博士論文番号：0981025

枯草菌 RNA ポリメラーゼ α サブユニット C 末端領域
の細胞内機能解析

村山　智彦
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科　原核生物分子遺伝学研究室
（真木　寿治　教授）

平成２７年７月１５日提出

Ⅰ．序論
Ⅰ．１　RNA ポリメラーゼ
Ⅰ．２．１　RNA ポリメラーゼ α サブユニット
Ⅰ．２．２　枯草菌 RNA ポリメラーゼ の α サブユニット
Ⅰ．３　本研究の目的

Ⅱ．材料と方法
Ⅱ．１　材料
Ⅱ．１．１　菌株
Ⅱ．１．２　プライマー
Ⅱ．１．３　培地及び抗生物質
Ⅱ．２　方法
Ⅱ．２．１　菌株の作成
Ⅱ．２．２　RNAP 複合体精製
Ⅱ．２．３　トランスクリプトーム解析
Ⅱ．２．４　ChAP-chip 解析

Ⅲ．結果
Ⅲ．１　菌株の構築と変異型 RpoA の生育への影響の評価
Ⅲ．１．１　菌株の構築
Ⅲ．１．２　変異型 RpoA の発現による枯草菌の固形培地(LB プレート)における生育への影響
Ⅲ．１．３　変異型 RpoA の発現による枯草菌の液体培地(LB 培地)における生育への影響
Ⅲ．１．４　変異型 RpoA を発現した枯草菌における RNAP 複合体の解析
Ⅲ．２　トランスクリプトーム解析
Ⅲ．２．1　変異型 RpoA 発現株を用いたトランスクリプトーム解析
Ⅲ．２．2　変異型 RpoA の発現により転写が低下、あるいは増加する遺伝子の探索
Ⅲ．２．３　発現低下遺伝子に含まれる遺伝子のプロモーター上流には、ClassI 転写活性化因子の結合配列が存在する
Ⅲ．２．　４ 発現増加遺伝子のプロモーター配列
Ⅲ．２．　５　発現低下遺伝子の時系列発現パターンによる分類

Ⅲ．３　ChAP-chip 解析
Ⅲ．３.１　変異型 RpoA を組み込んだ RNAP は転写伸長複合体を形成できる

Ⅲ．３．２　トランスクリプトーム解析により決定された発現低下・増加は、実際の RNAP の結合減少、あるいは増加を反映している
Ⅲ．３．３　変異型 RpoA 発現株における RNAP の結合強度が低い遺伝子の解析
Ⅲ．３．４　変異型 RpoA 発現株で RNAP 結合強度が大きく減少した遺伝子の結合プロファイルの特徴

Ⅳ．考察

Ⅴ．謝辞

Ⅵ．参考文献

参考資料

Ⅰ．序論

Ⅰ．１　RNA ポリメラーゼ

原核生物の RNA ポリメラーゼ（RNAP）のコア酵素は、$\alpha^2\beta\beta'$のサブユニットより構成され、DNA を鋳型に相補的な RNA 合成を行う触媒活性を持つ（Ebright *et al*.,2000）。転写は、開始、伸長、終結の 3 つの段階で進む。転写開始はコア酵素に σ 因子が結合してホロ酵素を形成し、プロモーターに結合可能なホロ酵素を形成することから始まる。ホロ酵素は、σ 因子を介して、プロモーター配列を認識、結合し、RNAP closed complex（RPc）を形成する（Kovacic *et al*.,1987）。大腸菌では σ^{70}、枯草菌では σ^{A} が主要 σ 因子として機能しており、多くのプロモーターに存在する-35(TTGACA)、-10(TATAAT)領域を認識する。他方、多くの細菌には、主要 σ 因子とは別に、複数のマイナーな σ 因子が存在し、-35 および-10 領域の塩基配列とは異なる塩基配列を有するプロモーターの認識に関わっている (Debarbouille *et al*., 1991) 。大腸菌 RNAP では、RPc が形成した後、RNAP は、構造を変化させ、RNA 合成の際に鋳型となる DNA 鎖を含む領域の DNA2 本鎖を開き、open complex を形成する（Saecker *et al*.,2002）。RNAP は、短い RNA 配列（8～15bp 以下）の合成を繰り返しながら(abortive transcripts)、8～15bp 以上の RNA が合成されるとプロモーターから解離し、RNAP transcription elongation complex (TEC)を形成し、mRNA の合成を開始する (Murakami *et al*., 2003) 。mRNA の合成開始後、σ 因子は RNAP から放出される。TEC は非常に安定であり、平均 30-100 nt/sec の速度で転写を行う（Krummel *et al*.,1992; Levin *et al*.,1987; Vogel *et al*.,1994）。転写が終了する時は、RNAP がターミネーター（新生された RNA をヘアピン構造にする）に到達するか ρ 因子が作用することで RNA の転写が終結し、RNAP は DNA から解離する。解離した RNAP コア酵素は再び σ 因子と結合し転写を開始する（図１．１）。

一連の転写ステップの中で、転写開始は転写強度を決定する最も重要なステップであり、様々な転写開始制御機構が知られている。一部のプロモーターでは、-35 領域の上流に存在する、アデニン、チミンに富む UP エレメントと呼ばれる DNA 配列あるいは、転写因子結合部位に結合した転写因子と RNAP の α サブユニットが直接相互作用することが、RNAP のプロモーターへのリクルートに必要とされる（Busby *et al*.,1994; Gourse *et al*.,2000）。このことから、α サブユニットは転写開始強度を決定する重要な因子であると言える。

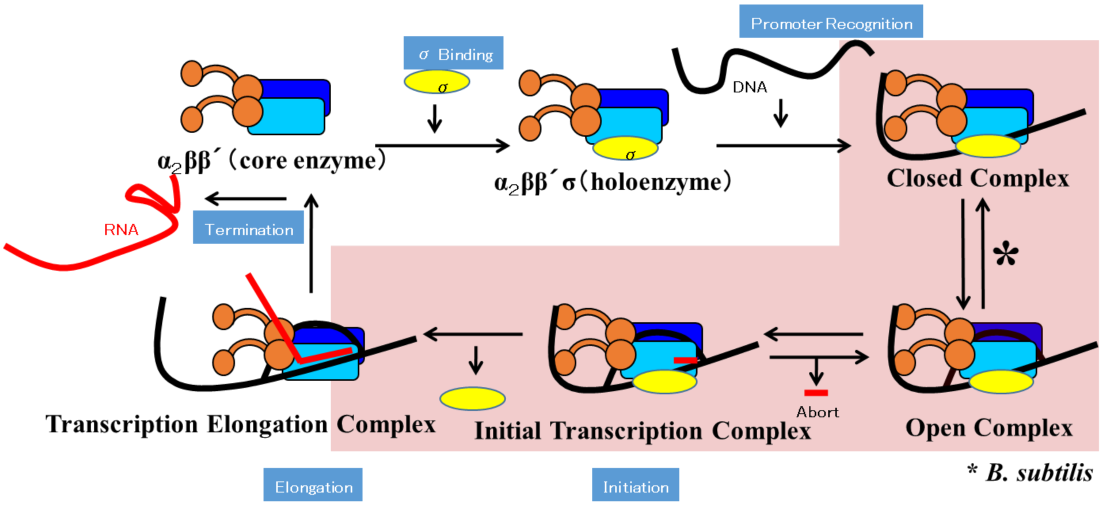


図１．１　RNAP の転写サイクルモデル

転写サイクルは、開始（Initiation）、伸長（Elongation）、終結（Termination）の 3 つの段階で進む。大腸菌では、Open complex が形成されると、Closed complex には戻らないが、枯草菌においては Closed Complex と Open Complex との間が可逆的だと考えられている。

Ｉ．２　RNA ポリメラーゼ α サブユニット

Ｉ．２．１　 RNA ポリメラーゼ α サブユニットの構造と機能

大腸菌 RNAP の α サブユニットは、2 つのドメイン（α-NTD 及び α-CTD）から構成され、13 アミノ酸より成る可動性リンカーによってつながっている（Blatter *et al.*,1994; Negishi *et al.*,1995; Jeon *et al.*,1997）。N 末端領域（α-NTD；図１．４, 8-232 残基）は、RNAP コア酵素の形成に必須である。α サブユニットは、α-NTD を介して 2 量体となり、形成された 2 量体は、さらに β、β′と相互作用して RNAP コア酵素を形成する（Ishihama *et al.*, 1992; Hayward *et al.*, 1991; Niu *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Igarashi *et al.*, 1991）。一方、C 末端領域（α-CTD；図１．４, 249-329 残基）は、UP エレメント、転写活性化因子、転写抑制因子、転写伸長因子と相互作用することで、転写開始複合体形成の促進や、転写伸長および終結に関連することが知られている（図１．２）（Busby and Ebright,1994; Ebright and Busby,1995; Hochschild and Dove,1998; Liu and Hanna,1995; Liu *et al.*,1996; Schauer at al.,1996; Kainz and Gourse,1998）。実際に、C 末端領域を欠く、α サブユニットを用いて試験管内再構成された変異型大腸菌 RNAP を用いて 試験管内転写解析を行うと、大腸菌の転写活性化因子である cAMP 受容体タンパク質(CRP)依存的な *lac* プロモーターの転写活性は著しく低下する（Igarashi and Ishihama.,1991）。また、CRP 以外の大腸菌の転写活性化因子、あるいは他の細菌の転写活性化因子に関しても、同様の知見が得られている（Browning *et al.*, 2004）。コア酵素に結合した 2 つの α サブユニットの α-CTD は、それぞれ独立して 2 つの転写因子、あるいは、転写因子と UP エレメントの双方と同時に相互作用する（Estrem *et al.*,1999）。他方、C 末端側の 3 分の 1 を欠失した α と β、β′で構成された RNAP によって、転写が活性化されるプロモーターも存在し、転写開始に、α-CTD を必要とするかどうかは、プロモーターごとに異なっている。（Igarashi *et al.*,1991; Ishihama, 1992; Igarashi *et al.*, 1991）。

α-CTDはCRPなどの転写活性化因子の働きに必須である一方で、転写制御因子とは独立に、UPエレメントと呼ばれるα-CTD依存的に転写を活性化するDNA領域に依存した転写活性化にも必要とされる（Ross *et al.*,1993）。UPエレメントはプロモーターの-35領域の上流に位置するATリッチなDNA配列であり、α-CTDと相互作用して転写を促進する（Ross *et al.*,1993）。大腸菌の*rrnB*のP1プロモーター（*rrnB*のプロモーターの1つ）の解析により、UPエレメントは転写開始点の上流、-59から-38bpの領域にかけて存在することが明らかにされている（Gourse *et al.*,2000）。*rrnB* P1ではUPエレメントは2つのドメイン（プロモーターに近位-46から-38の9bpの領域及びプロモーターに遠位-59から-47の13bpの領域）から構成され、それぞれのドメインに1分子のRNAP複合体に含まれる、2分子のαサブユニット中のα-CTDのそれぞれが、独立に結合する（Blatter *et*

al.,1994）。

　アラニンスキャンニングを用いた、α-CTDに対する網羅的な変異導入によって、UPエレメントに依存した転写活性化に必要とされるアミノ酸残基は、L262、R265、N268、C269、G296、K298、S299であることが決定されている（Gaal *et al*.,1996）。これらのアミノ酸残基は、ほぼすべての真正細菌α-CTDに保存されていることから、α-CTDと相互作用するUPエレメントも、真正細菌に保存されていることが示唆される（Gourse *et al*.,2000）。更に、立体構造解析によって、α-CTDを構成するアミノ酸残基の中で、UPエレメントとの結合に関与しているアミノ酸残基が、V264、R265、N268、N294、G296、K298、S299であり、特にR256が、DNAのマイナーグルーブ（副溝）に接触し、α-CTDがDNAに結合するための決定要素であることが示されている。これら７残基は*rrnB* P1のUPエレメントとα-CTDとの相互作用に、最も重要である（図１．３）(Benoff *et al*.,2002; Ross *et al*.,2001; Yasuno *et al*.,2001)。

　大腸菌では、α-CTDは、UPエレメントや転写因子と相互作用する一方で、プロモーターを認識するσ^{70}と相互作用することが報告されている(Lawson *et al*.,2004; Chen *et al*., 2003; Ross *et al*., 2003)。加えて、α-CTDと転写伸長因子であるNusA との相互作用も報告されている。NusAは細菌における一般的な転写伸長因子でありRNA伸長の休止を誘導し転写終結を助ける。他方でアンチターミネーションの補助因子としても働きターミネーションを阻害する。（Liu *et al*.,1996; Mah *et al*.,2000; Prsch *et al*.,2009）。更にはαサブユニットとリボソーム(RPL2)との相互作用も報告されている(Rippa *et al*., 2010)。これらの事実は、大腸菌においては、α-CTDの機能が、転写開始のみに限定されたものではなく、転写サイクルの様々な機能に必要とされることを示唆している。

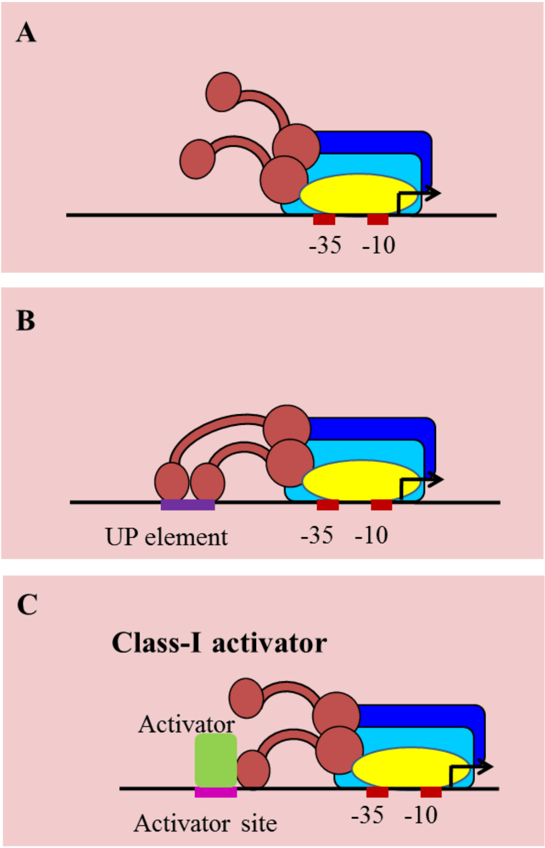


図１．２　**UP エレメントと Class-I 転写活性因子依存的転写**

α-CTD と RNAP は、α-NTD を介して自由度の高い可動性リンカーでつながっている

A. シンプルなプロモーター（e.g., *lacUV5*)。α-CTD は相互作用していない。

B. -35 領域より上流に UP 配列を含むプロモーター(α-CTD と高い親和性を持つ DNA サイト)（e.g., *rrnB P1*, *UP-lac*, or *UP^prox^-lac*)。αCTD は UP 配列と特異的に相互作用する。

C. Class-I 転写活性因子依存的プロモーター（αCTD と相互作用する転写活性因子）（e.g., *lac* in the presence of CAP)。αCTD は転写活性因子と特異的に相互作用する。

（Chen *et al.*, 2003 を改変）

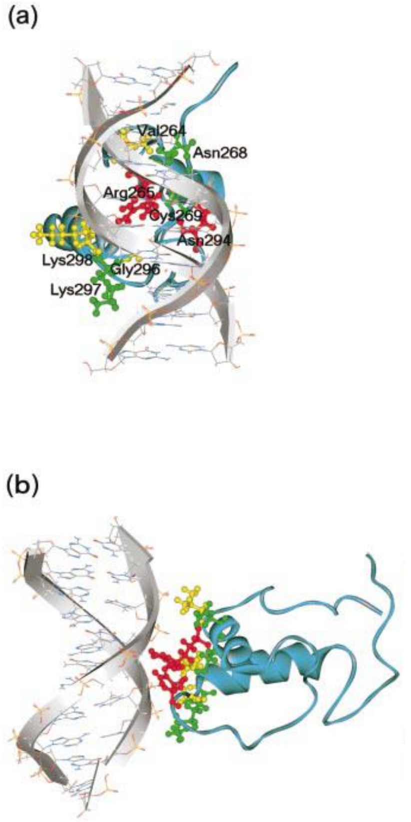


図１．３　αCTD と UP エレメントが結合している状態の立体構造モデル

（a）手前に DNA、奥にαCTD を描いた。V264、G296、K298 を黄色、R265、N294 を赤、N268、C269、K297 を緑で示した。

（b）（a）を横から見たモデル。αCTD が、副溝と相互作用していることがわかる。

（Yasuno *et al.*,2001 を改変）

Ｉ．２．２　枯草菌 RNA ポリメラーゼ の α サブユニット

上述したように、枯草菌の α サブユニットと転写因子あるいは UP エレメントの関係性は、いくつかの限られたプロモーターに関して解析がなされている。枯草菌 *srf* オペロンは、転写活性化因子 ComA により転写が活性化される(Zhang *et al.*, 2006)。この活性化は、ComA と α-CTD が直接相互作用することにより促進されていることが、α-CTD と ComA の共精製、あるいは *srf* オペロンのプロモーター領域を用いた、RNAP や ComA の DNaseI フットプリント解析により明らかにされている。枯草菌の φ29 ファージの A3 プロモーターの転写には、φ29 ファージの転写活性化因子 p4 と α-CTD との相互作用が必要であることが示されている(Mencia *et al.*, 1996)。また、φ29 ファージの C2, A2 および A2c プロモーターには、-35 領域の上流に AT リッチな DNA 配列が存在し、α-CTD と相互作用すると同時に、試験管内転写の活性化に必要なことから、UP エレメントであると考えられている(Meijer *et al.*, 2004; Monsalve *et al.*, 1996)。これらのプロモーターは、枯草菌の主要 σ 因子である σ^A 依存性のプロモーターであるが、マイナーな σ 因子によって認識されるプロモーターにも、UP エレメントが存在する可能性があることが指摘されている。枯草菌の *hag, fliD* および *motA* 遺伝子は、σ^D 依存性のプロモーターだが、これらの遺伝子の-35 領域の上流には AT リッチな DNA 配列が存在し、転写活性化に寄与するとともに、*hag* の上流配列が α サブユニットと直接相互作用することが確認されている(Fredrick *et al.*, 1995)。また、σ^H 依存性の *spoVG* 遺伝子に関しても、UP エレメントが存在する可能性が示唆されている(Banner *et al.*, 1983; Frisby *et al.*,1991)。加えて、大腸菌の α-CTD 中の、UP エレメントと相互作用するアミノ酸残基は、枯草菌の α サブユニットにも保存されている（図１．４）（Boylan *et al.*,1989）。また、枯草菌に代表されるグラム陽性細菌のプロモーターの上流領域にも、UP エレメントになる可能性のある AT リッチな配列が存在する（Graves *et al.*,1986; Helmann,1995）。したがって、枯草菌を含む、グラム陽性菌においても、α-CTD と UP エレメントあるいは転写因子との相互作用が、転写制御に重要な役割を担っていることが想像される。しかしながら、私の知る限り、*srf* オペロンおよび φ29 のプロモーターを除き、α-CTD が、転写活性化因子あるいは UP エレメントの可能性のある領域と直接転写に関与するかどうかは確認されていない。

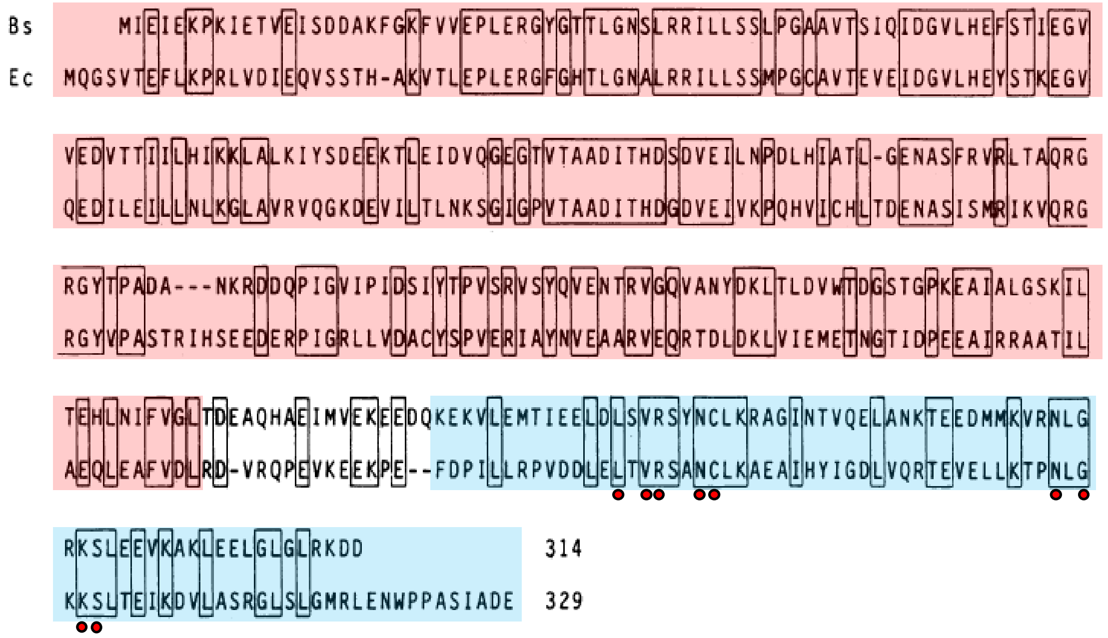


図１．４　枯草菌と大腸菌での RNAP α のアミノ酸配列の比較

Bs は枯草菌、Ec は大腸菌をそれぞれ示す。赤い帯で覆われた領域は N 末端領域（α-NTD）、青い帯で覆われた部分は C 末端領域（α-CTD）、赤い帯と青い帯の間の部分はリンカー、線で囲われている部分は枯草菌と大腸菌で保存された配列であり、赤い丸印は UP エレメントとの相互作用部位（ L262、V264、R265、N268、C269、N294、G296、K298、S299）を表す。

（Boylan *et al*.,1989 を改変）

Ｉ．３　本研究の目的

RNA ポリメラーゼ (RNAP) は、プロモーター領域を認識しプロモーター下流の DNA 配列を鋳型に RNA を合成するという機能や構造は細菌全体で保存されているが、大腸菌 RNAP と枯草菌 RNAP の間では転写サイクルにおける詳細な機能には違い（転写因子、オープンコンプレックスの安定性、アボーティブ転写の量、転写停滞シグナル等）がある (Artsimovitch *et al*., 2000) 。例えば、転写因子に関しては、大腸菌では、グルコース飢餓におけるグルコース以外の炭素源の利用に寄与するグローバルな転写活性化因子の CRP が、様々な遺伝子の転写を促進するが、枯草菌は CRP を持たず、グローバルな転写抑制因子(CcpA)による転写抑制を、グルコース飢餓時に解除することで同様の制御を行っている (Darbon *et al*., 2002; Ludwib *et al*., 2002; Schmiedel *et al*., 1996)。また、大腸菌のリボソーム遺伝子は、転写活性化因子である Fis および UP エレメントによる制御が知られているが、枯草菌のリボソーム遺伝子の制御には、転写活性化因子は関与しておらず、UP エレメントの寄与も非常に限定されている(Gourse *et al*., 2000; Gourse *et al*., 1996)。また、大腸菌において、リボソームタンパク質の制御に関与するとされている DksA は、枯草菌には存在しない(Krasny *et al*., 2004; Lemke *et al*., 2011)。さらに、枯草菌では、大腸菌には無いシステムであるグローバルな転写抑制因子として Spx が存在することもわかっている(Zhang *et al*., 2006; Newberry *et al*., 2005)。しかしながら、実際に、どのような違いが大腸菌と、枯草菌の間に存在するかどうかに関する系統だった解析は少ない。

α-CTD の機能は、主に大腸菌 RNAP を用いた *in vitro* 研究によって進められてきた。しかし、細菌の転写制御における α-CTD の重要性を明らかにするためには、大腸菌以外の細菌において、α-CTD がどのような機能を果たしているかを明らかにすることも重要である。実際に、黄色ブドウ球菌の α-CTD の活性を阻害する抗生ペプチドの解析から、大腸菌以外の細菌における α-CTD の機能に関する多くの知見も得られている (Osmundson *et al*., 2012) 。本研究では、細菌における α-CTD の機能に関する知見をさらに深めるため、枯草菌細胞において、α-CTD による転写制御を受けている遺伝子をゲノム解析の手法（トランスクリプトームおよび ChAP-chip 解析）を用いて網羅的に同定することを試みた。その結果、枯草菌の α-CTD は、大腸菌同様、グルコース以外の炭素源の利用を始め、共通した生命現象に関連する機能を制御しているが、その標的遺伝子や、転写制御の方法に多くの違いがあることが明らかになった。このことは、細菌における転写制御の多様性に、α-CTD を介した転写制御機構が大きく貢献していることを示しているのかもしれない。

Ⅱ．　材料と方法

Ⅱ．１　材料

Ⅱ．１．１　菌株

本研究で使用した菌株を表２．１に示す。

表２．１ 本研究に使用した菌株

菌株	遺伝子型	参考文献と構築
Bacillus subtilis		
168	*trpC*2	研究室ストック
SMS01	168 *rpoA*::*Cm*-P*spac-rpoA*	本研究
SMS02	168 *amyE*::P*xyl-rpoA-rplQ-Km*	本研究
SMS03	168 *amyE*::P*xyl-rpoAΔ*CTD-*rplQ-Km*	本研究
SMS04	168 *amyE*::P*xyl-rplQ-Km*	本研究
SMS05	168 *rpoA*::*Cm*-P*spac-rpoA*, *amyE*::P*xyl-rpoA-rplQ-Km*	本研究(SMS01→SMS02)
SMS06	168 *rpoA*::*Cm*-P*spac-rpoA*, *amyE*::P*xyl-rpoAΔ*CTD-*rplQ-Km*	本研究(SMS01→SMS03)
SMS07	168 *rpoA*::*Cm*-P*spac-rpoA*, *amyE*::P*xyl-rplQ-Km*	本研究(SMS01→SMS04)
SMS08	168 *rpoA*::*Cm*-P*spac-rpoA*, *amyE*::P*xyl-rpoA-rplQ-Km*, *rpoC*::pMUTinHis*ΔrpoC*	本研究 (SMS05→168 rpoC-His)
SMS09	168 *rpoA*::*Cm*-P*spac-rpoA*, *amyE*::P*xyl-rpoAΔ*CTD-*rplQ-Km*, *rpoC*::pMUTinHis*ΔrpoC*	本研究 (SMS06→168 rpoC-His)
SMS10	168 *rpoA*::*Cm*-P*spac-rpoA*, *amyE*::P*xyl-rplQ-Km*, *rpoC*::pMUTinHis*ΔrpoC*	本研究 (SMS07→168 rpoC-His)
SMS14	168 *amyE*::P*xyl-rpoA-Km*	本研究
SMS15	168 *amyE*::P*xyl-rpoAΔ*CTD-*Km*	本研究
SMS16	168 *amyE*::P*xyl-rpoA*His-*rplQ-tet*	本研究
SMS17	168 *amyE*::P*xyl-rpoAΔ*CTDHis-*rplQ-tet*	本研究
SMS18	168 *rpoA*::*Cm*-P*spac-rpoA*, *amyE*::P*xyl-rpoA*His-*rplQ-tet*	本研究(SMS01→SMS15)
SMS19	168 *rpoA*::*Cm*-P*spac-rpoA*, *amyE*::P*xyl-rpoAΔ*CTDHis-*rplQ-tet*	本研究(SMS01→SMS16)
168 rpoCHis	168 *rpoC*::pMUTinHis*ΔrpoC*	研究室ストック
168 xylR:Pxyl::Ngfp:MCS	168 *amyE*::*xylR*:P*xyl*::Ngfp:MCS	研究室ストック

Ⅱ．１．２　プライマー

本研究で使用したプライマーを表２．２に示す。

表２．２　本研究に使用したプライマー

Primer ID	DNA sequence	Purpose
SMP01	GGATTACCTGTTCGCGGACAAAACTC	断片 A
SMP02	CCTGCCCCGTTAGCAAATTACACGCGGCGACG	断片 A
SMP03	CTAACGGGGCAGGTTAGTGACATTAG	断片 B
SMP04	CGGAAGCTTTGCAGGCATGCCTGCAGGTC	断片 B
SMP05	CCTGCAAAGCTTCCGGTTTTGAAGGAGGGTTTTAAGT	断片 C
SMP06	GAATCGATCGGAATCACGCCGATTGGC	断片 C
SMP07	TCCTTCTAAGTCGGTTAGAATTCCGTTAAG	断片 D
SMP08	GATTTAAGTGAACAAGTTTATCCATCAAC	断片 D
SMP09	CTTGTTCACTTAAATCGTTTTGAAGGAGGGTTTTAAG	断片 E, H, K および M
SMP10	GTCAATCGTCTTTGCGAAGTCCGAGTCC	断片 K
SMP11	CGCAAAGACGATTGACTAGTTTCCCTTGTGAACTAG	断片 I
SMP12	CTGTCCCGCCCTTCTTTAGATACAC	断片 E, I および J
SMP13	GTGTATCTAAAGAAGGGCGGGACAG ACGATAAACCCAGCGAACCATTTG	断片 F
SMP14	CACCGCCCAGCCTAAACGGATCTAC CTTTACACTTTATGCTTCCG	断片 F および L
SMP15	GTA GATCCGTTTAGGCTGGGCGGTG	断片 G
SMP16	GCACGCAAGGTAATCGTCAGTTG	断片 G および P
SMP17	G TCA ATCGTCTTTGCG TTGATCTTCTTCTTTTTC	断片 H および M
SMP18	GATGGATAAACTTGTTCACTTAAATCTGACTAGTTTCCCTTGT GAACTAGG	断片 J
SMP27	CGCAAAGACGATTGACACGATAAACCCAGCGAACCATTTG	断片 L
SMP28	CTCTTGGTGAGAATGCGAGTTTCCG	断片 N
SMP29	GATGCGATCCTCTCATCTCGAGATCGTCTTTGCGAAGTCCGA GTCC	断片 N
SMP30	CTCGAGATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACCACCAC CATCATCACCATTGACTAGTTTCCCTTGTGAACTAGG	断片 O
SMP31	GCTCTTCTGGTGGAGTCTATCCCTGTCCCGCCCTTCTTTAGAT ACAC	断片 O
SMP32	GGATAGACTCCACCAGAAGAGCCAGGTCGATATGAACAGC	断片 P

Ⅱ．１．３　培地及び抗生物質

本研究で使用した培地を表２．３に示す。なお、LB 寒天培地を作製する際には 1.5%（w/v）の寒天粉末を加えた。また、必要に応じて、抗生物質（クロラムフェニコール [終濃度 5 μg / ml]、カナマイシン[終濃度 5 μg / ml]、エリスロマイシン[終濃度 0.5 μg / ml]、テトラサイクリン[終濃度 5 μg / ml]、および、スペクチノマイシン[終濃度 100 μg / ml]）および IPTG [終濃度 1mM] もしくは キシロース [終濃度 1 %] を加えた。

表２．３　本研究に使用した培地

LB 培地	1	L
Bacto tryptone	10	g
Bacto teast extract	5	g
NaCl	10	g
CI 培地	1	L
K_2HPO_4	7	g
KH_2PO_4	3	g
クエン酸ナトリウム二水和物	0.5	g
$(NH_4)_2SO_4$	1	g
D-gulucose	0.25	g
1M $MgSO_4$・$7H_2O$	5	ml
10% Casamino acid	2	ml
L-tryptophan(5mg/ml)	10	ml
5% yeast extract	10	ml
CII 培地	1	L
K_2HPO_4	7	g
KH_2PO_4	3	g
クエン酸ナトリウム二水和物	0.5	g
$(NH_4)_2SO_4$	1	g
D-gulucose	0.25	g
1M $MgSO_4$・$7H_2O$	5	ml
10% Casamino acid	1	ml

Ⅱ．２　方法

Ⅱ．２．１　菌株の作成

Ⅱ．２．１．１　枯草菌の形質転換

枯草菌の形質転換は Anagnostopoulos らの方法（Anagnostopoulos and Spizizen,1961）に従って行った。枯草菌を LB 寒天培地上で 37 ˚C、一晩培養を行った。そのコロニーから回収した菌体を 5ml の CI 培地に、OD_{600} ＝0.1 となるように懸濁し、37 ˚C で OD_{600} が 1.5 になるまで振とう培養した。培養液をファルコンチューブに移し、遠心（8000rpm 、3 分間、室温）により集菌し、ペレットを CII 培地 10 ml に懸濁後、37˚C で 40 分間振とう培養した。次に 500μl の培養液を小試験管に移し、適量の DNA 溶液を加え、37˚C で 1 時間 30 分から 2 時間培養した。この培養液を選択用の抗生物質を含む LB プレートに植菌し形質転換体を選択した。

Ⅱ．２．１．２　枯草菌染色体 DNA の調整

Marmur の方法に従い、枯草菌細胞から染色体 DNA を抽出した（Marmur *et al.*,1961）。枯草菌を LB 培地を用いて 37˚C で OD_{600} ＝0.7 から 1.0 まで振とう培養し、1.5ml 容エッペンドルフチューブに集菌（15000rpm、3 分間、室温）した。得られた菌体は溶菌バッファー（10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 20 mM EDTA, 100mM KCl, 1 mg/ml lysozyme）を 500μl 加え 37˚C、10 分間加温し 50μl の 10%SDS を加えて攪拌した。次に等量のフェノール、クロロフォルム、イソアミルアルコール（25：24：1）混合液(ナカライテスク株式会社)を加えて攪拌した。遠心分離（15000rpm、10 分間、室温）後、上清を 350μl 取り 2 倍量の 100%エタノールを加え攪拌した。遠心分離（15000rpm、3 分間、室温）した後、上清を捨て 1ml の 70%エタノールを加え洗浄し、遠心（15000rpm、3 分間、室温）後、50μl の TE バッファー（10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA）に溶解した。

Ⅱ．２．１．３　枯草菌 SMS01 株の作成

枯草菌 RNAP の α サブユニット（RpoA）をコードする遺伝子、*rpoA* の転写を IPTG により制御可能な SMS01 株を作成した。枯草菌 168 株ゲノム DNA を鋳型とし、*rpsM* 遺伝子下流部位、*rpsK* 遺伝子全長および断片 B との相同領域 13 bp を含む 520 bp をプライマーSMP01 と SMP02 を用いて PCR により増幅し、フラグメント A とした。P*spac* とクロラムフェニコール耐性遺伝子（*cat*)を含む DNA 断片を鋳型とし、プライマーSMP03 と SMP04 を用いて PCR により増幅し、断片 B とした。枯草菌 168 株ゲノム DNA を鋳型とし、断片 B との相同領域 15 bp を含む *rpoA* 遺伝子の上流部位 541 bp をプライマーSMP05 と SMP06 を用いて PCR により増幅し、断片 C とした。これら 3 断片を Wizard

SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega USA) を用いて精製し、リコンビナント PCR により形質転換に用いる DNA 断片を増幅した。

枯草菌 168 株を、増幅 DNA 断片を用いて形質転換し、クロラムフェニコールと IPTG を含む LB プレートを用いて形質転換体を選択した（図２．１)。得た株について LB プレートおよび LB プレート IPTG （終濃度 1mM） を用いた試験により *rpoA* が P*spac* 制御下にあることを確認し、SMS01 株とした。

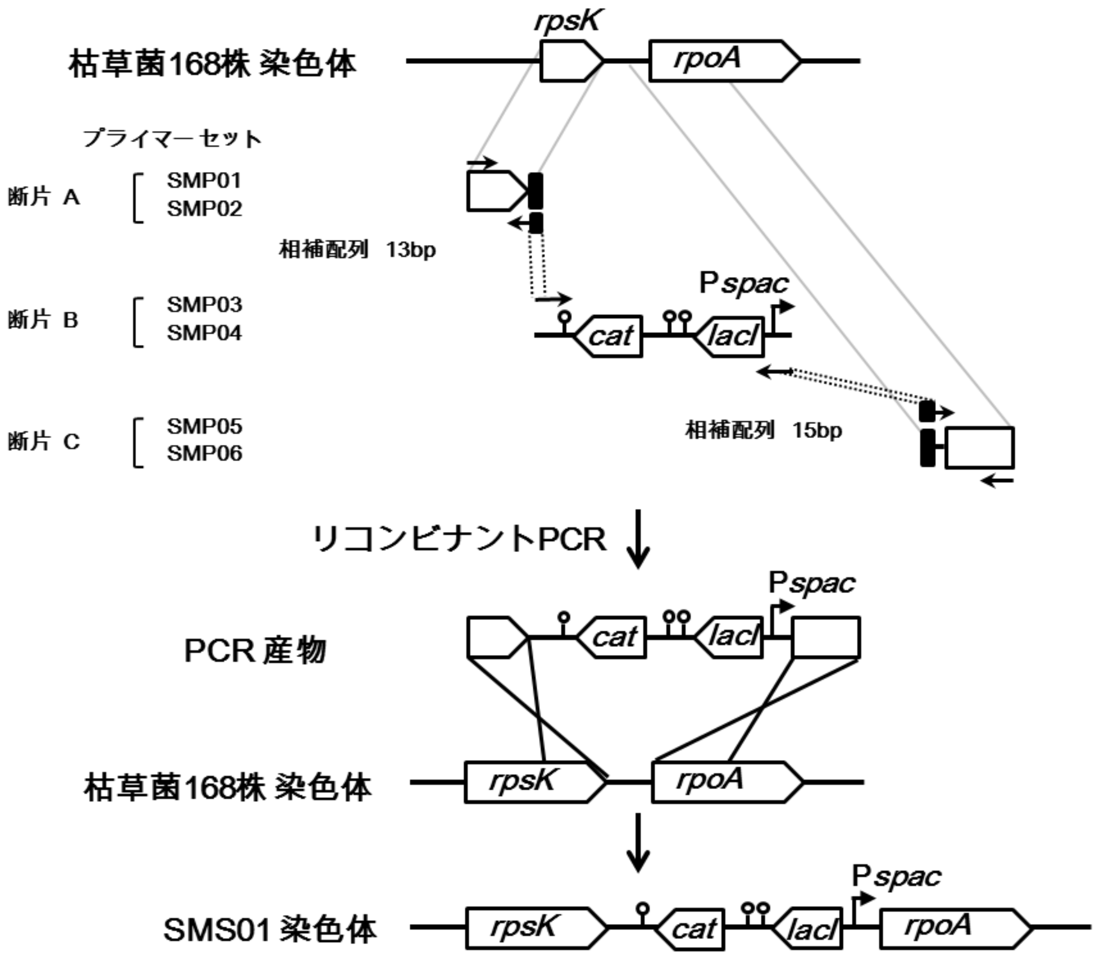


図２．１　**SMS01 株の構築**

リコンビナント PCR を用いた菌株作成の概要を示した。箱型矢印により遺伝子を示した。点線により、増幅した DNA 断片と対応するゲノム DNA 上の相同領域を示した。プライマー名の横にある矢印により、ゲノム DNA 上の、プライマーを設計した位置を示した。

Ⅱ．２．１．４　枯草菌 SMS02 株、SMS03 株および SMS04 株の作成

本解析では、枯草菌細胞内で発現している α サブユニットを、全長を有する完全長 α サブユニットから、C 末端領域を欠失した α サブユニットに変換する必要がある。この操作を可能にするため、枯草菌ゲノム上の、*rpoA* 遺伝子が本来存在する領域とは異なる *amyE* 領域に、*rpoA* 遺伝子をキシロース誘導プロモーターと共に組み込み、培地へのキシロースの添加により RpoA の発現を制御可能な株を作成した。その際、*rpoA* の下流に存在し、*rpoA* と同一のオペロンに含まれる、枯草菌の生育に必須な遺伝子 *rplQ* を、*rpoA* と共に組み込んだ。これは、P*spac* プロモーターを *rpoA* 遺伝子上流へ組み込んだ場合、*rpoA* 遺伝子と同様、*rplQ* も、IPTG 非存在下では、発現しなくなるためである。本解析では、キシロース誘導プロモーターにより野生型 RpoA の発現を制御可能な SMS02 株、RpoA の C 末端領域を欠失した変異型 RpoA の発現を制御可能な SMS03 株およびキシロース誘導プロモーターにより *rplQ* のみを転写可能な SMS04 株を作成した。

枯草菌 LY111 株ゲノム DNA 上の *amyE* 遺伝子内に組み替えられている *xylR* 遺伝子の下流部位から P*xyl* プロモーターを含む領域までを、枯草菌 LY111 株ゲノム DNA を鋳型とし、プライマーSMP07 と SMP08 を用いて PCR により増幅し断片 D とした。枯草菌 168 株ゲノム DNA を鋳型とし、*rpoA* 遺伝子の SD 配列、*rpoA* 遺伝子及び *rplQ* 遺伝子を含む領域を、プライマーSMP09 と SMP12 を用いて PCR を用いて増幅し、断片 E とした。カナマイシン耐性遺伝子(*Km*)断片をプライマー SMP13 と SMP14 を用いて PCR により増幅し、断片 F とした。枯草菌 168 株ゲノム DNA を鋳型とし、プライマーSMP15 と SMP16 用いて PCR により断片 G を増幅した。これら 4 断片を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega USA) を用いて精製し、精製した 4 断片を鋳型とし、プライマーSMP07 と SMP16 を用いて、4 断片を結合する形でリコンビナント PCR を行った。枯草菌 LY111 株を、リコンビナント PCR の結果得られた DNA 断片を用いて形質転換し、カナマイシンを含む LB プレートを用いて形質転換体を選択した。この枯草菌を SMS02 株とした（図２．２）。

また、枯草菌 168 株ゲノム DNA を鋳型とし、*rpoA* 遺伝子の C 末端領域となる部分を含まない 755 bp の領域を、プライマーSMP09 と SMP17 を用いて PCR により増幅し断片 H とし、*rplQ* 遺伝子をプライマー SMP09 と SMP12 を用いて PCR を用いて増幅し断片 I とした。DNA 断片 D, H, I, F, G を用いて上記手法で作成した枯草菌を SMS03 株とした（図２．２及び図２．３）。

さらに、枯草菌 168 株ゲノム DNA を鋳型とし、*rplQ* 遺伝子全長を含む 480 bp の領域を、プライマー SMP18 と SMP12 を用いて PCR により増幅し断片 J とし、DNA 断片 D, J, F, G を用いて上記手法で作成した枯草菌を SMS04 株とし

た（図２．２及び図２．３）。

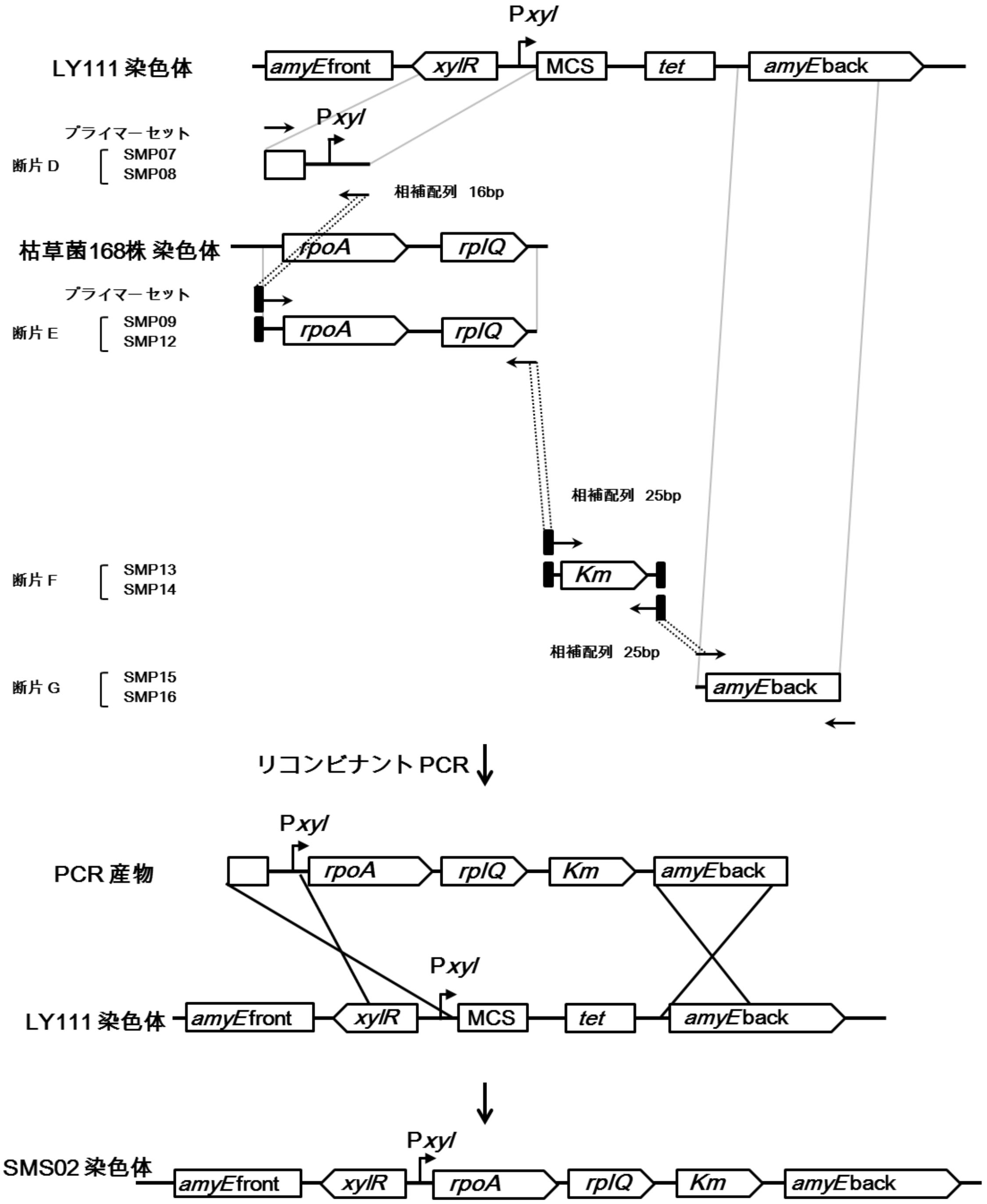


図２．２　枯草菌 SMS02 株の作成

リコンビナント PCR を用いた菌株作成の概要を示した。箱型矢印により遺伝子を示した。点線により、増幅した DNA 断片と対応するゲノム DNA 上の相同領域を示した。プライマー名の横にある矢印により、ゲノム DNA 上の、プライマーを設計した位置を示した。

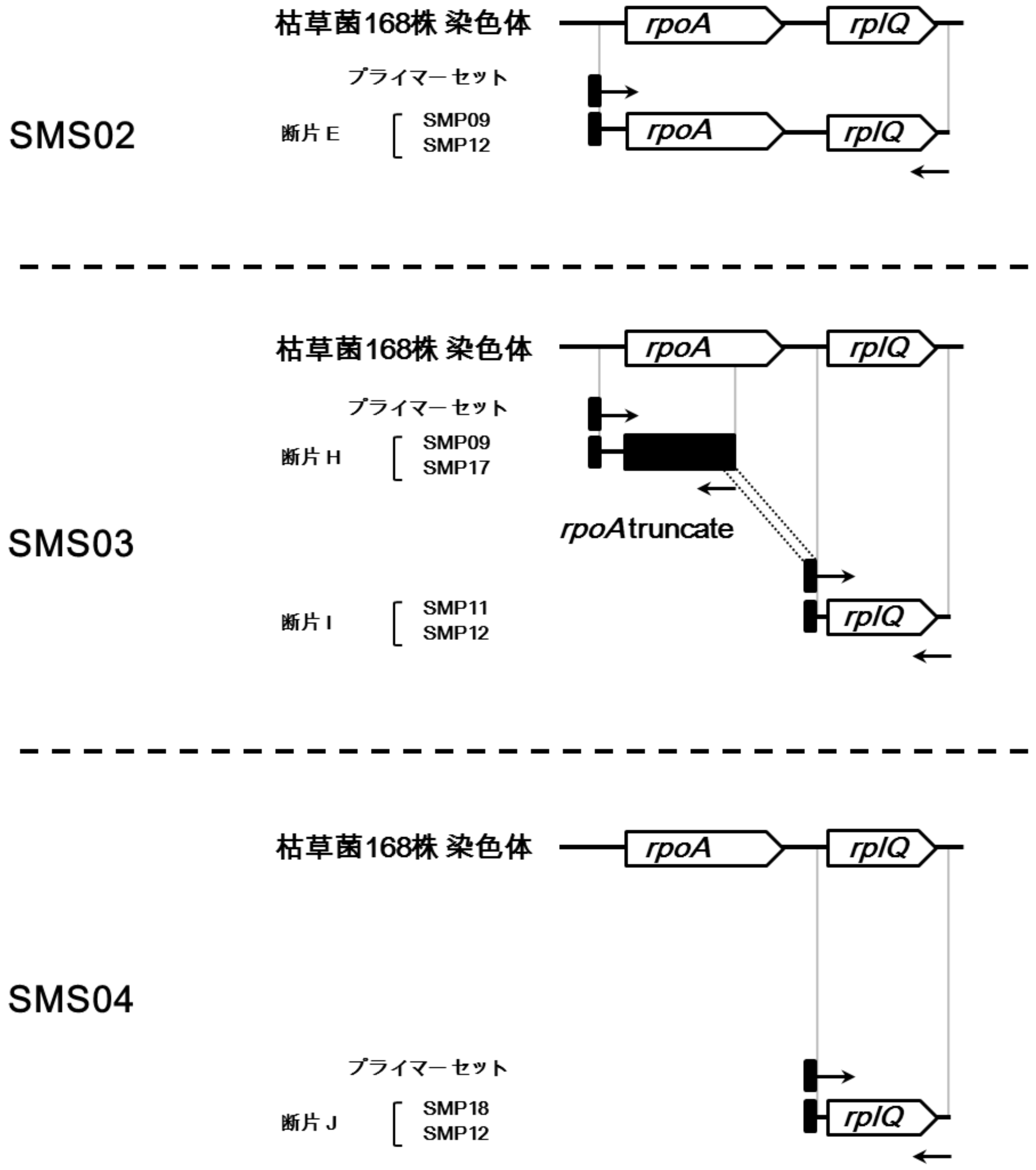


図２．３　枯草菌 **SMS03** 株及び **SMS04** 株の作成

リコンビナント PCR を用いた菌株作成の概要を示した。箱型矢印により遺伝子を示した。点線により、増幅した DNA 断片と対応するゲノム DNA 上の相同領域を示した。プライマー名の横にある矢印により、ゲノム DNA 上の、プライマーを設計した位置を示した。

Ⅱ．２．１．５　枯草菌 SMS05 株、SMS06 株および SMS07 株の作成

枯草菌 SMS02、SMS03 および SMS04 株を、枯草菌 SMS01 株のゲノム DNA により形質転換し、クロラムフェニコール、カナマイシンおよび IPTG を含む LB プレートに塗布して、形質転換体を選択した。これらの枯草菌株を、それぞれ SMS05、06 および 07 株とした。

Ⅱ．２．１．６　枯草菌 SMS08 株、SMS09 株および SMS10 株の作成

枯草菌 168rpoCHis 株を、枯草菌 SMS05、SMS06 および SMS07 株から精製したゲノム DNA により形質転換し、クロラムフェニコール、カナマイシン、エリスロマイシンおよび IPTG を含む LB プレートに塗布して、形質転換体を選択した。これらの枯草菌を SMS08、SMS09 および SMS10 株とした。

Ⅱ．２．１．７　枯草菌 SMS14 株および SMS15 株の作成

枯草菌 LY111 株ゲノム DNA を鋳型とし、断片 D と断片 G を作成した（Ⅱ．２．１．４参照）。枯草菌 168 株ゲノム DNA から *rpoA* 遺伝子とその SD 配列を含む 968 bp をプライマー SMP09 と SMP10 を用いた PCR で増幅し、断片 K とした。カナマイシン耐性遺伝子(*Km*)断片をプライマーSMP25 と SMP14 を用いて PCR により増幅し断片 L とした。断片 D および断片 G と新たに増幅した断片 K および断片 L を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega USA) を用いて精製し、鋳型 DNA として使用し、プライマーSMP07 と SMP16 を用いたリコンビナント PCR を行った。枯草菌 LY111 株を、リコンビナント PCR により得られた DNA 断片を用いて形質転換し、カナマイシンを含む LB プレートを用いて形質転換体を選択した。この枯草菌を SMS14 株とした（図 S１．１）。

また、枯草菌 168 株ゲノム DNA から *rpoA* 遺伝子の C 末端領域となる部分を含まない 755 bp をプライマーSMP09 と SMP17 を用いて PCR により増幅し断片 M として、DNA 断片 D, M, L, G を用いて上記手法で作成した枯草菌を SMS15 株とした（図 S１．２）。

Ⅱ．２．１．８　枯草菌 SMS16 株および SMS17 株の作成

枯草菌 168 株ゲノム DNA から *rpoA* 遺伝子の後半部分で終始コドンを含まない 577 bp と断片 O との相同領域 22 bp の合計 599 bp をプライマーSMP28 と SMP29 を用いて PCR により増幅し断片 N とした。枯草菌 168 株ゲノム DNA から *rplQ* 遺伝子の 480 bp と、その上流に His-tag 配列を付加し、下流に断片 P との相同配列を付加した合計 541 bp をプライマーSMP30 と SMP31 を用いて PCR により増幅し断片 O とした。枯草菌 168 LY111 株ゲノム DNA からテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet*)と下流の *amyE* 遺伝子の一部までをプライマーSMP32 と SMP16 を用いて PCR により増幅し断片 P とした。これら 3 断片を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega USA) を用いて精製し、鋳型 DNA として使用し、プライマーSMP28 と SMP16 を用いたリコンビナント PCR を行った。枯草菌 SMS14 株を、リコンビナント PCR により得られた DNA 断片を用いて形質転換し、テトラサイクリンを含む LB プレートを用いて形質転換体を選択した。この枯草菌を SMS16 株とした（図 S１．３）。

また、枯草菌 168 株ゲノム DNA から *rpoA* 遺伝子の中間部分 578 bp と断片 O との相同領域 22 bp の合計 600 bp をプライマーSMP32 と SMP33 を用いて PCR により増幅し断片 Q として、DNA 断片 Q, O, P を用いて上記手法で DNA 断片を増幅した。枯草菌 SMS15 株を、リコンビナント PCR により得られた DNA 断片を用いて形質転換し、テトラサイクリンを含む LB プレートを用いて形質転換体を選択した。この枯草菌を SMS17 株とした（図 S１．４）。

Ⅱ．２．１．９　枯草菌 SMS18 株および SMS19 株の作成

枯草菌 SMS01 株を、枯草菌 SMS16 株のゲノム DNA により形質転換し、クロラムフェニコール、テトラサイクリンおよび IPTG を含む LB プレートに塗布して、形質転換体を選択した。この枯草菌を SMS18 株とした（図 S１．５）。

また。枯草菌 SMS01 株を、枯草菌 SMS17 株のゲノム DNA により形質転換し、クロラムフェニコール、テトラサイクリンおよび IPTG を含む LB プレートに塗布して、形質転換体を選択した。この枯草菌を SMS19 株とした（図 S１．５）。

Ⅱ．２．２　RNAP 複合体精製

LB 培地に抗生物質（クロラムフェニコール、カナマイシン、エリスロマイシン）と IPTG を添加し、37˚C、200rpm で対数期まで前培養した。LB 培地で細胞を 2 回洗浄し、抗生物質と IPTG を含む LB 培地を除去した。1L 三角フラスコに 400 ml の 1%のキシロースを加えた LB 培地を入れ、LB 培地で洗浄した枯草菌を OD600＝0.02 となるように植菌した後、37˚C、200 rpm で培養した。目的の培養時間に達した本培養液を 10 から 20 OD units になるように、遠心(8000rpm、10 分間)で集菌した。上清を捨て、1 ml TE バッファーに溶解し、2 ml チューブに移し遠心(8000rpm、10 分間)し、上清を捨て-80˚C で凍結した。凍結試料に 1.5 ml の Binding バッファー（0.1 M Tris-HCl[pH 7.5], 20% glycerol, 1 mM β-mercaptoethanol, 50 mM imidazole[pH 7.5], 0.5M NaCl）と 15µl の 100 mM PMSF を加え、アストラン超音波細胞破砕機（MODEL XL2020 ヒートシステム社　USA）を用いて、氷水上で、10 秒間の間隔をあけ、4 秒間のレベル 4.5 の超音波を断続的に 10 分間かけることで、細胞を破砕した。破砕後の試料を遠心（8000 rpm、10 分間、4˚C）し、上清を 2 ml チューブに移した。また、上清 100µl をコントロール用の試料として -20 ˚C で保存した。2 ml チューブに 50 µl の His-Tag Isolation & Pulldown（Dynabeads Life Technologies USA）を加え、4˚C で 30 分間回転した。この反応液を遠心（5000 rpm、1 分間、4˚C）し、マグネティックスタンドを用いて上清を取り除いた。次いで、2 ml チューブに 1.5 ml の Binding バッファーを加え、ビーズを完全に懸濁した後、マグネティックスタンドを用いて上清を取り除く作業を 5 回繰り返した。次いで、50µl の Elution バッファー（0.1 M Tris-HCl [pH 7.5], 20% グリセロール, 1 mM β-mercaptoethanol, 0.5 M imidazole[pH 7.5], 0.1M NaCl）を加え、ビーズを完全に懸濁した後、5 分間氷上に静置し、遠心（15000 rpm、2 分間、4˚C）し、マグネティックスタンドを用いて抽出液を回収した。

Ⅱ．２．３　トランスクリプトーム解析

Ⅱ．２．３．１　核酸の抽出

菌株の培養は、Ⅱ．２．２（RNAP 複合体精製）の項と同様に行った。目的の培養時間に達した培養液を 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄した後、液体窒素で急速に凍結し、-80˚C で保存した。凍結した細胞を 640µl の LETS バッファー (100 mM LiCl, 10 mM EDTA, 10mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% SDS) に懸濁し、0.4 ml のフェノール、クロロフォルム、イソアミルアルコール（25 : 24 : 1）混合液(ナカライテスク株式会社)と 400µl のガラスビーズ(直径 0.5mm)を入れた 2ml チューブに移した。3 分間、30/seconds で振とうし、細胞を破砕した。遠心後、水層から 480ul を取り、等量のフェノールクロロホルムイソアミルアルコールを加えて、2 分間、ボルテックスした。遠心後、水層から 320µl を取り、1/10 量の 1M LiCl と 2.5 倍量の 100%エタノールを加えて遠心し核酸のペレットを回収した。回収試料は冷 70%エタノールで洗浄し、100ul の Nuclease free water に溶かした。このうち 100 µg の核酸を RNeasy (Qiagen Germany) を用いて精製、DNase I (Qiagen Germany) 処理を行った。これにより得られた RNA のうち 15µg を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を Qiaquick (Qiagen Germany) で精製し、DNaseI 処理と断片化した DNA の標識を行った。

Ⅱ．２．３．２　cDNA の合成

15µg の RNA サンプル、3µl の 3 µg/µl ランダムプライマー (Invitrogen USA) および 3µl の 10mM dNTP と蒸留水を混合し、総量を 41µl に調整した。65 ˚C で 5 分間加温した後、氷上で 1 分間静置したサンプルに、12µl の 5 × cDNA 合成 バッファー (Invitrogen USA), 3µl の 100mM DTT、1µl の RNase Out (Invitrogen USA)、3µl の Super ScriptIII Reverse Transcriptase (Invitrogen USA)を加え、25˚C、5 分間、37˚C、30 分間、42 ˚C、60 分間加温し、cDNA を合成した。20µl の 1M 水酸化ナトリウム溶液を加えた後、65˚C で 30 分間加温し、20µl の 1M 塩酸溶液を加えて cDNA を合成した。cDNA の精製には QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Germany) を用いた。

Ⅱ．２．３．３　DNase I 処理

cDNA を 5µg 含有する cDNA 溶液を、3µl の DNase I、5µl の 10 × PCR buffer と撹拌し、容量を蒸留水で 50µl に調整した後、37 ˚C で 10 分間加温した。その DNA 溶液を 98 ˚C で 10 分間加温し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、DNA が十分に断片化していることを確認した。残りの DNA 溶液 45µl は DNA 標識に用いた。

Ⅱ．２．３．４　DNA の標識

Affymetrix 社のマニュアルにしたがって行った。DNA 断片の標識には BioArray Terminal Labeling Kit with Biotin-ddUTP (Enzo Life science USA) を使用した。DNA 断片溶液 45µl に 20 µl の 5 ×リアクションバッファー、10 µl の 10 × $CoCl_2$、1 µl の 100×biotin-ddUTP、2 µl のターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ、22 µl の蒸留水を加え、37˚C で 60 分間加温した後、2µl の 0.5M EDTA を加え反応を停止した。

Ⅱ．２．３．５　ハイブリダイゼーション

Affymetrix 社のマニュアルにしたがって行った。標識された DNA 断片溶液 92.7µl に 100 µl の 2 × ハイブリダイゼーションバッファー、3.3 µl の 3nM Control Origo B2 (Affymetrix)、2.0 µl の 10 mg/ml Herming Sperm DNA (Promega USA)、2.0 µl の 50 mg/ml BSA (Invitrogen) を加え、Affymetrix 社の Genechip *Bacillus subtilis* genome array に注入し、45˚C、60 rpm で 16 時間ハイブリダイズした。

Ⅱ．２．３．６　解析

解析には Affymetrix 社から提供されている Genechip 解析プログラムである GCOS を用いた。GCOS の標準化機能を用い、全てのトランスクリプトーム解析のシグナル値の標準化を行った。すなわち、全プローブのうち、シグナル強度が上下 2%に含まれるプローブを除いた後、平均値が 500 になるように標準化し解析した。

Ⅱ．２．４　ChAP-chip 解析

Ⅱ．２．４．１　クロマチンアフィニティ沈降（ChAP）法

Ⅱ．２．４．１．１　ホルムアルデヒド処理による細胞の固定（クロスリンク）

菌株の培養は、Ⅱ．２．２（RNAP 複合体精製）の項と同様に行った。目的の培養時間に達した培養液に終濃度が 1%になるようにホルムアルデヒド溶液を加えた後、37˚C、200 rpm で 30 分間振とうした。この細胞固定反応液を遠心（8000 rpm、5 分間、室温）し、沈殿を 2 ml の TBS(8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 3 g/L Tris-HCl [pH 7.4])に懸濁した。この懸濁液に 10 ml の TBS を加え、15 ml ファルコンチューブに移し遠心（8000 rpm、3 分間、室温）し、上清を捨て沈殿した枯草菌細胞を -80 ˚C で保存した。

Ⅱ．２．４．１．２　RNase 処理

-80 ˚C で凍結保存した枯草菌細胞に 3 ml の King 2 バッファー(0.1 M Tris-HCl [pH 7.5], 0.2 M NaCl, 1 % TritonX-100, 0.1 % Na-deoxycholate, 0.2 % Brij58、20 % glycerol) を加えた。そこへ 60 µl の 10 mg/ml RNaseA を加え、ピペッティングにより撹拌した。37˚C、230 rpm で 30 分間保温し、遠心(8000rpm、10 分間、室温)後、上清を取り除いた。枯草菌細胞に 2 ml の King 2 バッファーで洗浄し、遠心分離(8000rpm、3 分間、室温)後、上清を取り除き、氷上に保存した。

Ⅱ．２．４．１．３　超音波処理による細胞破砕と DNA の断片化

RNase 処理後の枯草菌細胞に 3 ml の UT バッファー （100 mM HEPES、500 mM NaCl、10 mM Imidazole、8 M Urea、1% Triton X-100、10 mM β-mercaptoethanol,、1 mM PMSF）を加え、アストラン超音波細胞破砕機（MODEL XL2020、ヒートシステム）を用いて氷水上でレベル 5、4 秒間のパルスを 10 分間、間隔 10 秒間の条件で細胞を破砕した。破砕後の試料を遠心（8000 rpm、3 分間、4˚C）し、上清を 2 ml チューブ 2 本に各 1.5 ml ずつ分注した。また、上清 150µl をコントロール用の試料として -20˚C で保存した。

Ⅱ．２．４．１．４　ChAP（アフィニティ精製）法

細胞破砕液 1.5ml を分注した 2 ml チューブに各 50 µl の His-Tag Isolation & Pulldown（Dynabeads Life Technologies）を加え、室温で一晩回転した。この反応液を遠心（5000 rpm、1 分間、室温）し、マグネティックスタンドを用いて上清を取り除いた。次いで、各 2 ml チューブに 1.5 ml の UT バッファーを加え、ビーズを完全に懸濁した後、マグネティックスタンドを用いて上清を取り除く作業を 5 回繰り返した。その後、200µl の 溶出 バッファー（100 mM Tris-HCl [pH 7.5]、500 mM Imidazole [pH 7.5]、1% SDS、10 mM DTT）を加え、2 分以上攪拌

しビーズを完全に懸濁した後、遠心分離（15000 rpm、5 分間、室温）し、マグネティックスタンドを用いて抽出液を回収した。

Ⅱ．２．４．１．５　限外濾過による RNAP‐DNA 複合体の精製

ChAP（アフィニティ精製）法により精製された RNAP‐DNA 複合体のうち、分子量 100kDa 以下の DNA 断片、タンパク質等を除去するために、限外濾過による精製を行った。Amicon Ultra – 0.5mL Centrifugal Filters Ultracel – 100K (Millipore)にアフィニティ精製した溶液を 400µl、もしくはコントロール用に保存した細胞破砕液上清 100µl に M-wash バッファー（100 mM Tris-HCl [pH7.5], 1% SDS、10 mM DTT）300µl を加えた試料をセットし、遠心（13000 rpm、10 分間、室温）した後、素通り画分を取り除いた。再度、カラムに 400µl の M-wash バッファーを加え、遠心（13000 rpm、10 分間、室温）し、素通り画分を取り除いた。この作業を 3 回繰り返し、最終的に、遠心（5000 rpm、3 分間、室温）して濃縮サンプルを回収した。サンプルには、M-wash バッファーを加え、最終容量が 50µl になるように調整した。

タンパク質の複合体解析は、溶出液 20µl に 5×SDS サンプルバッファーを加え、90˚C、30 分間加熱した後、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを用いてタンパク質を検出した。

RNAP‐DNA 複合体からの DNA の精製は、アフィニティ精製を行った試料 30µl には M-wash バッファー 70µl を加え、コントロール用の試料 10µl には M-wash buffer 90µl を加え、これらを 65˚C で一晩反応した。この反応液に QIAquick PCR Purification kit（Qiagen Germany）を用いて DNA を精製し、Nucrease free water で溶出し 50µl に調整した。アフィニティ精製を行った試料を ChAP DNA 画分、コントロール用の試料は 10 ng/µl に調整して Sup. DNA 画分とした。

Ⅱ．２．４．２　ChAP によって共精製された DNA の chip よるマッピング

Ⅱ．２．４．２．１　Round-A（共精製された DNA に対するタグ配列の付加）

Round-A は Sequenase Ver2.0（USB）を用いて行った。ChAP DNA は、精製後の、44µl の DNA 溶液をエタノール沈殿し、7 µl の TE[pH 8.0]に溶解した。ChAP DNA の反応は、7 µl の濃縮した ChAP DNA 溶液、2 µl の 5×Sequenase バッファー、1 µl の 1 µl の PF43 プライマー（100 pmol/µl）を混合し、全量 10 µl で反応させた。一方、Sup. DNA は 10 ng/µl の 7 µl の Sup. DNA 溶液、2 µl の 5×Sequenase バッファー、PF43 プライマー（100 pmol/µl）を混合し、全量 10 µl で反応させた。反応は、 94˚C で 2 分間 加温した後、10 ˚C で 5 分間 冷却（冷却している間に reaction mix [5×Sequenase バッファー 1 µl, 3 mM dNTP 1.5 µl, 100 mM DTT 0.75 µl, 0.5 mg/ml BSA 1.5 µl, Sequenase 0.3 µl] (全量 5.05 µl) を各反応液に加えた）し、 10˚C から 37˚C まで 10 分間かけて昇温 させた後、 37˚C で 8 分間 反応を行った。続いて、94 ˚C で、2 分間加温した後、10 ˚C で 5 分間冷却した（この間に Sequenase buffer により希釈した sequenase [sequenase dilution バッファー 0.96 µl, Sequenase 0.24 µl], (全量 1.2 µl) を各反応液に加えた）。その後、10 ˚C から 37 ˚C まで 10 分間かけて昇温させた。この反応液に 585 µl の滅菌水を加え、 混合した後、 Amicon Ultra – 0.5mL Centrifugal Filters Ultracel – 30K (Millipore) を用いて反応液を 15 µl まで濃縮した。

Ⅱ．２．４．２．２　Round-B（タグを付加した DNA の増幅）

Round-B は東洋紡 の KOD-Plus-を用いて行った。反応組成は Round-A で濃縮した DNA 15 µl、KOD-Plus- DNA polymerase 2 µl、10×buffer for KOD-Plus- 10 µl、2mM dNTPs 10 µl、25 mM $MgSO_4$ 6.4µl、PF44 プライマー（100 pmol/µl）1 µl、全量 100 µl とし、反応を行った。反応条件は、熱変性を 94˚C、2 分間行った後、熱変性を 94 ˚C、15 秒間、アニーリングを 52 ˚C、30 秒間、伸長反応を 72˚C、1 分間を Sup. DNA については 20 サイクル、 ChAP DNA については 30 サイクル行った。増幅産物に 500 µl の滅菌水を加え、Amicon Ultra – 0.5mL Centrifugal Filters Ultracel – 10K (Millipore) を用いて反応液を濃縮し、Nuclease free water で全量を 50 µl に調整した。 5 µl の DNA 溶液と 75 µl の Nuclease free water を混合し、分光光度計 （Ultrospec 2100 *pro*、Amersham） を用いて DNA 濃度を測定した。

Ⅱ．２．４．２．３　DNaseI 処理

DNaseI（Amersham）を用いて行った。反応組成は 10×one-Phor-All-buffer 5µl、標識する DNA (~5 µg)、Nuclease free water を混合し、全量を 50 µl とした。次に、DNaseI を 0.6 U/µg-DNA になるように添加した。反応条件は 37 ˚C で 10 分間 加温した後、98˚C で 10 分間、加温した。反応を、1µl の 0.5M EDTA を加えて停

止させたのち、反応液 5 µl を 2%アガロースゲル電気泳動し、100 bp 以下のバンドが得られたことを確認した。

Ⅱ．２．４．２．４　DNA の標識

DNA 消化した反応液は、 BioArray Terminal Labeling Kit （Enzo） を用いて付属のマニュアルに従って DNA の標識反応を行った（２．４．４参照）。

Ⅱ．２．４．２．５　Genechip 上のアレイプローブとハイブリダイゼーション

本解析で使用した Genechip は、枯草菌のゲノム配列を両鎖について 9 bp の間隔で隙間なく網羅したプローブを持つカスタムアレイである （Affimetrix） (Ishikawa *et al*., 2007; Chumsakul *et al*., 2011; Kusuya *et al*., 2011)。アレイプローブとのハイブリダイゼーションは Hybridization oven 640 （Affimetrix）を用いて行った。 洗浄と染色は GeneChIP fluidics station 450 （Affimetrix）を用いて、Affimetrix のマニュアルに従って行った。

Ⅱ．２．４．２．６　ハイブリダイゼーションシグナルの解析

ハイブリダイゼーションシグナルの解析は Gene ChIP Scanner 3000（Affimetrix）および、Affymetrix 社から提供されている Genechip 解析プログラムである GCOS を用いた。GCOS により得られたプローブごとの蛍光強度（.cel ファイル）を In silico MolecularCloning (インシリコバイオロジー株式会社) に取り込み、全プローブの平均値が 500 になるように標準化した。

Ⅲ．結果

Ⅲ．１　菌株の構築と変異型 RpoA の生育への影響の評価

Ⅲ．１．１　菌株(SMS08 株、SMS09 株、SMS10 株、SMS18 株および SMS19 株)の構築

α-CTD は枯草菌の生育に必須であることが示唆されている(Zhang *et al.*, 2006)。したがって、α-CTD をコードする *rpoA* 遺伝子の 3'側領域を削除できない可能性が高い。そこで、本研究では、野生型 RpoA の発現と、変異型 RpoA の発現を調節することが可能な菌株を作成し、枯草菌の菌体内で α-CTD の機能を解析した（図３．１）。

最初に、枯草菌染色体上に存在する *rpoA* 遺伝子の発現が、IPTG を培地に添加することにより誘導可能な枯草菌株を作成した。*rpoA* は、翻訳開始因子をコードする、*infA*、リボソームサブユニットをコードする、*rpmJ*、*rpmM*、*rpmK*、*rplQ* と共に、オペロンを形成しており、その転写開始点は、*infA* の上流に存在する（Boylan *et al.*, 1989）。そこで、IPTG の培地への添加により、発現誘導が可能な、P*spac* プロモーターを *rpoA* と *rpmK* の間に挿入し（SMS01 株、図３．１．A）、野生型 *rpoA* および *rpoA* の下流に存在する *rplQ* が、培地に IPTG を添加した場合にのみ発現する株を作成した。次に、キシロースの培地への添加により誘導可能な P*xyl* プロモーターの下流に変異型 *rpoA* と *rplQ* を付加し、枯草菌染色体上の *amyE* 領域に挿入した株を構築した（SMS03 株、図３．１．B 中段）。*rplQ* を付加する理由は、SMS01 株では、*rplQ* の発現も IPTG により制御されるため、IPTG が存在しない培養条件においては、*rplQ* も発現しなくなるためである。

変異型 *rpoA* 遺伝子は、α-CTD を構成する 5 つのサブドメインを全て欠失させるよう、*rpoA* 遺伝子の 733 bp から 931 bp までを削除した。この削除により、変異型 RpoA は、α-CTD の立体構造を形成する 66 残基のアミノ酸が欠失する一方、ドメインに含まれない最後尾の 4 残基のみが残る（図３．２）。コントロール株として、キシロースにより野生型 RpoA と RplQ の発現を誘導することが可能な株（SMS02 株、図３．１．B 上段）と、キシロースにより RplQ のみの発現誘導が可能な株（SMS04 株、図３．１．B 下段）を作成した。次に、これらの株を、P*spac* プロモーターを *rpoA* 遺伝子上流に挿入した SMS01 株から抽出されたゲノム DNA を用いて形質転換し、野生型 RpoA の発現が IPTG で制御され、同時に、野生型 RpoA と RplQ、変異型 RpoA と RplQ、RplQ のみの発現が、キシロースで制御される株（SMS05、SMS06、SMS07 株）を構築した。

これらの株に加え、RNAP 複合体の解析および RNAP の ChAP-chip 解析に必

要とされる、RNAP のアフィニティー精製を可能にするため、SMS05、SMS06、SMS07 株の RpoC に His タグを付加した株（SMS08 株、SMS09 株、SMS10 株）、および、野生型 RpoA および変異型 RpoA の ChAP-chip 解析に必要となる、野生型 RpoA に His タグを加えた形（RpoA-His）で発現させる株（SMS18）および変異型 RpoA に His タグを加えた形で発現させる株（SMS19）を作成した。

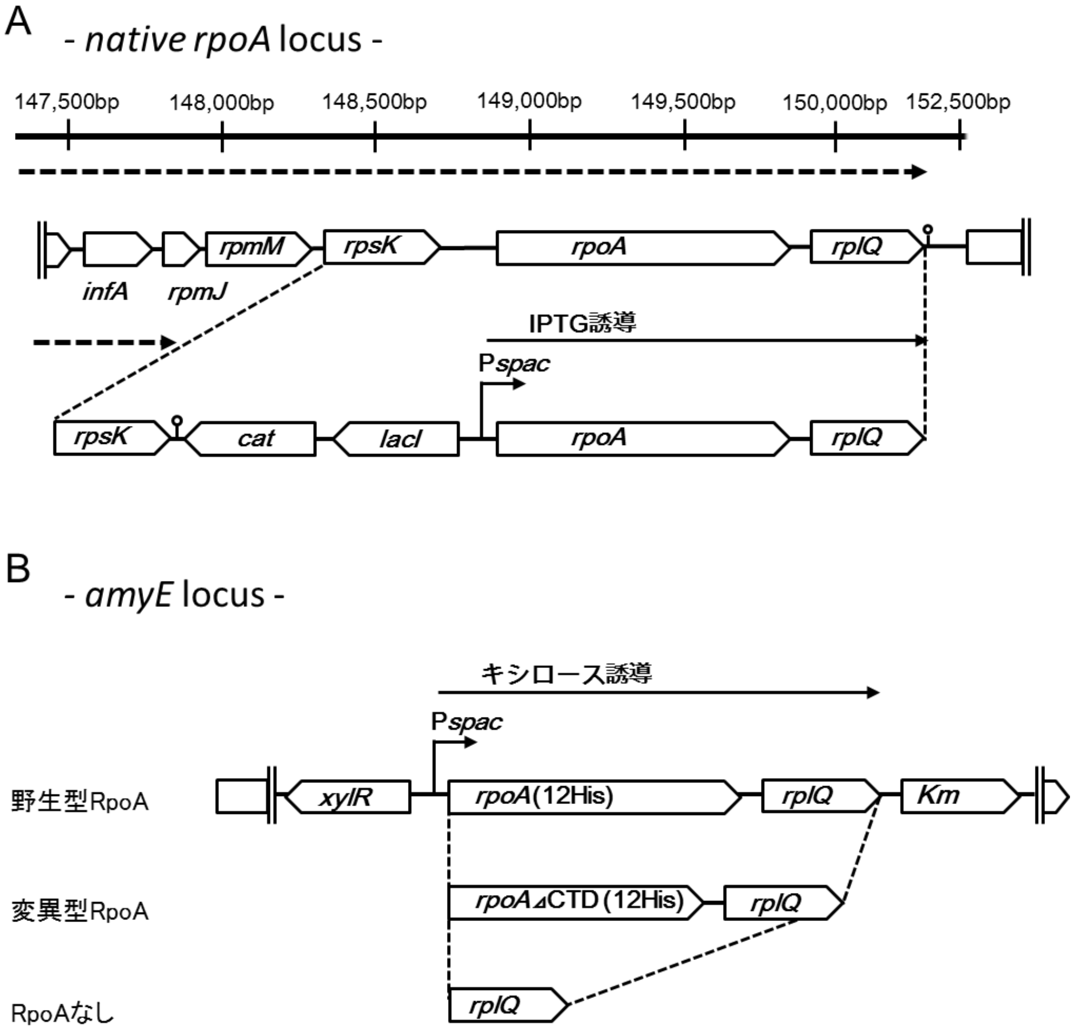


図３．１　野生型 RpoA と変異型 RpoA の誘導を切り替えるシステム

A.　従来 *rpoA* 遺伝子があった位置には、遺伝子上流に IPTG により誘導できるプロモーター、P*spac* を挿入した。破線は、*rpoA* 遺伝子を含むオペロンの転写領域を表す。下段は、P*spac* 挿入後に構成される転写ユニットを示しており、野生株に存在する転写が、*rpoA* 遺伝子の手前で停止する一方、P*sapc* により *rpoA* および *rplQ* 遺伝子の転写が誘導される。

B.　 P*xyl* により制御される遺伝子座を示す。キシロースにより誘導可能な P*xyl* と共に野生型、変異型 *rpoA* 遺伝子と *rplQ* 遺伝子および P*xyl* と *rplQ* 遺伝子を *amyE* 領域に挿入した。P*xyl* により発現が誘導されると、*rpoA* と共に *rplQ* が発現する。

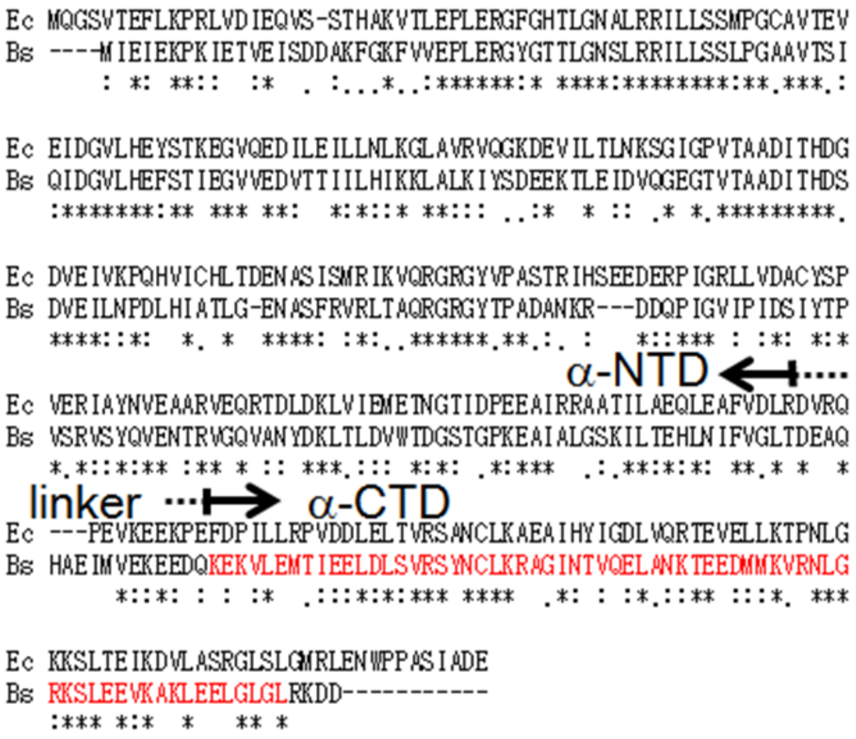


図３．２ 変異型 RpoA のデザイン

上段に大腸菌 RpoA のアミノ酸配列(Ec)、下段に枯草菌 RpoA のアミノ酸配列(Bs)を示す。α-NTD←は、αサブユニットの N 末端ドメイン（α-NTD） とリンカー領域の境界を、→α-CTD は、α サブユニットの C 末端ドメイン(α-CTD)とリンカー領域の境界を示している。変異型 RpoA は α-CTD に含まれる、構造を取る全てのサブドメインを含む 66 残基のアミノ酸（赤字）を欠失している。

Ⅲ．１．２　変異型 RpoA の発現による枯草菌の固形培地(LB プレート)における生育への影響

構築した株における、IPTG による RpoA 発現の制御、キシロースによる RpoA と変異型 RpoA 発現の制御、変異型 RpoA 発現が菌の生育に及ぼす影響を確認した（図３．３）。何も加えない LB プレートに、SMS08 株、SMS09 株、SMS10 株および 168RpoC-His 株を塗布した場合、P*spac* プロモーターを *rpoA* 上流に挿入していない 168RpoC-His 株（野生型株）を除き、全ての株はコロニーを形成できなかった。一方、SMS08 株、SMS09 株、SMS10 株の生育は、添加する IPTG 濃度が高くなるにつれて良くなった。このことは、*rpoA* 上流に挿入された P*spac* プロモーターに依存して、*rpoA* 遺伝子が発現していることを示している。

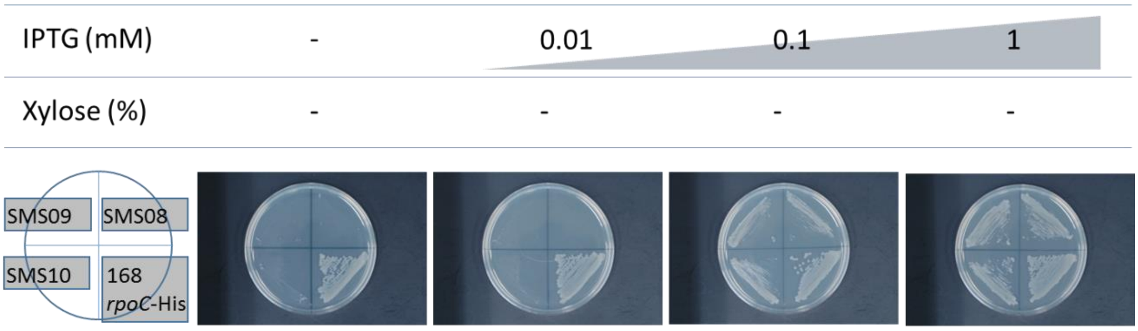


図３．３　IPTG を加えた LB プレート上での、SMS08、SMS09 および SMS10 株の生育

図上段に L プレートに添加した IPTG の濃度、中段に、添加されたキシロースの濃度、下段に、LB プレートの写真を示した。塗布した菌株は、写真左の円の中に示した。

次に IPTG を添加せず、キシロースのみを添加した LB プレートに構築した菌株を塗布し、その生育を観察した（図３．４）。野生型 *rpoA* を P*xyl* 下流に有する SMS08 株はコロニーを形成した。一方で、変異型 *rpoA* を持つ SMS09 株、および *rplQ* のみを有する SMS10 株は生育しなかった。また、野生型 RpoA を誘導した SMS08 株の生育はキシロース濃度に依存した。これらの結果は、構築した株では、P*xyl* プロモーターがキシロース濃度に依存して活性化していること、および以前に示唆されていたように(Zhang *et al*., 2006)、α-CTD が枯草菌の生育に必須であることを示している。

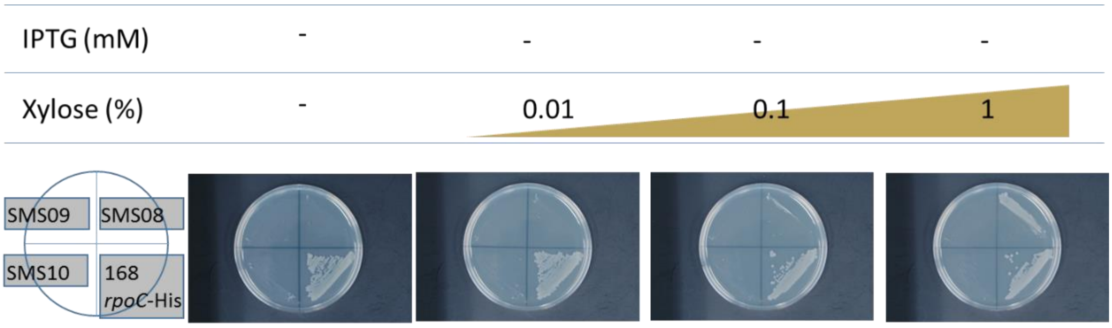


図３．４　キシロースを加えた LB プレート上での、SMS08、SMS09 および SMS10 株の生育

図上段に L プレートに添加した IPTG の濃度、中段に、添加されたキシロースの濃度、下段に、LB プレートの写真を示した。塗布した菌株は、写真左の円の中に示した。

大腸菌では、α-CTD を欠失した RpoA を発現させた場合、野生型 RpoA が発現している場合でも、大腸菌の生育が阻害されることが報告されている（Hayward *et al.*, 1991）。プレートに生育に十分な濃度の IPTG(1mM IPTG)と共にキシロースを加え、枯草菌を培養したところ、枯草菌の生育に大きな変化は見られなかった（図３．５）。一方、キシロースによる誘導をかけた状態で、IPTG 濃度を減らした場合、野生型 RpoA をキシロース依存的に発現している SMS08 株は安定してコロニーを形成した（図３．６）。このことは、構築した SMS08 株の P*xyl* による *rpoA* の発現量が、枯草菌の生育を維持するために十分であることを示している。

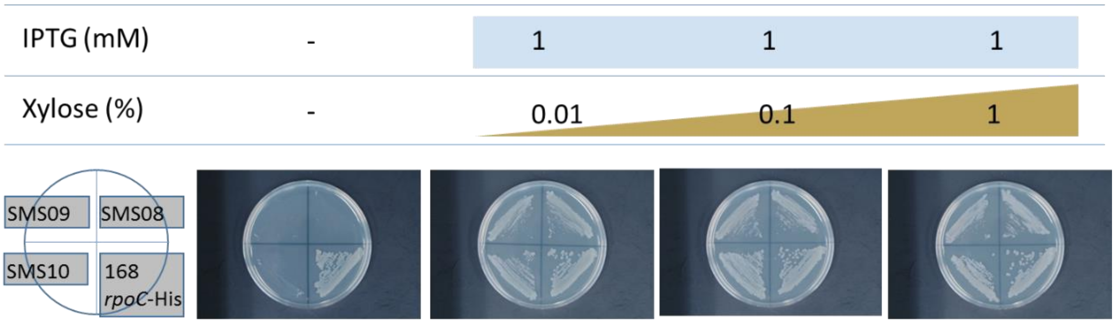


図３．５　IPTG 濃度を一定とし、キシロース濃度を変化させた場合の LB プレート上での、SMS08, SMS09 および SMS10 株の生育

図上段に L プレートに添加した IPTG の濃度、中段に、添加されたキシロースの濃度、下段に、LB プレートの写真を示した。塗布した菌株は、写真左の円の中に示した。それぞれの番号に対応する菌株名は下に示した。

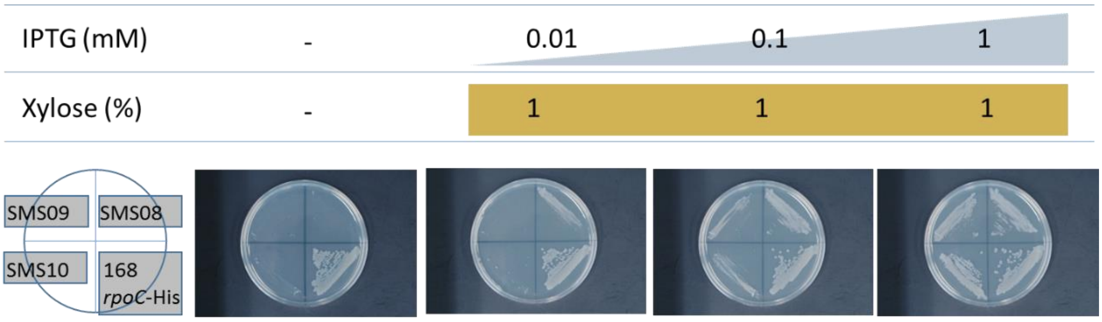


図３．６　キシロース濃度を一定とし、IPTG 濃度を変化させた場合の LB プレート上での、SMS08, SMS09 および SMS10 株の生育

図上段に L プレートに添加した IPTG の濃度、中段に、添加されたキシロースの濃度、下段に、LB プレートの写真を示した。塗布した菌株は、写真左の円の中に示した。それぞれの番号に対応する菌株名は下に示した。

Ⅲ．１．３　変異型 RpoA の発現による枯草菌の液体培地(LB 培地)における生育への影響

次に、SMS09 株を IPTG を添加した液体培地（LB 培地）を用いて対数期まで培養した後、キシロースを添加した LB 培地で生育させた場合に、どのような影響が表れるかを確認した（図３．７）。

キシロースを添加した培地において、野生型 RpoA が発現する SMS08 株は約 1.0 時間の倍加時間で増殖した（図３．７、緑線)。一方、キシロース添加培地において、変異型 RpoA が発現する、SMS09 株は、キシロース添加培地への変換後、2 時間目までは、SMS08 株と同じ生育速度で増殖したが、その後、増殖速度が低下し、約 1.9 時間の倍加時間で、少なくとも 6 時間、生育した（図３．７、青線)。一方、RpoA が供給されない SMS10 株の生育は 3 時間目で停止し、その後、菌株の溶菌と思われる、培養液の濁度低下が観察された（図３．７、赤線)。このことから、変異型 RpoA を発現している SMS09 株も、キシロース添加培地における培養開始から 6 時間目までは、増殖することが明らかとなった。そこで、この培養条件を利用し、変異型 RpoA の細胞内の機能を解析することにした。

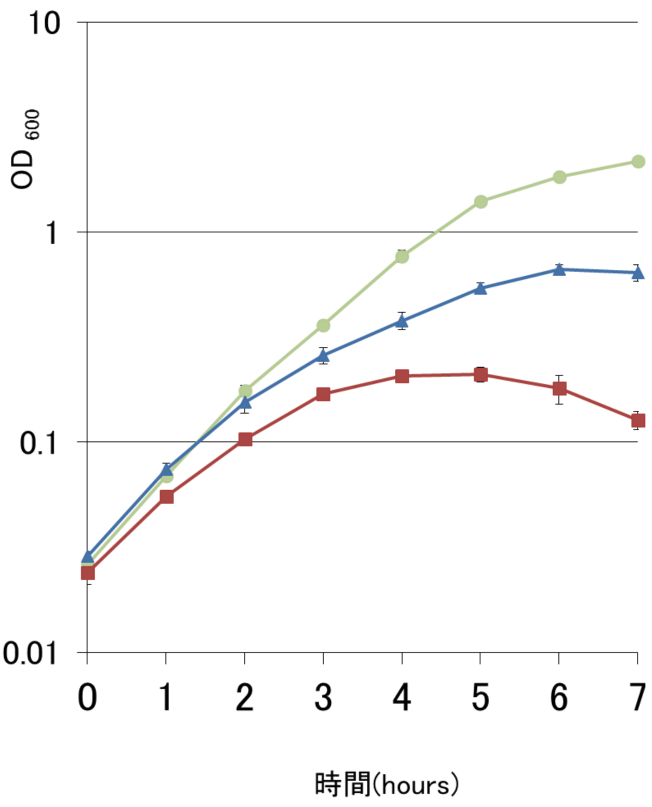


図３．７　野生型 RpoA、変異型 RpoA および RplQ のみを発現する枯草菌株の生育曲線

縦軸に培養液の菌濁度（OD_{600}）、横軸に IPTG を添加した LB 培地からキシロースを添加した LB 培地への変換後の培養時間を示した。緑線：SMS08 (野生型 RpoA 発現株)、青線：SMS09 (変異型 RpoA 発現株)、赤線：SMS10 (コントロール株[RplQ のみ発現])

Ⅲ．１．４　変異型 RpoA を発現した枯草菌における RNAP 複合体の解析

発現した変異型 RpoA が細胞内の RNAP 中に存在する野生型 RpoA と入れ替わるかどうかを確認するために、キシロース添加培地で培養した変異型 RpoA 発現株（SMS09 株）から RNAP 複合体を精製、その構成要素を解析した。

RNAP 複合体は、ニッケルレジンを用いたアフィニティー精製により行った(詳細はⅡ．２．２に記載)。

細胞抽出液を用いたウェスタンブロッティングの結果、SMS08 株では、キシロース添加培地を用いた培養中、野生型 RpoA がほぼ一定の量、発現していることが示唆された（図３．８）。加えて、精製 RNAP を用いたウェスタンブロッティングの結果から、RNAP 中の RpoA の量は、キシロース添加培地での培養中、一定であることが示唆された。

一方、SMS09 株の細胞抽出液を用いたウェスタンブロッティングの結果から、キシロース添加培地を用いた培養中、SMS09 株では、継続的に細胞内の野生型 RpoA の量が減り、変異型 RpoA が誘導されていることが示された。さらに、精製 RNAP を用いた、ウェスタンブロッティングの結果から、変異型 RpoA が RNAP に組み込まれていることが確認された。

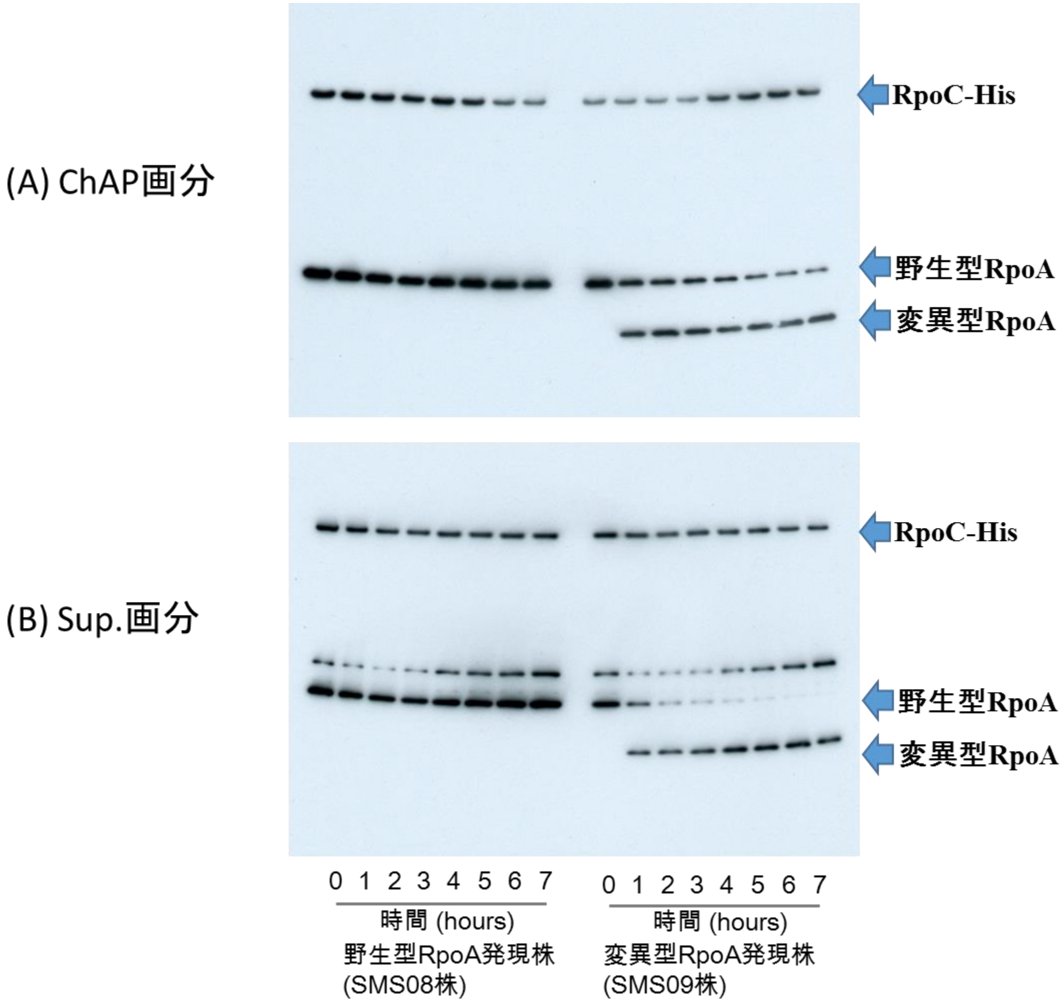


図３．８　細胞抽出液および精製 RNAP のウェスタンブロッティング

(A)精製した RNA ポリメラーゼ（RNAP）、(B)細胞抽出液のウェスタンブロッティングの結果を示す。RpoC および RpoA の位置は、それぞれの写真の右側に示した。電気泳動に用いた精製 RNAP の量は、SDS-PAGE による定量を行い、全てのレーンの精製 RNAP の量が一定になるように調整した。細胞抽出液の電気泳動は、菌濁度(OD_{600})を参照し、全てのレーンの用いる細胞抽出液が、一定の菌体量から抽出されたものになるよう調整し、電気泳動を行った(5-20%グラジエントゲル)。それぞれのサンプルに対応する、サンプリング時間は、キシロース添加培地による培養開始後の時間として、写真下に記した。

次に RNAP 内に組み込まれた野生型 RpoA と変異型 RpoA の量比を、定量した。精製 RNAP を SDS-PAGE により分離した後、定量性に優れた蛍光染色（フラミンゴ、BioRad）(Ball *et al.*, 2007) を用いて、直接染色し、RpoC、RpoA に対応するバンドを定量した（図３．９）。まず最初に、定量した RpoC のバンドのシグナル強度に対する、RpoA のバンドのシグナル強度の相対値を計算することで、RNAP 中の RpoA の量を決定した。次に、決定した RpoA 量を用いて、キシロース培地での培養開始前(0 時間)に精製した RNAP 中の野生型 RpoA に対して、培養開始後の、各サンプリング時間における、精製 RNAP 中の野生型 RpoA の割合を計算した。その結果、野生型 RpoA を発現している SMS08 株の RNAP には、キシロース添加培地での培養期間中、RpoA が一定量存在していることが示された（図３．１０、青線）。一方、SMS09 株では、キシロース添加培地における培養開始後 3 時間で、RNAP に含まれている変異型 RpoA の割合が、培地置換前の 40 パーセント以下となった（図３．１０、オレンジ色の線）。また、培養開始後、3 時間を過ぎると、RNAP 中の野生型 RpoA 量の減少速度は低下した。他方、各サンプリング時間における変異型 RpoA の精製 RNAP 中の量を、培養開始後 6 時間後の精製 RNAP 中の変異型 RpoA の量に対する相対値として解析した（図３．１０、黒色の線）。その結果、変異型 RpoA の量は、キシロース添加培地における培養開始後 3 時間で、6 時間後の RNAP 中の変異型 RpoA の量と、ほぼ変わらない量となった。これらの結果から、RNAP に含まれる変異型 RpoA はキシロース添加培地における培養開始後、3 時間で約 60 から 70 パーセントになり、以降数時間はその比率が維持される事が確認された。

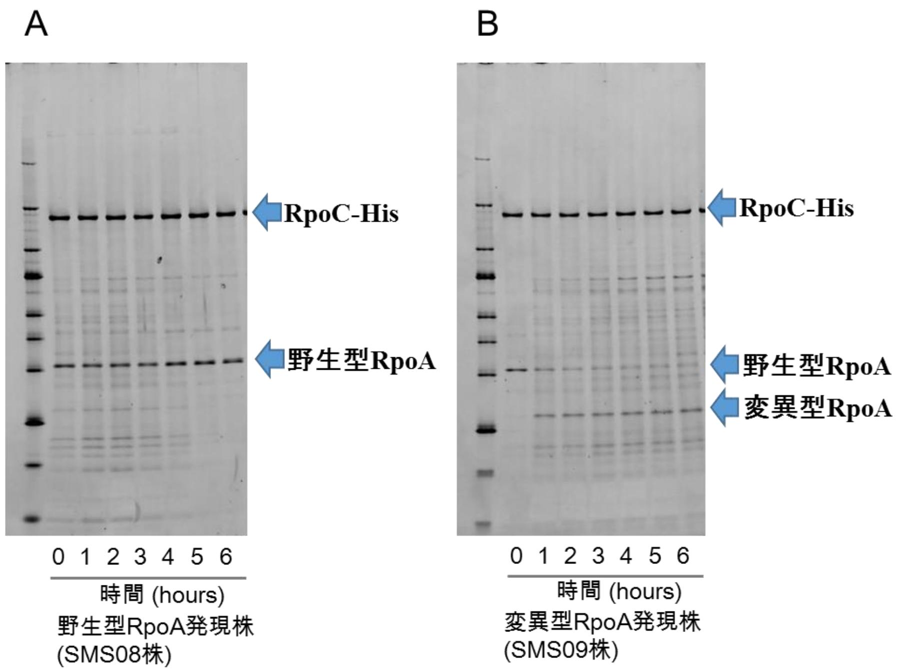


図３．９　蛍光標識した精製 **RNAP** の電気泳動ゲル

(A) SMS08 株から精製した RNAP の電気泳動　(B) SMS09 株から精製した RNAP の電気泳動

サンプリング時間に対応する培地変換後の培養時間を図下に示した。RpoC、野生型 RpoA および変異型 RpoA に対応するバンドの位置は、それぞれの写真の右に示した。 それぞれのサンプルに対応する、サンプリング時間は、キシロース添加培地による培養開始後の時間として、写真下に記した。

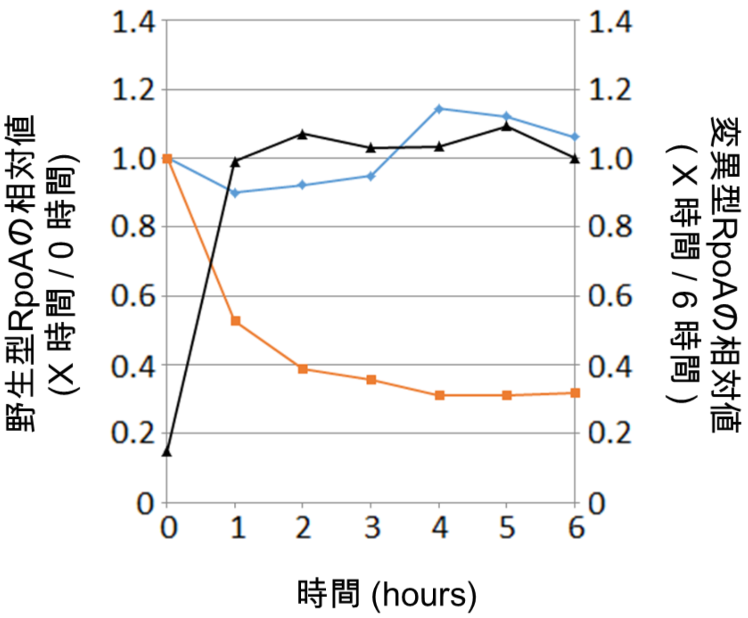


図３．１０　野生型 RpoA と変異型 RpoA の相対的量の比較

培地変換後の培養時間をグラフの下に示す。各時間がサンプリングタイムに相当する。それぞれの線は、以下の計算式に従って出した、RpoA の相対量に応じて示した。RpoA 量 = [RpoA バンドのシグナル強度] / [RpoC バンドのシグナル強度]. 野生型 RpoA の相対量：相対値 (培地変換後 X 時間) = [X 時間後の RpoA 量] / [0 時間後の RpoA 量].　変異型 RpoA の相対量：相対値 (培地変換後 X 時間) = [X 時間後の RpoA 量] / [6 時間後の RpoA 量].

青線：野生型 RpoA 発現株（SMS08 株）の RNAP に含まれる野生型 RpoA の培地変換前（0 時間）に対する、各サンプリングタイム（培地置換後の培養時間）の RNAP に含まれる野生型 RpoA の相対比

オレンジ線：変異型 RpoA 発現株（SMS09 株）の RNAP に含まれる野生型 RpoA の培地変換前（0 時間）に対する、各サンプリングタイム（培地置換後の培養時間）の RNAP に含まれる野生型 RpoA の相対比

黒線：変異型 RpoA 発現株（SMS09 株）の RNAP に含まれる変異型 RpoA の培地変換後 6 時間（6 時間）のサンプルに対する、各サンプリング時間（キシロース培地での培養開始後の時間）の RNAP に含まれる変異型 RpoA の相対比

Ⅲ．２　トランスクリプトーム解析

Ⅲ．２．１　変異型 RpoA 発現株を用いたトランスクリプトーム解析

細胞内で変異型 RpoA が RNAP に組み込まれることによる転写への影響をみるため、野生型 RpoA を組み込んだ RNAP のみが細胞内に存在する SMS08 株と変異型 RpoA を組み込んだ RNAP が細胞内に存在する SMS09 株を用いてトランスクリプトーム解析を行った。変異型 RpoA の誘導後 3 時間で 60 から 70 パーセントが RNAP に組み込まれ、その後、組み込まれる RpoA 量は、大きく変化しない（図３．１０）ことが示されたため、キシロース添加培地での培養開始後 3 時間､経時的にトランスクリプトーム解析を行うことにした。SMS08 株 SMS09 株についてキシロース添加培地における培養開始後(0~3 時間)、計 4 回のサンプリングを行い、回収した菌体から、全 RNA（計 8 種）を回収した。RNA を用いて cDNA を合成し、Affymetirx ジーンチップのハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションシグナルの検出および、そのノーマライゼーションを行った（詳細はⅡ．２．４）。

情報解析に先立ち、解析の精度を低下させる発現量が低い遺伝子を除去した。本解析では、野生型 RpoA 発現株(SMS08 株)、変異型 RpoA 発現株(SMS09 株)について、再現性を確認するために、それぞれの株を用いて、同一の条件で 2 回の実験を行った。したがって、1 つのタイムポイントに 4 つのサンプルが存在する。この 4 つのシグナル強度の合計が 400 より小さい場合、発現量が低い遺伝子と判断し、以降の解析から除外した。

キシロース添加培地における培養開始前 (0 時間) から培養開始後 1 時間にかけて、野生型 RpoA 発現株、変異型 RpoA 発現株共に発現プロファイルが大きく変化した（図３．１１．0 時間 vs 1 時間)。しかしながら、0 時間および 1 時間における野生型 RpoA 発現株、変異型 RpoA 発現株のトランスクリプトームを比較したところ、その相関は非常に高いことが示された（図３．１２．A)。このことから、0 時間から、1 時間にかけてのトランスクリプトームの変化は、SMS08 および SMS09 株双方に共通して起こった現象であり、新たな培地への変更により誘導された転写変化であることが明らかとなった。そこで、本研究では、キシロース添加培地への培地の変換に伴うトランスクリプトームへの影響を考慮し、それぞれのタイムポイントで得られた野生型 RpoA 発現株および変異型 RpoA 発現株のトランスクリプトームを比較することで、変異型 RpoA が RNAP に組み込まれたことにより生じた転写プロファイルの変化を検出することにした。

培地変換前、および培地変換後 1 時間までの、野生型 RpoA 発現株と変異型 RpoA 発現株のトランスクリプトームの変化は、極めて小さかった。それぞれの時間の野生型 RpoA 発現株および変異型 RpoA 発現株の遺伝子発現の相関は、それぞれ r = 0.995 および r = 0.95 であった(図３．１２．A, 0 時間および 1 時間)。

一方、培地変換後、2 時間が経過すると、相関は低下し (図３．１２．A, r = 0.90)、3 時間後には r = 0.83(図３．１２．A, 3 時間)になる。どの時間においても、正の相関がみられることから、発現が変化する遺伝子数は限定されていると考えられるが、変異型 RpoA が発現し、RNAP 内の RpoA が野生型から変異型に置き換わった事により、発現が変化した遺伝子が存在すると考えられた。

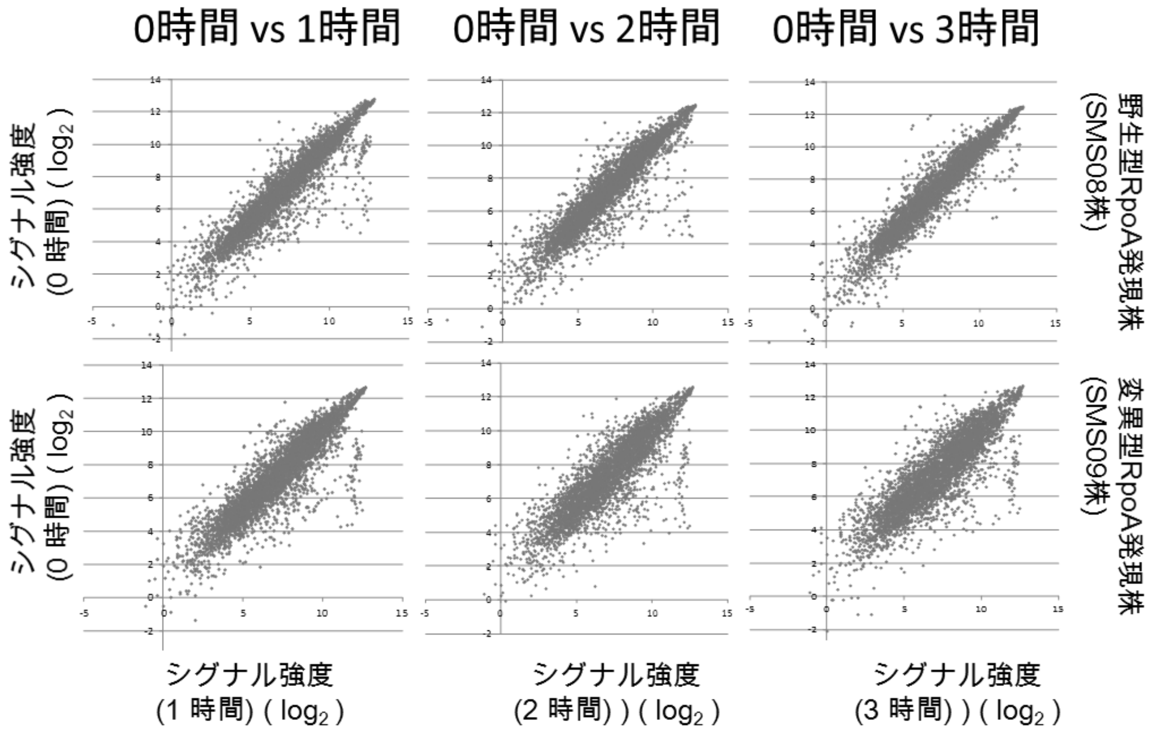


図３．１１　SMS08 株及び SMS09 株におけるタイム 0 からの遺伝子発現の変化

各株（SMS08 株及び SMS09 株）のキシロース添加培地を用いた培養開始後、0 時間のトランスクリプトームと、1 時間、2 時間及び 3 時間のトランスクリプトームを比較した散布図。

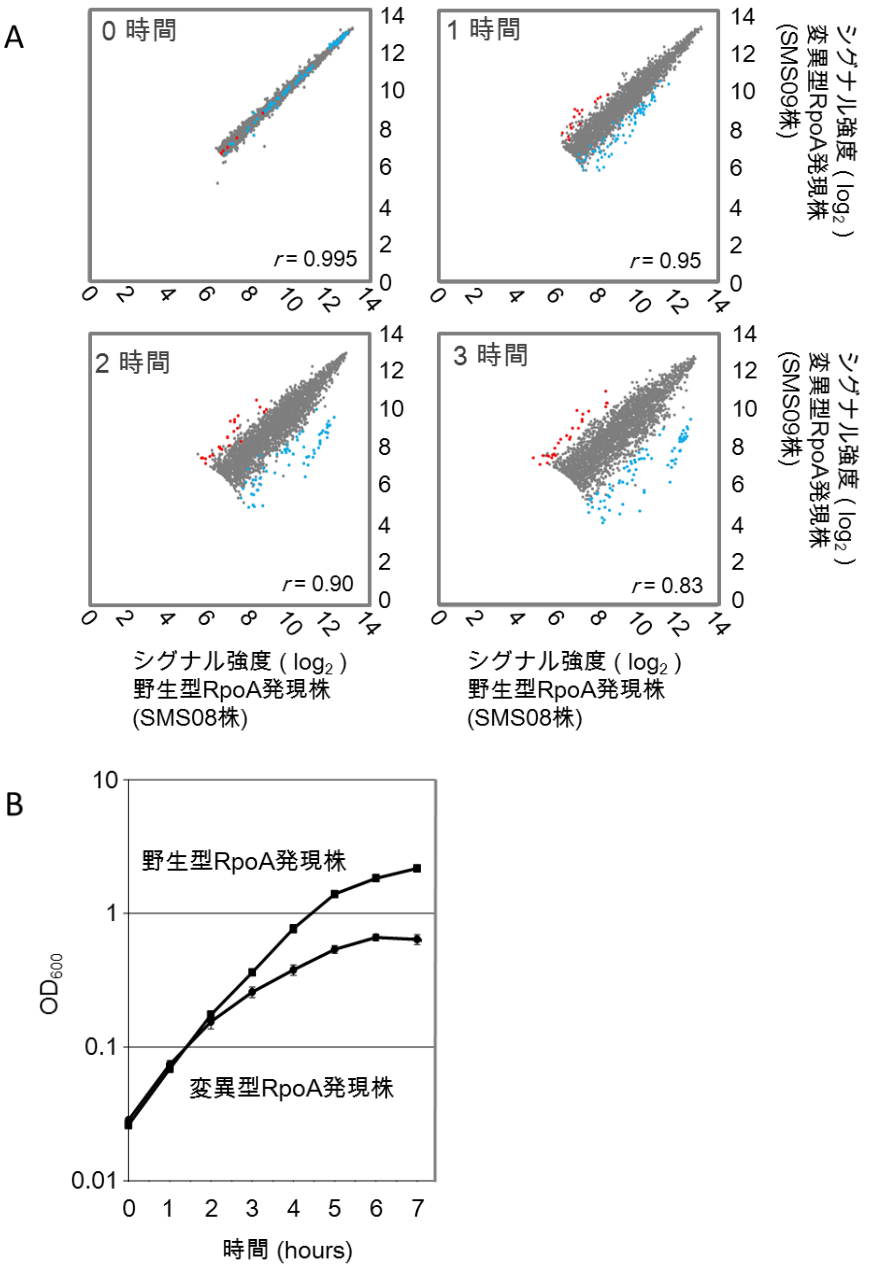


図３．１２　野生型 RpoA もしくは変異型 RpoA を発現させた枯草菌のトランスクリプトーム解析

A. 野生型 RpoA 発現株（SMS08 株)と変異型 RpoA 発現株（SMS09 株)の転写シグナルの散布図（log2 スケール)。縦軸に野生型 RpoA を誘導した SMS08 株、横軸に変異型 RpoA を誘導した SMS09 株を設定した。遺伝子のシグナル強度は、それぞれのサンプリング時間について、2 回の独立した実験の平均値を用いた。4 つの実験の数値の合計が 400 より下回る遺伝子は取り除いた。各タイムポイントの分析に用いた遺伝子数は、タイム 0 : 2755、タイム 1 : 2855、タイム 2 : 2921、タイム 3 : 2956 であった。SMS08 株と比較して、SMS09 株で培養開始後 3 時間目における転写が低下した遺伝子は青、上昇した遺伝子は赤で表した。

B. 野生型 RpoA 発現株（SMS08 株)と変異型 RpoA 発現株（SMS09 株)の生育曲線

Ⅲ．２．２　変異型 RpoA の発現により転写が低下、あるいは増加する遺伝子の探索

変異型 RpoA 発現する SMS09 株と、野生型 RpoA 発現する SMS08 株のトランスクリプトームの比較によって、変異型 RpoA の発現により、発現が変化する遺伝子が存在することが示唆された。そこで、 変異型 RpoA 発現株と野生型 RpoA 発現株を比較し、変異型 RpoA 発現株で発現量が減少した遺伝子を発現低下遺伝子、発現量が増加した遺伝子を発現増加遺伝子として検索した。変異型 RpoA 発現株におけるシグナル強度が、野生型 RpoA 発現株におけるシグナル強度と比べて、0.25 倍あるいは 4 倍（log2 スケールで-2 あるいは 2）になり、加えて、ウェルチの t 検定で、*q* 値が、0.2 以下になる遺伝子を、発現低下および発現増加遺伝子とした。キシロース添加培地での培養開始後 2 時間（タイム 2）では 24 個の発現低下遺伝子、6 個の発現増加遺伝子が検出された(表３．１)。キシロース添加培地での培養開始後 3 時間（タイム 3）では、53 個の発現低下遺伝子、27 個の発現増加遺伝子が検出された（表３．２）（表３．３）。タイム 2 での発現低下および増加遺伝子を、タイム 3 での発現低下および増加遺伝子と比較すると、タイム 2 での発現低下および増加遺伝子のうち、5 遺伝子(発現低下 ; *yhfH, yhzC, ykbA, yokG,* 発現上昇 ; *yhzC*)が、タイム 2 特異的に検出された。しかしながら、これらの遺伝子は、遺伝子発現量が低い（シグナル強度が低い）、*q* 値が高い（遺伝子の発現変化が統計的には有意ではない）、あるいは発現変化が 0.25 倍あるいは 4 倍に及ばない、という理由で、タイム 3 における、発現低下遺伝子、発現増加遺伝子としては検出されていなかった。このことから、タイム 2 で変異型 RpoA 発現株における発現が野生型 RpoA 発現株における発現に対して低下、あるいは増加した遺伝子は、基本的に、タイム 3 で発現が変化した遺伝子に含まれることが判明した。一方、キシロース添加培地での培養開始後 1 時間（タイム 1）では、本解析で設定した閾値以上に、変異 RpoA 発現株において、発現が増加あるいは減少した遺伝子は見いだされなかった。このことから、遺伝子の発現変化は、RNAP に含まれる変異型 RpoA の割合が高まると同時に、増加する傾向があることが示された。

表３．１　**SMS09 株(変異型 RpoA 発現株)**で発現の変化した遺伝子（タイム２）

遺伝子名 [a]	シグナル強度(log_2 スケール)[b]				平均値(log)（変異型 / 野生型）	平均値（変異型 / 野生型）	*p* 値 [c]	*q* 値 [d]
	野生型 RpoA（実験1）	野生型 RpoA（実験 2）	変異型 RpoA（実験1）	変異型 RpoA（実験 2）				
Down−regulated								
srfAA	10.726	10.616	7.242	7.334	−3.383	0.096	0.001	0.100
srfAB	10.888	10.706	7.428	7.771	−3.190	0.110	0.011	0.132
srfAC	11.501	11.404	8.207	8.578	−3.049	0.121	0.028	0.146
srfAD	11.470	11.357	8.728	8.844	−2.628	0.162	0.001	0.105
rapA	8.659	8.596	5.244	4.973	−3.513	0.088	0.018	0.137
pel	9.177	9.232	6.894	6.721	−2.395	0.190	0.013	0.134
ybfS	8.644	8.365	6.140	6.271	−2.305	0.202	0.016	0.135
comS	11.864	11.752	8.442	8.787	−3.184	0.110	0.021	0.139
cotN	8.033	8.100	5.722	5.706	−2.353	0.196	0.006	0.131
yrkA	9.748	10.166	8.021	7.860	−2.029	0.245	0.040	0.161
yveK	8.420	8.246	6.018	5.840	−2.403	0.189	0.003	0.114
yveL	7.820	8.022	5.027	4.982	−2.920	0.132	0.017	0.135
ydhM	8.406	7.986	5.036	5.096	−3.145	0.113	0.039	0.157
yufR	8.241	7.987	5.267	4.995	−2.982	0.127	0.004	0.122
clpE	10.066	10.156	7.779	7.754	−2.345	0.197	0.007	0.132
ybfT	8.183	8.105	5.664	5.681	−2.472	0.180	0.007	0.132
yhfH	9.795	9.496	7.043	6.229	−2.960	0.128	0.059	0.174
yhzC	7.707	7.627	5.300	5.229	−2.403	0.189	0.001	0.100
ykbA	8.147	8.131	6.060	6.135	−2.041	0.243	0.009	0.132
ykrS	10.665	10.634	8.234	8.049	−2.505	0.176	0.020	0.139
ykrT	9.965	9.897	7.153	7.227	−2.741	0.150	0.000	0.100
ykrX	7.434	7.613	5.582	5.399	−2.033	0.244	0.004	0.122
yokG	8.351	8.493	6.282	6.184	−2.191	0.219	0.003	0.114
yokH	7.935	8.788	6.192	5.658	−2.474	0.180	0.056	0.171
Up−regulated								
proH	7.062	6.900	9.429	9.510	2.487	5.607	0.006	0.130

ybcP	5.372	5.406	7.577	7.961	2.393	5.253	0.050	0.167
ybcQ	7.141	7.255	9.427	9.701	2.372	5.175	0.017	0.135
ybcO	7.393	7.409	9.778	9.749	2.363	5.143	0.000	0.100
proJ	8.365	8.208	10.644	10.522	2.296	4.911	0.002	0.113
ybcS	7.197	7.203	9.488	9.417	2.254	4.769	0.010	0.132

a: 発現量の変化した遺伝子名、赤字の遺伝子はタイム２特異的に変化した遺伝子。

b: 再現性を見るために同一条件で２回の実験を行った。それぞれを実験 1、実験 2 とし、本表に記述した。

c , d: *p* 値、*q* 値は welch の t-test により算出した。

表３．２　**SMS09 株(変異型 RpoA 発現株)**で発現の減少した遺伝子（タイム３）

遺伝子名 [a]	シグナル強度(log2 スケール)[b] 野生型 RpoA（実験1）	野生型 RpoA（実験 2）	変異型 RpoA（実験1）	変異型 RpoA（実験 2）	平均値 (log)（変異型 ／ 野生型）	平均値（変異型 ／ 野生型）	*p* 値 [c]	*q* 値 [d]
down								
ydhM	10.141	10.085	4.711	5.256	−5.104	0.029	0.032	0.153
ydhN	9.184	9.030	4.717	4.897	−4.299	0.051	0.001	0.133
yjdE	10.457	10.186	5.372	6.484	−4.295	0.051	0.067	0.179
yjdD	10.469	10.183	5.638	6.456	−4.229	0.053	0.039	0.157
srfAA	11.524	11.531	7.161	7.514	−4.179	0.055	0.027	0.149
srfAB	11.629	11.731	7.221	7.978	−4.032	0.061	0.055	0.170
rapA	9.143	9.319	5.450	5.174	−3.915	0.066	0.004	0.135
ydhO	8.419	8.059	4.233	4.479	−3.889	0.067	0.005	0.138
yveL	8.337	8.271	4.322	4.672	−3.796	0.072	0.024	0.148
yufR	8.575	7.866	4.413	4.838	−3.623	0.081	0.023	0.146
comS	12.326	12.294	8.295	9.012	−3.612	0.082	0.062	0.175
ydhP	8.614	8.553	4.787	5.202	−3.575	0.084	0.033	0.154
mtlA	11.645	11.783	7.591	8.587	−3.542	0.086	0.082	0.193
srfAC	12.032	12.198	8.323	8.877	−3.491	0.089	0.035	0.154
srfAD	12.171	12.118	8.706	8.903	−3.337	0.099	0.012	0.138
mtlD	12.056	12.172	8.236	9.221	−3.304	0.101	0.088	0.198
cotN	8.320	8.410	5.027	5.259	−3.218	0.107	0.010	0.138
clpE	9.671	9.764	6.399	6.780	−3.116	0.115	0.029	0.150
ycxA	9.404	9.499	6.505	6.272	−3.059	0.120	0.010	0.138
yokH	8.468	7.665	4.536	5.594	−2.962	0.128	0.052	0.169
yjdC	10.939	10.481	7.324	8.108	−2.959	0.129	0.037	0.155
yrkA	9.676	9.901	6.564	7.166	−2.897	0.134	0.041	0.159
yveK	8.555	8.613	5.838	5.539	−2.888	0.135	0.027	0.150
yxzC	8.287	8.320	5.446	5.539	−2.810	0.143	0.004	0.135
pel	9.818	10.024	7.224	7.011	−2.803	0.143	0.003	0.135
ybfS	9.357	9.100	6.164	6.755	−2.745	0.149	0.037	0.155
rbsC	8.505	8.508	5.413	6.129	−2.691	0.155	0.083	0.194

ybfT	8.671	8.748	5.986	6.125	−2.652	0.159	0.003	0.135
yxiG	7.974	8.249	5.459	5.482	−2.648	0.160	0.032	0.153
yolJ	7.367	7.691	4.739	5.036	−2.643	0.160	0.007	0.138
ykrS	10.472	10.521	7.900	7.853	−2.620	0.163	0.000	0.133
ywsB	9.012	9.074	6.140	6.688	−2.604	0.165	0.063	0.175
ydhS	7.850	7.591	5.154	5.162	−2.569	0.169	0.032	0.153
rbsA	9.206	9.018	6.411	6.671	−2.568	0.169	0.006	0.138
rapC	10.086	10.275	7.773	7.604	−2.493	0.178	0.003	0.135
ykrT	9.581	9.592	7.003	7.188	−2.488	0.178	0.023	0.146
yonR	9.480	9.573	6.760	7.304	−2.470	0.181	0.062	0.175
yxiF	8.475	8.739	6.098	6.242	−2.441	0.184	0.010	0.138
yfmQ	10.039	10.108	7.689	7.612	−2.423	0.186	0.000	0.133
yxxG	9.700	10.014	7.397	7.580	−2.374	0.193	0.013	0.138
yrhP	9.667	9.699	7.367	7.478	−2.259	0.209	0.009	0.138
yxzG	8.444	8.722	6.300	6.399	−2.239	0.212	0.023	0.146
yhdO	9.770	9.189	7.632	6.926	−2.187	0.220	0.044	0.160
ykrX	7.348	7.617	5.256	5.358	−2.181	0.220	0.021	0.146
yoeB	11.170	11.052	8.762	9.111	−2.165	0.223	0.033	0.154
lmrA	9.302	9.324	7.128	7.260	−2.117	0.230	0.017	0.140
yxiJ	7.731	8.267	5.703	6.087	−2.116	0.231	0.030	0.152
comQ	8.032	7.823	5.647	6.025	−2.083	0.236	0.022	0.146
xpt	7.612	7.757	5.597	5.650	−2.063	0.239	0.011	0.138
wapA	10.324	10.175	8.105	8.279	−2.057	0.240	0.003	0.135
spo0E	11.246	11.300	9.126	9.358	−2.027	0.245	0.028	0.150
ykrZ	7.634	7.580	5.843	5.278	−2.019	0.247	0.085	0.196
rbsR	10.157	9.942	7.719	8.300	−2.015	0.247	0.062	0.175

a: 発現量の変化した遺伝子名。

b: 再現性を見るために同一条件で２回の実験を行った。それぞれを実験 1、実験 2 とし、本表に記述した。

c , d: *p* 値、*q* 値は welch の t-test により算出した

表３．３　**SMS09 株(変異型 RpoA 発現株)**で発現の増加した遺伝子（タイム３）

遺伝子名[a]	シグナル強度(log2 スケール)[b] 野生型 RpoA（実験1）	野生型 RpoA（実験 2）	変異型 RpoA（実験1）	変異型 RpoA（実験 2）	平均値（log）（変異型 ／ 野生型）	平均値（変異型 ／ 野生型）	*p* 値[c]	*q* 値[d]
up								
proH	6.662	7.190	10.251	10.186	3.269	9.641	0.048	0.162
yabG	4.426	5.040	7.880	7.600	2.981	7.895	0.034	0.154
proJ	8.405	8.360	11.359	11.081	2.844	7.182	0.027	0.150
ybcQ	7.164	7.285	9.869	10.111	2.769	6.817	0.009	0.138
ybcO	7.564	7.506	10.276	10.029	2.622	6.157	0.023	0.146
yeeG	5.194	5.289	7.845	7.866	2.614	6.120	0.008	0.138
ybdB	6.285	5.950	8.536	8.845	2.572	5.945	0.008	0.138
ybdA	6.772	6.635	9.227	9.297	2.557	5.885	0.004	0.135
ybcS	7.277	7.143	9.673	9.779	2.516	5.719	0.002	0.135
yisK	6.009	6.055	8.716	8.316	2.497	5.647	0.048	0.163
ywdH	6.435	6.401	8.945	8.868	2.489	5.615	0.003	0.135
ybcT	7.169	7.230	9.571	9.704	2.439	5.424	0.005	0.138
yisT	5.520	5.420	8.179	7.538	2.423	5.363	0.079	0.190
ybdE	5.853	5.792	8.162	8.317	2.419	5.348	0.009	0.138
sacV	4.954	5.233	7.456	7.356	2.307	4.948	0.022	0.146
yoxA	5.361	5.692	7.884	7.746	2.281	4.859	0.023	0.146
yuiF	7.095	6.961	9.383	9.184	2.257	4.781	0.005	0.138
ybdD	6.810	6.428	8.830	8.820	2.194	4.574	0.055	0.170
yxbC	5.588	5.838	7.952	7.846	2.182	4.537	0.017	0.140
pps	8.361	8.475	10.585	10.561	2.154	4.452	0.013	0.138
yrrD	6.075	5.485	7.933	7.945	2.129	4.373	0.086	0.197
yydG	6.448	6.710	8.617	8.749	2.100	4.286	0.015	0.138
ytoA	8.432	8.530	10.648	10.508	2.098	4.280	0.003	0.135
ylbD	5.498	5.835	7.891	7.589	2.071	4.202	0.012	0.138
yufS	5.527	5.354	7.767	7.185	2.062	4.176	0.070	0.182
yoaZ	8.475	8.308	10.406	10.407	2.013	4.036	0.026	0.149

glgB	5.768	5.954	7.796	7.945	2.008	4.023	0.004	0.135

a: 発現量の変化した遺伝子名。

b: 再現性を見るために同一条件で２回の実験を行った。それぞれを実験 1、実験 2 とし、本表に記述した。

c , d: *P* 値、*q* 値は welch の t-test により算出した

Ⅲ．２．３　発現低下遺伝子に含まれる遺伝子のプロモーター上流には、クラスI 型転写活性化因子の結合配列が存在する

枯草菌のプロモーターの情報が収集されているデータベース DBTBS(Sierro *et al.*, 2008)および Bsubcyc(Caspi *et al.*, 2014)を用いて、キシロース培地培養開始後3 時間（タイム 3）において、SMS09 株（変異型 RpoA 発現株）と SMS08 株（野生型 RpoA 発現株）の間で発現が変化した遺伝子のプロモーターと、そのプロモーター上流に存在する転写因子結合配列を探索した。培養開始後 3 時間（タイム 3）における発現低下遺伝子 53 個のうち 40 の遺伝子が、25 の転写単位に含まれており、そのうち 20 の転写単位のプロモーターがデータベースには記述されていた。このうち、転写制御因子を持つものは 17 個あり、そのうち-35 領域より上流に転写活性化因子結合部位を持つプロモーターが、8 個存在した（表３．４）。これらのプロモーターに結合する因子として、4 種類の転写活性因子(ComA, YufM, RemA, ManR)が報告されている。ComA の結合領域がプロモーター上流に存在することが報告されている転写単位は 3 個存在し、6 個の発現低下遺伝子を含んでいる（ *srfA* - *srfAB* - *comS* - *srfAC* - *srfAD, rapA* - *phrA, rapC* - *phrC*)。*maeN* 遺伝子に関しては、YufM による制御が報告されている。RemA は、2 つの発現低下遺伝子、*cotN*(*tasA*)および *yveL*(*epsB*)を含む 2 つの転写単位(*eps, yqxM* - *sipW* - *tasA*) のプロモーター上流に結合領域が存在することが報告されている。ManR に制御されている 2 つの転写単位（ *manPA* - *yjdF, manR*)は、3 つの発現低下遺伝子(*yjdE, yjdD* および *yjdC*)を含んでおり、そのプロモーター上流に ManR 結合配列が存在することが報告されている（表２．４）。興味深いことに、これらの転写因子の結合配列は、転写開始点の上流 60bp から 80bp の全体、あるいは一部を含んでいた（表３．４）。この領域（転写開始点上流 60bp から 80bp）は、クラス I 型転写活性化因子が結合し、機能する領域として知られており(Browning *et al.*, 2004)、転写因子による転写の活性化のためには、プロモーターに結合した RNAP の α-CTD と転写因子が相互作用する必要があることが明らかになっている。実際に *srf* 遺伝子において α-CTD と ComA の相互作用が報告されている(Zhang *et al.*,2006)。ComA を除く、上述の転写活性化因子と α-CTD が相互作用し、転写を活性化するかどうかの報告はこれまでないが、今回の解析により、ComA, YufM, RemA, ManR は、発現低下遺伝子のプロモーター上流に結合し、α-CTD と相互作用して転写を活性化する可能性があることが示された。

一方、転写制御因子（ CcpA, CtsR, YycF, LmrA, SinR, AbrB ）の結合サイトが、発現低下遺伝子を含む 9 個の転写単位（ *gumBACDEFG, clpE, rbsRKDACB, gamAP, wapA* - *yxxG, yoeB, lmrAB, xpt* - *pbuX, spo0E*)の、-10 領域と転写開始点近傍に結合し、転写を負に制御することが報告されている（表３．４）。したがって、これらの転写制御因子は、プロモーターに結合し、直接転写を抑制する転写抑制因子

であると考えられる。興味深いことに、本解析では、これらの遺伝子が、α-CTD の欠損により発現が低下することが示された。

YycFG (WalRK) は二成分制御系として機能する転写制御因子であり、細胞壁代謝と細胞分裂を調節し、枯草菌の生育に必須である。また、LB 培地で枯草菌を培養した場合に、YycFG が細胞内で機能していることが報告されていることから(Fukuchi *et al.*, 2000; Bisicchia *et al.*,2007)、YycFG が本解析に用いられた培養条件でも、機能している可能性が強い。興味深いことに、α-CTD を欠失した RpoA 発現している SMS09 株では、*wapA* および *yoeB* の遺伝子の発現が制御されていた。加えて、すでに報告されている ChIP-chip 解析により、これらの遺伝子のプロモーターには、YycF が強く結合し、発現を抑制することが明らかにされている(Salzberg *et al.*, 2013)。このことから、YycF が、*wapA* および *yoeB* の転写を抑制する一方、α-CTD は、両遺伝子の発現を促進するように機能していると考えられた。α-CTD が、*wapA* および *yoeB* の活性化に寄与する場合、転写を正に制御する転写因子あるいはUP エレメントとの相互作用する可能性があげられる。DBTBS と Bsubcyc データベースには、*wapA* と *yoeB* のプロモーター上流に結合する転写活性化因子の存在は記載されていない(Sierro *et al.*, 2008; Caspi *et al.*,2014)、そこで、それぞれの遺伝子上流に、UP エレメントが存在するかどうかを検討した。大腸菌を用いた解析によって、UP エレメントは転写開始点上流の 41bp から 57bp の領域に存在することが示されている(Gourse *et al.*, 2000)。*wapA* および *yoeB* の転写開始点上流 41bp から 57bp の領域の塩基配列を調べたところ、*wapA* は **AGATAAATTTT**CT**AGAA**、*yoeB* は **AAAAT**A**ATTT**ATGC**AAA** という塩基を有しており、これらの塩基配列は、selex により決定された UP エレメントのコンセンサス配列 AAA(A/T)(A/T)T(A/T)TTTT—AAAA (Ross *et al.*, 1998)と 3 塩基を除き一致していた（表３．５）。大腸菌と枯草菌のゲノム配列の GC 含量は大きく異なり、加えて、枯草菌ゲノムの GC 含量は、大腸菌に比べて低いことから、*wapA* および *yoeB* の転写開始点上流の 41bp から 57bp に存在する塩基配列と、大腸菌で機能している UP エレメントの配列を、単純に比較することは難しいが、大腸菌において、UP エレメントによる転写制御を受けることが良く知られている *rrnB* および *rrnD* の UP エレメントと UP エレメントのコンセンサス配列の違いが、3 および 4 塩基であることを考慮すると、上記 2 つの配列は、UP エレメントとして機能する可能性がある。

表３．４　**SMS09** 株にて遺伝子発現の減少した遺伝子の転写単位と転写調節因子（タイム３）

遺伝子名 [a]	転写単位（DBTBS, bsubcyc)[b]	転写調節因子（DBTBS, bsubcyc)[c]
down (タイム 3)		
ydhM	gmuBACDREFG	CcpA (negative), GmuR (negative)
clpE	clpE	CtsR (negative: −33:−9, −5:+20, +40:+63, −5:+19, +42:+66)
comQ	comQX	
yveL	eps	SinR (negative: −163:−124, −73:−48), RemA (positive: −108:−52) (BC)
yveK	eps	
ybfT	gamAP (BC)	YbgA (negative) (BC)
ydhN	gmuBACDREFG	
ydhO	gmuBACDREFG	
ydhP	gmuBACDREFG	
ydhS	gmuBACDREFG	
lmrA	lmrAB	LmrA (negative: −21:+21)
yufR	maeN	YafM (positive: −86:−23)
yjdE	manPA−yjdF (BC)	ManR (positive: −75:−32) (BC)
yjdD	manPA−yjdF (BC)	
yjdC	manR (BC)	ManR (positive: −75:−32) (BC)
mtlA	mtlAD	
mtlD	mtlAD	
ykrS	mtnKA	
ykrT	mtnKA	
ykrX	mtnWXBD	
ykrZ	mtnWXBD	
pel	pel	
rapA	rapA−phrA	ComA (positive: −75:−36), Spo0A (negative)
rapC	rapC−phrC	ComA (positive: −72:+7), CodY (negative)
rbsC	rbsRKDACB	CcpA (negative: −11:+23), AbrB (positive: −133:−67, −4:+29)
rbsA	rbsRKDACB	
rbsR	rbsRKDACB	

spo0E	spo0E	AbrB (negative: −39:−5)
srfAA	srfAA−srfAB−comS−srfAC−srfAD	ComA (positive: −118:−81, −74:−37), PerR (positive: −46:+17), CodY (negative: −74:−37)
srfAB	srfAA−srfAB−comS−srfAC−srfAD	
comS	srfAA−srfAB−comS−srfAC−srfAD	
srfAC	srfAA−srfAB−comS−srfAC−srfAD	
srfAD	srfAA−srfAB−comS−srfAC−srfAD	
yolJ	sunT−bdbA−yolJ−bdbB	
yxxG	wapA−yxxG	YycF (negative: −29:−13) (BC), DegU (negative:−42:−19, +5:+21), YvrH (positive)
wapA	wapA−yxxG	
xpt	xpt−pbuX	PurR (negative: −97:−45)
yfmQ	yfmQ	
yoeB	yoeB	YycF (negative: −38:+3)
cotN	yqxM−sipW−tasA	SinR (negative: −80:−52, −4:+27), RemA (positive: −111:−53) (BC), AbrB (negative: −151:−97, −163:−201) (BC), Spo0A (negative)
ywsB	ywsB	
ycxA	no information	
yokH	no information	
yrkA	no information	
yxzC	no information	
ybfS	no information	
yxiG	no information	
yonR	no information	
yxiF	no information	
yrhP	no information	
yxzG	no information	

yhdO	no information	
yxiJ	no information	

a: 発現量の変化した遺伝子名。

b: 既知の転写単位。黒字は DBTBS に登録されているもの。青字は bsubcyc に登録されているもの。

c: 既知の転写調節因子。黒字は DBTBS に登録されているもの。青字は bsubcyc に登録されているもの。

横の数値は転写開始点(+1)からの距離を表す。

表３．５　SMS09株にて遺伝子発現の増加した遺伝子の転写単位と σ^A プロモーター（タイム３）

遺伝子名 [a]	転写単位 (DBTBS, bsubcyc)[b]	σ^A プロモーターの配列（DBTBS, bsubcyc[BC])[c]
down (タイム 3)		
clpE	clpE	ATCAAAAATTTTTGTGCATAAGACTTGAAAGTCAAAGATAGTCAGAGTATACTATTAATCAAAGT / TTCAGTCTGCTTTGAGCATATTGGTTTGAATGCCGTTAAGTTTGCCGTATACTAATAGTCAAAGA
comQ	comQX	GATTGTTAAAAAACGAAAAACCTGCTGTCCTTTAAATGTCCCATTTAGTAAAATGGAATGGGAGG
yveL	eps	GAACTTATTGGCTTATTTTGCAATTTTTAAATAATAACGTTTTCTTTTATAATCCAATCATTAAC
yveK	eps	
ybfT	gamAP (BC)	AACAAATTTTCAGAAATTAATATTGACAGTTTGATAAGGGCGGTGCTAAATTCGTAATGACAAGT
ydhM	gmuBAC DREFG	GATTATATTTATTTTATAAAAGTATAGACATTTAAAATTAAATGACTATAATAATCAATGTAAGC
ydhN	gmuBAC DREFG	
ydhO	gmuBAC DREFG	
ydhP	gmuBAC DREFG	
ydhS	gmuBAC DREFG	
lmrA	lmrAB	GTCTTTTCATACAATGAATTTTTCTTGACAATTGATGATTGAATCAAGATAATAGACCAGTCACT
yufR	maeN	TGTTTATTAGTTTTTTAACTTAAAAAAATATGAAGTGTTAACGCTTTCTTGTAGACTGTAACAAA
yjdE	manPA-yjdF (BC)	CCGGAACCTATGGTAAAAAAAGCGATTTTAATGAGCTGATTTCGGTATACAGTTGAGACAAGATC
yjdD	manPA-yjdF (BC)	
yjdC	manR (BC)	GGAAGCTTCGGTAAAAAACGAAACTTTTGTCTCTATGATTTTGTTTTATAATGTAAACGGTTTCT

mtlA	mtlAD	no information
mtlD	mtlAD	
ykrS	mtnKA	AAGATTTATATTAAAAAATATATTGACAACTAACTAAATTACCTGTTACCATGTTCATCAACTGA
ykrT	mtnKA	
ykrX	mtnWXBD	GAACCTGTTTACCCAAAAAAGCATTGACAAGACCTTATAACGATGGGATAATTCAAAATAATTTA / AGCATTGACAAGACCTTATAACGATGGGATAATTCAAAATAATTTATAAAATCTATATTTCTTA
ykrZ	mtnWXBD	
pel	pel	no information
rapA	rapA-phrA	TTCGACAATTGCGGTTATTTTGCGTTCTTCTTTTTCTTGTAAATATGATAAAATATGACATATCT
rapC	rapC-phrC	AAAACAAAGATTGCGTGTTTTTCGGGTTGGGACGGCCTATAAACATGATAAAATATGACATAAAC
rbsC	rbsRKDACB	TTAGATTTCTTTTGATATTTTTATTGCTAACTTCGGATTGTTCATGATAATCTATCTATGTAAAC
rbsA	rbsRKDACB	
rbsR	rbsRKDACB	
spo0E	spo0E	TAACTTATTTAATGAAAATATGTTTACAAATAAAGTATAATCTGTAATAATGCACAATAACCCAA
srfAA	srfAA-srfAB-comS-srfAC-srfAD	TGAAACTTTTCACCCATTTTTCGGTGATAAAAACATTTTTTTCATTTAAACTGAACGGTAGAAAG
srfAB	srfAA-srfAB-comS-srfAC-srfAD	
comS	srfAA-srfAB-comS-	

	srfAC–srfAD	
srfAC	srfAA–srfAB–comS–srfAC–srfAD	
srfAD	srfAA–srfAB–comS–srfAC–srfAD	
yolJ	sunT–bdbA–yolJ–bdbB	no information
yxxG	wapA–yxxG	TAAGATAAATTTTCTAGAAAAATATTGTAATGATATTTCAGTCTAGTTAAGATTATTGA**G**TAAAT
wapA	wapA–yxxG	
xpt	xpt–pbuX	GTTCGGGAATTTTTATTTTCAGCCTATGCAAGAGATTAGAATCTTGATATAATTTATTA**C**AATAT
yfmQ	yfmQ	no information
yoeB	yoeB	AAAAAATAATTTATGCAAAAGTATTGTAATCTATCCGTAATTATTGTAACATTTGTAAC**A**TAAGA
cotN	yqxM–sipW–tasA	ACAAAATGAGCGATTTCGGTGTTTTTAAATCTATAAATCGTTGATTATACTCTATTTGT**G**AAGTT
ywsB	ywsB	no information
ycxA		no information
yokH		no information
yrkA		no information
yxzC		no information
ybfS		no information
yxiG		no information
yonR		no information

yxiF		no information
yrhP		no information
yxzG		no information
yhdO		no information
yxiJ		no information

a: 発現量の変化した遺伝子名。

b: 既知の転写単位。黒字は DBTBS に登録されているもの。青字は bsubcyc に登録されているもの。

c: 既知の σ^A プロモーター配列。赤字は-10 領域、-35 領域を表す。太字は転写開始点(+1)を表す。

表３．６　SMS09 株にて遺伝子発現の増加した遺伝子の転写単位と σ^A 以外のプロモーター（タイム３）

遺伝子名 [a]	転写単位 (DBTBS, bsubcyc)[b]	σ[A] 以外のプロモーターの配列 (DBTBS, bsubcyc[BC])[c]	σ因子
down (time 3)			
clpE	clpE		
comQ	comQX		
yveL	eps		
yveK	eps		
ybfT	gamAP (BC)		
ydhM	gmuBAC DREFG		
ydhN	gmuBAC DREFG		
ydhO	gmuBAC DREFG		
ydhP	gmuBAC DREFG		
ydhS	gmuBAC DREFG		
lmrA	lmrAB		
yufR	maeN		
yjdE	manPA-yjdF (BC)		
yjdD	manPA-yjdF (BC)		
yjdC	manR (BC)		
mtlA	mtlAD		
mtlD	mtlAD		
ykrS	mtnKA		
ykrT	mtnKA		
ykrX	mtnWXBD		
ykrZ	mtnWXBD		

pel	pel		
rapA	rapA-phrA		
rapC	rapC-phrC	TAGAGGATTTAGCCCTAGAAGTAGCAAAATATTACTATGAACA	sigH
rbsC	rbsRKDACB		
rbsA	rbsRKDACB		
rbsR	rbsRKDACB		
spo0E	spo0E		
srfAA	srfAA-srfAB-comS-srfAC-srfAD		
srfAB	srfAA-srfAB-comS-srfAC-srfAD		
comS	srfAA-srfAB-comS-srfAC-srfAD		
srfAC	srfAA-srfAB-comS-srfAC-srfAD		
srfAD	srfAA-srfAB-comS-		

	srfAC– srfAD		
yolJ	sunT– bdbA– yolJ– bdbB		
yxxG	wapA– yxxG		
wapA	wapA– yxxG		
xpt	xpt–pbuX		
yfmQ	yfmQ		
yoeB	yoeB		
cotN	yqxM– sipW– tasA		
ywsB	ywsB		
ycxA			
yokH			
yrkA			
yxzC			
ybfS			
yxiG			
yonR			
yxiF			
yrhP			
yxzG			
yhdO			
yxiJ			

a: 発現量の変化した遺伝子名、赤字の遺伝子はタイム２特異的に変化した遺伝子。

b: 既知の転写単位。黒字は DBTBS に登録されているもの。青字は bsubcyc に登録されているもの。

c: 既知の σ^A 以外の σ 因子に依存したプロモーター配列。赤字は-10 領域、-35 領域を表す。太字は転写開始点(+1)を表す。

Ⅲ．２．４ 発現増加遺伝子のプロモーター配列

キシロース培地を用いた培養開始後 3 時間において検出された発現低下遺伝子の発現を制御していることが知られている 23 個のプロモーターうち 22 個は σ^A により認識されるプロモーター配列を持っている（表３．５）。唯一の例外は、*rapC-phrC* オペロンであり、σ^A プロモーター以外にも σ^H により認識されるプロモーターを持っている（表３．６）。一方、培地開始後 3 時間において検出された転写増加遺伝子 27 個（表３．７）を含む転写単位は、10 個 DBTBS および Bsubcyc に登録されていた。この転写単位を制御しているプロモーターは 9 個判明しており（表３．８と表３．９）、3 個が σ^A プロモーター、残りの 6 個は様々なストレスに応答して活性化される代替 σ 因子 σ^B, σ^E, σ^G, σ^K, σ^H により認識されるプロモーターであった（表３．９）。このことから、転写増加遺伝子は、変異型 RpoA が RNAP に組み込まれることにより直接影響を受け、発現が増加したのではなく、変異型 RpoA が RNAP により組み込まれ、様々な遺伝子の発現が抑制されたことにより、生じたストレスにより、間接的に上昇した可能性が高いと考えられた。また、制御されている遺伝子の機能からも、α-CTD の生理的な重要性を示唆することはできなかった。そのため、本解析においては、変異 RpoA 発現株における発現増加遺伝子の、これ以上の詳細な解析は行わなかった。

表３．７　**SMS09 株にて遺伝子発現の増加した遺伝子の転写単位と転写調節因子（タイム３）**

遺伝子名 [a]	転写単位（DBTBS, bsubcyc）[b]	転写調節因子（DBTBS, bsubcyc）[c]
up（タイム 3）		
glgB	glgBCDAP	
proH	proH–proJ (BC)	
proJ	proH–proJ (BC)	
ybcQ	skf	AbrB (negative), PhoP (positive), Spo0A (positive: −64:+4)
ybcO	skf	
ybdB	skf	
ybdA	skf	
ybcS	skf	
ybcT	skf	
ybdE	skf	
ybdD	skf	
yabG	yabG	
ylbD	ylbDE	
yoxA	yoxA–dacC	
yrrD	yrrD	
ywdH	ywdH	
yxbC	yxbCD	AbrB 8negative), Spo0A (positive)
yydG	yydFGHIJ	Rok (negative)
yeeG	no information	
yisK	no information	
yisT	no information	
sacV	no information	
yuiF	no information	
pps	no information	
ytoA	no information	
yufS	no information	
yoaZ	no information	

a: 発現量の変化した遺伝子名。

b: 既知の転写単位。黒字は DBTBS に登録されているもの。青字は bsubcyc に登録されているもの。

c: 既知の転写調節因子。黒字は DBTBS に登録されているもの。青字は bsubcyc に登録されているもの。横の数値は転写開始点(+1)からの距離を表す。

表３．８　**SMS09** 株にて遺伝子発現の増加した遺伝子の転写単位と σ^A プロモーター（タイム３）

遺伝子名[a]	転写単位 (DBTBS, bsubcyc)[b]	σ[A]プロモーターの配列（DBTBS, bsubcyc[BC])[c]
up (タイム 3)		
glgB	glgBCDAP	
proH	proH–proJ (BC)	ACAAATCAATAATGGCCTTCAAACTTGACATCATTTCCTCACGTGGTAACATTTTAAACGTGTGA
proJ	proH–proJ (BC)	
ybcQ	skf	TTAGGATAATATACAAAATCCCCCTTACTTCGACAATTGCAATCTGGTATTATCGTATCGCATGG
ybcO	skf	
ybdB	skf	
ybdA	skf	
ybcS	skf	
ybcT	skf	
ybdE	skf	
ybdD	skf	
yabG	yabG	
ylbD	ylbDE	
yoxA	yoxA–dacC	
yrrD	yrrD	
ywdH	ywdH	no information
yxbC	yxbCD	
yydG	yydFGHIJ	TTCAGATTTTTTAGGTACAATATATTGACATGTATTGAATGATATAGAATAATTGGTTTATATTA
yeeG	no information	no information
yisK	no information	no information
yisT	no information	no information
sacV	no information	no information
yuiF	no information	no information
pps	no information	no information
ytoA	no information	no information

yufS	no information	no information
yoaZ	no information	no information

a: 発現量の変化した遺伝子名。

b: 既知の転写単位。黒字は DBTBS に登録されているもの。青字は bsubcyc に登録されているもの。

c: 既知のシグマ A プロモーター配列。赤字は-10 領域、-35 領域を表す。太字は転写開始点(+1)を表す。

表３．９　SMS09 株にて遺伝子発現の増加した遺伝子の転写単位とσ^{A}以外のプロモーター（タイム３）

遺伝子名 [a]	転写単位 (DBTBS, bsubcyc)[b]	σ^{A}以外のプロモーターの配列（DBTBS, bsubcyc[BC]）[c]	σ因子
up（タイム 3）			
glgB	glgBCDAP	CTTCGAATAAATACTATAAATGAAAACTATGATGTCAGAAAGG	SigE
proH	proH–proJ (BC)		
proJ	proH–proJ (BC)	TGTTTTGCGCACCACATGGACTGCCGCTACATAGGCTAGAGAAGGA	SigK
ybcQ	skf		
ybcO	skf		
ybdB	skf		
ybdA	skf		
ybcS	skf		
ybcT	skf		
ybdE	skf		
ybdD	skf		
yabG	yabG		
ylbD	ylbDE	AGGCGAACACAATGCCCGACAAAACGATACATTGTAGTAGGTAACGATTTT	SigK
yoxA	yoxA–dacC	AACGGTGTTTTTTTATTTGATAGGGGAAAATATAAAATGGA / TATTTGATAGGGGAAAATATAAAATGGAGGAAATATGGTACAGTA	SigB / SigH
yrrD	yrrD	CATCGTATGAGTCTAAGGCGCAAAGCAAAACCTAAGCCTGTTCAACAAAAGGTG	SigG
ywdH	ywdH		
yxbC	yxbCD		
yydG	yydFGHIJ		
yeeG	no information		
yisK	no information		
yisT	no information		

sacV	no information		
yuiF	no information		
pps	no information		
ytoA	no information		
yufS	no information		
yoaZ	no information		

a: 発現量の変化した遺伝子名。

b: 既知の転写単位。黒字は DBTBS に登録されているもの。青字は bsubcyc に登録されているもの。

c: 既知のシグマ A 以外のシグマ因子に依存したプロモーター配列。赤字は-10 領域、-35 領域を表す。太字は転写開始点(+1)を表す。

Ⅲ．２．５　発現低下遺伝子の時系列発現パターンによる分類

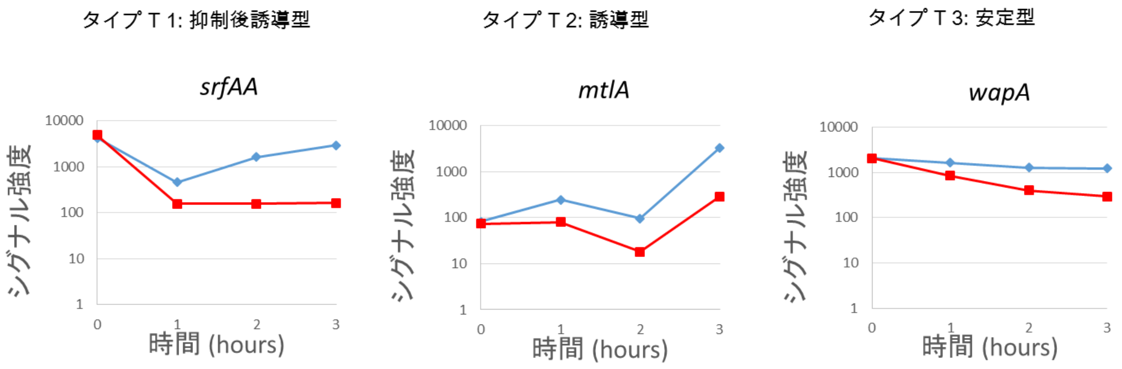
キシロース培地による培養開始後3時間（タイム3）で検出した、発現低下遺伝子を、培養開始前から、開始後 3 時間目までの時系列転写プロファイルにより分類した(図３．１３及び図S２．１,２,３,４,５及び６)。その結果、発現低下遺伝子は3つのタイプに分類された。タイプT1は、培地変換後1時間目にSMS08株（野生型 RpoA 発現株）および SMS09 株（変異型 RpoA 発現株）共に、発現が低下するが、培地変換後2時間目以降に、野生型 RpoA 発現株でのみ、発現の上昇が観察される遺伝子である。タイプ T2 は、培地変換前の発現は低く抑えられているが、培地変換後に、野生型 RpoA 発現株で発現誘導が起こる遺伝子である。変異型 RpoA 発現株では、この誘導が、野生型 RpoA 発現株に比べ低くなるか、あるいは、起こらない。タイプ T3 は、野生型 RpoA 発現株における発現が、培地変換前から培地変換後にかけて一定な遺伝子である(図３．１３)。

タイプ T1 およびタイプ T2 は、発現が誘導されることから、何らかの刺激を受けて、転写が培地変換後に誘導されると考えられる。したがって、転写活性化因子あるいは、転写抑制因子による制御を受けている可能性が高い。実際にタイプ T1 には、Ⅲ．２．４において述べた、ComA、AbrB および ManR によって制御される遺伝子が分類されている(図 S２．１及び２)。ComA は、培地が貧栄養(グルコース飢餓を含む)の状態あるいは定常期に活性化されることが知られている転写因子であり、ManR は、グルコース飢餓で活性化することが知られている転写因子である。このことから、キシロース添加培地における培養開始後 1 時間（タイム 1）の転写の低下は、新鮮な LB 培地に培地が転換されたことで、グルコース（あるいは、その他の栄養源）が供給され、その結果、ComA および ManR の活性化が抑制されために生じた可能性がある。その場合、野生型 RpoA を発現する株では、キシロース添加培地における培養が進むにつれて、培地中のグルコース濃度が低下し、ComA と ManR により発現が促進される遺伝子（ComA : *srfAA, rapA, rapC,* ManR : *yjdC, yjdD*）の発現誘導が引き起こされ、他方、変異型 RpoA 発現株においては、α-CTD の欠損により、これらの転写因子に依存した発現誘導が起こらないと考えられる。その結果、これらの遺伝子は、変異型 RpoA 発現株において発現が低下した遺伝子として検出された可能性が高い。一方で、AbrB に依存した発現誘導が、どのようなメカニズムで引き起こされるかは、はっきりしないが、他の発現制御機構が不明な遺伝子も含め、LB 培地における培養が進んだ時に生じるシグナル、例えば環境中の糖源、あるいは他の栄養源の枯渇により発現が誘導されるものと考えられる(図 S２．１及び２)。

タイプ T2 に分類される遺伝子には、MtlR により発現が正に制御される *mtlA* が含まれている(図 S２．３)。MtlR は、培地中にマンニトールが存在すると活性化することがわかっている(Bouraoui *et al.*, 2013)。MtlR が、*mtlA* のプロモーター上

流に結合するかどうかはわかっていないが、α-CTD の欠損はこの活性化を阻害している可能性がある。培地変換後に、*mtlA* の発現が誘導されることを考えると、キシロース添加培地に含まれる何らかの基質により、*mtlA* の発現が誘導された可能性がある。*ykrS* および *ykrT* に関しては、転写を正に制御する転写因子が存在するかどうかはわかっていないが（Sekowaka *et al*., 2002）、タイプ T2 遺伝子も生育環境の変化（培地の変換）により発現が誘導されることから、未知の転写因子による正の制御を受けているのかもしれない(図 S２．３)。

タイプ T3 には、RemA および YufM による正の制御を受ける遺伝子が分類されている（図 S２．４,５及び６）。RemA は、LB 培地中で *eps* および *tapA-sipW-tasA* オペロンの発現を正に制御していることが報告されており(Winkelman *et al*., 2013)、今回の実験条件においても *epsB* および *tasA* の発現を正に制御していると考えられる。YufM は、2 成分制御系に属する転写因子であり、生育環境中のリンゴ酸の存在により活性化されることが知られている（Tanaka *et al*., 2003）。このことから、LB 培地中に含まれるリンゴ酸により、YufM が活性化されていると考えられる。α-CTD の欠損は、これらの転写因子による正の転写制御を阻害していると考えられる。興味深いことに、タイプ T3 には、前述した、YycF により転写が直接抑制される *yoeB* および *wapA* が含まれている。これらの遺伝子は、すでに述べた通り、UP エレメントによる発現の促進を受けている可能性が高い。α-CTD は、YycF の負の制御に対し、UP エレメントと相互作用し、転写促進することで競合的に機能し、転写を一定に保っていると考えられた。さらに興味深いことに、タイプ T3 には、*xpt* が含まれている。*xpt* には、UP エレメントと重なる位置に、PurR が結合することが知られている(Sierro *et al*., 2008)。このことは、UP エレメントに競合する形で、PurR が結合し、α-CTD と UP エレメントとの相互作用を阻害することで、発現を抑制している可能性を示唆している。これらの結果は、α-CTD が、正の転写因子あるいは UP エレメントとの相互作用を介して遺伝子発現を正に制御していること、さらには、転写を正に制御することで、転写抑制因子による転写抑制に対して競合的に作用していることを示唆している。



srfAA, ropA, rapC, pel, rbsR, ydhM, yjdC, yjdE, ybfT, yolJ, ywsB, ycxA, yokH, ybfS

mtlA, ykrX, ykrS

wapA, yveL, spo0E, clpE, yoeB, lmrA, yufR, comQ, xpt, yfmQ, yxiJ, yrkA, yxzC, yxiG, yonR, yxiF, yrhP, yxzG, yhdO

図３．１３　野生型 RpoA 発現株（SMS08 株）と比較し変異型 RpoA 発現株（SMS09 株）で発現レベルの低下した遺伝子について、タイム 0 からタイム 3 までの変化をグラフにし、3 つのカテゴリに分類した

タイプ T1：タイム 0 で発現しており、キシロース培地における培養開始後 1 時間（タイム 1）で一時的に抑制されるが、野生型 RpoA を持つ SMS08 株では発現レベルが回復し、変異型 RpoA を持つ SMS09 株では発現レベルが回復しない遺伝子群。（例：*srfAA*）

タイプ T2：タイム 0 では発現レベルが低く、タイム 1 以降 RpoA を持つ SMS08 株では発現レベルが上昇し、変異型 RpoA を持つ SMS09 株では発現レベルが上昇しない遺伝子群。（例：*mtlA*）

タイプ T3：RpoA を持つ SMS08 株では発現レベルが一定に保てるが、変異型 RpoA を持つ SMS09 株ではタイム 1 以降、発現レベルが低下する遺伝子群。（例：*wapA*）

青線：野生型 RpoA 発現株（SMS08 株)、赤線：変異型 RpoA 発現株（SMS09 株)

Ⅲ．３　ChAP-chip 解析

Ⅲ．３.１　変異型 RpoA を組み込んだ RNAP は転写伸長複合体を形成できる

本章までに、枯草菌細胞内で、C 末端領域を欠損した変異型 RpoA を組み込んで RNAP 複合体が形成されること、複合体を形成した株では、多くの遺伝子の転写に変化が生じることを明らかにした。しかしながら、変異型 RpoA を組み込んだ RNAP の DNA 結合能が低下するような場合、トランスクリプトーム解析で観察された転写活性の低下は、変異型 RpoA を組み込んだ RNAP 複合体が転写活性を持たないためである可能性があり、その場合トランスクリプトーム解析の結果は、α-CTD の機能欠損を反映した結果とは言えない。そこで、変異型 RpoA を組み込んだ RNAP 複合体が、プロモーターを認識し、転写を開始、伸長させる能力があるかどうかを、転写クロマチン免疫沈降法（ChAP-chip 法）により解析した。

解析には、トランスクリプトーム解析に用いた C 末端にヒスチジンを融合した RpoC(RpoC-His)を発現し、同時に、野生型 RpoA あるいは変異型 RpoA をキシロース誘導により発現できる SMS08 株と SMS09 株、さらに、C 末端にヒスチジンを融合した野生型 RpoA(野生型 RpoA-His)および変異型 RpoA(変異型 RpoA-His)をキシロース誘導により発現する SMS18 および SMS19 株を用いた（Ⅲ．１．１　菌株の構築参照）。菌株の培養は、トランスクリプトーム解析の結果と比較するため、トランスクリプトーム解析に使用した条件と、完全に同一の条件で行った。すなわち、IPTG を添加した LB 培地で全培養した後、キシロース添加の LB 培地に培地変換を行い、その後 3 時間、キシロース存在下で培養した後、菌株を回収した。回収した菌株からの RNAP - DNA 複合体の精製は、RNAP の主要なサブユニットである RpoC、および野生型 RpoA と変異型 RpoA の C 末端に融合したヒスチジンタグを利用したアフィニティー精製により、すでに報告されている ChAP-chip 解析と同様の方法で行った（Ⅱ．２．５参照　Ishikawa *et al.*,2007）。

ChAP-chip の結果を（図３．１４）（図３．１５）（図３．１７）（図 S３．１,２,３,４,５,６,７,８及び９）（図 S４）に示す。遺伝子領域に対する RNAP の結合強度を用いた散布図を（図３．１４）に示す。SMS08 株および SMS09 株における RNAP 結合強度の相関は高く（図３．１４）、2 回の繰り返し実験において、相関係数はどちらも、0.9 以上であった。加えて、野生型 RpoA-His 発現株および変異型 RpoA-His 発現株を用いた ChAP-chip 解析の結果から、野生型 RpoA と変異型 RpoA の結合も、2 回の繰り返し実験における相関係数が 0.96 以上であり、高い相関を示すことが明らかとなった(図３．１５)。実際に、RpoA および RpoC の結合分布を見ると、野生型、変異型 RpoA 発現株における RpoA および RpoC の結合強度は、遺伝子コード領域と重なる形で強まることから（図３．１

７．A)、変異型 RpoA を組み込んだ RNAP が、プロモーターに結合し、転写を開始して、伸長する能力があることが明らかとなった。

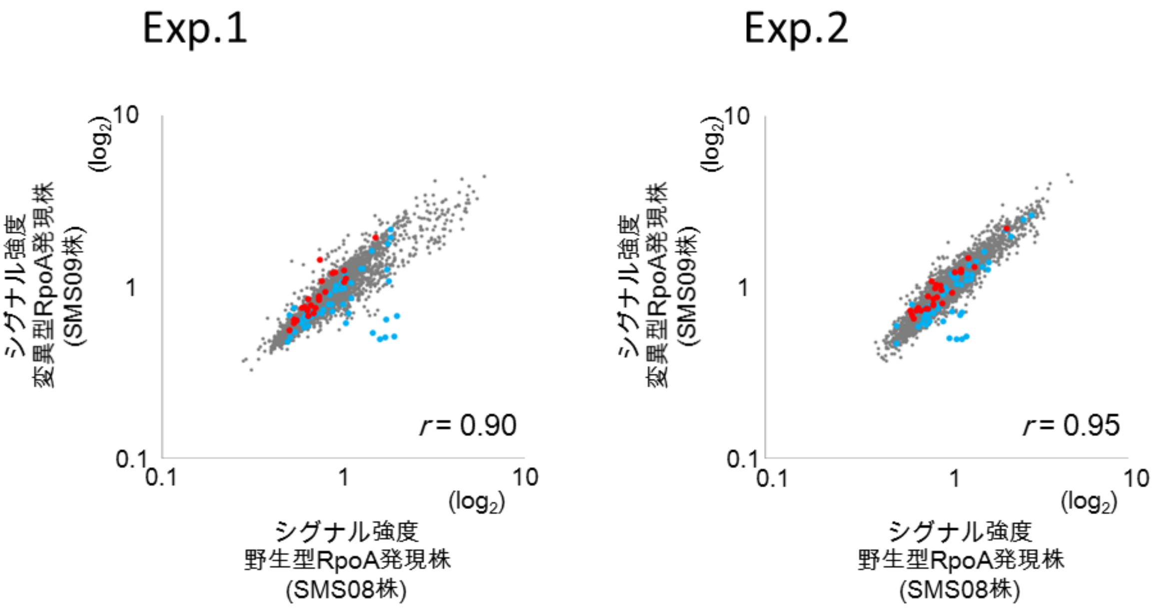


図３．１４　RpoC-His を用いた、野生型 RpoA 発現株（SMS08 株）と変異型 RpoA 発現株（SMS09 株）の ChAP-chip 解析

実験１回目（Exp.1）および２回目(Exp.2)の相関係数をそれぞれのパネル（ *r* ）に示した。

各スポットは遺伝子毎の RNAP の結合強度を示す。トランスクリプトーム解析において、野生型 RpoA 発現株に比べて変異型 RpoA 発現株における発現が上昇した遺伝子を赤、減少した遺伝子を青で示す。

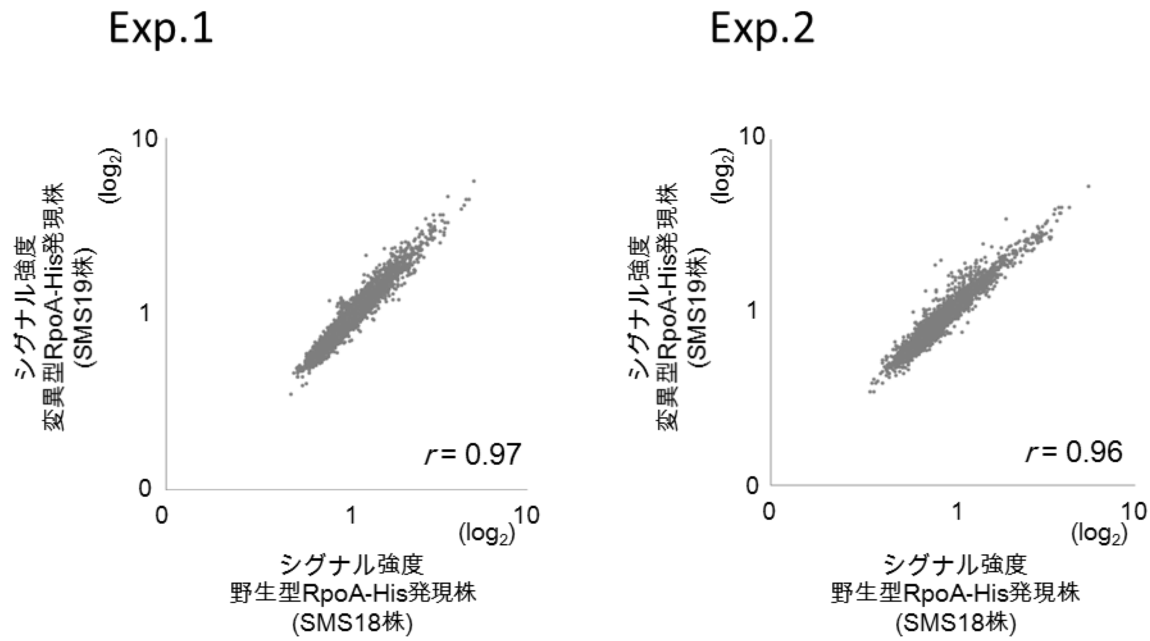


図３．１５　RpoA-His を用いた、野生型 RpoA-His 発現株（SMS18 株）と変異型 RpoA-His 発現株（SMS19 株）の ChAP-chip 解析

実験１回目（Exp.1）および２回目(Exp.2)の相関係数をそれぞれのパネル（ *r* ）に示した。

各スポットは遺伝子毎の結合強度を示す。

Ⅲ．３．２　トランスクリプトーム解析により決定された発現低下・増加は、実際の RNAP の結合減少、あるいは増加を反映している

前項で、変異型 RpoA を組み込んだ RNAP 複合体が、多くの遺伝子領域において、転写伸長活性を有していることを示した。発現が低下（発現低下遺伝子）あるいは増加（発現増加遺伝子）したとされた遺伝子において、実際の RNAP 結合強度がどのようになっているかを検討した(図３．１６)。変異型 RpoA 発現株および野生型 RpoA 発現株における RNAP 結合強度を用いた散布図を用い、トランスクリプトーム解析により決定した、変異型 RpoA 発現株における転写が低下あるいは増加した遺伝子を青点（発現低下遺伝子[表３．１参照]）、および赤点（発現増加遺伝子[表３．２参照]）で示すと（図３．１６．A)、分布の傾向は、発現低下遺伝子は低く、発現増加遺伝子は高まる傾向にあった。実際に、変異型 RpoA 発現株および野生型 RpoA 発現株における遺伝子コード領域に対する RNAP の結合強度は、遺伝子全体では有意な違いは見られないが、発現低下遺伝子群、および発現増加遺伝子群においては、統計的に有意な差が存在した(図３．１６．B, $p < 0.01$ [Mann-Whitney 検定])。このことは、トランスクリプトームにより検出された発現低下および発現増加は、実際に RNAP の結合の変化を反映したものであることが示唆している。

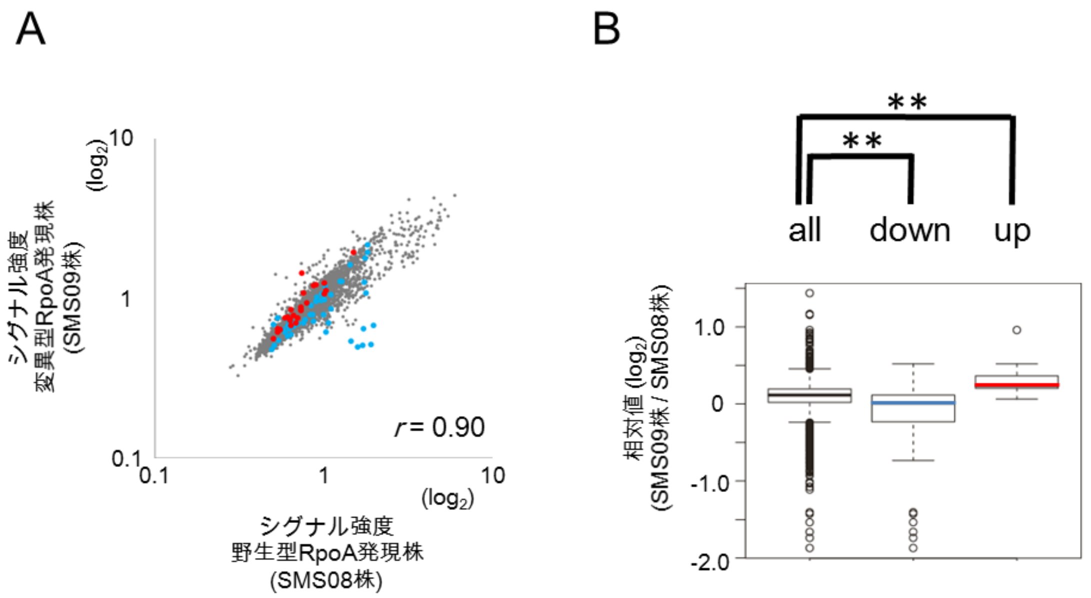


図３．１６　RpoC-His を用いた SMS08 株（野生型 RpoA）と SMS09 株（変異型 RpoA）の ChAP-chip 解析と箱髭図

A.（図３．１４, Exp.1 と同じ）

B.RNAP の相対的な比較【相対値＝[変異型 RpoA 発現株(SMS09 株)の RNAP 結合強度] / [野生型 RpoA 発現株(SMS08 株)の RNAP 結合強度]】を表した箱髭図。3 つの遺伝子群はそれぞれ左から、全遺伝子、トランスクリプトーム解析において発現が減少した遺伝子、発現が上昇した遺伝子として抽出された遺伝子。アスタリスクはそれぞれの組み合わせが統計的に有意であることを示す($p < 0.01$)

Ⅲ．３．３　変異型 RpoA 発現株における RNAP の結合強度が低い遺伝子の解析

本研究の主眼は、α-CTD の細胞内での役割にあることから、変化した遺伝子数が多く、転写制御因子等の解析から、多くの情報を獲得できる可能性が高い、変異型 RpoA 発現株で、転写が減少、あるいは RNAP の結合が低下した遺伝子に注目し、さらに解析を進めることにした。

RNAP の結合強度が変異型 RpoA 発現株（SMS08 株）で著しく減少した遺伝子がどのような遺伝子化を解析するため、野生型 RpoA 発現株に対して、変異型 RpoA 発現株における RNAP(RpoC)の結合強度が低い、上位 50 の遺伝子を抽出した。本解析では、再現性が高い遺伝子を選択するため、2 回の繰り返し実験それぞれにおいて、変異型 RpoA 発現株における RNAP(RpoC)の結合強度が最も低い遺伝子から、結合強度が低い遺伝子順に順位をつけ、2 回の実験における順位の平均を計算し、平均順位の高いものから 50 遺伝子を選んだ(表３．１０)。

まず最初に、50 遺伝子の中で、トランスクリプトーム解析で決定した発現低下遺伝子と重なる遺伝子を探索した。その結果、4 個の転写に含まれる 10 個の遺伝子（*srfAA-AB-AC-AD, mtlAD, mtnKA, rapA-phrA*）を見出した(表３．１０．遺伝子名を青字で表示)。さらに、リボソームサブユニット遺伝子に対する RNAP の結合が、変異型 RpoA 発現株で低下していた(表３．１０．黄字)。RNAP の結合は、15 のリボソームサブユニットをコードする遺伝子をコードする領域で、変異 RpoA 発現株特異的に大きく低下していた（図 S３．８）。この領域には、15 の生育に必須な遺伝子（12 のリボソームサブユニット遺伝子を含む）が含まれている。

表３．１０　**ChAP-chip** 解析にて、変異型 **RpoA** の組み込まれた **RNAP** により **RNAP** の結合が減少した遺伝子上位 **50**

遺伝子名[a]	結合強度（ChAP/sup.)[b]				相対値[c]（野生型／変異型）		相対値（log_2）（野生型／変異型）		RNAP 結合強度の順位		両実験の順位の平均値	順位[d]
	野生型 RpoA （実験1）	野生型 RpoA （実験 2）	変異型 RpoA （実験1）	変異型 RpoA （実験 2）	実験1	実験2	実験1	実験2	実験1	実験2		
srfAA	1.9	0.52	1.28	0.52	0.27	0.41	−1.87	−1.30	1	1	1	1
srfAB	1.7	0.51	1.22	0.5	0.30	0.41	−1.74	−1.29	2	2	2	2
srfAC	1.58	0.5	1.13	0.5	0.32	0.44	−1.66	−1.18	3	3	3	3
srfAD	1.45	0.54	1.04	0.51	0.37	0.49	−1.43	−1.03	5	4	4.5	4
mtlA	1.97	0.68	1.19	0.69	0.35	0.58	−1.53	−0.79	4	6	5	5
treP	1.49	0.69	1.28	0.72	0.46	0.56	−1.11	−0.83	7	5	6	6
mtlD	1.72	0.65	1.22	0.72	0.38	0.59	−1.40	−0.76	6	7	6.5	7
rpmD	3.38	1.68	3.07	1.83	0.50	0.60	−1.01	−0.75	12	8	10	8
glpF	1.39	0.68	1.14	0.72	0.49	0.63	−1.03	−0.66	10	11	10.5	9
glpD	1.37	0.72	1.29	0.79	0.53	0.61	−0.93	−0.71	13	10	11.5	10
cspB	4.57	2.17	3.08	2	0.47	0.65	−1.07	−0.62	9	15	12	11
cwlO	3.3	1.81	2.45	1.58	0.55	0.64	−0.87	−0.63	18	13	15.5	12
rpmGA	3.23	1.83	3.2	2.05	0.57	0.64	−0.82	−0.64	21	12	16.5	13
rplV	4.48	2.49	3.17	2.1	0.56	0.66	−0.85	−0.59	20	17	18.5	14
gapA	1.86	1.01	1.31	0.88	0.54	0.67	−0.88	−0.57	16	21	18.5	15
trpP	1.3	0.77	1.14	0.74	0.59	0.65	−0.76	−0.62	32	14	23	16
rplF	3.57	1.77	2.23	1.57	0.50	0.70	−1.01	−0.51	11	35	23	17
treA	0.95	0.56	0.9	0.61	0.59	0.68	−0.76	−0.56	29	23	26	18
rplX	3.41	1.84	2.22	1.57	0.54	0.71	−0.89	−0.50	15	37	26	19
mtnA	1.03	0.62	0.96	0.64	0.60	0.67	−0.73	−0.58	36	18	27	20
rplL	3.64	2.17	2.49	1.74	0.60	0.70	−0.75	−0.52	34	34	34	21
rpsE	3.9	2.13	2.44	1.8	0.55	0.74	−0.87	−0.44	17	56	36.5	22
rpsT	2.44	1.52	2.16	1.46	0.62	0.68	−0.68	−0.57	52	22	37	23

glpK	1.14	0.71	1.02	0.71	0.62	0.70	−0.68	−0.52	51	31	41	24
rpsC	4.77	2.73	2.91	2.15	0.57	0.74	−0.81	−0.44	24	58	41	25
deoC	1.11	0.66	0.95	0.7	0.59	0.74	−0.75	−0.44	33	54	43.5	26
odhB	1.07	0.68	1.09	0.76	0.64	0.70	−0.65	−0.52	57	33	45	27
rplP	4.68	2.77	3.04	2.25	0.59	0.74	−0.76	−0.43	30	60	45	28
odhA	1.05	0.66	0.98	0.69	0.63	0.70	−0.67	−0.51	55	36	45.5	29
xylB	1.34	0.84	1.35	0.96	0.63	0.71	−0.67	−0.49	54	39	46.5	30
cggR	1.81	1.2	1.56	1.07	0.66	0.69	−0.59	−0.54	68	27	47.5	31
secY	3.21	1.88	2.02	1.51	0.59	0.75	−0.77	−0.42	27	69	48	32
rplT	2.99	1.58	1.96	1.49	0.53	0.76	−0.92	−0.40	14	82	48	33
mtnK	1.06	0.71	1.07	0.73	0.67	0.68	−0.58	−0.55	73	26	49.5	34
qoxD	1.66	1.01	1.11	0.83	0.61	0.75	−0.72	−0.42	40	71	55.5	35
xylA	1.41	0.94	1.46	1.04	0.67	0.71	−0.58	−0.49	71	42	56.5	36
rapA	1.78	1.08	1.68	1.27	0.61	0.76	−0.72	−0.40	38	77	57.5	37
mapA	3.57	1.97	2.28	1.75	0.55	0.77	−0.86	−0.38	19	96	57.5	38
treR	1.03	0.73	1.09	0.73	0.71	0.67	−0.50	−0.58	99	20	59.5	39
sigX	1.49	1.01	1.47	1.05	0.68	0.71	−0.56	−0.49	76	43	59.5	40
adk	2.97	1.84	2.01	1.51	0.62	0.75	−0.69	−0.41	48	72	60	41
ypzK	1.42	1	1.38	0.96	0.70	0.70	−0.51	−0.52	95	30	62.5	42
rpsH	3.17	1.8	1.99	1.54	0.57	0.77	−0.82	−0.37	23	104	63.5	43
rplR	3.4	1.93	2.14	1.66	0.57	0.78	−0.82	−0.37	22	106	64	44
rpsK	3.73	2.46	2.67	1.99	0.66	0.75	−0.60	−0.42	67	66	66.5	45
ackA	1.49	1.05	1.35	0.96	0.70	0.71	−0.50	−0.49	96	40	68	46
rplQ	1.74	1.25	1.56	1.07	0.72	0.69	−0.48	−0.54	109	28	68.5	47
mtlF	1.54	0.73	1.08	0.85	0.47	0.79	−1.08	−0.35	8	140	74	48
atpB	2.12	1.43	1.64	1.24	0.67	0.76	−0.57	−0.40	75	78	76.5	49
rplE	3.56	2.16	2.31	1.8	0.61	0.78	−0.72	−0.36	39	115	77	50

a: 発現量の変化した遺伝子名、青字はトランスクリプトーム解析でも発現量が減少した遺伝子、黄色はリボソームサブユニット遺伝子。

b: 再現性を見るために同一条件で２回の実験を行った。それぞれを実験 1、実験 2 とし、本表に記述した。

c:野生型 RpoA 発現株と変異型 RpoA 発現株の間で、RNAP の結合力を比較した。

d:結合力の差について減少量の大きい順番で順位を付けた。実験 1 と実験 2 の順位を平均し、総合の順位を決定した。

Ⅲ．３．４　変異型 RpoA 発現株で RNAP 結合強度が大きく減少した遺伝子の結合プロファイルの特徴

これまでの解析から、特定の遺伝子における RNAP の結合強度が、変異型 RpoA 発現株で低下していることが明らかになった。このことは、変異型 RpoA 発現株では、α-CTD が、転写開始効率、転写伸長効率、あるいは転写開始複合体から転写伸長複合体への変換に関わっており、その欠損により、それらの効率が大きく低下している可能性があることを示している。そこで、RNAP の結合強度が、変異型 RpoA 発現株で低下している 50 遺伝子について、結合プロファイルを詳細に観察したところ、変異型 RpoA 発現株における RNAP 結合強度が大きく減少した 50 遺伝子を（前項参照）2 つのタイプに分類できることが明らかとなった。

タイプ C1 は、*srfAA* や *odhAB* に代表される結合プロファイルである（図３．１７．B. レーン１とレーン 2）（図 S３．１および２）。変異型 RpoA 発現株では、これらの遺伝子の遺伝子コード領域の RNAP 結合シグナルのみが減少する。このとき、プロモーター領域（あるいはプロモーター近傍）の RNAP 結合シグナルは、維持され、ピークとなる。この特徴から、これらの遺伝子は、1) RNAP がプロモーターを認識する際に α-CTD を必要としない。2) 結合した RNAP の開始複合体から転写伸長複合体への変換あるいは、プロモーターのすぐ下流に存在するポーズシグナル、あるいは停止シグナルでの RNAP の停滞を解消に、α-CTD が必要とされると考えられた。

タイプ C2 は、変異型 RpoA 発現株で、プロモーター領域、コード領域の双方で、RNAP 結合シグナルが減少する（図３．１７．C. レーン１とレーン 2）（図 S３．３,４,５,６,７,８及び９）。このことは、タイプ 2 に分類される遺伝子では、RNAP がプロモーター認識し、結合する際に、α-CTD を必要とすると考えられた。

また、いずれのタイプにおいても野生型 RpoA-His 発現株と変異型 RpoA-His 発現株の結合パターン（図３．１７．レーン 3 とレーン 4）はほぼ同一であり、これは RpoA-His の散布図の結果（図３．１５）とも一致した。

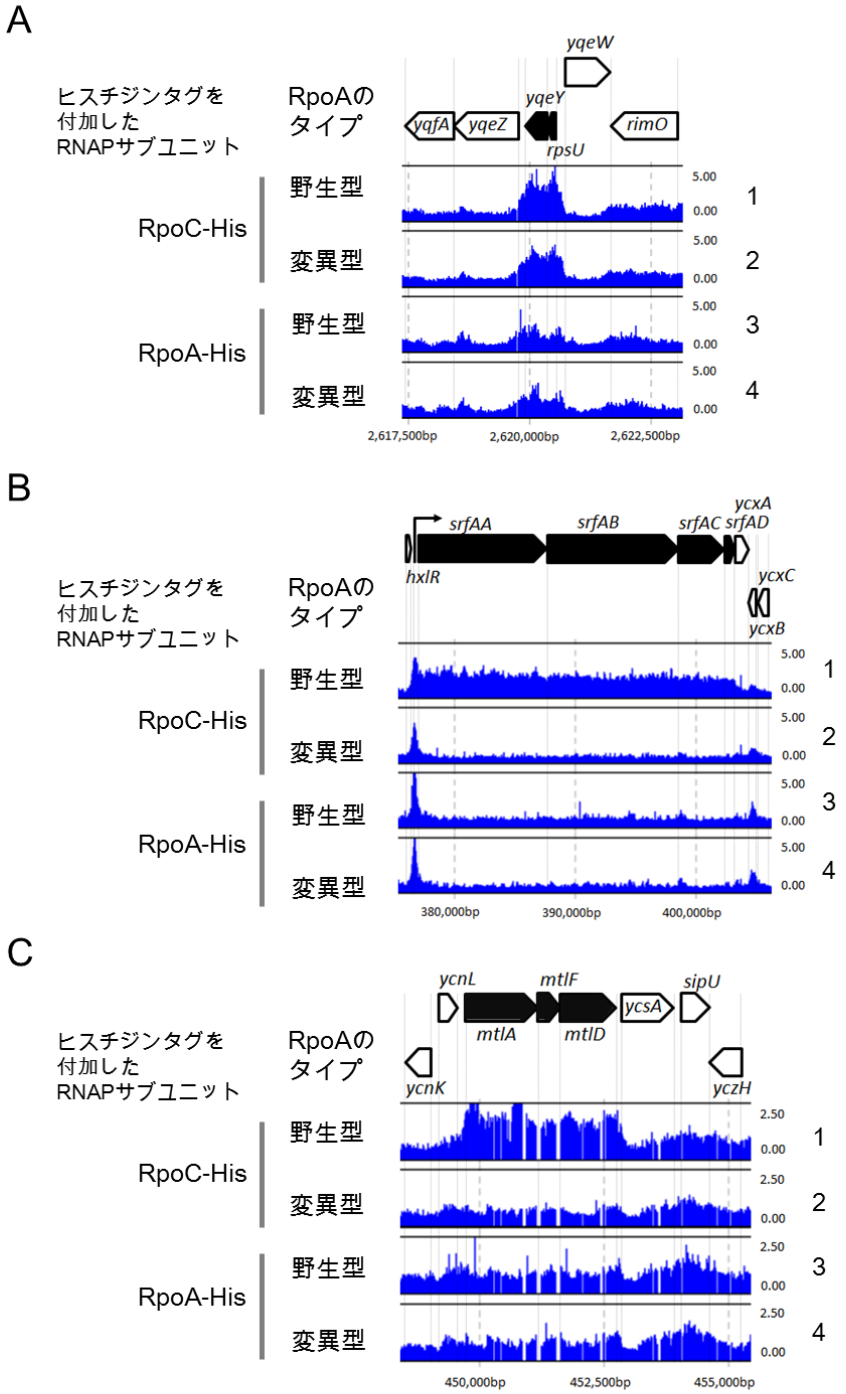


図３．１７　ChAP-chip の結合パターンによる分類

A. 変異型 RpoA 発現株と野生型 RpoA 発現株における RNAP の結合プロファイルが大きく変化しない遺伝子。　B. タイプ C1 の結合パターン。　C. タイプ C2 の結合パターン。

五角形の矢印は遺伝子を示す。黒い五角形の矢印群は 1 セットのオペロンである。遺伝子上部に描かれた矢印はプロモーターを示す。それぞれの青の縦線は RNAP 結合のシグナル強度（ChAP / sup.）で、プローブの設計された位置に表示した。野生型 RpoA 発現株における RpoCHis の結合プロファイルをレーン

1 に、変異型 RpoA 発現株における RpoCHis の結合プロファイルをレーン 2 に、野生型 RpoA 発現株における RpoAHis の結合プロファイルをレーン 3 に、変異型 RpoA 発現株における RpoAHis の結合プロファイルをレーン 4 に、それぞれ示した。

Ⅳ．考察

本研究では、枯草菌の細胞内における RNAP を構成するサブユニットの一つ α サブユニット（ RpoA ）の C 末端領域（α-CTD ）の機能解析を行った。私は、α サブユニットをコードする *rpoA* は必須遺伝子であり、α-CTD も生育に必須であることが示唆されているため(Zhang *et al.*, 2006)、単純に α-CTD を欠失させた変異体を作成することは難しいと考えた。そこで、IPTG による誘導で発現させた野生型 RpoA で生育し、その後、キシロースによる誘導で変異型 RpoA に発現を切り替えることが可能な枯草菌株を作成した。この株を、IPTG を含まず、キシロースのみを含む LB プレートに塗布し、その生育を観察したところ、変異型 RpoA をキシロース依存的に発現させる株は生育できず、他方、野生型 RpoA をキシロース依存的に発現させる株は生育できることから、α-CTD が枯草菌の生育に必須であることが強く示唆された。一方、前培養として、IPTG を添加した LB 培地（液体培地）で培養後、培地を変換して、キシロースのみを含む LB 培地で培養した場合には、変異型 RpoA 発現株では、キシロースを用いた培養開始後 6 時間の間は増殖が観察された。生育速度は、野生型 RpoA をキシロース誘導により発現させる株よりは遅かったものの、RpoA を発現しない株が増殖しないことから、変異型 RpoA のみが発現する状態でも、少なくとも 6 時間は、枯草菌の生育が持続することが確認された。RNAP 複合体を精製し、複合体を構成するサブユニットを詳細に解析したところ、キシロースのみを含む LB 培地で変異型 RpoA 発現株(SMS09 株)を培養した場合、培地変換後 3 時間で RNAP に含まれる野生型 RpoA の 60 から 70 パーセントが変異型 RpoA に置き換わることが明らかとなった。この培養条件を用いることで、変異型 RpoA 発現株で、α-CTD の細胞内での機能を解析した。

トランスクリプトーム解析および ChAP-chip 解析の結果から、枯草菌細胞内での α-CTD の最も重要な機能は、プロモーターでの転写活性化であることが示された。本解析では、α-CTD との相互作用が知られているクラス I 型の転写活性化因子が機能するプロモーターをもつ遺伝子の発現が、変異型 RpoA を発現する株で低下することが確認されている。実際に、*srfA* プロモーターでは α-CTD と二成分制御系の転写活性因子 ComA が相互作用して転写を活性化している(Zhang *et al.*, 2006)。他方、本研究で同定された発現低下遺伝子の中には、そのプロモーターの上流に、ComA、YufM、RemA および ManR の結合領域が存在していた。*rapA* プロモーター、*rapC* プロモーター上流には、ComA 結合領域が存在することが報告されている(Mueller *et al.*, 1992; Lazazzera *et al.*, 1999; Bongiorni *et al.*, 2005)。*maeN* プロモーターの上流には、YufM が相互作用する領域が存在し

ている(Tanaka *et al*., 2003)。*manP* と *manR* プロモーター上流には、ManR が結合する領域が存在している(Wenzel *et al*., 2013)。*eps* と *yqxM* プロモーター上流には、RemA が結合する領域が存在することが知られている(Winkelman *et al*., 2013)。また、結合領域は知られていないが、*mtlA* 遺伝子の発現は、MtlR により活性化される(Bouraoui *et al*., 2013)。また、*cwlO* 遺伝子の RNAP の結合は、変異型 RpoA 発現株では低下するが、*cwlO* のプロモーター領域には、YycF が結合することが知られている(Salzberg *et al*., 2013)。上述した遺伝子のうち、*srfA*、*rapA*、*rapC*、*maeN*、*manR*、*manPA*、*eps*、*ywxM* および *cwlO* のプロモーターでは、-35 領域より上流、転写開始点から 60bp から 80 bp 上流の少なくとも一部を含んだ領域に、転写活性化因子が結合することが明らかになっている。この領域への結合は、クラス I 型の転写活性化因子が α-CTD と相互作用し、転写を活性化するために必要である（Browning *et al*, 2004）。したがって、これらのプロモーターでは、クラス I 型の転写活性化因子と α-CTD との相互作用を介して、転写が活性化されている可能性が高い。実際に、トランスクリプトームにより決定された発現低下遺伝子の時系列的な転写プロファイルを確認したところ、グルコース飢餓により活性化される ComA および ManR に制御される遺伝子は、キシロースを添加した培地での変換直後には発現が一時的に低下するものの、LB 培地での 2 時間以上の培養後、発現が誘導された。一方で、その発現誘導は、変異型 RpoA 発現株では見られなかった。このことは、LB 培地を用いた培養の時間経過と共に活性化された ComA および ManR による遺伝子の発現誘導に、α-CTD が必要とされていることを強く示唆している。他方、RemA は LB 培地で活性化していることがすでに報告されている（Winkeiman *et al*., 2013）。また、YufM は LB 培地中に存在する C4 糖により、本解析条件でも転写が活性化している可能性が高い（Tanaka *et al*., 2003）。このことから、本解析条件では、RemA および YufM により転写が活性化される遺伝子の発現は、IPTG およびキシロースを添加した LB 培地による培養を通して、一定であると考えられた。実際に、野生型 RpoA 発現株における、それらの遺伝子の発現は、時系列を通して一定であった。一方で、変異型 RpoA 発現株では、RNAP 中の野生型 RpoA の減少に呼応して、RemA および YufM に制御される遺伝子の発現が低下した。このことから、α-CTD は RemA および YufM による転写促進に関しても重要な役割を果たしている可能性が高い。また、いくつかの発現低下遺伝子のプロモーターには、転写抑制因子の結合領域が、重なって存在していた。これらの遺伝子の中には、*wapA*、*yoeB* (*iseA*) が存在していた 。これらの遺伝子は、ChIP-chip 解析により YycF がプロモーターに強く結合し、発現を制御することが報告されている（Salzberg *et al*., 2013）。興味深いことに、変異型 RpoA 発現株では、*yoeB* や *wapA* の発現は低下する。これらの遺伝子では、α-CTD が転写の活性化に寄与している可能性が高い。α-CTD

の転写活性化には、転写活性化因子がプロモーターの-35 領域より上流に結合しα-CTD と相互作用するか、転写開始点上流 41bp から 57bp の領域に存在する UP エレメントと α-CTD が相互作用する必要がある。上述した転写活性化因子により制御されるプロモーターとは対照的に *yoeB* や *wapA* のプロモーター上流領域には、クラス I 型の転写活性化因子の結合領域の存在は報告されていない。一方で、*yoeB* と *wapA* のプロモーター上流配列を解析したところ、 UP エレメントに類似した配列をもつことが判明した。そこで、今回の解析により決定された、発現低下遺伝子あるいは、RNAP 結合が減少する遺伝子の多くが、UP エレメントに依存して転写を促進するプロモーターであるならば、これらの遺伝子の上流（転写開始点上流の 57bp から 38bp）の領域には、UP エレメントが保存されている可能性があると考え、枯草菌の転写開始点を網羅的に決定した報告に基づき（Irnov *et al*., 2010）、枯草菌の転写開始点上流の 57bp から 38bp の配列を枯草菌ゲノム配列中から抽出し、各ポジションにおける塩基頻度を観察した（図４．１）。興味深いことに、発現低下遺伝子あるいは、RNAP 結合が減少する遺伝子の転写開始点上流、57bp から 38bp には、phased A-tract と呼ばれる AT に富む配列が保存されていた。保存されている配列は、２つの領域に分かれており、それぞれ、すでに報告されている UP エレメントの proximal 配列および distal 配列（Gourse *et al*., 2000）の存在する位置に検出された。一方、この保存性は、発現低下遺伝子あるいは、RNAP 結合が減少する遺伝子以外の遺伝子では大きく低下することから、発現低下遺伝子あるいは、RNAP 結合が減少する遺伝子には、UP エレメントが存在することが明らかとなった。さらに、*yoeB* および *wap A* も分類された時系列転写プロファイルによる発現低下遺伝子の分類におけるタイプ 3 型遺伝子には、*xpt* が存在していた。この遺伝子のプロモーター上流（転写開始点上流の 97bp から 45bp）には、PurR と呼ばれる転写抑制因子の結合領域が存在し、PurR は *xpt* の発現を負に制御することが知られている(Sierro *et al*., 2008)。このことは、PurR が、*xpt* のプロモーター上流に存在する UP エレメントに代表される、α-CTD との相互作用を介して転写を促進するプロモーター上流の配列に結合し、α-CTD と上流配列の相互作用を阻害することで、転写抑制をしている可能性があることを示唆している。これらの解析結果をそ総合すると、α-CTD は、1) クラス I 型の転写活性化因子に依存した転写の促進に寄与している。2) UP エレメントと相互作用して転写を促進することで、プロモーターに結合した転写抑制因子と競合し、転写を一定に保つことに寄与している。3) UP エレメントと相互作用する転写抑制因子と競合することで転写制御に寄与している。ことが示された（図４．２）。

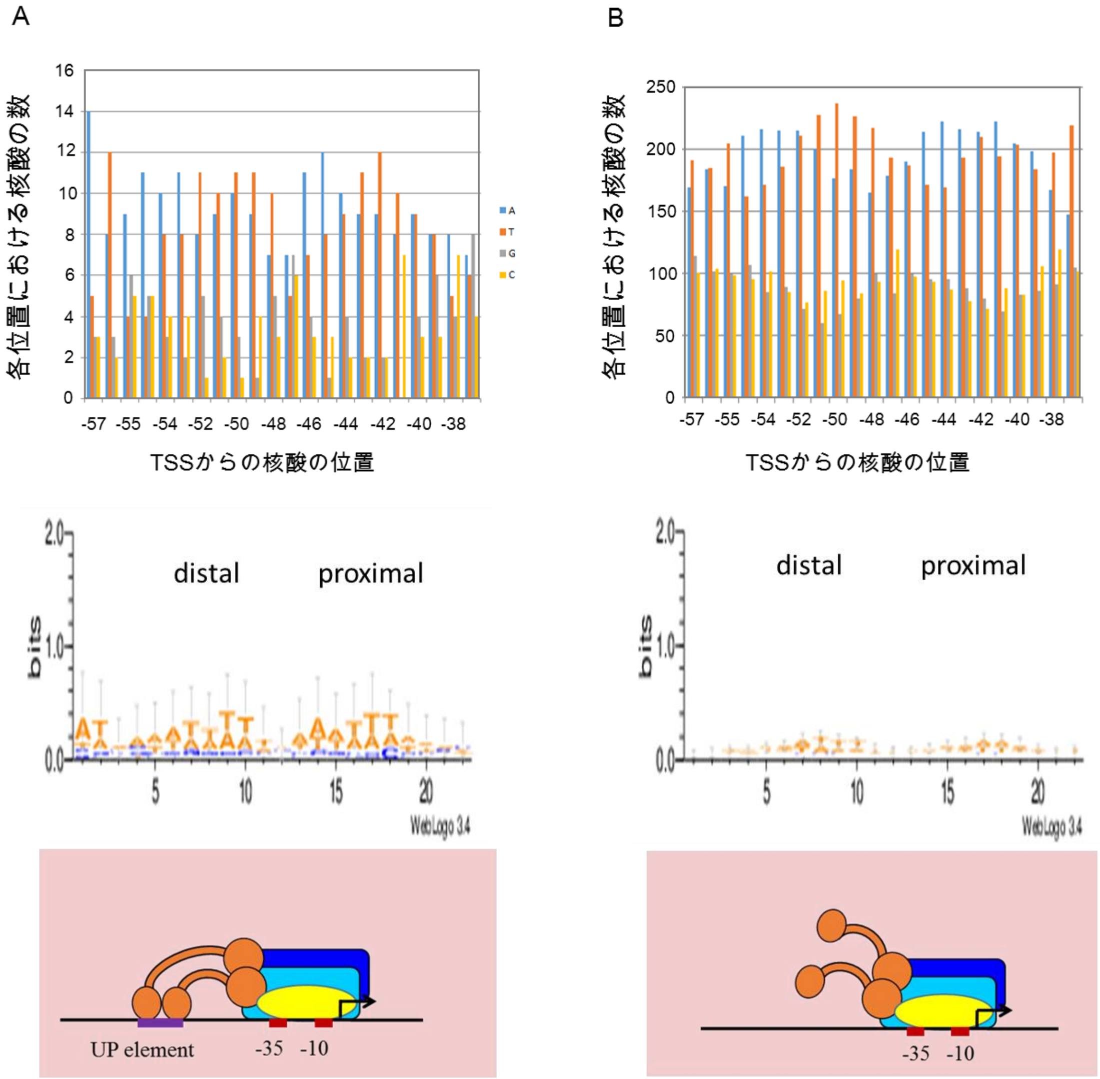


図４．１　変異型 RpoA 発現株（SMS09 株）で転写レベルの減少した遺伝子のプロモーターの解析

転写開始点（TSS）のデータは Irnov らのデータを参考にした（Irnov *et al*.,2010)。

それぞれのプロモーターについて転写開始点から数えて-38 から-57bp までの DNA 配列を使用した。塩基の頻度は weblogo(http://weblogo.threeplusone.com/)を用いて解析した。

A.本研究の ChAP-chip 解析にて転写レベルの低下した遺伝子と一致した 25 個のプロモーター(*cggR, cspB, cwlO, deoC, glpD, glpF, odhA, rapA, rpmGA, rpsT, srfAA, trpP, ypzK, comQ, pel, rapC, spo0E, wapA, xpt, yrhP, ywsB, iseA, yisT, yuiF, yxbC*)。

B.A に用いたプロモーター以外の 575 個。

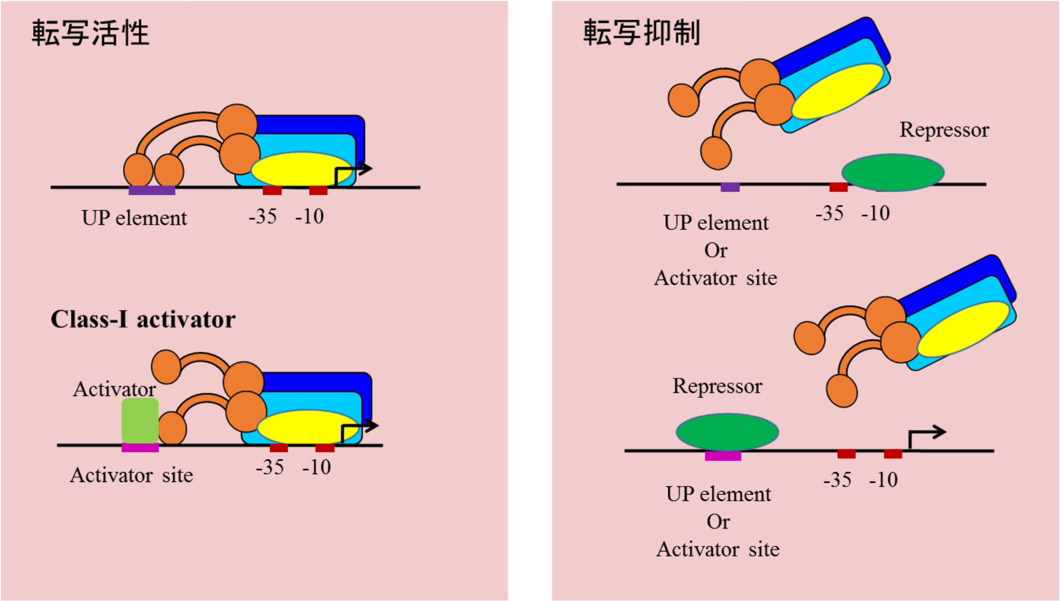


図４．２　枯草菌細胞内における α-CTD の機能のモデル

α-CTD は、UP エレメントや転写活性化因子との相互作用により転写活性に寄与している。一方で、転写抑制においては、UP エレメントや転写活性化因子と転写抑制因子との相互作用により拮抗状態を維持している。

その一方で、本解析では、α-CTD が、転写の一時停止や転写終結に関与する証拠を見つけることは出来なかった。大腸菌において NusA は α-CTD や RNA と相互作用し、転写伸長に制御に関与するが(Liu *et al.*, 1996; Schweimer *et al.*, 2011)、枯草菌の NusA にはこのドメインは存在しない。枯草菌の α-CTD は、少なくとも、NusA と相互作用して転写伸長を制御することはないのかもしれない。

RNAP の ChAP-chip 解析の結果は、α-CTD が転写開始の制御を、複数の段階で行っていることを示した（図４．３）。すなわち、1）プロモーター認識後、転写伸長複合体の形成もしくは転写開始複合体の安定化に関与する。2）RNAP のプロモーター部位へのリクルートに関与する。1)に関しては、本研究の結果のみでは、プロモーター認識後、転写開始点近傍での、転写の停滞や終結に α-CTD が係る可能性を排除できない。しかしながら、これまでに報告されている結果を考慮すると、転写開始に寄与している可能性が高い。大腸菌では、転写活性化因子である CRP が、プロモーター *malT, lac, gal* における転写開始複合体形成を促進する。興味深いことに、CRP が無い場合、 *malT* では転写伸長複合体を形成する能力のない RNAP-プロモーター複合体が形成される。一方、*lac, gal* プ

ロモーターでは、転写伸長複合体を形成する能力がある RNAP-プロモーター複合体の形成が低下する(Tagami *et al.*,1998)。変異型 RpoA を発現する枯草菌の内部では、タイプ C1 に分類されるような遺伝子のプロモーターでは、RNAP はプロモーターに結合するものの、転写伸長複合体は形成されないのかもしれない。一方、タイプ C2 遺伝子のプロモーターでは、RNAP とプロモーターとの結合が促進されないことが想定される。この促進は、UP エレメントおよびクラスⅠ型の転写活性化因子の機能としてよく知られている(Browing *et al.*, 2004)。

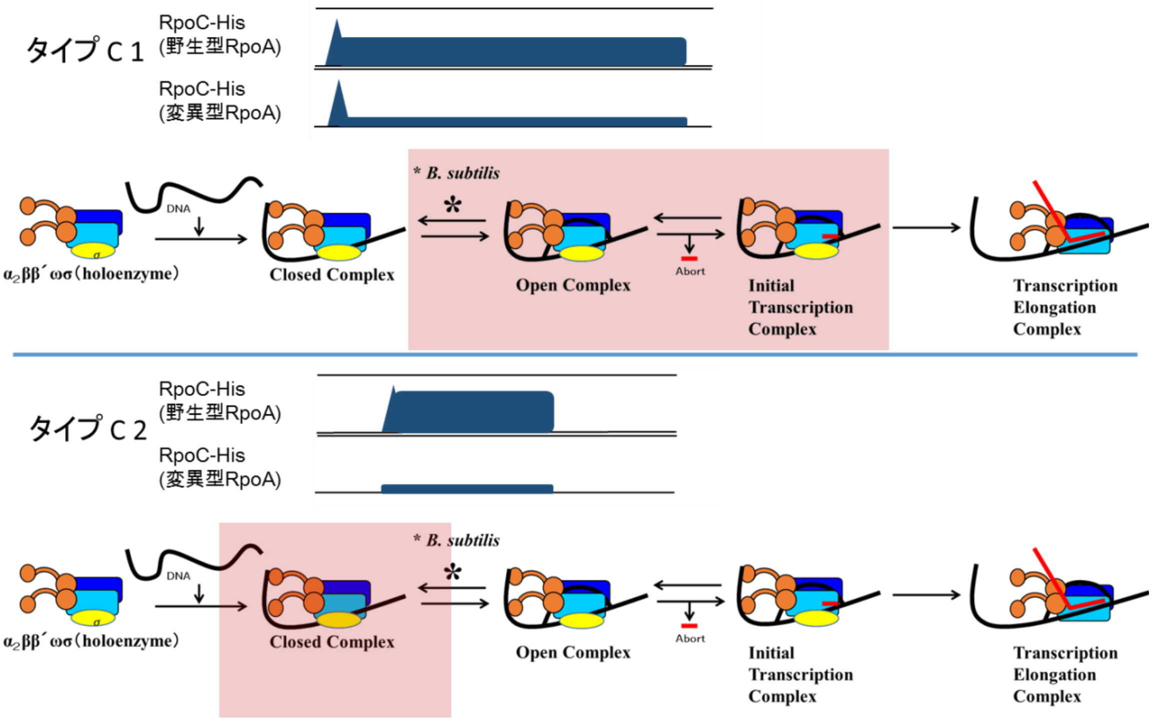


図４． ３　α-CTD は枯草菌ゲノムにおいて、転写開始の制御を、複数の段階行っている

タイプ C1 : プロモーター認識後、転写伸長複合体の形成もしくは転写開始複合体の安定化に関与する。

タイプ C2 : RNAP のプロモーター部位へのリクルートに関与する。

興味深いことに、本解析で示された ChAP-chip 解析とトランスクリプトーム解析では、本来大きく重なるはずの変異型 RpoA の発現により、転写レベルの減少する遺伝子と RNAP の結合量が大きく減少する遺伝子の間に、大きな違いが観察された。この理由として、トランスクリプトーム解析で検出するシグナルはそれぞれの遺伝子から転写された RNA の総量であり、細胞内に蓄積された全ての RNA を検出してしまう一方、ChAP-chip 解析では、遺伝子のコード領域に結合し、各サンプリング時間において、まさに転写中の RNAP を測定するため、トランスクリプトーム解析には反映された蓄積した RNA 量は反映されず、

実際の転写活性のみを検出していることが考えられた。興味深いことに、ChAP-chip 解析で、RNAP の結合レベルが変異型 RpoA 発現株において大きく減少した遺伝子をトランスクリプトーム解析の結果を元にした、散布図上に表示すると、シグナルが高い（RNA 量が比較的高い）遺伝子に集中することが明らかとなった(図４．４)。これは、トランスクリプトーム解析では、蓄積した RNA により発現量の高い遺伝子の発現の変化が検出しにくいことを示唆している。また、ChAP-chip とトランスクリプトームとの結果の違いは、ChAP-chip 解析はトランスクリプトーム解析に比べて、バックグラウンドノイズが非常に高く、転写レベルが低い遺伝子への RNAP の結合の検出が難しいことも、大きな要因になっていると考えられる。このようなトランスクリプトームと ChAP-chip 解析の違いがあることから、ChAP-chip およびトランスクリプトーム解析を同時に行った本解析は、トランスクリプトームあるいは ChAP-chip 解析を単独で行う解析よりも、より網羅的に α-CTD 依存的に発現する遺伝子を決定可能であったと考えている。

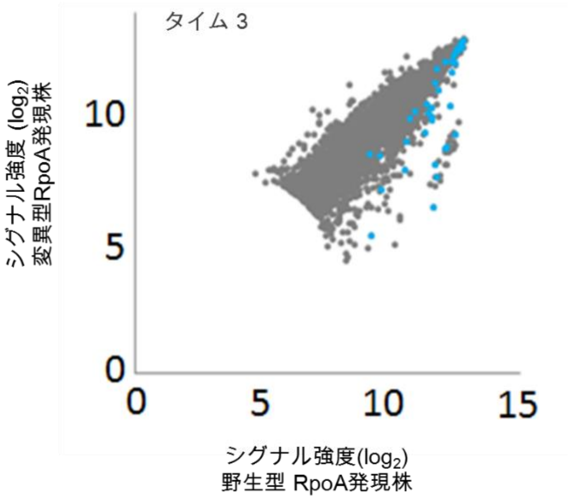


図４．４　トランスクリプトーム解析と ChAP-chip 解析の比較

トランククリプト-ム解析（タイム３）の散布図に ChAP-chip 解析にて転写レベルの減少した遺伝子を表示した。

灰色：トランスクリプトーム解析の散布図

青：ChAP-chip 解析にて転写レベルが減少した遺伝子

本解析で決定した α-CTD 依存的な発現を示す遺伝子の機能を（表４．１）に示す。興味深いことに、多くの遺伝子は、炭素源の代謝、枯草菌の対数増殖期か

ら定常期への移行、あるいはリボソームに関連するような機能に関連する多くの遺伝子を制御していた（表４．２；utilization of secondary carbon source, transition state response, ribosome synthesis 参照）（表４．３）。このうち、翻訳に関連するような機能および炭素源の代謝に関する遺伝子の発現制御は、大腸菌においても α-CTD 依存的であることが良く知られている (Blatter *et al.*,1994; Gourse *et al.*, 2000; Gourse *et al.*, 1996)。一方で、序にも述べたように、大腸菌と枯草菌の炭素源の代謝に関連する遺伝子の発現制御機構やリボソーム遺伝子の発現制御機構は大きく異なることが知られている。この事実は、α-CTD は、異なる細菌種においても、炭素源の利用を始め、共通した生命現象に関連する機能を制御している一方で、その標的遺伝子や、転写制御の方法には、多様性も持つことを強く示唆している。

表４．１　変異型 RpoA 発現株にて、発現量が低下もしくは RNAP の結合力が低下した遺伝子（転写単位）の数

Functional category	Transcriptome[a]	ChAP-chip[b]	Overlap[c]	Total[d]
Antibiotics related	2(2)			2(2)
Cell wall metabolism	3(2)	1(1)		4(3)
Membrane synthesis	1(1)			1(1)
Methionine salvage	4(2)	2(1)	2(1)	4(2)
Purine/pyrimidine metabolism	1(1)	1(1)		2(2)
Stress response	1(1)	2(2)		3(3)
Transition state response	13(8)	5(2)	5(2)	13(8)
Utilization of secondary carbon sources	16(7)	17(9)	2(1)	31(15)
Energy production	0(0)	4(3)		4(3)
Ribosomal synthesis	0(0)	17(5)		17(5)
Undefined	12(12)	1(1)		13(13)
Total	53(36)	50(25)	9(4)	94(57)

a: トランスクリプトーム解析によって発現量の低下した遺伝子（転写単位）の数。
b: ChAP-chip解析によってRNAPの結合力が低下した遺伝子（転写単位）の数。
c: トランスクリプトーム解析にて発現量が低下し、かつChAP-chip解析でRNAPの結合力が低下した遺伝子（転写単位）の数。
d: それぞれの分類の遺伝子（転写単位）の合計数。

表４．２　変異型 RpoA 発現株のトランスクリプトーム解析にて、発現量が低下した遺伝子（転写単位）の数

TUs[a]	TFs[b]	Functional category	Gene	Function and/or encoded protein[c]
srfAA-srfAB-comS-srfAC-srfAD	ComA, PerR, CodY	Transition state response	*srfAA*	Surfactin synthase subunit 1
			srfAB	Surfactin synthase subunit 2
			comS	Competence protein S
			srfAC	Surfactin synthase subunit 3
			srfAD	Surfactin synthase thioesterase subunit
rapA-phrA	ComA, (Spo0A)	Transition state response	*rapA*	Response regulator aspartate phosphatase A
rapC-phrC	ComA, (CodY)	Transition state response	*rapC*	Response regulator aspartate phosphatase C
pel	(ComA)	Transition state response	*pel*	Pectate lyase
comQX		Transition state response	*comQ*	Competence regulatory protein, ComQ
spo0E		Transition state response	*spo0E*	Aspartyl-phosphate phosphatase, Spo0E
eps	RemA, SinR	Transition state response	*epsA*	Similar to capsular polysaccharide biosynthesis protein
			epsB	Similar to capsular polysaccharide biosynthesis protein
yqxM-sipW-tasA	RemA, SinR, AbrB, (Spo0A)	Transition state response	*tasA*	Spore coat-associated protein N
manPA-yjdF	ManR	Utilization of secondary carbon sources	*manA*	Mannose-6-phosphate isomerase, ManA

			manP	PTS system mannose-specific EIIBCA component
manR	ManR	Utilization of secondary carbon sources	*manR*	Probable transcriptional regulator, ManR
rbsRKDACB	CcpA, AbrB	Utilization of secondary carbon sources	*rbsC*	Ribose transport system permease protein, RbsC
			rbsA	Ribose import ATP-binding protein, RbsA
			rbsR	Ribose operon repressor
mtlAFD	(MtlR)	Utilization of secondary carbon sources	*mtlA*	PTS system mannitol-specific EIICB component
			mtlD	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase
gamAP	(YgaR)	Utilization of secondary carbon sources	*gamA*	Probable glucosamine-6-phosphate deaminase 2
			gamP	Putative PTS system glucosamine-specific EIICBA component
gmuBACDREFG	(CcpA), (GmuR)	Utilization of secondary carbon sources	*gmuB*	Oligo-beta-mannoside-specific phosphotransferase enzyme IIB component
			gmuA	Oligo-beta-mannoside-specific phosphotransferase enzyme IIA component
			gmuC	Oligo-beta-mannoside permease IIC component
			gmuD	6-Phospho-beta-glucosidase GmuD
			gmuF	Mannose-6-phosphate isomerase
maeN	YufM	Utilization of secondary carbon sources	*maeN*	Na(+)-malate symporter

mtnKA		Methionine salvage	*mtnA*	Methylthioribose-1-phosphate isomerase
			mtnK	Methylthioribose kinase
wapA-yxxG	YycF	Cell wall metabolism	*wapA*	Wall-associated protein
			yxxG	Uncharacterized protein YxxG
yoeB	YycF	Cell wall metabolism	*yoeB*	Uncharacterized protein YoeB
plsC		Membrane synthesis	*plsC*	1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
mtnWXBD		Methionine salvage	*mtnX*	2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentenyl-1-phosphate phosphatase
			mtnD	Acireductone dioxygenase
xpt-pbuX	PurR	Purine/ pyrimidine metabolism	*xpt*	Xanthine phosphoribosyltransferase
lmrAB	LmrA	Antibiotics related	*lmrA*	HTH-type transcriptional regulator, LmrA
sunS		Antibiotics related	*sunS*	SPBc2 prophage-derived glycosyltransferase, SunS
ywsB		Undefined	*ywsB*	Cell wall-binding protein, YwsB
ycxA		Undefined	*ycxA*	Uncharacterized MFS-type transporter, YcxA
yokH		Undefined	*yokH*	SPBc2 prophage-derived uncharacterized protein, YokH
clpE	CtsR	Stress response	*clpE*	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit, ClpE
yrkA		Undefined	*yrkA*	UPF0053 protein, YrkA
yxzC		Undefined	*yxzC*	Uncharacterized protein, YxzC
yxiG		Undefined	*yxiG*	Uncharacterized protein, YxiG
yonR		Undefined	*yonR*	SPBc2 prophage-derived uncharacterized HTH-type transcriptional regulator, YonR
yxiF		Undefined	*yxiF*	Uncharacterized protein, YxiF
yrhP		Undefined	*yrhP*	Uncharacterized membrane protein, YrhP
yfmQ		Undefined	*yfmQ*	Uncharacterized protein, YfmQ

yxzG		Undefined	*yxzG*	Uncharacterized protein, YxzG
yxiJ		Undefined	*yxiJ*	Uncharacterized protein, YxiJ

a: 転写単位(TUs)はDBTBSとBsubcycを参考にした(Sierro *et al*., 2008; Caspi *et al*., 2014)。

b: 遺伝子の転写開始部位近傍で作用することが特定されている転写制御因子(TFs)。括弧内は遺伝子欠失によって転写に影響を及ぼしたものであるが、結合部位は確認されていない。

c: 遺伝子機能の情報。主にPanther database (http://www.pantherdb.org/)より得た。*epsA* と *epsB*についてはDBTBSより得た。*plsC*は枯草菌の生育に必須である。

表４．３　変異型RpoA発現株のChAP-chip解析にて、RNAPの結合力が低下した遺伝子（転写単位）の数

TUs[a]	Transcr-iptome[b]	Regulator[c]	Functional category	Gene	Esse-ntial[d]	Function and/or encoded protein [e]
srfAA-srfAB-comS-srfAC-srfAD	Y	ComA, PerR, CodY	Transition state response	*srfAA*		Surfactin synthase subunit 1
	Y			*srfAB*		Surfactin synthase subunit 2
	Y			*srfAC*		Surfactin synthase subunit 3
	Y			*srfAD*		Surfactin synthase thioesterase subunit
rapA-phrA	Y	ComA, (Spo0A)	Transition state response	*rapA*		Response regulator aspartate phosphatase A
mtnKA	Y		Methionine salvages	*mtnA*		Methylthioribose-1-phosphate isomerase
	Y			*mtnK*		Methylthioribose kinase
mtlAFD	Y	(MtlR)	Utilization of secondary carbon sources	*mtlA*		PTS system mannitol-specific EIICB component
	Y			*mtlD*		Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase
				mtlF		PTS system mannitol-specific EIIA component

trePAR		(CcpA)	Utilization of secondary carbon sources	*treP*		PTS system trehalose-specific EIIBC component
				treA		Trehalose-6-phosphate hydrolase
				treR		Trehalose operon transcriptional repressor
cggR-gapA-pgk-tpiA-pgm-emo		(CcpA), CggR	Utilization of secondary carbon sources	*cggR*		Central glycolytic genes regulator
				gapA		Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1
xylAB		CcpA, XylR	Utilization of secondary carbon sources	*xylA*		Xylose isomerase
				xylB		Xylulose kinase
ackA			Utilization of secondary carbon sources	*ackA*		Acetate kinase
glpFK		CcpA	Utilization of secondary carbon sources	*glpK*		Glycerol kinase
				glpF		Glycerol uptake facilitator protein
glpD			Utilization of secondary carbon sources	*glpD*		Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase
trpP			Utilization of secondary carbon sources	*trpP*		Probable tryptophan transport protein

infC-rplT (ribosomal protein gene cluster)			Ribosome synthesis	*rplT*	Y	50S ribosomal protein, L20
rpsT (ribosomal protein gene cluster)			Ribosome synthesis	*rpsT*		30S ribosomal protein, S20
rpmGA (ribosomal protein gene cluster)			Ribosome synthesis	*rpmGA*		50S ribosomal protein, L33
rpsJ-rplQ (ribosomal protein gene clusters)			Ribosome synthesis	*rplV*		50S ribosomal protein, L22
				rpsC	Y	30S ribosomal protein, S3
				rplP	Y	50S ribosomal protein, L16
				rplX	Y	50S ribosomal protein, L24
				rplE	Y	50S ribosomal protein, L5
				rpsH	Y	RNA polymerase sigma-H factor
				rplF	Y	50S ribosomal protein, L6
				rplR	Y	50S ribosomal protein, L18
				rpsE	Y	30S ribosomal protein, S5
				rpmD	Y	50S ribosomal protein, L30
				secY	Y	Protein translocase subunit, SecY
				adk	Y	Adenylate kinase

				mapA	Y	Methionine aminopeptidase 1
				rpsK	Y	30S ribosomal protein, S11
				rplQ	Y	50S ribosomal protein, L17
rplJ-rplL (ribosomal protein gene cluster)			Ribosome synthesis	*rplL*	Y	50S ribosomal protein, L7/L12
cwlO		YycF	Cell wall metabolism	*cwlO*		Peptidoglycan DL-endopeptidase, CwlO
deoC			Purine/ pyrimidine metabolism	*deoC*		Deoxyribose-phosphate aldolase
odhAB			Energy production	*odhA*		2-Oxoglutarate dehydrogenase E1 component
				odhB		Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex
qoxD			Energy production	*qoxD*		Quinol oxidase subunit 4
atpB			Energy production	*atpB*		ATP synthase subunit a
cspB			Stress response	*cspB*		Major cold-shock protein.
sigX			Stress response	*sigX*		RNA polymerase ECF-type sigma factor
ypzK			Undefined	*ypzK*		Riboflavin biosynthesis, reductase, *ribT*, *ribbed*

a: 転写単位(TUs)はDBTBSとBsubcycを参考にした(Sierro *et al*., 2008; Caspi *et al*., 2014)。
b: トランスクリプトーム解析で発現量の低下した遺伝子を［Y］と示した。

c: 転写開始点の近傍に結合する転写制御因子。括弧内は遺伝子欠失によって転写に影響を及ぼしたものであるが、結合部位は確認されていない。
d: 必須遺伝子を［Y］と示した。
e: 遺伝子機能の情報。主にPanther database (http://www.pantherdb.org/)より得た。*mtlF*の機能はBsubcycより得た。*cspB, ypzK, sigX* の機能はBSORF (http://bacillus.genome.ad.jp/)より得た。

V．謝辞

本研究を行うにあたり、小笠原直毅教授にはテーマの決定から博士論文の執筆まで長期にわたり様々な御指導をいただいたことを心から感謝します。

真木寿治教授には、アドバイザーヒアリングで貴重な御助言をいただいたこと、また小笠原教授退官後には主査として御指導頂いたことを深く感謝します。

高木博史教授には、入学前より名前を憶えていただき、目をかけていただきました。また、本論文の執筆にあたり、御助言をいただいたことを深く感謝します。

秋山昌広准教授には、アドバイザーヒアリングで貴重な御助言をいただいたことを深く感謝します。

大島拓助教には、研究を行う上での心構え、実験に関する助言、さらに博士論文の執筆に至るまで多岐にわたって御指導いただいたことを深く感謝します。

石川周助教には、博士論文執筆や発表練習等での有益な御助言、御助力を頂いたこと深く感謝します。

小林和夫助教、有益な御助言、御助力を頂いたこと深く感謝します。

実験の御指導を頂いた楠屋陽子さん、Onuma Chumsakul さんに深く感謝します。

公私にわたり共に時間を過ごした細胞機能システム研究室（旧システム細胞学講座）の皆様及び卒業生の皆様に感謝します。ありがとう。

最後に、私の大学院進学を快諾し、あらゆる面でのサポートをしていただいた両親に心から感謝します。

村山　智彦

Ⅵ. 参考文献

Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. (1961). Requirements for Transformation in *Bacillus Subtilis*. J. Bacteriol. *81,* 741-746.

Artsimovitch, I., Svetlov, V., Anthony, L., Burgess, R.R., and Landick, R. (2000). RNA polymerases from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* differ in recognition of regulatory signals *in vitro*. J. Bacteriol. *182,* 6027-6035.

Ball MS, K.P. (2007). Mass spectral compatibility of four proteomics stains. Journal of Proteome Research *6,* 4313-4320.

Banner, C.D., Moran, C.P.,Jr, and Losick, R. (1983). Deletion analysis of a complex promoter for a developmentally regulated gene from *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. *168,* 351-365.

Benoff, B., Yang, H., Lawson, C.L., Parkinson, G., Liu, J., Blatter, E., Ebright, Y.W., Berman, H.M., and Ebright, R.H. (2002). Structural basis of transcription activation: the CAP-alpha CTD-DNA complex. Science *297,* 1562-1566.

Bisicchia, P., Noone, D., Lioliou, E., Howell, A., Quigley, S., Jensen, T., Jarmer, H., and Devine, K.M. (2007). The essential YycFG two-component system controls cell wall metabolism in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. *65,* 180-200.

Blatter, E.E., Ross, W., Tang, H., Gourse, R.L., and Ebright, R.H. (1994). Domain organization of RNA polymerase alpha subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. Cell *78,* 889-896.

Bongiorni, C., Ishikawa, S., Stephenson, S., Ogasawara, N., and Perego, M. (2005). Synergistic regulation of competence development in *Bacillus subtilis* by two Rap-Phr systems. J. Bacteriol. *187,* 4353-4361.

Bouraoui, H., Ventroux, M., Noirot-Gros, M.F., Deutscher, J., and Joyet, P. (2013). Membrane sequestration by the EIIB domain of the mannitol permease MtlA activates the *Bacillus subtilis mtl* operon regulator MtlR. Mol. Microbiol. *87,* 789-801.

Boylan, S.A., Suh, J.W., Thomas, S.M., and Price, C.W. (1989). Gene encoding the alpha core subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase is cotranscribed with the genes for initiation factor 1 and ribosomal proteins B, S13, S11, and L17. J. Bacteriol. *171,* 2553-2562.

Browning, D.F., and Busby, S.J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. Nat. Rev. Microbiol. *2,* 57-65.

Busby, S., and Ebright, R.H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. Cell *79,* 743-746.

Caramori, T., and Galizzi, A. (1998). The UP element of the promoter for the flagellin gene, *hag,* stimulates transcription from both SigD- and SigA-dependent promoters in *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet. *258,* 385-388.

Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C.A., Holland, T.A., Keseler, I.M., Kothari, A., Kubo, A., *et al.* (2014). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. Nucleic Acids Res. *42,* D459-71.

Chen, H., Tang, H., and Ebright, R.H. (2003). Functional interaction between RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain and sigma70 in UP-element- and activator-dependent transcription. Mol. Cell *11,* 1621-1633.

Chumsakul, O., Takahashi, H., Oshima, T., Hishimoto, T., Kanaya, S., Ogasawara, N., and Ishikawa, S. (2011). Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. Nucleic Acids Res. *39,* 414-428.

Darbon E, Servant P, Poncet S, Deutscher J (2002). Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P~ GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis glpFK* expression. Mol. Microbiol. *43,* 1039-1052.

Debarbouille, M., Martin-Verstraete, I., Kunst, F., and Rapoport, G. (1991). The *Bacillus subtilis sigL* gene encodes an equivalent of sigma 54 from gram-negative bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88,* 9092-9096.

Ebright, R.H. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. J. Mol. Biol. *304,* 687-698.

Ebright, R.H., and Busby, S. (1995). The *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit: structure and function. Curr. Opin. Genet. Dev. *5,* 197-203.

Estrem, S.T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z.W., Niu, W., Ebright, R.H., and Gourse, R.L. (1999). Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. Genes Dev. *13,* 2134-2147.

Fredrick, K., Caramori, T., Chen, Y.F., Galizzi, A., and Helmann, J.D. (1995). Promoter architecture in the flagellar regulon of *Bacillus subtilis*: high-level expression of flagellin by the sigma D RNA polymerase requires an upstream promoter element. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92,* 2582-2586.

Fredrick, K., and Helmann, J.D. (1997). RNA polymerase sigma factor determines start-site selection but is not required for upstream promoter element activation on heteroduplex (bubble) templates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94,* 4982-4987.

Frisby, D., and Zuber, P. (1991). Analysis of the upstream activating sequence and site of carbon and nitrogen source repression in the promoter of an early-induced sporulation gene of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. *173,* 7557-7564.

Fukuchi, K., Kasahara, Y., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S., and Ogasawara, N. (2000). The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. Microbiology *146 (Pt 7),* 1573-1583.

Gaal, T., Ross, W., Blatter, E.E., Tang, H., Jia, X., Krishnan, V.V., Assa-Munt, N., Ebright, R.H., and Gourse, R.L. (1996). DNA-binding determinants of the alpha subunit of RNA polymerase: novel DNA-binding domain architecture. Genes Dev. *10,* 16-26.

Gourse RL, Gaal T, Bartlett MS, Appleman JA, Ross W (1996). rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. *50,* 645-677.

Gourse, R.L., Ross, W., and Gaal, T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. Mol. Microbiol. *37,* 687-695.

Graves, M.C., and Rabinowitz, J.C. (1986). *In vivo* and *in vitro* transcription of the Clostridium pasteurianum ferredoxin gene. Evidence for "extended" promoter elements in gram-positive organisms. J. Biol. Chem. *261,* 11409-11415.

Hayward, R.S., Igarashi, K., and Ishihama, A. (1991). Functional specialization within the alpha-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. J. Mol. Biol. *221,* 23-29.

Helmann, J.D. (1995). Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. Nucleic Acids Res. *23,* 2351-2360.

Hochschild, A., and Dove, S.L. (1998). Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. Cell *92,* 597-600.

Igarashi, K., Fujita, N., and Ishihama, A. (1991). Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. J. Mol. Biol. *218,* 1-6.

Igarashi, K., Hanamura, A., Makino, K., Aiba, H., Aiba, H., Mizuno, T., Nakata, A., and Ishihama, A. (1991). Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: two modes of transcription activation by positive factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88,* 8958-8962.

Igarashi, K., and Ishihama, A. (1991). Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase alpha subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. Cell *65,* 1015-1022.

Irnov, I., Sharma, C.M., Vogel, J., and Winkler, W.C. (2010). Identification of regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. *38,* 6637-6651.

Ishihama, A. (1992). Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation. Mol. Microbiol. *6,* 3283-3288.

Ishikawa, S., Ogura, Y., Yoshimura, M., Okumura, H., Cho, E., Kawai, Y., Kurokawa, K., Oshima, T., and Ogasawara, N. (2007). Distribution of stable DnaA-binding sites on the *Bacillus subtilis* genome detected using a modified ChIP-chip method. DNA Res. *14,* 155-168.

Jeon, Y.H., Yamazaki, T., Otomo, T., Ishihama, A., and Kyogoku, Y. (1997). Flexible linker in the RNA polymerase alpha subunit facilitates the independent motion of the C-terminal activator contact domain. J. Mol. Biol. *267,* 953-962.

Kainz, M., and Gourse, R.L. (1998). The C-terminal domain of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase is required for efficient rho-dependent transcription termination. J. Mol. Biol. *284,* 1379-1390.

Kovacic, R.T. (1987). The 0 degree C closed complexes between *Escherichia coli* RNA polymerase and two promoters, T7-A3 and *lacUV5*. J. Biol. Chem. *262,* 13654-13661.

Krasny L, Gourse RL (2004). An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. Embo j. *23,* 4473-4483.

Krummel, B., and Chamberlin, M.J. (1992). Structural analysis of ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase. Deoxyribonuclease I footprinting of defined complexes. J. Mol. Biol. *225,* 239-250.

Kusuya, Y., Kurokawa, K., Ishikawa, S., Ogasawara, N., and Oshima, T. (2011). Transcription factor GreA contributes to resolving promoter-proximal pausing of RNA polymerase in *Bacillus subtilis* cells. J. Bacteriol. *193,* 3090-3099.

Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M., and Ebright, R.H. (2004). Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. Curr. Opin. Struct. Biol. *14,* 10-20.

Lazazzera, B.A., Kurtser, I.G., McQuade, R.S., and Grossman, A.D. (1999). An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. *181,* 5193-5200.

Lemke JJ, Sanchez-Vazquez P, Burgos HL, Hedberg G, Ross W, et al. (2011). Direct regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108,* 5712-5717.

Levin, J.R., Krummel, B., and Chamberlin, M.J. (1987). Isolation and properties of transcribing ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase positioned at a single template base. J. Mol. Biol. *196,* 85-100.

Liu, K., and Hanna, M.M. (1995). NusA interferes with interactions between the nascent RNA and the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* transcription complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92,* 5012-5016.

Liu, K., Zhang, Y., Severinov, K., Das, A., and Hanna, M.M. (1996). Role of *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit in modulation of pausing, termination and anti-termination by the transcription elongation factor NusA. Embo j. *15,* 150-161.

Ludwig H, Rebhan N, Blencke HM, Merzbacher M, Stülke J (2002). Control of the glycolytic *gapA* operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA - mediated regulation. Mol. Microbiol. *45*, 543-553.

Mah, T.F., Kuznedelov, K., Mushegian, A., Severinov, K., and Greenblatt, J. (2000). The alpha subunit of *E. coli* RNA polymerase activates RNA binding by NusA. Genes Dev. *14,* 2664-2675.

MARMUR, J. (1961). A procedure for isolation of DNA from microorganisms. Journal of Molecular Biology *3,* 208-218.

Meijer, W.J., and Salas, M. (2004). Relevance of UP elements for three strong *Bacillus subtilis* phage phi29 promoters. Nucleic Acids Res. *32,* 1166-1176.

Mencia, M., Monsalve, M., Rojo, F., and Salas, M. (1996). Transcription activation by phage phi29 protein p4 is mediated by interaction with the alpha subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 6616-6620.

Monsalve, M., Mencia, M., Salas, M., and Rojo, F. (1996). Protein p4 represses phage phi 29 A2c promoter by interacting with the alpha subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93,* 8913-8918.

Mueller, J.P., Bukusoglu, G., and Sonenshein, A.L. (1992). Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* glucose starvation-inducible genes: control of *gsiA* by the ComP-ComA signal transduction system. J. Bacteriol. *174,* 4361-4373.

Murakami, K.S., and Darst, S.A. (2003). Bacterial RNA polymerases: the wholo story. Curr. Opin. Struct. Biol. *13,* 31-39.

Negishi, T., Fujita, N., and Ishihama, A. (1995). Structural map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: structural domains identified by proteolytic cleavage. J. Mol. Biol. *248,* 723-728.

Newberry KJ, Nakano S, Zuber P, Brennan RG (2005). Crystal structure of the *Bacillus subtilis* anti-alpha, global transcriptional regulator, Spx, in complex with the α C-terminal domain of RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102,* 15839-15844.

Niu, W., Kim, Y., Tau, G., Heyduk, T., and Ebright, R.H. (1996). Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. Cell *87,* 1123-1134.

Osmundson, J., Montero-Diez, C., Westblade, L.F., Hochschild, A., and Darst, S.A. (2012). Promoter-specific transcription inhibition in Staphylococcus aureus by a phage protein. Cell *151,* 1005-1016.

Prasch, S., Jurk, M., Washburn, R.S., Gottesman, M.E., Wohrl, B.M., and Rosch, P. (2009). RNA-binding specificity of *E. coli* NusA. Nucleic Acids Res. *37,* 4736-4742.

Rippa, V., Cirulli, C., Di Palo, B., Doti, N., Amoresano, A., and Duilio, A. (2010). The ribosomal protein L2 interacts with the RNA polymerase alpha subunit and acts as a transcription modulator in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. *192,* 1882-1889.

Ross, W., Ernst, A., and Gourse, R.L. (2001). Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. Genes Dev. *15,* 491-506.

Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., and Gourse, R.L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. Science *262,* 1407-1413.

Ross, W., Schneider, D.A., Paul, B.J., Mertens, A., and Gourse, R.L. (2003). An intersubunit contact stimulating transcription initiation by *E coli* RNA polymerase: interaction of the alpha C-terminal domain and sigma region 4. Genes Dev. *17,* 1293-1307.

Saecker, R.M., Tsodikov, O.V., McQuade, K.L., Schlax, P.E.,Jr, Capp, M.W., and Record, M.T.,Jr. (2002). Kinetic studies and structural models of the association of *E. coli* sigma(70) RNA polymerase with the lambdaP(R) promoter: large scale conformational changes in forming the kinetically significant intermediates. J. Mol. Biol. *319,* 649-671.

Salzberg, L.I., Powell, L., Hokamp, K., Botella, E., Noone, D., and Devine, K.M. (2013). The WalRK (YycFG) and sigma(I) RsgI regulators cooperate to control CwlO and LytE expression in exponentially growing and stressed *Bacillus subtilis* cells. Mol. Microbiol. *87,* 180-195.

Schauer, A.T., Cheng, S.W., Zheng, C., St Pierre, L., Alessi, D., Hidayetoglu, D.L., Costantino, N., Court, D.L., and Friedman, D.I. (1996). The alpha subunit of RNA polymerase and transcription antitermination. Mol. Microbiol. *21,* 839-851.

Schmiedel D, Hillen W (1996). Contributions of XylR, CcpA and cre to diauxic growth of *Bacillus megaterium* and to xylose isomerase expression in the presence of glucose and xylose. Mol. Gen. Genet. *250,* 259-266.

Schweimer, K., Prasch, S., Sujatha, P.S., Bubunenko, M., Gottesman, M.E., and Rosch, P. (2011). NusA interaction with the alpha subunit of *E. coli* RNA polymerase is via the UP element site and releases autoinhibition. Structure *19,* 945-954.

Sekowska, A., and Danchin, A. (2002). The methionine salvage pathway in *Bacillus subtilis*. BMC Microbiol. *2,* 8.

Sierro, N., Makita, Y., de Hoon, M., and Nakai, K. (2008). DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. Nucleic Acids Res. *36,* D93-6.

Tagami, H., and Aiba, H. (1998). A common role of CRP in transcription activation: CRP acts transiently to stimulate events leading to open complex formation at a diverse set of promoters. Embo j. *17,* 1759-1767.

Tanaka, K., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. (2003). The *Bacillus subtilis* YufLM two-component system regulates the expression of the malate transporters MaeN (YufR) and YflS, and is essential for utilization of malate in minimal medium. Microbiology *149,* 2317-2329.

Vogel, U., and Jensen, K.F. (1994). The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate. J. Bacteriol. *176,* 2807-2813.

Wenzel, M., and Altenbuchner, J. (2013). The *Bacillus subtilis* mannose regulator, ManR, a DNA-binding protein regulated by HPr and its cognate PTS transporter ManP. Mol. Microbiol. *88,* 562-576.

Winkelman, J.T., Bree, A.C., Bate, A.R., Eichenberger, P., Gourse, R.L., and Kearns, D.B. (2013). RemA is a DNA-binding protein that activates biofilm matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. *88,* 984-997.

Yasuno, K., Yamazaki, T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Matsugami, A., Katahira, M., Ishihama, A., and Kyogoku, Y. (2001). Interaction of the C-terminal domain of the *E. coli* RNA polymerase alpha subunit with the UP element: recognizing the backbone structure in the minor groove surface. J. Mol. Biol. *306,* 213-225.

Zhang, G., and Darst, S.A. (1998). Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit amino-terminal domain. Science *281,* 262-266.

Zhang, Y., Nakano, S., Choi, S.Y., and Zuber, P. (2006). Mutational analysis of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase alpha C-terminal domain supports the interference model of Spx-dependent repression. J. Bacteriol. *188,* 4300-4311.

参考資料

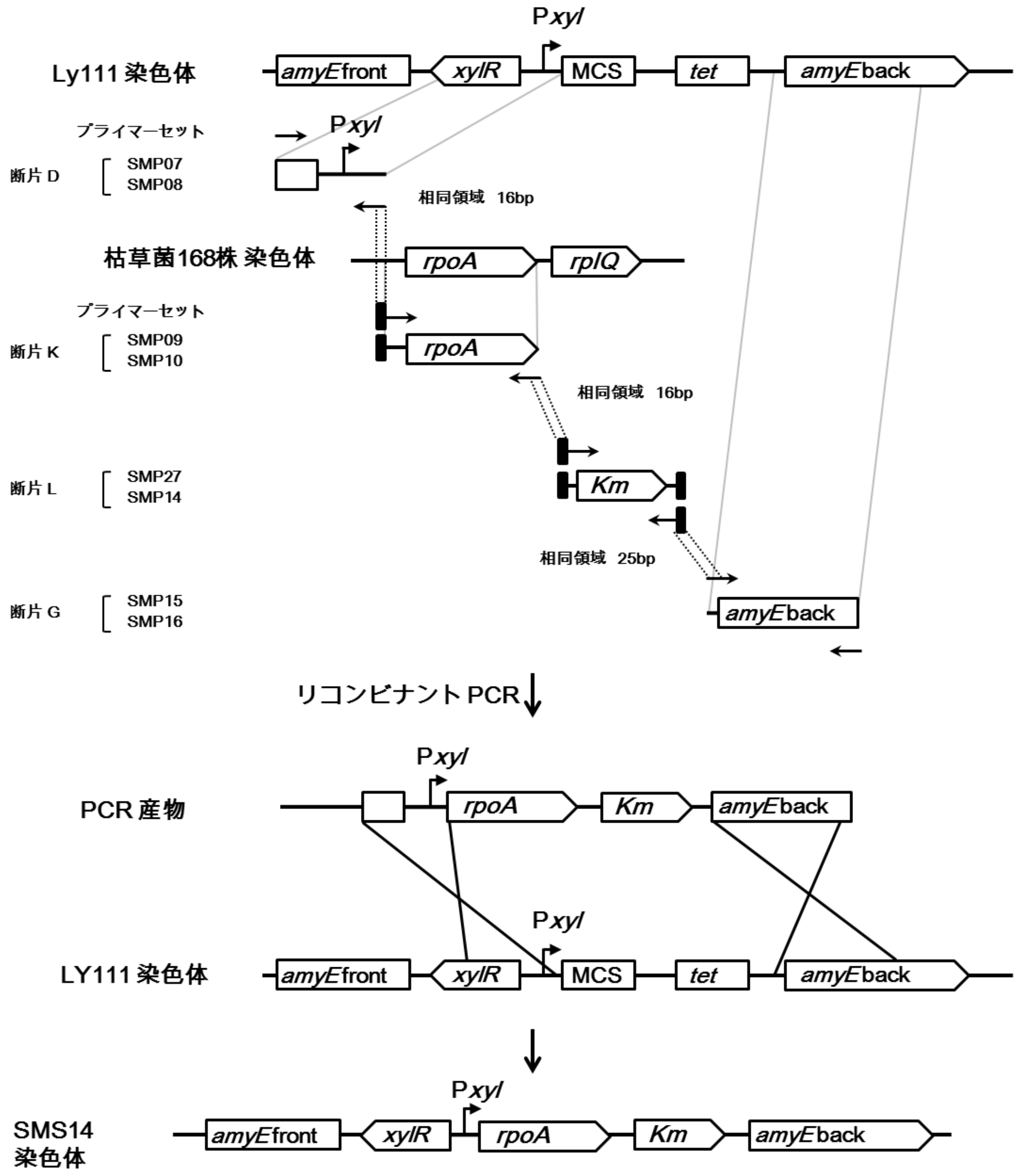


図 S１．１　枯草菌 SMS14 株の作成

リコンビナント PCR を用いた菌株作成の概要を示した。箱型矢印により遺伝子を示した。点線により、増幅した DNA 断片と対応するゲノム DNA 上の相同領域を示した。プライマー名の横にある矢印により、ゲノム DNA 上の、プライマーを設計した位置を示した。

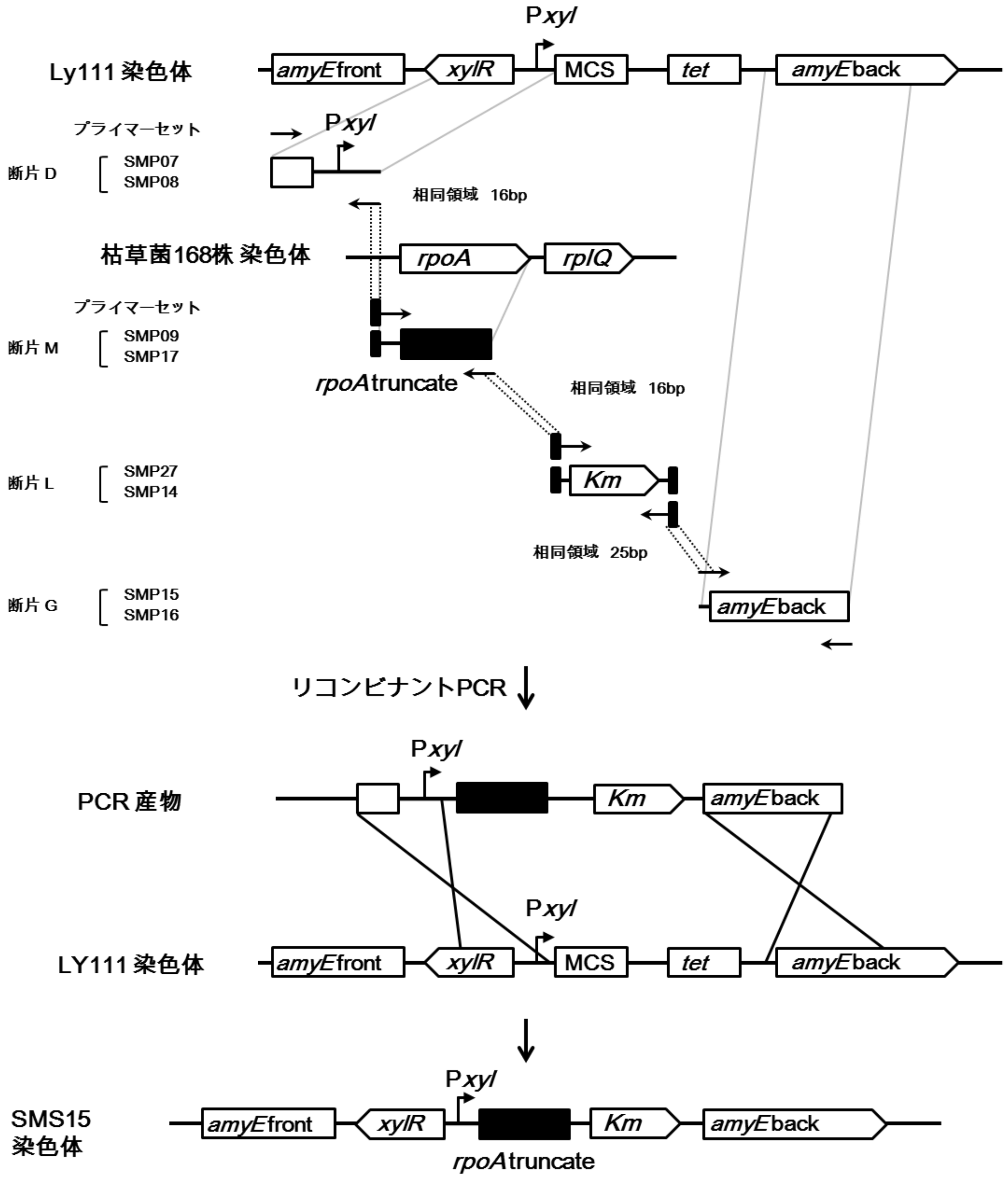


図 S１．２　枯草菌 SMS15 株の作成

リコンビナント PCR を用いた菌株作成の概要を示した。箱型矢印により遺伝子を示した。黒い四角は C 末端領域を欠失させた RpoA 遺伝子を示している。点線により、増幅した DNA 断片と対応するゲノム DNA 上の相同領域を示した。プライマー名の横にある矢印により、ゲノム DNA 上の、プライマーを設計した位置を示した。

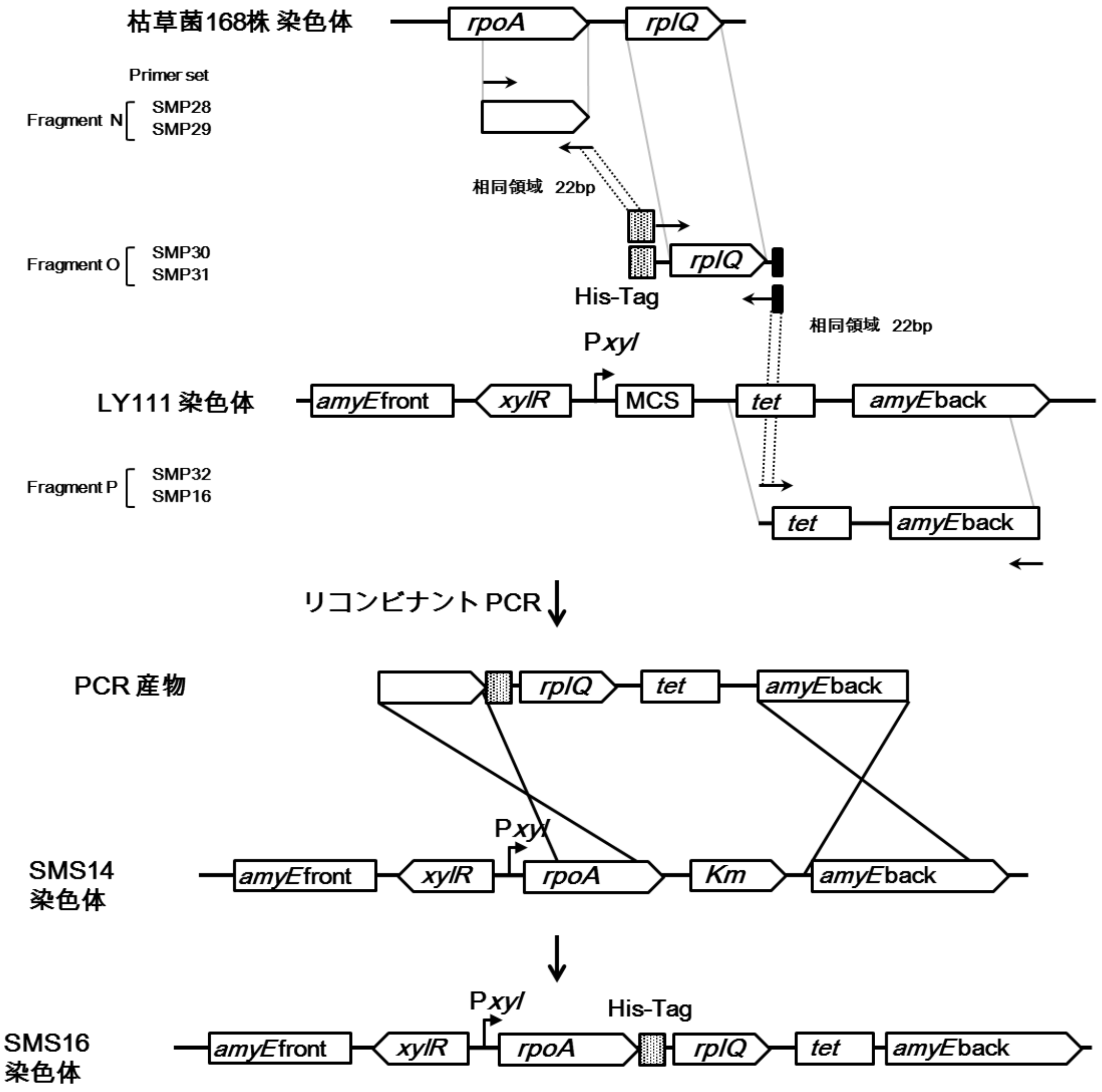


図 S１．３　枯草菌 SMS16 株の作成

リコンビナント PCR を用いた菌株作成の概要を示した。箱型矢印により遺伝子を示した。点線により、増幅した DNA 断片と対応するゲノム DNA 上の相同領域を示した。プライマー名の横にある矢印により、ゲノム DNA 上の、プライマーを設計した位置を示した。

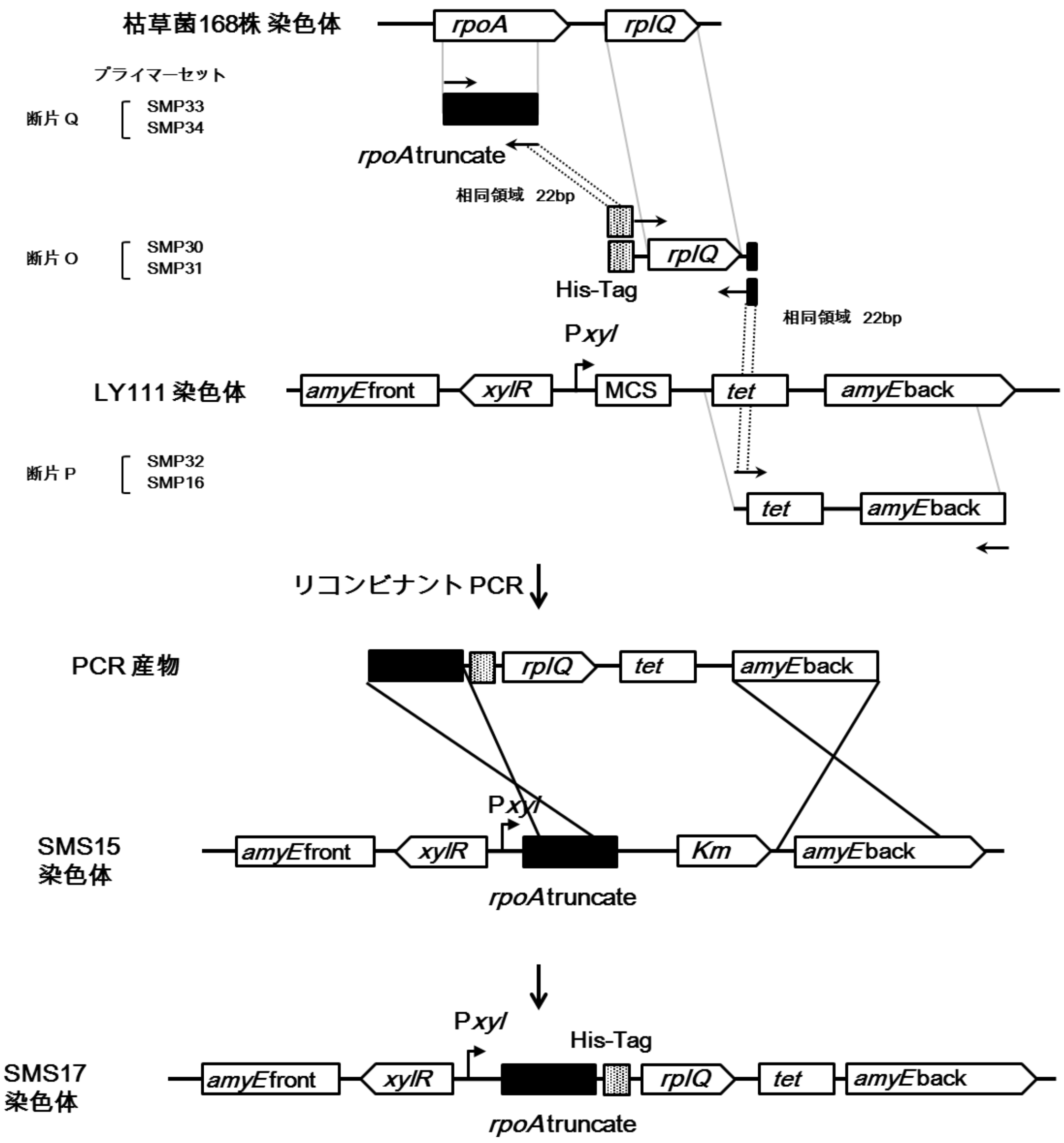
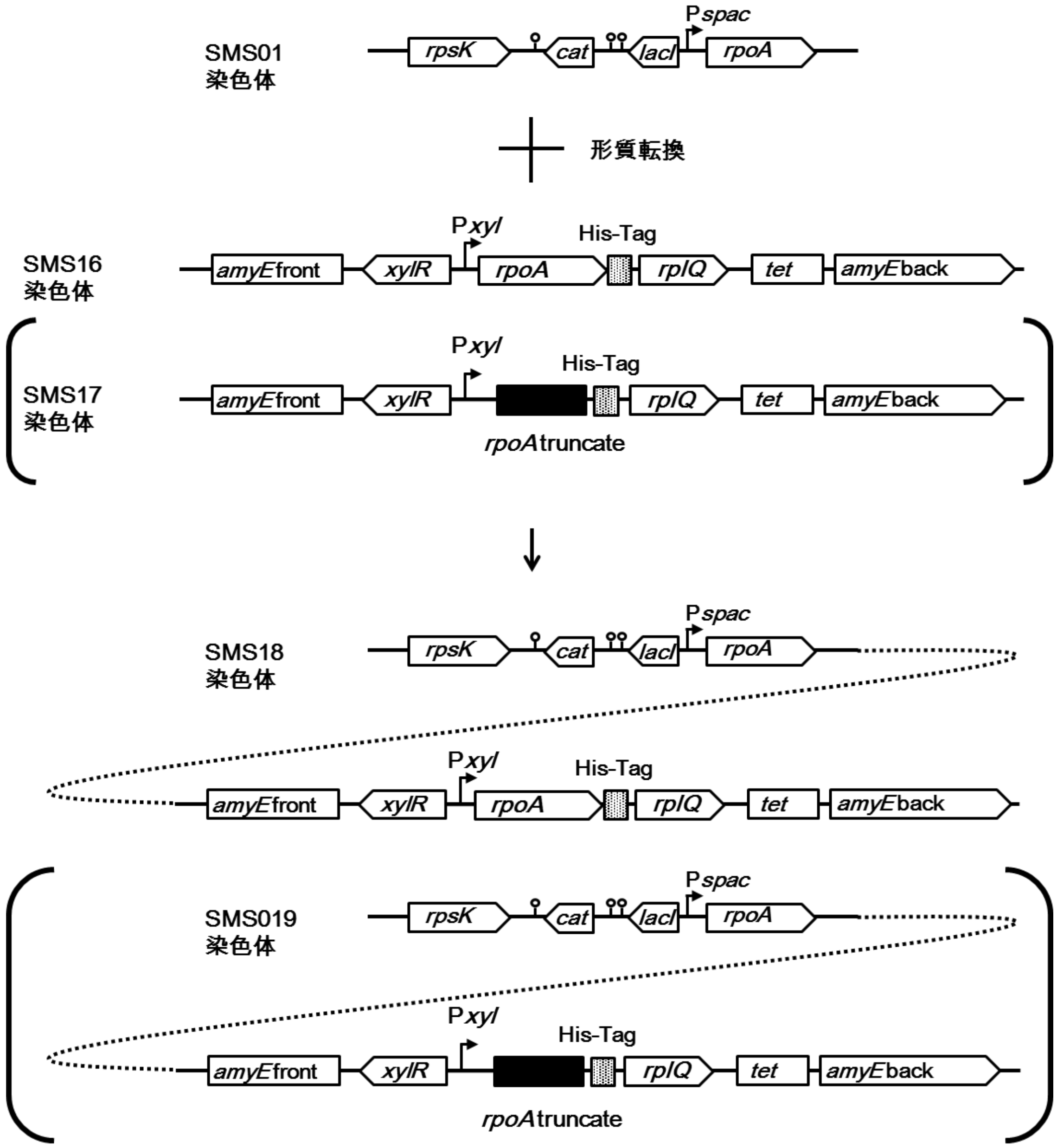


図 S1．４　枯草菌 SMS17 株の作成

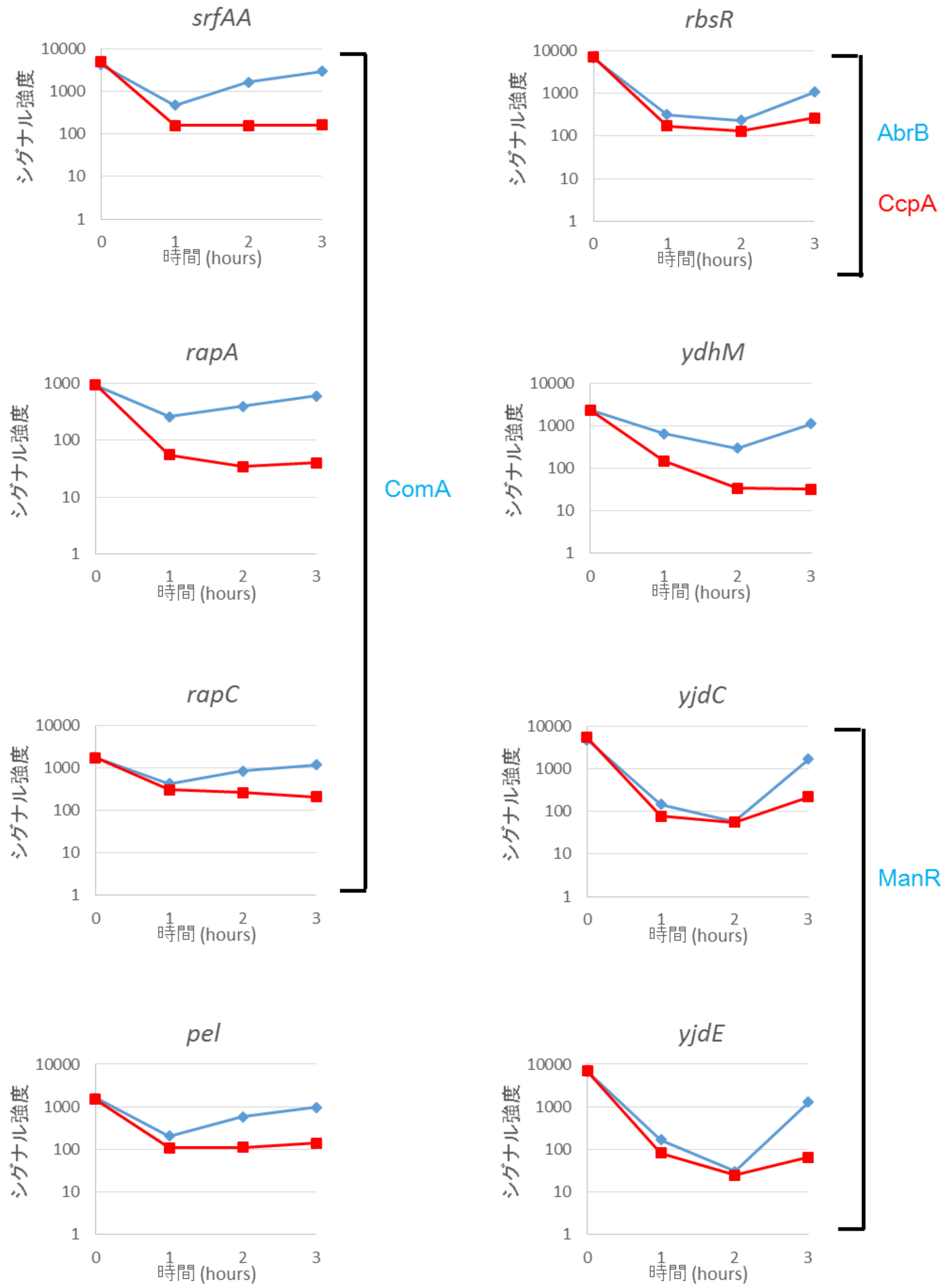
リコンビナント PCR を用いた菌株作成の概要を示した。箱型矢印により遺伝子を示した。黒い四角は C 末端領域を欠失させた RpoA 遺伝子を示している。点線により、増幅した DNA 断片と対応するゲノム DNA 上の相同領域を示した。プライマー名の横にある矢印により、ゲノム DNA 上の、プライマーを設計した位置を示した。



図Ｓ１．５　枯草菌 SMS18 株及び SMS19 株の作成

リコンビナント PCR を用いた菌株作成の概要を示した。箱型矢印により遺伝子を示した。黒い四角は C 末端領域を欠失させた RpoA 遺伝子を示している。点線により、増幅した DNA 断片と対応するゲノム DNA 上の相同領域を示した。プライマー名の横にある矢印により、ゲノム DNA 上の、プライマーを設計した位置を示した。

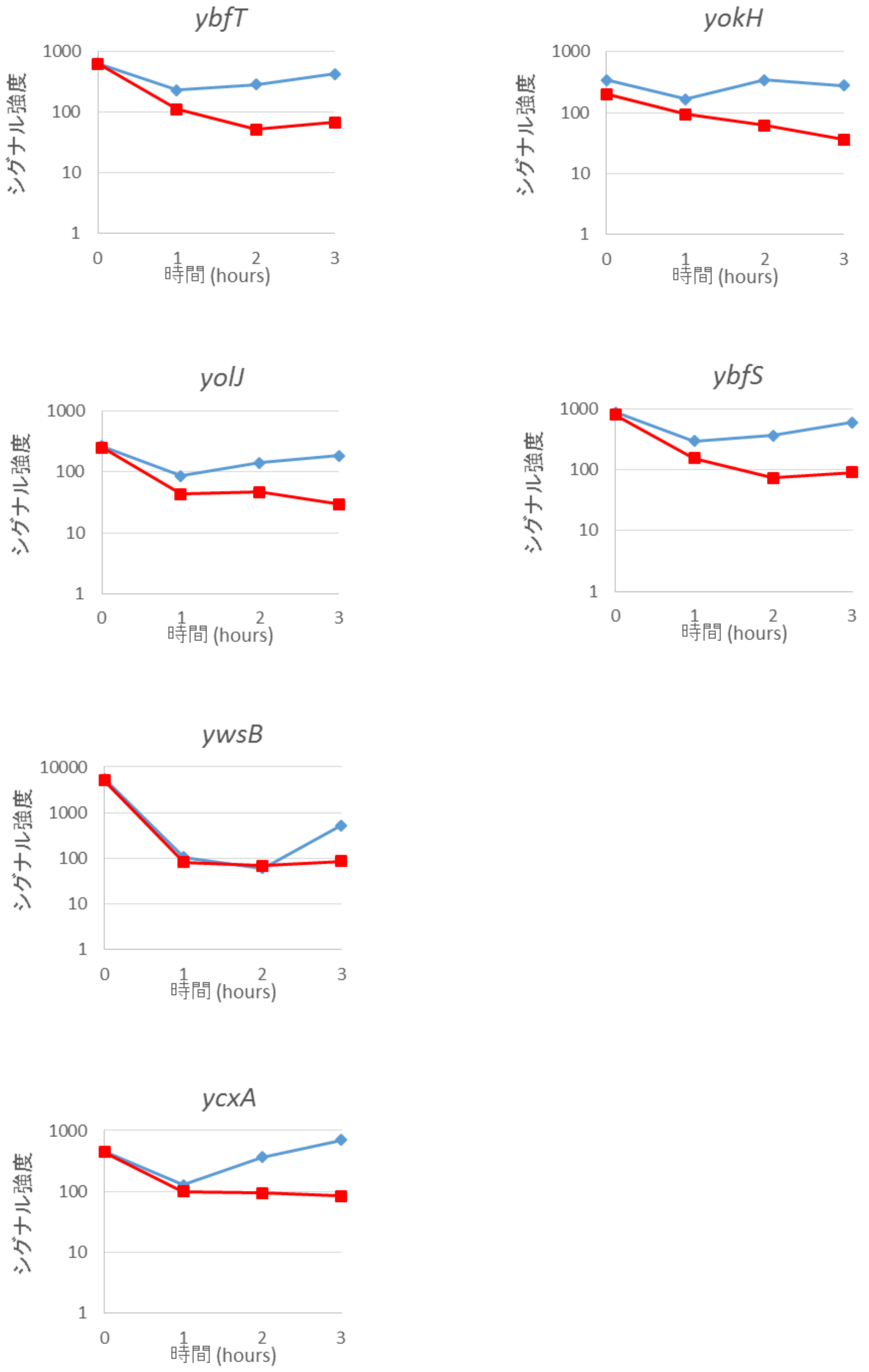
タイプＴ1: 抑制後誘導型



図Ｓ2．１　タイプ T1 : タイム 0 で発現しており、キシロース培地を用いた培養開始後 1 時間（タイム 1）で一時的に抑制されるが、野生型 RpoA を持つ SMS08 株では発現レベルが回復し、変異型 RpoA を持つ SMS09 株では発現レベルが回復しない遺伝子群

変異型 RpoA 発現株で、発現が低下した遺伝子のタイムコースの発現プロファイル。青線 : 野生型 RpoA 発現株（SMS08 株)、赤線：変異型 RpoA 発現株（SMS09 株)

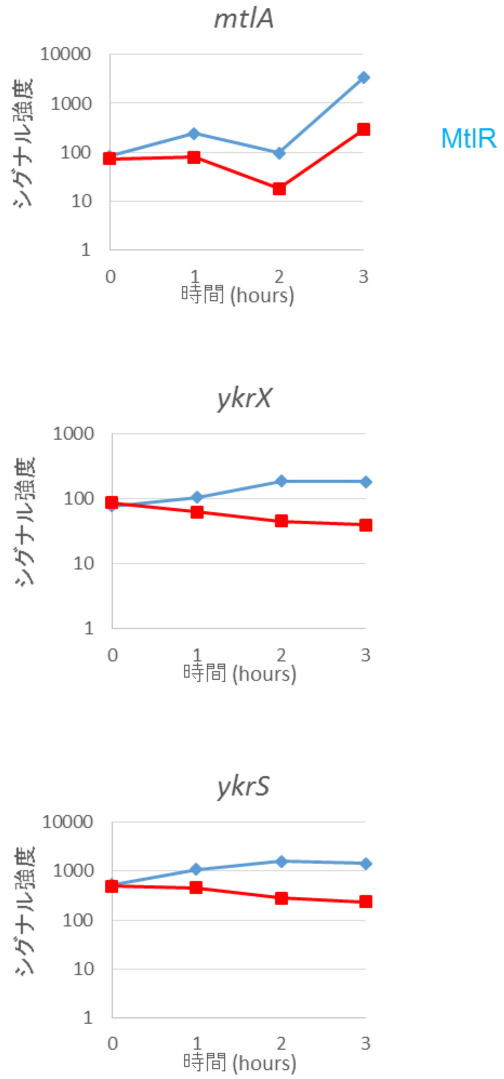
タイプＴ1: 抑制後誘導型



図Ｓ2．２　タイプ T1(続き)

変異型 RpoA 発現株で、発現が低下した遺伝子のタイムコースの発現プロファイル。青線：野生型 RpoA 発現株（SMS08 株)、赤線：変異型 RpoA 発現株（SMS09 株)

タイプ T 2:誘導型



図Ｓ２．３　タイプ T2 : タイム 0 では発現レベルが低く、タイム 1 以降 RpoA を持つ SMS08 株では発現レベルが上昇し、変異型 RpoA を持つ SMS09 株では発現レベルが上昇しない遺伝子群

変異型 RpoA 発現株で、発現が低下した遺伝子のタイムコースの発現プロファイル。青線 : 野生型 RpoA 発現株（SMS08 株)、赤線：変異型 RpoA 発現株（SMS09 株)

タイプ T 3: 安定型

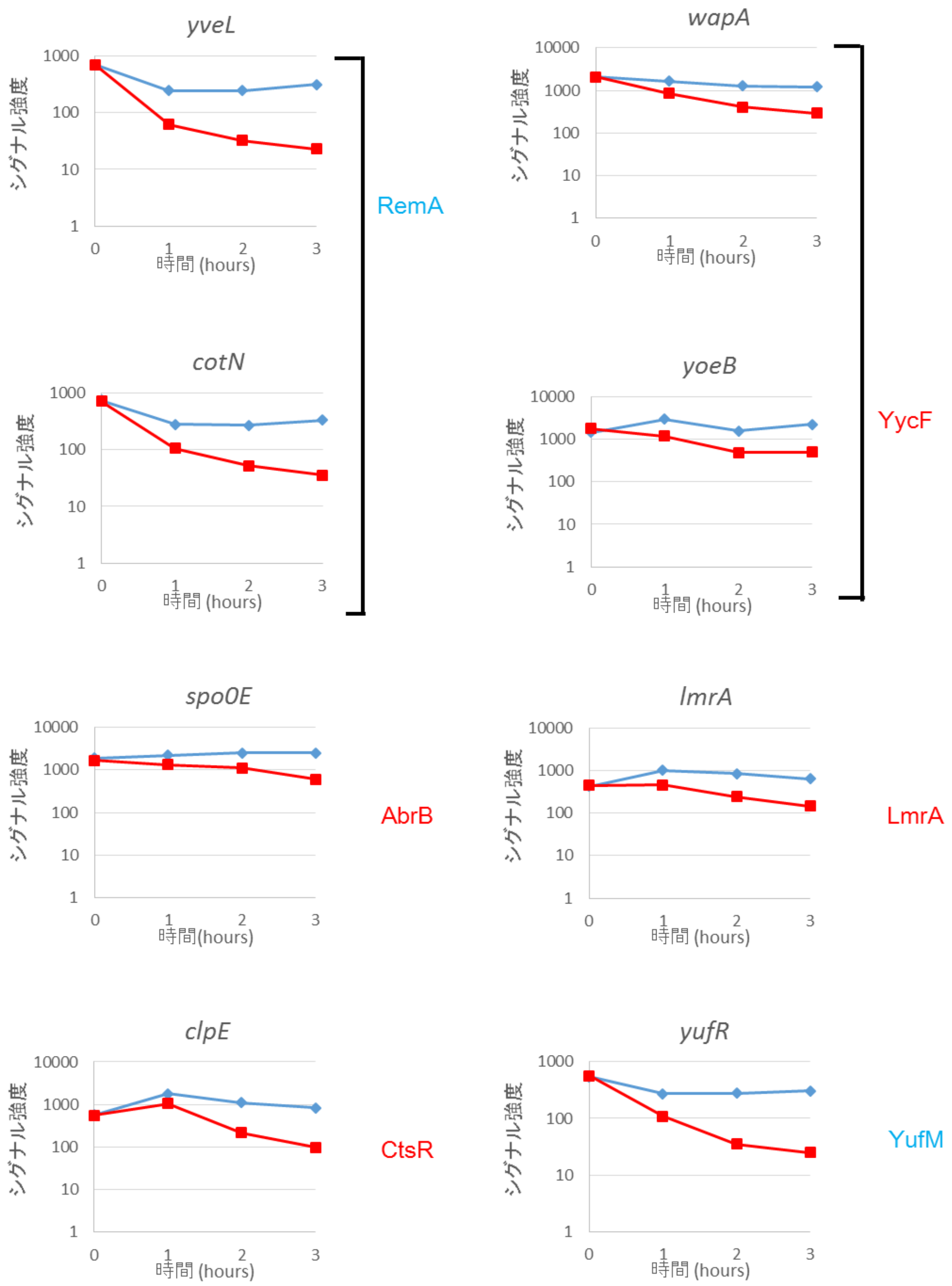
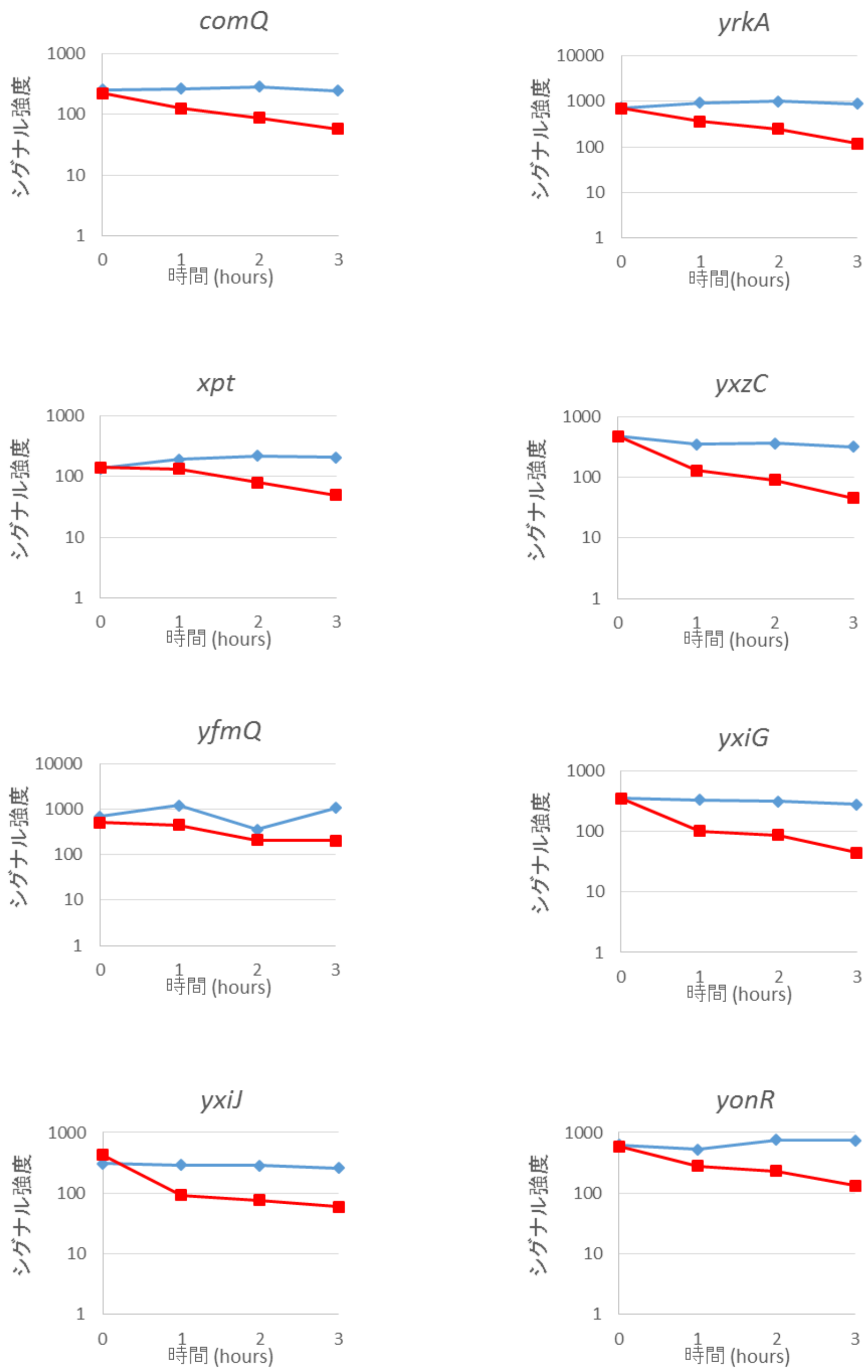


図 S2．４　タイプ T3：RpoA を持つ SMS08 株では発現レベルが一定に保てるが、変異型 RpoA を持つ SMS09 株ではタイム 1 以降、発現レベルが低下する遺伝子群

変異型 RpoA 発現株で、発現が低下した遺伝子のタイムコースの発現プロファイル。青線：野生型 RpoA 発現株（SMS08 株)、赤線：変異型 RpoA 発現株（SMS09 株)

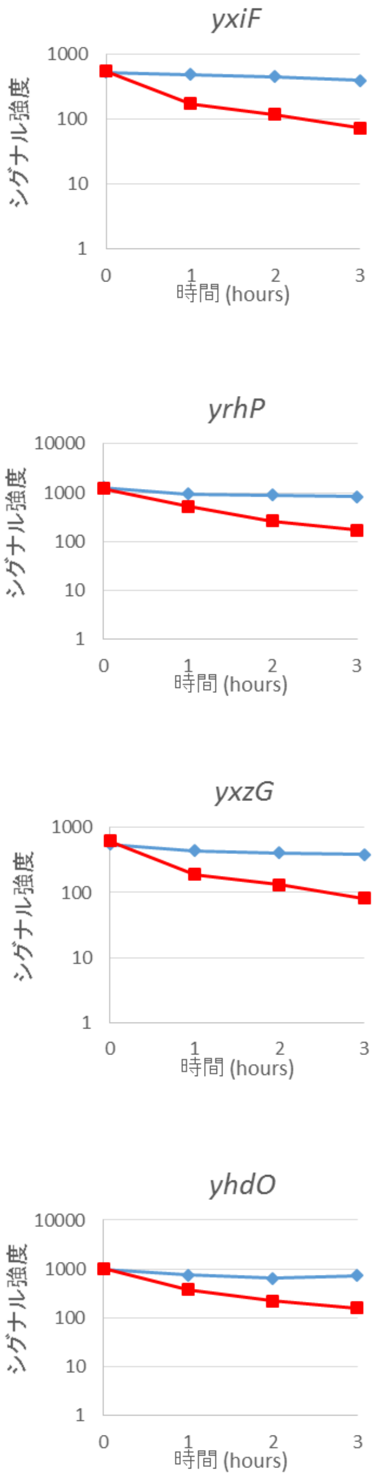
タイプＴ3: 安定型



図Ｓ2．５　タイプ T3(続き)

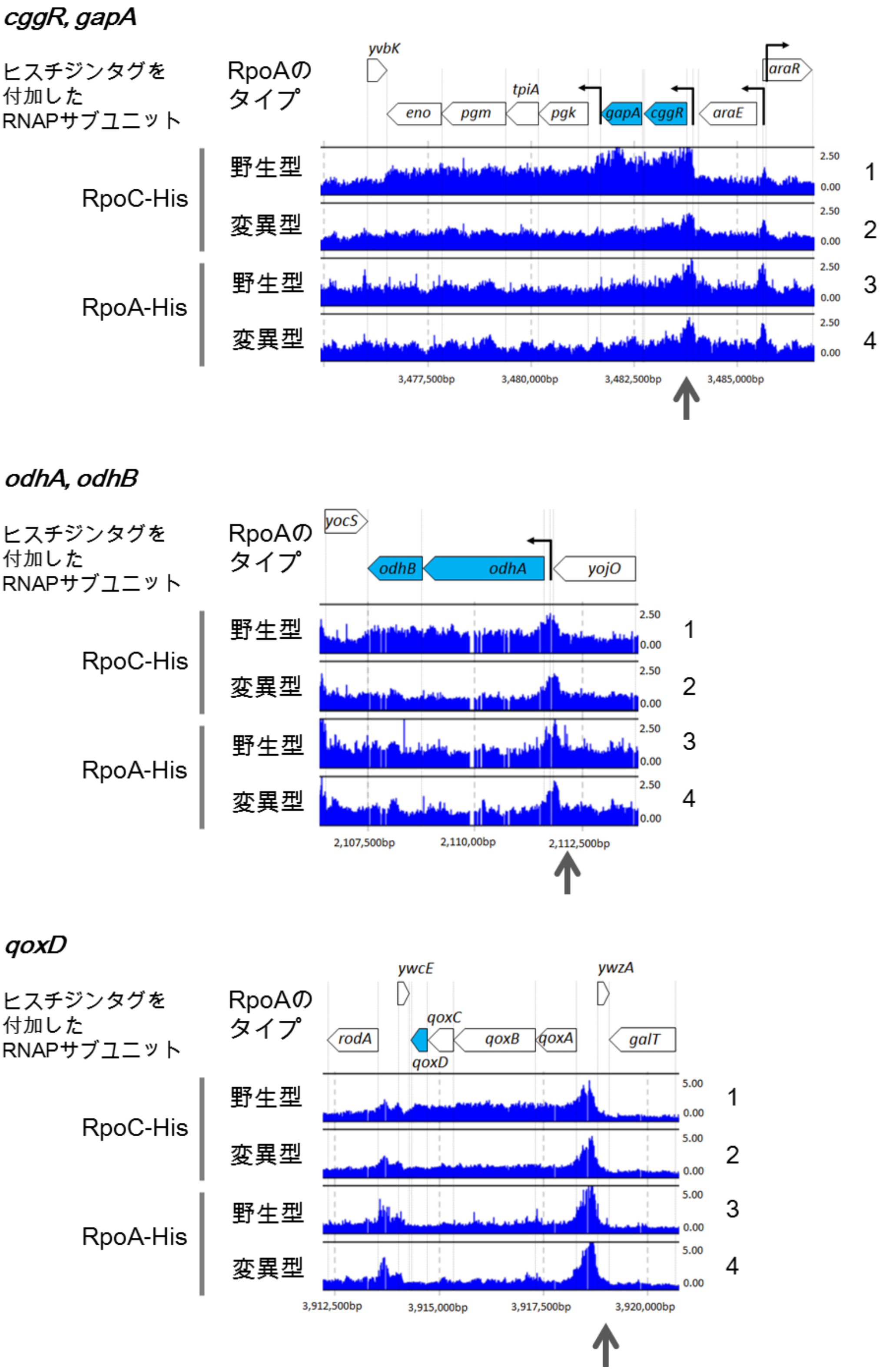
変異型 RpoA 発現株で、発現が低下した遺伝子のタイムコースの発現プロファイル。青線 : 野生型 RpoA 発現株（SMS08 株)、赤線：変異型 RpoA 発現株（SMS09 株)

タイプＴ3: 安定型



図Ｓ2．６　タイプ T3(続き)

変異型 RpoA 発現株で、発現が低下した遺伝子のタイムコースの発現プロファイル。青線：野生型 RpoA 発現株（SMS08 株)、赤線：変異型 RpoA 発現株（SMS09 株)



図S3．１　タイプC1の結合パターン

図の説明は図３．１７を参照。

図下に示した黒矢印は、転写開始領域に存在するピークの位置を示す。

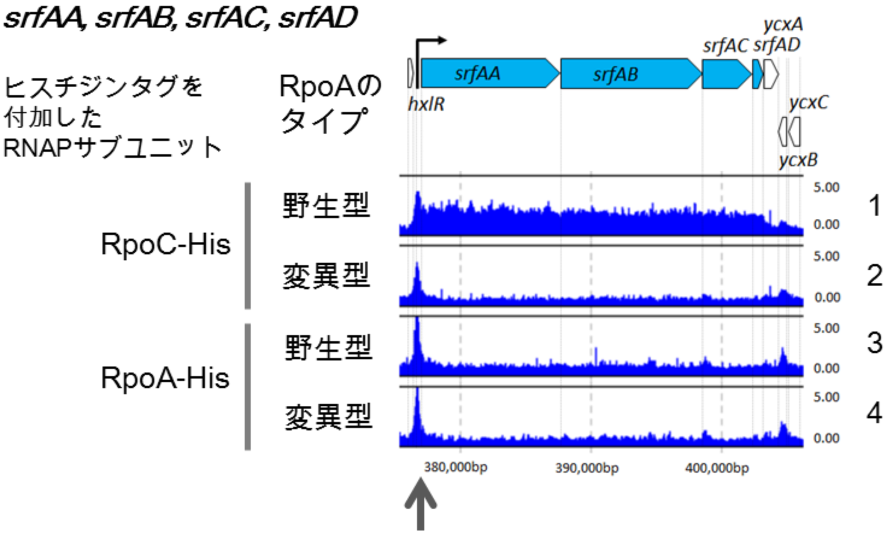


図 S3．２　タイプ C1 の結合パターン

図の説明は図３．１７を参照。

図下に示した黒矢印は、転写開始領域に存在するピークの位置を示す。

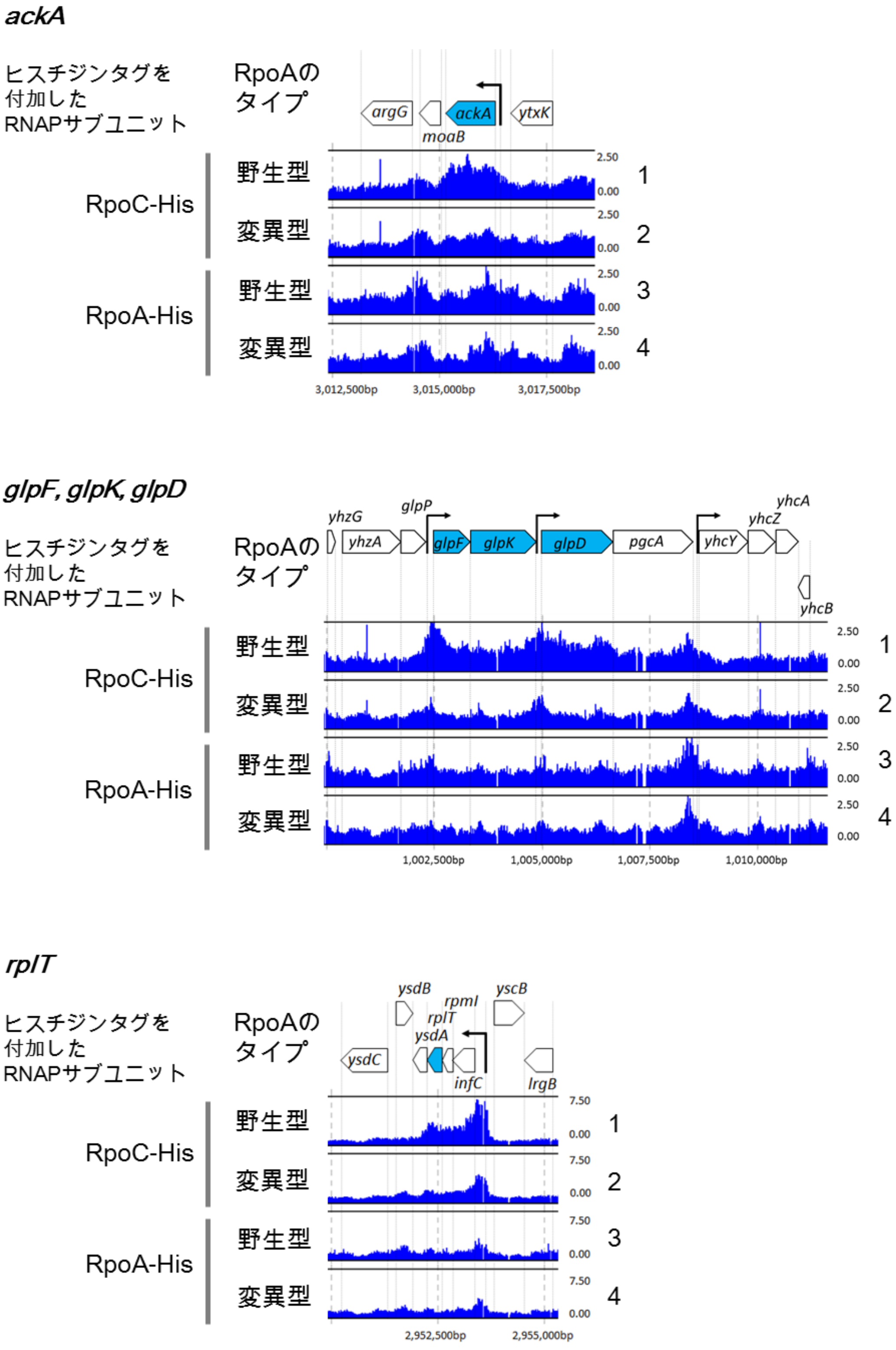


図 S３．３　タイプ C2 の結合パターン

図の説明は図３．１７を参照。

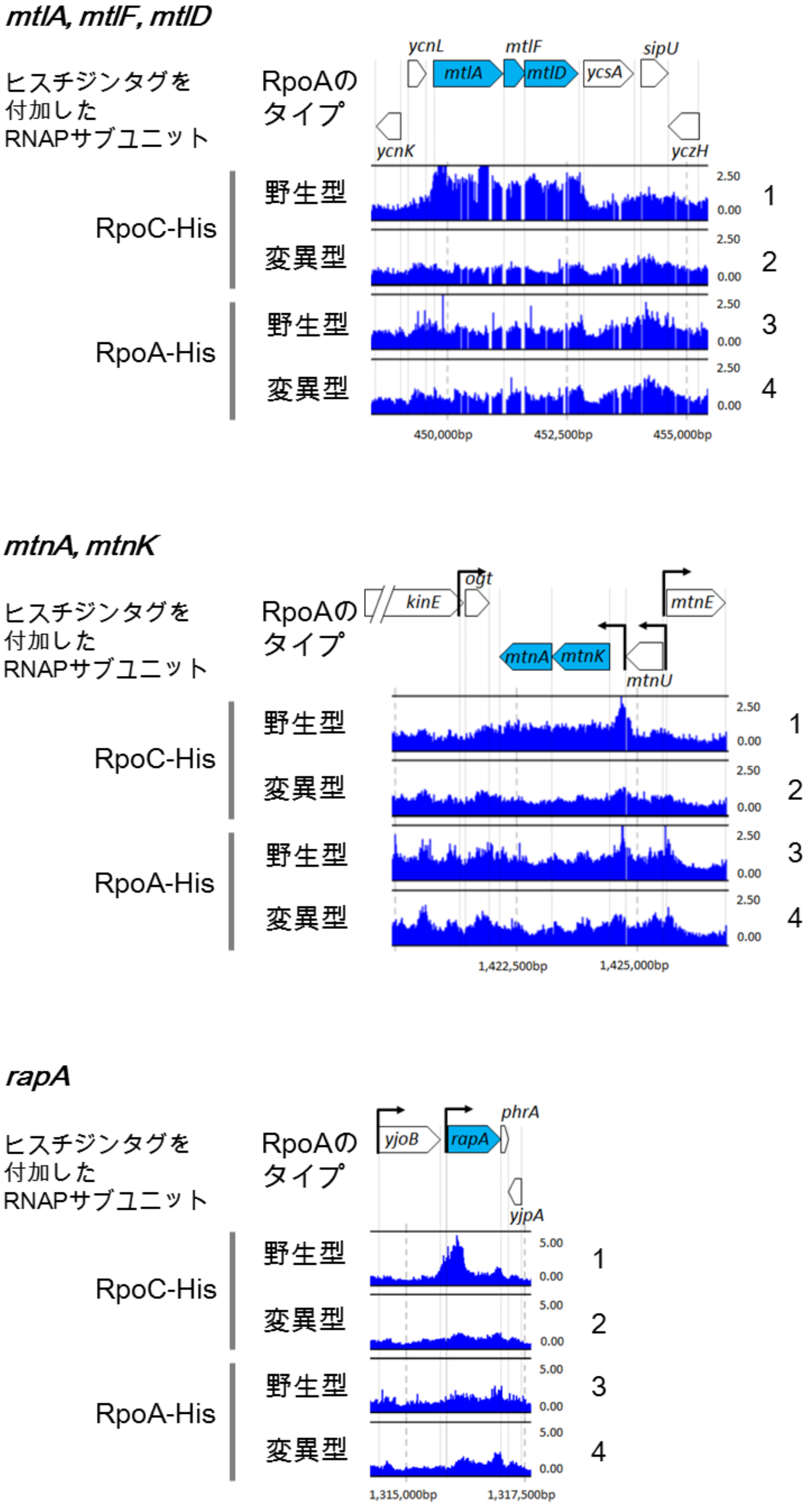
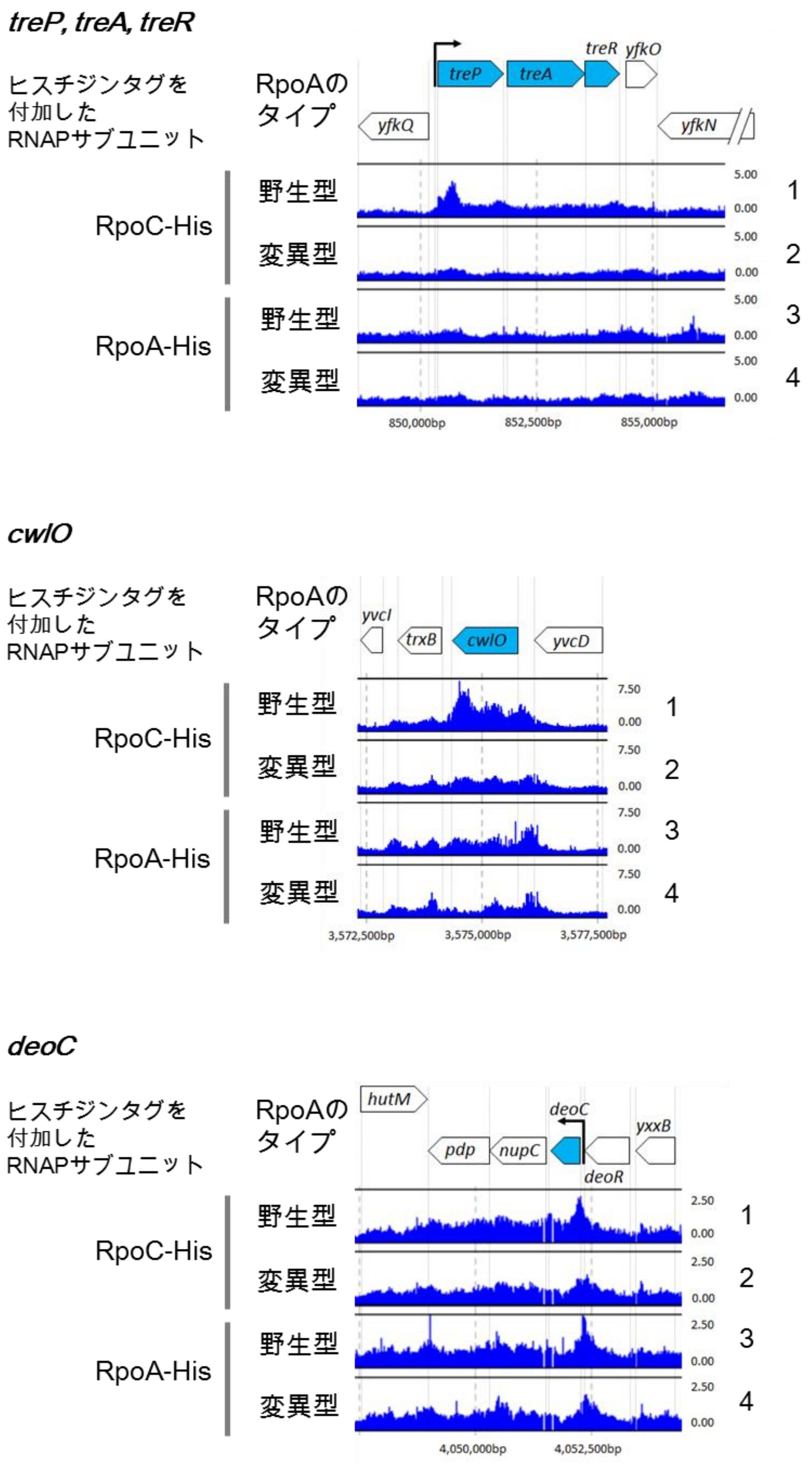


図 S３．４　タイプ C2 の結合パターン

図の説明は図３．１７を参照。



図S3．５　タイプC2の結合パターン

図の説明は図３．１７を参照。

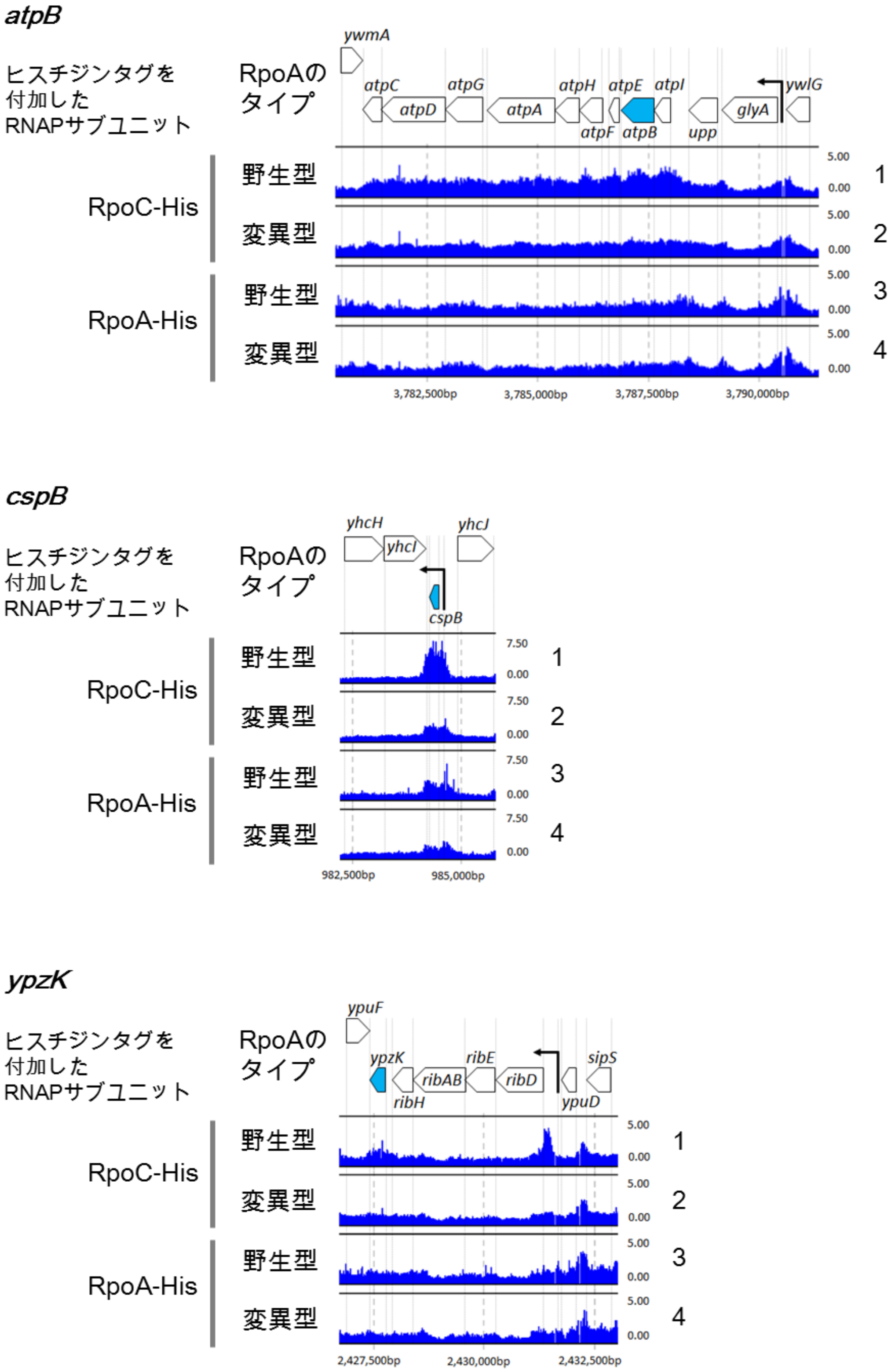


図 S3．6　タイプ C2 の結合パターン

図の説明は図３．１７を参照。

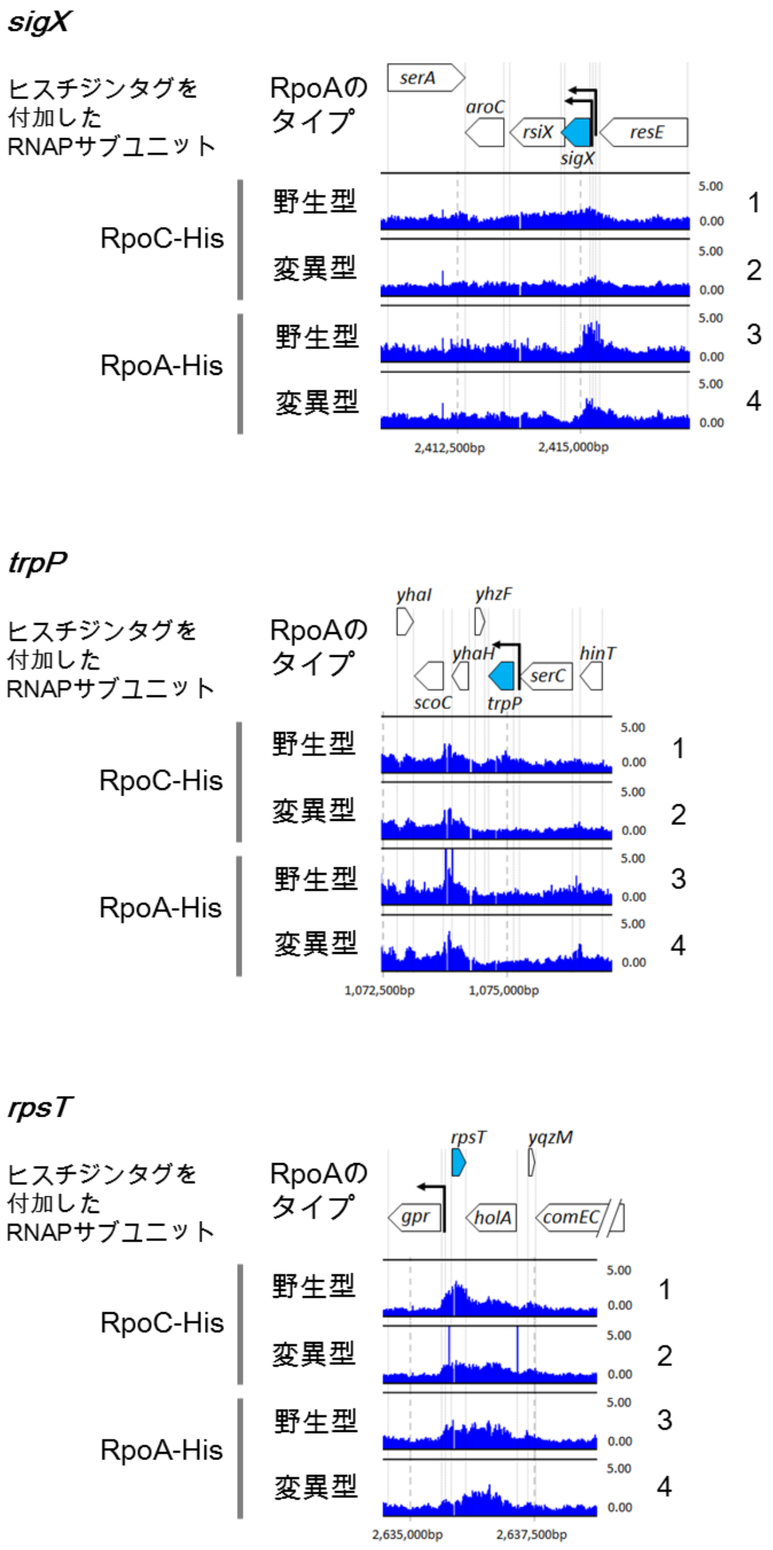
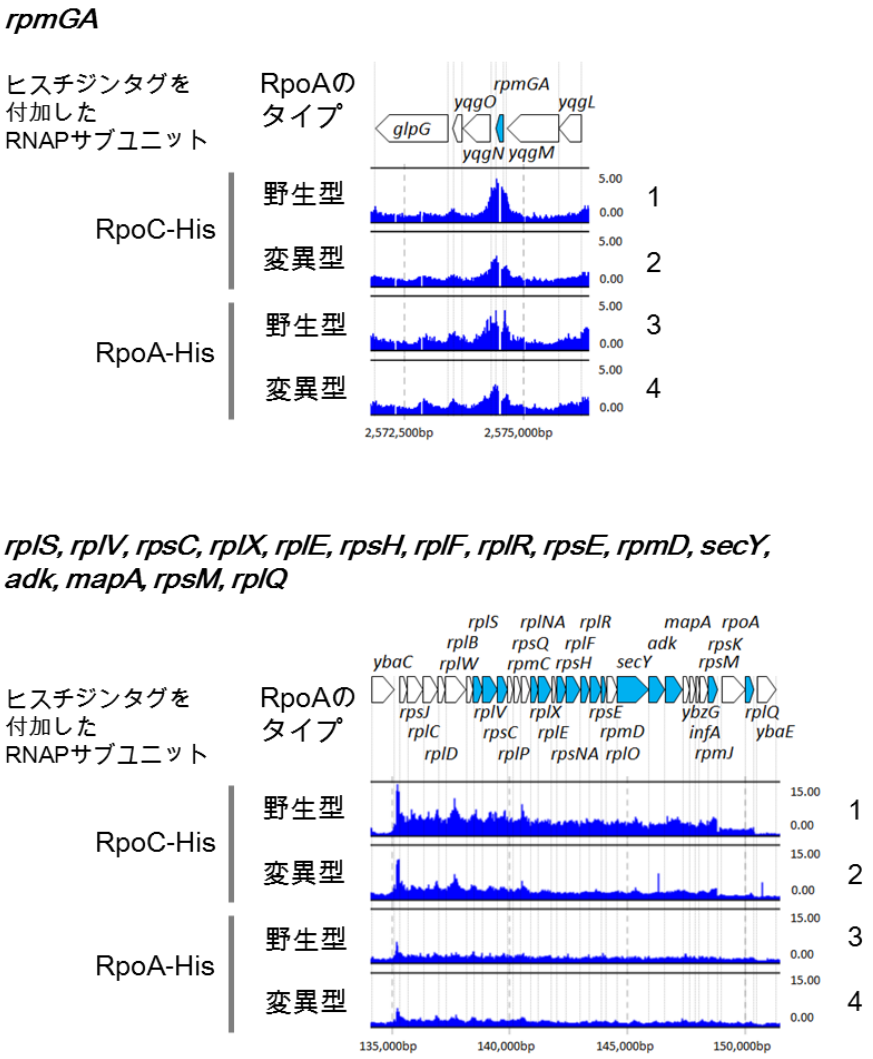


図 S3．7　タイプ C2 の結合パターン

図の説明は図３．１７を参照。



図Ｓ３．８　タイプ C2 の結合パターン

図の説明は図３．１７を参照。

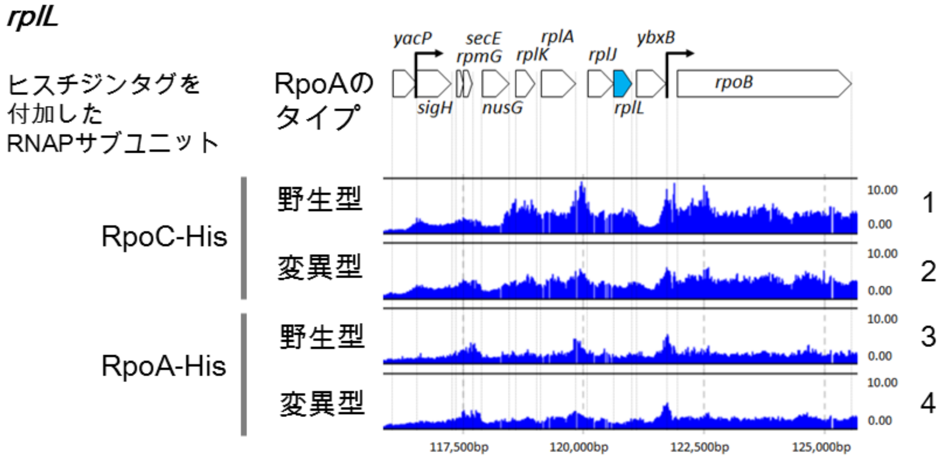
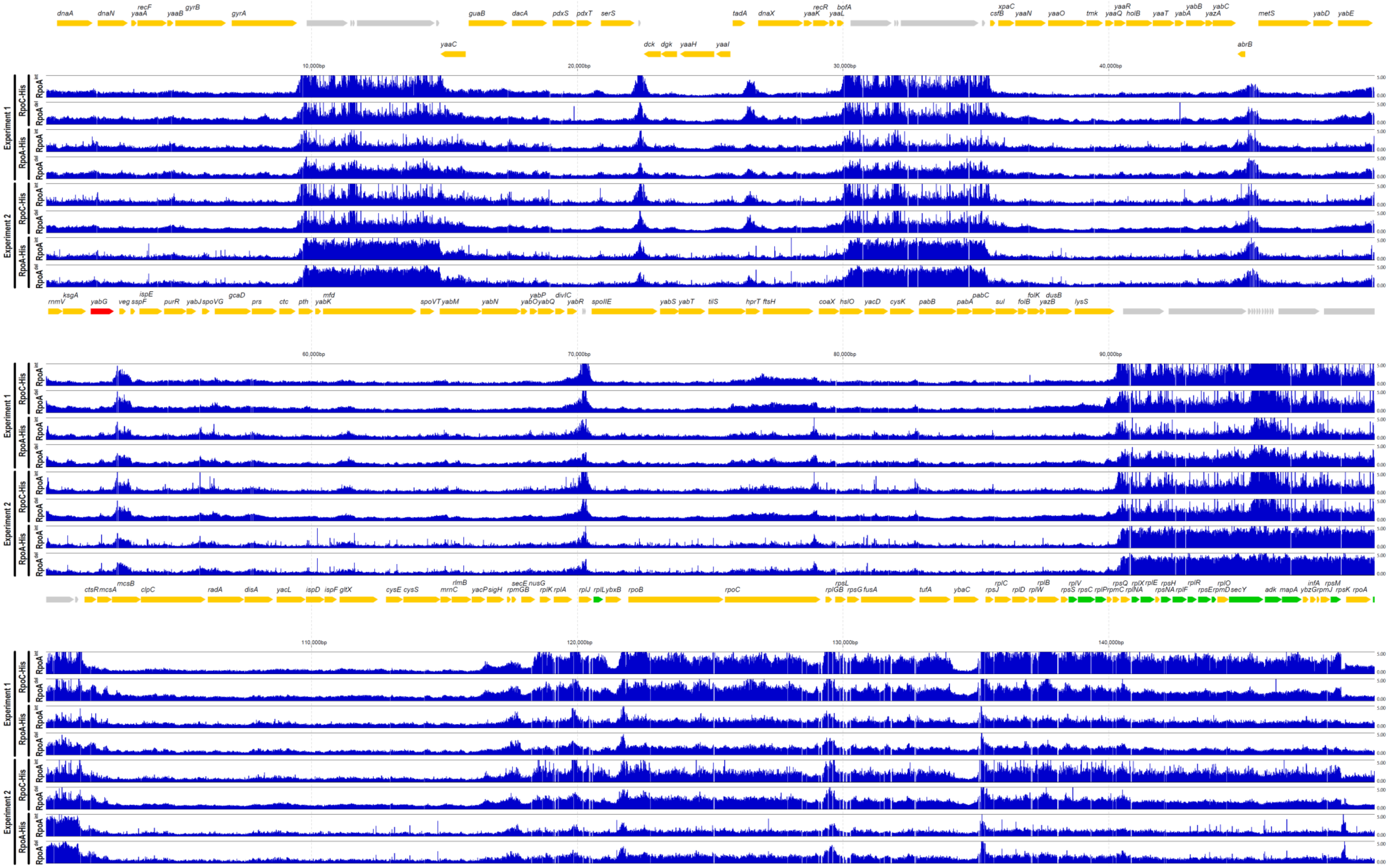
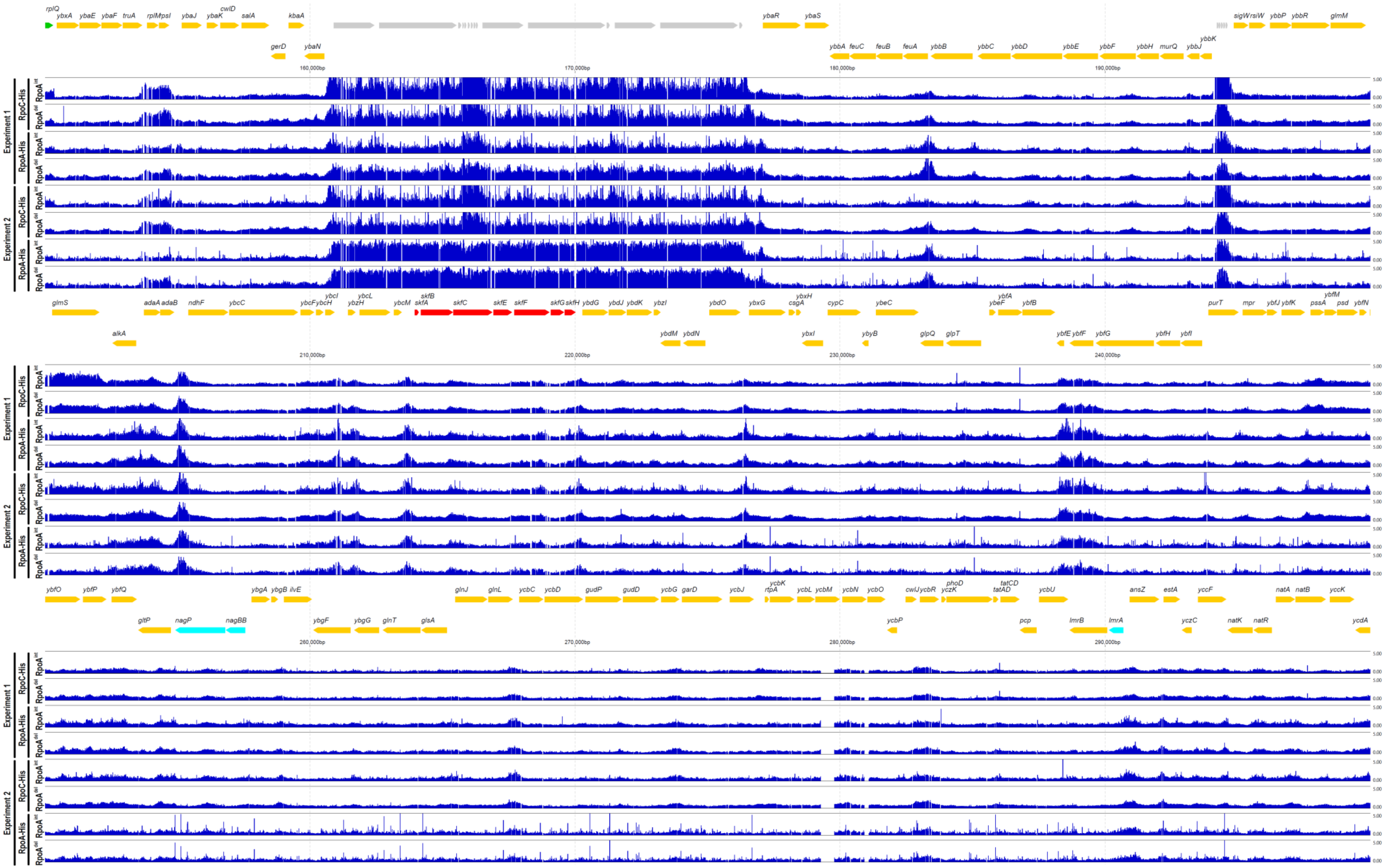
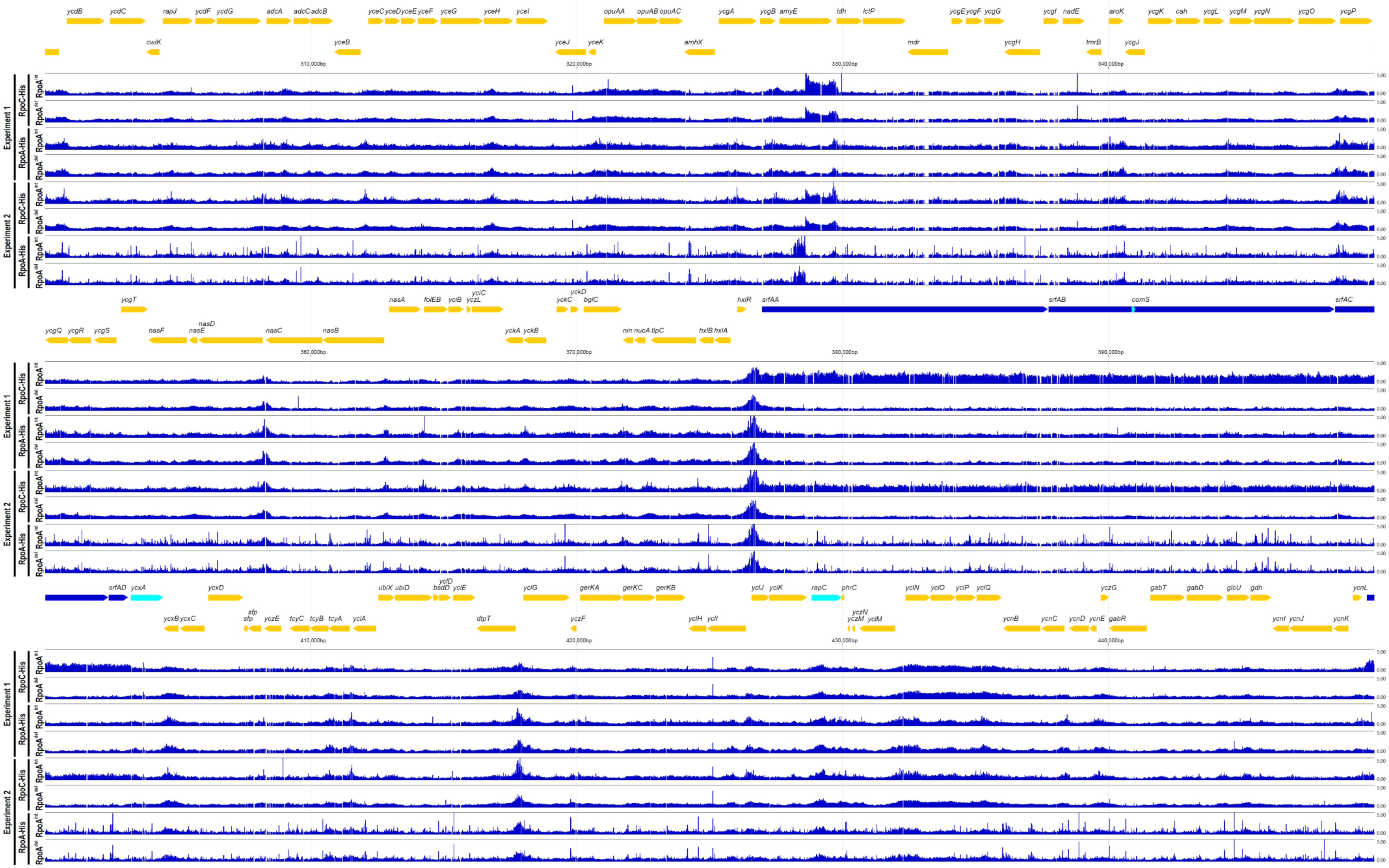


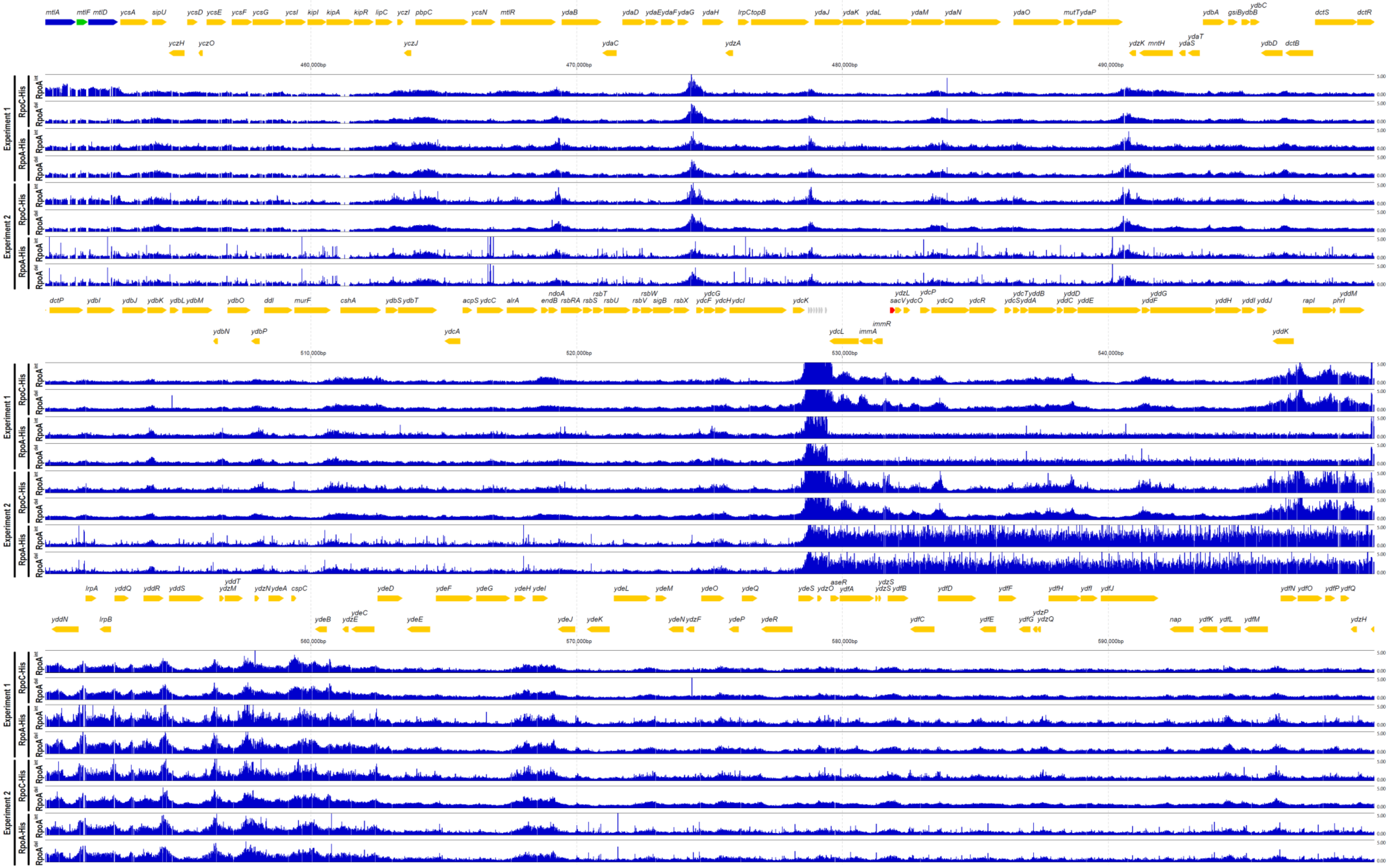
図 S3．９　タイプ C2 の結合パターン

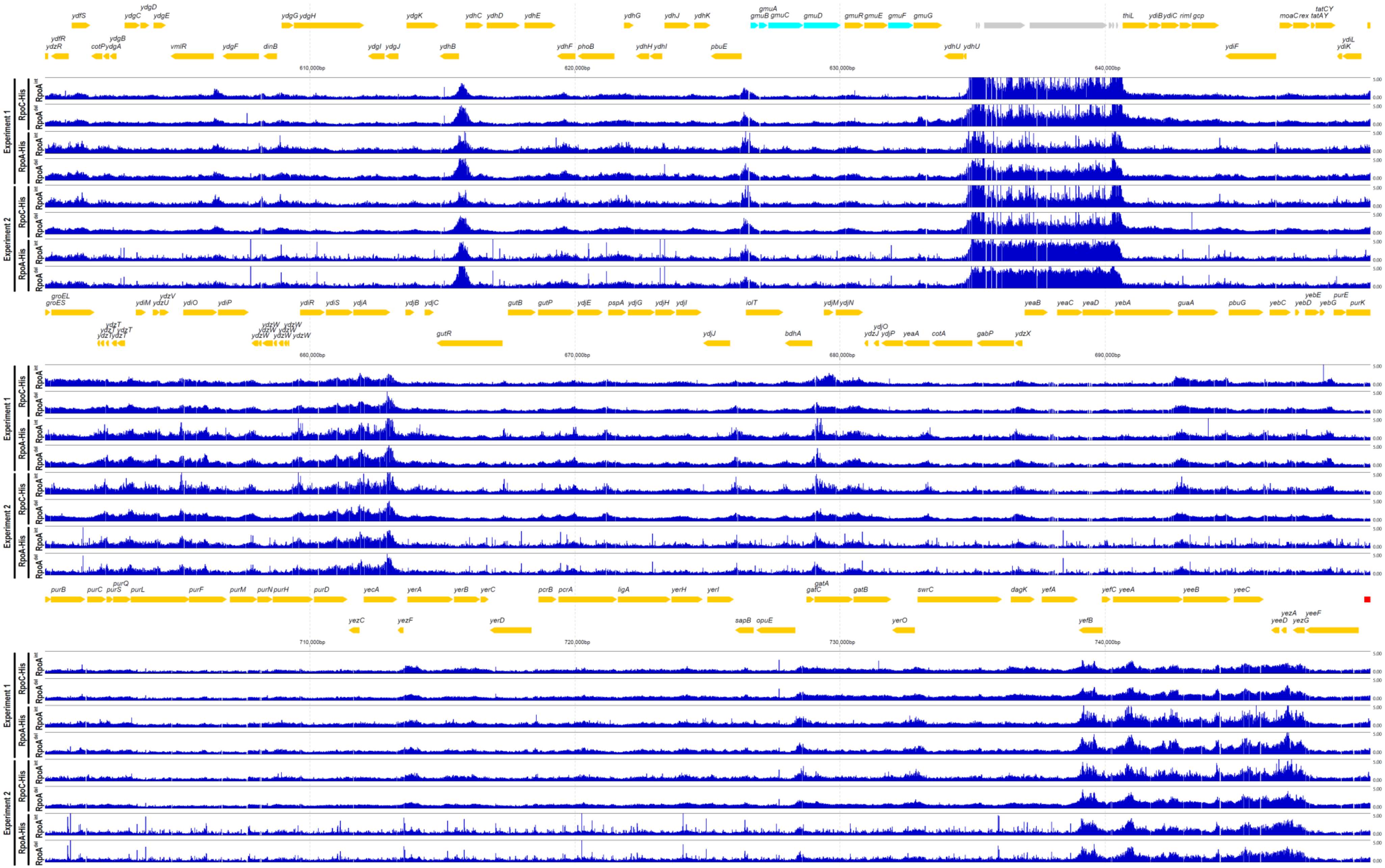
図の説明は図３．１７を参照。

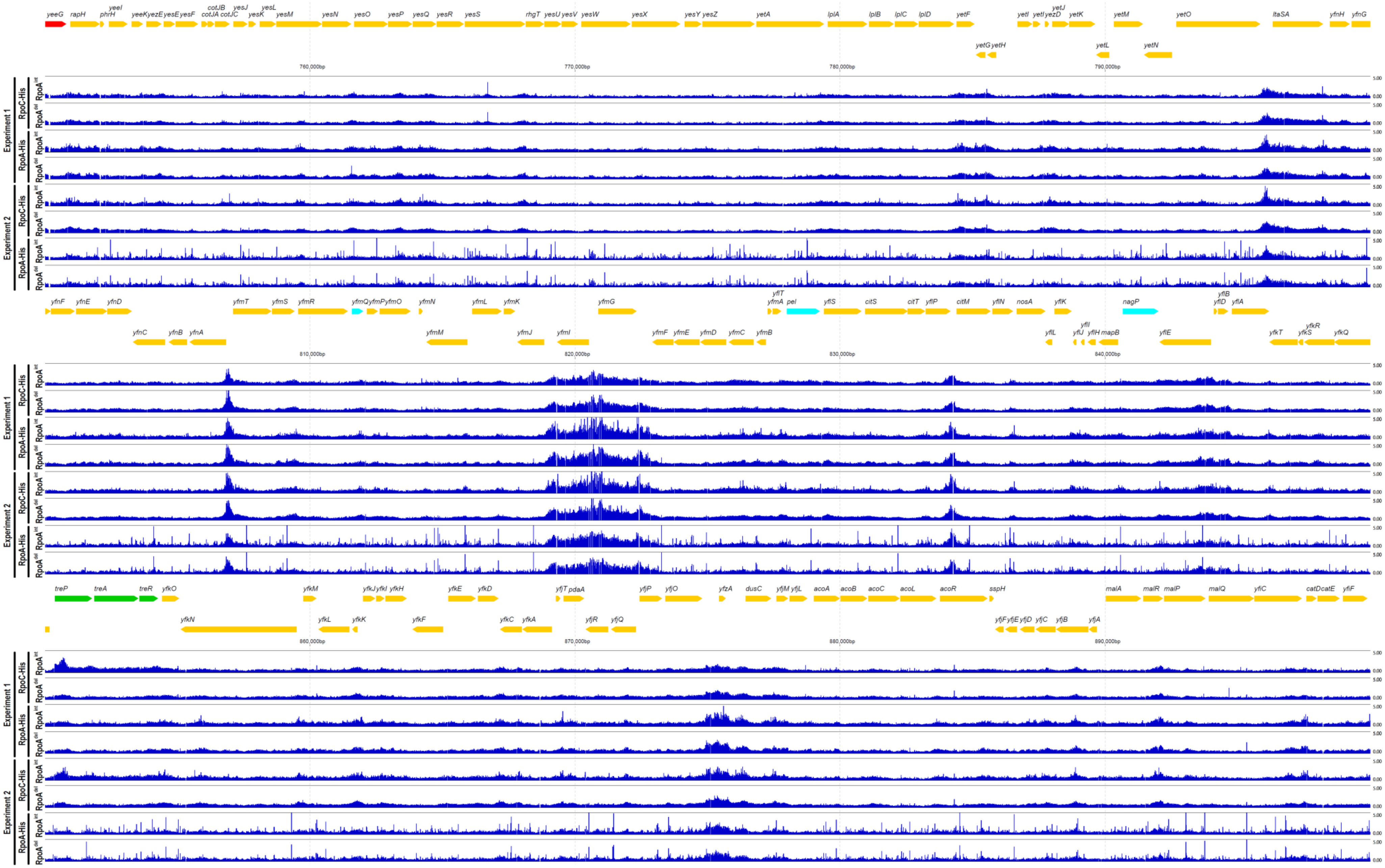



rplQ ybxA ybaE ybaF truA rplM/psl ybaJ ybaK cwlD salA kbaA
gerD ybaN
ybaR ybaS
sigW rsiW ybbP ybbR glmM
ybbA feuC feuB feuA ybbB ybbC ybbD ybbE ybbF ybbH murQ ybbJ ybbK
160,000bp
170,000bp
180,000bp
190,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00
glmS adaA adaB ndhF ybcC ybcF ybcH ybcI ybzH ybcL ybcM skfA skfB skfC skfE skfF skfG skfH ybdG ybdJ ybdK ybzI ybdO ybxG csgA ybxH cypC ybeC ybeF ybfA ybfB purT mpr ybfJ ybfK pssA psd ybfM ybfN
alkA ybdM ybdN ybxI ybyB glpQ glpT ybfE ybfF ybfG ybfH ybfI
210,000bp
220,000bp
230,000bp
240,000bp
ybfO ybfP ybfQ ybgA ybgB ilvE glnJ glnL ycbC ycbD gudP gudD ycbG garD ycbJ rtpA ycbK ycbL ycbM ycbN ycbO cwlJ ycbR yczK phoD tatAD tatCD ycbU ansZ estA yccF natA natB yccK
gltP nagP nagBB ybgF ybgG glnT glsA ycbP pcp lmrB lmrA yczC natK natR ycdA
260,000bp
270,000bp
280,000bp
290,000bp

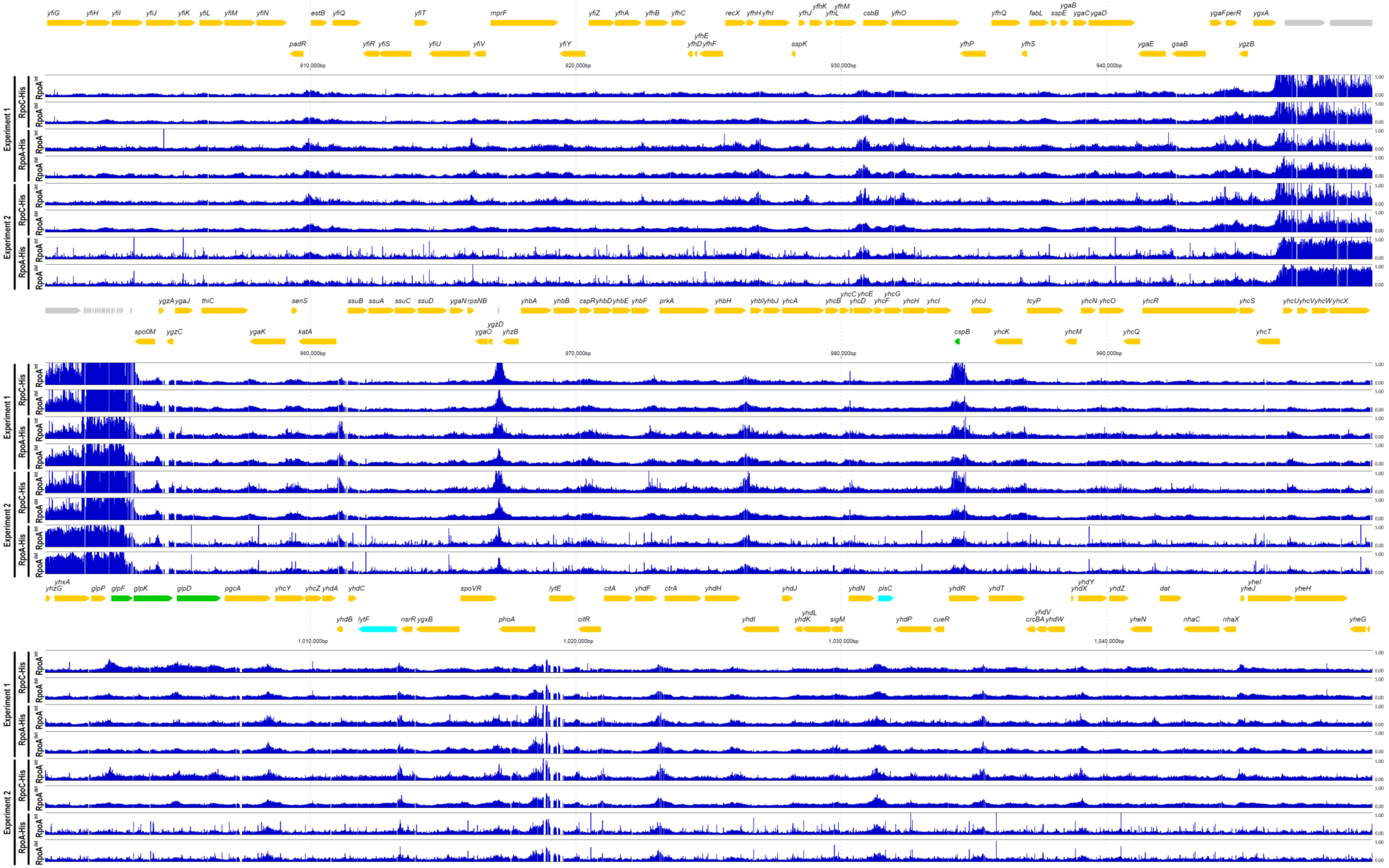

ycdB ycdC rapJ ycdF ycdG adcA adcC adcB yceC yceD yceE yceF yceG yceH yceI opuAA opuAB opuAC ycgA ycgB amyE ldh lctP ycgE ycgF ycgG ycgI nadE aroK ycgK cah ycgL ycgM ycgN ycgO ycgP
cwlK yceB yceJ yceK amhX mdr ycgH tmrB ycgJ
310,000bp 320,000bp 330,000bp 340,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00
ycgT nasA folEB yciB yciC yczL yckC yckD bglC hxlR srfAA srfAB comS srfAC
ycgQ ycgR ycgS nasF nasD nasE nasC nasB yckA yckB nin nucA tlpC hxlB hxlA
360,000bp 370,000bp 380,000bp 390,000bp
srfAD ycxA ycxD ubiX ubiD yclD bsdD yclE yclG gerKA gerKC gerKB yclJ yclK rapC phrC yclN yclO yclP yclQ yczG gabT gabD glcU gdh ycnL
ycxB ycxC sfp sfp yczE tcyC tcyB tcyA yclA dtpT yczF yclH yclI yczN yczM yclM ycnB ycnC ycnD ycnE gabR ycnI ycnJ ycnK
410,000bp 420,000bp 430,000bp 440,000bp

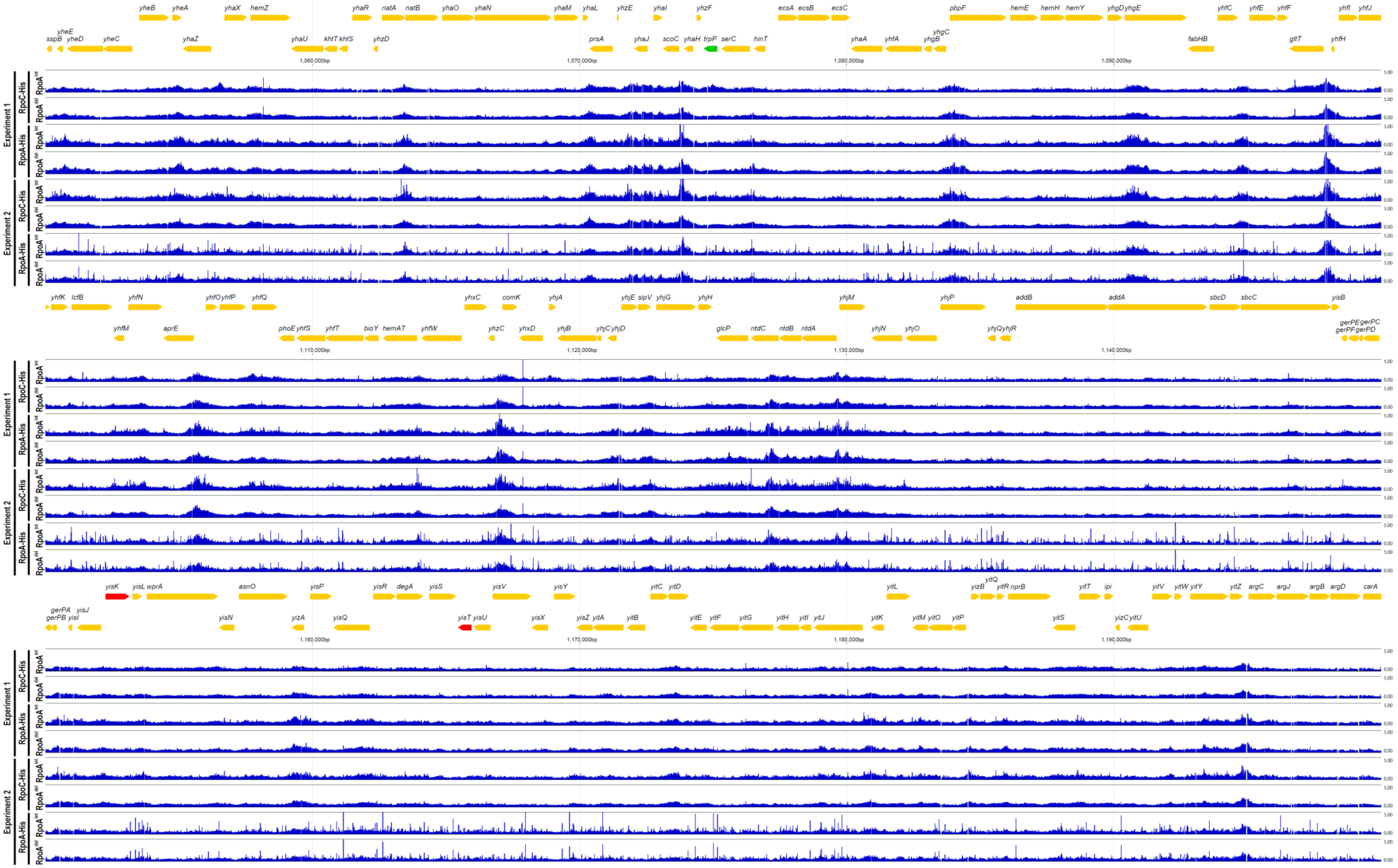

mtlA mtlF mtlD ycsA sipU ycsD ycsE ycsF ycsG ycsI kipI kipA kipR lipC yczI pbpC ycsN mtlR ydaB ydaD ydaE ydaF ydaG ydaH lrpC topB ydaJ ydaK ydaL ydaM ydaN ydaO mutT ydaP ydbA gsiB ydbB ydbC dctS dctR
yczH yczO yczJ ydaC ydzA ydzK mntH ydaS ydaT ydbD dctB
460,000bp
470,000bp
480,000bp
490,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA[wt]
RpoA[del]
5.00
0.00
dctP ydbI ydbJ ydbK ydbL ydbM ydbO ddl murF cshA ydbS ydbT acpS ydcC alrA ndoA endB rsbRA rsbS rsbT rsbU rsbW rsbV sigB rsbX ydcG ydcF ydcH ydcI ydcK ydzL sacV ydcO ydcP ydcQ ydcR ydcT yddB ydcS yddA yddD yddC yddE yddG yddF yddH yddI yddJ rapI yddM phrI
ydbN ydbP ydcA ydcL immA immR yddK
510,000bp
520,000bp
530,000bp
540,000bp
lrpA yddQ yddR yddS yddT ydzM ydzN ydeA cspC ydeD ydeF ydeG ydeH ydeI ydeL ydeM ydeO ydeQ ydeS ydzO aseR ydfA ydzS ydfB ydfD ydfF ydfH ydfI ydfJ ydfN ydfO ydfP ydfQ
yddN lrpB ydeB ydeC ydzE ydeE ydeJ ydeK ydeN ydzF ydeP ydeR ydfC ydfE ydzP ydfG ydzQ nap ydfK ydfL ydfM ydzH
560,000bp
570,000bp
580,000bp
590,000bp


ydfS ydgC ydgD ydgE ydgG ydgH ydgK ydhC ydhD ydhE ydhG ydhJ ydhK gmuA gmuB gmuC gmuD gmuR gmuE gmuF gmuG thiL ydiB ydiC rimI gcp moaC rex tatCY tatAY
ydfR ydzR cotP ydgB ydgA vmlR ydgF dinB ydgI ydgJ ydhB ydhF phoB ydhH ydhI pbuE ydhU ydhU ydiF ydiL ydiK
610,000bp 620,000bp 630,000bp 640,000bp
groEL groES ydiM ydzU ydzV ydiO ydiP ydiR ydiS ydjA ydjB ydjC gutB gutP ydjE pspA ydjG ydjH ydjI iolT ydjM ydjN yeaB yeaC yeaD yebA guaA pbuG yebC yebD yebE yebG purE purK
ydzT ydzW gutR ydjJ bdhA ydjO ydzJ ydjP yeaA cotA gabP ydzX
660,000bp 670,000bp 680,000bp 690,000bp
purB purC purQ purS purL purF purM purN purH purD yecA yerA yerB yerC pcrB pcrA ligA yerH yerI gatA gatC gatB swrC dagK yefA yefC yeeA yeeB yeeC
yezC yezF yerD sapB opuE yerO yefB yezA yeeF yeeD yezG
710,000bp 720,000bp 730,000bp 740,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00

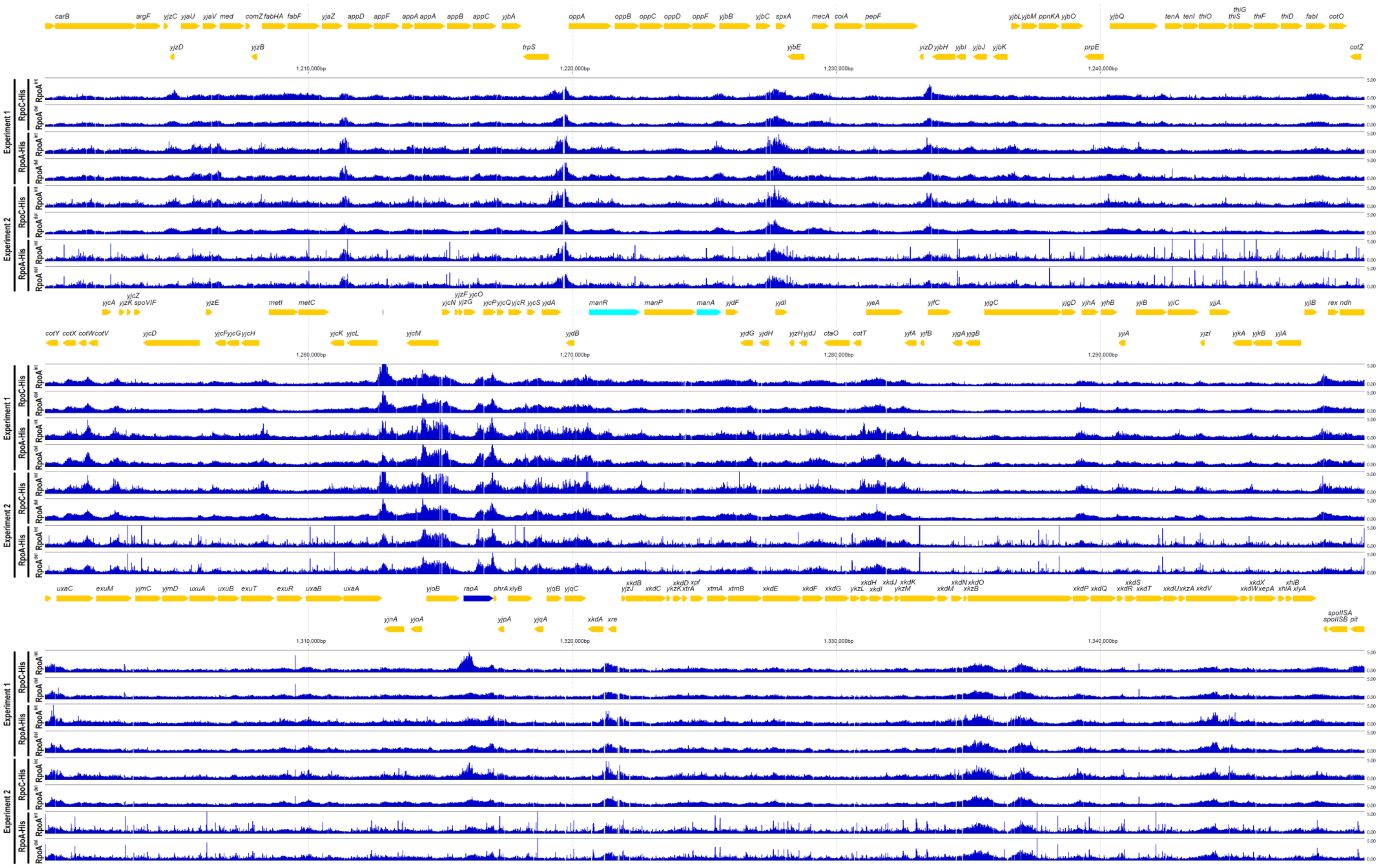


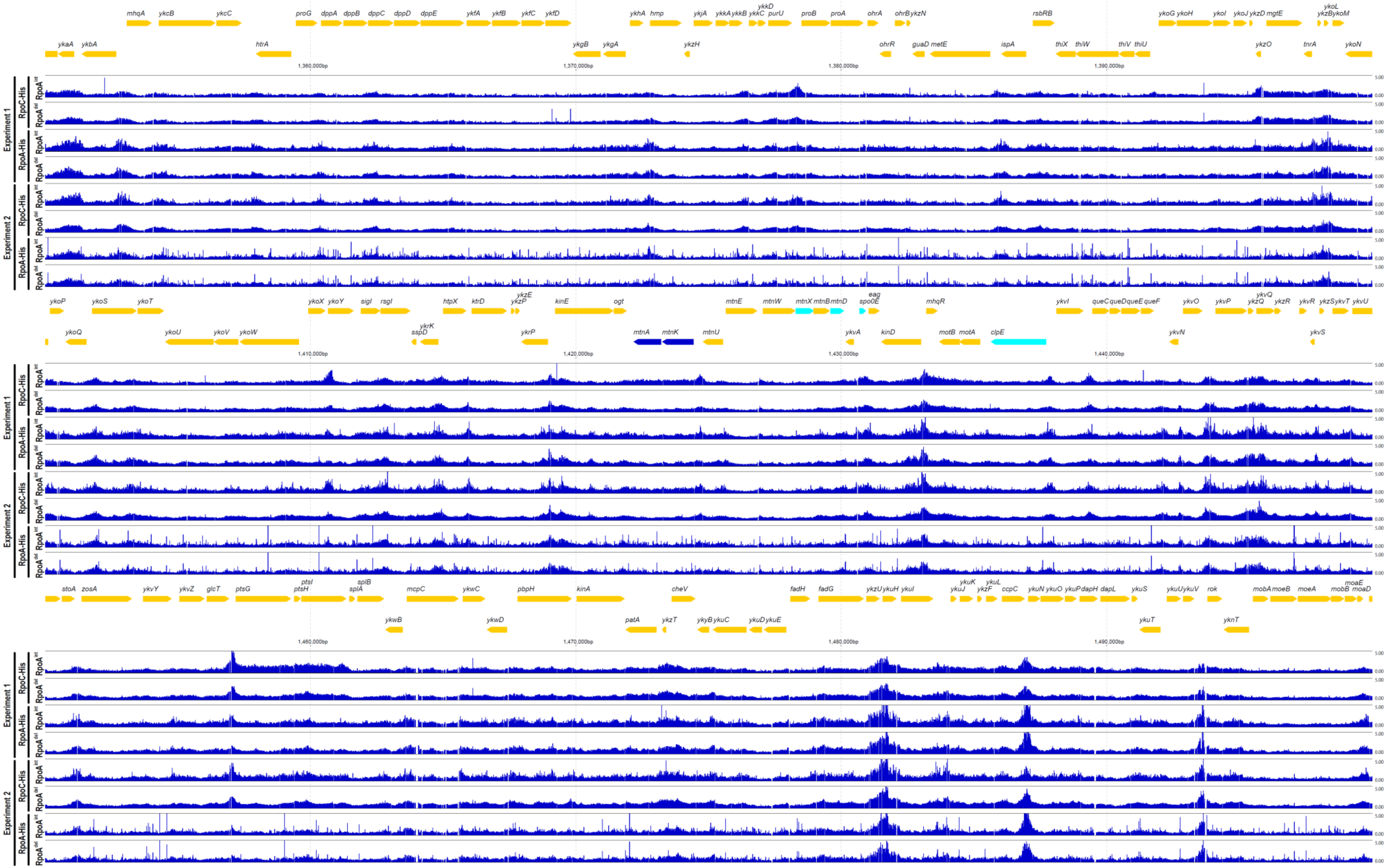
yeeG rapH yeeI phrH yeeK yezE yesE yesF cotJB cotJA cotJC yesJ yesK yesL yesM yesN yesO yesP yesQ yesR yesS rhgT yesU yesV yesW yesX yesY yesZ yetA lplA lplB lplC lplD yetF yetI yetI yetJ yezD yetK yetM yetO ltaSA yfnH yfnG
yetG yetH yetL yetN
760,000bp
770,000bp
780,000bp
790,000bp
yfnF yfnE yfnD yfmT yfmS yfmR yfmQ yfmP yfmO yfmN yfmL yfmK yfmG yfiT yfmA pel yflS citS citT yflP citM yflN nosA yflK nagP yflB yflD yflA
yfnC yfnB yfnA yfmM yfmJ yfmI yfmF yfmE yfmD yfmC yfmB yflL yflI yflJ yflH mapB yflE yfkT yfkR yfkS yfkQ
810,000bp
820,000bp
830,000bp
840,000bp
treP treA treR yfkO yfkM yfkJ yfkI yfkH yfkE yfkD yfjT pdaA yfjP yfjO yfzA dusC yfjM yfjL acoA acoB acoC acoL acoR sspH malA malR malP malQ yfiC catD catE yfiF
yfkN yfkL yfkK yfkF yfkC yfkA yfjR yfjQ yfjF yfjE yfjD yfjC yfjB yfjA
860,000bp
870,000bp
880,000bp
890,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00

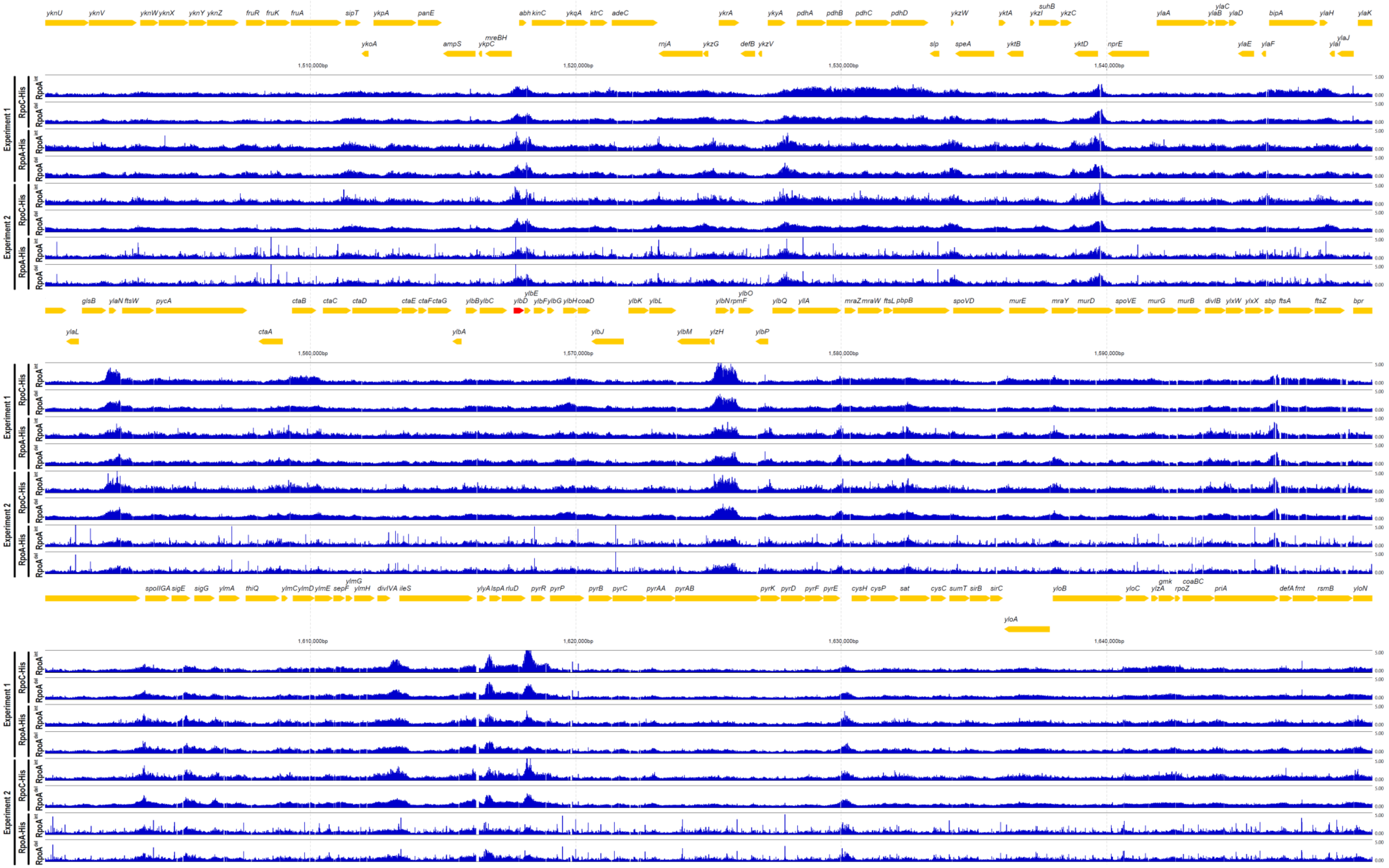

yfiG yfiH yfiI yfiJ yfiK yfiL yfiM yfiN estB yfiQ yfiT mprF yfiZ yfhA yfhB yfhC recX yfhH yfhI yfhJ yfhK yfhL yfhM csbB yfhO yfhQ fabL sspE ygaB ygaC ygaD ygaF perR ygxA
padR yfiR yfiS yfiU yfiV yfiY yfhE yfhD yfhF sspK yfhP yfhS ygaE gsaB ygzB
910,000bp
920,000bp
930,000bp
940,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
5.00
0.00
ygzA ygaJ thiC senS ssuB ssuA ssuC ssuD ygaN rpsNB yhbA yhbB cspR yhbD yhbE yhbF prkA yhbH yhbI yhbJ yhcA yhcB yhcC yhcD yhcE yhcF yhcG yhcH yhcI yhcJ tcyP yhcN yhcO yhcR yhcS yhcU yhcV yhcW yhcX
spo0M ygzC ygaK katA ygzD ygaO yhzB cspB yhcK yhcM yhcQ yhcT
960,000bp
970,000bp
980,000bp
990,000bp
yhxA yhzG glpP glpF glpK glpD pgcA yhcY yhcZ yhdA yhdC spoVR lytE citA yhdF ctrA yhdH yhdJ yhdN plsC yhdR yhdT yhdY yhdX yhdZ dat yheI yheJ yheH
yhdB lytF nsrR ygxB phoA citR yhdI yhdL yhdK sigM yhdP cueR yhdV crcBA yhdW yheN nhaC nhaX yheG
1,010,000bp
1,020,000bp
1,030,000bp
1,040,000bp

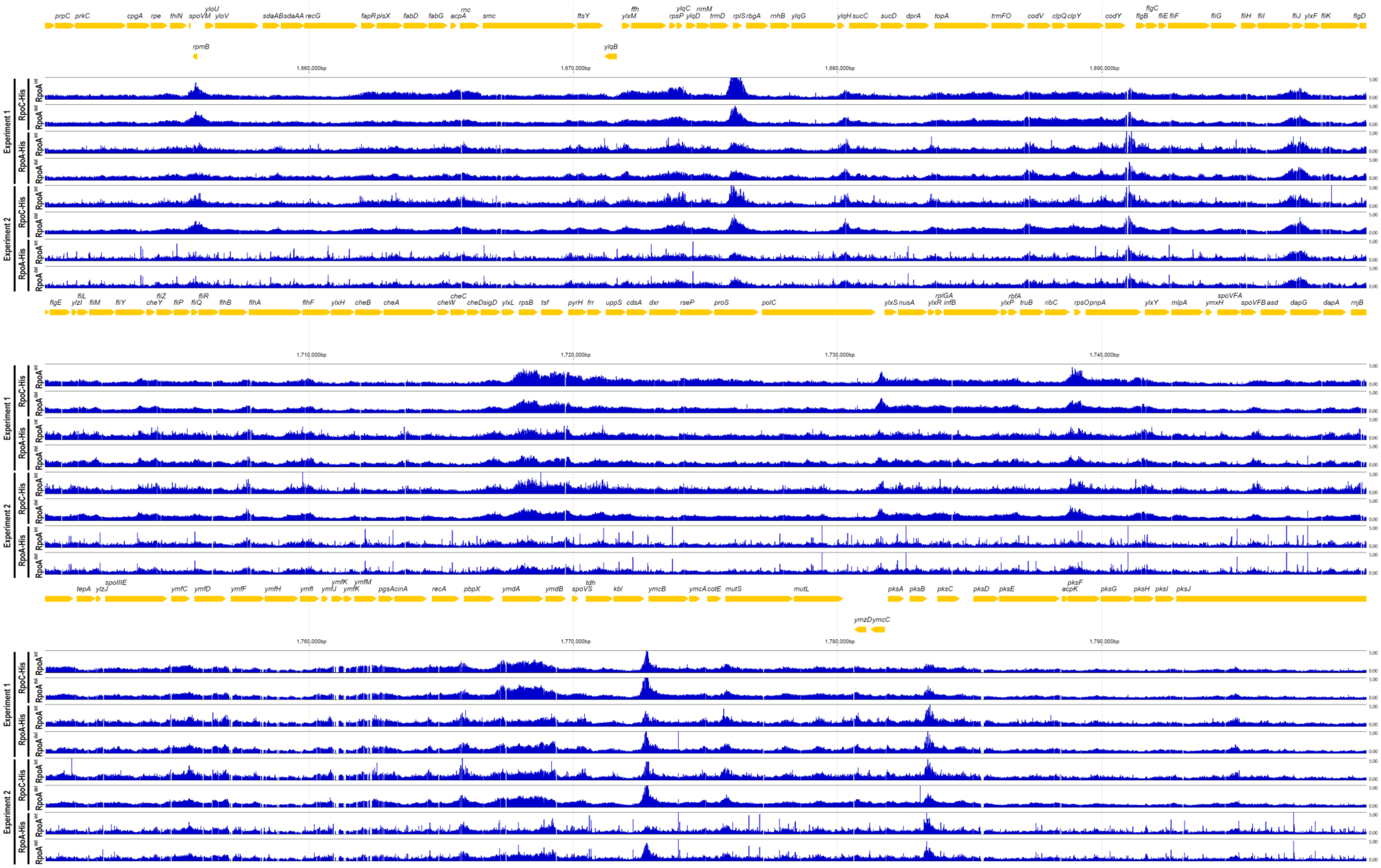


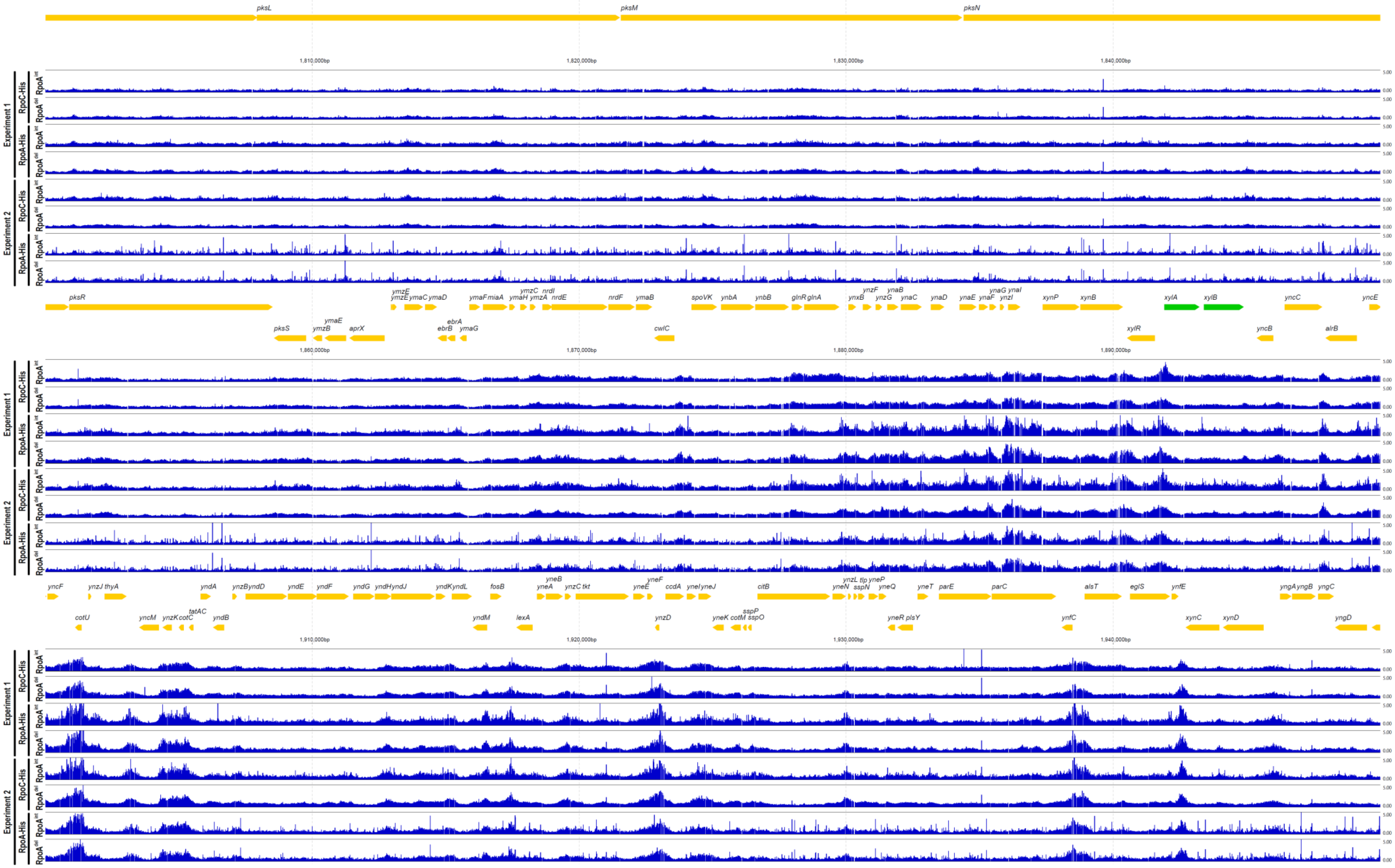
yheB yheA yhaX hemZ yhaR natA natB yhaO yhaN yhaM yhaL yhzE yhaI yhzF ecsA ecsB ecsC pbpF hemE hemH hemY yhgD yhgE yhfC yhfE yhfF yhfI yhfJ
yheE sspB yheD yheC yhaZ yhaU khtT khtS yhzD prsA yhaJ scoC yhaH trpP serC hinT yhaA yhfA yhgC yhgB fabHB gltT yhfH
1,060,000bp 1,070,000bp 1,080,000bp 1,090,000bp
yhfK lcfB yhfN yhfO yhfP yhfQ yhxC comK yhjA yhjE sipV yhjG yhjH yhjM yhjP addB addA sbcD sbcC yisB
yhfM aprE phoE yhfS yhfT bioY hemAT yhfW yhzC yhxD yhjB yhjC yhjD glcP ntdC ntdB ntdA yhjN yhjO yhjQ yhjR gerPE gerPC gerPF gerPD
1,110,000bp 1,120,000bp 1,130,000bp 1,140,000bp
yisK yisL wprA asnO yisP yisR degA yisS yisV yisY yitC yitD yitL yitQ yizB yitR nprB yitT ipi yitV yitW yitY yitZ argC argJ argB argD carA
gerPA yisJ gerPB yisI yisN yizA yisQ yisT yisU yisX yisZ yitA yitB yitE yitF yitG yitH yitI yitJ yitK yitM yitO yitP yitS yizC yitU
1,160,000bp 1,170,000bp 1,180,000bp 1,190,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
5.00
0.00

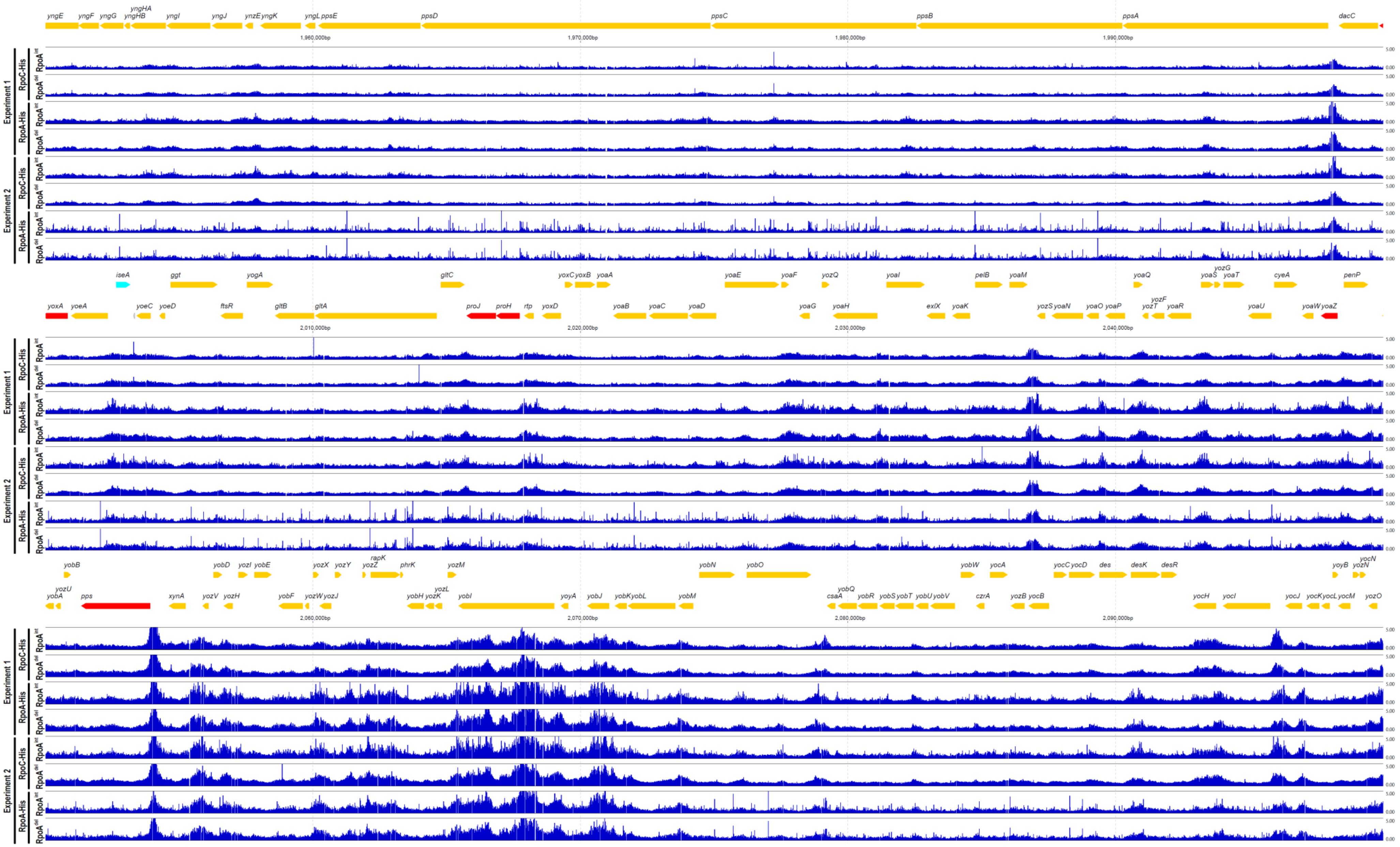


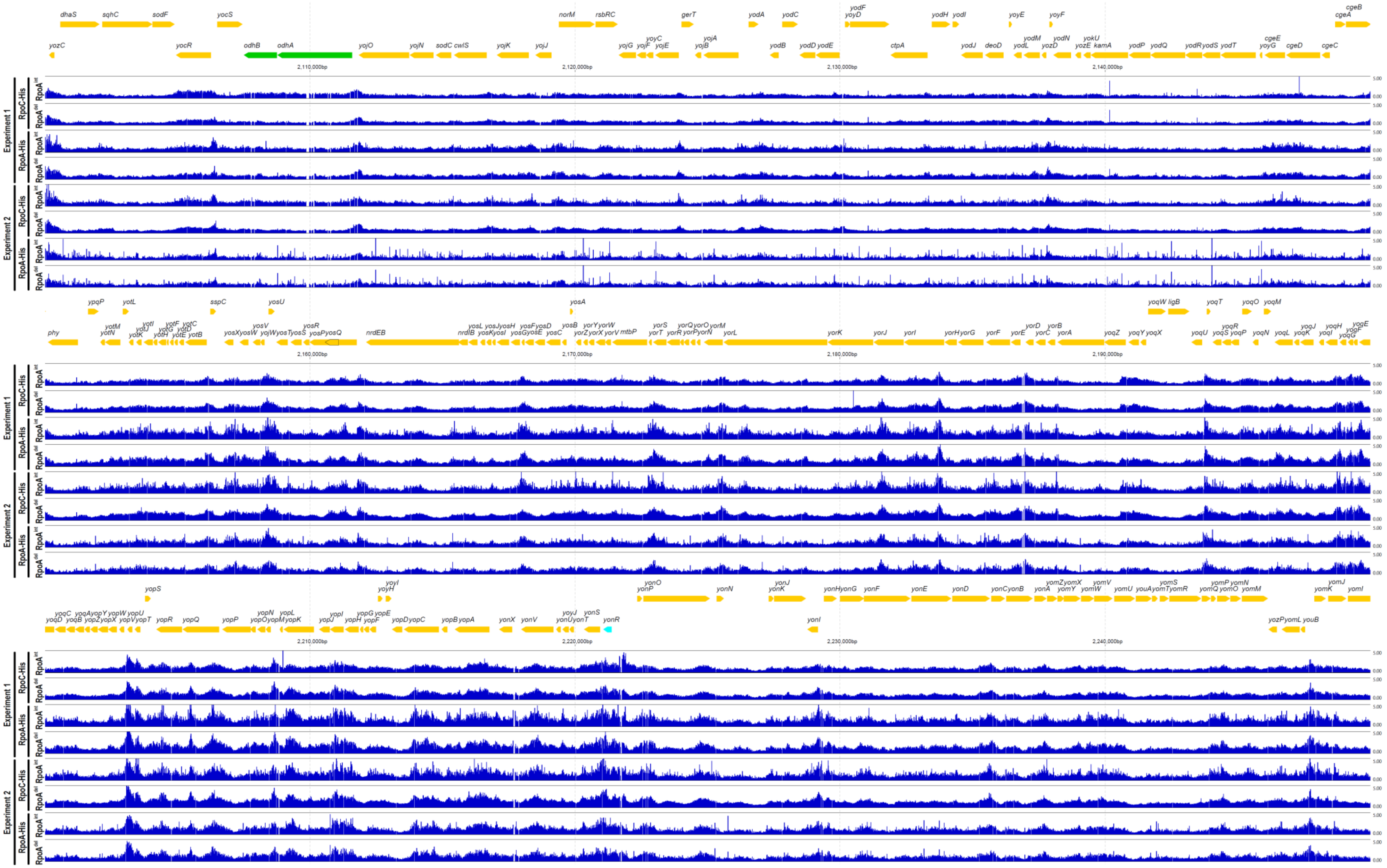

Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
1,360,000bp
1,370,000bp
1,380,000bp
1,390,000bp
1,410,000bp
1,420,000bp
1,430,000bp
1,440,000bp
1,460,000bp
1,470,000bp
1,480,000bp
1,490,000bp
5.00
0.00

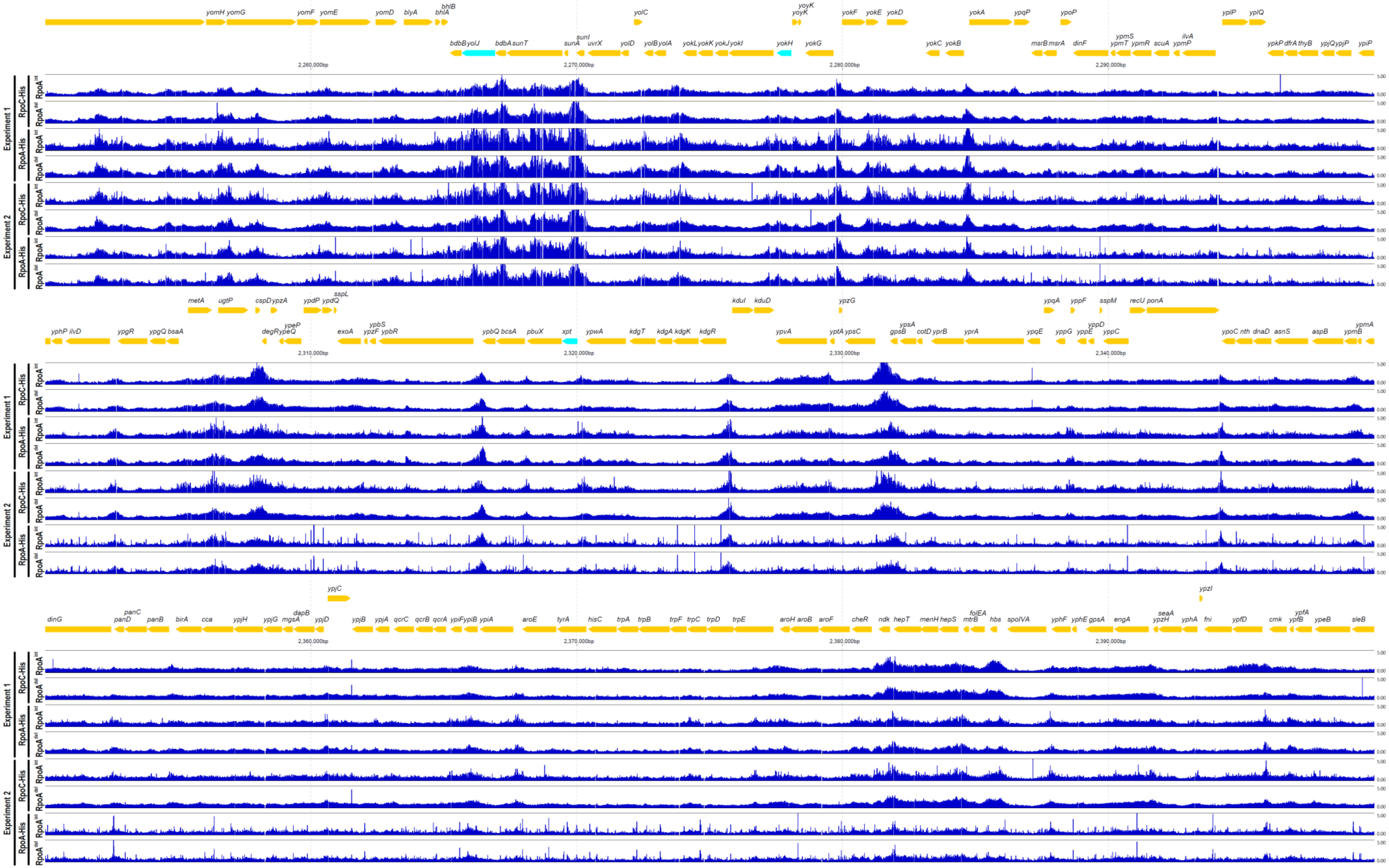

Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
1,510,000bp
1,520,000bp
1,530,000bp
1,540,000bp
1,560,000bp
1,570,000bp
1,580,000bp
1,590,000bp
1,610,000bp
1,620,000bp
1,630,000bp
1,640,000bp
5.00
0.00

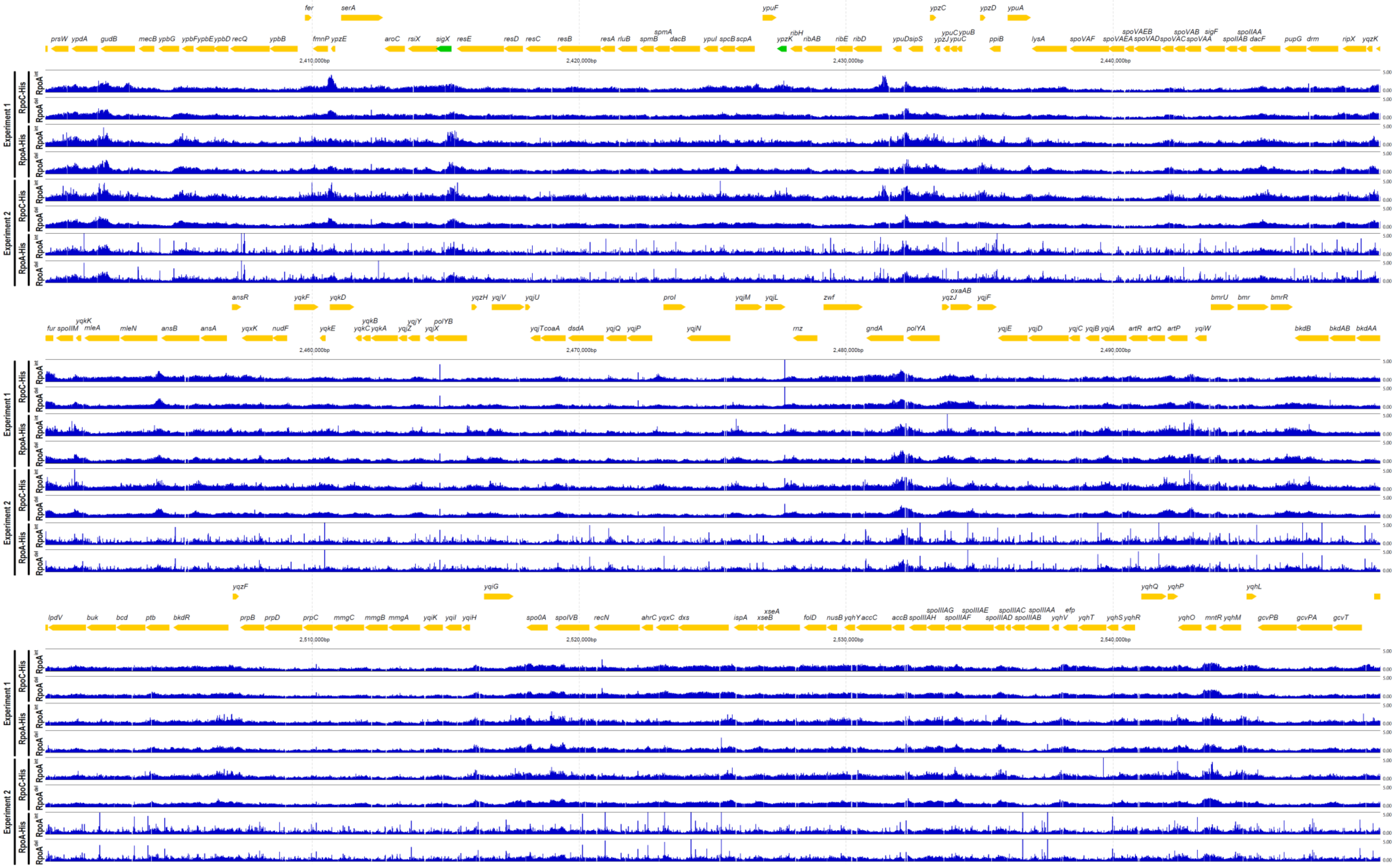

1,660,000bp
1,670,000bp
1,680,000bp
1,690,000bp
1,710,000bp
1,720,000bp
1,730,000bp
1,740,000bp
1,760,000bp
1,770,000bp
1,780,000bp
1,790,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00

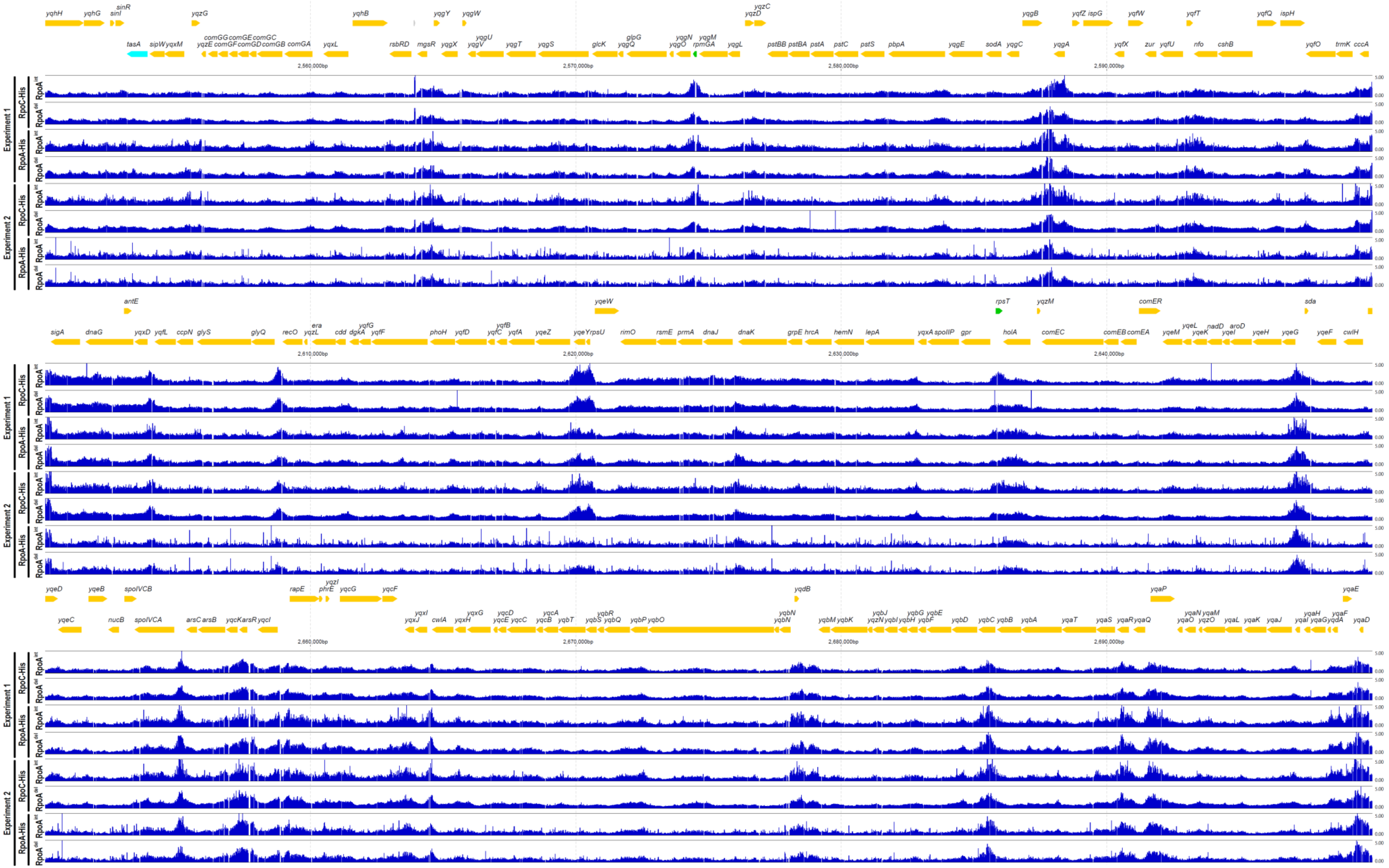

pksL
pksM
pksN
1,810,000bp
1,820,000bp
1,830,000bp
1,840,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
pksR
xylA
xylB
1,860,000bp
1,870,000bp
1,880,000bp
1,890,000bp
1,910,000bp
1,920,000bp
1,930,000bp
1,940,000bp

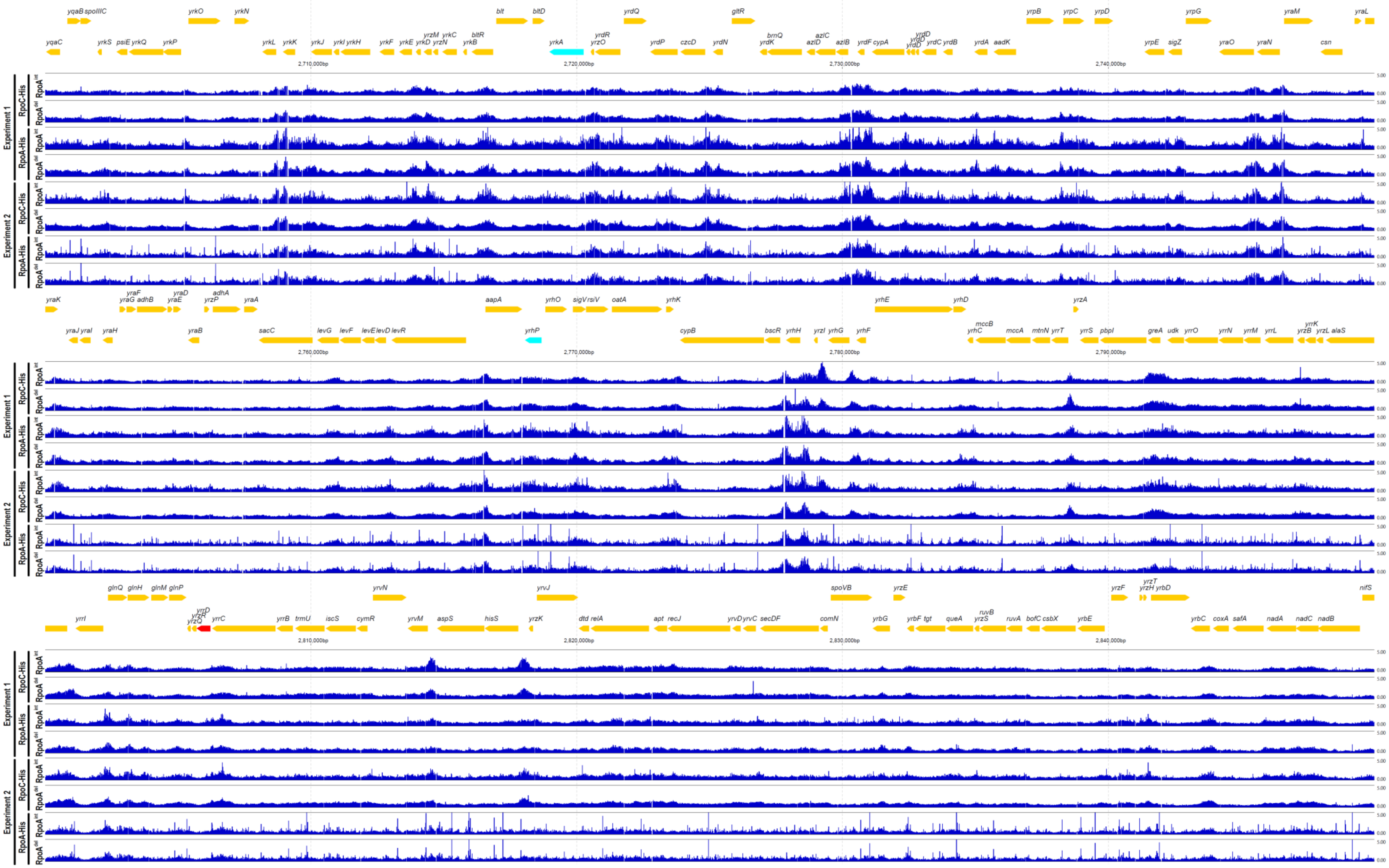



Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
2,110,000bp
2,120,000bp
2,130,000bp
2,140,000bp
2,160,000bp
2,170,000bp
2,180,000bp
2,190,000bp
2,210,000bp
2,220,000bp
2,230,000bp
2,240,000bp
5.00
0.00

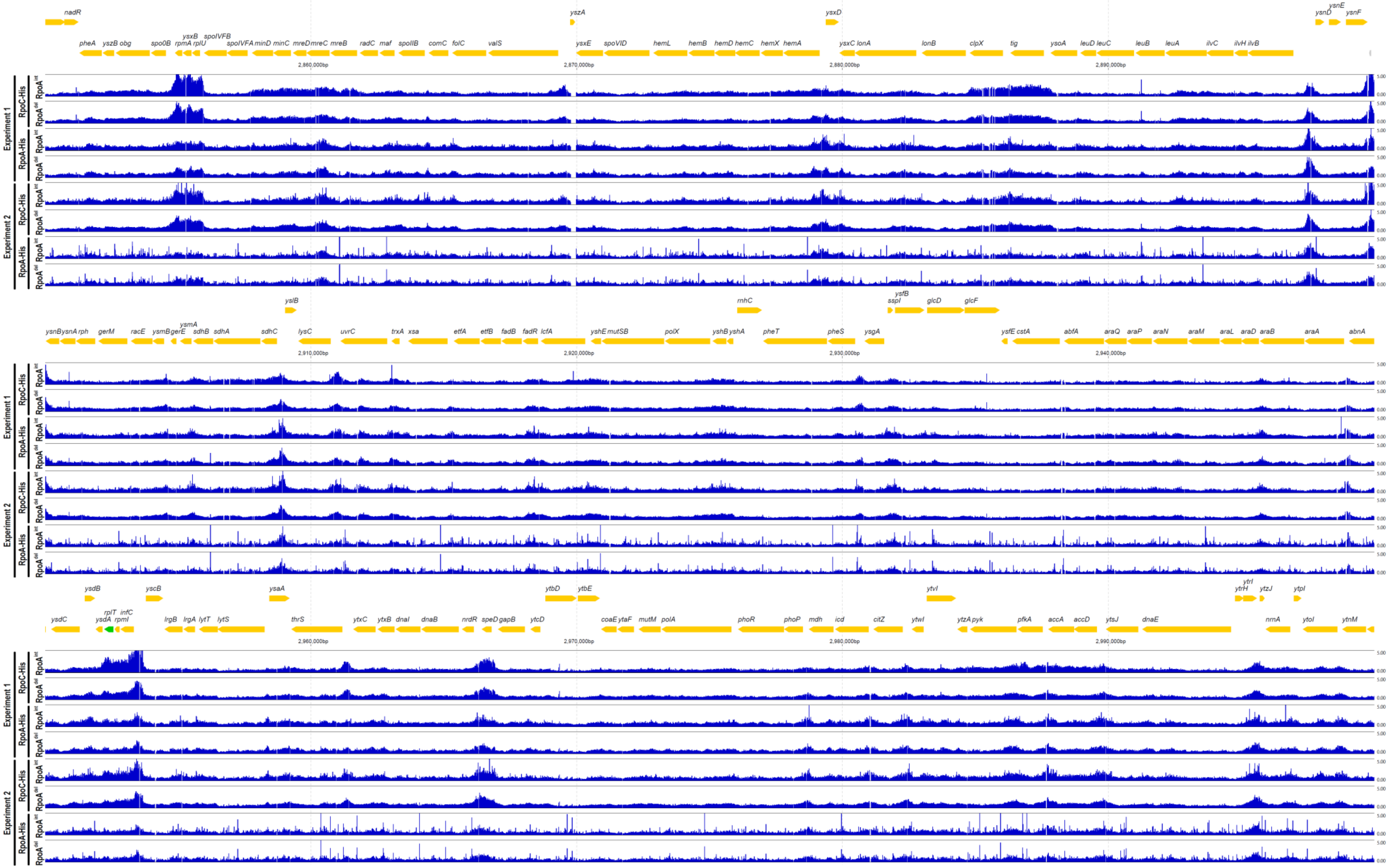

yomH yomG yomF yomE yomD blyA bhlA bhlB
yoyK yolC yokF yokE yokD yokA ypqP ypoP yplP yplQ
bdbB yolJ bdbA sunT sunI sunA uvrX yolD yolB yolA yokL yokK yokJ yokI yokH yokG yokC yokB msrB msrA dinF ypmS ypmT ypmR scuA ilvA ypmP ypkP dfrA thyB ypjQ ypjP ypiP
2,260,000bp
2,270,000bp
2,280,000bp
2,290,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
5.00
0.00
metA ugtP cspD ypzA ypdP ypdQ sspL kduI kduD ypzG ypqA yppF sspM recU ponA
yphP ilvD ypgR ypgQ bsaA degR ypeP ypeQ exoA ypbS ypzF ypbR ypbQ bcsA pbuX xpt ypwA kdgT kdgA kdgK kdgR ypvA yptA ypsC ypsA gpsB cotD yprB yprA ypqE yppG yppE yppD yppC ypoC nth dnaD asnS aspB ypmB ypmA
2,310,000bp
2,320,000bp
2,330,000bp
2,340,000bp
ypjC ypzI
dinG panC panD panB birA cca ypjH ypjG dapB mgsA ypjD ypjB ypjA qcrC qcrB qcrA ypiF ypiB ypiA aroE tyrA hisC trpA trpB trpF trpC trpD trpE aroH aroB aroF cheR ndk hepT menH hepS folEA mtrB hbs spoIVA yphF yphE gpsA engA seaA ypzH yphA fni ypfD cmk ypfA ypfB ypeB sleB
2,360,000bp
2,370,000bp
2,380,000bp
2,390,000bp

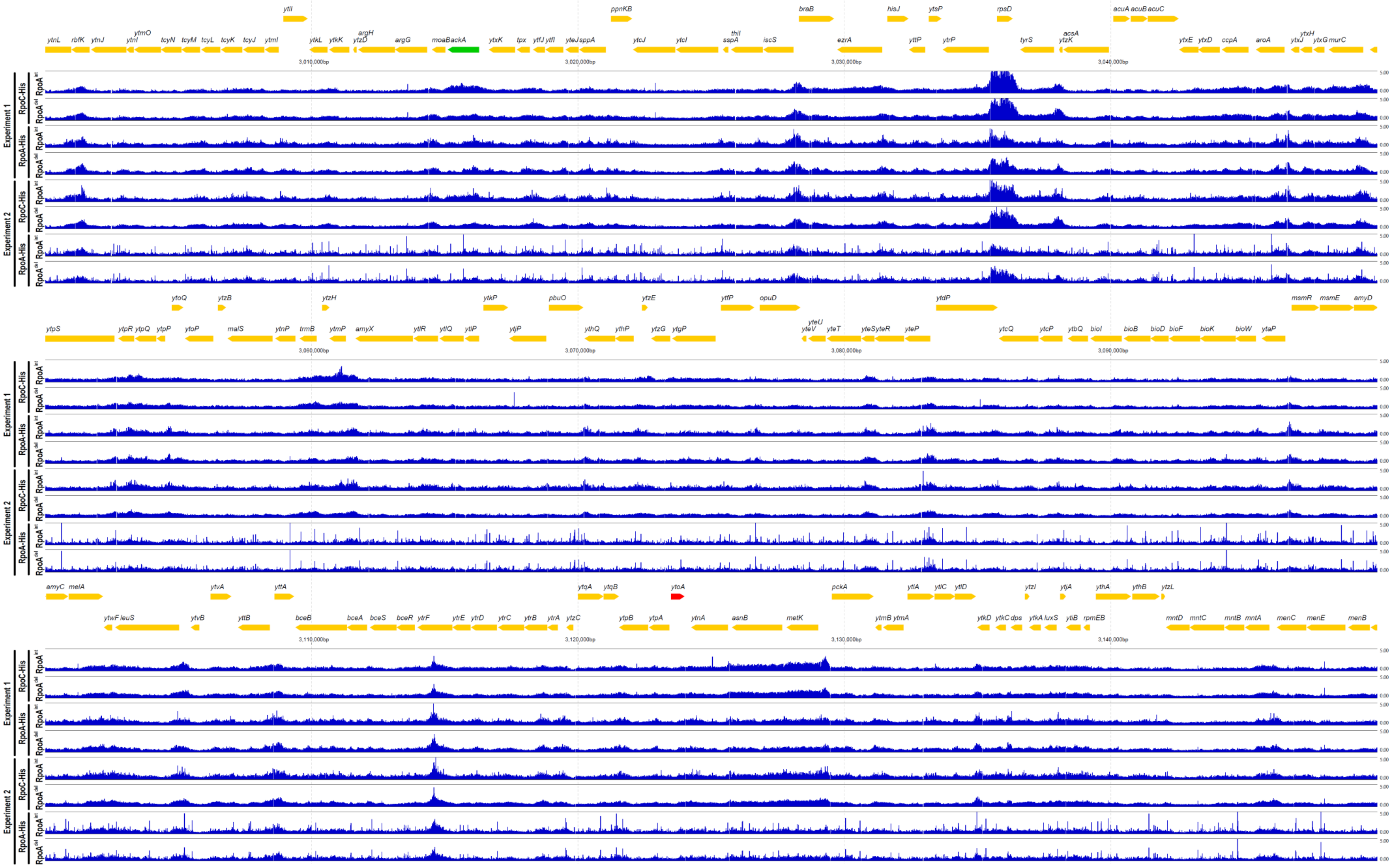

fer serA ypuF ypzC ypzD ypuA
prsW ypdA gudB mecB ypbG ypbFypbEypbD recQ ypbB fmnP ypzE aroC rsiX sigX resE resD resC resB resA rluB spmA spmB dacB ypuI spcB scpA ribH ypzK ribAB ribE ribD ypuDsipS ypuCypuB ypzJ ypuC ppiB lysA spoVAF spoVAEB spoVAEA spoVAD spoVAB spoVAC spoVAA sigF spoIIAA spoIIAB dacF pupG drm ripX yqzK
2,410,000bp 2,420,000bp 2,430,000bp 2,440,000bp
ansR yqkF yqkD yqzH yqjV yqjU proI yqjM yqjL zwf oxaAB yqzJ yqjF bmrU bmr bmrR
yqkK fur spoIIM mleA mleN ansB ansA yqxK nudF yqkE yqkB yqkC yqkA yqjY yqjZ polYB yqjX yqjT coaA dsdA yqjQ yqjP yqjN rnz gndA polYA yqjE yqjD yqjC yqjB yqjA artR artQ artP yqiW bkdB bkdAB bkdAA
2,460,000bp 2,470,000bp 2,480,000bp 2,490,000bp
yqzF yqiG yqhQ yqhP yqhL
lpdV buk bcd ptb bkdR prpB prpD prpC mmgC mmgB mmgA yqiK yqiI yqiH spo0A spoIVB recN ahrC yqxC dxs ispA xseA xseB folD nusB yqhY accC accB spoIIIAH spoIIIAG spoIIIAF spoIIIAE spoIIIAD spoIIIAC spoIIIAB spoIIIAA efp yqhV yqhT yqhS yqhR yqhO mntR yqhM gcvPB gcvPA gcvT
2,510,000bp 2,520,000bp 2,530,000bp 2,540,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA[wt]
RpoA[del]
5.00
0.00

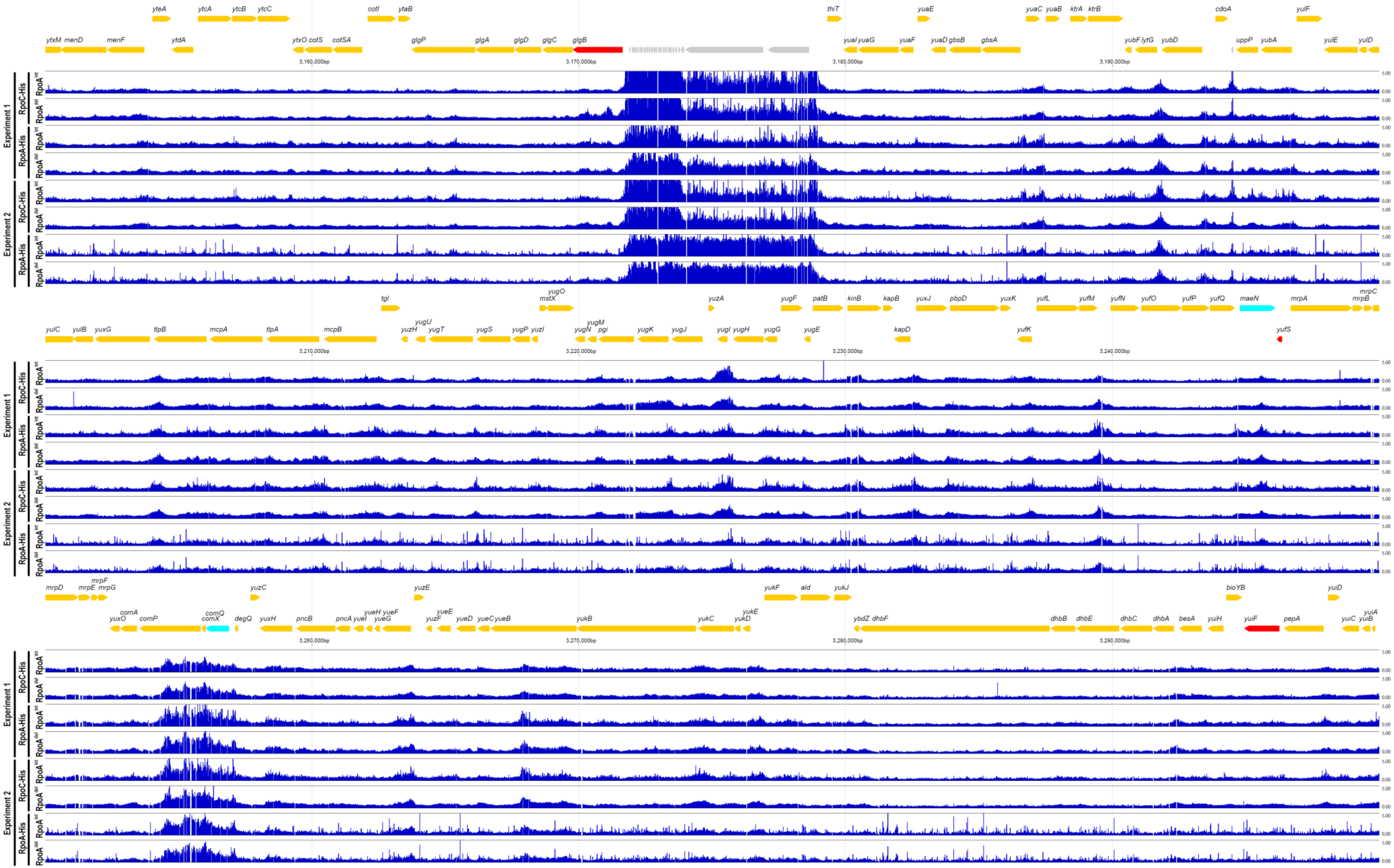

yqhH yqhG sinR sinI yqzG yqhB yqgY yqgW yqzC yqzD yqgB yqfZ ispG yqfW yqfT yqfQ ispH
tasA sipW yqxM comGG comGE comGC yqzE comGF comGD comGB comGA yqxL rsbRD mgsR yqgX yqgU yqgV yqgT yqgS glcK glpG yqgQ yqgN yqgM yqgO rpmGA yqgL pstBB pstBA pstA pstC pstS pbpA yqgE sodA yqgC yqgA yqfX zur yqfU nfo cshB yqfO trmK cccA
2,560,000bp
2,570,000bp
2,580,000bp
2,590,000bp
antE yqeW rpsT yqzM comER sda
sigA dnaG yqxD yqfL ccpN glyS glyQ recO era yqzL cdd dgkA yqfG yqfF phoH yqfD yqfB yqfC yqfA yqeZ yqeY rpsU rimO rsmE prmA dnaJ dnaK grpE hrcA hemN lepA yqxA spoIIP gpr holA comEC comEB comEA yqeM yqeL yqeK nadD aroD yqeI yqeH yqeG yqeF cwlH
2,610,000bp
2,620,000bp
2,630,000bp
2,640,000bp
yqeD yqeB spoIVCB rapE yqzI phrE yqcG yqcF yqdB yqaP yqaE
yqeC nucB spoIVCA arsC arsB yqcK arsR yqcI yqxI yqxJ cwlA yqxH yqxG yqcD yqcE yqcC yqcA yqcB yqbT yqbR yqbS yqbQ yqbP yqbO yqbN yqbM yqbK yqbJ yqzN yqbI yqbH yqbG yqbF yqbE yqbD yqbC yqbB yqbA yqaT yqaS yqaR yqaQ yqaN yqaM yqaO yqzO yqaL yqaK yqaJ yqaH yqaI yqaG yqdA yqaF yqaD
2,660,000bp
2,670,000bp
2,680,000bp
2,690,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00

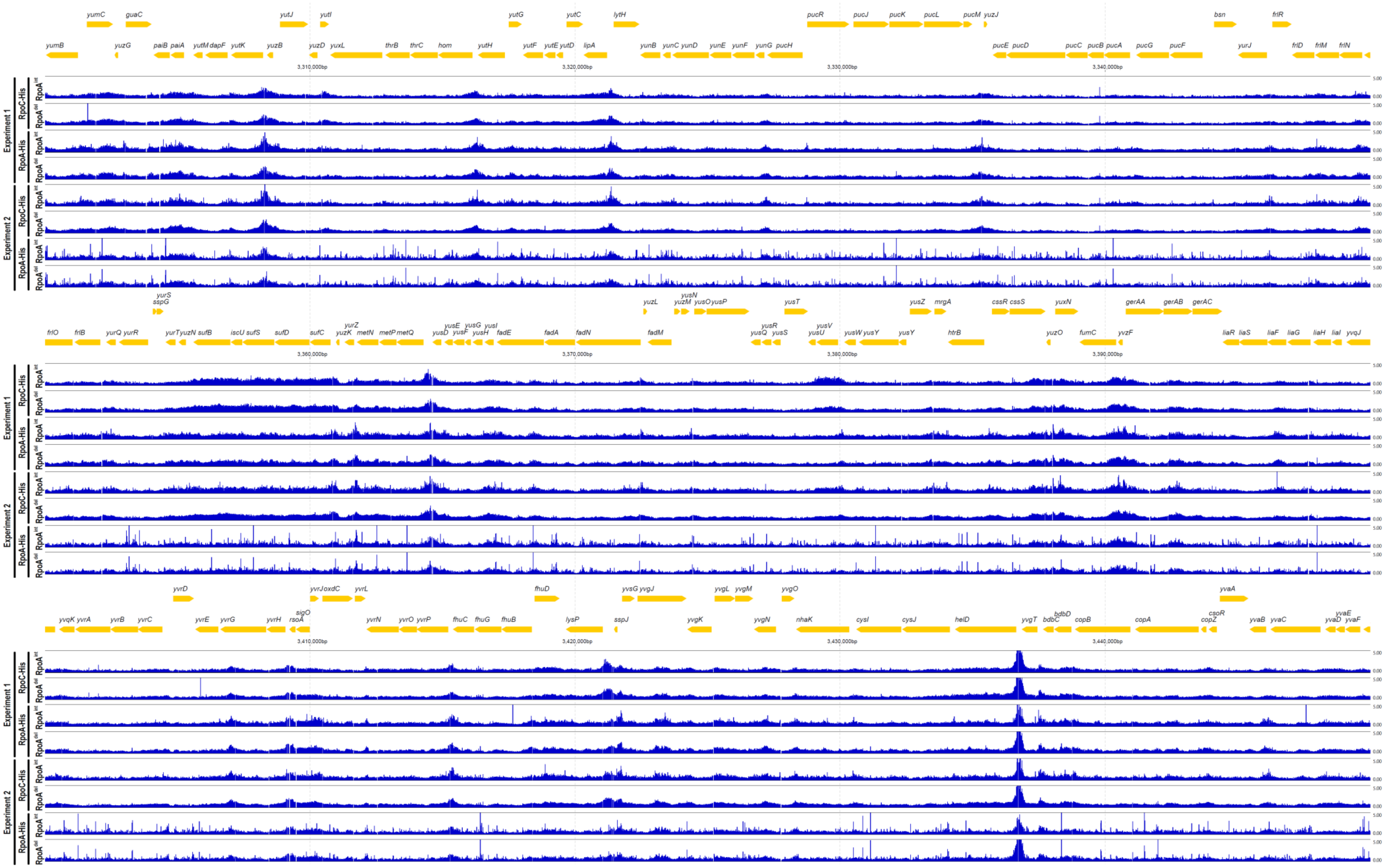


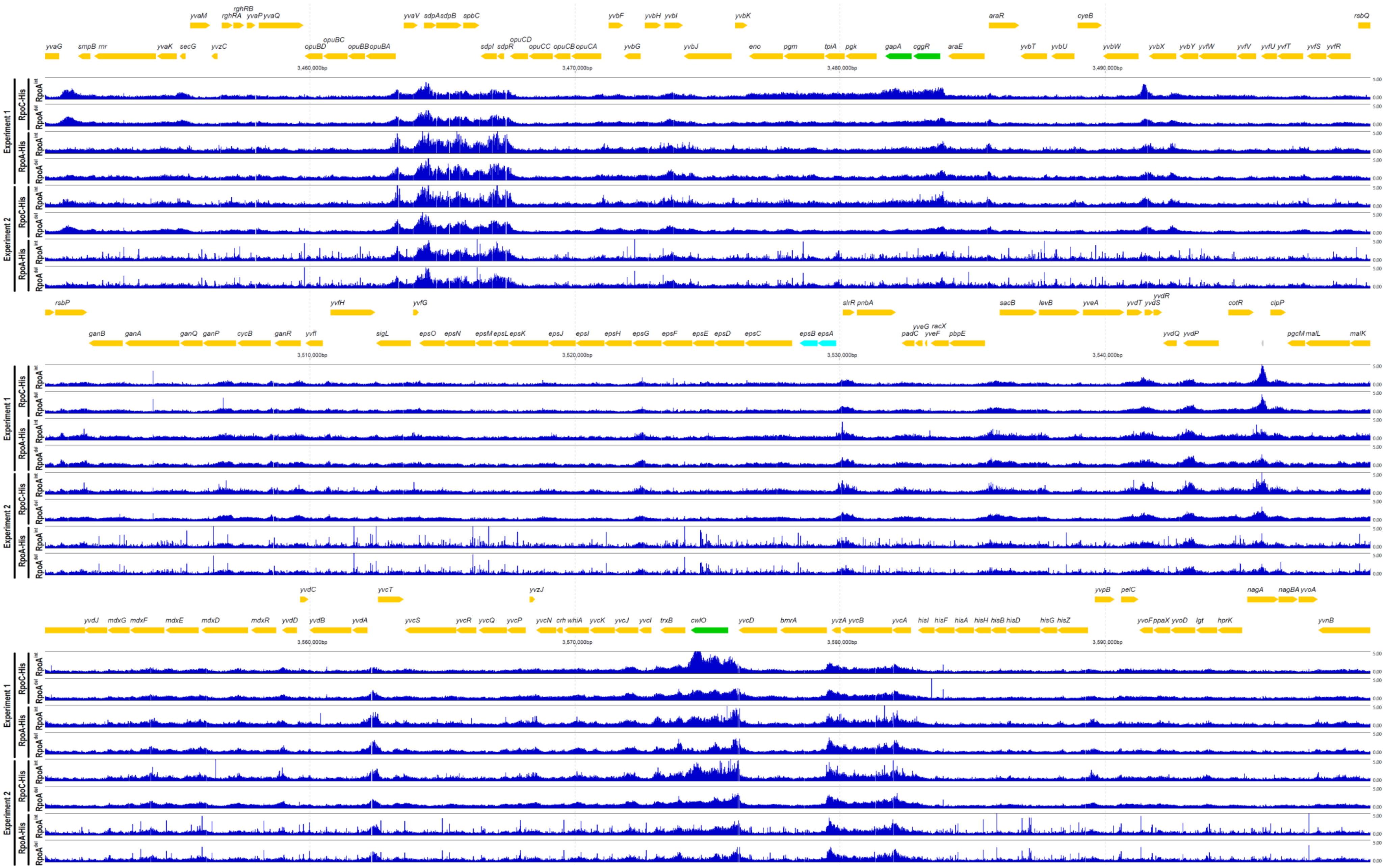
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
2,710,000bp
2,720,000bp
2,730,000bp
2,740,000bp
2,760,000bp
2,770,000bp
2,780,000bp
2,790,000bp
2,810,000bp
2,820,000bp
2,830,000bp
2,840,000bp
5.00
0.00


nadR
yszA
ysxD
ysnE
ysnD
ysnF
pheA yszB obg spo0B ysxB rpmA rplU spoIVFB spoIVFA minD minC mreD mreC mreB radC maf spoIIB comC folC valS
ysxE spoVID hemL hemB hemD hemC hemX hemA
ysxC lonA lonB clpX tig ysoA leuD leuC leuB leuA ilvC ilvH ilvB
2,860,000bp
2,870,000bp
2,880,000bp
2,890,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00
ysIB
rnhC
ysfB
sspI
glcD
glcF
ysnB ysnA rph gerM racE ysmB gerE ysmA sdhB sdhA sdhC lysC uvrC trxA xsa etfA etfB fadB fadR lcfA
yshE mutSB polX yshB yshA pheT pheS ysgA
ysfE cstA abfA araQ araP araN araM araL araD araB araA abnA
2,910,000bp
2,920,000bp
2,930,000bp
2,940,000bp
ysdB
yscB
ysaA
ytbD
ytbE
ytvI
ytrI
ytrH
ytzJ
ytpI
ysdC rplT infC ysdA rpmI lrgB lrgA lytT lytS thrS ytxC ytxB dnaI dnaB nrdR speD gapB ytcD
coaE ytaF mutM polA phoR phoP mdh icd citZ ytwI
ytzA pyk pfkA accA accD ytsJ dnaE rnmA ytoI ytnM
2,960,000bp
2,970,000bp
2,980,000bp
2,990,000bp

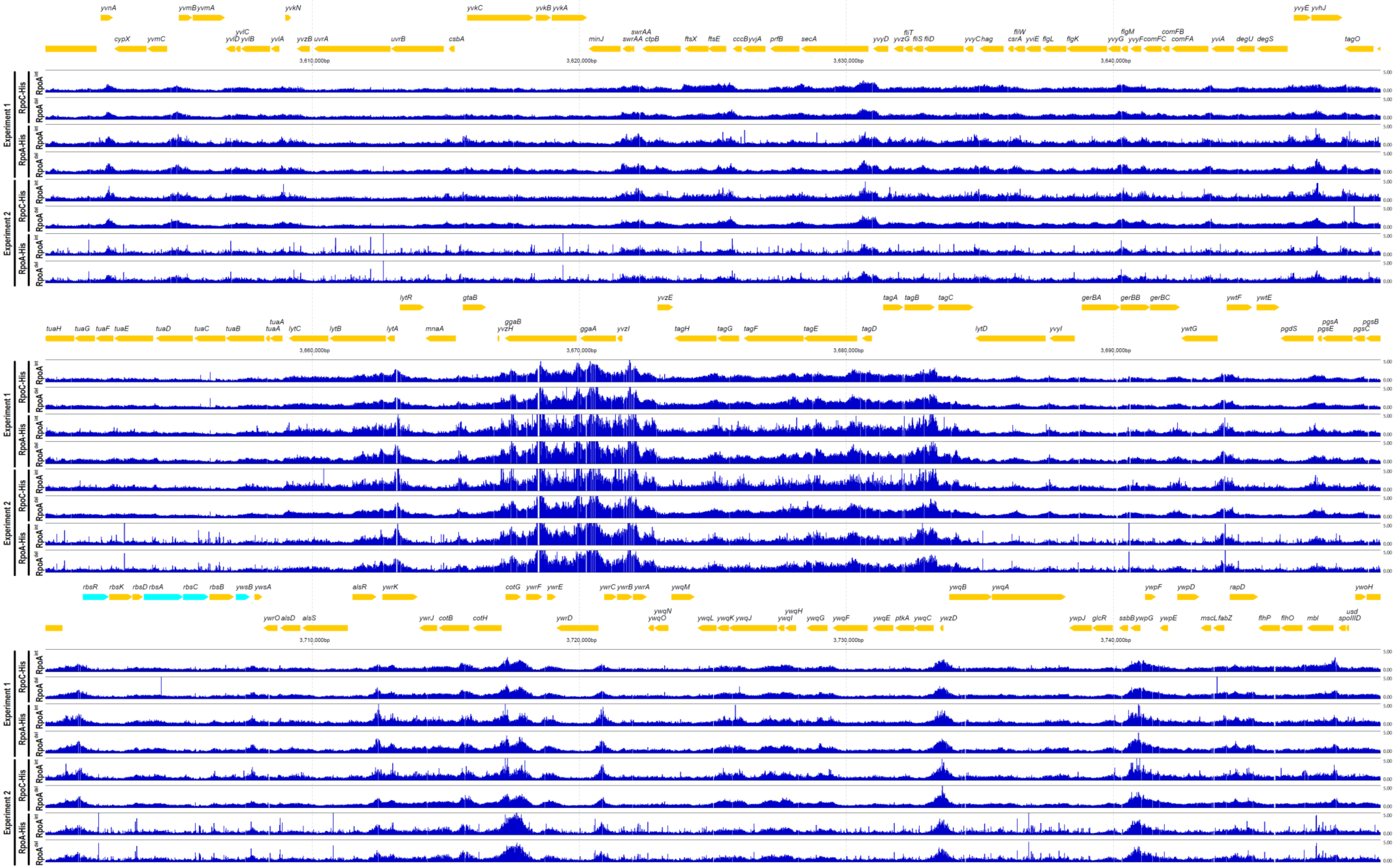

ytlI ppnKB braB hisJ ytsP rpsD acuA acuB acuC
ytnL rbfK ytnJ ytmO ytnI tcyN tcyM tcyL tcyK tcyJ ytmI ytkL ytkK argH ytzD argG moaBackA ytxK tpx ytfJ ytfI yteJ sppA ytcJ ytcI thiI sspA iscS ezrA yttP ytrP tyrS acsA ytzK ytxE ytxD ccpA aroA ytxH ytxJ ytxG murC
3,010,000bp 3,020,000bp 3,030,000bp 3,040,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA[wt]
RpoA[del]
5.00
0.00
ytoQ ytzB ytzH ytkP pbuO ytzE ytfP opuD ytdP msmR msmE amyD
ytpS ytpR ytpQ ytpP ytoP malS ytnP trmB ytmP amyX ytlR ytlQ ytlP ytjP ythQ ythP ytzG ytgP yteU yteV yteT yteS yteR yteP ytcQ ytcP ytbQ bioI bioB bioD bioF bioK bioW ytaP
3,060,000bp 3,070,000bp 3,080,000bp 3,090,000bp
amyC melA ytvA yttA ytqA ytqB ytoA pckA ytlA ytlC ytlD ytzI ytjA ythA ythB ytzL
ytwF leuS ytvB yttB bceB bceA bceS bceR ytrF ytrE ytrD ytrC ytrB ytrA ytzC ytpB ytpA ytnA asnB metK ytmB ytmA ytkD ytkC dps ytkA luxS ytiB rpmEB mntD mntC mntB mntA menC menE menB
3,110,000bp 3,120,000bp 3,130,000bp 3,140,000bp

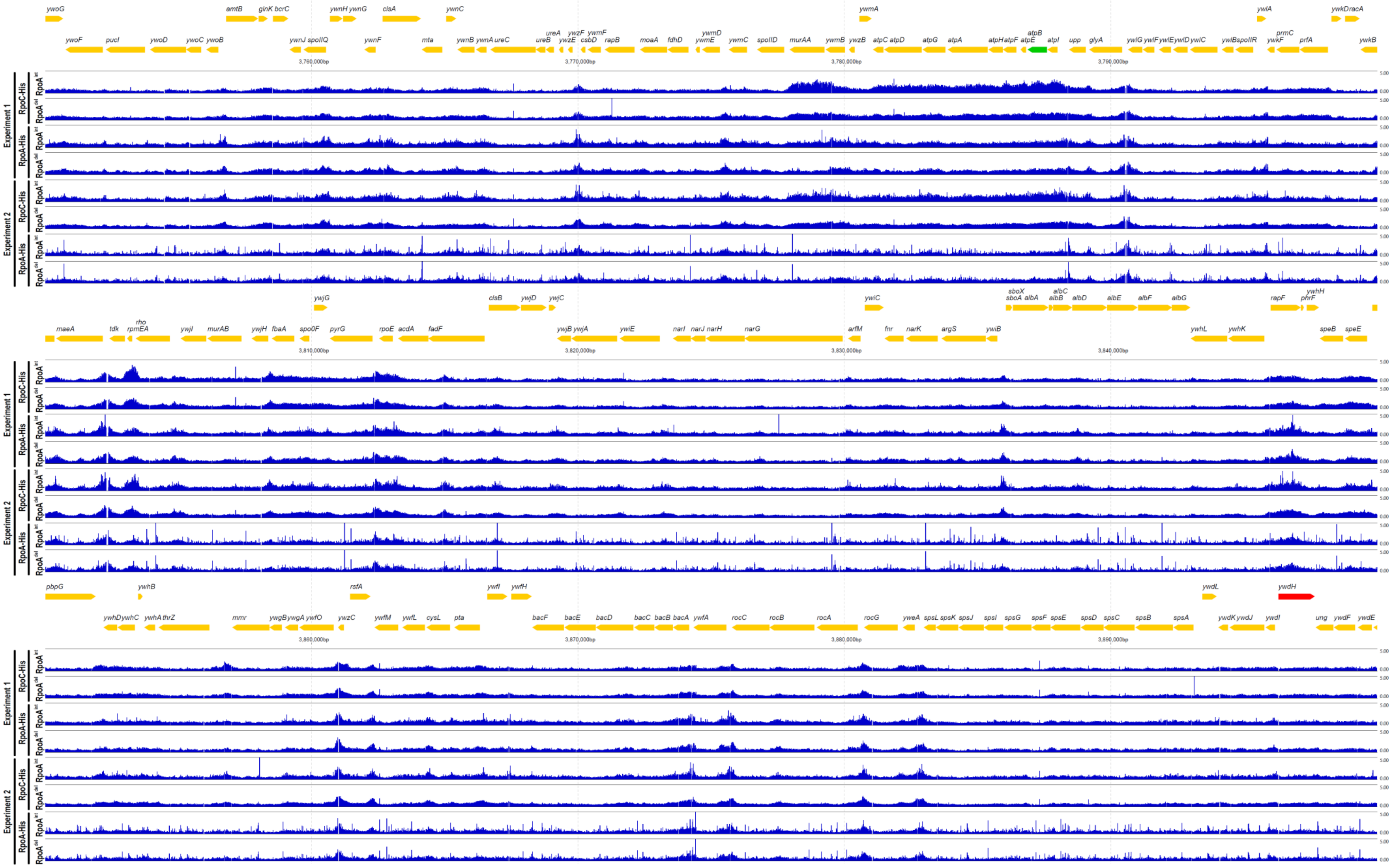

yteA ytcA ytcB ytcC cotI ytaB thiT yuaE yuaC yuaB ktrA ktrB cdoA yulF
ytxM menD menF ytdA ytxO cotS cotSA glgP glgA glgD glgC glgB yuaI yuaG yuaF yuaD gbsB gbsA yubF lytG yubD uppP yubA yulE yulD
3,160,000bp
3,170,000bp
3,180,000bp
3,190,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00
tgl yugO mstX yuzA yugF patB kinB kapB yuxJ pbpD yuxK yufL yufM yufN yufO yufP yufQ maeN mrpA mrpC mrpB
yulC yulB yuxG tlpB mcpA tlpA mcpB yugU yuzH yugT yugS yugP yuzI yugM yugN pgi yugK yugJ yugI yugH yugG yugE kapD yufK yufS
3,210,000bp
3,220,000bp
3,230,000bp
3,240,000bp
mrpF mrpD mrpE mrpG yuzC yuzE yukF ald yukJ bioYB yuiD
comA yuxO comP comQ comX degQ yuxH pncB pncA yueI yueH yueF yueG yueE yuzF yueD yueC yueB yukB yukC yukE yukD ybdZ dhbF dhbB dhbE dhbC dhbA besA yuiH yuiF pepA yuiC yuiA yuiB
3,260,000bp
3,270,000bp
3,280,000bp
3,290,000bp

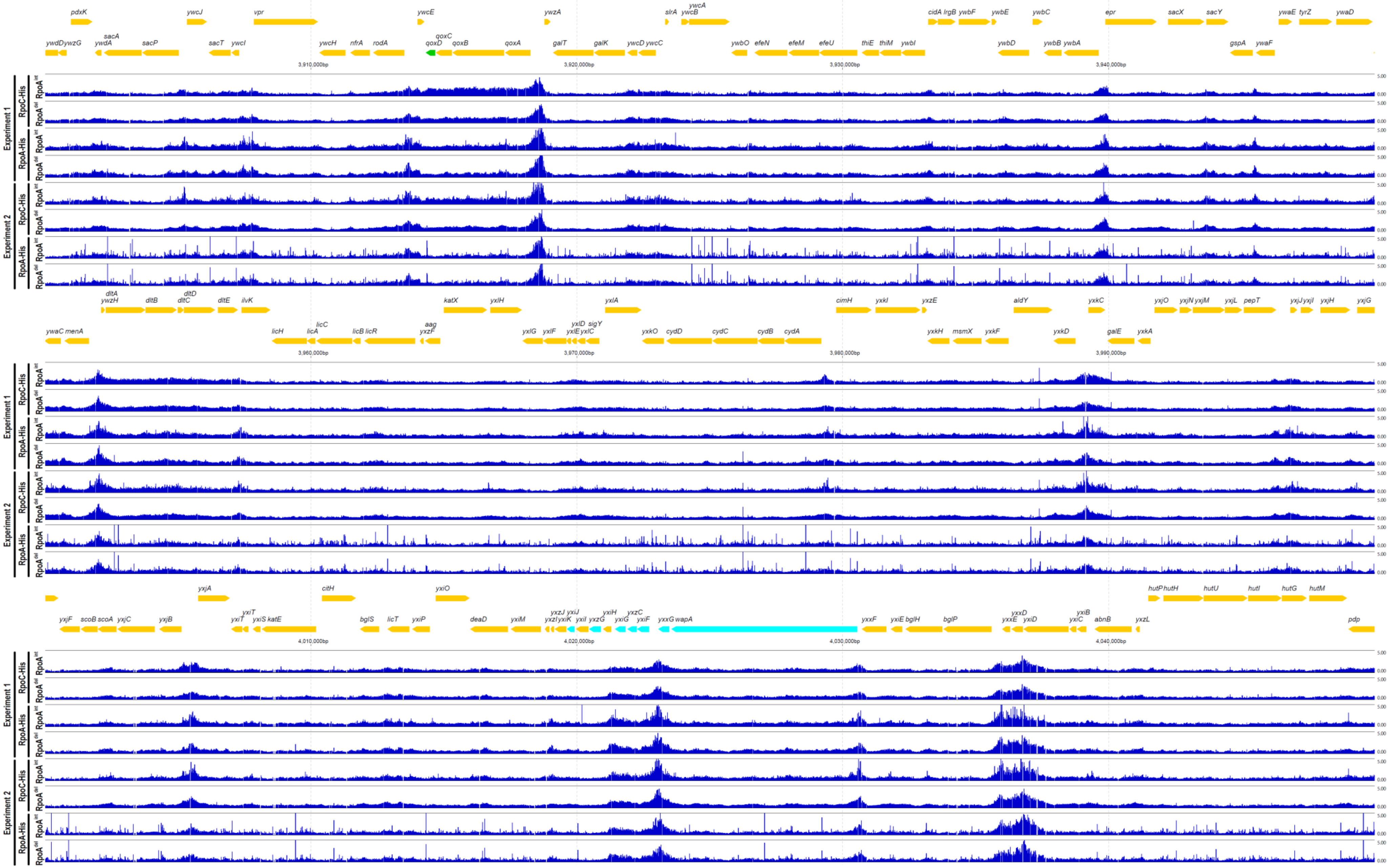

Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
3,310,000bp
3,320,000bp
3,330,000bp
3,340,000bp
3,360,000bp
3,370,000bp
3,380,000bp
3,390,000bp
3,410,000bp
3,420,000bp
3,430,000bp
3,440,000bp

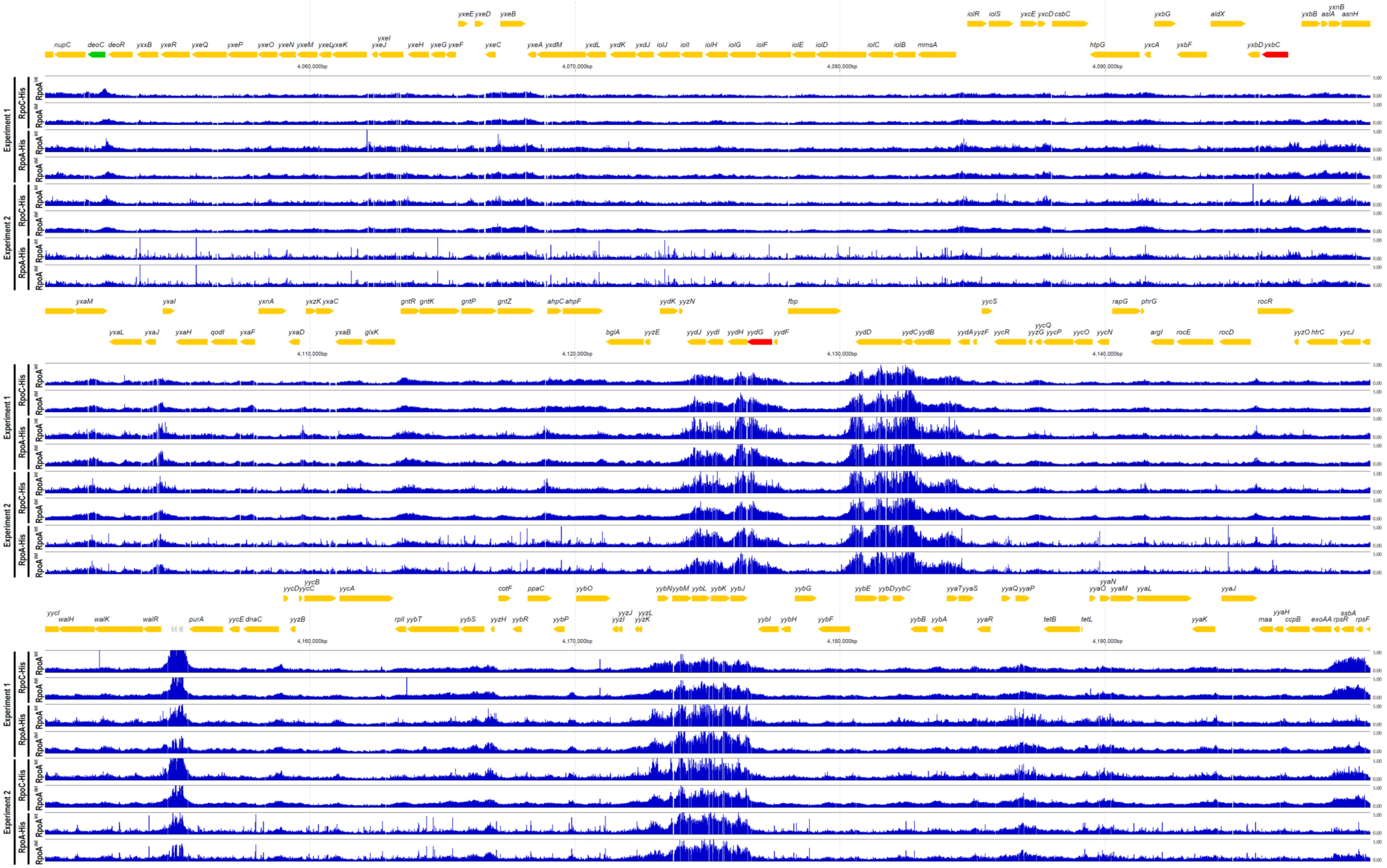


yvaM rghRB rghRA yvaP yvaQ yvaV sdpA sdpB spbC yvbF yvbH yvbI yvbK araR cyeB rsbQ
yvaG smpB rnr yvaK secG yvzC opuBC opuBD opuBB opuBA opuCD sdpI sdpR opuCC opuCB opuCA yvbG yvbJ eno pgm tpiA pgk gapA cggR araE yvbT yvbU yvbW yvbX yvbY yvfW yvfV yvfU yvfT yvfS yvfR
3,460,000bp 3,470,000bp 3,480,000bp 3,490,000bp
rsbP yvfH yvfG slrR pnbA sacB levB yveA yvdT yvdS yvdR cotR clpP
ganB ganA ganQ ganP cycB ganR yvfI sigL epsO epsN epsM epsL epsK epsJ epsI epsH epsG epsF epsE epsD epsC epsB epsA yveG racX padC yveF pbpE yvdQ yvdP pgcM malL malK
3,510,000bp 3,520,000bp 3,530,000bp 3,540,000bp
yvdC yvcT yvzJ yvpB pelC nagA nagBA yvoA
yvdJ mdxG mdxF mdxE mdxD mdxR yvdD yvdB yvdA yvcS yvcR yvcQ yvcP yvcN crh whiA yvcK yvcJ yvcI trxB cwlO yvcD bmrA yvzA yvcB yvcA hisI hisF hisA hisH hisB hisD hisG hisZ yvoF ppaX yvoD lgt hprK yvnB
3,560,000bp 3,570,000bp 3,580,000bp 3,590,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00




ywoG amtB glnK bcrC ywnH ywnG clsA ywnC ywmA ywlA ywkD racA
ywoF pucI ywoD ywoC ywoB ywnJ spoIIQ ywnF mta ywnB ywnA ureC ureA ureB ywzE ywzF ywmF csbD rapB moaA fdhD ywmD ywmE ywmC spoIID murAA ywmB ywzB atpC atpD atpG atpA atpH atpF atpB atpE atpI upp glyA ywlG ywlF ywlE ywlD ywlC ywlB spoIIR prmC ywkF prfA ywkB
3,760,000bp
3,770,000bp
3,780,000bp
3,790,000bp
ywjG clsB ywjD ywjC ywiC sboX sboA albA albC albB albD albE albF albG rapF ywhH phrF
maeA tdk rho rpmEA ywjI murAB ywjH fbaA spo0F pyrG rpoE acdA fadF ywjB ywjA ywiE narI narJ narH narG arfM fnr narK argS ywiB ywhL ywhK speB speE
3,810,000bp
3,820,000bp
3,830,000bp
3,840,000bp
pbpG ywhB rsfA ywfI ywfH ywdL ywdH
ywhD ywhC ywhA thrZ mmr ywgB ywgA ywfO ywzC ywfM ywfL cysL pta bacF bacE bacD bacC bacB bacA ywfA rocC rocB rocA rocG yweA spsL spsK spsJ spsI spsG spsF spsE spsD spsC spsB spsA ywdK ywdJ ywdI ung ywdF ywdE
3,860,000bp
3,870,000bp
3,880,000bp
3,890,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00


pdxK ywcJ vpr ywcE ywzA slrA ywcA ywcB cidA lrgB ywbF ywbE ywbC epr sacX sacY ywaE tyrZ ywaD
ywdD ywzG sacA ywdA sacP sacT ywcI ywcH nfrA rodA qoxC qoxD qoxB qoxA galT galK ywcD ywcC ywbO efeN efeM efeU thiE thiM ywbI ywbD ywbB ywbA gspA ywaF
3,910,000bp
3,920,000bp
3,930,000bp
3,940,000bp
dltA ywzH dltB dltD dltC dltE ilvK katX yxlH yxlA cimH yxkI yxzE aldY yxkC yxjO yxjN yxjM yxjL pepT yxjJ yxjI yxjH yxjG
ywaC menA licH licC licA licB licR aag yxzF yxlG yxlF yxlD sigY yxlE yxlC yxkO cydD cydC cydB cydA yxkH msmX yxkF yxkD galE yxkA
3,960,000bp
3,970,000bp
3,980,000bp
3,990,000bp
yxjA citH yxiO hutP hutH hutU hutI hutG hutM
yxjF scoB scoA yxjC yxjB yxiT yxiS katE bglS licT yxiP deaD yxiM yxzJ yxiJ yxzI yxiK yxiI yxiH yxzG yxiG yxzC yxiF yxxG wapA yxxF yxiE bglH bglP yxxD yxxE yxiD yxiB yxiC abnB yxzL pdp
4,010,000bp
4,020,000bp
4,030,000bp
4,040,000bp
Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA[wt]
RpoA[del]
5.00
0.00


Experiment 1
Experiment 2
RpoC-His
RpoA-His
RpoA^wt
RpoA^del
5.00
0.00
4,060,000bp
4,070,000bp
4,080,000bp
4,090,000bp
4,110,000bp
4,120,000bp
4,130,000bp
4,140,000bp
4,160,000bp
4,170,000bp
4,180,000bp
4,190,000bp

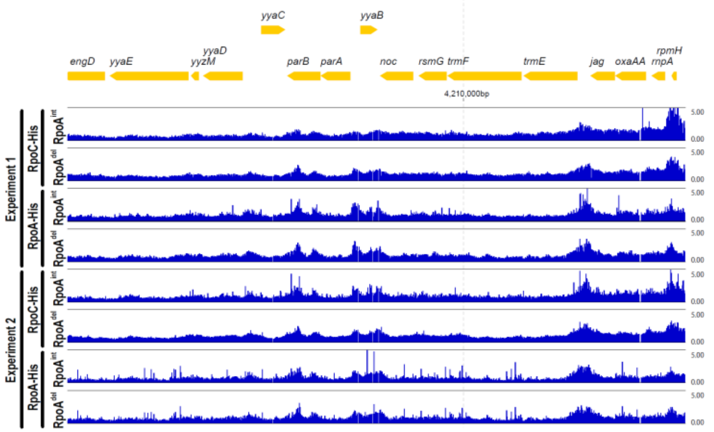


図 S４　枯草菌全ゲノム上の RNAP（野生型 RpoA）、RNAP（変異型 RpoA）、RpoA-His、変異型 RpoA-His の分布。

青：トランスクリプトーム解析で転写レベルの減少した遺伝子

赤：トランスクリプトーム解析で転写レベルの増加した遺伝子

緑：ChAP-chip 解析で転写レベルの減少した遺伝子

濃い青：トランスクリプトーム解析と ChAP-chip 解析で共に転写レベルの減少した遺伝子