

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04903

研究課題名(和文) 転写装置の新規機能とネットワーク解析による生存戦略の再評価

研究課題名(英文) Reassessment of survival strategy during post-exponential growth phase by exploring novel functions of the transcription machinery and related networks.

研究代表者

吉川 博文 (YOSHIKAWA, Hirofumi)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：50175676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の対数増殖後期、すなわちライフアフターログに関連するさまざまな機能は、生存戦略を決定する生命現象の基本的ネットワークを形成しており、枯草菌におけるいくつかの現象が転写装置に結びつくことからRNAポリメラーゼを中心として俯瞰する研究を行った。その結果、コア酵素の新機能として、転写レベルの抑制による細胞の耐熱化、転写開始点ヌクレオチドの嗜好性の変化による緊縮応答、およびプロモーター認識の嗜好性変化による異種遺伝子発現、といった分子機構を明らかにすることができた。また、緊縮調節に関する解析からGTP合成系に関連するSアデノシルメチオニンの機能という新規ネットワークを構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写装置に関する知見は多いが、本研究のように対数増殖後期の細胞機能が転写装置と密接な接点を持つことが新たに判明し、特にコア酵素の役割は単なる重合酵素ではなく、さまざまな制御機構に関わっていることを明らかにした。プロモーターや転写開始点認識に関わるコア酵素の役割は、50年近く謎であった現象を解明した時点で学術的意義は高い。またメチオニン感受性は不可思議な現象であったが、GTP合成系との関連を解明した点は核酸代謝における大きな学術的成果である。本研究の成果は、転写装置の新しい知見を元に異種遺伝子発現における種の壁を越えるアイデアに発展し、微生物生産という産業レベルでも大きな社会的意義も包括している。

研究成果の概要(英文)：Fundamental biological functions are typically consolidated during the stage after logarithmic growth phase and various phenomena related in this stage have been found to be associated with transcriptional machinery in *Bacillus subtilis*. Our findings are summarized in three aspects. One, the deceleration of transcription grant thermotolerance to the cells. Two, the altered preference of the initiation nucleotide confers stringent response independent on the cellular GTP level. Third, the altered preference of discriminator sequence makes the cells possible to recognize heterogeneous promoter. These findings uncovered new functions of RNA polymerase core enzyme, which had an important role for the survival strategy during the post-exponential growth phase. In addition, our comprehensive study on the stringent control revealed that an S-adenosyl methionine (SAM) had a role on the de novo GTP biosynthesis pathway by regulating the activity of the IMP dehydrogenase, GuaB.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：RNAポリメラーゼ コア酵素 転写開始機構 プロモーター認識 緊縮応答 異種遺伝子発現 枯草菌 耐熱化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

原核生物の発現調節機構において、転写レベルでの調節は最も多くの解析がなされてきており、その概要は既に明らかになっているというのが世界的に見ても一般的であった。また、異種遺伝子発現による有用物質生産のような遺伝子工学的分野においても、宿主の適切な転写調節系に組み込むことが大前提であり、生産に結びつかない例は、翻訳や修飾、折り畳みなど転写調節以外の要因によるとされてきたものが大半であった。一方、当研究室におけるいくつかの研究の流れにおいて、シグマ因子以外の要因でプロモーター認識能が変わる、すなわち RNA 合成の主要マシーンとだけ考えられてきたコア酵素に、プロモーター認識能を含めた新しい機能が備わっていることを見出した。このことは、基礎科学的な興味もさることながら、異種遺伝子発現のような応用的側面においても、生産性向上のために欠くことの出来ない知見を提供する成果に繋がるものと考えた。

さらに、このような当研究室が直面した課題は、細菌が対数増殖後期に迎える劇的な環境変化に対応する生存戦略という視点に集約されており、とりもなおさず、細胞の環境適応機構といった根本的な生命現象に新しい知見をもたらす、特に微生物分子生物学においては最も重要な解決すべき課題の1つとして捉えるべきという着想に至った。RNA ポリメラーゼのコア酵素の鋳型認識に関しては過去に唯一、Shorenstein & Losick (*J Biol Chem* 248: 6170, 1973)があり、シグマ因子を入れ替えたキメラ酵素が各宿主由来の鋳型の転写能に差があることから、コア酵素の鋳型選択性に言及していた。その後、40年以上この研究の続報は出ていない。こうした背景から、コア酵素に注目した転写装置の新規機能解析を行うことにより、対数増殖後期の細胞機能を俯瞰することにより、生存戦略を見直すことを提案した。再評価という課題は、単なるプロモータースイッチングによる定常期移行というレベルに留まらない、生命現象の集約的意義が、そこに見出せるからである。

### 2. 研究の目的

細菌が栄養増殖を停止して定常期に入るとき(ライフアフターログ)には、大きなシステムの変換が起きる。孢子という耐久型細胞へ分化する典型的な生存戦略を持つ枯草菌においても、栄養増殖から孢子形成開始に至るプロセスは謎が多い。筆者はこれまで、緊縮応答、細胞分裂、孢子形成、DNA 修復といった細胞の中核機能を解析する中で、転写装置との新規な連関を見出したことから、転写装置の持つ新たな役割を視野に入れてきたが、こうした問題の多くがライフアフターログの生存戦略と密接に絡んでいることに気づき、栄養源枯渇の感知から増殖停止期の生存戦略に向けた分子機構を転写装置という新しい視点から再評価していくことを目的とした。

(1) 具体的には、目的1として「細胞機能ネットワークと転写装置」を解析する。アミノ酸飢餓等によって誘導される緊縮応答は、アラームン(p)ppGppの誘導によってGTPレベルを低下させることで適応するが、(p)ppGpp合成酵素をすべて欠いた株の抑圧変異解析により、筆者らは新たなGTPレベル制御機構を見出した。本研究の過程で多くの抑圧変異を*rpoB*、*rpoC*遺伝子にマップしており、この抑圧機構を解析することにより、緊縮応答、さらには新規GTPレベル調節機構に関与する転写装置の機能を明らかに出来るかと考える。

(2) 目的2として「転写装置の新規機能」として、特にコア酵素の新規機能を解析する。その1つとして主要シグマ因子SigAだけが働く枯草菌株(SigA only株)の解析により、シグマ機能を明確にすることによってコアの機能を区別する。SigA only株から得られた49°Cで溶菌しない抑圧変異株が*rpoC*に同定されている。大腸菌における耐熱性上昇の実験進化によりやはり*rpoC*の変異株が報告されたが(山口大・山田、農芸化学会2015年大会)、これらのメカニズムは不明でありこの分子機構を解明する。また、合成生物学的アプローチにより、*in vitro*では転写される遺伝子が、*in vivo*では転写されない現象を追跡し、*in vivo*における新たな制御機構の存在を推定した。すなわち、コアの持つプロモーター配列認識機構であり、古くからの問題に決着を付けると同時に、増殖相依的な新しい転写装置のネットワークに組み込んでいく。

### 3. 研究の方法

#### (1) GTP 合成を中心とした増殖制御ネットワークの解析

アラームン(p)ppGpp合成酵素をすべて欠いた株(以後(p)ppGpp<sup>0</sup>株)を用いた緊縮応答に関わる細胞機能ネットワークの解析を行う。本実験は既に同様の報告があったが(Kriel et al. *Mol Cell* 48, 231, 2012)、彼らはメチオニン要求株を用いていた点で限られた抑圧変異、すなわち*de novo* GTP合成関連遺伝子しか得られなかった。筆者らはメチオニン非要求株から、既報のもの以外に*rpoB*、*rpoC*を含む多くの抑圧変異を同定した。RNAPコアの変異による解析は第(2)項に記すが、本項ではメチオニン添加によって抑圧変異の効果が打ち消される“メチオニン感受性”を追跡することにより、緊縮応答における新たなネットワークを探索した。

#### (2) 転写装置の新規機能に関しては次の3項目について遂行する。

##### ①*rpoC*変異による耐熱化機構の解析

SigA only株は、その性質上対数増殖後期に溶菌するが、49°Cではさらに顕著な溶菌が起きる。この株では他のシグマ因子の効果を排除できるため、49°Cにおける耐熱性の上昇した株を得れば、細胞の耐熱化機構への理解が深まると考え、耐熱化株を取得した。全ゲノムシーケンス解析から*rpoC*に変異が落ちていることを確かめたので、本研究の目的に合致すると考え、当該株の耐熱化機構を解析する。増殖特性や孢子形成能を指標として、コアの機能を探る。

## ② *rpoB/C* 変異による (p)ppGpp<sup>0</sup> 株緊縮応答抑圧機構の解析

(1) で述べた (p)ppGpp<sup>0</sup> 株抑圧変異として *rpoB/C* にマップされた株について、その抑圧変異の要因について解析する。枯草菌における緊縮応答の特徴の 1 つとして、対数増殖後期における GTP/ATP レベルの低下に伴い、転写開始点(+1)が G である rRNA 遺伝子の発現が抑制され、+1 が A であるアミノ酸合成遺伝子や胞子形成遺伝子の発現が促進される。したがってこのような転写制御パターンに変化が起きるかどうかを、リポーターアッセイや RNA-Seq による発現解析によって検証する。

## ③ コア酵素のプロモーター認識能解析へのアプローチ

これまでの知見と当研究室の成果を踏まえ、コア酵素のプロモーター認識能は、ディスクリミネータ配列にあるのではないかと予測し、転写装置の大きな謎を解くために直接的なアプローチを取ることにした。すなわち、コンセンサス配列が同じであるにもかかわらず、枯草菌内ではほとんど発現しない大腸菌プロモーターとして *lacUV5* を用い、薬剤耐性遺伝子をリポーターとしたアッセイにより、枯草菌 RNAP のコアの変異により *lacUV5* プロモーターを読めるようになる株のスクリーニングを試みた。これにより、長年の課題であったコアのプロモーター認識に及ぼす機能を探れると考えた。

## 4. 研究成果

### (1) GTP 生合成を中心とした増殖制御ネットワークの解析

本研究において (p)ppGpp<sup>0</sup> 株の生育阻害を抑圧する変異を同定した *prs*, *rpoB/C* は、過去の研究においては全く同定されなかった。本研究と過去の抑圧変異株のスクリーニング条件の違いとして、メチオニンの有無が挙げられる。このことから、メチオニン存在下では新規抑圧変異による生育回復効果が阻害されるのではないかと考え、最少培地メチオニン添加・非添加条件(MM±Met)における新規抑圧変異株の生育を比較した。その結果、抑圧変異株 *rpoB/C* は、いずれも MM+Met 条件において顕著な生育阻害を示した(メチオニン感受性)。一方で過去に同定されていた GTP 生合成に直接関与する遺伝子に抑圧変異を持つ株、及び抑圧変異株 *prs* においてはメチオニンの有無による生育への影響は殆ど見られなかった。以上の結果から、メチオニンは *rpoB/C* 変異による生育回復効果を打ち消すことが示唆された。抑圧変異株 *rpoB/C* とその他の抑圧変異株の相違点として、抑圧変異株 *rpoB/C* では細胞内 GTP 量の有意な低下は見られないことが挙げられる。このことから、抑圧変異株 *rpoB/C* は細胞内 GTP 量の上昇する要因に対し、他の抑圧変異株と比較して感受性が高いことが考えられた。実際に、最少培地における抑圧変異株 *rpoB/C* の生育は、GTP salvage 合成の基質である guanosine の添加により阻害される細胞内 GTP 量を上昇させることで、抑圧変異株 *rpoB/C* の生育回復効果を打ち消していたのではないかと考えた。GMP 合成酵素 GuaA の阻害剤 decoyinine を MM+Met 条件に添加したところ、*rpoB1* (p)ppGpp<sup>0</sup> 株のメチオニン感受性は部分的に回復した。また、MM±Met 条件における細胞内 GTP 量を、HPLC を用いて解析したところ、野生株においてはメチオニンの添加・非添加で細胞内 GTP 量に殆ど変化が見られなかったのに対し、*rpoB1* (p)ppGpp<sup>0</sup> 株においては、メチオニン添加条件で細胞内 GTP 量の顕著な上昇が見られた。以上の結果から、抑圧変異株 *rpoB/C* が示すメチオニン感受性は細胞内 GTP 量の上昇に起因することが示唆された (図 1)。

これまでの研究において、メチオニン感受性は *de novo* GTP 生合成に直接関与する遺伝子の抑圧変異株は示さなかったこと、一方で *rpoB1* (p)ppGpp<sup>0</sup> 株が示したメチオニン感受性は、GMP 合成酵素 GuaA の阻害剤 decoyinine の添加により部分的に相補されたことを踏まえ、メチオニン添加による細胞内 GTP 量の上昇は、メチオニン、またはその代謝産物が、*de novo* GTP 生合成のいずれかの律速段階を促進していると推察した。そこで *de novo* GTP 生合成経路の各酵素のドメイン構造について調べたところ、IMP dehydrogenase(GuaB)に着目するに至った。GuaB は ATP と GTP の生合成の分岐点にある IMP から XMP を合成する反応を触媒する GTP 生合成の律速酵素である。GuaB には CBS domain (bateman domain) と呼ばれる機能未知な subdomain が進化的に保存されている。CBS domain は多くの生物に、IMP dehydrogenase に限らず保存されており、主に Adenine base を持つ化合物がリガンドとして作用することが知られている。しかし、IMP dehydrogenase の CBS

domain に対して何がリガンドとして作用し、酵素の機能に対してどのように関与しているのかについてはあまり理解されていない。IMP dehydrogenase 以外の CBS domain を持つ酵素において、メチオニン代謝に関与する因子がリガンドとして作用する例を調べたところ、超高熱性細菌 *Methanocaldococcus jannaschii* の持つ機能未知酵素 Mj0100 の CBS domain にメチオニンの代謝産物である S-Adenosyl Methionine(SAM), 及び Methylthio adenosine(MTA)がリガンドとして作用することが報告されていた(Lucas M *et al.*, J. Mol. Biol. 2010)。Mj0100 と SAM, MTA との共結晶構造解析の結果から、CBS domain において SAM, MTA との結合に関与するアミノ酸残基も同定されており、枯草菌 GuaB と Mj0100 との CBS domain のアミノ酸配列比

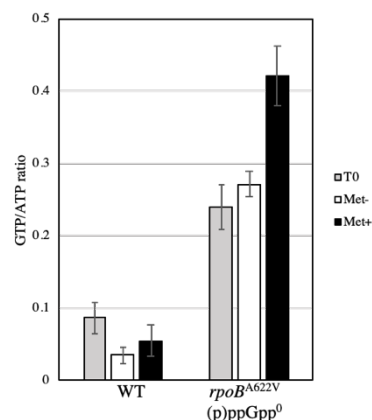


図 1. メチオニン添加による細胞内 GTP レベル。

較を行ったところ、枯草菌 GuaB CBS domain において SAM との結合に関与するアミノ酸残基が多数保存されていることが分かった(GuaB Leu114, Ile120, Val123, Ile137, Thr139, Val163, and Leu198)。このうち枯草菌 *guaB* のアミノ酸残基の変異:T139I と、I120, V123 近傍のアミノ酸残基の変異:S121F は、過去に(p)ppGpp<sup>0</sup>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.*, Mol. Cell 2012)。さらに、本研究においても(p)ppGpp<sup>0</sup>株の最少培地における生育阻害を抑圧する変異として、L198の近傍に位置するアミノ酸残基の変異(K196E)を同定した。そこで、これらの変異をそれぞれ *rpoB1* (p)ppGpp<sup>0</sup>株に導入し、MM ±Met 条件における生育を検証した。その結果、いずれの変異によっても、メチオニン感受性は完全に相補された。以上の結果から、メチオニンの代謝産物である SAM が、GuaB の酵素活性を CBS domain を介して正に制御し、GTP 生合成を活性化させる可能性が示された。このように、緊縮応答の抑圧変異の解析から GTP 生合成における SAM の関与という新しいネットワークの構築に繋がった。

## (2) RNA ポリメラーゼコア酵素の新規機能

### ① *rpoC* 変異による耐熱化機構の解析

SigA only 株を 49°C で培養し、プレーティングによってコロニーを確認後再び 49°C で培養する操作を繰り返した。こうして得られたコロニーは 49°C における溶菌現象の抑圧が見られた。これらの株を次世代シーケンサーによって全ゲノム解析したところ、共通して RNA ポリメラーゼコアの β' サブユニットをコードする *rpoC* に変異が見られた。この変異のみを SigA only 株に戻して溶菌の抑圧に寄与していることを検証し、168 株 (野生株) に同じ *rpoC* 変異を導入した。そして野生株においても高温培養時の生存率に寄与するかどうかを確かめるため、枯草菌の増殖限界近傍の温度で 10 分間処理後の生菌数を測定したところ、野生株と比べて生存率が上昇していた。このことから、*rpoC* の変異により細胞の耐熱性が上がったと考えられる。このような *rpoC* 変異株を 3 種 (*rpoC1*, 2, 3) 取得した (図 2)。得られた *rpoC* 変異株は常温においては若干増殖速度の低下が見られたことから、転写活性の抑制が耐熱化に繋がっているのではないかと考え、致死量でない低濃度のリファンピシンを添加して生育を遅延させ、55°C、10 分間処理して生存率を比較した。その結果、亜致死量のリファンピシン添加によって耐熱性が増加することが分かった (図 3)。このことは常温における転写活性、すなわち温度適応性を一部犠牲にすることによって (トレードオフ) 耐熱性を獲得したのではないかと考えられる。

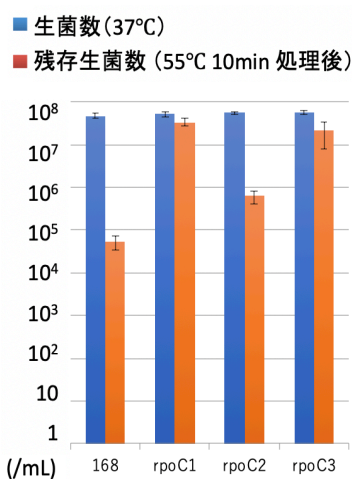


図 2. *rpoC* 変異による耐熱化

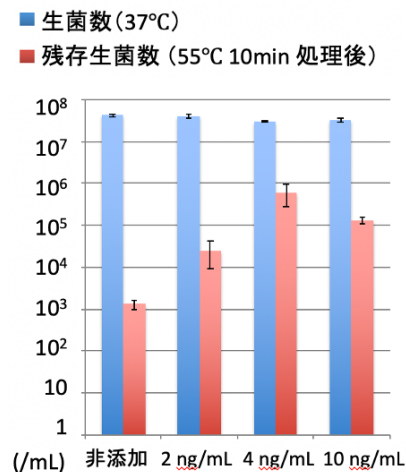


図 3. 亜致死量のリファンピシン添加による野生株の耐熱化

168 *rpoC* 変異株は RNA ポリメラーゼの変異であるため、シグマとの親和性に影響を及ぼした可能性を考え、孢子形成率を測定した。その結果 37°C においては *rpoC2* において孢子形成率がやや低下する程度であったが、49°C においては *rpoC1*, *rpoC2* において大きく減少した。以上のことから、*rpoC1*, *rpoC2* においては孢子形成能を落として (トレードオフ) 耐熱化していることが示唆された。孢子形成能の低下に関する *rpoC* 変異のさらに詳細なメカニズムを解析するため、孢子形成期特異的な遺伝子発現をリポーターアッセイにより検証したところ、SigA 依存プロモーターへの影響はわずかであったが、SigH 依存プロモーター活性が大幅に低下していた。したがって RNAP コアの変異によってシグマ因子との親和性が変化したのではないかと考えている。また、SigH のタンパク質量を経時的に調べたところ、蓄積量も減少していた。さらにコンピテンス関連遺伝子においてもプロモーター活性が低下していた。

大腸菌において高温馴化により得られた株の多くが、低温や常温における増殖適応性 (フィットネス) を低下させており、耐熱化のトレードオフという考え方が報告されている。枯草菌においても *rpoC* の変異やリファンピシン添加実験により、常温での生育遅延が起こることと耐熱化することがトレードオフの関係にあると考えられる。転写活性を低下させることで転写

に使うエネルギーを耐熱化に回しているのではないだろうか。

一方、枯草菌において得られた耐熱化株では、孢子形成能や運動性、コンピテンスの低下といった特徴が見出され、対数増殖期と孢子形成期の遷移期に働く転写抑制遺伝子に多くの変異が見つかった。遷移期における主要な転写抑制因子として *AbrB*、*ScoC*、*SinR* の三つの因子が知られているが、これら因子が孢子形成の開始期に起こる転写因子 *Spo0A* のリン酸化を抑制的に制御する働きによって正常なフェーズ移行が行われる。そこで活性化型 *Spo0A* を人為的に誘導したところ、耐熱性が増加するという極めて興味深い新知見を得た。このことから今回得られた遷移期における転写抑制遺伝子の変異は *spo0A* に対する抑制が効かなくなることで耐熱化したのではないかと考えている。以上のことから枯草菌における耐熱化に対するトレードオフは、遷移期に働く調節因子である *Spo0A* との関連性を強く示唆しており、微生物の耐熱化機構における遷移期制御因子の関与という新しい概念を提唱した。

### ② *rpoB/C* 変異による (p)ppGpp<sup>0</sup> 株の緊縮応答抑圧機構の解析

緊縮応答に関与する RNA ポリメラーゼの機能として、(p)ppGpp<sup>0</sup> 株の抑圧変異解析を行ったところ、コア酵素 *rpoB/C* の変異が同定された。始めに RNA-Seq 解析を行い、通常時と緊縮応答時の発現パターンの全体像を比較した。その結果、アミノ酸飢餓に誘導される +1 が A である遺伝子の発現は野生株では多くが発現しているのに対し、(p)ppGpp<sup>0</sup> 株ではそのほとんどが発現していない。一方、*rpoB* 抑圧変異株では、野生株ほどではないが (p)ppGpp<sup>0</sup> 株と比較すると発現していることが分かった。また、アミノ酸飢餓時に抑制される +1G の遺伝子発現は野生株ではあまり発現していないのに対し、(p)ppGpp<sup>0</sup> 株では多くが発現してしまっている一方、*rpoB* 抑圧変異株では、比較的抑制されている傾向にあった。したがって *rpoB* 抑圧変異株は、アミノ酸飢餓時に (p)ppGpp を合成できなくとも、誘導されるべき +1A である遺伝子の発現を促進し、抑制されるべき +1G である遺伝子の発現を抑制している傾向が観察された。

さらに、*rrnO* および *sigA-P2* の各プロモーターを用い、元々の転写開始点 (+1G) に対して人為的に +1A に変換した構築と合わせ、*lacZ* を融合させてリポーターアッセイを行った。この結果、どちらのプロモーターにおいても、野生株と比較して *rpoB* および *rpoC* の変異株では +1G からの転写活性が低下していた。これらの結果より、枯草菌 RNA ポリメラーゼコア酵素の機能として転写開始点の嗜好性を備えており、+1ヌクレオチドに対する親和性を変化させることにより、細胞内 GTP レベルの低下を引き起こせなくなった株においても rRNA オペロンの発現を制御し、緊縮応答を可能にしていることが明らかになった。これもコア酵素の機能として初めて見出した成果である。詳細な分子機構は明らかではないが、+1ヌクレオチドの取り込みに際し、コア酵素が何らかの役割を果たしているという新知見である。

### ③ コア酵素のプロモーター認識能解析へのアプローチ

上述のように枯草菌内ではほぼ活性のない大腸菌 *lacUV5* プロモーターに、薬剤耐性遺伝子 *cat* を融合して枯草菌に導入した。この株を用いて、RNA ポリメラーゼコア酵素の機能を探るため、*rpoB/C* 領域に PCR 変異導入法により人為的変異を導入し、クロラムフェニコール耐性になった株をスクリーニングした。さらにバッククロスにより、コア酵素の変異によって確かに耐性になったと思われる株を 2 株取得した。塩基配列を確認したところ、*rpoB* のやや N 末に近い領域に変異が見出された。同定された変異は 2 箇所とも立体構造モデルの中で、DNA の通り道に近い領域に位置しており、アミノ酸の置換によって鋳型認識に何らかの影響が出ることは考えられる。また 2 箇所のうち 1 つは、該当箇所のアミノ酸配列が大腸菌型になっていた。これらの結果は、RNA ポリメラーゼのコア酵素に鋳型認識能があることを強く示唆している。上記②の結果と合わせ、コア酵素によるプロモーター認識の嗜好性があると言える。

当研究室では以前、プロモーター認識に関するコア酵素の機能として、ディスクリミネーター配列 (-10~+1) 領域にあるアデニン(A)の数に依存してコアがプロモーター認識特異性を担っている、という仮説を提唱したが、A の数を変化させたさまざまな変異プロモーターを構築してリポーターアッセイを行ったところ、予想通りプロモーター活性が変化した。この機能は枯草菌 RNA ポリメラーゼが特異的に持っていると考えられる。今回得られた *rpoB* 変異株は、A の数が大腸菌型である *lacUV5* を転写できるようになったものであり、この枯草菌特異的機能がコア酵素 (RpoB) に由来している可能性を示唆している。このような解析は、当初の目的の 1 つである、異種遺伝子発現における種の壁の克服という点において重要な意味を持つと考える。

以上、更なる詳細な分子機構の解析が必要であるが、本研究の成果として、転写装置、特にコア酵素の新規機能をいくつか提案することが出来、基礎的、応用的側面から分子育種に貢献できたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takada H., Shiwa Y., Takino Y., Osaka N., Ueda S., Watanabe S., Chibazakura T., Su'etsugu M., Utsumi R., Yoshikawa H | 4. 巻<br>164           |
| 2. 論文標題<br>Essentiality of WalRK for growth in <i>Bacillus subtilis</i> and its role during heat stress.                       | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Microbiology   | 6. 最初と最後の頁<br>670-684 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1099/mic.0.000625.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takada H, Yoshikawa H.   | 4. 巻<br>82            |
| 2. 論文標題<br>Essentiality and function of WalK/WalR two-component system: the past, present, and future of research. | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Biosci Biotechnol Biochem.   | 6. 最初と最後の頁<br>741-751 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1080/09168451.2018.1444466.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Osaka N, Kanesaki Y, Watanabe M, Watanabe S, Chibazakura T, Takada H, Yoshikawa H, Asai K.  | 4. 巻<br>113             |
| 2. 論文標題<br>Novel (p)ppGpp0 suppressor mutations reveal an unexpected link between methionine catabolism and GTP synthesis in <i>Bacillus subtilis</i> . | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Mol Microbiol.  | 6. 最初と最後の頁<br>1155-1169 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/mmi.14484.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takada H., Osaka N., Su'etsugu M., Yoshikawa H.  |
| 2. 発表標題<br>Essentiality of WalRK for growth in <i>Bacillus subtilis</i> and its role under heat stress. |
| 3. 学会等名<br>19th International Conference on Bacilli & Gram-Positive Bacteria (国際学会)                     |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大坂夏木,高田啓,多喜乃雄太,兼崎友,渡辺智,千葉櫻拓,朝井計,吉川博文 |
| 2. 発表標題<br>枯草菌における(p)ppGppに依存しないアミノ酸飢餓適応機構の解析   |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会 89回大会                         |
| 4. 発表年<br>2017年                                 |

|                                |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名<br>石垣媛菜,朝井計,吉川博文       |
| 2. 発表標題<br>シグマ因子の in vivo 進化実験 |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム微生物学会 第12回年会   |
| 4. 発表年<br>2018年                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡辺愛美,円谷優佑,大坂夏木,兼崎友,朝井計,吉川博文       |
| 2. 発表標題<br>アミノ酸飢餓への適応に関わる枯草菌 RNA ポリメラーゼの変異解析 |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム微生物学会 第12回年会                 |
| 4. 発表年<br>2018年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大坂夏木,高田啓,多喜乃雄太,兼崎友,渡辺智,千葉櫻拓,吉川博文、朝井 計    |
| 2. 発表標題<br>プリンヌクレオチド合成経路初発酵素 Prs による新規アミノ酸飢餓適応経路の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム微生物学会 第12回年会                        |
| 4. 発表年<br>2018年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大坂夏木, 高田啓, 多喜乃雄太, 兼崎友, 渡辺智, 千葉櫻拓, 吉川博文, 朝井計 |
| 2. 発表標題<br>枯草菌における(p)ppGpp に依存しないアミノ酸飢餓適応機構の解析         |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2018年度大会                            |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>渡辺葵, 山下園加, 井上拓也, 吉川博文, 朝井計 |
| 2. 発表標題<br>枯草菌における異種プロモーター認識能拡張の取り組み  |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2018年度大会           |
| 4. 発表年<br>2018年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大坂夏木, 円谷優佑, 高田啓, 多喜乃雄太, 兼崎友, 渡辺智, 千葉櫻拓, 吉川博文 |
| 2. 発表標題<br>アミノ酸飢餓への適応に関する枯草菌RNAポリメラーゼの変異解析              |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム微生物学会 第11回年会                            |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高松美沙樹, 兼崎 友, 朝井 計, 吉川博文             |
| 2. 発表標題<br>枯草菌RNAPコア酵素の変異による耐熱化と高温適応に対するトレードオフ |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム微生物学会 第11回年会                   |
| 4. 発表年<br>2017年                                |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高田 啓、植田 修平、志波 優、渡辺 智、千葉櫻 拓、内海 龍太郎、吉川 博文 |
| 2. 発表標題<br>枯草菌二成分制御系WalRK の熱ストレス応答と生育必須性に関する解析     |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2017年度大会                        |
| 4. 発表年<br>2017年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大坂夏木、高田啓、多喜乃雄太、兼崎友、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文 |
| 2. 発表標題<br>枯草菌における栄養状態に応じた新規GTP 制御機構の解析     |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2017年度大会                 |
| 4. 発表年<br>2017年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>朝井 計、清水 葉子、廣澤 早香、高田 啓、吉川 博文         |
| 2. 発表標題<br>SigI とWalKR による枯草菌の増殖維持の制御ネットワークの解析 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2017年度大会                    |
| 4. 発表年<br>2017年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高松美沙樹、兼崎 友、朝井 計、吉川博文                 |
| 2. 発表標題<br>枯草菌RNAP コア酵素の変異による耐熱化と高温適応に対するトレードオフ |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 2017年度大会                     |
| 4. 発表年<br>2017年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大坂夏木、高田啓、兼崎友、門屋亨介、田口精一、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文、朝井計 |
| 2. 発表標題<br>メチオニン代謝が関与するGTP生成の新規な制御機構の解析             |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム微生物学会 第13回年会                        |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>片野 亘、徳山麻里、朝井計、吉川博文                                 |
| 2. 発表標題<br>IS 256Bsu1 のCRISPR/dCas9システムによるtransposase発現抑制系の開発 |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム微生物学会 第13回年会                                  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山口将司、吉川博文、朝井 計                    |
| 2. 発表標題<br>枯草菌2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体の遷移期における機能解析 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2019年度大会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>加納啓吾、北村夏美、法花津匠、大塚まみ、武井若紗、小菅是子、朝井 計、吉川博文 |
| 2. 発表標題<br>枯草菌を用いた分子シャペロンによる変異緩衝作用についての検証          |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2019年度大会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大坂夏木、高田啓、兼崎友、門屋亨介、田口精一、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文、朝井計 |
| 2. 発表標題<br>メチオニン代謝が関与するGTP生成の新規な制御機構の解析             |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2019年度大会                          |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡辺愛美、円谷優佑、大坂夏木、吉川博文、朝井計、兼崎友 |
| 2. 発表標題<br>枯草菌RNAPのiNTPに対する嗜好性の解析      |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2019年度大会             |
| 4. 発表年<br>2019年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡辺 智、朝井 計、赤沼元気、千葉櫻拓、河村富士夫、板谷光泰、吉川博文 |
| 2. 発表標題<br>合成生物シアノバチルスにおける合成ゲノム再起動計画           |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2019年度大会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>片野 亘、徳山麻里、吉川博文、朝井 計   |
| 2. 発表標題<br>CRISPR/dCas9 システムを用いたIS 256Bsu1 trasposase の枯草菌168 株への影響の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2019年度大会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Natsuki Osaka, Hiraku Takada, Yu Kanesaki, Ryosuke Kadoya, Seiichi Taguchi, Satoru Watanabe, Taku Chibazakura, Hirofumi Yoshikawa, Kei Asai |
| 2. 発表標題<br>Characterization of novel suppressor mutations of Bacillus subtilis (p)ppGpp0 strain not involved in GTP biosynthesis.                      |
| 3. 学会等名<br>20th International Conference on Bacilli and Gram-Positive Bacteria. (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大坂夏木、高田啓、兼崎友、門屋亨介、田口精一、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文、朝井計  |
| 2. 発表標題<br>Novel regulatory mechanism of Methionine metabolism involved in GTP biosynthesis. |
| 3. 学会等名<br>第42回 日本分子生物学会年会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石垣 媛菜、吉川 博文、朝井 計               |
| 2. 発表標題<br>枯草菌を用いた遺伝子重複と変異による転写装置の機能分化の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム微生物学会 第14回年会              |
| 4. 発表年<br>2020年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐藤 龍一、美田 知也、渡辺 智、兼崎 友、板谷 光泰、吉川 博文、朝井 計 |
| 2. 発表標題<br>枯草菌細胞内におけるシアノバクテリアRNAポリメラーゼの構築         |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム微生物学会 第14回年会                      |
| 4. 発表年<br>2020年                                   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|