

Two-dimensional Polyacrylamide Gel Analysis of Proteins Synthesized during Germination of Bacillus Subtilis 168

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8372

二次元電気泳動法による枯草菌孢子 発芽期の蛋白質の解析について

金沢大学癌研究所分子生物部 (主任: 亀山忠典教授)

平野 由 朗

(平成4年5月8日受付)

枯草菌孢子発芽期の遺伝子発現制御の一つの指標である蛋白質合成の経時的変化を二次元電気泳動法を用いて分析した。発芽5分で明白に3種類の標識蛋白質分子, 10分までに約65種類, 次の10~20分間に約210種類, 増殖期には約260種類の標識蛋白質分子がそれぞれ確認された。またアクチノマイシンDと³⁵S-メチオニンを発芽と同時に加え15分まで培養したところ2種類の蛋白質分子の合成が確認された。アクチノマイシンD存在下で合成が確認されるこの2種類の蛋白質分子は発芽5分までに合成が確認された3種類の蛋白質分子のうち2種類と同じものであった。またこの2種類の蛋白質分子のうちの一つは枯草菌のRNAポリメラーゼの σ^A である可能性が示唆される。

Key words *Bacillus subtilis*, germination, protein synthesis, RNA polymerase, σ factor

孢子形成細菌の作る孢子は生物学的活性を休止し, 外的環境に強い抵抗性を示す。この様な孢子は固有の条件に応じて発芽し, 成長期を経て栄養細胞になる。従ってこの過程は孢子において抑止状態にある遺伝子を活性化し発現する過程としてとらえることができる。Fukudaら¹⁾その他^{2,3)}により, 孢子形成過程においての遺伝子の転写制御にRNAポリメラーゼの σ 因子が関与していることが証明されている。しかし孢子が発芽して増殖期へ移行する過程についてはほとんどわかっていない。

従って枯草菌の細胞分化を包括的に理解するには孢子の発芽についての研究が特に重要である。孢子の発芽期の蛋白質合成パターンの変化に関する解析が, Mullinら⁴⁾や, Heckerら^{5,6)}によりなされているが, これらの結果には相互に多くの相違点があり, いずれもこの過程の蛋白質分子の特異パターンを結論するには不十分である。孢子の発芽過程で合成される伝令RNA (messenger RNA, mRNA) は増殖期と同様に寿命が短いことが特徴である⁷⁾から孢子発芽過程の蛋白質合成は, 直接的に遺伝子発現のプログラムによって表現されているとみなすことができる。

従って本研究では, 高感度二次元電気泳動法⁸⁾をもちいて孢子の発芽期に合成される蛋白質分子種の解析をおこない, あわせて遺伝子発現制御の一端を明らかにすることをめざした。

材料および方法

I. 試薬類

特に会社名の記載のない試薬類は和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。標識したアミノ酸はICNバイオメディカル社 (Costa Mesa, USA) から購入した。

II. 使用菌種

枯草菌168 (*Bacillus subtilis*) LMH: L-ロイシン, L-メチ

オニン, L-ヒスチジン要求性

III. 培地

1. 増殖培地

枯草菌培養の前培養および増殖用に用いた。この培地は1 l中に1 M トリス 100ml, 肉エキス 1.5g, 酵母エキス 1.5g, ペプトン 5g, 塩化ナトリウム 3.5g, 第二リン酸カリウム 140mg, 第一リン酸カリウム 60mg, ブドウ糖 5g およびL-ロイシン, L-メチオニン, L-ヒスチジンを各 50mg 含むpH7とした。

2. Schaefferの孢子調整培地

枯草菌孢子を得るために用いた。この培地は1 l中に肉エキス 8g, 硫酸マグネシウム 250mg, 塩化カリウム 1g, 塩化マンガ 1.96mg, 硫酸鉄 0.28mg, 硝酸カリウム 236mg, ブドウ糖 5g およびL-トリプトファン, L-ロイシン各 50mg, 寒天粉末 20g を含む, pH 7.2とした。

3. 発芽培地

枯草菌の発芽培地として Spizizenの最小培地⁹⁾に, 200 μ g/ml 酵母エキス, 500 μ g/ml カザミノ酸, 0.5%ブドウ糖, 100 μ g/ml L-アラニンを加えて用いた。

IV. 緩衝液

緩衝液A (100mM トリス, 1 M 塩化ナトリウム, 10mM 塩化マグネシウム, pH 7.2) 緩衝液B (100mM トリス, 10mM 塩化マグネシウム (石津, 大阪), 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 20%グリセリン, 0.15M 塩化ナトリウム)

V. 孢子の調整

Schaefferの孢子調整培養液を含む寒天(2%)培地で培養した。37°C, 3日の培養後, 顕微鏡で孢子を確認して集菌した。適当量の滅菌蒸留水に懸濁してリゾチームおよびドデシル硫酸

Abbreviations: EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid: mRNA, messenger RNA: PBS, phosphate buffered saline: SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: TCA, trichloroacetic acid

ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) (半井, 大阪) 処理の後, 1M および 0.14M 塩化ナトリウムでよく洗浄し, 更に滅菌蒸留水で数回十分に洗浄し, 使用まで滅菌蒸留水に懸濁して 4°C で貯蔵した。

VI. 発芽

使用前に 80°C, 15分熱処理した胞子を L-アラニン (100 µg/ml) を含む発芽培地中で 37°C に加温, 激しい振とう下で実験を行った。増殖期の細胞は中期対数増殖期からとった。

VII. 放射性同位元素による標識

生体高分子合成の経時的解析には, 放射性同位元素標識の ^3H -ウリジン (比活性 2.22TBq/mmol), ^3H -チミジン (比活性 1.11TBq/mmol), ^{35}S -メチオニン (比活性 50TBq/mmol) を用いた。標識反応は同量の冷 10% トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) で 3回洗浄後 TCA 不溶性沈殿をガラス繊維濾紙 (whatman GF/C) 上に集め, 放射性活性をトルエン ppo シンチレーター (Beckman, California, USA) を用いて測定した。

発芽期及び増殖期の細胞は ^{35}S -メチオニンで標識した後, 発芽開始後 30分までの細胞は 10%メルカプトエタノールをふくむ 8M 尿素 (pH 2.0) で 37°C 1時間処理し, 緩衝液 A で 5回良く洗浄し, さらに緩衝液 B で洗浄後, 同液に懸濁する。これをリゾチーム処理し, その後超音波 (Ultrasonics, USA) 処理で破砕した。発芽開始 30分以降の細胞は緩衝液 A で洗い, その後緩衝液 B に懸濁し, リゾチーム処理の後超音波処理した。

VIII. 二次元電気泳動

蛋白質の抽出液は, O' Farrell⁹⁾ の二次元電気泳動法で分析し

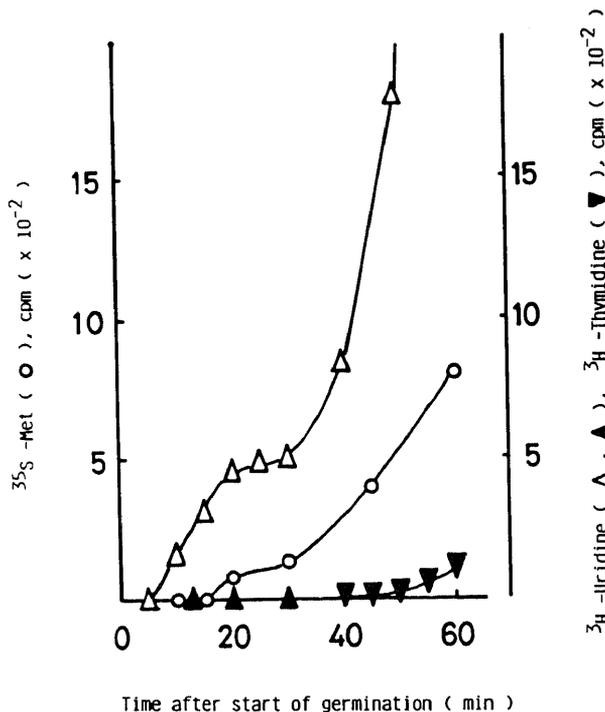


Fig. 1. Pulse-labelling of RNA, protein and DNA and the effect of actinomycin D on the sequential synthesis of RNA during germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* 168 LMH spores. Incorporation for 1 min of ^3H -uridine (Δ), ^{35}S -methionine (\circ) and ^3H -thymidine (\blacktriangledown) in to RNA, protein and DNA, respectively, was measured. Actinomycin D ($50\mu\text{g/ml}$) and ^3H -uridine were added to the suspension of spores at the start of germination, and the incorporation of ^3H -uridine was measured at the indicated time (\blacktriangle).

た。この方法は一次元には等電点電気泳動法, 二次元はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) を組み合わせたものである。等電点電気泳動には 4%ゲルを用いた。SDS-PAGE は SDS-トリス-グリシン系で 10%の泳動用ゲルと 5%の濃縮用ゲルの組合せを用い, 泳動用緩衝液には 25mM トリス, 192mM グリシン, 0.1% SDS を用いた。二次元電気泳動法により分画した蛋白分子はゲル乾燥の後, オートラジオグラフィーで検出した。銀染色法は 2D-銀染色試薬・II「第一」(第一化学, 東京) で指示された方法で行った。

IX. 大腸菌 RNA ポリメラーゼ抗血清

大腸菌の RNA ポリメラーゼ (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を $70\mu\text{g}$ ずつ 10日ごとに 4回ウサギに免疫し, Okoshi ら¹⁰⁾ により述べられた方法で抗血清を作製した。

X. 二次元二重免疫拡散法

二次元二重免疫拡散法は Ouchterlony¹¹⁾ により開発された方法で行った。

XI. ウェスタンブロットニング

二次元電気泳動法で分離した蛋白質はニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) に転写した。このニ

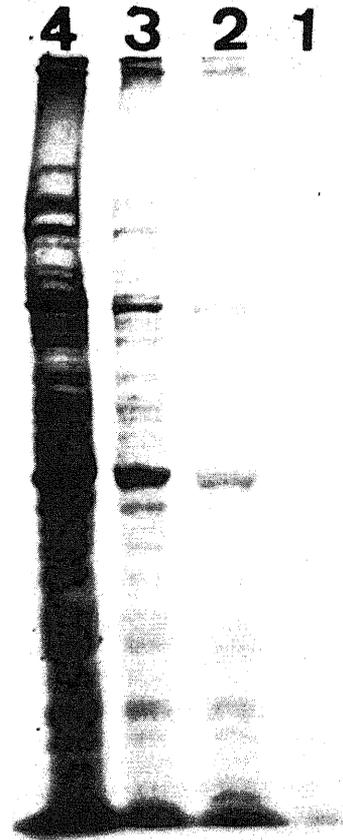


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of proteins synthesized during germination. Labelling with ^{35}S -methionine was performed from 0 to 5 min (1), 0 to 10 min (2), 10 to 20 min (3), and 20 to 30 min (4) during germination.

トロセルロース膜をブロッキング用の緩衝液に3時間浸し、一次抗体として抗大腸菌 RNA ポリメラーゼ家兎血清で30分反応させた後、二次抗体として西洋ワサビ過酸化酵素 (horseradish peroxidase) 標識した抗ウサギ抗体ヤギ抗体 (Bio Rad, California, USA) を用いて、間接抗体法¹²⁾で抗原を検出した。発色剤は4 塩化ナフトール (Bio Rad) を用いた。

XII. 枯草菌の RNA ポリメラーゼ

分析に用いた RNA ポリメラーゼは、硫酸塩析の後 DEAE セルロースカラムクロマトグラフィで精製したものを小林泰夫教授 (東京農工大) より供与していただいた。

成 績

I. パルス標識

これまでも多くの報告¹³⁾¹⁴⁾があるように枯草菌胞子の発芽期では、最初に RNA が合成され次に蛋白質合成、少し遅れて DNA 合成と続く。著者はまず ³H-ウリジン、³⁵S-メチオニン、³H-チミジンを用いて RNA 合成、蛋白質合成、DNA 合成を1分パルス標識で調べた (図1)。図1で示すように発芽5分で RNA 合成が始まり、15分で蛋白質合成が開始され、やや遅れて45分で DNA 合成がはじまる。またアクチノマイシンD (50

μg/ml) を発芽開始と同時に加えると、³H-ウリジンの取り込みはみられない。発芽初期におけるアクチノマイシンDの存在は RNA 合成を阻害している (図1)。

II. SDS-PAGE による解析

発芽期においてまず最初に合成される蛋白質分子はどのようなものか、そしてこの過程の進行とともに合成される蛋白質種を解明するために以下の実験をおこなった。SDS-PAGE の解析では発芽5分で少なくとも3つのバンドに ³⁵S-メチオニンの取り込みが確認され10分、20分と蛋白質分子のバンド数およびそれらの標識の強度が増大する (図2)。

III. 二次元電気泳動法による解析

分解能が SDS-PAGE より高性能の O' Farrell⁶⁾ 二次元電気泳動法を用いて発芽後特定の時期に合成される蛋白質分子種の解析を行った。この方法による解析の結果、³⁵S-メチオニンを0分に加えて5分まで培養したものでは少なくとも3種類の蛋白質分子の合成が確認され (図3A)、0分~10分のものでは約65種類 (図3B)、10分~20分のものでは約210種類 (図3C)、そして増殖期の1分標識では約260種類 (図3D) の蛋白質分子の合成が確認された。このように発芽過程の進行にともなって合成される蛋白質分子種が段階的にふえていく。

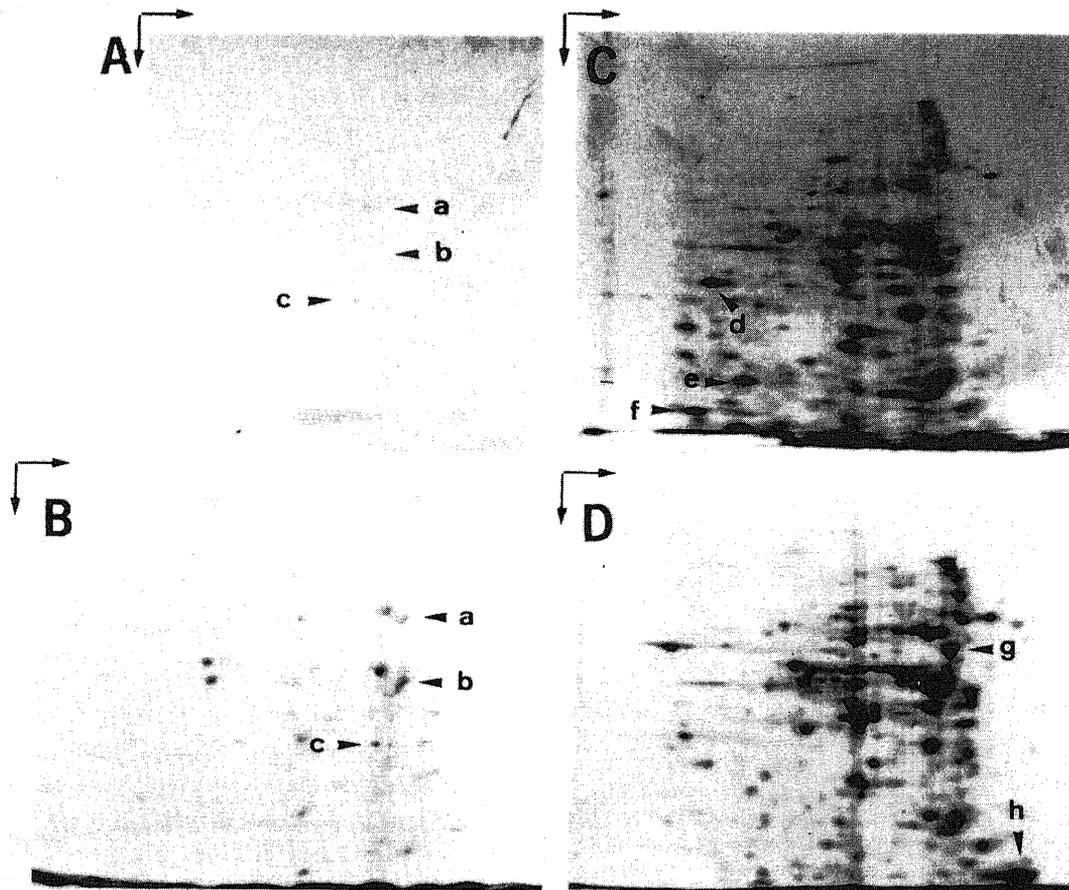


Fig. 3. Two-dimensional gel (electrophoresis) pattern of proteins synthesized during germination and vegetative growth. Labelling with ³⁵S-methionine was performed from 0 to 5 min (A), 0 to 10 min (B), and 10 to 20 min (C) during germination, and for 1 min (D) during vegetative growth. Horizontal and vertical arrows indicate the direction of isoelectric focusing and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis respectively. Spots a, b and c indicate proteins synthesized at early stage of germination. The d, e and f indicate proteins synthesized at later stage of germination and disappeared at vegetative stage. Spots g and h indicate proteins synthesized at vegetative stage.

このうち発芽5分で合成される a, b, c のうち b はこの後連続して多量に合成されるが a と c はその後20分まで b に比べて相対量は少ない (図 3C). またこの蛋白質 a, b は一度合成が開始されると発芽期, 増殖期とも継続して合成されるが c は増殖期には合成が確認されない. 発芽10分にはさらに多くの蛋白質分子数が合成され ^{35}S -メチオニン標識濃度の高いもので10数種, 濃度の低いものを含めると約65種の蛋白質分子のバンドが確認され (図 3B), これらはこれ以降継続して安定した発現がみられる. 次の発芽10~20分には10分までに発現した蛋白質分子種のスポットもより明確になり新たな蛋白質分子種の発現がみられ (図 3C) これらの蛋白質分子の大部分は継続して発現するが発芽初期のみみられる蛋白質分子も少ないながら存在する. それらの蛋白質分子は図 3C の d, e, f などである (図 3C).

増殖期の主要な蛋白質分子種スポットの二次元パターンは20分期のそれとほぼ一致する. 増殖期にのみみられる蛋白質分子のスポットは図 3D の g, h などである. このような分子種の合成量や分子種の段階的増加はその鋳型となる mRNA に依存していると思われる. 特に発芽初期の蛋白質分子の合成がどのような mRNA に依存しているかを吟味することが必要である.

Jeng ら¹⁵⁾ は休眠胞子に増殖期および胞子形成期の mRNA はあるが発芽期には機能しないとしている. またアクチノマイシン D を加えるとただちに mRNA の合成が阻害される. しかしながら現在のところ休眠胞子に蓄えられた RNA に発芽に必要な mRNA の機能があるかどうか証明されているとは考えられない.

IV. アクチノマイシン D の影響

図 1 に示すように, 発芽初期におけるアクチノマイシン D の存在は完全に RNA 合成を阻害しているから, アクチノマイシン D 存在下で蛋白質合成が認められるとするならばそれは胞子に蓄えられていた mRNA によるのか, あるいはアクチノマイシン D が発芽初期には胞子内部に透過しないので, この薬剤の影響を受けずに合成された mRNA に依存することも考えられる. 以上の観点からアクチノマイシン D の蛋白質合成におよぼす影響を調べた.

まず発芽開始と同時にアクチノマイシン D と ^{35}S -メチオニンを加え, 15分まで合成蛋白質を標識し, O' Farrell の二次元泳動法によって2種類の蛋白質分子 a, b の合成が確認された (図 4A). 0分にアクチノマイシン D を加え, 10分に ^{35}S -メチ

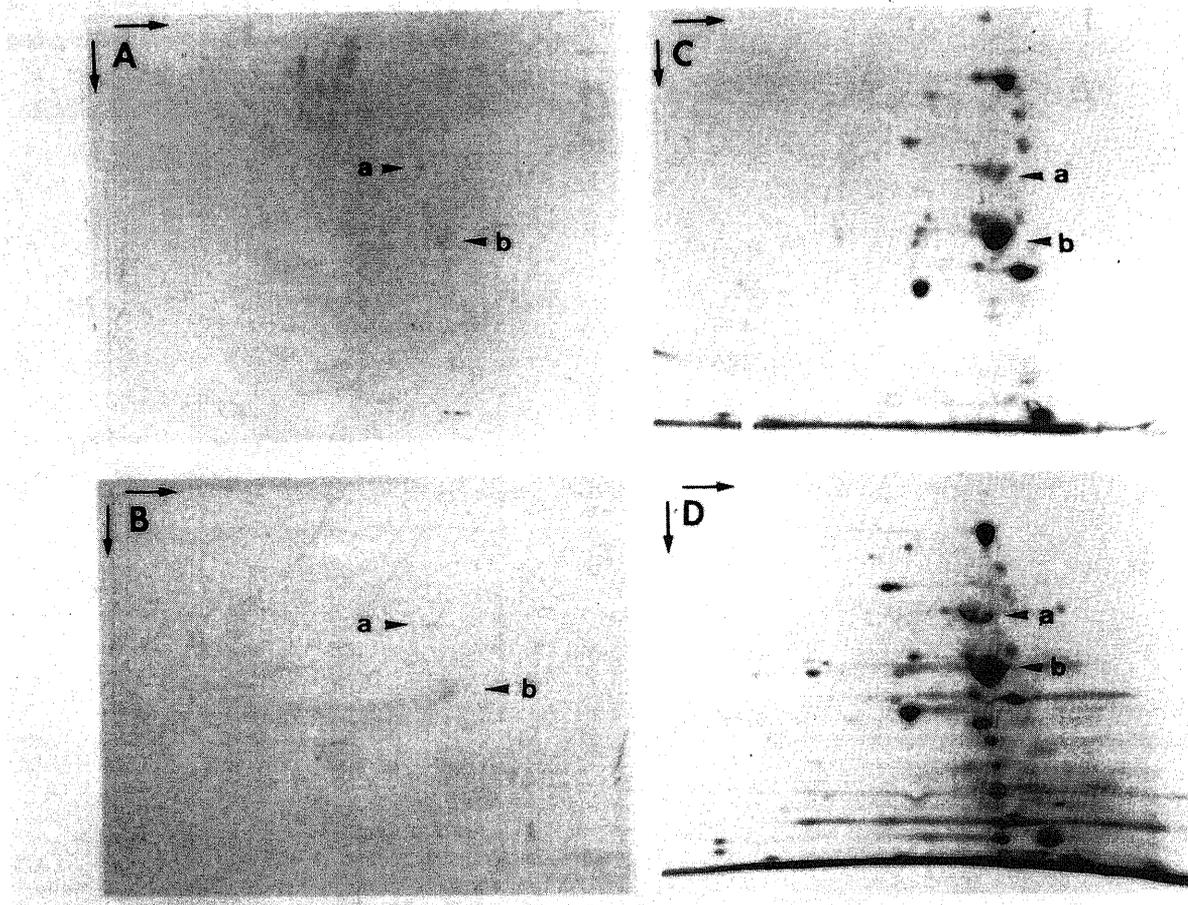


Fig. 4. Effects of actinomycin D on the protein synthesis during germination. (A) Actinomycin D and ^{35}S -methionine were added at 0 min of germination and the proteins synthesized over the next 15 min were analyzed. (B) Actinomycin D was added at 0 min of germination, ^{35}S -methionine was then added at 10 min, and the proteins were analyzed at 20 min after the start of germination. (C) Actinomycin D and ^{35}S -methionine were added at 10 min during germination and proteins were analyzed at 20 min. (D) Actinomycin D and ^{35}S -methionine were added at 20 min during germination and the proteins were analyzed at 30 min. Horizontal and vertical arrows indicate the direction of isoelectric focusing and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis respectively. Proteins a and b correspond to that of fig 3 respectively.

オニンを加えさらに10分間培養した結果もこの2種類の蛋白分子の合成が同様に確認された(図4B)。また発芽開始10分後(図4C)、20分後(図4D)にそれぞれアクチノマイシンDと³⁵S-メチオニンを加えて10分間標識した場合もこの2種の蛋白分子の合成が確認されたがそれ以外にも安定に合成される蛋白分子があった。

アクチノマイシンD存在下で合成されるこれら2種の蛋白分子は孢子由来の mRNA によるものか、またはアクチノマイシンDの阻害を開始してから合成された mRNA によるものかはわからないが、発芽開始5分までに合成された3種の蛋白分子(図3Aのa, b, c)のうちa, bと同じものであり、比較的生命のながい mRNA により合成されていることをうかがわせている。この2種以外の蛋白分子は発芽後新しく合成された mRNA により合成されていると考えられる。発芽開始後ただちに合成されるこれら2種の蛋白分子は、新しい遺伝子群の発現のスイッチをいれる正の調節因子の働きをしているのではないかと推測される。

V. RNA ポリメラーゼの σ サブユニットの同定

Kobayashi¹⁸⁾は孢子が発芽し成長期、増殖期へと転換するのにリボゾーム蛋白質やRNAポリメラーゼが重要な役割を演じているとしている¹⁷⁾¹⁸⁾。Shawら¹⁹⁾も発芽初期にリボゾーム蛋白質の合成がただちに継続するとしている。われわれが発見した発芽初期に合成される、2種の蛋白分子とリボゾーム蛋白質あるいはRNAポリメラーゼとの関連を検索するために二つの実験を行った。

まず枯草菌の増殖期と発芽期の両方からリボゾーム蛋白質をとり、O' Farrellの二次元電気泳動法で分析をおこなったが、蛋白分子のa, bに該当するものはなかった。枯草菌のRNAポリメラーゼの二次元電気泳動による分析結果を図5Aに示す。スポットの1はRNAポリメラーゼの σ^A サブユニットであり、スポットの2は α サブユニットである²⁰⁾(図5A)。

図4Aと図5Aの比較の結果RNAポリメラーゼの σ^A サブユニットは図4の蛋白分子bと非常に近い位置にあり(図4A, 図5A)両者は同一分子種であることを強く示唆する。この事を確認するため、発芽後20分から得た蛋白分画と枯草菌のRNAポリメラーゼを混合して、O' Farrell⁹⁾の二次元電気泳動法で分離した後、銀染色を行ったのが図5Bである。図5Bのスポットの1が σ^A サブユニットで2が α サブユニットである。比較の結果、蛋白分子bのスポットと σ^A サブユニットのスポットは一致し、蛋白分子のbは σ^A サブユニットである可能性が示唆される結果をえた。

VI. 抗原抗体反応

これを確認するため、次の実験を行った。枯草菌のRNAポリメラーゼの σ^A サブユニットと大腸菌のRNAポリメラーゼの σ サブユニットはアミノ酸配列の間かなりの相同性があり、枯草菌のRNAポリメラーゼの σ^A サブユニットを抗原として作製した抗体は大腸菌のRNAポリメラーゼの σ や枯草菌の σ^A とは反応するが枯草菌の他の σ 因子や、RNAポリメラーゼのコア酵素に関連するペプチドとは反応しない²¹⁾。また、大腸菌と枯草菌のRNAポリメラーゼの σ^A 因子間の塩基配列には非常に大きな相同性がある²²⁾。

これらの知見にもとづいて家兎を大腸菌RNAポリメラーゼで免疫し抗血清を作製した。この抗体を用いて枯草菌のRNAポリメラーゼを抗原とする二重免疫拡散法¹¹⁾によって σ^A の同

定を行った。この抗血清は枯草菌、大腸菌両方のポリメラーゼと沈降反応をおこした(図6A)。このことは家兎抗血清と反応する共通の抗原があることを示している。更にアクチノマイシンDを0分に加え発芽15分の蛋白分画をO' Farrellの二次元電気泳動法で解析した後、上記家兎血清を用いてウエスタンブロットングを行った。ウエスタンブロットングで染色された位置と蛋白分子bの位置は明らかに一致した(図6B)。図3, 図4, 図5, 図6の結果から発芽初期に合成される蛋白分子bが枯草菌RNAポリメラーゼの σ^A である可能性が強く示唆される。今後の課題として抗 σ^A 抗体で反応する蛋白質に³⁵Sが取り込まれるかどうか確認したい。

考 察

枯草菌孢子の成長、発生サイクルは細胞ゲノムの遺伝子(群)の選択と遺伝子の逐次発現に関する分子機構を研究するのに適したモデルである。これまで孢子形成期の研究では多くの成果が蓄積され孢子形成期の分子機構を解明する努力が結実し

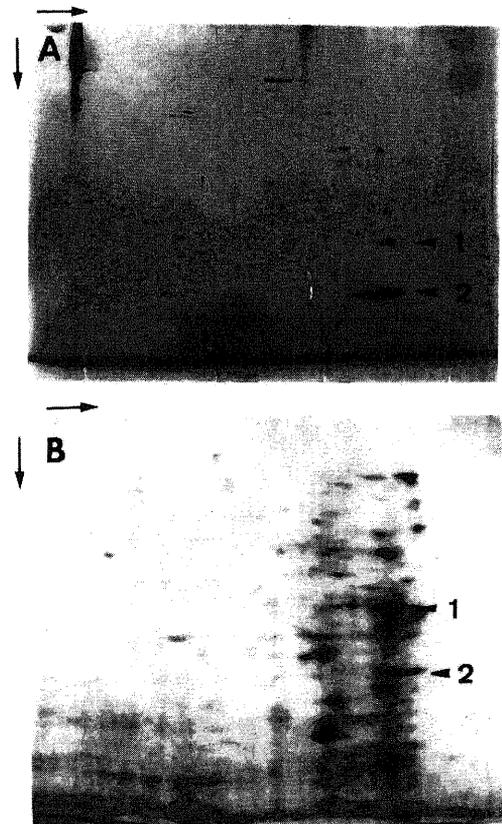


Fig. 5. Positional correlation on the two-dimensional gel profiles of proteins synthesized during germination to the RNA polymerase proteins of *Bacillus subtilis*. (A) Two-dimensional gel pattern of the RNA polymerase fraction prepared from *Bacillus subtilis*. (B) The protein prepared from cells at 20 min of germination was mixed with the RNA polymerase fraction from *Bacillus subtilis* and analysed on two-dimensional gel electrophoresis. The proteins were visualized by silver-staining method. Horizontal and vertical arrows indicate the direction of isoelectric focusing and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis respectively. Proteins 1 and 2 correspond to the σ^A and α subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase respectively.

つつある。孢子形成の開始期即ち初期から中期、後期に関与する多くの σ 因子が同定され、孢子化遺伝子の転写制御に明確に関与していることが証明された。

しかしながら枯草菌胞子の発芽期の研究は比較的少なく、その分子機構について見るべき進展はない。枯草菌胞子の発芽期では胞子の遺伝子発現プログラムが成長期、増殖期へと変化する過程として捕らえることができる。この枯草菌胞子の発芽過程の転写制御に関与する遺伝子活性化調節因子の解明は興味深いところである。他方、発芽中の胞子内で合成される mRNA の大部分は増殖細胞の mRNA と同じく短命であるので遺伝子発現プログラムは蛋白質合成プログラムを解析することにより知ることができる。従って著者は高分解能の O' Farrell の二次元電気泳動法を用いて孢子発芽系の蛋白質合成パターンを分析

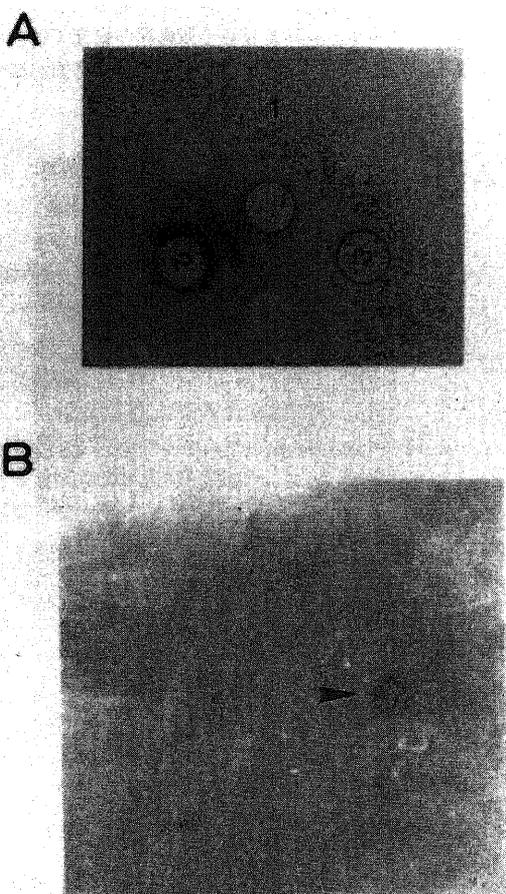


Fig. 6. Immunological identification of proteins synthesized during germination. (A) Ouchterlony double immunodiffusion test using antiserum against *Escherichia coli* (*E. coli*) RNA polymerase. The outer wells contained phosphate-buffered saline (PBS) (1); RNA polymerase from *E. coli* (2); and RNA polymerase from *Bacillus subtilis* (3). The center well contained the antiserum from a rabbit immunized with *E. coli* RNA polymerase. After overnight incubation at room temperature, the slide made of 1% agarose in PBS was washed with PBS and distilled water and stained with 0.1% Coomassie Blue. (B) Western blotting. Actinomycin D was added at the start of germination and proteins synthesized for the next 15 min were fractionated by two-dimensional gel electrophoresis. The blotted membrane was allowed to react with antiserum against *E. coli* RNA polymerase.

し、転写調節に関する多様な新しい分子的作用様式を解明する事を期待した。

著者がこの報告で示した結果は上記の期待と良く合致して孢子発芽期の各時間帯において合成される蛋白分子種のパターンの変化を示すことに成功したと考えられる。発芽開始と共に3種の蛋白分子の合成が確認され10分までに約65種類、20分までに約210種類の蛋白分子の合成が確認された。これはゲノムにおける遺伝子の選択的活性化は発芽期において完全に逐次段階的なものであることを物語っている。増殖期にみられる主要蛋白分子の多くは発芽開始後20分までに発現している。このことは遺伝子転写調節機構は20分までにすでに増殖期の機構をほぼ確立しているものとみることができる。これは発芽期の胞子も増殖期細胞と同じく成長や増殖のために同様の遺伝子産物を必要とすることを意味する。

O' Farrell の二次元電気泳動の結果は合成開始時間と継続時間によって以下のように分類できる。但し遺伝子群の分類は1個の細胞中に十分な分子数が存在し、二次元ゲル上ではっきり確認される蛋白分子のみに限っている。

1. 合成が発芽開始と同時に始まり、全発芽過程を通じて合成される蛋白分子群 (図 3A の a・b)
2. 発芽 5 分以降 10 分までに合成される蛋白分子群
3. 発芽開始 10 分以降に合成される蛋白分子群
4. 特定の発芽段階のみに限られ、それ以外には発現しない蛋白分子群 (図 3A の c, 図 3C の d・e・f, 図 3D の g・h)

発芽過程が進んでから転写される遺伝子群は少なくとも、部分的にはそれ以前に発現した遺伝子群により合成された蛋白分子の直接的な正の制御を受けていると考えられる。このような転写制御に携わるとされる蛋白分子は、発芽開始と同時に合成される蛋白分子群 1 および 2 に含まれるものが候補として考えられる。図 4 の結果が示すようにアクチノマイシン D の存在にもかかわらず 2 種の蛋白分子の合成が確認された。この 2 種の蛋白分子のスポットは図 3A の a・b と同じものである。これら 2 種の蛋白分子の合成の鋳型となった mRNA は、胞子由来の mRNA か新しく合成された mRNA によるものかわからない。これ以降合成される蛋白分子は新しく合成された mRNA によるものと思われ、これまでの説を裏づけている。

発芽のより遅い段階では RNA 合成は蛋白質合成阻害剤であるクロラムフェニコールで阻害されることが観察された。したがって発芽初期に合成される蛋白分子の a・b はこれ以降の転写制御に重要な役割を演じている可能性が示唆される。Kobayashi らは発芽期の遺伝子発現制御に RNA ポリメラーゼとリボゾーム蛋白質の重要性を主張している。

孢子形成遺伝子の逐次発現に関しては Fukuda ら¹¹や Doi¹²の研究に始まり、現在では 9 種類の σ 因子²³⁻²⁷ が同定され、孢子形成機構が明らかになりつつある。発芽期における遺伝子の発現も完全に逐次段階的なものであり、これに関与すると考えられる RNA ポリメラーゼの構造と機能の変化が示唆される。この報告で示したように発芽初期に合成される蛋白分子 b は RNA ポリメラーゼの σ^A である可能性が強く示唆される。その分子の実体を解明することは今後の課題である。

結 論

高分解能の O' Farrell の二次元電気泳動法を用いて枯草菌胞

子の発芽期の蛋白分子種の合成プログラムを解析した結果次のことが明らかになった。

1. 枯草菌胞子の発芽期の遺伝子は段階的に発現する。
2. アクチノマイシンD存在下にもかかわらず発現する蛋白分子がある。
3. 発芽期には比較的寿命の長い mRNA が存在する。
4. 発芽期に最初に合成される蛋白分子は2種あり、うち一つは RNA ポリメラーゼの σ^A である可能性が示唆される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました亀山忠典教授に深甚の謝意をあらわします。また、終始御指導、御教示いただきました飯田克平先生、野村孝弘先生ならびに麻布大学松田基夫先生に深く感謝いたします。また本研究の遂行に際し、御協力いただきました教職員各位に深く感謝します。さらに、枯草菌 RNA ポリメラーゼを供与下さいました東京農工大学小林泰夫先生に厚く御礼もうしあげます。

文 献

- 1) Fukuda, R., Keilman, G., Mcvey, E. & Doi, R. H.: Ribonucleic acid polymerase pattern of sporulating *Bacillus subtilis* cells. *Spores*, **6**, 213-220 (1975).
- 2) Losick, R. & Pero, J.: Cascades of sigma factors. *Cell*, **25**, 582-584 (1981).
- 3) Doi, R. H.: Multiple RNA polymerase holoenzymes exert transcriptional specificity in *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 772-781 (1982).
- 4) Mullin, H. B. & Hansen, J. N.: Two-dimensional polyacrylamide gel analysis of protein synthesized during outgrowth of *Bacillus subtilis* 168. *Spores*, **8**, 246-248 (1981).
- 5) Hecker, M., Wachlin, G., Dunger, A-M. & Mach, F.: Protein synthesis during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. A two-dimensional gel electrophoresis study. *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 57-60 (1984).
- 6) Hecker, M.: Molekularbiologie der Keimung von *Bacillus*-sporen. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **23**, 517-535 (1983).
- 7) Steinberg, W. & Halvorson, H. O.: Timing of enzyme synthesis during outgrowth of spores of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, **95**, 469-478 (1968).
- 8) O' Farrell, R. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (1975).
- 9) Spizizen, J.: Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **44**, 1072-1078 (1958).
- 10) Okoshi, S., Tomoda, T. & Makimura, S.: Analysis of normal cat serum by immunoelectrophoresis. *Jap. J. Vet. Sci.*, **29**, 337-345 (1968).
- 11) Ouchterlony, D.: Double diffusion in gel technique. *Prog. Allergy.*, **5**, 1-78 (1958).
- 12) Yamaguchi, T., Ono, E. & Yanagawa, R.: Expression of antigen genes of *Leptospira interrogans* serovar *canicola* in *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.*, **32**, 1179-1187 (1988).
- 13) Armstrong, R. L. & Sueoka, N.: Phase transitions in ribonucleic acid synthesis during germination of *Bacillus subtilis* spores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **59**, 153-160 (1968).
- 14) Keynan, A.: The transformation of bacterial endospores into vegetative cells. *In* J. M. Ashworth & J. E. Smith (eds.), *Microbial Differentiation*, 1st ed., p85-124, Cambridge University Press, Cambridge, 1973.
- 15) Jeng, Y-H. & Doi, R. H.: Messenger ribonucleic acid of dormant spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **119**, 514-521 (1974).
- 16) Kobayashi, Y.: Activation of dormant spore ribosomes during germination II. Existence of defective ribosomal subunits in dormant spore ribosomes. *Spores*, **5**, 269-276 (1972).
- 17) Cohen, A., Silverstein, Z. & Mazor, Z.: Ribonucleic acid polymerase from vegetative cells and spores of *Bacillus cereus*. *Spores*, **5**, 247-253 (1972).
- 18) Hattori, J., Ben-Ze'ev, H., Silverstein, Z., Tesone, C. & Torriani, A.: Ribonucleic acid polymerase of germinating *Bacillus cereus* T. *J. Bacteriol.*, **124**, 542-549 (1975).
- 19) Shaw, M. V. & Armstrong, R. L.: Biosynthesis of 50S ribosomal proteins during the outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.*, **109**, 276-284 (1972).
- 20) Chang, B-Y. & Doi, R. H.: Overproduction, purification, and characterization of *Bacillus subtilis* RNA polymerase σ^A factor. *J. Bacteriol.*, **172**, 3257-3263 (1990).
- 21) Wong, S-L. & Doi, R. H.: Peptide mapping of *Bacillus subtilis* RNA polymerase σ factors and core-associated polypeptides. *J. Biol. Chem.*, **257**, 11932-11936 (1982).
- 22) Gitt, M. A., Wang, L-F. & Doi, R. H.: A strong sequence homology exists between the major RNA polymerase σ factors of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **260**, 7178-7185 (1985).
- 23) Binnie, C., Lampe, M. & Losick, R.: Gene encoding the σ^{37} species of RNA polymerase σ factor from *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 5943-5947 (1986).
- 24) Rather, P. N., Coppolecchia, R., Degrazia, H. & Moran, Jr. C. P.: Negative regulator of σ^G -controlled gene expression in stationary-phase *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **172**, 709-715 (1990).
- 25) Marquez, L. M., Helmann, J. D., Ferrari, E., Parker, H. M., Ordal, G. W. & Chamberlin, M. J.: Studies of σ^D -dependent functions in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **172**, 3435-3443 (1990).
- 26) Jonas, R. M., Peters III, H. K. & Haldenwang, W. G.: Phenotypes of *Bacillus subtilis* mutants altered in the precursor-specific region of σ^B . *J. Bacteriol.*, **172**, 4178-4186 (1990).
- 27) Lu, S., Halberg, R. & Kroos, L.: Processing of the mother-cell factor, σ^K , may depend on events occurring in the forespore during *Bacillus subtilis* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 9722-9726 (1990).

Two-dimensional Polyacrylamide Gel Analysis of Proteins Synthesized during Germination of *Bacillus Subtilis* 168, Yoshiro Hirano, Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 101, 583—590 (1992)

Key words *Bacillus subtilis*, germination, protein synthesis, RNA polymerase, σ factor

Abstract

In order to verify the regulatory program of gene expression in the process of *Bacillus subtilis* spore germination, proteins synthesized successively were analysed by two-dimensional gel electrophoresis. The results demonstrated that at least three species of soluble proteins during 0~5 min, around 65 during 0~10 min, and approximately 210 during 10~20 min, were synthesized after the start of germination. As a reference, the vegetatively growing cells synthesized nearly 260 species of proteins discernible by this technique. When actinomycin D was added at the onset of germination and the soluble protein synthesized for the subsequent 15 min and then subjected to the analysis, two types of protein molecules were observed. These two proteins had the same mobility as two of the three species of proteins which were synthesized during the first 5 min of germination in the absence of actinomycin D. And furthermore, it seems possible that one of these two molecular species, even when synthesized in the presence of actinomycin D, may correspond to the σ^A factor of *Bacillus subtilis* RNA polymerase, according to two-dimensional gel electrophoresis and an immunological blotting test.