

博士論文

長期継代により変異した 枯草菌 L-form の遺伝的解析

太田 和希

内容

略語一覧	4
第一章 序論	5
第一節 生物の増殖と細胞分裂の仕組み	5
第二節 原始的な分裂形態をとる L-form	8
第一項 L-form の発見と初期の研究史	10
第二項 細胞膜の過剰生産による分裂	11
第三項 不安定型 L-form と安定型への移行	13
第三節 増殖の高速化と進化	16
第四節 本研究の目的	18
第二章 枯草菌 L-form の長期継代実験と表現型の解析	20
第一節 目的	20
第二節 方法	20
第一項 使用した菌株	20
第二項 L-form の培養条件とプレカルチャーの作成	22
第三項 増殖速度の測定と顕微鏡観察	22
第四項 細胞膜量と細胞内 DNA 量の比較	24
第三節 結果	24
第一項 増殖速度の測定と形態の調査	24
第二項 細胞壁合成能力の調査	30
第三項 細胞膜量と DNA 量の比較	32
第四節 考察	34
第三章 進化株の全ゲノム解析	37
第一節 目的	37
第二節 方法	37

第一項	枯草菌株からのゲノム抽出.....	37
第二項	全ゲノムリーディングとアライメント	38
第三節	結果.....	38
第一項	全ゲノム解析の結果	38
第二項	変異の解析.....	42
第四節	考察.....	43
第四章	遺伝子ノックアウト株の作成と解析	50
第一節	目的.....	50
第二節	方法.....	51
第一項	ノックアウト株の作成.....	51
第二項	ノックアウト株の L-form 培養方法	57
第三項	増殖速度の測定と顕微鏡観察	58
第四項	<i>tagF</i> ノックアウト株の細胞壁合成能力.....	59
第三節	結果.....	60
第一項	ノックアウト株の作成.....	60
第二項	ノックアウト株の増殖速度比較.....	61
第三項	<i>tagF</i> ノックアウト株の細胞壁合成能力の調査	64
第四節	考察.....	69
第五章	結論	73
謝辞		76
参考文献		78
補足資料		86

略語一覽

<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
DDW	Double distilled water
DNA	Deoxyribonucleic acid
Em	Erythromycin
GFP	Green Fluorescent Protein
Km	Kanamycin
LB 培地	Luria-Bertani
NB	Nutrient Broth
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction

第一章 序論

第一節 生物の増殖と細胞分裂の仕組み

生物の持つ重要な要素の一つに自己を複製し分裂し増殖していく能力がある。現生の生物は一個の原始細胞から増殖してきたと考えられており、また自己複製能力は生物の定義を満たす要素のうちの一つに挙げられることも多い[1]。しかしながら、生物が分裂と増殖という能力を獲得したとき、原始細胞がどのような手段で分裂と増殖を行っていたのかという点についてわかっていることは少ない。

現生の生物の分類には様々な説が提唱されているが、その中の一つに Woese らの提唱した、生物は大きく分けて原核生物、古細菌、真核生物の三界に分類されるというものがある[2]。その中で、体構造が比較的単純であるとされる原核生物に分類される細菌においても、その分裂様式は多数の遺伝子やタンパク質をはじめとする様々な要素が複雑に関わった分裂形式を持っている。一般的な細菌の細胞分裂は、染色体の複製と娘染色体の分離の後に、ほぼ正確に細胞の中心から二つに分裂する。それを可能にするメカニズムは、細胞壁を起点とし、細胞骨格の一種に数えられる FtsZ が深くかかわり、10 以上の分裂因子が関連した複雑な機構により体積がほぼ等しい娘細胞 2 つに分裂する[3][4]が、この分裂様式は複雑なものであるにもかかわらず細菌全体に広く保存されており、かなり早い段階で完成したものと推測されている。一方で、真核細胞の分裂様式は原核生物や古細菌などと共通する部分もあ

るが、分裂周期の存在や細胞骨格の挙動など多くの部分で異なっている。現生の生物細胞が分裂する原理については多くの研究があり、その分裂メカニズムについても知られているものも多い。一方で、原核生物や真核生物など含めすべての生物の祖先である原始細胞の分裂様式はすでに失われており謎に包まれている。現生の生物がみな備えているような多数の遺伝子とそれからなる機構により複雑に制御される分裂様式は、生物の共通祖先である原始細胞の時点で備わっていたのだろうか？原始細胞は単純な構造である、との考え方に立つとその説は取り難く、より単純な機構で分裂・増殖を行っていたのではないかと考えられる (Fig. 1)。

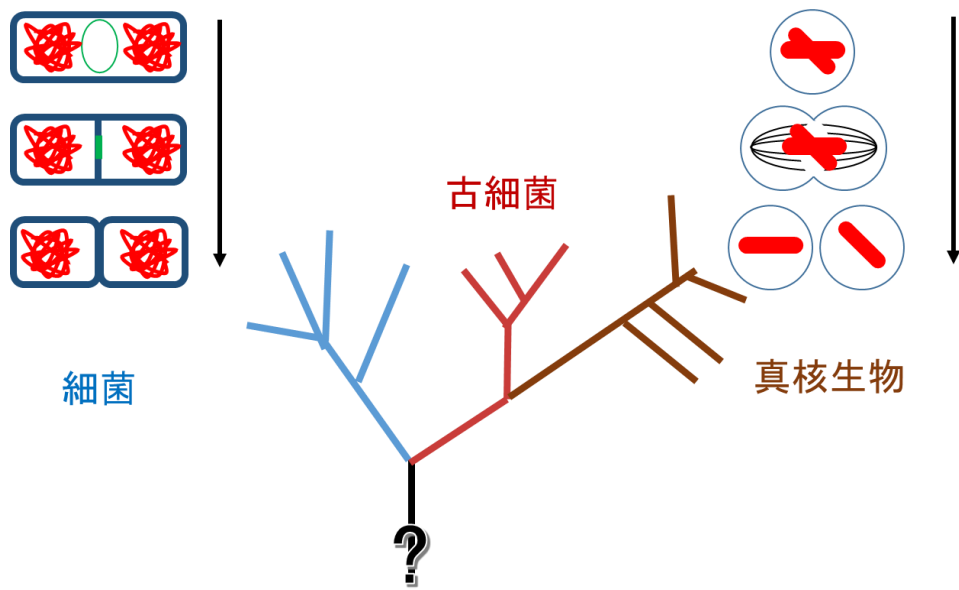


Fig. 1 現生の生物の分類と分裂様式の模式図

現生の生物は大きく三つの界に分類されるが、それぞれ異なる複雑な分裂形態を持つ。しかし、生物の祖先である原始細胞がとっていた分裂形態は不明である。

第二節 原始的な分裂形態をとる L-form

細菌の持つ特異的な構造として、ペプチドグリカンの主成分とする細胞壁を持つことがあげられる。ペプチドグリカン細胞壁はほぼすべての細菌に備わっており、また分裂に際しても細胞壁は重要な役割を果たす。このことは細菌がその共通祖先でも細胞壁を備えていたという可能性を示している[5]。しかし、ペプチドグリカン細胞壁の合成には多くの遺伝子がかかわる複雑な経路を経ているうえに、真核生物や古細菌はペプチドグリカンの主成分とする細胞壁を持たず、これら生物と細菌の共通祖先である原始細胞は細菌のような細胞壁やそれに依存した分裂機構を持っていなかった可能性がある。そのような原始細胞がとりそうな単純な分裂機構のモデルとされるのが、細胞壁欠損状態での生存と増殖を行う細菌の形態である L-form[6]である。L-form は細胞壁合成を阻害する抗生物質の影響を受ける環境で、様々な細菌で発見された特殊な分裂様式を持つ形態である[7][8]。通常の細菌が抗生物質や酵素などの影響により、本来備える細胞壁を失った状態になると、多くの場合は生存できず死に至る。これは、細胞壁の欠損により外界からの影響に脆弱になること、低張な環境では外部からの水の流入により細胞が破裂し溶菌するなどの要因に加え、細胞壁は細菌の細胞分裂において多くの場合は欠かすことのできない要素であるため、細胞分裂が行えず増殖も不可能になるためである[9]。しかしながら、細胞壁合成を阻害する抗生物質が存在し、かつ浸透圧が調整された環境下で L-

form になった細菌は、細胞壁がないにもかかわらず分裂と増殖を行うようになる[6]。この分裂様式は細胞壁を必要としない、という一点からも単純な機構であることが推測された[10]。またこの現象は特定の細菌にのみ見られる固有の能力ではなく、大きく構造が異なるグラム陽性菌とグラム陰性菌の両方で多くの種類で確認されている[6][8]。

第一項 L-form の発見と初期の研究史

L-form は 1935 年に Klieneberger らにより発見され、後にマイコプラズマとして知られるようになる胸膜肺炎菌に似た生物として報告がされた[11][12]。L-form 細菌は一部の抗生物質に対する耐性菌としてふるまうため、臨床的に重要視され、研究されてきた。細胞壁合成阻害剤の普及後はそれを利用した培養により L-form を誘導することが幅広く行われた[13]。結果的に、グラム陽性菌か陰性菌かの区別なく、多くの細菌種において、細胞壁合成阻害剤を含み、また水分の流入による溶菌を防ぐために浸透圧を調製した培地での培養によって L-form を誘導できることがわかった[14]。また、L-form の研究が行われるにつれ、L-form は細胞壁の合成能力を残す不安定型と細胞壁の合成能力を失った安定型に分類できること[14]や、固体培地上では不定形で半透明のムコイド型コロニーを形成すること[15]、臨床的には、抗生物質の多用により真核生物の体内で出現し様々な病気に関与している可能性[16]やヒト以外の動物での発見[17][18]など、多くの発見があった。しかし、多くの研究がなされながらも、L-form の発生とその増殖メカニズムの根底にある分子メカニズムについては研究がなかなか進まず[19]、また増殖や取り扱いが非常に難しかったため研究が困難である[20]こともあり、1990 年代に入ると L-form 関連の研究と出版物は減少していった[14]。

第二項 細胞膜の過剰生産による分裂

細菌が L-form に切り替わるために必要な条件の一つが報告されたのは比較的近年である 2013 年になってからであり、グラム陽性細菌のモデル生物である枯草菌を用いた研究によって、細胞膜の過剰な合成をもたらす変異を含む二つの遺伝子変異が起こることが必要という報告が Errington らによりされた[19]。L-form となるのに必要な二つの変異はそれぞれクラス 1 とクラス 2 と呼称される[21]。一方のクラス 1 変異は、いくつかの異なるタイプがあるが、いずれも細胞膜の合成に関わるものであった[21]。しかし、細胞膜の過剰合成のみでは、L-form としては生存していくことができず、ほどなく溶菌に至る[21]。L-form としての生存のために必要なおもう一つの遺伝子変異の要件がクラス 2 変異であり、それは酸化ストレス応答因子の変異であることが 2015 年に報告された。L-form の溶菌の原因が細胞に損傷を与える活性酸素種 (ROS) の蓄積によるものであり、その影響を低減する変異によって、L-form のまま生存ができるようになる。あるいは、嫌気環境での培養でも生存できるということも併せて報告された[21]。

また同時期に、L-form の分裂についても多くのことが判明した。枯草菌を含む通常の細菌は成長とともに染色体が複製され、細胞形状やタンパク質複合やエントロピーなどの作用により染色体を分配し[22][23]、分配された染色体の間で FtsZ が細胞壁に沿って環状に組み立てられ、親細胞を二分割するように隔壁が成長するに

従い Z リングが収縮し、隔壁が完成すると Z リングが分解され隔壁部分からほぼ同じ大きさの娘細胞二つに分裂する[24]。一方で L-form の分裂には細胞膜が深く関係していることが判明し、同時期の研究により表面構造の流動による小胞の形成により無秩序な分裂をすることがわかっている[10][25] (Fig. 2)。また染色体の複製と細胞分裂のプロセス開始との対応が崩れるために多核細胞となり、また分裂した娘細胞には DNA が分配されており生存可能であることも確認されている[10]。グラム陰性細菌である大腸菌の L-form は分裂のために細胞表面にわずかに残存するペプチドグリカンが必要とするとの報告が D'Ari らによりされていた[15]が、枯草菌 L-form ではペプチドグリカン合成系は必要がないことに加え、FtsZ に結合する GFP を発現する枯草菌株を用いた研究により[10]、枯草菌の L-form 分裂には、一般的な細菌のほぼすべてに共通する FtsZ を介した分裂様式[3]は一切関係なく発生することが判明した[10]。

これらのことが判明したことにより、比較的自由に L-form を誘導することが可能となった。同時に、近年急速に発達した遺伝子解析技術によって、継代によって変異した細菌に起こっている遺伝的な変異を全ゲノムベースのシーケンスによって解析することが比較的容易に行えるようになってきた。

第三項 不安定型 L-form と安定型への移行

L-form は、不安定型 L-form と安定型 L-form の二種類に分類される[26]。不安定型 L-form は、細胞壁合成を阻害する抗生物質などの要因がなくなると L-form から細胞壁を有する通常の状態に戻ることができるが、安定型 L-form は抗生物質がない状態でも L-form を維持する。不安定型 L-form は継代培養を経ることで安定型 L-form に移行されることが多いということが知られている[20] (Fig. 3)。また、枯草菌においては、*murC* 遺伝子を含む 18 kbp 領域の欠失により、安定な L-form が形成されることが報告されている[6]。別の研究では、天然に存在する大腸菌の安定な L-フォームに変異が確認されたが、L-フォームを安定化させる変異は確認されなかった[27]。

不安定型 L-form が継代により安定型となると、細胞壁合成能力の喪失とともに速く増殖するようになったという報告がある[20][28]。例えば、Allan らの報告によれば *Streptomyces viridifaciens* の L-form を 12 回継代培養したところ安定型へと移行し、不安定型の増殖定数 $\mu = 0.36 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、倍加時間 $\text{td} = 1.9 \text{ (h)}$ から安定型の $\mu = 0.72 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、 $\text{td} = 0.97 \text{ (h)}$ と二倍近くの増殖速度になった[28]。しかし、安定型になった際の細胞壁合成能力の喪失と L-form 増殖の高速化の関係と、その遺伝的な背景に踏み込んだ研究はこれまでに存在していない。

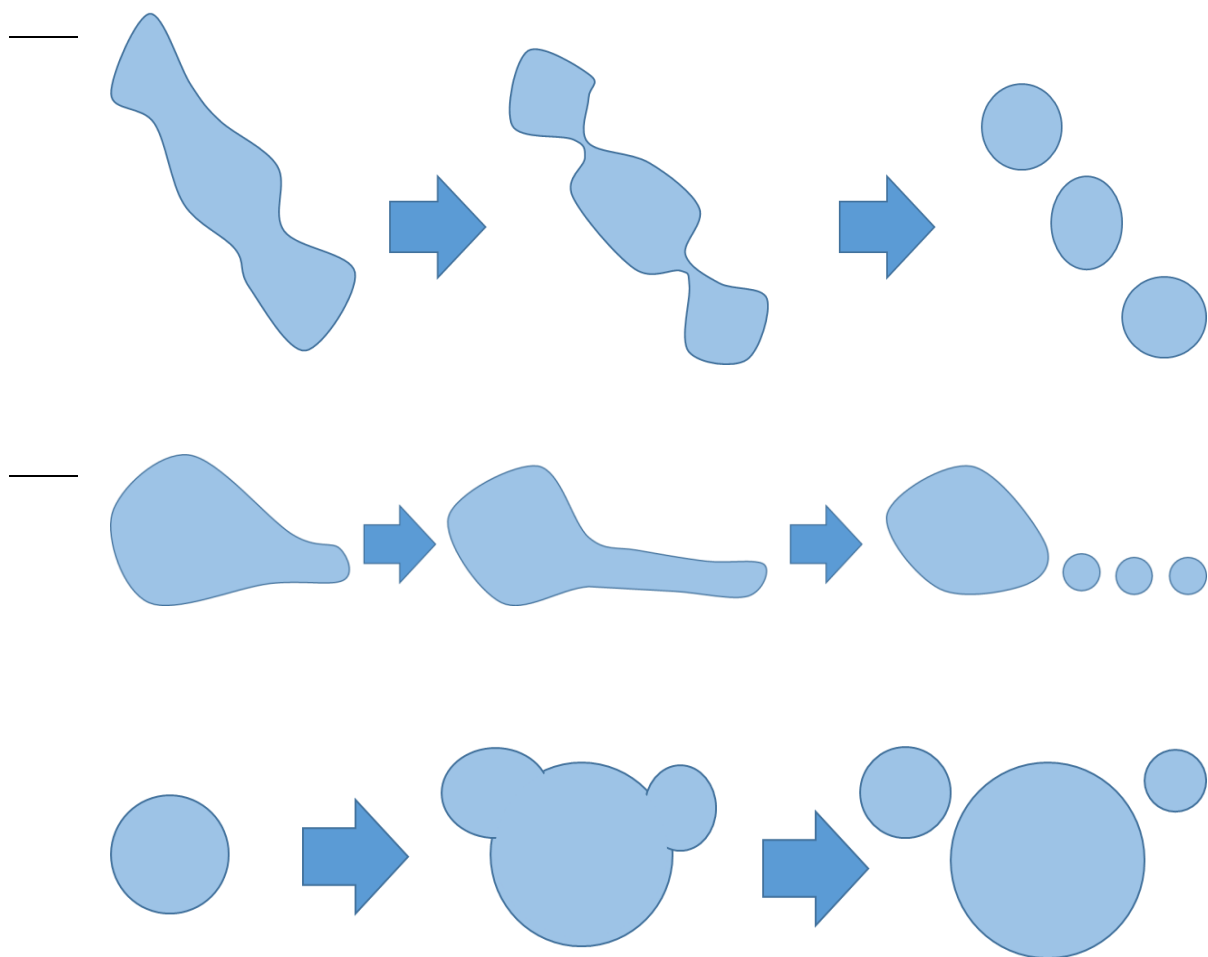


Fig. 2 L-form 分裂の模式図

A)、B)、C) L-form が分裂する際の挙動の例。いずれも[10]で示された分裂形式を参考に模式図にしたもの。A. 細長い形状になった **L-form** 細胞が複数の細胞に分裂するパターン。B. 細胞から細長い突起が形成され、その突起が複数の娘細胞に分裂するパターン。C. 細胞表面からくびれるようにして突起が出現し、複数の娘細胞が押し出されるようにして分裂するパターン。

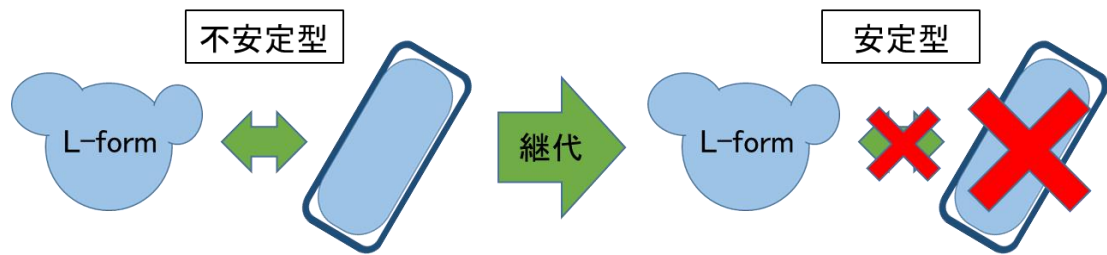


Fig. 3 L-form の不安定型から安定型への遷移

L-form が不安定型から安定型に移行するイメージ図。不安定型では抗生物質の有無など周囲の環境により細胞壁のある状態に戻ることができるが、安定型になると細胞壁を合成しなくなる。

第三節 増殖の高速化と進化

これまで L-form の原始的な増殖とその高速化について述べてきたが、果たしてこれらの現象を研究することにどういった意義があるといえるだろうか。まず、L-form は細胞壁合成や分裂を阻害する抗生物質への耐性や病原性などの観点から医療面で重要視されている。よって L-form の増殖速度の向上の条件に新しいものが判明した場合、その増殖速度の向上を妨げる手段をとることにより病原性のある L-form 細菌に対する対策となる可能性がある。また細菌の進化の研究のモデルともなり得ることが示唆されている[10]。特に、L-form 分裂は、タンパク質による制御を介さずに、比較的単純な小胞系でも発生させられることが判明している[29]。また、体積に対して流動性のある膜の比率を高めることによって分裂が起こる現象については理論面からも明らかにされている[30]。これらのことから、L-form 分裂は細胞の体積と膜面積の不均衡を生じさせることで物理的な作用のみで発生することが判明した[10]。このことから、L-form の増殖形態はタンパク質による制御を介さずとも実現可能で、十分に単純であると考えられ、細菌の通常の分裂が発達するよりもさらに前の段階、原始的な細胞の研究のモデルとなり得ることが提唱された[19]。よって、L-form の増殖について研究することは生命の起源とその進化について知ることのヒントを提供することにつながる。例えば、継代によってより増殖速度が向上し、生存に適したものが多く残っていくことは一種の進化が起こっている

と考えることができる。**L-form** が原始的な細胞の増殖形態のモデルとなるならば、**L-form** 細菌を人為的に進化させていく実験系は原始的な細胞がどのように進化していったかのモデルとなり得ると考えられる。また、**L-form** 分裂を継代によって分裂速度を向上させていった場合に、**L-form** 分裂での増殖速度の限界を調査することもできると思われる。

第四節 本研究の目的

私の所属する研究室では、枯草菌 **L-form** の長期継代実験を行ってきた。その目的は、**L-form** の分裂形態でどこまで高速で分裂できるようになるかということの調査と、**L-form** を保った状態でこれまで必須遺伝子とされていた一部の遺伝子の破壊が可能ではないかといった目的があった。

私は本研究において、この継代によって得られた枯草菌 **L-form** 株の調査と解析を二通りの新しい方法で行った。一つ目は、これまでにない解析手法として、蛍光顕微鏡によるサイズ解析や細胞壁合成能力の確認、吸光度の測定による増殖速度の比較などの従来行われてきた表現型解析と、近年急速に発達してきた DNA シーケンス技術、特に全ゲノムリーディングを利用した遺伝的解析手法を組み合わせることで、長期継代実験の中で起こった形態や表現型の変化を遺伝的側面から明らかにした。**L-form** の継代による形態や表現型の変化の報告は先行研究で複数知られている。しかし、そのほとんどは現代の遺伝子解析法が発展する前の 1960～90 年代に集中しており、これらの表現型の変化が具体的にどの遺伝子のこういった変異によって引き起こされたのか、ということを明らかにした報告はこれまでになかった。二つ目は継代進化後の枯草菌株で機能欠損が起こっているとみられる変異が発見された遺伝子の一部について、継代前の祖先株で対応する遺伝子をノックアウトすることにより、進化株の表現型や増殖速度を再現可能かということの調査である。

これらの調査により、例えば **L-form** 分裂を高速化する要因を新たに発見できれば、原始細胞の進化についての新たなヒントが発見されるなど、様々な発見があることが期待された。

本研究の目的は長期継代進化実験により得られた枯草菌 **L-form** に起こった変異・進化を表現型と遺伝的側面から解析し調査することである。そのため、まず第二章では進化型 **L-form** 株の増殖速度や細胞壁合成能力の有無などの表現型の調査を行い、発生した変化をリストアップした。第三章では進化型の全ゲノムリーディングを行い、祖先株との比較により遺伝的変異をリスト化し、変異により予想される表現型の変化と実際に起こっている変化を対応させて考察した。第四章では重要とみられた一部遺伝子について、祖先株から当該遺伝子をノックアウトした欠損株を作成し、表現型の変化を調査して進化株との比較を行った。

第二章 枯草菌 L-form の長期継代実験と表現型の解析

第一節 目的

私が所属する研究室では L-form の長期継代実験を行っていた。それによって L-form にどのような変化が起きたかの調査を本章にて行った。増殖速度の比較を始め顕微鏡での観察などにより表現型の変化を確認し、長期継代された枯草菌不安定型 L-form の表現型を継代前の祖先株と比較した。

第二節 方法

第一項 使用した菌株

祖先株 YK1694 は Errington 研究室より分譲を受けたもので、枯草菌 168 株を改変したもので、xylose の存在下で細胞膜合成遺伝子群 *accDA* を過剰発現し、過剰な膜合成によって L-form の成長をサポートすることが報告されている[19]。YK1694 の *xseB::Tn(km)*変異は *ispA* 遺伝子の発現を抑え、酸化ストレスを低減するため、好氣的条件下で L-form で生育できる[6]。

私が所属する研究室ではこの祖先株の長期継代実験を行っていた。浸透圧調整培地 NB/MSM に xylose と細胞壁合成阻害剤 fosfomycin を添加した培地で、L-form 培養・UV 照射・新しい培地への希釈を三つの実験系で 77 代にわたって繰り返した (Fig. 4)。最初の 20 回は UV 照射と OD₆₆₀ 測定を行わずに実施した。77 代目の

培養物を、fosfomycin と xylose を含む固体 NB/MSM 培地 (1% agar)で培養し、単一コロニーを得た。得られた単一クローンであるコロニーを培養しグリセロールストックを作成し、これにより得られた枯草菌 L-form 長期継代株 (以降は進化株と呼ぶ)をそれぞれ BE1771、BE1772、BE1773 とし以降の実験に用いた。

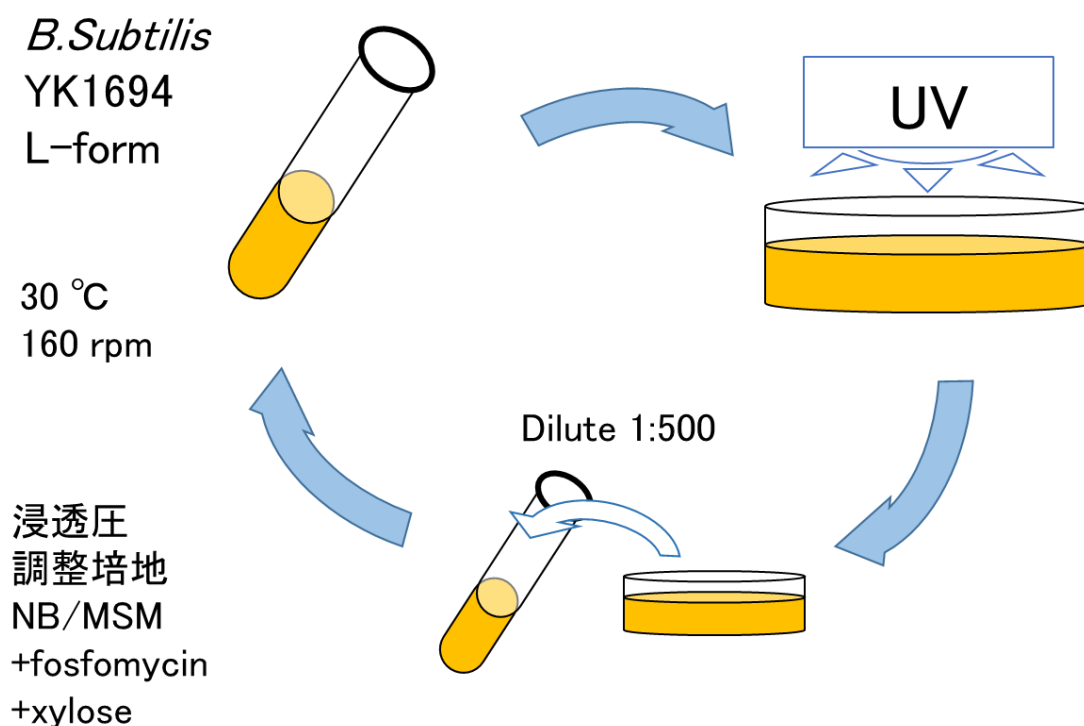


Fig. 4 : 長期継代実験のイメージ図

祖先株 L-form を浸透圧調整培地で培養し、紫外線を照射したうえで新しい培地に希釈した。培地には細胞膜合成遺伝子を過剰発現させるための xylose と細胞壁合成阻害剤の fosfomycin が含まれていた。当研究室ではこのサイクルを 77 代繰り返し、進化株 BE1771、1772、1773 を得た。

第二項 L-form の培養条件とプレカルチャーの作成

L-form の培養には主に NB/MSM 培地を使用した (6.5 mg/mL nutrient broth (NB、Oxoid)、20 mM MgCl₂、0.5 M sucrose、and 20 mM maleic acid (pH 7) [10])。また特に記述がない限り培地には適宜 *accDA* を発現させるための xylose を 0.5%、細胞壁合成を抑制するための fosfomycin を 0.15 mg/mL となるよう添加した。

祖先株 YK1694 はグリセロールストックから固体 LB 培地上に塗布し、形成された 1 コロニーを xylose および fosfomycin を含む 3 mL の NB/MSM 培地に接種し 160 rpm で浸透しながら 30 °C で 2 晩培養し L-form にした。進化株 3 株 (BE1771、1772、1773) は各グリセロールストックから xylose および fosfomycin を含む 3 mL の NB/MSM 培地に直接接種し 160 rpm で振盪しながら 30 °C で培養した。祖先株 L-form および進化株 3 種を 2 晩培養しプレカルチャーを作成した。培養には試験管 (AS ONE、15 mL Culture tube 34184015D、Japan) を用いた。

第三項 増殖速度の測定と顕微鏡観察

祖先株 L-form および進化株 3 種のプレカルチャーを作成し、OD₆₆₀ を計測した。新しい NB/MSM 培地に OD₆₆₀ $\div$ 0.02、液量 3 mL となるように希釈し、OD₆₆₀ を記録した。その後は通常の培養条件に従って培養し、2 時間ごとに OD₆₆₀ の測定を

行った。基本的に NB/MSM 培地には xylose 及び fosfomycin が含まれていたが、後にどちらも含まない NB/MSM での増殖も計測し比較を行った。培養と計測は $N = 3$ で行った。OD₆₆₀ の測定は Mini photo 518R (TAITEC、Japan) で行った。

OD₆₆₀ が 0.1 の対数増殖期にアリコート を 500 μ L 取り、2000 $\times g$ 、10 min、4 $^{\circ}$ C で細胞を集め、20 μ L の SMM (0.5 M sucrose、0.02 M maleate buffer [pH 6.4]、0.02 M magnesium chloride) で懸濁後に SYBR I (Takara) および FM4-64 (Invitrogen) で細胞膜を染色した。FM4-64 で染色した細胞を共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP8) で観察し、画像を取得した。取得した画像から ImageJ で細胞サイズを計測した。

細胞壁合成能力の調査のために、fosfomycin と xylose を含まない培地での培養を行った。細胞壁合成能力が残っている場合により早く確実に細胞壁を再生できるように、細胞壁欠損状態となった細菌の細胞壁再生を促す培地 PR19 中で各 L-form 細胞を培養した。PR19 培地は、先行研究[31]に記載された HCP-3 培地を改変して作成した。まず、コハク酸二ナトリウム六水和物 (135 g) を含むオートクレーブ処理液 300 mL と、K₂HPO₄ (7 g)、KH₂PO₄ (3 g)、カゼインナトリウム (2 g)、ポリビニルピロリドン (30 g)、カザミノ酸 (5 g)、tryptophan (0.2 g)、glucose (10 g)、tryptic soy broth (10 g)、1 M MgCl₂ 40 mL を添加した。2 $\times$ 原液を滅菌水で 2 倍希釈してから使用した (0.2 M コハク酸二ナトリウム六水和物、0.35% K₂HPO₄、

0.15% KH_2PO_4 、0.1% カゼインナトリウム、1.5% ポリビニルピロリドン、0.25% カザミノ酸 (5 g)、0.01% tryptophan、0.5% glucos、0.5% tryptic soy broth)。

第四項 細胞膜量と細胞内 DNA 量の比較

FACS (FACS Aria II BD)は毎秒 10^4 個以上の微粒子の傾向や散乱光を個別に測定可能な機器である。対数増殖期の祖先株 L-form および継代株 3 種を染色しこの機器で測定した。それぞれのサンプルは DNA を染色する SYBR green I 及び細胞膜を染色する FM4-64 により染色され、解析のため FACS につけられた。測定されたデータから各 L-form 細胞の細胞膜量と DNA 量を比較した。

第三節 結果

第一項 増殖速度の測定と形態の調査

当研究室では枯草菌 L-form の長期継代実験を行った。そのうち 57 代は UV 照射を行い、その時の OD の計測の結果を Fig. 5 に示す。77 代の継代後に、fosfomycin と xylose を含む固体 NB/MSM 培地 (1% agar) で培養し、単一コロニーを得た。3 つの独立した実験系で得られた長期継代株のシングルクローンをそれぞれ BE1771、BE1772、BE1773 とした。進化株の表現型の調査として、L-form 増殖の速度の測定を行った。進化株はすべて、fosfomycin と xylose の存在下で祖先株

より速く増殖した (Fig. 6-A)。このうち OD₆₆₀ の値が指数関数的に増加していた、祖先株の 14 時間目から 22 時間目の間、および進化株の 4 時間目から 8 時間目の間を対数増殖期とした。対数増殖期の増殖定数と倍加時間は、祖先株の増殖速度定数 $\mu = 0.045 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、倍加時間 $td = 6.7 \text{ (h)}$ から進化株はそれぞれ、BE1771: $\mu = 0.12 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、 $td = 2.5 \text{ (h)}$ 、BE1772: $\mu = 0.12 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、 $td = 2.4 \text{ (h)}$ 、BE1773: $\mu = 0.083 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、 $td = 3.6 \text{ (h)}$ 、平均で $\mu = 0.11 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ 、 $td = 2.9 \text{ (h)}$ と二倍近くの増殖速度になった。L-form の増殖には細胞膜の過剰合成が必要とされている。本研究で用いた祖先株 YK1694 の場合は xylose の存在下で過剰発現する細胞膜合成遺伝子群 *accDA* が細胞膜の過剰合成を引き起こし L-form を誘導する。そこで、増殖に対する *accDA* 過剰発現への依存性を調べるため、xylose を添加せずに同様の実験を行ったところ、xylose を含む培地に対し含まない培地中の株は、一時的に増殖は見られたもののやがて増殖が止まり、その後はほとんど成長しなかったため、進化株の急速な成長は *accDA* 発現に依存することがわかった (Fig. 6-B)。L-form 分裂をしていること、および分裂形態に祖先株 L-form との差異が発生しているかの調査として、対数増殖期 (OD₆₆₀ = 0.1) の細胞膜を FM4-64 で染色し、顕微鏡で観察した。明視野 (BF) と染色細胞膜画像の双方から、進化株の細胞の形状は祖先株 L-form と同様の球状であることが確認され、形状に大きな変化は認められなかった (Fig. 7)。細胞サイズ分布に関しては、進化株がやや広くなったものの、こちらも大

きな違いはなかった (Fig. 8)。各細胞の直径の平均は祖先株 : 1.4 (μm)、BE1771 : 1.6 (μm)、BE1772 : 1.6 (μm)、BE1773 : 1.6 (μm)であった。

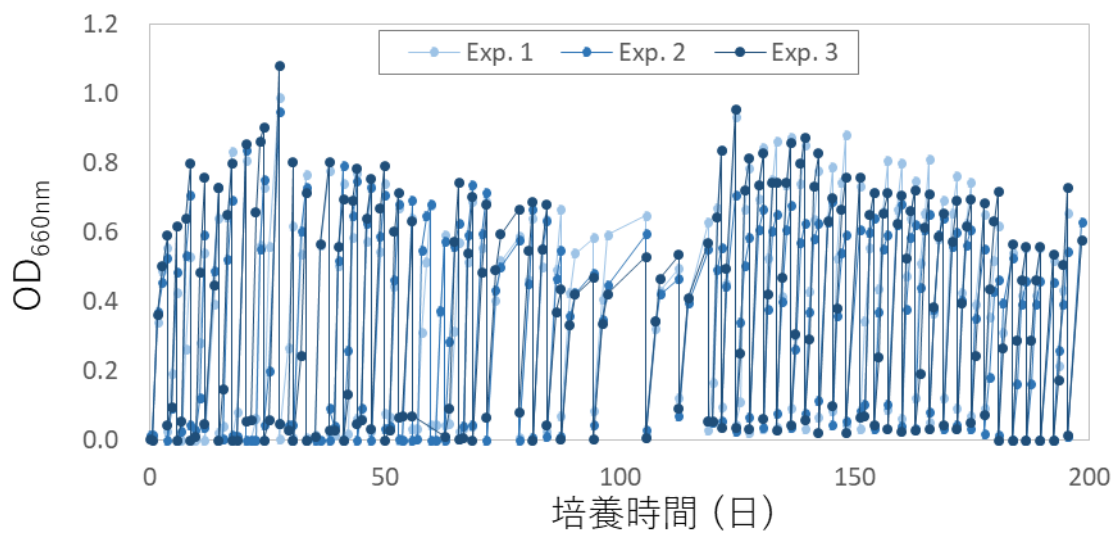


Fig. 5 : 長期継代実験の OD と培養期間のデータ

継代実験は独立して $N = 3$ で行った。最初の 20 回の継代の後は毎回 UV 照射と OD 計測を行った。100 日前後で培養時間が長くなっているのは、実験者の都合により一時的に継代ができなかったため。

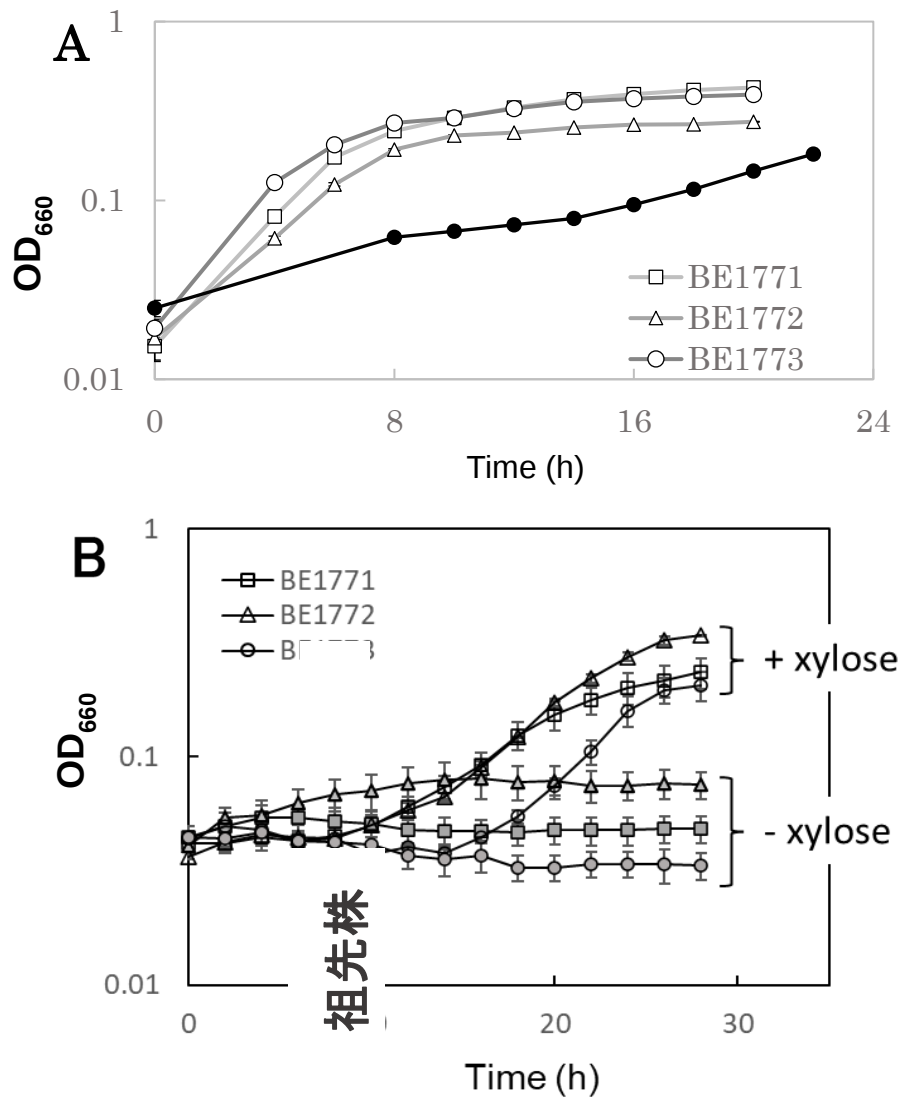


Fig. 6：祖先株 L-form と進化株の増加曲線

A) 祖先株と進化株の L-form での成長曲線。第二節第二項に記載したように、菌株は細胞壁合成を阻害する fosfomycin と細胞膜合成遺伝子群 *accDA* を発現させる xylose を加えた NB/MSM 培地で、穏やかに振盪しながら 30°C で培養した。N = 3 でありエラーバーは標準誤差を表す。ただし誤差が小さかったためにエラーバーがマーカーに埋まり図上では視認できないものもある。

B) 進化株の増殖における xylose の影響。進化株三株を fosfomycin と xylose を含む NB/MSM 培地で培養しプレカルチャーを作成した。プレカルチャーを 2000 × *g* で 10 分間遠心分離して上澄みを捨て、fosfomycin を加えた NB/MSM 培地に懸濁した。さらに培地に xylose を加えたものと、加えなかったものとの、第二節第二項に記載した方法で培養した。N = 3 でエラーバーは標準誤差を示す。

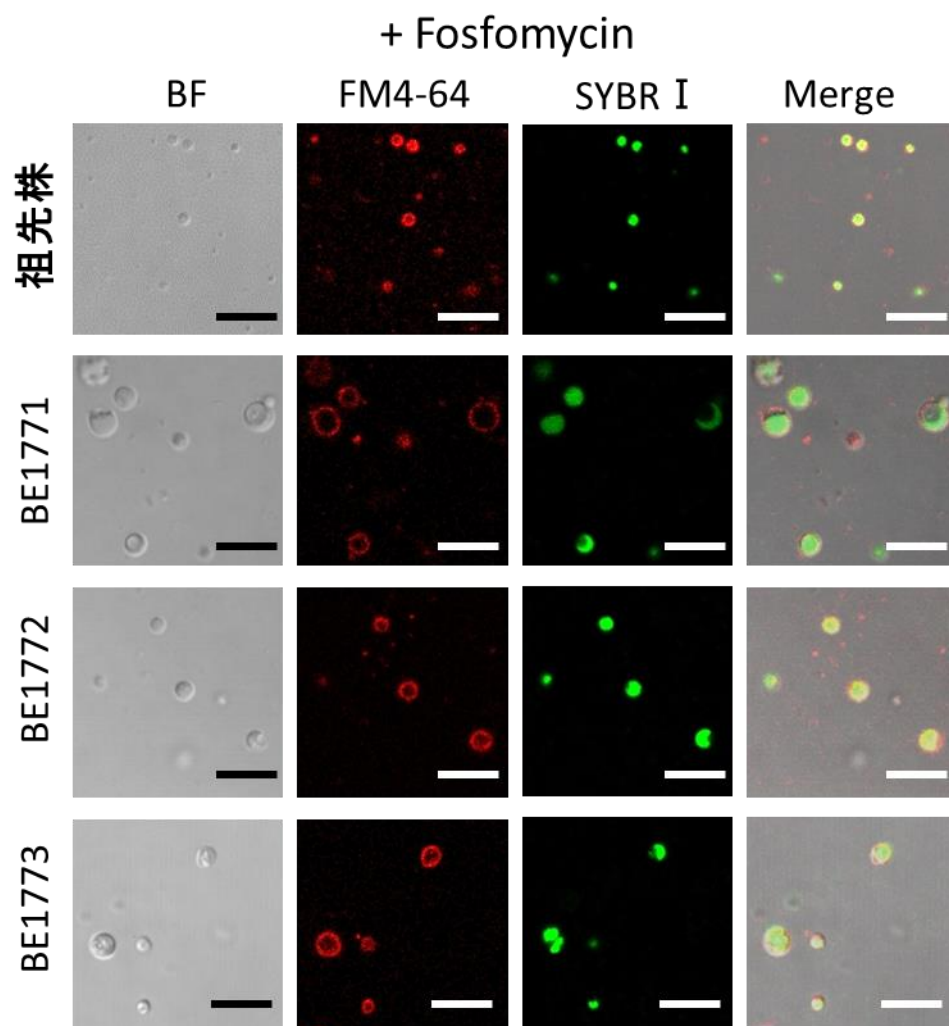


Fig. 7：細胞形状の顕微鏡観察

細胞壁合成を阻害する fosfomycin、および *accDA* を誘導する xylose 存在下での対数増殖期 ($OD_{660} = 0.1$)の細胞形状。明視野 (BF)画像と、細胞膜を染色する FM4-64、DNA を染色する SYBR Iの蛍光および各画像を合成した Merge 画像を示す。スケールバーは 10 μm である。

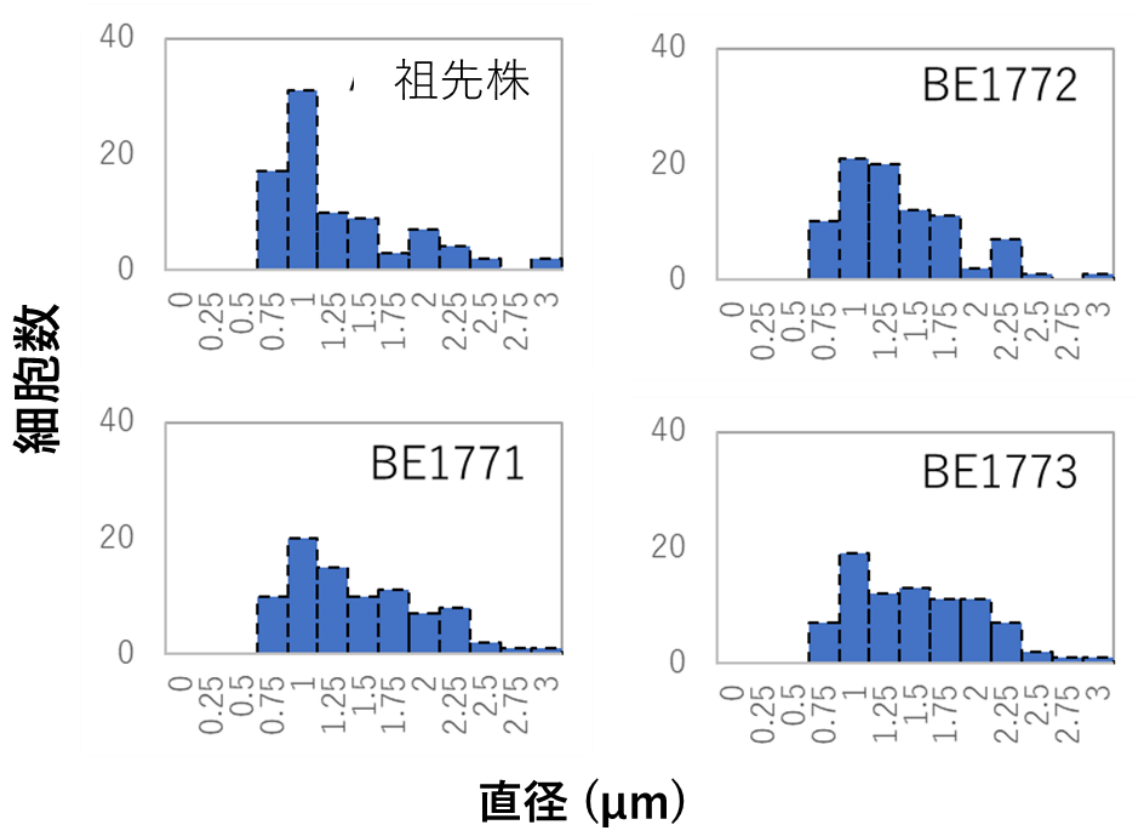


Fig. 8 細胞サイズ分布

細胞壁合成を阻害する fosfomycin、および *accDA* を誘導する xylose 存在下での対数増殖期 ($OD_{660} = 0.1$)の細胞 100 個を顕微鏡で確認し、ImageJ を用いて画像解析を行った。

第二項 細胞壁合成能力の調査

細胞壁合成能力を調べるため、細胞壁合成阻害剤 fosfomycin および L-form を誘導する xylose を含まない培地で培養することで細胞壁が再生されるかを確認した。細胞壁合成能力が残っている場合により早く確実に細胞壁を再生できるように、細胞壁欠損状態となった細菌の細胞壁再生を促す培地 PR19 中で各 L-form 細胞を培養した。この場合、不安定型 L-form は細胞壁合成を再開し、全体を細胞壁でおおわれた通常の細胞に復帰するはずである。実際に不安定型 L-form である祖先株は通常の細胞と同様の棒状の細胞に変化したが、進化株は球状の細胞のままであり、長期培養株は正常な細胞壁を合成する能力を失ったことが示された (Fig. 9)。この結果は、祖先株である不安定型 L-form が長期培養を経て安定型 L-form に変換されたことを示唆している。

また、fosfomycin および xylose を加えない固体 NB/MSM 培地上に進化株グリセロールストックを撒いた場合、半透明で不定形のコロニーが形成された。これは L-form に特有のムコイドコロニーと考えられ、実際に固体培地に fosfomycin と xylose を加えて祖先株を撒いた場合も同様のコロニーが形成された。このことも、進化株は自力で細胞壁を合成できない安定型 L-form となっていることを示している。

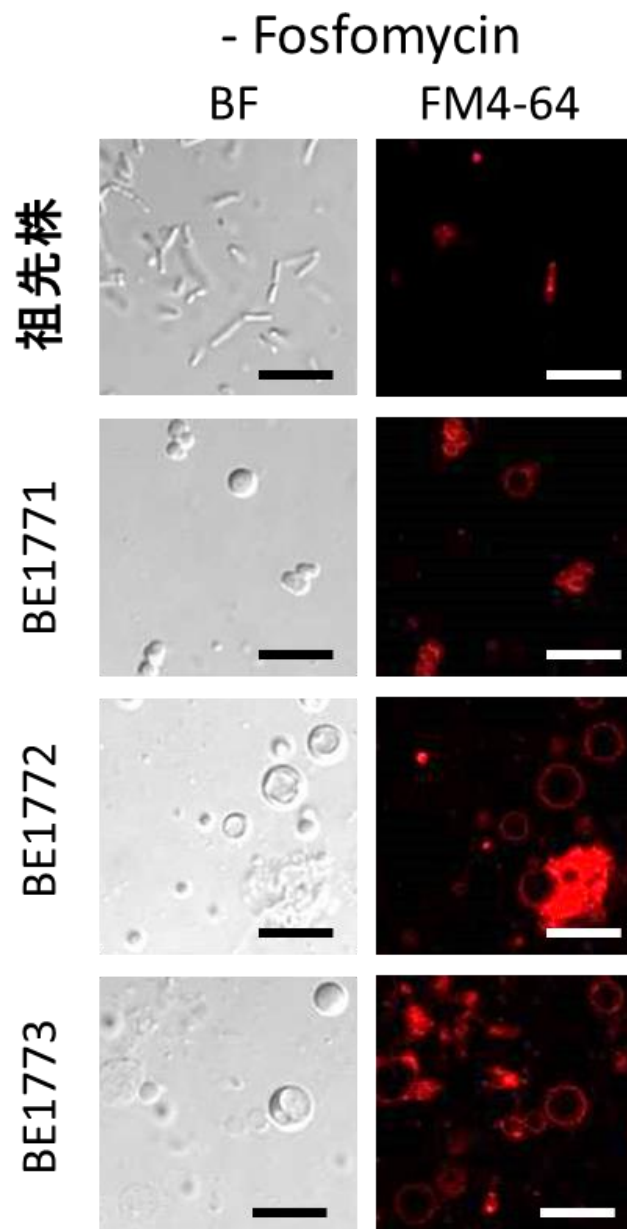


Fig. 9：細胞形状の顕微鏡観察

細胞壁合成を阻害する fosfomycin および xylose 非存在下での細胞形状。祖先株は細胞壁を合成し桿菌の形状に復帰したが、進化株は三種とも球状の L-form を示した。明視野 (BF) 画像と、細胞膜を染色する FM4-64 の蛍光を示す。スケールバーは 10 μm である。

第三項 細胞膜量と DNA 量の比較

毎秒 10^4 個以上の微粒子の蛍光や散乱光を個別に測定可能な機器 FACS (FACS Aria II BD)を用いて、対数増殖期の祖先株 L-form および継代株 3 種を、DNA を染色する SYBR I 及び細胞膜を染色する FM4-64 により染色し測定した。測定されたデータから各 L-form 細胞の細胞膜量と DNA 量を比較したところ、進化株では DNA 量に対する細胞膜量が祖先型に比べて増加していることが判明した (Fig. 10)。対して祖先株 L-form は膜の量に対して DNA 量が過剰となっている細胞が多く見られた。このことは、祖先型 L-form に比べ、進化株では細胞膜の合成速度が増加した可能性が考えられた。

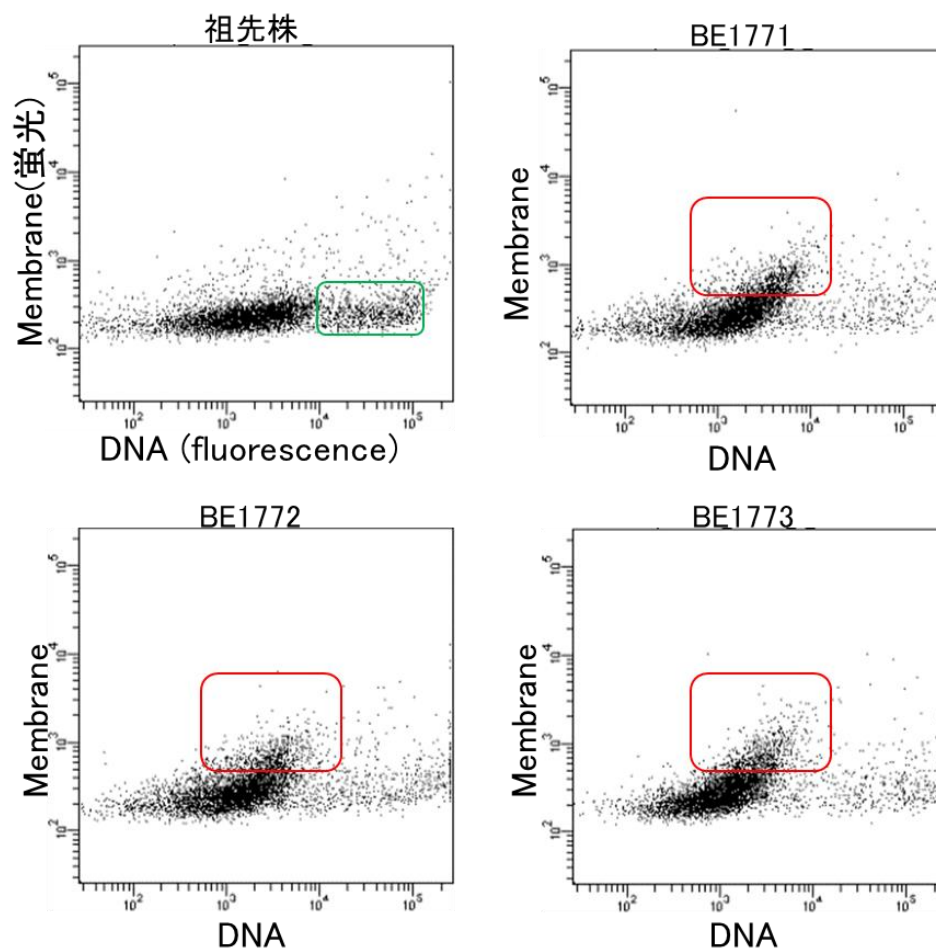


Fig. 10 細胞膜と DNA 量の比較

細胞壁合成を阻害する fosfomycin、および *accDA* を誘導する xylose 存在下で、細胞膜を FM4-64、DNA を SYBR I で染色した細胞 10000 個の蛍光強度を FACS を用いて計測した。祖先株 L-form では縦軸の細胞膜の蛍光に比べ横軸の DNA 染色蛍光が強い、DNA 過剰な細胞が進化株に比べ多く見られた（緑枠内）。一方進化株では細胞膜の蛍光が強い細胞が多く確認された（赤枠内）。

第四節 考察

この章では長期継代実験によって得られた枯草菌 L-form 継代進化株 (BE1771、1772、1773)の性質を調査し、祖先株 YK1694 との比較を行った。その結果、進化株は祖先株に比べて複数の表現型の変化が確認された。まず進化株は三つの実験系すべてにおいて L-form 増殖の速度が祖先株から大きく向上したことが確認された。また、進化株からは細胞壁合成能力が失われており、細胞壁合成阻害剤や L-form の誘導がない状況で、祖先株 L-form が細胞壁を再生させた状況でも L-form を維持した。これらのことから進化株は祖先株の不安定 L-form から安定型 L-form へと移行したと考えられる。

細胞膜合成遺伝子群 *accDA* を過剰発現させるための xylose を加えなかった場合に、進化株の L-form 増殖は停止し、28 時間の培養を経ても目に見えて増殖したようには見えなかった。Xylose を加えた場合はこの時点で大きく増殖していたため、進化株の L-form 増殖は *accDA* の過剰発現による細胞膜の過剰合成に依存すると考えられる。ただし、比較に用いたコントロールである xylose を加えた培地中で培養した進化株も、通常通りの増殖に比べて対数増殖期に入る前の静止期が長くなっていた。これは、xylose を除く際に遠心分離にかけたため、コントロールである xylose あり培地での培養も一度遠心分離を経た後に培養にかけられた際に、遠心分離が細胞にダメージを与え、静止期を延長させたと考えられる。また、遠心分離を

行わない場合は xylose および fosfomycin がなくとも進化株は L-form としての増殖が見られた(Fig. 9)。そのため、xylose がいない場合も増殖そのものができなくなるのではなく静止期から対数増殖期への移行が長くなったために 28 時間の培養では増殖が見られなかったと考えられる。

一方で、顕微鏡観察による細胞形状の確認と、画像解析による細胞サイズ分布の比較では、祖先株 L-form と進化株の間に大きな違いを見つけることができなかった。細胞形状は祖先株・進化株どちらも L-form によくみられる球状を呈し、また細胞サイズの比較でも有意な差はなかったが進化株が若干大きな細胞に偏っているように見えた。しかし、細胞膜と細胞内 DNA の蛍光強度による比較では祖先株は進化株に比べ細胞膜に比べ DNA 量が過剰となっている細胞が多く見られた。L-form 細胞は多核細胞となることが報告されている[10]が、進化株は細胞内に存在する染色体がより少ないコピー数で効率よく分裂ができるようになった可能性が考えられる。

本章では長期継代実験によって得られた進化株枯草菌 L-form の表現型の調査を行い、不安定型の枯草菌 L-form が増殖の速い安定型 L-form となり、細胞壁合成能力を失ったことを始めいくつかの変化が起こったことを確認した。これらの変化は不可逆的であり、UV 照射を伴う長期継代実験によって遺伝子の変異があった物

と考えられるが、この章では具体的に進化株の DNA 配列にどのような変異が起きたかまでは調査を行わなかった。

第三章 進化株の全ゲノム解析

第一節 目的

枯草菌不安定型 L-form 株 YK1694 が、長期継代によって多くの表現型の変化が見られ、特に不安定型 L-form だった祖先株が進化株では細胞壁合成能力の喪失と増殖の高速化が見られ安定型 L-form となったことが第二章で確認された。これらの変化は長期継代実験の間に枯草菌 L-form に遺伝的な変異が起こったことが原因と考えられたが、具体的にどのような遺伝子変異が起こったかは不明であった。本章では、祖先株と進化株の全ゲノムリーディングを行い、ゲノム配列を比較して、長期継代によって不安定型から安定型へ移行した際に起こった DNA 配列の変化による遺伝的変異の特定を行う。

第二節 方法

第一項 枯草菌株からのゲノム抽出

第二章に記述した方法と同様にして、祖先株 YK1694 および進化株三種 BE1771、BE1772、BE1773 の枯草菌 L-form の培養を行った。L-form 化した祖先株含むそれぞれの株は細胞壁合成阻害剤 fosfomycin および L-form を誘導する xylose を含む浸透圧調整培地 NB/MSM で二晩浸透培養をし、その後ゲノム DNA を

NucleoSpin Microbial DNA (Takara, Japan)を用いて、メーカーの説明書に従い抽出した。

第二項 全ゲノムリーディングとアライメント

抽出したゲノム DNA は DNBSEQ-G400m を用いて、2×200 bp のショットガンリーディングで配列決定された。得られた配列データを *B. subtilis* 168 reference sequence (NC_000964.3)[32]に基づいて breseq version 0.35.5[33]でアライメントと変異の抽出を行なった。

第三節 結果

第一項 全ゲノム解析の結果

祖先株および進化株のゲノムをキット抽出し、全ゲノム配列をショットガンシーケンスにより決定した。シーケンシングのサンプル量と結果については Table 1 に示す。また、全ての配列データは BioSample データベース (accessions: DRA015056)に寄託された。

B. subtilis 168 reference sequence (NC_000964.3) をリファレンス配列として、breseq でアライメントと変異の抽出を行なった。最小カバー率はすべてのデータで 100 以上であった。その上で、進化株に起こっていた変異から祖先株の時点で起

こっていたもの（補足資料 Table S1）と同義置換または非コード領域を除き、すべての進化株に起こった変異をリストアップした（Table 2）。

DNA 濃度			ライブラリー作製	
サンプル名	濃度 (ng/ul)	液量(ul)	インプット量 (ng)	サイクル数
YK1694	71.1	40	130	10
BE1771	52.3	40	130	10
BE1772	27.4	40	117	10
BE1773	57.6	40	130	10

ライブラリー濃度			シーケンシング結果			
サンプル名	濃度 (ng/ul)	液量(ul)	ペアリード数	総塩基数(bp)	$\geq Q20$ (%)	$\geq Q30$ (%)
YK1694	68.4	20	6,373,417	2,549,366,800	95.1	85.7
BE1771	79.7	20	5,782,338	2,312,935,200	95.3	86.2
BE1772	78.2	20	5,457,540	2,183,016,000	95.1	85.9
BE1773	84.5	20	5,714,340	2,285,736,000	95.5	86.7

Table 1: 全ゲノムシーケンス結果

祖先株と進化株の全ゲノムシーケンスの結果をしめす。

*配列番号は *B. subtilis* 168 reference sequence (NC_000964.3)を基にした。

BE1771				
位置*	塩基変化	アミノ酸変化	遺伝子名	推定される機能
198,863	C→A	Gln→Lys	<i>glmM</i>	ホスホグルコサミンターゼ
217,696	(A)9→7	Tyr→His	<i>ylxS</i>	
574,832	Δ1 bp	frameshift	<i>ydeO</i>	膜タンパク質
1,732,091	T→C	Tyr→His	<i>ylxS</i>	リボソーム成熟要素
2,518,076	C→A	Glu→stop	<i>spo0A</i>	芽胞形成応答因子、YlbF/YmcA/YaaT と複合しリン酸化
2,612,481	G→A	Ser→Phe	<i>pgpH</i>	c-di-AMPの分解
2,860,069	(GCTCAATA) _{1→2}	frameshift	<i>mreC</i>	細胞形状決定因子
2,953,082	G→A	Arg→Trp	<i>infC</i>	開始因子IF-3
2,985,843	C→T	Glu→Lys	<i>pyk</i>	ピルビン酸キナーゼ
3,333,034	C→T	Ser→Leu	<i>pucK</i>	尿酸パーミアーゼサブユニット
3,677,776	(T)6→7	frameshift	<i>tagF</i>	CDP-glycerol:polyglycerol phosphate glycerol-ホスホトランスフェラーゼ: テイコ酸合成
BE1772				
Position*	塩基変化	アミノ酸変化	遺伝子名	
198,863	C→A	Gln→Lys	<i>glmM</i>	ホスホグルコサミンターゼ
995,508	G→A	Glu→Lys	<i>srtA,yhcS</i>	タンパク質C末端の細胞壁への固定
1,735,986	C→T	Arg→Cys	<i>infB</i>	開始因子IF-2
2,339,758	Δ476 bp		<i>sspM+yp pC</i>	小型酸溶性芽胞タンパク質, 仮想タンパク質
2,518,716	Δ39 bp		<i>spo0A</i>	芽胞形成応答因子、YlbF/YmcA/YaaT と複合しリン酸化
2,612,407	(AAC TG) _{1→2}	frameshift	<i>pgpH</i>	c-di-AMPの分解
2,903,089	C→T	Gly→Glu	<i>gerM</i>	発芽および芽胞形成溶菌酵素
3,334,775	G→A	Asp→Asn	<i>pucM</i>	5-ヒドロキシイソレイン酸ヒドロラーゼ/ウリカーゼサブユニット
3,677,770	Δ1 bp	frameshift	<i>tagF</i>	CDP-glycerol:polyglycerol phosphate glycerol-ホスホトランスフェラーゼ: テイコ酸合成

BE1773				
Position*	塩基変化	アミノ酸変化	遺伝子名	
198,863	C→A	Gln→Lys	<i>glmM</i>	ホスホグルコサミンムターゼ
279,944	C→A	Pro→Thr	<i>ycbM</i>	二成分制御系ヒスチジンキナーゼ
832,689	G→A	Asp→Asn	<i>citT</i>	二成分制御系レギュレーター
1,159,303	C→T	Gly→Ser	<i>yizA</i>	
1,228,211	A→G	Val→Ala	<i>yjbE</i>	
1,264,528	2 bp→TG	framshift	<i>yjcM</i>	仮想タンパク質
			<i>sspM</i>	
2,339,758	Δ 476 bp	deletion	<i>+yppC</i>	
2,518,716	Δ 39 bp	deletion	<i>spo0A</i>	芽胞形成応答因子、YlbF/YmcA/YaaT と複合しリン酸化
	(AACTG) ₁			c-di-AMPの分解
2,612,407	− ₂	framshift	<i>pgpH</i>	
2,861,217	G→A	Gln→Stop	<i>mreB</i>	細胞形状決定因子
3,677,770	Δ 1 bp	framshift	<i>tagF</i>	CDP-glycerol:polyglycerol phosphate glycerol-ホスホトランスフェラーゼ：テイコ酸合成
3,682,704	G→T	Gly→Stop	<i>tagB</i>	推定：テイコ酸合成
3,888,000	T→C	Yyr→Cys	<i>spsE</i>	
4,139,065	G→A	Ser→Phe	<i>yycO</i>	

Table 2 : 進化株に入っていた変異のリスト

全ゲノムシーケンスにより祖先株から長期継代実験により進化株に入ったとみられる変異のうち、機能欠損を伴うとみられたものを抽出したものを示す。

第二項 変異の解析

進化株で起こっていた全変異のうち、進化株 (BE1771、1772、1773)には、それぞれ 15、17、22 の変異が起こっていたのが確認された。これらの変異には平均して 6.7 個の同義置換または非コード領域の変異が含まれていた。これらの変異が増殖に中立であると仮定すると、ゲノム 1 複製あたりの変異率は 0.013 (紫外線照射 57 サイクル、1 サイクルは約 9 複製)であると概算された。

祖先株 YK1694 と比較して、進化株で生じた主な変異は、細胞壁合成に直接または間接的に関与する遺伝子に多く見られた (Table 2) [34]。特に、*spo0A*[35]、*pgpH*[36]、*tagF*[37] は全ての進化系統で共通して変異しており、フレームシフトによる機能喪失も予測される遺伝子であった。*spo0A* は、生存に適さない環境への耐性を持った芽胞の形成開始に関与する遺伝子である。*pgpH* はシグナル分子である c-di-AMP[38]を分解することで細胞壁合成の制御に関与している[36]。さらに *pgpH* は c-di-AMP を通じて細胞壁合成に深く関係する遺伝子 *glmM* と密接にかかわっている[21][36][39]。進化株においては *glmM* 遺伝子もすべての系で点変異を起こしていたが、その変異による機能の変化については不明である。最も興味深いのは *tagF* 遺伝子である。本遺伝子はテイコ酸合成に関与しており、その機能の欠損はテイコ酸の正常な合成を阻害すると考えられ、また *tagF* は先行研究においては生存に必須とされていた[34]。

一部の進化株には興味深い変異が見られたものもあった。BE1771 には 2,152,046 から 134,402 bp の欠落が起こっている (Table S3)。この欠落領域は SP β プロファージ領域であり、DNA 損傷による応答もしくは芽胞形成時の親細胞で切り出しが起こる[40]。どちらの場合も切り出しが起こった細胞は溶菌するため、SP β 領域が欠失した状態は通常維持されないが、BE1771 ではそれが起こっていた。また SP β 領域が切り出されると、それによって分割されていた *spsM* 遺伝子が構成される[41]。胞子多糖合成遺伝子である *spsM* は芽胞形成の際に SP β の切り出しにより発現する。しかし BE1771 は芽胞形成因子である *spo0A* が欠損しているため芽胞形成は行われず、したがって *spsM* が働くことはない。ただしこれら一連の変異が BE1771 株の増殖に与える影響は不明である。また必須遺伝子である細胞形状決定因子 *mreB*、*mreC* の変異、BE1773 株では *tagF* と同様にテイコ酸合成に関わる必須遺伝子 *tagB* の変異も見られたが、これらの遺伝子は細胞壁でおおわれた細胞の形状を決定する因子であるため、細胞壁を欠き不定形状で生存可能な L-form では必要がなく、よって欠損しても生存が可能になった可能性がある。

第四節 考察

本章では長期継代実験によって得られた安定型枯草菌 L-form が、祖先株の不安定型 L-form からどのような遺伝子の変異が起こっているかの調査のために全ゲノ

ム解析を行った。祖先株および進化株からゲノムを抽出し、次世代シーケンサを用いて全ゲノムのショットガンシーケンスを行い、変異を解析によって抽出し比較調査した。その結果、祖先株から進化株までの間に複数の変異が確認された。

変異が起こっていた遺伝子の多くは細胞壁と何かしらの関係のある遺伝子が特に多く目立っていた。主に細胞壁の生合成や、細胞壁に基づく細胞形状決定などに関与する必須遺伝子の変異も見られた。枯草菌における細胞壁合成経路の図説を Fig. 11 に示す。また注目すべき点として、三つの実験系すべてで共通して機能欠損しているとみられる変異、*spo0A*、*pgpH*、*tagF*が存在していた。まず *spo0A* は芽胞形成に関与する遺伝子の中では形成の開始にかかわる遺伝子として知られており、枯草菌がこの遺伝子を欠損した場合芽胞の形成を行わなくなる。芽胞は細胞の生存に適さない環境への耐性を持っているが、長期継代実験系では安定して生存できる環境が維持されるため、芽胞を形成する必要がないために欠損したと考えられる。次に *pgpH* はシグナル分子である c-di-AMP を分解する機能を持っている。*pgpH* が欠損した場合、細胞内では c-di-AMP の分解に支障をきたし、細胞内での濃度が過剰になるが、通常の細胞壁に覆われた細胞の場合、細胞壁合成に異常をきたし、異常な細胞形状となったのちに溶菌することが知られている[36]。しかし、L-form で生存していく場合には c-di-AMP が過剰となっても長期の生存が可能になっていると推測される。あるいは、同じく c-di-AMP を介して細胞壁の構成成分

であるペプチドグリカンとテイコ酸の前駆体合成に関与する *glmM* もまたすべての実験系で変異が起きていたため、何らかの関与が疑われる。ただし、*glmM* の変異は三つの実験系すべてにおいて全く同じ点変異であり、機能欠損までが起こっていたかは疑わしいものがある。

三つの実験系すべてにおいて変異が起こっていた遺伝子の中で特に興味深いのが *tagF* 遺伝子の変異である。枯草菌の細胞壁はペプチドグリカンのほかにテイコ酸が重要な要素としてあり、その生合成に関与する *tag* 遺伝子群の一つが *tagF* である (Fig. 11-B)。テイコ酸の生合成経路において、*tagF* は一連の合成経路の後方に位置している。先行研究では *tagF* は機能欠損が致命的となる必須遺伝子とされ、また細胞壁合成経路上に存在しているために、その欠損は枯草菌から細胞壁合成能力を失わせ、L-form を安定化させる可能性が考えられた。

BE1771 に起こっていた SP β プロファージ領域は、DNA 損傷による応答もしくは芽胞形成時の芽胞母細胞で切り出しが起こることが知られている[40]。どちらの場合も切り出しが起こった細胞はその後分裂することなく溶菌するため、SP β 領域が欠失した状態は通常維持されないが、BE1771 ではそれが起こっていた。また SP β 領域が切り出されると、それによって分割されていた *spsM* 遺伝子が再構成される[41]。孢子多糖合成遺伝子である *spsM* は芽胞形成の際に SP β の切り出しにより発現する。しかし BE1771 は芽胞形成因子である *spo0A* が欠損している。そのため

spsM が働くことはないと考えられる。ただしこれら一連の変異が BE1771 株の増殖に与える影響は不明である。

これらの変異の多くは、細胞壁のない **L-form** での長期の継代を経る中で、生存に不要なために欠損していったものと考えられる。あるいは、これらの変異の一部は、細胞壁合成に必要なエネルギーと材料を節約することで、**L-form** の速い増殖速度に寄与するために起こった可能性がある。また、今回発生した変異の中には、祖先株の細胞壁合成能力を失わせ、または増殖速度を向上させることで、不安定型であった **L-form** が安定型に移行する要因となった変異も含まれているはずである。特に、全ての系で共通して見られた細胞壁合成能力の喪失の原因として、同じくすべての系で共通して機能欠損とみられる変異が起きていた、細胞壁合成に関与する *pgpH*、*tagF* 遺伝子が関与していることが想定された。しかしながら本章では、進化株でみられた表現型の変化の一部について原因と推定される遺伝子の欠損とみられる変異は確認することができたものの、実際にその遺伝子の欠損が表現型の変化を引き起こしているかどうかについては不明なままである。

また興味深いことに、本研究で用いた進化株を得るために行われた長期継代実験で使用した細胞壁合成阻害剤 fosfomycin が標的にする、ペプチドグリカン合成経路を構成する *mur* 遺伝子群には変異が起こっていなかった。

本章では近年急速に技術が発達し、安価で行えるようになった全ゲノム解析を用いた解析を行った。**L-form** の研究は古くから行われていたものの、2000 年代に入ってから研究が減っており、こうした新しい手法による解析はいまだ多くない。本研究のように古くから知られている現象の遺伝的解析を行っていく方法は新たな発見につながっていく可能性がある。

今回得た祖先株および進化株三種の全ゲノムシーケンスデータは **DDBJ Biosample** データベースに寄託し、公開されている（アクセッション番号：**DRA015056**）。

とテイコ酸の合成が起こるが、本研究で用いた細胞壁合成阻害剤 fosfomycin はペプチドグリカン合成に関係する *mur* 遺伝子群の働きを阻害する。一方テイコ酸の合成に関係するのが *tag* 遺伝子群である。

B) テイコ酸合成経路の図説。進化株で共通して変異が起こっていた *tagF* 遺伝子はペプチドグリカンと合成される前の重合反応に関連する。

第四章 遺伝子ノックアウト株の作成と解析

第一節 目的

長期継代実験により得られた進化株について、増殖速度が向上し、細胞壁合成能力が失われていることから安定型 **L-form** に移行したとわかった。また、進化株について祖先株とともに全ゲノムシーケンスを行い、遺伝子解析を行った結果、安定型へ移行した進化株に複数の遺伝子変異が起こっていたことが確認された。特に、*spo0A*、*pgpH*、*tagF* の三つの遺伝子はすべての実験系で共通して機能欠損を伴うとみられる変異が起こっていたため、安定型 **L-form** に見られる細胞壁合成能力の喪失や増殖速度の向上に関係していることが予想された。しかし、実際にその遺伝子の機能欠損が **L-form** の安定化を引き起こすかは不明である。また、全ての実験系に共通して、同じ点変異が起こっていた *glmM* も細胞壁合成遺伝子の一つであったため関与が疑われた。この章では、全ての実験系統で共通して変異が起きていた遺伝子に狙いを絞って、祖先株からその遺伝子を破壊した遺伝子ノックアウト株を作成した。ノックアウト株の解析により、安定型への移行を引き起こす、すなわち欠損によって細胞壁合成能力の喪失または増殖速度の向上を引き起こす遺伝子を突き止めることを目的として実験を行った。

第二節 方法

第一項 ノックアウト株の作成

三章で確認された遺伝子変異のうち、本研究では全ての進化株で共通して変異していた遺伝子のノックアウトを試みた。4つの遺伝子、*glmM*、*spo0A*、*pgpH*、*tagF* について4種類のノックアウト株の作成を行った。ノックアウト株は以下のように作成した。レシピエント株として祖先株 YK1694 を使用した。枯草菌は細胞外の DNA を取り込む能力に優れ、複製開始起点がない DNA を取り込んだ場合には枯草菌ゲノム内から相同配列を検索し、相同配列部分で交差組み換えを起こす自然形質転換能力をもつ。この性質を利用し、枯草菌内のノックアウトしたい遺伝子の前後の、約 1 kbp の相同配列とそれに挟まれるように抗生物質耐性遺伝子を持つ DNA 断片を作成し、枯草菌の自然形質転換能力によって標的遺伝子を抗生物質耐性遺伝子に組み替える手法を用いた (Fig. 12)。

本研究で使用した枯草菌株および PCR プライマーを Table 3 に示す。枯草菌の自然形質転換の初めのステップとして、遺伝子組み換え用の DNA 断片を作成した。DNA 断片の作成は二段階の PCR によって行った。二段階 PCR による DNA 断片の作成について概要を Fig. 13-A に記す。テンプレート DNA として、前後 1 kbp ずつの相同領域は祖先株 YK1694 抽出ゲノム (抽出手順は第三章に記載)、抗生物質耐性遺伝子は BKE 遺伝子破壊株である BKE24220 (Table S1) よりエリスロマイ

シン耐性遺伝子を使用した。PCR プライマーは、標的遺伝子の前後約 1 kbp の相同領域と Em 耐性遺伝子を増幅し、また 5'側の相同領域の 3'末端と Em 耐性遺伝子の 5'末端、及び Em 耐性遺伝子の 3'側末端と 3'側相同領域の 5'末端が、それぞれ相補になるような 20 bp 前後の長さの追加配列ができるように設計された (Table 4-A)。ノックアウトが成功した場合、それぞれの遺伝子のうち欠損する箇所はアミノ酸番号で(欠失箇所 / 全アミノ酸数)として、*glmM*は (129 ~ 255 / 448)、*spo0A*は (19 ~ 184 / 267)、*pgpH*は (166 ~ 477 / 711)、*tagF*は (452 ~ 703 / 746)となる。一段階目の PCR として、各遺伝子の前後の相同領域と Em 耐性遺伝子を別々に PCR を行い、PCR 産物を得た (Fig. 13-B)。それぞれの PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)により精製され、DNA 断片を得た (Table 4-B)。二段階目の PCR (Fig. 13-A)は各遺伝子ごとに、前後の相同領域と Em 耐性遺伝子を混合し、5'側相同領域の増幅に用いた F プライマーと、3'側相同領域の増幅に用いた R プライマーで各 DNA 断片を挟み込むようにして PCR を行うことで断片を結合させるために行う。二段階目の PCR の産物 (Fig. 13-C)を再度 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)により精製し、形質転換に用いた。それぞれの PCR 反応には MiniAmp サーマルサイクラー (Applied Biosystems technology)を使用し、DNA ポリメラーゼに PrimeSTAR® HS (Takara)を用いた。

二段階 PCR により作成した DNA 断片を用い、祖先株をレシピエント細胞とし

て自然形質転換法による遺伝子組み換えを行った。グリセロールストックから固体 LB 培地上に起こした祖先株の単コロニーを液体 LB 培地中で振盪培養してプレカルチャーを作成した。3 mL の C-I 培地 (2 mg/mL (NH₄)SO₄, 14 mg/mL K₂HPO₄, 6 mg/mL KH₂PO₄, 1 mg/mL クエン酸ナトリウム、5 mg/mL D-glucose、0.1 mg/mL MgSO₄, 0.05% Yeast Extract、0.02% Casamino acid、50 µg/mL L-Trp) にプレカルチャーを 30 µl 加え、37 °C、160 rpm、6 h 浸透培養した。培養物を 250 µL、1.5 mL チューブに分注し、6 k×g、3min で遠心分離し、上澄みを捨てた。次いで 500 µL の C-II 培地 (2 mg/mL (NH₄)SO₄, 14 mg/mL K₂HPO₄, 6 mg/mL KH₂PO₄, 1 mg/mL クエン酸ナトリウム、5 mg/mL D-glucose、0.1 mg/mL MgSO₄, 0.001% Yeast Extract、0.01% Casamino acid、50 µg/mL L-Trp) で懸濁し、37 °C で 40 分間静置した。その後 1.5 mL チューブに 100 µL ずつ分注し、それぞれ DNA 断片を 10 µL 加え、37°C で二時間静置した。細胞壁が合成されなくなる可能性を考え、形質転換後のサンプルは浸透圧調整がされた固体 NB/MSM 培地、または固体 PR19 培地 (0.8% agar) 上に塗布し、コロニーが形成されるまで 30 °C で培養した。

形成されたコロニーが実際に遺伝子組み換えが起こったかの評価は PCR 産物の制限酵素処理と電気泳動によって行った。最終的に得られた *spo0A*, *pgpH*, *tagF* のノックアウト株をそれぞれ BLD11、BLD12、BLD13 とし、グリセロールストックを作成した。

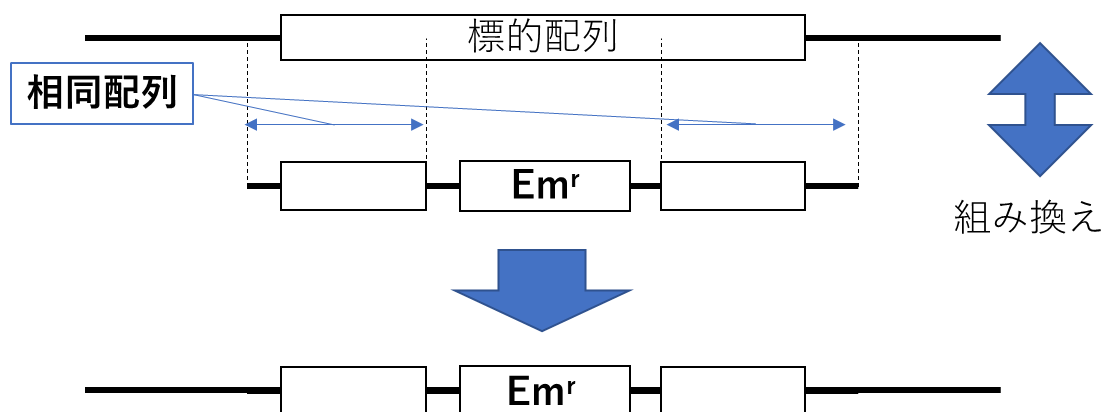


Fig. 12：自然形質転換法の概要

枯草菌は細胞外の DNA を菌体内に取り込み、ゲノムと相同配列がある場合は相同組み換えを起こす能力がある。この性質を利用し、ノックアウトしたい遺伝子の前後約 1 kbp の相同配列に抗生物質耐性遺伝子（本研究では Em 耐性を用いた）をもつ DNA 断片をあらかじめ用意し、枯草菌に取り込ませ相同組み換えを起こさせることでノックアウトを行った。

A

プライマー名	配列
210630_BKE_erm_plusF	AGTGCCACCTGACGTCTAAGGAGGGAGGAAAGGCAGGATACC
210630_BKE_erm_plusR	ACCTCTTTAGCTCCTTGAAGCTGCGCGTATCTGTGCTCTCTCTA
210604_glmM_des_FF	GATGTAACGGCTAAAGGCTCTC
210604_glmM_des_FR_erm	CTTAGACGTCAGGTGGCACTGCTCAATTTAGCCTCCTGTTC
210604_glmM_des_RF_erm	CAGCTTCCAAGGAGCTAAAGAGGTGTAGACGGCGACCAAATCATGT
210604_glmM_des_RR	CCCATTTCTGACCGGACGACTT
210604_spo0A_des_FF	GTGAACACACAAGGCTGGGTGC
210604_spo0A_des_FR_erm	CTTAGACGTCAGGTGGCACTGACATCGAATTGCTCGGCAGCA
210604_spo0A_des_RF_erm	CAGCTTCCAAGGAGCTAAAGAGGTTTAAACAGGCTTACCAGCTCTCG
210604_spo0A_des_RR	GGCGCGATTTTCTCAGAACGC
210604_pg pH_des_FF	CTACAAGGAAGCCGCAAATGAG
210604_pg pH_des_FR_erm	CTTAGACGTCAGGTGGCACTCATGAGGCTGCTCGAGCTGTCT
210604_pg pH_des_RF_erm	CAGCTTCCAAGGAGCTAAAGAGGTGTCTTCACTGTCTGCTTTCAGC
210604_pg pH_des_RR	CCGCTGTATGACGCTCTCCATG
210604_tagF_des_FF	CAAAAGTCTTGTTACGGCCTGC
210604_tagF_des_FR_erm	CTTAGACGTCAGGTGGCACTCTATCAAGCAGATCTCATCGCC
210604_tagF_des_RF_erm	CAGCTTCCAAGGAGCTAAAGAGGTCCCAATACTCAGCTCTTGCCAT
210604_tagF_des_RR	GGAACGGAATCTGAATTTCCGC

B

断片名	Fw プライマー	Rv プライマー	テンプレート
PCR Em +	210630_BKE_erm_plusF	210630_BKE_erm_plusR	BKE24220 genome
PCR glmM F	210604_glmM_des_FF	210604_glmM_des_FR_erm	BKE24220 genome
PCR glmM R	210604_glmM_des_RF_erm	210604_glmM_des_RR	BKE24220 genome
PCR spo0A F	210604_spo0A_des_FF	210604_spo0A_des_FR_erm	YK1694 genome
PCR spo0A R	210604_spo0A_des_RF_erm	210604_spo0A_des_RR	YK1694 genome
PCR pgpH F	210604_pgpH_des_FF	210604_pgpH_des_FR_erm	BKE24220 genome
PCR pgpH R	210604_pgpH_des_RF_erm	210604_pgpH_des_RR	BKE24220 genome
PCR tagF F	210604_tagF_des_FF	210604_tagF_des_FR_erm	BKE24220 genome
PCR tagF R	210604_tagF_des_RF_erm	210604_tagF_des_RR	BKE24220 genome
PCR glmM Dis	210604_glmM_des_FF	210604_glmM_des_RR	PCR glmM F, PCR Em +, PCR glmM R
PCR spo0A Dis	210604_spo0A_des_FF	210604_spo0A_des_RR	PCR spo0A F, PCR Em +, PCR spo0A R
PCR pgpH Dis	210604_pgpH_des_FF	210604_pgpH_des_RR	PCR pgpH F, PCR Em +, PCR pgpH R
PCR tagF Dis	210604_tagF_des_FF	210604_tagF_des_RR	PCR tagF F, PCR Em +, PCR tagF R

C

断片名	対応する略称
PCR Em +	Em
PCR glmM F	gF
PCR glmM R	gR
PCR spo0A F	sF
PCR spo0A R	sR
PCR pgpH F	pF
PCR pgpH R	pR
PCR tagF F	tF
PCR tagF R	tR
PCR glmM Dis	gD
PCR spo0A Dis	sD
PCR pgpH Dis	pD
PCR tagF Dis	tD

Table 4: 使用したプライマーと DNA 断片のリスト

A) 使用したプライマー名。B) 使用した DNA 断片及びその増幅のための PCR に使用した A のリストに表記されているプライマーの組み合わせ。C) 次図 (Fig. 13-B、C) で表記されている DNA 断片の略称と本 Table の B に挙げられている DNA 断片との対応表。

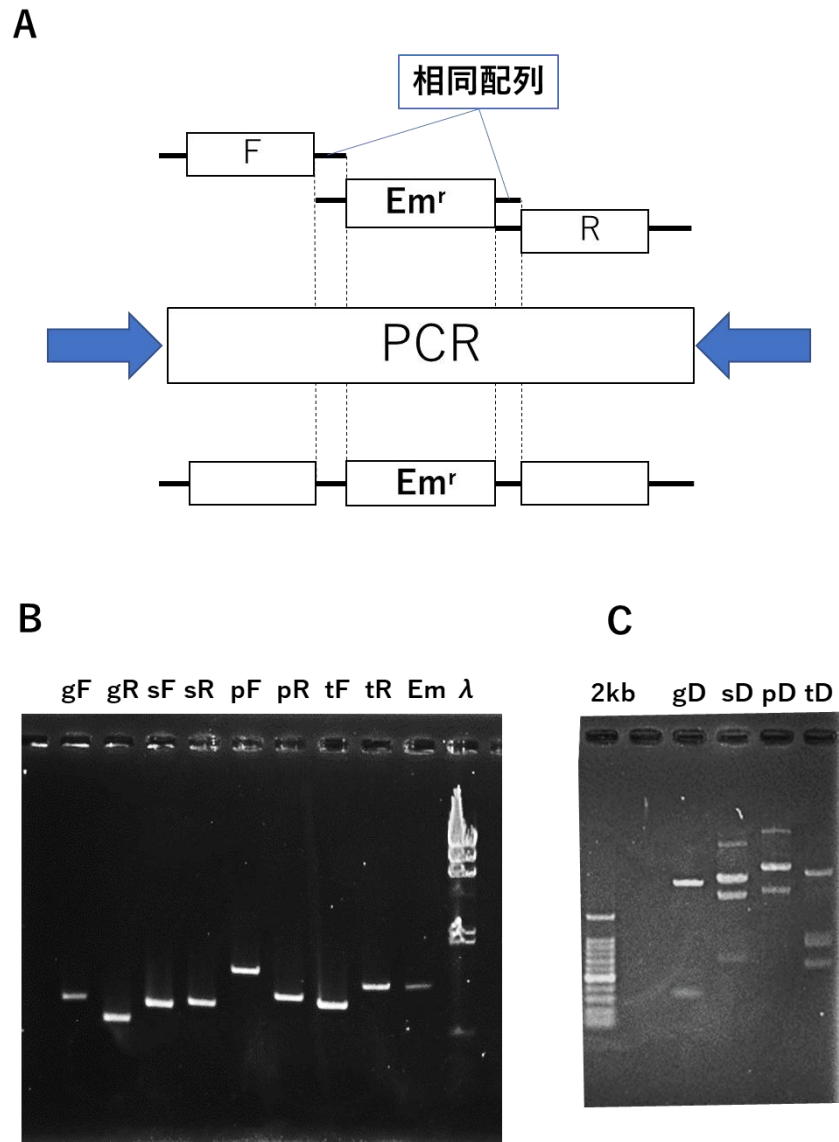


Fig. 13 : DNA 断片の作成手順

A) 作成手順の模式図。一段階目の PCR で前後の相同配列 (F、R) と Em 耐性遺伝子配列を別々に増幅する。このとき、それぞれの断片を二段階目で結合させる『のりしろ』の役割を果たす約 20 bp ほどの長さの相補な配列ができるようにプライマーを設計する。

B) 一段階目の PCR 後に各断片ができているかの評価のため行った電気泳動の写真。各レーンの DNA 断片の内容は略称で表記され、対応する DNA 断片は前頁の Table 4-C に記載。λ のレーンはサイズ確認用の λHindIII ラダーである。

C) 二段階目の PCR 後に結合した DNA 断片の電気泳動像。一番左 (2kb) が 2000 bp ラダー (Takara) であり、それ以外のレーンは前頁の Table 4-C に記載された DNA 断片と対応する略称で示されている。

第二項 ノックアウト株の L-form 培養方法

第一項で得られたノックアウト株 BLD11、12、13 および比較用の祖先株 YK1694 について、L-form を作成した。祖先株と BLD11 および BLD12 については、L-form の培養は第二章に記述した祖先株の L-form 培養方法と同様だった。主に NB/MSM 培地を使用した。6.5 mg/mL nutrient broth (NB、Oxoid)、20 mM MgCl₂、0.5 M sucrose、and 20 mM maleic acid (pH 7) [10]。また特に記述がない限り培地には適宜 *accDA* を発現させるための xylose を 0.5%、細胞壁合成を抑制するための fosfomycin を 0.15 mg/mL となるよう添加した。枯草菌株はグリセロールストックから固体 LB 培地上に塗布し、形成された 1 コロニーを xylose および fosfomycin を含む 3 mL の NB/MSM 培地に接種し 160 rpm で浸透しながら 30 °C で 2 晩培養し L-form にした。*tagF*破壊株である BLD13 は LB 培地中では生育しなかったため、進化株の培養と同様の方法で L-form の培養を行った。グリセロールストックから xylose および fosfomycin を含む 3 mL の NB/MSM 培地に直接接種し 160 rpm で振盪しながら 30 °C で培養した。祖先株 L-form およびノックアウト株 3 種を 2 晩培養しプレカルチャーを作成した。培養には試験管 (AS ONE、15 mL Culture tube 34184015D、Japan)を用いた。

第三項 増殖速度の測定と顕微鏡観察

祖先株 L-form およびノックアウト株 3 種のプレカルチャーを作成し、OD₆₆₀ を計測した。新しい NB/MSM 培地に OD₆₆₀ $\doteq$ 0.02、液量 3 mL となるように希釈し、OD₆₆₀ を記録した。その後は通常の培養条件に従って培養し、8 時間目から 2 時間ごとに OD₆₆₀ の測定を行った。基本的に NB/MSM 培地には xylose 及び fosfomycin が含まれていたが、後にどちらも含まない NB/MSM での増殖も計測し比較を行った。培養と計測は N = 3 で行った。OD₆₆₀ の測定は Mini photo 518R (TAITEC、Japan)で行った。

OD₆₆₀ が 0.1 の対数増殖期にアリコートを 500 μ L 取り、2000 $\times g$ 、10 min、4 $^{\circ}$ C で細胞を集め、20 μ L の SMM (0.5 M sucrose、0.02 M maleate buffer [pH 6.4]、0.02 M magnesium chloride) で懸濁後に FM4-64 (Invitrogen)で細胞膜を染色した。染色後の細胞を共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP8)で観察し、画像を取得した。取得した画像から ImageJ で細胞サイズを計測した。細胞壁合成能力の調査のために、fosfomycin と xylose を含まない培地での培養を行った。細胞壁欠損状態となった細菌の細胞壁再生を促す培地 PR19 中で各 L-form 細胞を培養した。培養後の細胞を FM4-64 (Invitrogen)で細胞膜を染色し顕微鏡で観察した。

第四項 *tagF* ノックアウト株の細胞壁合成能力

細胞壁合成能力が失われていることが疑われた *tagF* 破壊株 BLD13 について、実際に細胞壁が合成されていないことを明らかにするために細胞壁を染色して顕微鏡観察を行った。BLD13 のプレカルチャーを作成し、細胞壁合成阻害剤 fosfomycin、L-form を誘導する xylose をともに含まない NB/MSM 培地 3 mL に 30 μ L 加えた。コントロールとして液体 LB 培地で培養した祖先株 YK1694 と fosfomycin と xylose をともに含む NB/MSM 培地で培養した祖先株 L-form を準備した。2 晩の培養後に細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンを染色する Alexa Fluor 488 Conjugate (WGA、Invitrogen) を先行研究[42]の方法に従って使用し細胞壁を染色した。染色後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

同時に、浸透圧調整のない培地中での生存ができるかについても調査した。通常の LB 培地、またはコントロールの NB/MSM 培地それぞれ 3 mL に BLD13 のプレカルチャーを 30 μ L 加え、OD₆₆₀ を計測した後に 160 rpm で振盪しながら 30 °C で培養した。48 時間後に再度 OD₆₆₀ を計測した。

第三節 結果

第一項 ノックアウト株の作成

本研究では進化株に共通して変異が起こっていた 4 つの遺伝子(*glmM*、*spo0A*、*pgpH*、*tagF*)について、枯草菌の自然形質転換能力を用いた二段階飢餓法による遺伝子ノックアウトを試みた。すべてのサンプルは標的遺伝子と置き換わるように導入される Em 耐性遺伝子を利用し、浸透圧調整された固体 NB/MSM 培地上で Em で選択された。*spo0A* 及び *pgpH* のノックアウト株とみられるコロニーは得られたが、*glmM* 及び *tagF* のノックアウト株は得られなかったため形質転換後の選択培地として細胞壁再生用培地である固体 PR19 培地に Em を加えたものも使用して実験を繰り返したところ、*tagF* ノックアウト株が得られた。このとき、*tagF* ノックアウト株の細胞形状を顕微鏡で確認したところ、細胞壁合成阻害剤 fosfomycin および L-form を誘導する xylose を含まない培地であるにもかかわらず L-form に見られる球形の細胞が見られた。また、コロニー形成までに約 3-4 日を要し、成長が遅いことが考えられた。しかし、*glmM* ノックアウト株はこれらの試行の後も得ることができず、*glmM* のノックアウトは浸透圧調整環境下であっても致死的であると考えられた。得られた 3 つのノックアウト株は PCR とその産物の制限酵素処理および電気泳動によって確認された。最終的に得られた *spo0A*、*pgpH*、*tagF* それぞれのノックアウト株を順に BLD11、BLD12、BLD13 とした。

第二項 ノックアウト株の増殖速度比較

作成したノックアウト株 BLD11、12、13 について、遺伝子のノックアウトが L-form 増殖に与える影響の調査を行った。まず各ノックアウト株と祖先株の L-form を fosfomycin および xylose 存在下で増殖速度を計測した (N = 3)。その結果、全てのノックアウト株の L-form 増殖速度は祖先株と同程度であり (Fig. 14)、3 つの各遺伝子の破壊は L-form の増殖の高速化に寄与しないことが示された。対数増殖期の細胞を染色し、ImageJ を使用した画像解析、並びに蛍光顕微鏡による細胞形状の観察によるサイズ分布 (Fig. 15) の比較も、ノックアウト株ではサイズ分布がわずかに広がったことが見られたものの、どれも祖先株とノックアウト株の間に有意な差はなかった。各細胞の直径の平均は祖先株 : 1.4 (μm)、BLD11 : 1.5 (μm)、BLD12 : 1.4 (μm)、BLD13 : 1.6 (μm) であった。このことは、進化株に共通して変異していた遺伝子のうち、生存可能な単一の遺伝子のノックアウトは、L-form 増殖に関してはその速度を始め大きな影響を及ぼさないということを示唆している。

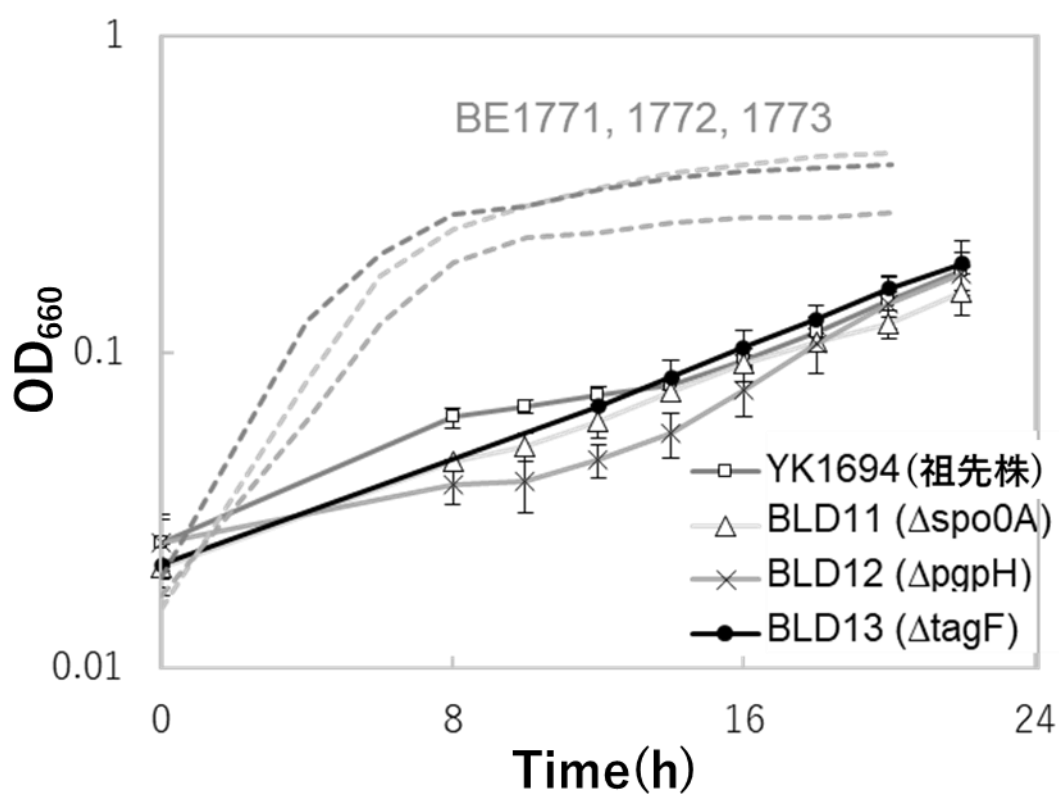


Fig. 14: ノックアウト株の増加曲線

祖先株と進化株の L-form での成長曲線。第二節第二項に記載したように、菌株は細胞壁合成を阻害する fosfomycin と細胞膜合成遺伝子群 *accDA* を発現させる xylose を加えた NB/MSM 培地で、穏やかに振盪しながら 30°C で培養した。N=3 でありエラーバーは標準誤差を表す。また図中には点線で Fig. 6-A で示した進化株の増加曲線も参考を示してある。

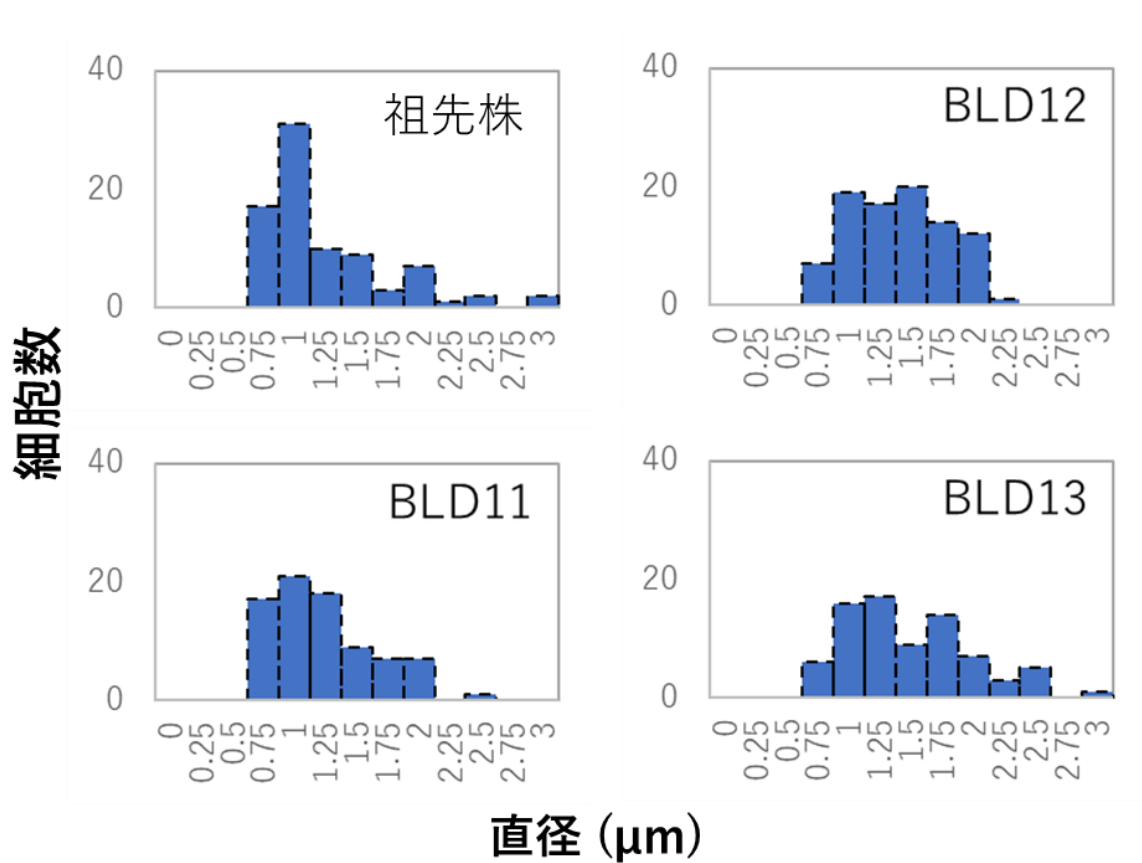


Fig. 15： ノックアウト株の細胞サイズ分布

祖先株およびノックアウト株について、細胞壁合成を阻害する fosfomycin、および *accDA* を誘導する xylose 存在下での対数増殖期 ($\text{OD}_{660} = 0.1$)の細胞 100 個を顕微鏡で確認し、ImageJ を用いて画像解析を行った。

第三項 *tagF* ノックアウト株の細胞壁合成能力の調査

ノックアウト株の細胞壁合成能力の調査のために、細胞壁合成阻害剤 fosfomycin および L-form を誘導する xylose を含まない、細胞壁欠損状態となった細菌の細胞壁再生を促す培地 PR19 中で各 L-form 細胞を培養した。BLD11 および BLD12 株は棒状の細胞に変化したが、*tagF* 破壊株である BLD13 は球状の細胞のままであり、*tagF* の機能欠損が正常な細胞壁合成能力を失わせる可能性が示された (Fig. 16)。そこで、細胞膜を染色する FM4-64 のほかに、細胞壁能構成成分であるペプチドグリカンを染色する WGA を使用し、細胞壁が失われているかを確認した。その結果、*tagF* ノックアウト細胞には細胞上の一部にしか WGA 蛍光を確認できず、細胞壁の合成が正常にできていないことが確認された (Fig. 17)。この結果は、*tagF* 遺伝子の欠損により安定型 L-form と同様の細胞壁合成能力を喪失した状態になったことを示唆している。

同時に、浸透圧調整のない培地中での生存ができるかについても調査した。通常の LB 培地、またはコントロールの NB/MSM 培地それぞれで、fosfomycin または xylose の存在の有無での変化も含めて培養による確認を行った。48 時間の培養の後に、浸透圧調整のある NB/MSM 培地では、fosfomycin の有無にかかわらず xylose を含む場合は増殖し、また過剰な膜合成を誘導し L-form の分裂を促す xylose を含まない場合は増殖していない状態だったが、浸透圧調整のない LB 培地では

fosfomycin と xylose の有無にかかわらず OD₆₆₀ の値は有意に減少し、BLD13 株の増殖は見られなかった (Fig. 18)。これは、浸透圧を調整しない LB 培地では溶菌を起こし生存できなかったために OD 値の現象が起こったものと考えられる。これらのことから、*tagF* ノックアウト株は細胞壁を合成できず、安定型 L-form と同様に細胞壁合成能力が失われた状態になることが確認された。

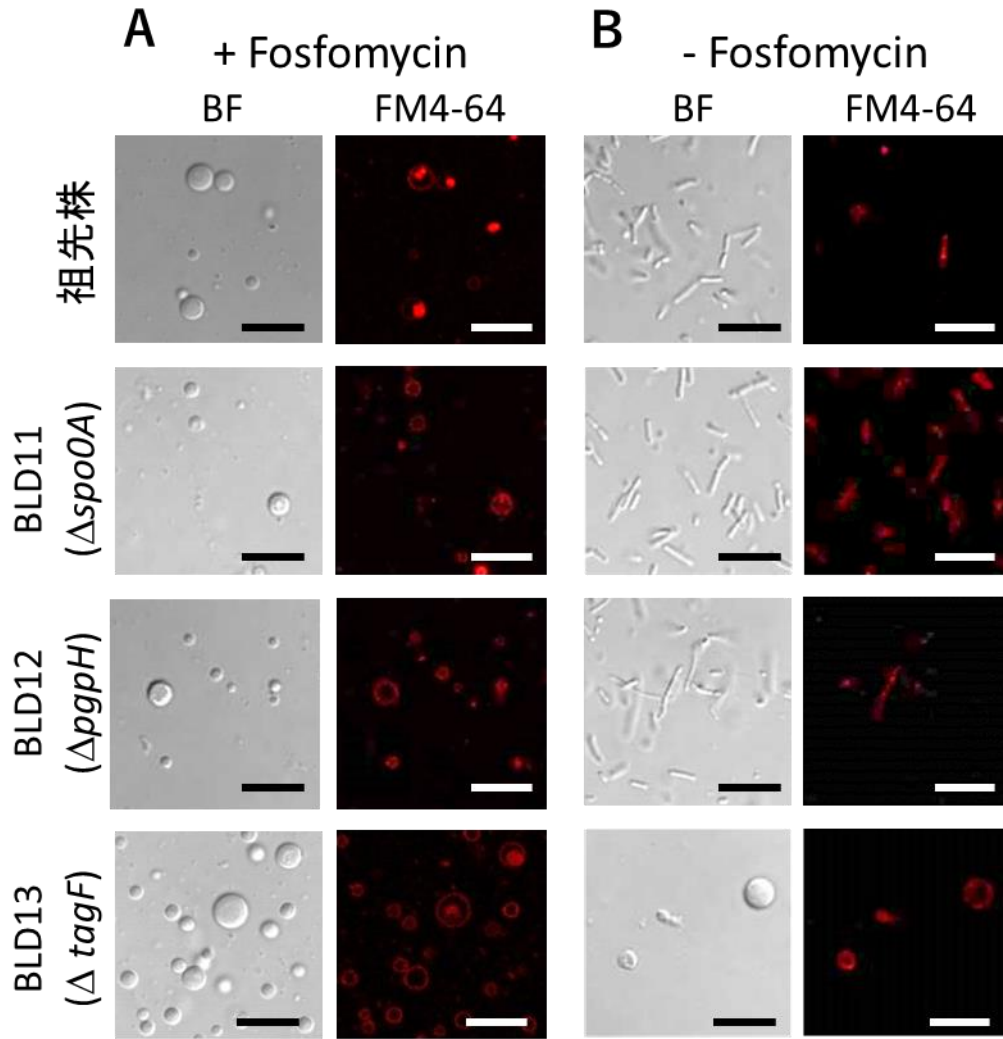


Fig. 16：細胞形状の顕微鏡観察

細胞壁合成を阻害する fosfomycin、および *accDA* を誘導する xylose 存在下での細胞形状。明視野 (BF)画像と、細胞膜を染色する FM4-64 の蛍光を示す。A) fosfomycin および xylose 存在下での細胞形状。細胞は L-form とみられる球形を示している。B) fosfomycin および xylose 非存在下での細胞形状。祖先株と BLD11、12 は細胞壁を合成し桿菌の形状に復帰したが、*tagF* ノックアウト株 BLD13 は球形を示し、L-form のままの可能性が考えられた。スケールバーは 10 μm である。

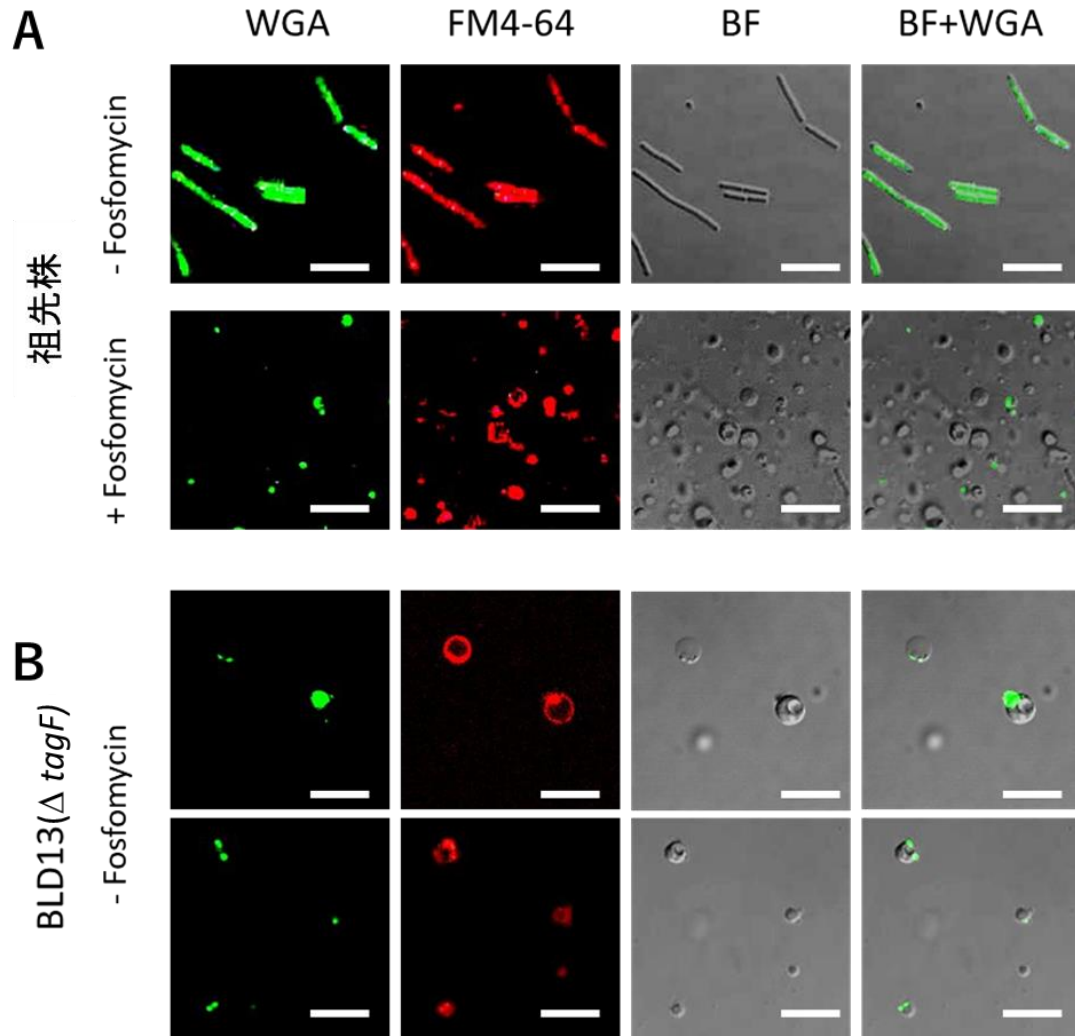


Fig. 17 : 細胞壁染色した *tagF* ノックアウト株の顕微鏡観察

細胞壁を染色する WGA を用い、fosfomycin、および xylose 非存在下での細胞の蛍光顕微鏡画像。左から順に細胞壁を染色する WGA の蛍光、細胞膜を染色する FM4-64 の蛍光、明視野 (BF) 画像、を示す。A) 祖先株の細胞形状。fosfomycin および xylose 存在下では細胞は棒状となり、その全体を WGA の蛍光が覆っている。Fosfomycin 存在下では細胞は L-form の球形を示し、WGA の蛍光は細胞表面の一部にしか見られない。B) fosfomycin および xylose 非存在下での BLD13 株の細胞形状。L-form とみられる球形を示し、WGA 蛍光は祖先株 L-form と同様に細胞表面の一部にのみ確認できる。スケールバーは 10 μm である。

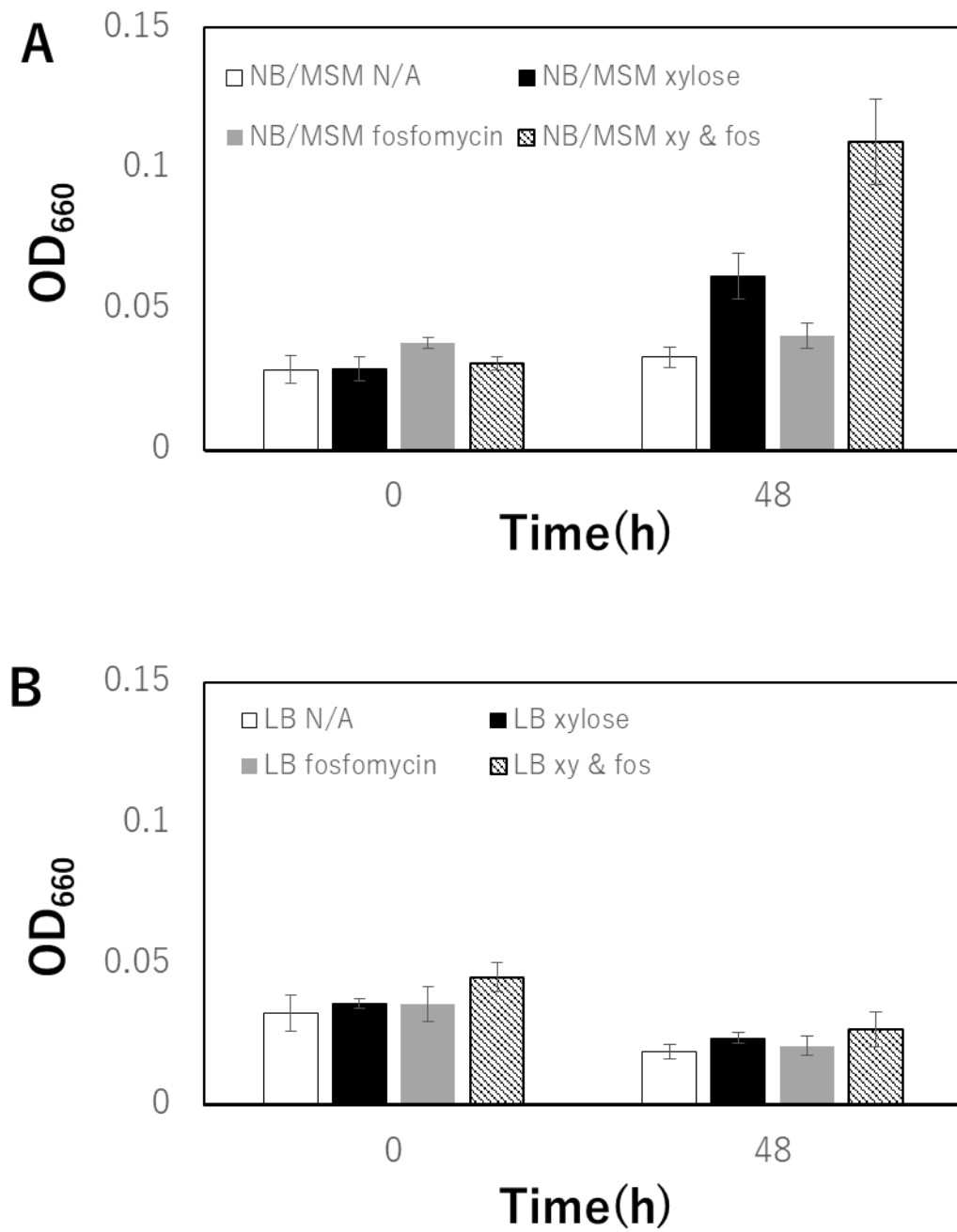


Fig. 18 : LB 培地中の *tagF* ノックアウト株の増殖

A) 浸透圧調整培地 NB/MSM 中の *tagF* ノックアウト株 BLD13 の OD₆₆₀ 値の変化。B) 浸透圧調整をしない LB 培地での OD₆₆₀ の変化。N = 3 でエラーバーは標準誤差を示す。

第四節 考察

本研究では進化株で共通して変異がみられた遺伝子のノックアウト株を作成し、その表現型を調査することで進化株が示した **L-form** の不安定型から安定型への移行による表現型の変化を説明することを目指し、その一部に成功した。不安定型 **L-form** が安定型へと移行する際に、大きく分けて増殖速度の向上と細胞壁合成能力の喪失という二つの変化がみられた。このうち、細胞壁合成能力の喪失は、少なくとも *tagF* の機能欠損により説明ができることが判明した。一方で増殖速度の向上に関しては、*tagF* 含む単一の遺伝子の欠損では **L-form** の増殖速度を向上させる効果はないことが判明した。このことは、今回の進化株のケースでは、**L-form** が不安定型から安定型へと移行する際に、細胞壁合成能力の喪失と増殖速度の向上は別々の要因によるものであり、細胞壁合成能力を失うこと自体が増殖速度を向上させているわけではないということを示している。

今回ノックアウトに成功した遺伝子 *tagF* は先行研究ではノックアウトが致命的な必須遺伝子であると報告されていた[34][43]。しかし、*tagF* ノックアウト株は細胞壁合成能力を欠損するため、本研究で用いた NB/MSM や PR19 のような浸透圧調整培地を必要とすることが考えられる。このため、先行研究で報告された LB 培地中での *tagF* 遺伝子は必須遺伝子として働くことは合理的であると考えられる。

また、ペプチドグリカン合成系は無傷でありながら、テイコ酸合成経路の停止のみで枯草菌の細胞壁合成全体が停止したという事実は驚くべきものである。ただし、WGA によるペプチドグリカンの染色を伴う顕微鏡観察では、一部細胞表面に染色された領域が観察されたことは留意されるべきである。この観察結果は、わずかながらペプチドグリカンが存在した可能性を示唆している。事実、*tagF* ノックアウト株ではペプチドグリカン合成系は無傷のまま残されているため、合成経路の阻害が無ければ自身でペプチドグリカンを合成できる可能性は残されている。枯草菌の L-form 分裂にはペプチドグリカン合成系は必要がないことに加え、FtsZ に結合する GFP を発現する枯草菌株を用いた研究により[10]、枯草菌の L-form 分裂には、一般的な細菌のほぼすべてに共通する FtsZ を介した分裂様式[3]は一切関係なく発生することが Errington らにより報告されている[10]。一方で、グラム陰性細菌である大腸菌の L-form は分裂のために細胞表面にわずかに残存するペプチドグリカンを必要とするとの報告が D'Ari らによりされている[15]。抗生物質によって誘導された大腸菌 L-form は野生型の 7%のペプチドグリカンを含み、また隔壁形成タンパク質 PBP3 を阻害すると増殖しなくなることが観察されている[15][44]。このことから、より速い増殖のために、進化型 L-form が残存した少量のペプチドグリカンを利用した可能性が考えられる。あるいはペプチドグリカン合成系を阻害する fosfomycin への耐性を得るなどして自身でペプチドグリカンを合成した可能性が

ある。第三章で確認された、テイコ酸合成系には変異が入り、かつ fosfomycin で阻害されながらも、ペプチドグリカン合成系はどの継代実験系でも変異が確認されなかったことはこの説を支持している。

また、*tagF*以外の *spo0A* および *pgpH* 遺伝子のノックアウト株は fosfomycin 及び xylose の非存在下では細胞壁は合成され、かつ L-form 増殖の高速化も起こらなかった。これらの遺伝子が進化株の速い増殖にどのような影響を与えるかは不明なままである。*spo0A* 遺伝子は枯草菌の生存に適さない高温や乾燥、凍結などの環境を生き延びる耐性胞子の形成起点に関係し、欠損により芽胞形成が起こらなくなることが先行研究で報告されている[35]。また *pgpH* 遺伝子はシグナル伝達因子 c-di-AMP の分解を行い細胞内の濃度を調節するため、欠損により c-di-AMP 濃度が細胞内で過剰になると細胞が異常形状となり致死となることが知られている[36]。また *pgpH* と c-di-AMP を通じて関係している *glmM* も進化株で共通した点変異が見られたが、本研究ではノックアウト株を作成できなかったため影響は不明である。これらの遺伝子の変異は、L-form としての生存に不要であるために起こった可能性がある。またこれらの変異の一部は、芽胞や細胞壁の合成に必要なエネルギーと材料を節約し、L-form の成長を助けることで、進化株の速い増殖を引き起こした可能性が考えられる。このため今回の研究で作成した、単一の遺伝子のノックアウトでは L-form の増殖を高速化させるには至らず、共通した変異だけでなく各進化

株に固有の変異や欠損が積み重なることで進化株の速い増殖が達成された可能性
がある。

この章では進化株に起こっていた遺伝子の変異のうち、重要と思われるものを選び出し、祖先株よりその遺伝子のノックアウト株を作ることによって進化株でみられた表現型の再現をすることで表現型の変化の原因を突き止めることを試みた。結果的に不安定型 **L-form** が安定型へと移行したことについて、細胞壁合成能力が失われた原因が *tagF* 遺伝子の欠損であると判明した。しかし、増殖速度が向上の原因は不明なままであった。今後の展望として、複数の遺伝子のノックアウトにより増殖速度の向上を達成できるかが目標となると思われる。

第五章 結論

生物にとって分裂や増殖をしていく機能は生物の定義を満たす重要な要素として考えられている[1]。生物がどのように増殖し進化していったかについての理解を目指す際に原始的な細胞がとっていたと思われる単純な分裂機構について研究・考察することは生命の進化を考えるうえで極めて重要なことであると思われる。しかし、原始的な細胞分裂機構はすでに失われており、実際にどのような形で分裂していたかは確実なことは判明していない。その点で、細胞膜の合成速度を上げ細胞の体積と細胞膜の不均衡を起こすだけで物理的な作用で分裂を達成できる **L-form** の分裂様式は十分に単純で原始的な分裂形態のモデルとして扱えるといえる。しかし、**L-form** は多くの特異な現象が報告されていたものの、取扱いの難しさや不安定さなど多くの困難のために研究が減少してきた。しかし、近年では Errington らにより **L-form** 化する遺伝的条件が解明されたことに加え、遺伝子解析技術の急速な発達により、全ゲノム解析などの遺伝的な解析のための強力なツールを現実的なコストで用いることが可能となった。本研究では、長期継代実験によって人為的に進化させた枯草菌 **L-form** について古典的な手法と近代的な手法の組み合わせによる詳細な解析を行った。本研究の成果の一つは、長期継代された **L-form** 細菌が条件により細胞壁を再生できる不安定型から、細胞壁を合成する能力を喪失し同時に増殖が高速化する安定型へと移行する現象について遺伝子面から明らかにできたこと

である。L-form が細胞壁を再生できる不安定型と細胞壁を再生しない安定型に分かれていることは以前から知られていた[20] [28]。また、枯草菌においては欠損により L-form を安定化させる遺伝子の存在も報告されていた[6]。しかし今回見つかった *tagF* 遺伝子のようなテイコ酸合成経路の欠損により枯草菌が細胞壁を合成できなくなり L-form が安定化するという報告はこれまでにないものである。また本研究では、安定型 L-form に移行する際、細胞壁合成能力を失うことそれ自体が増殖速度の向上の直接の原因となるわけではなかったことが判明した。また本研究においても増殖速度の向上の原因を明らかにすることはできなかったものの、関係していると思われる遺伝子変異のリストは得ることができ、今後の研究に生かすことができるものと思われる。これらの発見や考察は全ゲノム解析によって発見できたものであり、今後の研究においても、複数の遺伝子の変異や欠損による表現型の変化を突き止めるなどの応用が考えられる。

また本研究では総合して長期継代実験により枯草菌 L-form に起きる遺伝子変異と表現型の変化を示すことができた。本研究で用いた長期継代実験系は L-form 誘導材として働く xylose に加え、ほぼすべての細胞に必須のペプチドグリカン合成系を阻害し、細胞壁の合成を阻害する fosfomycin を用い、細胞壁の合成をできない状況に保って継代されるように行った。そのような環境での長期継代により L-form は生存に不要となったいくつかの機能、細胞壁の合成能力や芽胞の形成能力、

細胞決定因子などを失い、また増殖を高速化させた。このことは、**L-form** が一定の状況に置かれた際にどのような変異が起き、どういった方向に進化していくかという一つの例を示したといえる。このことは、**L-form** を原始細胞のモデルとして考える際に、一定の環境下ではどのような進化をしていくかということを考える際の一つの例を示したと考えることができる。もちろん、本研究で用いた枯草菌は原始細胞ではなくすでに十分に進化した現生の生物であり、特殊な環境下で一部の遺伝子が削除されたことを直接原始的な細胞の進化を示しているということとはできないと思われる。しかし、枯草菌以外の様々な細菌を利用したり、本研究で用いたシステムから培地や変異条件を変更した実験系を利用した同種の研究を積み重ねたりすることにより、原始的な細胞の進化に迫ることができる可能性がある。そういった点からも、本研究は **L-form** を含む生物の研究として重要な意味を持っていると考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり自由な研究環境の整備や極めて多くのご指導を賜りました東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系 兼 先進科学研機構 兼 生物普遍性機構 市橋伯一教授に心から感謝の意を表します。

本研究において枯草菌の形質転換や細胞壁の染色など多くの手法の指導や研究についてのアドバイス、学術論文の提出に関してなど多くの点での支援をいただいた富山県立大学 工学部 生物工学科 大島拓准教授に心よりお礼申し上げます。

東京大学大学院市橋研究室 水内良先生をはじめとする東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系 市橋研究室のメンバーには時にアドバイスや支援をいただくなどのサポートを受け、本研究を進めるにあたって欠かすことのできない存在でありました。深く感謝します。また本研究において枯草菌 **L-form** の長期にわたる継代実験を行ってくださった清水天馬氏の尽力は極めて重大なものでありました。ここに感謝の意を示します。

これまで経済的、精神的に大きな支援をしていただいた両親に心から感謝します。

本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2108 の支援を受けたものです。経済的、また研究の支援などの面での支援により憂いなく研究に励むことができました。深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] P. L. Luisi, “About various definitions of life,” *Orig. Life Evol. Biosph.*, vol. 28, no. 4–6, pp. 613–622, 1998.
- [2] C. R. Woese, O. Kandler, and M. L. Wheelis, “Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 12, pp. 4576–4579, 1990.
- [3] D. W. Adams and J. Errington, “Bacterial cell division: Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 9, pp. 642–653, 2009.
- [4] L. Rothfield, A. Taghbalout, and Y.-L. Shih, “Spatial control of bacterial division-site placement,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 12, pp. 959–968, Dec. 2005.
- [5] J. Errington, “L-form bacteria, cell walls and the origins of life,” *Open Biol.*, vol. 3, no. JAN, 2013.
- [6] R. Mercier, Y. Kawai, and J. Errington, “General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria,” *Elife*, vol. 3, Oct. 2014.

- [7] G. Wu, E. Drufva, and K. Wu, “Fast genome editing in *Bacillus subtilis*,” *Eng. Life Sci.*, vol. 19, no. 6, pp. 471–477, Jun. 2019.
- [8] K. Ramijan *et al.*, “Stress-induced formation of cell wall-deficient cells in filamentous actinomycetes,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 5164, Dec. 2018.
- [9] B. G. SPRATT, “Properties of the Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia coli* K12,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 72, no. 2, pp. 341–352, Jan. 1977.
- [10] M. Leaver, P. Domínguez-Cuevas, J. M. Coxhead, R. A. Daniel, and J. Errington, “Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*,” *Nature*, vol. 457, no. 7231, pp. 849–853, Feb. 2009.
- [11] E. Klieneberger, “The natural occurrence of pleuropneumonia-like organism in apparent symbiosis with *Strrptobacillus moniliformis* and other bacteria,” *J. Pathol. Bacteriol.*, vol. 40, no. 1, pp. 93–105, Jan. 1935.
- [12] G. J. Domingue and H. B. Woody, “Bacterial persistence and expression of disease,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 10, no. 2, pp. 320–344, Apr. 1997.
- [13] S. Madoff and J. W. Lawson, “The L-Forms of Bacteria,” in *The Prokaryotes*, vol. 112, New York, NY: Springer New York, 1992, pp. 4068–4081.

- [14] E. J. Allan, C. Hoischen, and J. Gumpert, "Chapter 1 Bacterial L - Forms," in *Advances in Applied Microbiology*, 1st ed., vol. 68, no. 09, Elsevier Inc., 2009, pp. 1–39.
- [15] D. Joseleau-Petit, J.-C. Liébart, J. A. Ayala, and R. D'Ari, "Unstable Escherichia coli L Forms Revisited: Growth Requires Peptidoglycan Synthesis," *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 18, pp. 6512–6520, Sep. 2007.
- [16] W. E. Owens, "Isolation of Staphylococcus aureus L forms from experimentally induced bovine mastitis," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 25, no. 10, pp. 1956–1961, Oct. 1987.
- [17] D. Kiessling, H. Gerlach, and J. Kösters, "On the Importance of Bacterial L -Forms in Pigeons," *J. Vet. Med. Ser. B*, vol. 37, no. 1–10, pp. 615–623, 1990.
- [18] L. Schmidtke, "Induction, characterisation and pathogenicity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) of *Lactococcus garvieae* L-forms," *Vet. Microbiol.*, vol. 69, no. 4, pp. 287–300, Sep. 1999.
- [19] R. Mercier, Y. Kawai, and J. Errington, "Excess Membrane Synthesis Drives a Primitive Mode of Cell Proliferation," *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 997–1007, Feb. 2013.

- [20] E. J. Allan, "Induction and cultivation of a stable L -form of *Bacillus subtilis*," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 70, no. 4, pp. 339–343, 1991.
- [21] Y. Kawai, R. Mercier, L. J. Wu, P. Domínguez-Cuevas, T. Oshima, and J. Errington, "Cell Growth of Wall-Free L-Form Bacteria Is Limited by Oxidative Damage," *Curr. Biol.*, vol. 25, no. 12, pp. 1613–1618, 2015.
- [22] S. Jun and B. Mulder, "Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: Lessons for the bacterial chromosome," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 33, pp. 12388–12393, Aug. 2006.
- [23] S. Jun and A. Wright, "Entropy as the driver of chromosome segregation," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 8, pp. 600–607, Aug. 2010.
- [24] J. Errington and L. J. Wu, "Cell Cycle Machinery in *Bacillus subtilis*," in *Sub-Cellular Biochemistry*, vol. 84, 2017, pp. 67–101.
- [25] S. Dell'Era *et al.*, "*Listeria monocytogenes* l-forms respond to cell wall deficiency by modifying gene expression and the mode of division," *Mol. Microbiol.*, vol. 73, no. 2, pp. 306–322, 2009.
- [26] E. J. Allan, C. Hoischen, and J. Gumpert, "Bacterial L -Forms," in *Advances in Applied Microbiology*, Elsevier, 2009, pp. 1–39.

- [27] M. Osawa and H. P. Erickson, “L form bacteria growth in low-osmolality medium,” *Microbiology*, vol. 165, no. 8, pp. 842–851, Aug. 2019.
- [28] C. M. J. Innes and E. J. Allan, “Induction, growth and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* L-form bacteria,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 90, no. 3, pp. 301–308, Mar. 2001.
- [29] P. Peterlin, V. Arrigler, K. Kogej, S. Svetina, and P. Walde, “Growth and shape transformations of giant phospholipid vesicles upon interaction with an aqueous oleic acid suspension,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 159, no. 2, pp. 67–76, 2009.
- [30] S. Svetina, “Vesicle Budding and the Origin of Cellular Life,” *ChemPhysChem*, vol. 10, no. 16, pp. 2769–2776, Nov. 2009.
- [31] T. Akamatsu and J. Sekiguchi, “An Improved Method of Protoplast Regeneration for *Bacillus* Species and Its Application to Protoplast Fusion and Transformation,” *Agric. Biol. Chem.*, vol. 48, no. 3, pp. 651–655, 1984.
- [32] R. Borriss *et al.*, “*Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 11, no. 1, pp. 3–17, Jan. 2018.

- [33] D. E. Deatherage and J. E. Barrick, “Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1151, pp. 165–188, 2014.
- [34] K. Kobayashi *et al.*, “Essential *Bacillus subtilis* genes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 8, pp. 4678–4683, 2003.
- [35] J. A. Hoch, “Regulation of the Phosphorelay and the Initiation of Sporulation in *Bacillus Subtilis*,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 47, no. 1, pp. 441–465, Oct. 1993.
- [36] J. Gundlach *et al.*, “An essential poison: Synthesis and degradation of cyclic Di-AMP in *Bacillus subtilis*,” *J. Bacteriol.*, vol. 197, no. 20, pp. 3265–3274, 2015.
- [37] S. Brown, J. P. Santa Maria, and S. Walker, “Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 67, no. 1, pp. 313–336, Sep. 2013.
- [38] F. M. Commichau, A. Dickmanns, J. Gundlach, R. Ficner, and J. Stülke, “A jack of all trades: the multiple roles of the unique essential second messenger cyclic di-AMP,” *Mol. Microbiol.*, vol. 97, no. 2, pp. 189–204, Jul. 2015.

- [39] F. M. P. Mehne, K. Gunka, H. Eilers, C. Herzberg, V. Kaeffer, and J. Stülke, “Cyclic Di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*: Both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 3, pp. 2004–2017, 2013.
- [40] V. Lazarevic, A. Düsterhöft, B. Soldo, H. Hilbert, C. Mauël, and D. Karamata, “Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SP8c2,” *Microbiology*, vol. 145, no. 5, pp. 1055–1067, 1999.
- [41] K. Abe *et al.*, “Developmentally-Regulated Excision of the SP8 Prophage Reconstitutes a Gene Required for Spore Envelope Maturation in *Bacillus subtilis*,” *PLoS Genet.*, vol. 10, no. 10, 2014.
- [42] A. Marsee *et al.*, “Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids,” *Cell Stem Cell*, vol. 28, no. 5, pp. 816–832, May 2021.
- [43] M. A. D’Elia, K. E. Millar, T. J. Beveridge, and E. D. Brown, “Wall Teichoic Acid Polymers Are Dispensable for Cell Viability in *Bacillus subtilis*,” *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 23, pp. 8313–8316, Dec. 2006.
- [44] J. Casadesús, “Bacterial L-forms require peptidoglycan synthesis for cell division,” *BioEssays*, vol. 29, no. 12, pp. 1189–1191, Dec. 2007.

補足資料

Table S1 本研究で用いた細菌株のリスト

株	特徴	出典
YK1694	168CA xseB::Tn (kan), Ω amyE::Pxyl-accDA spc	Mercier et al. 2013
BKE24220	168 Δ spo0A::erm	Byoung-Mo Koo et al. 2017
BE1771	A strain after long-term subculturing	This study
BE1772	A strain after long-term subculturing	This study
BE1773	A strain after long-term subculturing	This study
BLD11	YK1694 Δ spo0A::erm	This study
BLD12	YK1694 Δ pgpH::erm	This study
BLD13	YK1694 Δ tagF::erm	This study

Table S2 祖先株に入っていた変異 (NCBI リファレンス配列: NC_000964.3)

祖先株YK1694に起こっていた変異。NCBI Reference Sequence: NC_000964.3 に基づく
位置* 塩基変化

165749	Δ1 bp
165751	Δ1 bp
165826	+C
166037	+T
166345	Δ1 bp
347626	G→T
528912	G→C
557870	(T)5→6
608219	(A)5→6
1195327	A→T
1317152	+GT
1317158	(T)5→6
2097087	(A)7→8
2107460	G→A
2151828	T→A
2177319	G→A
2271424	T→C
2271505	C→T
2271523	A→C
2480646	2 bp→AT
2480654	Δ1 bp
2480667	Δ1 bp
2581732	(T)6→7
3770066	(A)8→9
3935825	Δ1 bp
4155395	(A)5→6

Table S3 進化株でみられた全変異のリスト

青でハイライトされた変異は非同義置換または非コード領域

BE1771						
Position*	Nucleotide	Amino acid	Mutation AA No.	Protein length	Gene	Putative Function
136,311	C→T	synonymous	200	209	<i>rplC</i>	
198,863	C→A	Gln→Lys	123	448	<i>glmM</i>	phosphoglucosamine mutase
478,813	G→A	noncoding				
574,832	Δ 1 bp	frameshift	48	290	<i>ydeO</i>	putative integral inner membrane protein
1,732,091	T→C	Tyr→His	106	156	<i>ylxS</i>	ribosome maturation factor
2,152,047	Δ134,402 bp					SPβ prophage, and <i>spsM</i> gene reconstitute
2,518,076	C→A	Glu→stop	251	267	<i>spo0A</i>	response regulator, phosphorylated in response to complex YlbF/YmcA/YaaT
2,612,481	G→A	Ser→Phe	646	711	<i>pgpH</i>	c-di-AMP-degrading phosphodiesterases
2,629,263	G→A	synonymous	125	343	<i>hrcA</i>	
2,860,069	(GCTCAATA) _{1→2}	frameshift	212-215	290	<i>mreC</i>	cell-shape determining protein
2,953,082	G→A	Arg→Trp	90	173	<i>infC</i>	initiation factor IF-3
2,985,843	C→T	Glu→Lys	235	585	<i>pyk</i>	pyruvate kinase
3,333,034	C→T	Ser→Leu	396	430	<i>pucK</i>	uric acid permease subunit
3,677,776	(T)6→7	frameshift	208	746	<i>tagF</i>	CDP-glycerol:polyglycerol phosphate glycerophosphotransferase
4,208,753	Δ1 bp	noncoding				

BE1772

Position*	Nucleotide	Amino acid	Gene		
120,495	T→A	synonymous	145	166	<i>rplJ</i>
198,863	C→A	Gln→Lys	123	448	<i>glmM</i> phosphoglucosamine mutase
995,508	G→A	Glu→Lys	171	198	<i>srtA,y</i> <i>hcS</i> C-terminal anchoring of proteins to the cell wall
1,735,986	C→T	Arg→Cys	660	716	<i>infB</i> initiation factor IF-2
1,775,249	T→C	synonymous	61	181	<i>cotE</i> morphogenic spore protein
1,979,921	C→T	synonymous	876	2555	<i>ppsC</i> non-ribosomal plipastatin synthetase C involved in synthesis of plipastatin
2,003,388	C→T	noncoding			
2,339,758	Δ 476 bp		30 - 177	34 - 320	<i>-sspM</i> <i>+ypp</i> <i>C</i> small acid-soluble spore protein, hypothetical protein
2,518,716	Δ 39 bp		38 - 50	267	<i>spo0A</i> response regulator, phosphorylated in response to complex YlbF/YmcA/YaaT
2,612,407	(AACTG) ₁ → ₂	frameshift	671, 672	711	<i>pgpH</i> c-di-AMP-degrading phosphodiesterases
2,691,592	C→A	noncoding			
2,903,089	C→T	Gly→Glu	5	366	<i>gerM</i> germination (cortex hydrolysis) and sporulation (stage II, multiple polar septa) lytic enzyme
2,906,985	G→A	synonymous	371	586	<i>sdhA</i> succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)
3,035,511	G→A	noncoding			
3,334,775	G→A	Asp→Asn	44	114	<i>pucM</i> 5-hydroxyisourate hydrolase; also uricase subunit
3,677,770	Δ 1 bp	frameshift	210	746	<i>tagF</i> CDP-glycerol:polyglycerol phosphate glycerophosphotransferase
3,924,581	C→T	synonymous	119	513	<i>vbfa</i> acetate Na ⁺ -dependent symporter subunit involved in volatile signal for biofilm formation

BE1773						
Position*	Nucleotide	Amino acid	Gene			
198,863	C→A	Gln→Lys	123	448	<i>glmM</i>	phosphoglucosamine mutase
267,772	G→A	noncoding				
279,944	C→A	Pro→Thr	296	311	<i>ycbM</i>	two-component sensor histidine kinase
583,142	C→T	synonymous	105	306	<i>ydfC</i>	
832,689	G→A	Asp→Asn	49	226	<i>citT</i>	two-component response regulator
1,159,303	C→T	Gly→Ser	130	159	<i>yizA</i>	two-component response regulator
1,228,211	A→G	Val→Ala	194	218	<i>yjbE</i>	putative membrane protein of unknown function
1,264,528	2 bp→TG	framshift	137	409	<i>yjcM</i>	conserved hypothetical protein; phage island
2,003,388	C→T	noncoding				
2,295,733	T→A	synonymous	144	213	<i>yplQ</i>	
2,339,758	Δ 476 bp	deletion	30 - 177	34 - 320	<i>sspM⁺yppC</i>	response regulator, phosphorylated in response to complex YlbF/Ymc
2,518,716	Δ 39 bp	deletion	38 - 50	267	<i>spo0A</i>	
2,577,236	C→T	D253N (GAT→AAT)				
2,612,407	(AACTG) _{1→2}	framshift	671, 672	711	<i>pgpH</i>	c-di-AMP-degrading phosphodiesterases
2,691,592	C→A	noncoding				
2,861,217	G→A	Gln→Stop	178	337	<i>mreB</i>	cell-shape determining protein
3,035,511	G→A	noncoding				
3,400,448	C→T	noncoding				
3,677,770	Δ 1 bp	framshift	210	746	<i>tagF</i>	CDP-glycerol:polyglycerol phosphate glycerophosphotransferase teichoic acid primase, CDP-glycerol:N-acetyl-beta-d-mannosaminyl-1, 4-N-acetyl-d-glucosaminyldiphosphoundecaprenyl glycerophosphotransferase putative phosphoenolpyruvate-sugar pyruvyltransferase
3,682,704	G→T	Gly→Stop	178	381	<i>tagB</i>	
3,888,000	T→C	Yyr→Cys	288	373	<i>spsE</i>	conserved exported protein
4,139,065	G→A	Ser→Phe	158	245	<i>yycO</i>	