

# 枯草菌胞子発芽期における転写とその調節について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: 作成者: 松田, 基夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8820">http://hdl.handle.net/2297/8820</a>

## 枯草菌孢子発芽期における転写とその調節について

金沢大学がん研究所分子生物部 (主任: 亀山忠典教授)

松 田 基 夫

(昭和55年1月9日受付)

孢子形成細菌のつくる孢子は細胞として保有していた生物学的活性を休止し、熱抵抗性をもついわゆる休眠状態にある。これら孢子に特有な性質は発芽期において喪失し、発芽後成育期を経て栄養細胞が出現する。このような孢子発芽期は、まず休止あるいは抑止状態にある全ゲノム DNA と遺伝子発現機構を活性化する過程あるいはこれを新たに確立する過程として把えることができる。したがってこの孢子発芽系は遺伝子転写の指標である RNA 合成を解析することによって、これら活性化あるいは新しい確立がどのような分子の様式によって行なわれるかを明らかにする上で適切な実験系であると考えられる。

枯草菌孢子発芽期の RNA 合成に関しては、古くは Armstrong らによる biphasic pattern theory<sup>1)</sup> がある。彼らはその初期 (0 ~ 10 分) においては ribosomal RNA と soluble RNA が合成され、後期 (15 ~ 45 分) では messenger RNA の合成が開始されるとし、更に初期から後期への移行は chloramphenicol によって阻害される事を報告した。更に最近 Rudner らは、<sup>3</sup>H-uridine でパルス標識した RNA の比活性の解析から、発芽 50 分と 85 分にピークを持つ a wave rhythmic pattern theory<sup>2)</sup> を提唱した。しかしこれらの報告において、まず前者の場合、合成 RNA 分子種の解析は蔗糖密度勾配遠心の沈降パターンのみによって判断されており、又後者の場合、発芽期の初期の測定が粗雑であり、この期の RNA 合成の様式を問題にするにはきわめて不十分であると考えられ、いずれも詳細に再検討することが必要である。

一方発芽期において chromosome が顕著な構造変換をすることが報告されている<sup>3)</sup>。即ち孢子中の chromosome は膜から遊離して拡散した状態にある

が、発芽培地中で活性化するとこの chromosome は凝集して細胞膜と結合する。又最近  $\Phi 80p_{trp}$  の tryptophane operon<sup>4)</sup> をはじめとして、いくつかの転写系で DNA gyrase が関与している事が報告された<sup>5)6)</sup>。DNA gyrase は ATP に依存した反応で、二本鎖の閉環状 DNA に負の超コイル構造を導入する topoisomeric な酵素である<sup>7)</sup>。孢子発芽期における上記の DNA の構造変換にこのような topoisomeric な酵素が関与する可能性があり、更に又この DNA の topoisomeric な変換が発芽期の転写調節に大きな影響を及ぼす可能性があると考えられる。

著者は細菌の全ゲノムにわたる遺伝情報発現のための機構が休止あるいは欠損していると考えられる孢子が、発芽へと活性化される時、どのような分子的過程によって、作動を開始しあるいは必須因子を補いつつ逐次増殖細胞としての転写機構を確立し完成するかを解明することを意図して本研究を行なった。

まず枯草菌孢子発芽期における RNA 合成速度、DNA-RNA ハイブリッド分子形成とその拮抗、合成 RNA 分子種、RNA 合成速度及び合成 RNA 分子種に及ぼす蛋白合成阻害剤の影響、DNA gyrase の阻害剤である novobiocin<sup>8)</sup> と nalidixic acid<sup>9)</sup> の RNA 合成に及ぼす作用等の諸問題を解析した。本研究ではこれらの解析から、発芽期における転写が二つの新しい調節因子によって制御されていることを示唆する結果を得たので、ここに報告する。

### 実験材料及び方法

#### I 使用菌株

*Bacillus subtilis* 168 LMH : leucine, methionine, histidine 要求性

Transcription and its Regulation During Germination of the *Bacillus Subtilis* Spores  
**Motoo Matsuda**, Division of Molecular Biology (Director ; Prof. T. Kameyama), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

## II 培地

1. Low phosphate Penassay (LP): 枯草菌の前培養, 増殖培養及び発芽培地用として用いた. この培地は 1l 中に 1M Tris 100 ml, Bacto Beef Extract 1.5g, Bacto Yeast Extract 1.5g, Bacto Peptone 5.0g, NaCl 3.5g,  $K_2HPO_4$  140 mg,  $KH_2PO_4$  60 mg, Glucose 5.0g, 及び L-leucine, L-methionine, L-histidine, L-tryptophan を各々 50 mg を含み pH 7.2 とした.

2. Schaeffer の Spore 培地<sup>10)</sup>: 枯草菌孢子調製のため使用した.

## III. 緩衝液

1. TM buffer: 20mM Tris, 20mM  $MgCl_2$ , pH 7.4.

2. TMC-MS-KPVS: TM buffer に 10mM KCN, 60mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 15% sucrose, potassium polyvinyl sulfate ( $20\mu g/ml$ ) を加えたものである.

3. SSC: 0.15M NaCl, 0.015M  $Na_2C_6H_5O_7$

4. Saline buffer (1M):  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  8g,  $Na_2HPO_4$  61.8g を 1l の蒸留水に溶解し pH 6.7 である.

5. TEB buffer: 1l 中に Trizma Base 108g, Boric acid 55g, EDTA 9.3g を含み pH 8.3 である.

IV. 孢子の調製: Schaeffer の Spore 培養液を含む寒天 (2%) 培地中で培養した. 37°C 3日の培養後, 顕微鏡下で孢子になっている事を確認して集菌した. 適当量の滅菌蒸留水に懸濁して lysozyme-SDS 処理の後, 1M 及び 0.14M NaCl でよく洗浄し, 更に蒸留水で数回十分に洗浄し使用まで蒸留水に懸濁して 4°C で貯蔵した.

V. 発芽: 使用前に 80°C 15分熱処理した孢子を L-alanine ( $100\mu g/ml$ ) を含む LP 培地中で 37°C に加温激しい振とう下で発芽実験を行なった. 発芽期の turbidity の変化は Klett colorimeter, 660 filter を用いて測定した. 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 uridine, thymidine, amino acid mixture 及び methionine を用いた. 標識反応は同容量の冷 10% TCA (トリクロル酢酸) を加えて停止させ, 標識試料を 5% TCA で 3回洗浄した後, TCA 不溶性沈殿を Glass fibre filter (Whatman, GF/C) 上に集め放射能活性をトルエン PPO シンチレーターを用いて測定した.

VI. 標識及び未標識 RNA の調製: DNA-RNA ハイブリッド形成に用いる  $^3H$ -標識 RNA を調製するため  $^3H$ -uridine (5,6- $^3H$ -uridine, 40Ci/mmol) を発芽 10分の場合 200 ml, 55分の場合 150 ml, 増殖期の場合 50 ml の LP 培地に加えて標識を行なった.

標識時間は発芽 10~20分までの 10分間, 発芽 55~60分までの 5分間, 増殖期では 2分間であり,  $^3H$ -uridine をそれぞれ 10mCi, 3mCi, 1mCi 加えた.

標識された発芽孢子及び細胞懸濁液をそれぞれ KPVS ( $20\mu g/ml$ ), 10mM KCN を含む等容量の半水冷 2xTM buffer にす早く注ぎ込み反応を停止させた. 10,000 rpm 20分 4°C の遠心により集菌し TMC-MS-KPVS により 2回洗浄し, TMC-MS-KPVS に懸濁した. lysozyme-SDS 処理及び active bentonite 存在下でのフェノール処理の後エタノール沈殿を行なった. DNase I 処理により NDA を除去した後, 精製  $^3H$ -uridine 標識 RNA を DNA-RNA ハイブリッド形成とその拮抗実験に用いた.

電気泳動による解析のための  $^3H$ -RNA の調製法は, 小スケール培養法を用いた以外上記の方法に準じて行なった. 又未標識 RNA の調製もこれらと同様の方法で行なった. なお発芽初期における  $^3H$ -RNA は回収率 80% 以上のものを使用した.

VII. DNA の調製及びアルカリ変性: 枯草菌増殖期細胞からの DNA の調製は Saito-Miura 法に従って行なった. DNA のアルカリ変性は 0.1xSSC 中の DNA 溶液 ( $50\mu g/ml$ ) に 1/10 容量の 1M NaOH を加えて室温で 15分処理して行なった. アルカリ処理後 1M  $NaH_2PO_4$  で中和して pH 6.8 とした後 0.4M Saline buffer に一夜透析した.

VIII. DNA-RNA ハイブリッド分子形成とその拮抗実験: ハイブリッド形成とその拮抗実験は Gillespie-Spiegelman の Filter 法<sup>11)</sup>を用いた.

IX. ポリアクリルアミドゲル電気泳動: 0.5% アガロース-2% ポリアクリルアミド複合ゲルの作製は Peacock らの方法<sup>12)</sup>に従った. 10% ポリアクリルアミド (60 ml) の組成は次の様である. 20% アクリルアミド (acrylamide と N, N'-methylenebisacrylamide の重量比 19:1) 30 ml, 6.4% 3-(dimethylamino) propionitril 3.75 ml, TEB buffer 6 ml, 蒸留水 15.25 ml, 1.2% 過硫酸アンモニウム 5 ml. 電気泳動は複合ゲルの場合 10°C, 100V, 1.5時間, 10% ゲルの場合 20°C, 100V, 3時間行なった. 泳動終了後 Fluorography 法<sup>13)</sup>で標識 RNA の検出を行なった.

## 成 績

I. 発芽期の RNA 合成は 3つの異なる時期を経て逐次進行する.

これまで多くの報告がある様に枯草菌孢子の発芽期においては, まず初期に RNA 合成が開始され, 続いて

蛋白合成, DNA 合成が始まる (Fig. 1).

著者はまず転写の指標として, RNA 合成速度を解析した. Fig. 2 に示す様に,  $^3\text{H}$ -uridine 1 分パルス標識で示される RNA 合成は, 発芽 5 分で開始され, その合成速度は 15 分まで直線的に増加する (Gm1: 0~15 分). この合成速度はその後一定のレベルに達するとほぼこのレベルを維持し (Gm2: 15~40 分). 続いて急激な直線的増加を示す (Gm3: 40~60 分). この様に発芽期の RNA 合成は異なる速度変化で特徴づけられる三つの時期, Gm1, Gm2, Gm3 を経て進行する. この RNA 合成の pattern と照応して, 一方蛋白合成は 15 分で開始され, その後合成速度も一定値に達しこれを維持した後, 直線的増加を示す. その段階的移行が RNA 合成速度の段階的移行とはほぼ同調していることも興味深い. DNA 合成は発芽 45 分に開始される (Fig. 1). Fig. 2 に示される RNA 合成速度の 3 相的経過は転写部位の量的拡大を意味すると思われるので, このことを実証するため DNA-RNA ハイブリッド分子形成とその拮抗実験を行なった (Fig. 3). Gm1 Gm2 にまたがる時期 (発芽 10~20 分), Gm3 (55~60 分) および増殖期 (2 分間) で標識された

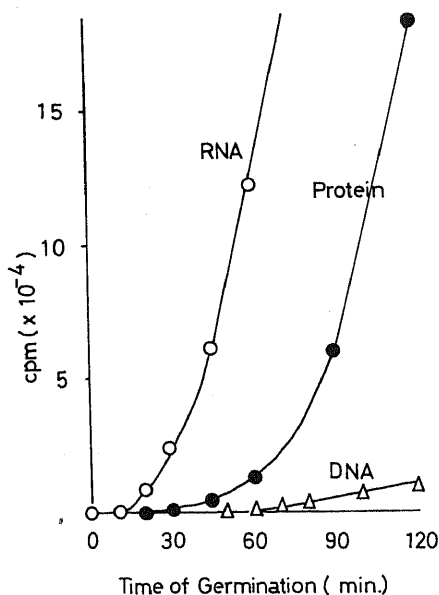


Fig. 1. Sequential synthesis of RNA, protein and DNA during germination. *B. subtilis* spores in LP medium supplemented with L-alanine was counted.  $^3\text{H}$ -uridine,  $^3\text{H}$ -amino acid mixture and  $^3\text{H}$ -thymidine were added at 0 min.

$^3\text{H}$ -RNA とアルカリ変性枯草菌 DNA との間のハイブリッド分子形成実験では, これら標識 RNA は加えた DNA の 2.1%, 7.5%, 20% でそれぞれ飽和点に達した (Fig. 3a). 従って Gm1 及び Gm2 の初期では DNA のごくわずかな領域が転写されるにすぎないが, Gm3 から増殖期へ移行するにつれて転写領域が増加してゆく. 又 Fig. 3b に示す拮抗実験では, 上記結果と一致して, 発芽開始 10~20 分の間に合成される RNA は増殖期標識 RNA のハイブリッド形成に対して部分的に競合するにすぎない (Fig. 3b. (1)). また一方増殖期の細胞から調製した未標識 RNA は Gm1 Gm2 Gm3 各 3 時期において合成された  $^3\text{H}$ -RNA の DNA-RNA ハイブリッド形成に対して完全に競合する結果が得られた (Fig. 3b. (3)). 従ってこれらの各時期では発芽期に特異的な RNA 分子種はほとんどあるいはまったく合成されていないと考えられる.

II. 合成される RNA 分子種によって各時期は特徴づけられる.

発芽期においてまず最初に活性化され転写される遺伝子は何であるか. そしてひき続いてどのような順序で遺伝子転写が進行するのかを明らかにするために,

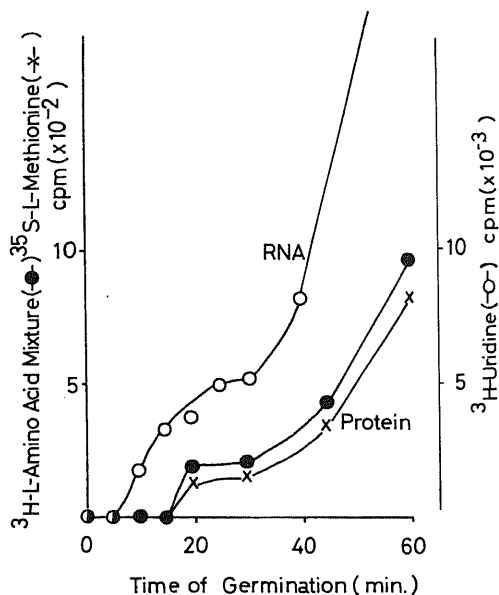


Fig. 2. The rate of RNA and protein synthesis during germination. Isotopes were added at times indicated and a pulse incorporation for 1 min was counted.

各期で合成される RNA 分子種の解析を行なった。Fig. 4a に示されている様に、Gm1 では主に 4~5S RNA が合成されている。この期ではあきらかに 23S, 16S ribosomal RNA の合成は抑制されている。23S, 16S ribosomal RNA は Gm2 になってはじめて合成される。Gm1 で合成される分子種は 4S, 5S, 6S RNA と他のいくつかの低分子 RNA である (Fig. 4b)。6S RNA は Gm2 で消失する。Gm3 ではより不均一な大きな RNA、恐らく messenger RNA と思われる分子種の合成が顕著に見られるようになる。これら 3 つの時期を特徴づける RNA 分子種の解析結果は、RNA 合成速度の段階的変化によって特定し得た発芽期 3 時期に関して、Gm1 では 4~6S 低分子 RNA 遺伝子の活性化、ついで Gm2 では 23S, 16S ribosomal RNA 遺伝子の転写開始という遺伝子活性化の順序性という内容を含む質的变化として特徴づけられることを示している。又 Gm3 における合成 RNA 分子種の pattern は更に多様になり増殖期のそれに接近してく

ることは転写機構の完成を意味するものであろう。この Gm3 期は DNA 複製が開始される時期でありその RNA 合成の量的質的拡大の要因にとって、複製と関連する機構や DNA dose effect 等も考慮せねばならないであろう。

Ⅲ. Gm1 から Gm2 への移行は蛋白合成阻害剤によって抑制される。

胞子発芽期においてこれら先期から次の各期への移行には何らかの調節因子が関与しているのどうかを明らかにする目的で蛋白合成阻害剤を用いた解析を行なった。

Fig. 5 に示す様に chloramphenicol (CM) を発芽開始 0 分に投与すると、5 分からの RNA 合成開始とその合成速度の 15 分までの直線的増加は基本的に影響を受けない。しかし Gm2 Gm3 における RNA 合成は阻害される。なおこの際 CM 投与によって発芽期に特徴的な turbidity の減少は影響を受けないが、60 分以後の増加が見られない。CM を 20 分で投与した場合は投与

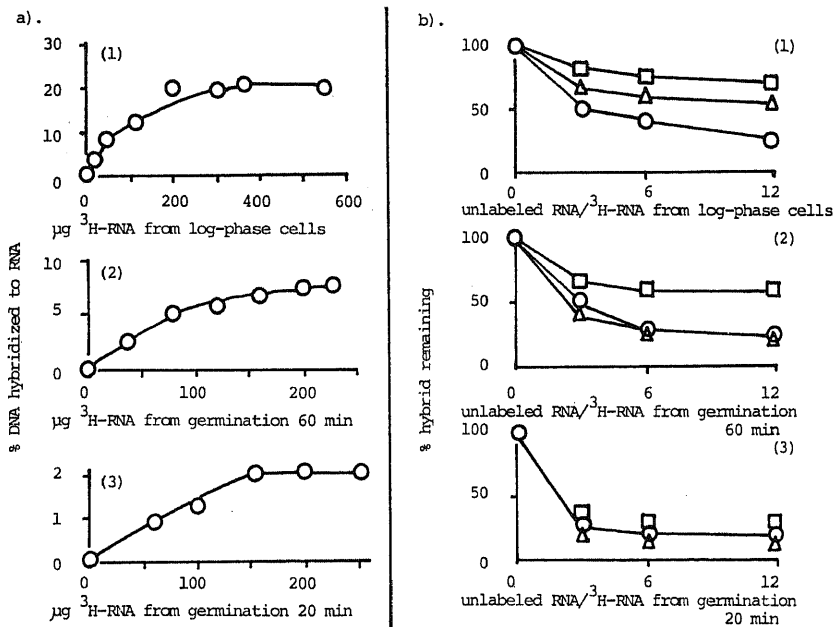


Fig. 3. Hybridization of pulse-labeled RNA with DNA (a) and competition (b). Each annealing mixture contained 1  $\mu\text{g}$  of alkali-denatured DNA immobilized on Millipore membrane filters and increasing amounts of log phase  $^3\text{H}$ -RNA (12,900 cpm/ $\mu\text{g}$ ), germination 60 min  $^3\text{H}$ -RNA (91,900 cpm/ $\mu\text{g}$ ) or germination 20 min  $^3\text{H}$ -RNA (38,080 cpm/ $\mu\text{g}$ ) (a). Each annealing mixture contained denatured DNA as indicated in (a), 300  $\mu\text{g}$  of log phase  $^3\text{H}$ -RNA, 200  $\mu\text{g}$  of germination 60 min  $^3\text{H}$ -RNA or 180  $\mu\text{g}$  of germination 20 min  $^3\text{H}$ -RNA and increasing amounts of unlabeled bulk RNA as indicated in the abscissa (b). Symbols:  $\circ$ , log phase unlabeled RNA;  $\triangle$ , germination 60 min unlabeled RNA;  $\square$ , germination 20 min unlabeled RNA.

時の合成速度をおおよそ維持し増加は見られない。40分および60分で投与した場合は、投与後 RNA 合成速度は経時的に減少する。この CM による各時期に特徴的な RNA 合成の阻害 pattern は、用いたすべての蛋白合成阻害剤 lincomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), erythromycin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), streptomycin (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), puromycin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) でも同様にみとめられた。このような結果は Gm1 における RNA 合成速度の増加は蛋白合成阻害剤によってほとんど影響を受けないが、Gm2 と Gm3 における合成速度の増加は添加時期にかかわらずこれら薬剤によって抑制される事を示している。従って前述の合成分子種の解析結果と照合するならば、これら薬剤の Gm2 期以降の RNA 合成に及ぼす阻害効果は、Gm2 を明らかに特徴づけている 23S, 16S ribosomal RNA の合成開始を抑制することに起因するのではないかという問題を提示している。そこで次に CM を 0 分に投与した後の各期の合成 RNA 分子種を解析した。その結果を Fig. 6 に示した。明らかに Gm2 および Gm3 における

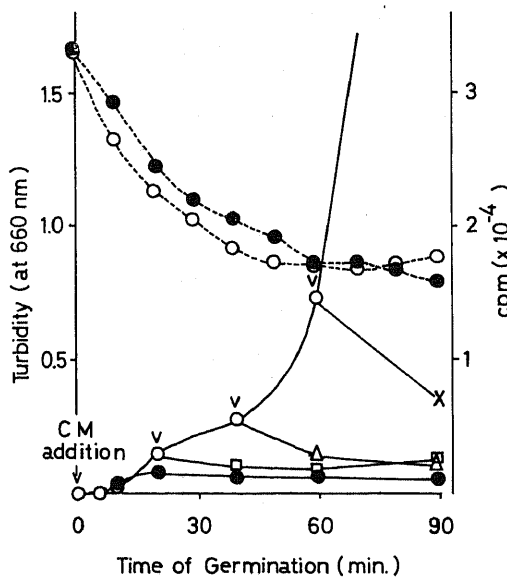


Fig. 5. Effect of CM on the rate of RNA synthesis during germination. Turbidity changes are shown by broken lines. CM (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added at 0, 20, 40 and 60 min as indicated.  $^3\text{H}$ -uridine pulse incorporation into RNA for 1 min was counted (solid lines). ○: without CM, ●: CM was added at 0 min, □: at 20 min, △: at 40 min, ×: at 60 min.

23S, 16S ribosomal RNA の合成が顕著に阻害されている (Fig. 6a). 又この際 Gm1 にその合成が特異的な 6S RNA は Gm2 Gm3 においても合成され、更にその合成量は相対的な増加を示した (Fig. 6b). CM を発芽 15 分で投与した場合においても、23S, 16S ribosomal RNA の合成は抑制されているが、これら分子種の合成が開始されている時期、たとえば 30 分で投与した場合には、これらの分子種の合成は持続している (データ省略).

これらの結果は Gm1 から Gm2 への移行すなわち 23S, 16S ribosomal RNA の合成開始には Gm1 期における *de novo* の蛋白合成が必要である事を明らかに示唆するものである。

#### IV. DNA gyrase が発芽期の RNA 合成に関与している。

前章までの結果は、Gm1 における転写機構がそれ以降の Gm2 および Gm3 と著しく異なる様式によっている事を明らかにした。このことは Gm1 から Gm2 への移行には転写様式の質的転換が想定され、この転換を支配する因子の 1 つが新しい蛋白因子である事が示唆された。そこでさらに前述した様な発芽初期の DNA 構造変換がもう 1 つの要素としてこの転写様式の転換にどういふ関連をするかについて解析することにした。

先ず DNA gyrase の阻害剤である novobiocin (NOV) と nalidixic acid (NAL) を用いて RNA 合成への影響をしらべた。なおこれら薬剤は DNA 合成の阻害剤でもある。NOV (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を発芽開始 0 分および 30 分に投与すると発芽開始直後の turbidity の減少は影響を受けないが、発芽後 60 分頃に見られる turbidity の増加は観察されない (データ省略)。著者らがすでに報告したように<sup>14)</sup>、NOV, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  又は 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を発芽 0 分に投与すると RNA 合成速度は 15 分までまったく影響を受けないが、それ以後阻害効果があらわれ 30 分でそれぞれ 40% 及び 71% が阻害された。5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では 15 分ですでに阻害効果が認められるが、これらの場合も Gm1 の RNA 合成は、Gm2 と Gm3 のそれに比べ相対的に insensitive である。発芽 0 分に NAL を添加した場合も、やはり Gm1 でこの薬剤に対し部分的に insensitive な RNA 合成を示す。又 NOV (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を発芽 5, 10, 15, 20, 25 分でそれぞれ投与して投与後の RNA 合成速度を測定した<sup>14)</sup>。発芽後 5 分に投与した場合には、投与後 5 分間は RNA 合成速度の増加が見られるがそれ以後の増加はなく減少する。発芽後 10 分から 25 分までの投与では、投与後の RNA 合成

速度の増加はなく減少する。NAL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) でも同様の傾向が認められた。

これらの結果によって、Gm1にはRNA合成がそれ以降の時期に比べてDNA gyraseの阻害剤に対して相対的にかなりinsensitiveな部分が存在するが、Gm2とGm3のそれはきわめてsensitiveであることが明らかとなった。したがってGm1からGm2への移行にはfrozen DNAの活性化が必要であり、この活性化にはDNA gyraseが主要な役割を果している事が強く示唆される。この可能性は他のDNA合成阻害剤hydroxyurea, 6-(p-hydroxyphenylazo)-uracilを用いた実験で更に支持された<sup>14)</sup>。ちなみにこれらの薬剤はtopoisomericなDNAの変換反応とは全く無関係である事が知られている。これらの薬剤はGm1 Gm2のRNA合成には全く影響を与えず、DNA合成が開始される時期にあたるGm3のRNA合成を阻害した。一方mitomycin CではNOV, NALと同様にGm2のRNA合成への阻害が認められた。又NOV, NALによるRNA合成の阻害効果は、薬剤の除去でRNA合成がただちに完全に回復するので、可逆的である。更にNOV耐性変異株<sup>15)</sup>ではNOV存在下で、発芽期のRNA合成は正常に進行した。したがって、NOVのRNA合成阻害は少なくともRNA合成と関連する諸代謝系路の阻害によるものではない。次にNAL存在下で合成されるRNA分子種を解析した所、予想した通りGm2で開始される23S, 16S ribosomal RNAの合成が抑制されていた(Fig.7)。しかしGm1にその合成が特徴的な低分子RNA分子種はNAL存在下でもGm2およびGm3で認められた。

## 考 察

枯草菌において、そのライフサイクルの各時期における発現形質 pattern のちがいが、注目されてすでに久しいが、孢子形成期の解析に比べて発芽期の転写調節を主題とした研究はきわめて少ない。原核生物において、単一オペロンの転写はもとより、全ゲノムの転写あるいは逐次転写におけるpositiveな調節機構の重要性が、大腸菌のオペロン<sup>16)</sup>や大腸菌ファージT<sub>4</sub><sup>17)</sup>, T<sub>7</sub><sup>18)</sup>,  $\lambda$ <sup>19)</sup>等で示されている。一方、孢子発芽期においては、この系に独自の過程、すなわち全機能の休止状態から全面的活性化へ移行する過程であるが故に、その遺伝子の逐次発現には、全ゲノムと各オペロンのレベルで、転写のpositiveな調節が重要な役割を果していると考えられる。従って著者は孢子発芽系の研究によって、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ことを期待した。

著者がこの報告で示した結果は、上記の期待によく合致して、発芽Gm1期からGm2期への移行にはribosomal RNAの転写開始に必要な蛋白性のpositive調節因子とDNA構造変換に関与すると思われるtopoisomeric enzyme (s)が必要である事を明らかにした。

本研究によって明らかとなった実験結果をTable.1にまとめた。これによって転写の段階的量的拡大が転写部位の質的增加に起因し、しかもきわめて画然と制御されつつ移行することが示されている。

すでに述べたように、Armstrongらは枯草菌W23株孢子を用いて、発芽7分から10分までに<sup>3</sup>Hで標識されたRNAを蔗糖密度勾配遠心法で分析し、発芽初期(0~10分)においてすでにribosomal RNAとsoluble RNAが同時に合成されていると報告した<sup>1)</sup>。著者の得た結果は、明らかにこれと異なっている。この点に関して彼らの実験において、0~7分間の合成RNA分子種がどうであったか、またその分析法の精度に問題はないか等対比較すべき点が残されている。

蛋白合成阻害剤を用いた実験(III章)からGm1で合成されることが想定された蛋白性のpositive調節因子の実体解明は、すべて今後の課題として残されている。Fig.2から明らかのように、培地に添加した標識アミノ酸のbulkの蛋白へのとりこみは発芽15分から開始される。従ってGm1で合成される蛋白は、一般的にきわめて微量であるか、あるいは標識されにくい性質のものであろう。特に後者については、発芽初期における孢子中蛋白の異化崩壊によるアミノ酸プールとの関連が考慮されねばならないであろう。またこのpositive調節因子の機能については、発芽期に孢子型転写酵素から増殖細胞型転写酵素への変換があり得るという実験結果<sup>20)</sup>との関連においても解明すべき興味ある課題である。

発芽期、発芽後成育期、増殖期のRNA合成に及ぼすNOVとNALの阻害効果をFig.8にまとめた。これによって明らかのように、各期でこれら薬剤による効果は異なる個々のpatternを示す。NOVでは発芽期から増殖期へ移行するにつれRNA合成に対する阻害程度が増大して行く。増殖期ではNOV投与後15分でRNA合成の97%が阻害されている。

Halvorsonらは最近、NOVは枯草菌の増殖期の成育には影響を与えず、発芽後成育のみを特異的に阻害する事を報告した<sup>21)</sup>。その際NOVの合成RNAの蓄積に及ぼす阻害効果は、発芽期と増殖期で同じであった。しかし本研究によってNOVのRNA合成に対する阻害効果は、発芽期と増殖期では異なる事が明らかとな

った.同時に NOV に比較的耐性を示す RNA 合成が発芽初期 (Gm1) にかかなりの部分として存在するという事実が明らかとなった. この NOV に耐性を示す部分は株, 培地によらず再現性よく認められた. 高濃度の NOV (50  $\mu\text{g/ml}$ ) と多量の  $^3\text{H}$ -uridine (50  $\mu\text{ci}$ ) を用いたパルス標識実験では発芽 5 分ですでに NOV の影響が現われ, 薬剤の除去で RNA 合成が急速にかつ完全に回復するので, この NOV に耐性を示す RNA 合成は発芽胞子の NOV に対する不透過性によるものではないと考える. 低濃度の NOV に対して発芽初期に不透過である可能性は完全には否定出来ないが, rifampicin, ethidium bromide (これら薬剤は発芽 0 分投与で Gm1 の RNA 合成を完全に抑制した: データ省略) に比べて NOV (及び NAL) のみがか不透過性である事を積極的に支持する知見は得られていない. NAL では発芽中期の RNA 合成が最も強く影響を

受けるが, 増殖期では投与後 15 分で約 50% の阻害にとどまっている. この NOV, NAL による増殖期の RNA 合成に及ぼす阻害効果のちがいは, 一義的にはこれら薬剤が DNA gyrase のそれぞれ異なる機能を持つ subunit B, A を特異的に阻害する<sup>9)</sup>事の反映であると考えられるが, 両薬剤 (特に NAL<sup>22)</sup> の副作用を考慮に入れた評価が必要である.

発芽中期における両薬剤の RNA 合成に及ぼす阻害 pattern のちがいは, 胞子形成期の T<sub>4</sub> 期以降でも認められた (データ省略). なお胞子形成 T<sub>2</sub> 期では, NAL による RNA 合成の促進 (投与 10 分後に約 250%), NOV に対する完全な耐性が検出されたが, これらについては現在詳細に検討中である. 又 ethidium bromide (5  $\mu\text{g/ml}$ ) では発芽期, 増殖期, 胞子形成期いずれにおいても投与後 5 分以内に  $^3\text{H}$ -uridine の取り込みは完全に阻害された (データ省略).

Table 1. RNA synthesis during germination of *B. subtilis* spore.

Phase		Gm 1 (0-15 min)	Gm 2 (15-40 min)	Gm 3 (40-60 min)
RNA	Rate:	gradually increases	reaches a definite level	explosively increases
	Species:	t-RNA (major) 5S RNA 6S RNA smaller RNA  mRNA (a little?)	t-RNA 5S RNA 6S RNA disappears  23S, 16S r-RNA starts mRNA starts	t-RNA 5S RNA  23S, 16S r-RNA continues mRNA increases
	CM:	no inhibition to t-RNA, 5S RNA & 6S RNA	40% inhibition no 23S, 16S r-RNA & mRNA  6S RNA	remarkable inhibition no 23S, 16S r-RNA & mRNA 6S RNA
	LM, SM, PM, EM:	the same as above	the same as above	the same as above
	NOV, NAL:  6Hpu, HU: EtBr:	no inhibition to t-RNA, 5S RNA & 6S RNA  no inhibition complete inhibition	60% inhibition no 23S, 16S r-RNA & mRNA 6S RNA no inhibition complete inhibition	90% inhibition no 23S, 16S r-RNA & mRNA 6S RNA 15% inhibition complete inhibition
protein		only a limited synthesis	starts & reaches a definite level	linearly increases
DNA		no synthesis	no synthesis	starts

CM: chloramphenicol, LM: lincomycin, SM: streptomycin, PM: puromycin, EM: erythromycin, NOV: novobiocin, NAL: nalidixic acid, 6Hpu: 6-(p-hydroxyphenylazo)-uracil, HU: hydroxyurea and EtBr: ethidium bromide.

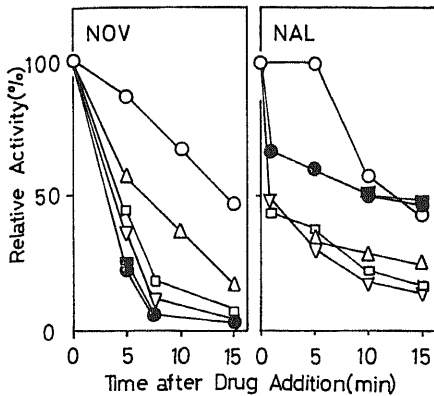


Fig. 8. Effect of NOV and NAL on the rate of RNA synthesis during germination, outgrowth and vegetative growth.  $^3\text{H}$ -uridine pulse incorporation into RNA for 1 min at times indicated was counted. NOV ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) or NAL ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) was added at 0 min of germination,  $\circ$  : at 5 min,  $\triangle$  : at 10 min,  $\square$  : at 15 min,  $\nabla$  : at 120 min of outgrowth,  $\blacksquare$  : at vegetative growth,  $\bullet$  :

細菌染色体においてはDNA分子が20数個の小環に分割され、そのおのおのが負の超コイル構造を作っていると考えられている<sup>23)</sup>。今回報告した結果は、孢子中でdiffusiveな状態にあるDNAは発芽期において部分的構造変換を行ないながらcondensed stateへと進行して行く事がこの時期の転写を考える基盤でなければならないことを教えている。また本研究はDNA複製開始後の発芽後成育期及び栄養増殖期においてはchromosomeの恒常的な高次構造変換によって転写が大きく影響を受け、孢子形成期においては、徐々にその高次構造が解除されdiffusive form即ち休眠状態に回帰することをも強く示唆するものである。

## 結 論

枯草菌孢子発芽期のRNA合成はDNA転写部位の経時的増加を特徴とし、かつそれは質量共に異なる3期、即ち初期(Gm1: 0~15分)、中期(Gm2: 15~40分)、後期(Gm3: 40~60分)を経て進行する事が明らかとなった。

Gm1では、発芽約5分でRNA合成が開始されその後合成速度は直線的に増加する。この期で合成される分子種は4~5S, 6Sと他のいくつかの低分子RNAである。6S RNAはこの期に特異的である。23S, 16S ribosomal RNAの合成は抑制されている。又この期

では用いた比活性の放射性標識アミノ酸の取り込みからは蛋白合成は検出されない。Gm2ではRNA合成速度は一定の値に達しこれを維持する。23S, 16S ribosomal RNAの合成が開始され又蛋白合成が始まる。Gm3では急激なRNA合成速度の増加が見られ、messenger RNA合成も顕著になる。

Gm1からGm2への移行はCMをはじめ用いたすべての蛋白合成阻害剤によって妨げられた。Gm1のRNA合成はこれら薬剤に対して耐性である。Gm2ではCMの存在によって、23S, 16S ribosomal RNAの合成が抑制されていた。更にGm2及びGm3でCMを投与すると、投与後RNA合成速度は著しい減少を示した。

孢子発芽期におけるchromosomeの構造変換との関連において、DNA gyraseの転写活性に及ぼす効果をしらべるため、この酵素の阻害剤であるNOV, NALの影響を検討した。Gm1のRNA合成は両薬剤に対してinsensitiveであったが、Gm2以降のそれは著しい阻害を受けた。又Gm2以降のRNA合成に対するNOVの阻害効果はNOV耐性変異株ではまったく認められない。これら薬剤によるGm2 Gm3に対する阻害効果は、薬剤の除去によって完全に回復し発芽後成育には何の影響も示さない。

以上の結果は、発芽初期Gm1における転写活性は孢子中の転写機構に関連する諸因子の物理的活性化のみによって十分発現されるが、Gm2への移行には新しいpositiveな因子の合成とDNAの構造変換をうながす酵素(topoisomeric enzyme(s))の関与を強く示唆するものである。

稿を終るにあたり、本研究に対して、終始御指導賜りました亀山忠典教授、御助言をいただいた吉川寛教授に心から感謝致します。また御協力下さいました教室員各位に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Armstrong, R. L. & Sueoka, N. : Phase transitions in RNA synthesis during germination of *Bacillus subtilis* spores. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S., **59**, 153-160 (1968).
- 2) Margulies, L., Setoguchi, Y. & Rudner, R. : Asymmetric transcription during post-germinative development of *Bacillus subtilis* spores. Biochem. Biophys. Acta., **521**, 708-718 (1978).
- 3) Ryter, A. : Association of the nucleus and membrane of bacteria: A morphological study.

- Bacteriol. Rev., 32, 39-54 (1968).
- 4) **Smith, C. L., Kubo, M. & Imamoto, F.** : Promoter-specific inhibition of transcription by antibiotics which act on DNA gyrase. *Nature*, **275**, 420-423 (1978).
- 5) **De Wyngaert, M. A. & Hinkle, D. C.** : Involvement of DNA gyrase in replication and transcription of bacteriophage T7 DNA. *J. Virol.*, **29**, 529-535 (1979).
- 6) **Yang, H. L., Heller, D. C., Gellert, M. & Zubay, G.** : Differential sensitivity of gene expression *in vitro* to inhibitors of DNA gyrase. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **76**, 3304-3308 (1979).
- 7) **Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. & Nash, H.** : DNA gyrase : an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **73**, 3872-3876 (1976).
- 8) **Gellert, M., O'Dea, M., Itoh, T. & Tomizawa, J.** : Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **73**, 4474-4478 (1976).
- 9) **Sugino, A., Peebles, C. L., Kreuzer, K. N. & Cozzarelli, N. R.** : Mechanism of action of nalidixic acid : Purification of *Escherichia coli* nal A gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **74**, 4767-4771 (1977).
- 10) **Schaeffer, P., Ionesco, H., Ryter, A. & Balassa, G.** : In mecanismes de regulation des activites cellulaires chez microorganismes. p. 553, *Colloq. Intern. C. N. R. S, Paris.*, (1965).
- 11) **Gillespie, D. & Spiegelman, S.** : A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.*, **12**, 829 (1965).
- 12) **Peacock, A. C. & Dingman, C. W.** : Molecular weight estimation and separation of RNA by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry*, **7**, 668-674 (1968).
- 13) **Laskey, R. A. & Mills, A. D.** : Quantitative film detection  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, **56** 335-341 (1975).
- 14) **Matsuda, M. & Kameyama, T.** : *J. Bacteriol.*, in press.
- 15) **Harford, N. & Sueoka, N.** : Chromosomal location of antibiotic resistance markers in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, **51**, 267-286 (1970).
- 16) **Englesberg, E.** : In *Metabolic Pathways* (Vogel, H. J., ed), V, chap. 9 Academic Press, (1971).
- 17) **Stevens, A.** : New small peptides associated with DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli* after infection with bacteriophage T4. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **69**, 603-607 (1972).
- 18) **Chamberlin, M., McGrath, J. & Waskell, L.** : New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature*, **228**, 227-231 (1970).
- 19) **Szybalski, W.** : RNA-polymerase and transcription (Silverstri, L. G., ed), p. 209, *Proceedings of the first international Lepetit Colloquium in Florence.* (1969).
- 20) **Nomura, T.** : Properties of DNA-dependent RNA polymerase purified from vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis*. *Juzen Ikg. Z.* **83**, 477-494 (1974).
- 21) **Gottfried, M., Orrego, C., Keynan, A. & Halvorson, H. O.** : Specific inhibition of outgrowth of *Bacillus subtilis* spores by novobiocin. *J. Bacteriol.*, **138**, 314-319 (1979).
- 22) **Chao, L.** : Nalidixic acid-induced protein alterations in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **11**, 167-170 (1977).
- 23) **Yoshikawa, H.** : in *Gendai Kagaku*, vol. 8. p. 31, Tokyo Kagaku Dojin (1979).

**Transcription and its Regulation during Germination of the *Bacillus Subtilis* Spores**—Motoo Matsuda, Division of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Jusen. Med. Soc.*, 89, 154–165 (1980).

**Abstract** Transcription and its regulation during germination of the *Bacillus subtilis* spores were investigated.

RNA synthesis proceeds stepwise during germination, increasing the region of transcription on DNA through distinct three phases, namely, Gm 1, Gm 2 and Gm 3, with respect to the rate of RNA synthesis and RNA molecular species synthesized.

RNA molecules having relatively low molecular weight, 4S, 5S, 6S and minors, were synthesized at Gm 1. The synthesis of 16S and 23S ribosomal RNA was repressed at Gm 1, and then it started when the phase proceeded to Gm 2. Larger RNA, probably, mRNA, could be detected as heterogeneous products at Gm 3, when the rate of RNA synthesis also increased explosively.

The transition from Gm 1 to Gm 2 was inhibited by chloramphenicol and all other inhibitors of protein synthesis used. This result indicates that the transcription at Gm 1 might take place depending on only physical activation of factors in spore, and that the transcription should require some protein factors synthesized *de novo* at Gm 1. This implies that positive regulation involves the transcription during germination.

Antibiotics acting on DNA-gyrase, nalidixic acid and novobiocin, were relatively insensitive to Gm 1 but sensitive to Gm 2 and Gm 3. Different inhibitors such as hydroxyurea and 6-(p-hydroxyphenylazo)-uracil acting on other steps of DNA synthesis inhibited only the phase Gm 3 without any effect on Gm 2. Consequently, activation of frozen DNA, an alteration of DNA conformation from diffusive state to condensed state, should be a prerequisite for attaining Gm 2 and could be accomplished by DNA-gyrase as the most probable candidate among topoisomerase.

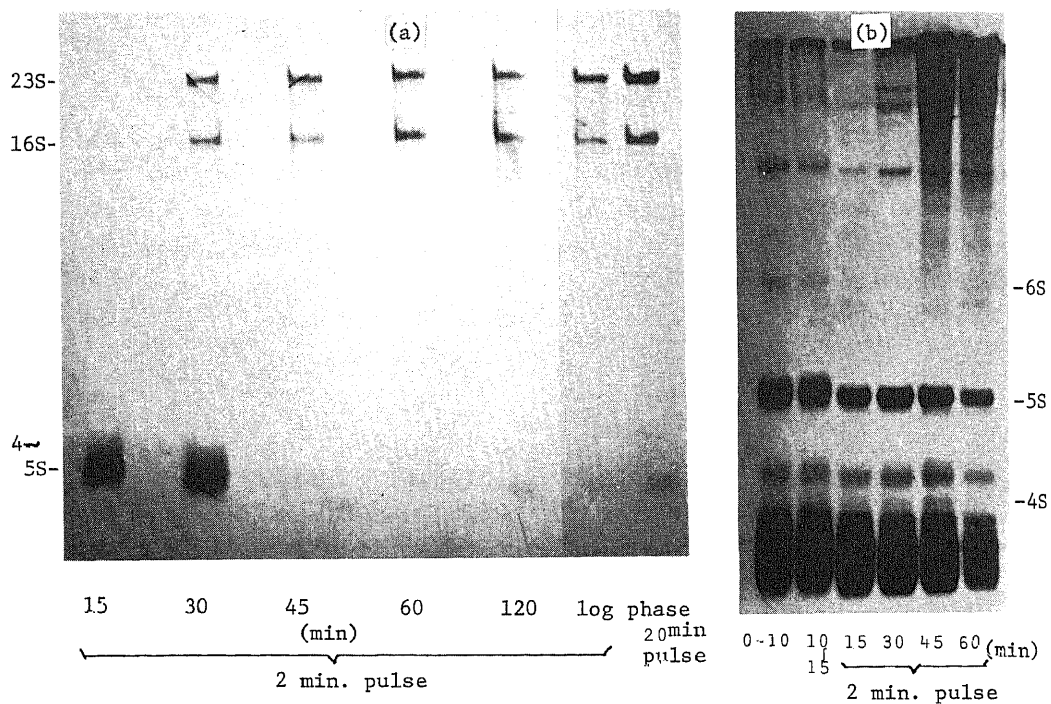


Fig. 4. Gel-electrophoresis of RNA synthesized during germination. a) 0.5% agarose-2% acrylamide (composite) gel. b) 10% acrylamide gel.  $^3\text{H}$ -RNA were prepared at times indicated. For each sample, labeled RNA about 10,000 cpm were subjected to electrophoresis in slab gel. The method of fluorography was used for detection.

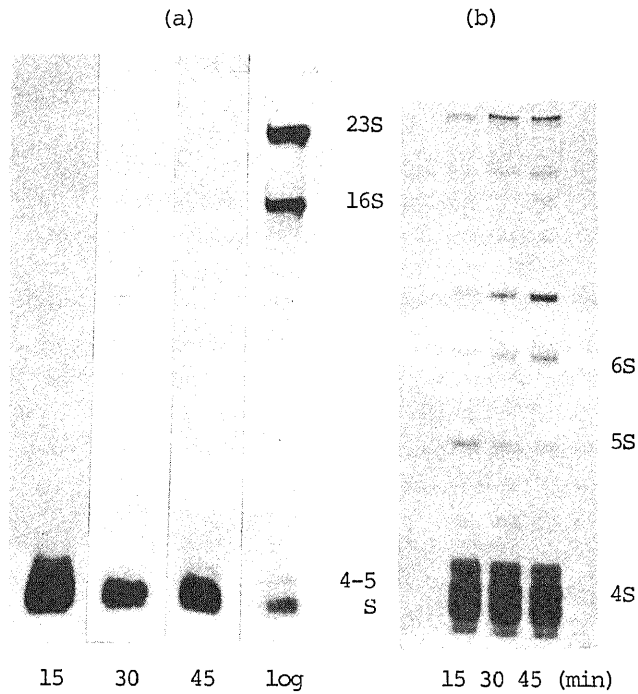


Fig. 6. Gel-electrophoretic patterns of pulse-labeled  $^3\text{H}$ -RNA in the three phases and log phase. In the presence of CM 2min pulse-labeled  $^3\text{H}$ -RNA prepared at germination 15min (Gm 1), 30min (Gm 2) and 45min (Gm 3) was subjected to (a) composite and to (b) 10% acrylamide gel-electrophoresis. Log phase  $^3\text{H}$ -RNA was prepared in the absence of CM. The other methods were the same as in Fig. 4.

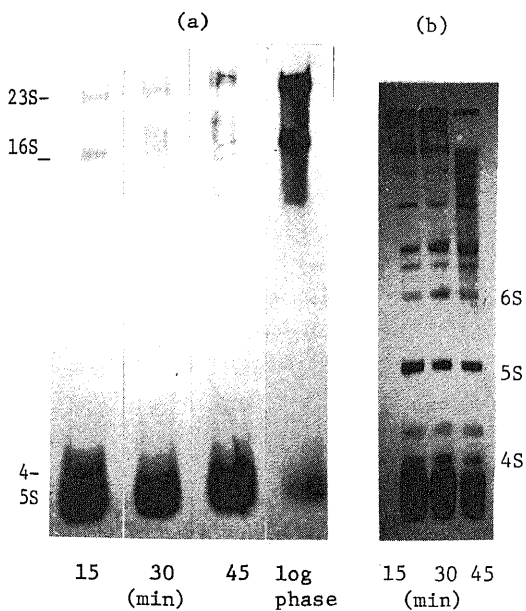


Fig. 7. Gel-electrophoretic patterns of pulse-labeled  $^3\text{H}$ -RNA in the presence of NAL (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Log phase  $^3\text{H}$ -RNA was prepared in the absence of NAL. The other methods were the same as in Fig. 4.