌する。オートクレーブ後、フラスコが手で持てる程度まで冷えたら以下のものを加え、バーナーを炊いてプレートにまく。

10×MM	10ml
50% glucose	1ml
1M MgSO ₄	0.5ml
L-Tryptophan	2ml

・ CI 培地(0.004% casamino acid) (100ml)

細菌用粉末寒天	1.5g
10×MM	10ml

細菌用粉末寒天を H₂O 81 ml に溶かし、10×MM は別の容器に分注し、オートクレーブで 121°C, 20 分滅菌する。オートクレーブ後、フラスコが手で持てる程度まで冷えたら以下のものを加え、バーナーを炊いてプレートにまく。

10×MM	10ml
50% glucose	1ml
1M MgSO ₄	0.5ml
5% casamino acid	80µl

・ 10×MM (Minimal Medium) (250 mL)

K ₂ HPO ₄ (関東化学株式会社)	35 g
KH ₂ PO ₄ (関東化学株式会社)	15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (関東化学株式会社)	5 g
Trisodium Citrate Dihydrate (関東化学株式会社)	2.5 g

ビーカーに約 100 mL の H₂O (MilliQ water) を入れ、上記の試薬を加えて攪拌しながら溶解する。メスシリンダーに洗いこみ、目的の量まで fill-up する。試薬瓶に移してオートクレーブ滅菌 (121°C, 20min) 。室温で保存。

・ 1×MM (Minimal Medium)

上記の 10×MM を MilliQ water で 10 倍希釈し、オートクレーブ滅菌 (121°C, 20min)する。

2. 抗生物質他

Spc (100 mg/mL)

Spectinomycin (和光純薬株式会社) 1 g

H₂O 10 mL

薬剤を目的濃度で H₂O に溶解し、溶け残りが無いようよく Vortex 攪拌した後、フィルター滅菌(0.45 μm) し 1.5 mL チューブに分注して-30°Cに保存。

Cm (20 mg/mL)

Chloramphenicol (ナカライテスク株式会社) 200 mg

99.5% EtOH (関東化学株式会社) 10 mL

薬剤を目的濃度で EtOH に溶解し、溶け残りが無いようよく Vortex 攪拌し、1.5 mL チューブに分注して-30°Cに保存。

Em (10 mg/mL)

Erythromycin (ナカライテスク株式会社) 100 mg

99.5% EtOH (関東化学株式会社) 10 mL

薬剤を目的濃度で EtOH に溶解し、溶け残りが無いようよく Vortex 攪拌し、1.5 mL チューブに分注して-30°Cに保存。

Amp (100 mg/mL)

Ampicillin sodium salt (Sigma-Aldrich) 1g

H₂O 10 mL

薬剤を目的濃度で H₂O に溶解し、溶け残りが無いようよく Vortex 攪拌した後、フィルター滅菌(0.45 μm) し 1.5 mL チューブに分注して-30°Cに保存。

Km (50 mg/mL)

Kanamycin Sulfate (富士フィルム和光純薬) 500mg

H₂O 10mL

薬剤を目的濃度で H₂O に溶解し、溶け残りが無いようよく Vortex 攪拌した後、フィルター滅菌(0.45 μm) し 1.5 mL チューブに分注して-30°Cに保存。

IPTG (1 M)

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (タカラバイオ株式会社) 2.38 g

H₂O 10 mL

薬剤を目的濃度で H₂O に溶解し、溶け残りが無いようよく Vortex 攪拌した後、フィルター滅菌(0.45 μm) し 1.5 mL チューブに分注して-30°Cに保存。

RNase (10 mg/ml)

Ribonuclease A (SIGMA) 10mg

1M Tris-HCl (pH7.5) 10 μ l

1M NaCl 15 μ l

H₂O 975 μ l

よく混ぜて溶かした後、100°C,15min incubate し室温でゆっくり常温に戻す。

Lysozyme (10mg/ml)

Lysozyme 10mg

10mM Tris-HCl (pH8.0) 1ml

用事調整で溶解して使用する。

10% SDS (100ml)

SDS (ナライテックス株式会社) 10g

Sodium dodecyl sulfate = Sodium lauryl sulfate

試薬ビンオートクレーブにかけ、乾燥させておく。適当な大きさのビーカーに SDS を 10g 入れ、加温しながら (高温不可・50-60°Cまで) H₂O で (Volume が出やすいため注意) 溶かす。マグネチックスターラーを使用する。溶解後、洗い込みながら、100ml に fill up・フィルター滅菌で滅菌乾燥した試薬ビンに入れる。

TES buffer (100 ml)

TES (100 ml)

Sucrose 25 g

1M Tris-HCl 5 ml

EDTA

0.5M EDTA (pH8.0) (500 ml)

EDTA-3Na (FW=412.24) (ナライテックス株式会社) 103.06 g

ビーカー中の適当量 H₂O (約 350 ml) でマグネチックスターラーを回して、10 N NaOH (約 5 ml) で pH を調整して溶解した後メスシリンダーで 500 ml に fill up、試薬ビンに移してオートクレーブする。

1M Tris-HCl (100ml)

TRIZMA HCl (SIGMA) 0.444g

TRIZMA Base (SIGMA) 0.265g

25°C (pH8.0) のもので H₂O に溶かし、メスシリンダーで 100ml に fill up し、試薬ビンに入れてオートクレーブする。

50×TAE (1000ml)

Tris Base (SIGMA) 242g

Acetic acid (関東化学株式会社) 57.1ml

0.5M EDTA (調製法：別紙参照) 100ml (pH8.0)

1L のビーカーに 500-600ml の milliQ、Tris-Base を入れてスターラーで攪拌。吸熱反応のため、温めると溶けやすくなる。酢酸（発熱反応）と、EDTA を加えて 1000ml に fill up する。（オークレなし）

50% glucose (100 ml)

glucose (関東化学株式会社) 50 g

H₂O up to 100 ml

まず、攪拌子を入れた 100 ml のビーカーに 50 ml 程度の H₂O を入れる。

量り取った glucose をビーカーに少量ずつ入れ、全て溶かす（熱を加えるとより溶け易くなる）全て解けたら、100 ml のメスシリンダーに注ぎ、ビーカーを 2-3 度洗いこむ。

100 ml まで fill up し、パラフィルムで蓋をし、よく混ぜる。

試薬ビンに分注し、オートクレーブで 121°C・15 min 滅菌する。

5% Casamino acid

Bacto™ VITAMIN ASSAY CASAMINO ACIDS (DIFCO) 5 g

試薬ビンをオートクレーブにかけ、乾燥させておく。適当な大きさのビーカーに CASAMINO ACIDS を 5 g 入れ、加温しながら（高温不可・50-60°Cまで）H₂O で溶かす。マグネチックスターラーを使用する。溶解後、洗い込みながら、100 ml に fill up・フィルター滅菌で滅菌乾燥した試薬ビンに入れる。

2.5 mg/ml L-Tryptophan

L-Tryptophan (関東化学) 250 mg

試薬ビンをオートクレーブにかけ、乾燥させておく。適当な大きさのビーカーに L-Tryptophan を入れ、加温しながら（高温不可・50-60°Cまで）H₂O で溶かす。マグネチックスターラーを使用する。溶解後、洗い込みながら、100 ml に fill up・フィルター滅菌で滅菌乾燥した試薬ビンに入れ、試薬ビンはアルミホイルで遮光し、4°C保存。

5mg/ml L-Methionine

L-Methionine (関東化学) 250 mg

試薬ビンをオートクレーブにかけ、乾燥させておく。適当な大きさのビーカーに L-Methionine を入れ、加温しながら（高温不可・50-60°Cまで）H₂O で溶かす。マグネチックスターラーを使用する。溶解後、洗い込みながら、100 ml に fill up・フィルター滅菌で滅菌乾燥した試薬ビンに入れる。常温保存。

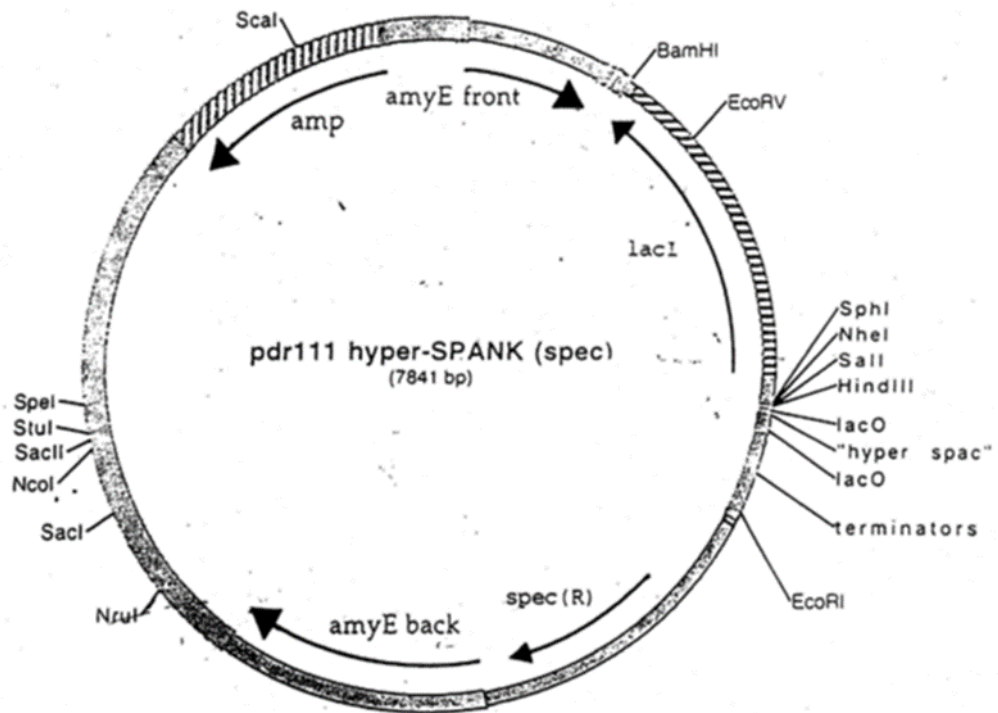
RHX (5mg/ml)

Arginine Hydoroxamate (Sigma Ardrich) 50mg

TPP チューブに Arginine Hydoroxamate 50mg を入れ、10ml に Fill up。その後フィルター滅菌で滅菌。-30°Cにて保存。

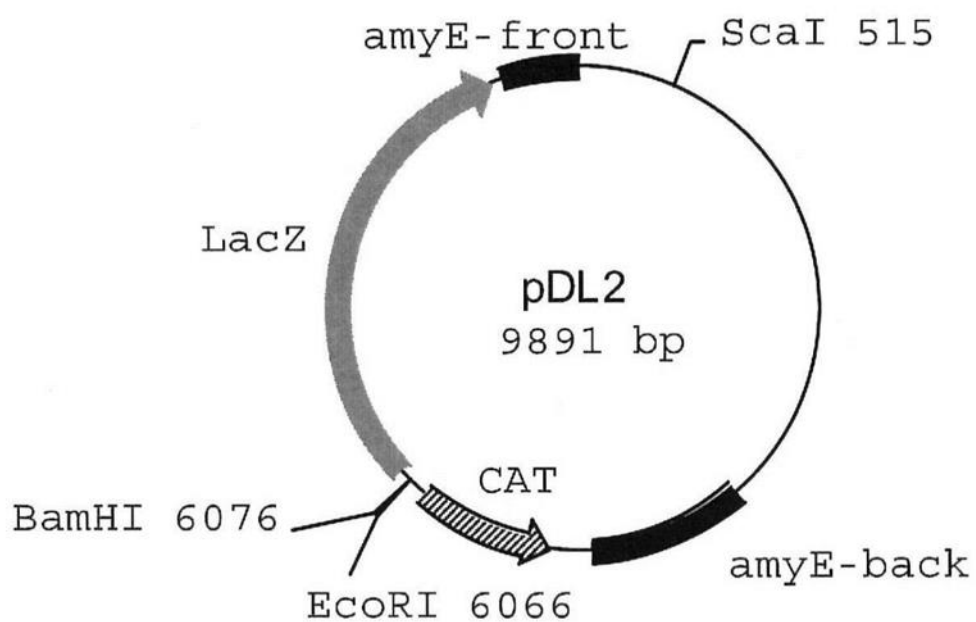
pDT111C

pDR111 のスペクチノマイシン耐性遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子に置き換えたもの。



pDL2

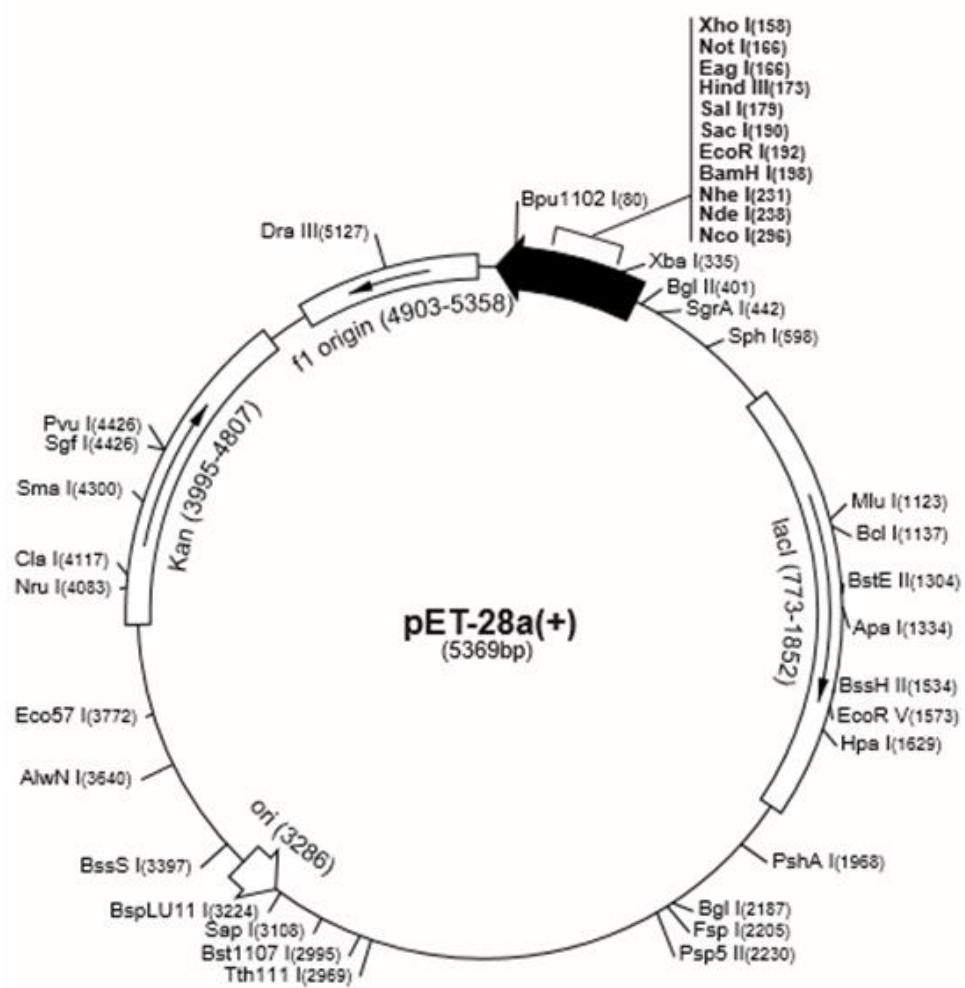
LacZ assay 用の株作製に使用。
amyE 領域にコンストラクトを導入できる。



<http://astamuse.com/ja/published/JP/No/2011103875> より引用、一部改変

pET28a

タンパク質精製における大腸菌宿主の発現ベクターとして使用。



https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-28a-c_map. より引用。

<引用・参考文献>

1. Agirrezabala, X., Fernández, IS., Kelley, AC., Cartón, DG., Ramakrishnan, V., Valle, M. (2013) The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA. *EMBO Reports*. **14**(9):811-6.
2. Alexandre, T., Raynal, B., and Munier-Lehmann, H. (2015) Two classes of bacterial IMPDHs according to their quaternary structures and catalytic properties. *PLoS ONE*, **10**:e0116578.
3. Anderson, B.W., Liu, K., Wolak, C., Dubiel, K., She, F., Satyshur, K.A., *et al.* (2019) Evolution of (p)ppGpp-HPRT regulation through diversification of an allosteric oligomeric interaction. *eLIFE* e47534.
4. Arnvig, K., Hove-Jensen, B., and Switzer, R.L. (1990) Purification and properties of phosphoribosyl-diphosphate synthetase from *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, **92**:195-200.
5. Atkinson, G.C., Tenson, T., and Hauryliuk, V. (2011) The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS ONE*, **6**:e23479.
6. Barker, M.M., Gaal, T., and Gourse, R.L. (2001a) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Molecular Biology*, **305**:673-688.
7. Barker, M.M., Gaal, T., and Gourse, R.L. (2001b) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *Journal of Molecular Biology*, **305**:689-702.
8. Bartlett, M.S., Gaal, T., Ross, W., and Gourse, R.L. (1998) RNA polymerase mutants that destabilize RNA polymerase-promoter complexes alter NTP-sensing by *rrn* P1 promoters. *Journal of Molecular Biology*, **279**:331-345.

9. Basu, R.S., Warner, B.A., Molodtsov, V., Pupov, D., Esyunina, D., Fernández-Tornero, C. *et al.* (2014) Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **289**:24549-24559.
10. Bateman, A. (1997) The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in Biochemical Sciences*, **22**:12-13
11. Belisky, B.R. and Sonenshein, A.L. (2013) Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* CodY-binding sites at single-nucleotide resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**:7026-7031
12. Bittner, A.N, Kriel, A., and Wang, J.D. (2014) Lowering GTP level increases survival of amino acid starvation but slows growth rate for *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp. *Journal of Bacteriology*, **196**:2067-2076.
13. Breton, A., Pinson, B., Coulpier, F., Giraud, M.F., Dautant, A., and Daignan-Fornier, B. (2008) Lethal accumulation of guanylic nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae* HPT1-deregulated mutants. *Genetics*, **178**:815-824.
14. Buey, R.M., Fernández-Justel, D., Marcos-Alcalde, Í., Winter, G., Gómez-Puertas, P., de Pereda, J.M., *et al.* (2017) A nucleotide-controlled conformational switch modulates the activity of eukaryotic IMP dehydrogenases. *Scientific Reports*, **7**:2648.
15. Buey, R.M., Ledesma-Amaro, R., Velázquez-Campoy, A., Balsera, M., Chagoyen, M., de Pereda, J.M., *et al.* (2015) Guanine nucleotide binding to the Bateman domain mediates the allosteric inhibition of eukaryotic IMP dehydrogenases. *Nature Communications*, **6**:8923.
16. Durfee, T., Hansen, A.M., Zhi, H., Blattner, F.R., and Jin, D.J. (2008) Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **190**:1084-1096.
17. Ebbole, D.J. and Zalkin, H. (1989) *Bacillus subtilis pur* operon expression and regulation. *Journal of Bacteriology*, **171**:2136-2141.
18. Eriksen, T.A., Kadziola, A., Bentsen, A.K., Harlow, K.W., and Larsen, S. (2000)

Structural basis for the function of *Bacillus subtilis* phosphoribosyl-pyrophosphate synthetase. *Nature Structural Biology*, 7:303-308.

19. Eymann, C., Homuth, G., Scharf, C., and Hecker, M. (2002) *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, **184**:2500-20.
20. Gaca, A.O., Kajfasz, J.K., Miller, J.H., Liu, K., Wang, J.D., Abranches, J., *et al.* (2013) Basal levels of (p)ppGpp in *Enterococcus faecalis*: the magic beyond the stringent response. *mBIO*, **4**:e00646-13.
21. Gallant, J., Irr, J., and Cashel, M. (1971) The mechanism of amino acid control of guanylate and adenylate biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **246**:5812-5816.
22. Guédon, E., Serror, P., Ehrlich, S.D., Renault, P., and Delorme, C. (2001) Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, **40**:1227-1239.
23. Handke, L.D., Shivers, R.P., and Sonenshein, A.L. (2008) Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *Journal of Bacteriology*, **190**:798-806.
24. Hernandez, V.J. and Cashel, M. (1995) Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* σ 70 mediate ppGpp-dependent functions *in vivo*. *Journal of Molecular Biology*, **252**:536-549.
25. Knight, R.D., Mangum, J., Lucas, D.L., Cooney, D.A., Khan, E.C., and Wright, D.G. (1987) Inosine monophosphate dehydrogenase and myeloid cell maturation. *Blood*, **69**:634-639.
26. Kofuji S., Hirayama A., Eberhardt A.O., Kawaguchi R., Sugiura Y., Sampetrean O., Ikeda Y., *et al.*, (2019) IMP dehydrogenase-2 drives aberrant nucleolar activity and promotes tumorigenesis in glioblastoma. *Nature Cell Biology*, **21**(8):1003-1014.
27. Krásný, L. and Guarse, R.L. (2004) An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *The EMBO Journal*,

23:4473-4483.

28. Krásný, L., Tiserová, H., Jonák, J., Rejman, D., and Sanderová, H. (2008) The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **69**:42-54.
29. Kriel, A., Bittner, A.N., Kim, S.H., and Liu, K., Tehranchi A.K., Zou W.Y., *et al.* (2012) Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. *Molecular Cell*, **48**:231-241.
30. Kriel, A., Brinsmade, S.R., Tse, J.L., Tehranchi, A.K., Bittner, A.N., Sonenshein, A.L., *et al.* (2014) GTP dysregulation in *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp results in phenotypic amino acid auxotrophy and failure to adapt to nutrient downshift and regulate biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, **196**:189-201.
31. Labesse, G., Alexandre, T., Vaupré, L., Salard-Arnaud, I., Him, J.L., Raynal, B., *et al.* (2013) MgATP regulates allostery and fiber formation in IMPDHs. *Structure*, **21**:975-985.
32. Lane, W.J. and Darst, S.A. (2010) Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: structural analysis. *Journal of Molecular Biology*, **395**:686-704.
33. Laurie, A.D., Bernardo, L.M., Sze, C.C., Skarfstad, E., Szalewska-Palasz, A., Nyström, T., *et al.* (2003) The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:1494-503.
34. Levine, A., Vannier, F., Dehbi, M., Henckes, G., and Séror, S.J. (1991) The stringent response blocks DNA replication outside the ori region in *Bacillus subtilis* and at the origin in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, **219**:605-613.
35. Liu, K., Myers, A.R., Pisithkul, T., Claas, K.R., Satyshur, K.A., Amador-Noguez, D., *et al.* (2015) Molecular mechanism and evolution of guanylate kinase regulation by (p)ppGpp. *Molecular Cell*, **57**:735-749.
36. Lopez, J.M., Dromerick, A., and Freese, E. (1981) Response of guanosine 5'-

triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. *Journal of Bacteriology*, **146**:605-613.

37. Lucas, M., Encinar, J.A., Arribas, E.A., Oyenarte, I., García, I.G., Kortazar, D. *et al.* (2010) Binding of S-methyl-5'-thioadenosine and S-adenosyl-L-methionine to protein MJ0100 triggers an open-to-closed conformational change in its CBS motif pair. *Journal of Molecular Biology*, **396**:800-820.
38. Lucas, D.L., Webster, H.K., and Wright, D.G. (1983) Purine metabolism in myeloid precursor cells during maturation. Studies with the HL-60 cell line. *The Journal of Clinical Investigation*, **72**:1889-1900.
39. McLean, J.E., Hamaguchi, N., Belenky, P., Mortimer, S.E., Stanton M., and Hedstrom, L. (2004) Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical Journal*, **379**:243-251.
40. Meyer, E. and Switzer, R.L. (1979) Regulation of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase activity by end products. *Journal of Biological Chemistry*, **254**:5397-5402.
41. Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., Rodnina, MV. *et al.* (2006) The nucleotide-binding site of bacterial translation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **38**: 13962-7.
42. Mitkevich, VA., Ermakov, A., Kulikova, AA., Tankov, S., Shyp, V., Soosaar, A., Tenson, T. *et al.*, (2010) Thermodynamic characterization of ppGpp binding to EF-G or IF2 and of initiator tRNA binding to free IF2 in the presence of GDP, GTP, or ppGpp. *Journal of molecular biology*, **402**(5):838-46.
43. Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., *et al.* (2003) Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *Journal of Bacteriology*, **185**:1911-1922.
44. Murphy, H. and Cashel, M. (2003) Isolation of RNA polymerase suppressors of a

- (p)ppGpp deficiency. *Methods in Enzymology*, **371**:596-601.
45. Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C.S., Narisawa, T., Murakami, K., *et al.* (2008) Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **67**:291-304.
 46. Nimmesgern, E., Black, J., Futer, O., Fulghum, J.R., Chambers, S.P., Brummel, C.L., *et al.* (1999) Biochemical analysis of the modular enzyme inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Protein Expression and Purification*, **17**:282-289.
 47. Ochi K. (1986) A decrease in GTP content is associated with aerial mycelium formation in *Streptomyces* MA406-A-1. *Journal of General Microbiology*, **132**:299-305.
 48. Pall, M.L. and Robertson, C.K. (1988) Growth regulation by GTP. Regulation of nucleotide pools in *Neurospora* by nitrogen and sulfur control systems. *Journal of Biological Chemistry*, **263**:11168-11174.
 49. Pao, CC, Dyess, BT. (1981) Effect of unusual guanosine nucleotides on the activities of some *Escherichia coli* cellular enzymes. *Biochim Biophys Acta.*, **677**:358-62.
 50. Paul, B.J., Barker, M.M., Ross, W., Schneider, D.A., Webb, C., Foster, J.W., *et al.* (2004) DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, **118**:311-322.
 51. Paul, B.J., Berkmen, M.B., and Gourse, R.L. (2005) DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**:7823-7828.
 52. Pimkin, M. and Markham, G.D. (2008) The CBS subdomain of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase regulates purine nucleotide turnover. *Molecular Microbiology*, **68**:342-359.
 53. Pimkin, M., Pimkina, J., and Markham, G.D. (2009) A regulatory role of the Bateman domain of IMP dehydrogenase in adenylate nucleotide biosynthesis.

Journal of Biological Chemistry, **284**:7960-7969.

54. Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.W., and Sonenshein, A.L. (2001) *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes & Development*, **15**:1093-1103.
55. Rutherford, S.T., Villers, C.L., Lee, J.H., Ross, W., and Gourse, R.L. (2009) Allosteric control of *Escherichia coli* rRNA promoter complexes by DksA. *Genes & Development*, **15**:236-248.
56. Shivers, R.P. and Sonenshein, A.L. (2004) Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Molecular Microbiology*, **53**:599-611.
57. Sojka, L., Kouba, T., Barvík, I., Sanderová, H., Maderová, Z., Jonák, J., *et al.* (2011) Rapid changes in gene expression: DNA determinants of promoter regulation by the concentration of the transcription initiating NTP in *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids research*, **39**:4598-4611.
58. Spizizen, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **44**:1072-1078.
59. Sturgill, G. and Rather P.N., (2004) Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology*, **51**:437-446.
60. Szalewska-Palasz, A., Johansson, L.U., Bernardo, L.M., Skarfstad, E., Stec, E., Brannstrom, K., and Shingler, V. (2007) Properties of RNA polymerase bypass mutants: Implications for the role of ppGpp and its co-factor DksA in controlling transcription dependent on σ^{54} . *Journal of Biological Chemistry*, **282**:18046-18056.
61. Tojo, S., Satomura, T., Kumamoto, K., Hirooka, K., and Fujita, Y. (2008) Molecular mechanisms underlying the positive stringent response of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon, involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids. *Journal of Bacteriology*, **190**:6134-6147.

62. Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., and Fujita, Y. (2005) Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Molecular Microbiology*, **56**:1560-1573.
63. Tomsic, J., McDaniel, B.A., Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2007) Natural variability in S-adenosylmethionine (SAM)-dependent riboswitches: S-box elements in *Bacillus subtilis* exhibit differential sensitivity to SAM *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Bacteriology*, **190**:823-833.
64. Traag, B.A., Ramirez-Peralta, A., Wang Erickson, A.F., Setlow, P., and Losick, R. (2013) A novel RNA polymerase-binding protein controlling genes involved in spore germination in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **89**:113-122.
65. Trautinger, B.W. and Lloyd, R.G. (2002) Modulation of DNA repair by mutations flanking the DNA channel through RNA polymerase. *The EMBO Journal*, **21**:6944-6953.
66. Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H.T, Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T., *et al.* (2008) The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **68**:1128-1148.
67. Tucker AM., Winkler HH., Driskell LO., Wood DO. (2003) S-adenosylmethionine transport in *Rickettsia prowazekii*. *Journal of Bacteriology*, **185**(10): 3031-5.
68. Varik V., Oliveira S.R.A., Hauryliuk V., Tenson T. (2017) HPLC-based quantification of bacterial housekeeping nucleotides and alarmone messengers ppGpp and pppGpp. *Scientific Reports*, **7**(1):11022.
69. Varma, A., Freese, E.B., and Freese, E. (1985) Partial deprivation of GTP initiates meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics*, **201**:1-6
70. Wang, B., Dai, P., Ding, D., Del Rosario, A., Grant, R.A., Pentelute, B.L., *et al.* (2018) Affinity-based capture and identification of protein effectors of the growth regulator

ppGpp. *Nature Chemical Biology*, **15**:141-150.

71. Wang, J.D., Sanders, G.M., and Grossman, A.D. (2007) Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell*, **128**:865-875.
72. Weng, M., Nagy, P.L., and Zalkin, H. (1995) Identification of the *Bacillus subtilis* pur operon repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**:7455-7459.
73. Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., and Cashel, M. (1991) Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**:5980-5990.
74. Zhou, Y.N. and Jin, D.J., (1998) The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like "stringent" RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**:2908-2913.