

遺伝子とタンパク質から細胞機能に至る道 独奏、2重奏からオーケストレーションへ

小倉 光雄¹⁾

The Path from Genes and Proteins to Cellular Functions:
From Solo and Duet to Orchestration

Mitsuo Ogura¹⁾

Abstract

This paper aims to review achievements in *Bacillus subtilis* molecular genetics research over the past 35 years, presented in chronological order and reflecting the author's personal research history. The first half focuses on research into DegSU, which is a His-Asp phospho-relay system. The second half focuses on research for the glucose induction of *sigX*, one of the ECF (extracellular function) sigma factors. During this period, spanning the turn of the 21st century, two significant new developments occurred in *Bacillus* genetics field. The first was the determination of the complete *Bacillus subtilis* genome sequence in 1997. This enabled genome-wide analyses of various types and spurred vigorous reverse genetic studies of homologous protein families present in the genome. The second was the publication of the first paper using a wild and ancestral strain by R. Losick in 2004. Subsequent research using wild-type strains has progressively revealed the functions of genes that were previously unknown. Undoubtedly, major discoveries will continue to emerge in the future.

筆者の枯草菌研究の前史

本稿は筆者の35年間にわたる枯草菌研究を振り返ることで、この間の枯草菌研究の発展を垣間みようという試みである。従って、筆者の個人的研究史を語ることもお許しいただきたい。1982年春に筆者は、東大農芸化学・鈴木昭憲教授の主宰する生物有機化学教室に配属になり、松本正吾助手(のち理研主任研究員)から“アワヨトウガ幼虫を用いた昆虫脱皮阻害物質の放線菌からの探索”というテーマをいただいた。この研究で、筆者はむしろ昆虫よりも微生物研究がやりたいと気づいたのだった。幸いこの研究は、先輩の作田庄平博士(東大助教授を経て帝京大教授)と磯貝彰助教授(のち奈良先端大学長)のもとで新規物質の構造決定と論文発表に結実した(Isogai et al., 1984)。ところで筆者は、1983年春から旧応用微生物研究所第6研究部(抗生物質)に大学院生として進学し、大岳望教授から“異なる

ポリエーテル抗生物質生産菌の細胞融合による新規抗生物質の創生”というテーマをいただいた。しかし教室には放線菌からの代謝産物単離と構造決定のプロはいても、遺伝学の素養がある人はいなかったので、野外から単離した菌株を用いての研究の困難さと相まって、五里霧中という有様だった。たとえば細胞融合のマーカーとして栄養要求性変異を入れるのに数ヶ月、細胞融合の前処理であるプロトプラスト形成条件の検討にさらに数ヶ月を要した。しかし、この過程で当該の菌株をエチジウムプロマイドで処理しただけで新規抗生物質を生産し始めたことに気づいた。当時は理由が分からなかったが、今の知識ではゲノムに潜む休眠中のポリケタイド合成系オペロンのスイッチが入ったせいだろうと推察できる。この物質の構造決定で修士を取り(Ogura et al., 1985)、自己耐性遺伝子の研究で博士を取った(Ogura et al., 1986, 1990)。ちなみに当時の論文の図はロット

1) 東海大学海洋研究所 〒424-8610 静岡市清水区折戸3-20-1
Institute of Oceanic Research and Development, Tokai University, Orido 3-20-1, Shizuoka, Japan
(2025年11月25日受付/2025年12月5日受理)

リングという手技を使うのだが、これが筆者は不得意でなかなか綺麗な図ができなかった、その後図表作成はMacができるようになりずいぶん助かった。また、1989年にがん研で初めてMacで図を作成できたり、論文textのfontが自由に変えられる事には大いに衝撃を受けてその後もMacを愛用することになった。1988年春から、がん研究所化学療法センター基礎部でPDを3年間勤めた。ここでは、鶴尾隆部長(のち東大教授)から、“抗がん抗生物質に対する多剤耐性遺伝子の転写制御”というテーマをいただいたが、この研究室でもヒト細胞遺伝学のテーマは初めてで色々苦労はあったが、論文を発表することはできだし、種々のことを学ぶことができた(Ogura et al., 1992)。そして、6研の先輩であった田中暉夫博士(三菱化成生命研主任研究員)が1991年に東海大学海洋学部に教授として赴任することになった際に、一緒に仕事を、とお誘いを受け静岡キャンパスに赴任し、ようやく筆者の枯草菌研究が始まったわけである。

DegSU リン酸リレー系

田中先生は初代生命研究所長である江上不二夫博士の、大腸菌研究ばかりでは生命観が偏るという教えに従い、工業用酵素生産で注目されていた枯草菌を題材にした。枯草菌 *Bacillus subtilis* はグラム陽性菌のモデル生物で有胞子性の桿菌である(Kovacs,

2019)。枯草菌研究が細菌遺伝学に対して成し遂げた貢献や応用的成果はこの総説に詳しい(Stulke et al., 2023)。田中先生は日本の遺伝子工学の草分けの一人で当初は制限酵素もご自分で精製されて使用していたそうである。そして、1988年にPasteur研のMsadek/Kunst/Rapoportグループとほぼ同時に菌体外プロテアーゼ生産の制御因子 *degU* 遺伝子の単離と塩基配列決定を報告した(Kunst et al., 1988; Tanaka and Kawata, 1988)。この当時は、ようやく2成分制御系、今ではHis-Aspリン酸リレー系として確立された細菌一般が広く持つシグナル伝達系の概念がようやく提案されていた時代であった。この系では、何らかのシグナルを受けて sensor kinase の His 残基が自己リン酸化し、そのリン酸が response regulator の Asp 残基に移動し、タンパク質表面の電荷状態を変えることで response regulator がDNAの認識配列に結合できるように立体構造が変化する(Fig. 1)。田中先生は、それ以前にDegSU系の補助因子として *degR* を単離しただし発表時には作用はわからなかった一論文発表(Tanaka et al., 1987)、さらに1991年当時未発表だったプラスミドに乗せると多コピーでDegSUの機能を調節する遺伝子を単離していたところである。この多コピー遺伝子の本体解明が筆者の最初の枯草菌研究だった。助手として赴任した1991年春には実験設備は何もなく、ここが先生のお部屋ですと案内されたがらんどうの部屋ではデスクの上に内線電話

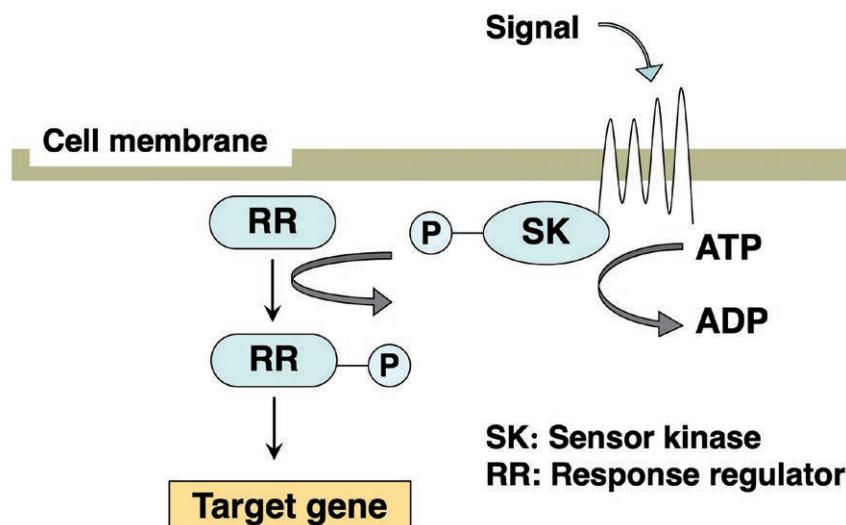


Fig. 1. His-Asp phospho-relay. This system is also known as a two-component regulatory system. Environmental signals activate the extracellular domain of the sensor kinase, and this signal promotes the autophosphorylation of a His residue in the intracellular domain of kinases. This phosphate is transferred to an Asp residue in the C-terminal domain of the regulator, enhancing the DNA-binding activity of regulator to its target sequence. Consequently, the environmental signal activates transcription of the corresponding gene.

の受話器が載っているだけで、先が思いやられたが（イヤな感じの雨の日だった）、そこは若さというもので何とかなるだろうと思い直したものだった。当時のサンガー法による塩基配列決定は手作業の実験でうまくいっても一回で200塩基程しか読めなかつたし、順番に200塩基ずつ端から短くした当該DNAをプラスミドにクローン化する必要があつてなかなか時間を要した。ようやく配列を決定し、電話回線で遺伝研DDBJに接続してホモロジーサーチを行った。このプロセスも素人の筆者にはなかなかの苦労だった。すると、驚いたことにプロリン生合成遺伝子*proB*を釣ったことが判明した。最初は意味がわからなかったが、田中先生がこの遺伝子はキナーゼだからDegUをリン酸化するんじやないかと提案され、その線で論文にして発表した、1994年のことだった(Ogura et al., 1994)。次に、*degR*遺伝子が主要シグマ因子以外のシグマで読まれていることに興味を覚え、*degR*の発現研究を行った(Ogura and Tanaka, 1996)。ちなみに、シグマへの関心は以前からあり、それは筆者の院生時代に応微研2研の院生だった田中寛さん(のち東京科学大教授)が放線菌シグマの研究でScienceに論文発表した際の衝撃があったからだった(Tanaka et al., 1988)。当時の筆者は遺伝学の業績がなく、何とも煌びやかに見えたものだった。次に*degR*の発現に関わる遺伝子として*med*と名付けた遺伝子をトランスポゾン法で単離し、細胞膜表面にリポタンパク質として発現していることを示した(Ogura et al., 1997, 2002a)。*med*の塩基配列を決定した時、大腸菌にどうしてもクローンできない領域があり苦労したが、当時ようやく利用可能になってきたPCRを用いてその領域をゲノムから増幅したのも(オリゴDNAは自分

で合成した、梅雨時は合成機の試薬交換時に湿気が入るので大変だった)今では遠い昔話の類である。この頃にはABIの蛍光色素を用いた自動シーケンサーが利用できるようになったが、やはりサンガー法だから読める範囲は350塩基程度だった。Medタンパク質はのちに、R. Losickらにより胞子形成のマスター制御因子Spo0Aへのシグナル伝達に関する可能性が強く示唆された(Banse et al., 2011)。Spo0Aも4つのタンパク質からなる複合型His-Aspリレー系の最後に位置するresponse regulatorである。

1年間のアメリカ研究生活

DegUはリン酸化されていない時は枯草菌の外来DNA取り込み能(competenceと称する)の重要な制御因子であることが知られていた(Fig. 2)。Competence制御系では、His-Aspリン酸リレー系であるComPAが細胞外に分泌されるペプチドフェロモンComXによって活性化され、ComS活性化を経て最終的にはComKのDNA結合能がONになることでDNA取り込み装置が細胞膜に合成される(Ogura et al., 2002b; Berka et al., 2002; Hamoen et al., 2003) (Fig. 3)。D. Dubnauのグループによれば、DegUの作用機作は非リン酸化型DegUがcomKプロモーターに直接結合するというので、DegUのDNA結合活性を初めて示した(Hamoen et al., 2000)。東海大の留学システムを利用して留学先を探す際に、competenceを研究していたPeter Zuber博士とNakano Michiko博士ご夫妻の主宰する研究室を選んだ。多くの日本人はBostonとかSan Diegoに行くが、筆者はアメリカ南部に興味があつてミ

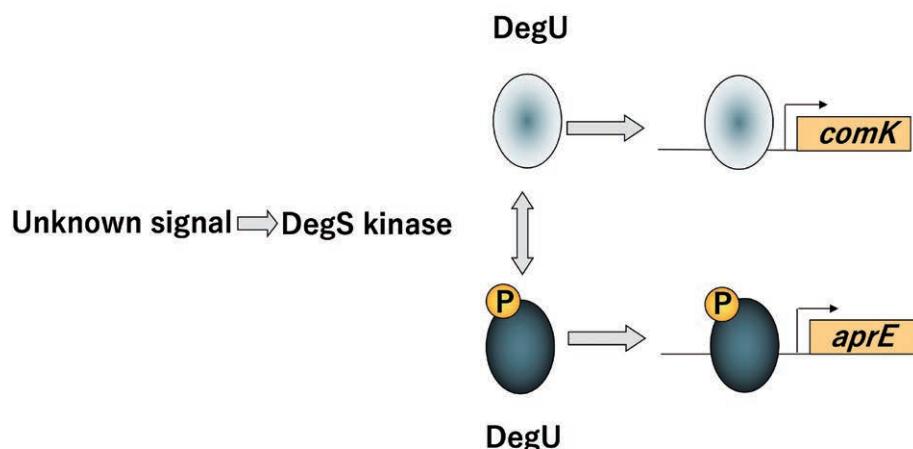


Fig. 2. DegU has different targets in phosphorylated and non-phosphorylated forms. *aprE* and *comK* genes encode alkaline protease and competence transcription factor, respectively.

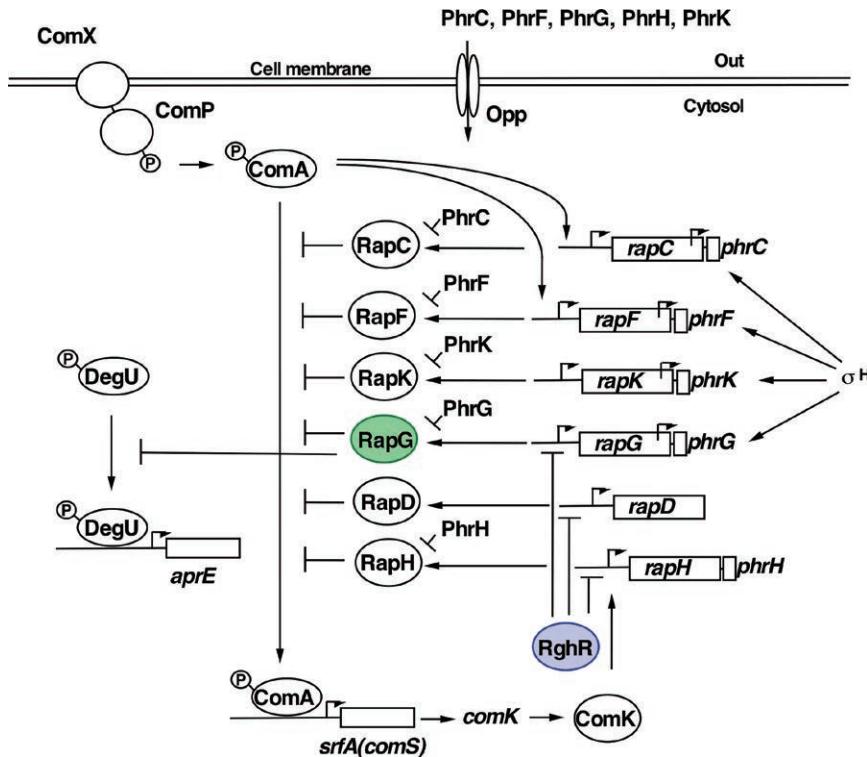


Fig. 3. The competence control system beginning with extracellular regulation of ComA activity. ComA phosphorylation is regulated extracellularly by the ComX pheromone, and the binding of phosphorylated ComA to target genes is regulated by Phr peptides. Specifically, Phr peptides inhibit the function of their cognate Rap proteins, which inhibit ComA, through the binding to Rap proteins. One target gene of phosphorylated ComA is *srfA* (the surfactin synthase operon). The mRNA for *srfA* encodes *comS*, shifted by one translation frame. ComS is essential for activating ComK, the master competence regulator. ComK activates many targets, including the *rapH-phrH* operon. Additionally, RapG also regulates DegU.

シシッピ川やplantationも見たかったし(後述するようにフォークナーがらみで)、彼らの研究室がLouisiana州北部のShreveportにあったのも魅力だった。ただし、1997年秋に現地に到着するとShreveportには日本人が少なく、いきなりアメリカ人ばかりの幼稚園に行くことになった娘は大変だったに違いないが、なんとかうまくやってくれたのはありがたかった。ただし、Maine州出身のPeterはこの土地に馴染めないな、と思っていたようで、その後すぐ彼の憧れの地Oregon州の大学に移動して行った。Peterは日本人の考える典型的なアメリカ人タイプではなく、節度ある態度の人でそれで損をしたこともあったらしいが、筆者はとても好感を持ち、良い関係を作れたと思う。アメリカ微生物学会からの論文審査は断らないし締切も守るので優秀審査員賞を後年学会からもらっていた。研究室ではNakano博士とチームを組んでcompetence制御因子ComSの変異解析を行った。Nakano博士は一時三菱生命研に在籍していて、その意味では筆者や田中先生と縁がある人でもあり、明治薬科大的助手をされていた当時は放線菌を研究されてい

た。筆者も遠くから眺めていた時は、派手な鍔ヒロ帽子をかぶっていたりして目立つ人だなと思っていた。しかし現実に付き合うと、アメリカではやはり大和撫子であり、大変細かいところに気が付く繊細な人で仕事もバリバリ進めるし、物心両面でずいぶんお世話になった。彼女の亡父は仏教美術の研究者で朝日賞をもらったことのある松原さんという人物で、そんな話も色々聞かせていただいた。ちなみに、筆者は渡米後半年ほど経った時に雨の道で後ろから失恋してやけ酒を飲んだドライバーに追突され、全損事故にあったりもして(誰も怪我なしは幸運だった)、事後処理も大変だったし、後席の妻が慎重な性格で子供にシートベルトをさせていて、もしそれがなかったら家族を失くすところだった。その際も色々助けていただいた。さて、当時はComSの分子量が小さくWesternでうまく検出できない点がbottle neckだったが、筆者は外部から来たので難しいという先入観を持っていなかったから、感度が高いというWestern検出kitを複数検討したらなんとかなるだろうと考え、うち一つがうまく行って大変Peterに感謝された。院生のLeeさんとい

北京医科大の出身の女性のデータと合わせてなんとか論文にまでこぎつけた(当時北京医科大の同窓会はNew York開催だったという、みんなアメリカにいるから)(Ogura et al., 1999)。アメリカでは休暇にNew OrleansとYellow Stoneを家族で訪問できて感銘を受けたし、学会でColorado州Rocky Mountain国立公園内のlodgeに、これも家族で宿泊したのも良い思い出である。1998年夏の終わりにlabを去る時のpartyでPeterからMitsuoが来てlab内の会話に文学や映画、音楽の話が出るようになって雰囲気がとても良くなつて嬉しかった、と言われて趣味の小説読み(ブルーストとかフォークナーとか、ちなみにブルーストはウケが良いようだ、アメリカのインテリはフランスに文化的コンプレックスを持っていることが多い)なんて何の役に立つのかと思っていたが、思わぬところで役に立ったようだ。

ゲノム決定の余波

田中先生の生命研時代の共同研究者である板谷光泰博士(のち慶應大教授)が枯草菌の8塩基認識制限酵素によるゲノム地図を作成した(Itaya and Tanaka, 1991)。それを基礎に枯草菌の全ゲノム決定の国際共同研究が1990年代に始まつてはいたが(Harwood and Wipat, 1996)、筆者は直接にはこの計画には参加していなかった。欧州と日本の研究室で担当領域を決めてシーケンスする計画で一つの生命体としては世界初のゲノム決定を目指していくが、shotgun方式のC. Venterによる*Haemophilus influenzae*のゲノム決定に先を越されてしまった(Fleischmann et al., 1995; Kunst et al., 1997)。しかし、その第2期計画が21世紀ミレニアムプロジェクトとして始まった時には、田中先生と筆者も参加した。すなわち、ゲノム決定で見出されたおよそ4100遺伝子のうち1800程度の機能未知のいわゆるY遺伝子の破壊株作成と機能探索である。この過程で筆者もささやかながら、*sodA*や*perR*という過酸化ストレスに対応するための遺伝子が界面活性化抗菌剤Surfactinの生合成遺伝子の転写制御に関わっていることを見出した(Hayashi et al., 2005; Ohsawa et al., 2006)。また、転写因子ScoCの活性調節に働く遺伝子*sala*も見出した(Ogura et al., 2004)。さらに共同研究で作製した1800に及ぶ破壊株の形質転換効率を試験し新たなcompetenceに関わる遺伝子をいくつか見出した(Ogura and Tanaka, 2009; Ogura, 2011)。この探索研究には10年を超える卒業研究で計19名の卒研生諸君の協力を得た。論文著者とはならなかつたが、2009年の

論文謝辞にて名前をあげて感謝の意を記録している。結局この破壊株作成計画は著者99名でPNAS誌に発表され筆者の名もABC順で何番目かに入っている(Kobayashi et al., 2003)。また、全ゲノム決定を受けて可能になったDNAマイクロアレイによる転写因子の全標的決定も福山大の藤田泰太郎教授のグループが技術開発に邁進していた。マイクロアレイには非常に大きな可能性があり、早速DegUの制御遺伝子の全体像解明のため共同研究を開始した。その結果、多くのY遺伝子や鞭毛形成関連遺伝子を含む116遺伝子を検出した(Ogura et al., 2001)。この論文でDegSUと鞭毛の関連性を検出したことが、その後のDegSへのシグナルinput解明につながることは言及しておく価値がある。さらに枯草菌の有するほとんどの機能未知His-Aspリレー系である26種類についても標的解析をマイクロアレイで行った(Kobayashi et al., 2001; Ogura and Tanaka, 2002)。その結果、ごく少数の遺伝子を制御する系と多くの遺伝子を制御するglobalな系の2種類に分かれることが判明した。さらに、機能既知1つと未知の系2つについて、footprint、EMSA、in vivo lacZ解析などによってresponse regulatorの認識塩基配列を明らかにした(Ogura et al., 2007, 2008, 2010)。論文発表当時は機能未知であったが、最近になってpeptidoglycan生合成酵素の遺伝子を制御する系であることが判明したYclJKのような例もある(Roney and Rudner, 2023)。また、ゲノム配列が明らかになると、それ以前の個別解析で判明していたのと同じグループに属する遺伝子群が検出できるようになり、その解析が激しい競争と共に行われた。筆者もその一つであるHis-Aspリレー系の機能をリン酸化の阻害やDNA結合阻害で調節するPhr-Rap系の解析を行つた。5アミノ酸からなるPhr分子が細胞外に放出されて、その濃度が高まると細胞内に再び取り込まれRapタンパク質に結合してHis-Aspリン酸リレー系のRapによる阻害状態を解放するというものである(Gallegos-Monterrosa and Kovács, 2023) (Fig. 3)。筆者はDegUに作用するPhrG-RapGの解析を報告した(Ogura et al., 2003)。また奈良先端大と共同研究でTranscription factorアレイという新手法でrapGの抑制因子RghRも単離した(Hayashi et al., 2006) (Fig. 3)。

更なるDegSUの解析

21世紀に入ると枯草菌研究はゲノム解析と相まってもう一つの大きな転機を迎えた。それまでは実験室菌株を使用していたが、実はこの株は

Surfactinを生産しないし、swarming motilityも示さない。いわば、その昔野外から採取された株がいくつかの変異を蓄積して家畜化されたものであることが意識された(Zeigler et al., 2008)。実際野外株のようなより祖先に近い株は、多くの細菌の自然な life style である biofilm を形成する点が実験室株ともっとも大きく違う点である(**Fig. 4**)。枯草菌の野外株とはほぼ納豆菌であると言っても過言ではない。さて、野外株における biofilm 形成制御の主要な点は、Spo0A が biofilm 形成に必要な遺伝子発現を抑えている SinR の抑制を解除することにあるのを見出したのは R. Losick のグループだった(Vlamakis et al., 2013)。しかし、DegU もその欠損株が biofilm 形成できないことから、biofilm 形成に重要な役割を果たしていることが小林和夫博士(奈良先端大)によって見出された(Kobayashi and Iwano, 2012) (**Fig. 4**)。Biofilm matrix の構成材料の一つ BslA タンパク質の直接の活性化因子が DegU であるからだ。さらにある種の野外株の性質である poly-gamma-glutamic acid 生産も(この物質は納豆の粘り成分である)直接の制御因子として DegU を要求する、ただし、この際 SwrA と以前から知っていた DegU の補助因子 DegQ が必要である(Stanley and Lazazzera, 2005; Do et al., 2011) (**Fig. 5**)。DegQ は ComA の制御下にもあるので複数の His-Asp リン酸リレー系が複雑に関係していることがわかる(Msadek et al., 1991)。また、

swarming motility には *fla/che* operon の強い発現が必要だが、その際やはり SwrA/DegU が必要である(Patrick and Kearns, 2009)。筆者は SwrA が DegU とタンパク相互作用して複合体を形成することを酵母 two-hybrid システムを使って初めて示した(Ogura and Tsukahara, 2012)。このように DegSU の重要性が高まるにつれ DegS リン酸化を促すシグナル本体の解明が求められた。多くの His-Asp リレー系のセンサーが膜タンパク質であるのに対して、DegS は細胞内に存在するが、そのシグナルが何であるかは長く不明であった。筆者は DegSU 解析を進めいくつかの重要な性質を明らかにした。標的である *aprE*, *sacB*, *pgsB*, *fla/che*, *degU* の標的塩基配列を解明し、その認識配列があまり厳密ではないことを示した(Shimane and Ogura, 2004; Tsukahara and Ogura, 2008; Ohsawa et al., 2009; Ogura and Tsukahara, 2010)。さらに、DegU の DNA 結合部位である Helix -Turn-Helix 部分のアミノ酸に Alascanning 変異をかけて、DNA 結合にはどのアミノ酸が必要か解明した(Shimane and Ogura, 2004)。また、DegU がリン酸化されると細胞内タンパク分解酵素 ClpCP で分解されていることも示した。これはその後のゲノムワイドな ClpCP で分解される標的タンパク質リスト解明でも再現された(Ogura and Tsukahara, 2010; Schmedt et al., 2014) (**Fig. 6**)。*degU* のプロモーターは炭素代謝の中心的制御因子 CcpA の直接の支配下にあること、また SinR にも制

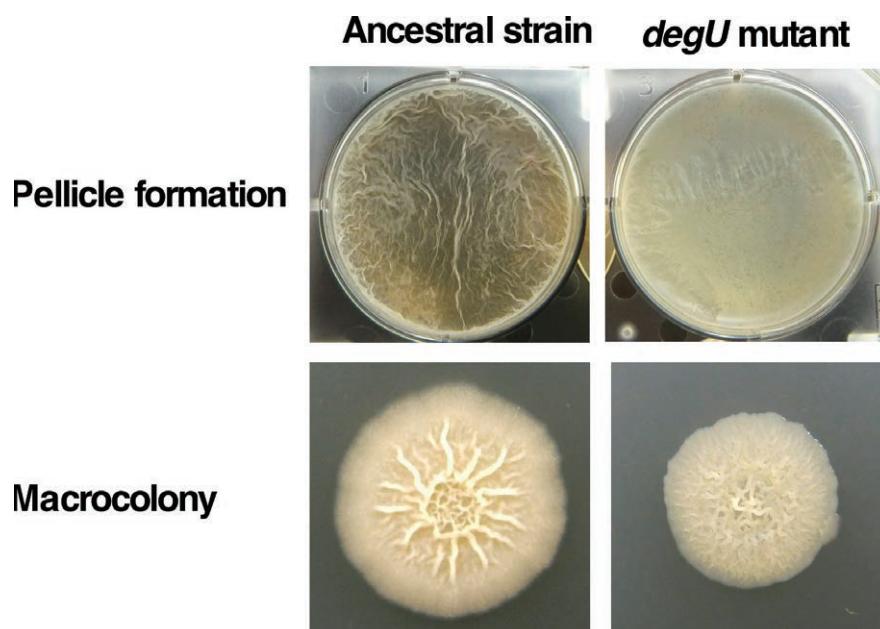


Fig. 4. Two types of biofilm formation. Pellicle formation can be observed in static liquid culture. The photograph shows the surface of the culture viewed from above. Wrinkles are visible in the wild-type strain but not in the *degU* strain. Macrocolony formation was performed on agar plates. The wild-type strain exhibits a characteristic wrinkled morphology.

御されていることを示した(Ishii et al., 2013; Ogura et al., 2014) (Fig. 6)。しかし、筆者の解析ではシグナル本体は解明できず、その解明はN. Stanley-Wallによりもたらされた。すなわち、枯草菌の存在する環境中の粘性が高まり鞭毛の回転が物理的に抑制されるとDegUがリン酸化されるというものだ(Cairns et al., 2013)。このケースでは、浮遊状態の細胞が固体表面に定着してbiofilm形成に至る引き金がDegUであるかもというシナリオとよく一致する。この知見は微妙に訂正されてその後他グループからも追認された(Diethmaier et al., 2017)。この時点では筆者は、DegU以外の新たな中期的な研究対象を模索することになった。細かい分子機序の解明はまだであるし、そのほかのシグナルが存在する可能性もあるとはいえる、長年の疑問が解明されてしまったのである。当時、筆者は*degS*プロモーターがグルコースで誘導されることと、Peter Zuberの発見した多くの細菌で働いているSpxという転写制御因子が*degS*のグルコース誘導に必要であることを報告していた(Zuber, 2009; Shiwa et al., 2015; Schafer and Turgay, 2019)。そして*spx*自身はECFシグマである*sigX*や*sigM*で転写されていることがわかっていた(Rojas-Tapias and Helmann, 2018)。そして、*sigX*と*sigM*がCcpA非依存的にグルコース誘導(GI)を受けるという興味深い現象を見出し、その探究を始めることにした。グルコースという多くの生理作用を持つ重要成分による転写制御は、

一旦は1990年代の藤田泰太郎とDeutscherによるCcpAのグルコース活性化機構の発見で整理されたようだったが(Fujita et al., 1995)、この時期になってそれだけでは説明がつかない現象が多くなってきた(Charbonnier et al., 2017)。これからの中長期的目標がここにあると思えた。

グルコース誘導!

話は2015年くらいまで進んだが、この間、実は筆者の研究環境にはいくつかの変化が起きていた。経緯は省かせていただくが、2006年度から学部教育を離れて海洋研究所に移動することになった。教育義務がだいぶ減って実験できる時間はその分増えたが、それまでと違って卒研学生や大学院生の皆さんを受け入れて研究していくスタイルはとれなくなってしまった。それまでの論文には院生の名前が入っているけれど、彼らの残したデータも尽きてきた頃からは、数名の学外の共同研究者との連名や時には単名の論文も出してきた。要はPIであり研究費を稼いでいて尚且つ、自らがPDとして研究するような状態である。そういう状態で果たして成果を出せるか不安だったが、結局その後何とか持続できたのは幸運だった。また、長年の共同研究者であった田中先生も2008年度で定年退職されてますます一人感は強くなった。さて、*sigX*のGIである。*sigX*制御はアンチシグマX因子による制御が知られているだ

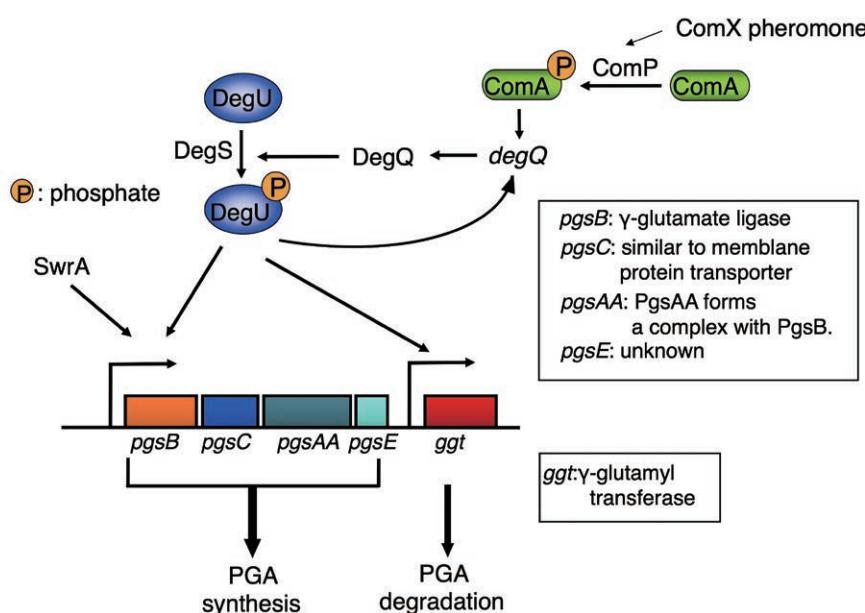


Fig. 5. Control of PGA Synthesis. Poly-gamma-glutamic acid (PGA) synthesis genes are directly regulated by DegU and indirectly regulated by ComA via DegQ. Furthermore, DegU also regulates PGA degradation enzyme genes. Binding of phosphorylated DegU to the PGA synthesis gene promoter requires SwrA.

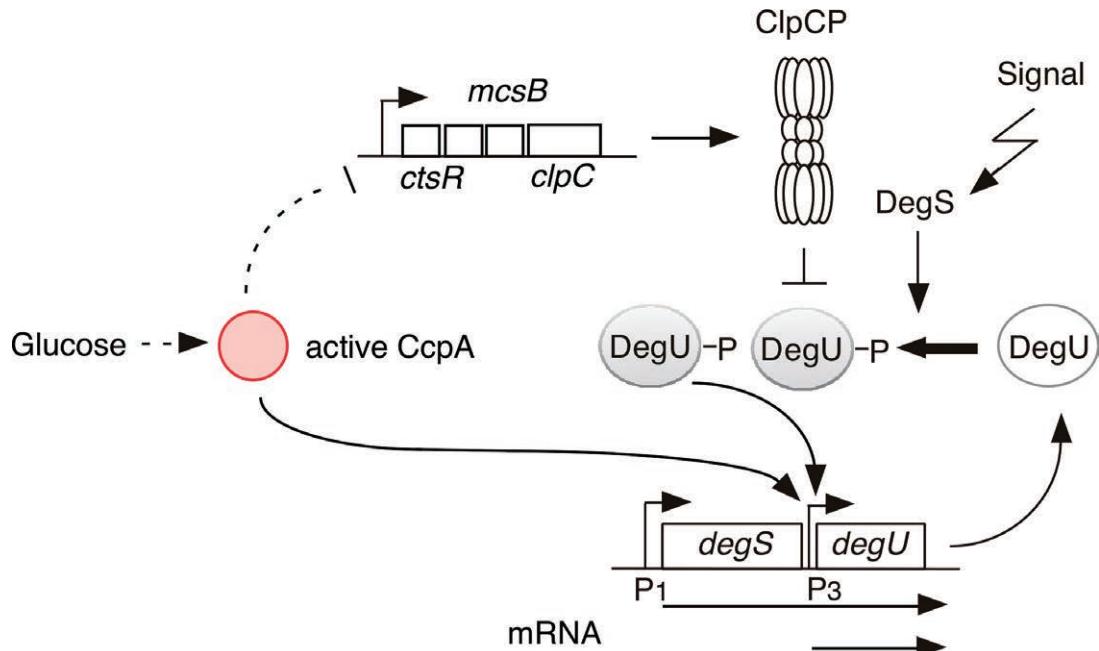


Fig. 6. The *degU* gene regulatory system. The *degU* promoter is glucose-inducible through direct binding by CcpA. Additionally, *degU* undergoes feedback regulation where DegU binds to its own promoter to activate it; this circuit is finely tuned by DegU degradation via the protease ClpCP. Furthermore, the *clpCP* gene itself is also regulated by CcpA.

けでグルコース誘導はそれとは関係ないことはすでに押さえてある。おそらくグルコースがあるとアセチルCoAが増えてRNAポリメラーゼのアセチル化が起きて、そのためRNAポリメラーゼのシグマ選好性が変化するのだろうと当たりをつけた。このアイデアは東農大教授の朝井計博士との議論で出てきた。*sigX-lacZ*株にトランスポゾンを入れて誘発条件に置きXgalとグルコース入りの寒天培地にとにかくコロニーを撒き、あとは周りのコロニーに比べて白いコロニーを選ぶだけである。2015年の夏には毎日この実験をして20000コロニー以上を調べた。液体培養での再現性を確かめたあと、トランスポゾン挿入位置を決定してGIに必要な遺伝子を確かめて20くらいの遺伝子を同定した。まず*cshA*という遺伝子が取れたが、この分子がアセチル化される事はすでに示されていたし、RNAポリメラーゼに緩く結合する事も知られていた(Delumeau et al., 2011; Kosono, et al, 2015)。この分子のアセチル化部位であるリジン残基にアセチル化をmimicする変異やアセチル化できない変異を入れると*sigX*のGIが予想通りに変化するのでGIの機構に確信を得た(Ogura and Asai, 2016)。さらに機能未知だが何度も取れてくる*ylyR*遺伝子に注目した。かなり多くの細菌に保存されている重要らしい遺伝子である。どうもDNA/RNAに結合する構造を持つらしく、この遺伝子破壊株のRNA-seq解析を行ってみると400以上の代謝酵素遺伝子などの発現が変化する。こ

の知見は、今解析中のGIシステムの傘下にこれら遺伝子群が位置する事を示していた。しかし、大腸菌で生産し精製してDNA結合性を見るとどうも認識特異性には乏しいようで、その他の性質からいわゆる Nucleotide-associated protein ではないかと考えた(Ogura and Kanesaki, 2018)。この頃になるともうDNAマイクロアレイは検出力がRNA-seqに比べて弱いため廃れつつあった。また、*ylyR*支配下には*tsaD*という遺伝子があり、この遺伝子産物はtRNAのアデニン残基のthreonyl-carbamoyl化を行う(Thiaville et al., 2015)。この修飾は全生物で共通に存在し、枯草菌ではピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体PDHなどのタンパク質翻訳を正常に行うために必要である。さらに*ylyR*遺伝子の発現に必要な遺伝子をトランスポゾン挿入で検索すると、*ywlE*遺伝子が取ってきた。この遺伝子もGIを受けていた。YwlEタンパク質はタンパク質のArg残基に結合したリン酸基を解離させ、さらにArgリン酸はClpCPプロテアーゼによるタンパク分解の目印である(Mijakovic et al., 2016)。反対方向の反応であるArgリン酸化はMcsBという酵素で行われるが、この酵素遺伝子は*clpC*とオペロンを成していてグルコースで転写が抑制される(Ishii et al., 2013)(Fig. 6)。つまりYwlEはタンパク質を分解から守る役目を持つ。実際グルコースからアセチルCoAを作る酵素複合体PDHタンパク質とTsaDタンパク質はMcsB/YwlE/ClpCPシステムの支配下にあ

ることを示した(Ogura, 2020)。以上の結果から考えたモデルをFig. 7に示す。

グルコース誘導II

*ywlE*遺伝子もGIを受けていたので、そのメカニズムに興味を持ち更なるトランスポゾン挿入での解明を試みたが、どうも挿入位置決定がうまくいかず、この路線は諦めた。この遺伝子上流にはマンガンイオン(Mn)取り込みに関係するかもしれないと言われていた遺伝子があった。そこで、Mnの細胞内濃度が*ywlE*遺伝子発現に関係するのではないだろうかと予想し、既知のMn取り込み輸送体遺伝子の発現を増大させてみたところMn濃度の上昇と同時に*ywlE*遺伝子発現が増大した。グルコース存在下でのMn細胞内濃度を測定したところ、やはり有意に増大していた。するとグルコースがMn取り込みもしくは排出の輸送体遺伝子発現を調整しMn細胞内濃度を上昇させ*ywlE*遺伝子を誘導するというシナリオが成り立つ(Ogura et al., 2023)。ま

た、アルギニン代謝制御転写因子AhrCの遺伝子発現がCcpA非依存的にGIを受けるという知見があった(Heidrich et al., 2006)。これにヒントを得てAhrCのMn取り込み・排出の輸送体遺伝子発現への影響をみたところ有意性が認められ、さらにプロモーターへのAhrC結合も観察したので、AhrCもMn細胞内濃度・*ywlE*遺伝子発現を制御していることが判明した。AhrCとMntR(Mn輸送体遺伝子発現の制御因子, Que and Helmann, 2006)のRNA-seq解析を行い、新規のMn取り込みと排出輸送体YcsGとYknUVを見出した。このシステムの全体像をFig. 8に示した。この際、*ycsG*の制御転写因子として知られるKipRがMnに反応する可能性を見出し(Wang et al., 1997)、2025年開始の科研費採択課題の中心テーマとして申請した、定年後にはなるが今後の研究はここをメインにする予定である。またMntR結合を解析する過程で、この分野の権威であるJ.D. Helmannの言うMntR認識塩基配列は直接的根拠が乏しく筆者の解析とは少々異なることが判明した。ちなみにこの論文の最初の投稿雑誌の審査

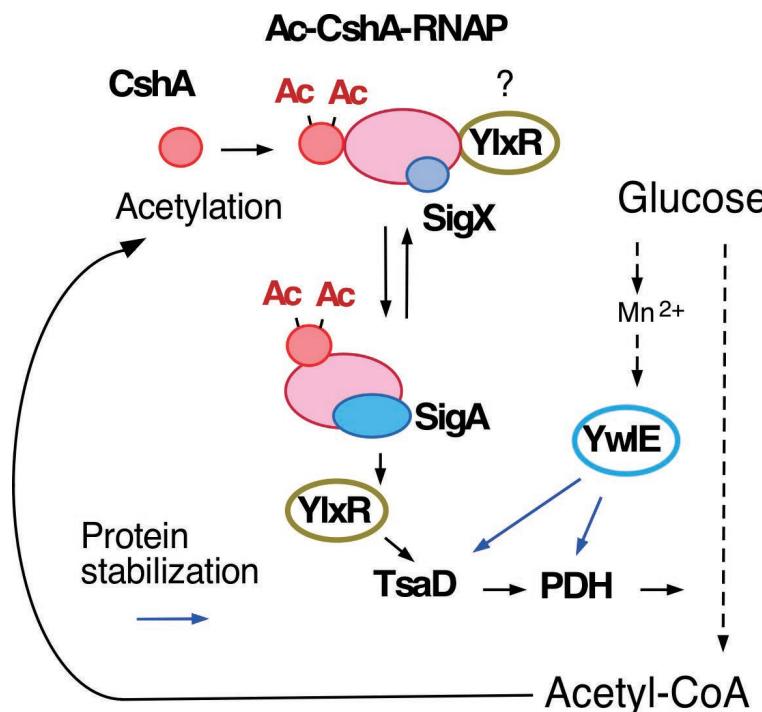


Fig. 7. Schemes of glucose-response and feedback regulation including *ylxR*. Arrows and T-bars indicate activation and inhibition, respectively. The dotted line represents the multi-step reaction. An association of CshA with RNAP and glucose-stimulated CshA acetylation have been observed. CshA-dependent PylxS regulation drives *YlxR* expression and *YlxR* regulates the transcription of *tsaEBD* through its binding to the promoter of *tsaEBD*. The *tsaEBD* products are assembled into tRNA modification enzyme that regulates the translation of pyruvate dehydrogenase (PDH). Pyruvate dehydrogenase provides acetyl-CoA, an acetyl moiety source for CshA acetylation. Acetylated RNAP may alter its affinity for SigX and SigM. Recently, in cyanobacteria, *YlxR*-binding to RNAP was reported, which may cause a change in the affinity of RNAP to a specific sigma factor. Glucose enhances cellular manganese concentrations, resulting in stimulation of expression of *ywlE*. *ywlE* encodes a protein arginine phosphatase that protects PDH and TsaD from ClpCP-dependent protein degradation.

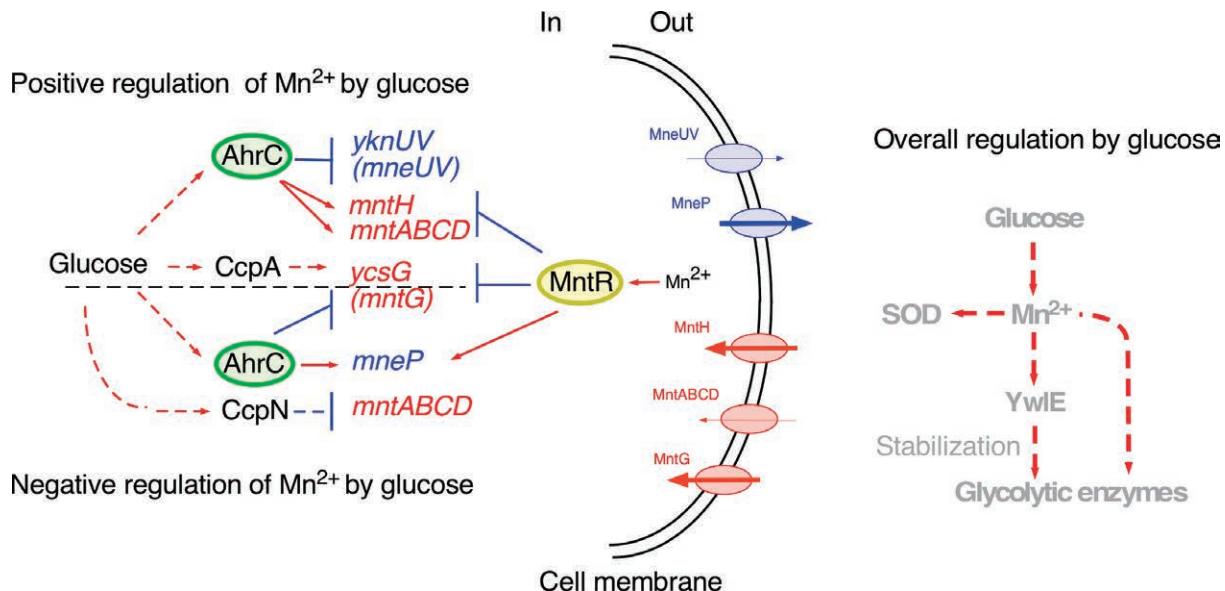


Fig. 8. Schematic representation of glucose-mediated regulation of Mn^{2+} transport. Left. T-bar and arrow indicate inhibition and activation of gene expression, respectively. Dotted arrow and T-bar indicate indirect effects. Proteins in red and blue represent Mn^{2+} importer and exporter, respectively. The arrow width in the transporter indicates putative overall effects of glucose on transporter genes expression. Direction of arrows indicates ion influx or efflux. Right. Overall glucose-mediated effects of upshift of cellular Mn^{2+} equilibrium is shown. YwlE is a protein arginine phosphatase, which counteracts the arginine phosphorylation of proteins by McsB kinase, leading to protection of the protein from degradation including glycolytic enzymes. Glucose addition results in upshift of central carbon flow including glycolysis, TCA cycle, and respiratory chain, leading to generation of toxic reactive oxygen species (ROS). Addition of glucose will increase the demand for superoxide dismutase (SOD).

過程で審査員としておそらく彼が登場してきたため、そこでの掲載を諦め現在の雑誌に投稿し直した経過がある。この場合審査1ヶ月ですぐに掲載可となった。権威ある人の言うことに間違いがあつてもそれをうまくやり過ごすのが処世術だとは理解しているが、筆者の性格上そもそもできず周り道をしてしまうことが多い。*MntR*が直接結合する遺伝子をいくつか見つけたので、今後それらのプロモーターへの*MntR*結合部位を明らかにしてより説得力を任せたいと考えている。

DnaJK シャペロンとYlxR

筆者は、YlxRの非特異的なDNA結合を観察し、いわゆる Nucleoide-associated protein としてYlxRが遺伝子発現を制御する事を想定していた。言い換えれば、YlxRは塩基配列特異的なDNA結合による転写制御因子ではない。このアイデアは、藍藻ではYlxRはRNAポリメラーゼ(RNAP)やSigma Aと相互作用することからも支持されると思われる(Hemm et al., 2024)。2024年にゲッチンゲン大学のグループがYlxRはRNA分解酵素RNase P(タンパク質RnpAとRNA成分RnpBからなるリボザイム)に特異的に結合しその酵素活性を調節していると報告しRnpMと再命名した(Wicke et al., 2024)。

RNase PはtRNA 5'末端の成熟化酵素だが、近年 mRNA代謝への関与が提唱されている(Mohanty and Kushner, 2022)。そこで、YlxRの遺伝子発現制御メカニズムにRNase Pが関係しているかどうかを調べることにした。YlxRが制御する *proB-lacZ* 株でその発現が減少するトランスポゾン株を取って調べると、*ylxR*とともに *dnaK*, *dnaJ* 遺伝子破壊株が取ってきた。さらに種々の遺伝学的解析を行いモデルを構築した(Fig. 9)。ここで思い起こせば筆者の最初の枯草菌論文は *proB* に関するものであった。このモデルでは、タンパク質の立体構造保持に働くシャペロンDnaJK複合体がYlxRを通じて RNase P複合体の酵素活性を調節している事が示唆された。さらに *dnaJ*, *ylxR*, *rnpB* の RNA-seq 解析により、同様の転写後制御を受けていると思われる遺伝子を同定した。DnaJKが働き新生ペプチド鎖がうまく折りたたまれていると、RNase P活性を抑えるので翻訳進行中のmRNAは分解されない(Ogura et al., 2025)。しかし、何かの不具合でDnaJKが働くと不良タンパク質ができるとRNase Pは活性化し mRNA 分解が進み、細胞は無駄な仕事を行うエネルギーを節約できる。このようなメカニズムは今まで報告されておらず、他の生物でも同様なメカニズムが存在するのかもしれない。

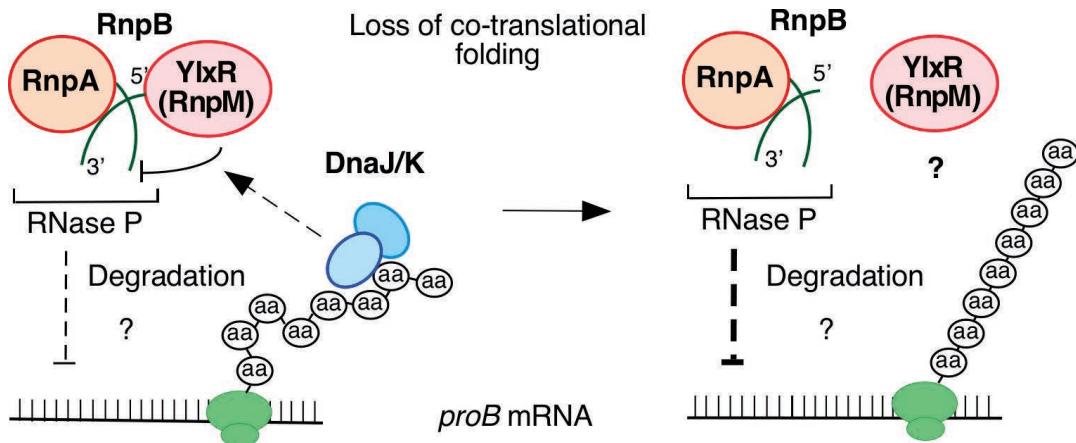


Fig. 9. Schematic model for linkage of DnaJ/K and RNase P/YlxR(RnpM). Arrows and T-bars indicate activation and inhibition, respectively. Dotted arrow and T-bar indicate effects that are based on circumstantial evidence. Green ovals show ribosome sub-units. Association of YlxR(RnpM) with RnpB and inhibition of RNase P by YlxR(RnpM) are reported. As to mRNA degradation by RNase P neither its denial nor affirmation is in direct evidence.

EF-P と GI

まとめにあたって現在投稿中の研究を紹介したい。*sigX*のGIを阻害する破壊株として*efp*変異が同定されていたが、GI阻害は中程度であったし、最初の解析でYlxRやCshAを含む制御回路とは独立であると予想された。Western解析で、*efp*変異体ではRNAPサブユニットRpoBおよびRpoCの、さらにはSigAの減少が明らかになった。これに対して*ylxR*変異体ではそのような現象は観察されなかった。すなわち、*efp*変異体では、RNAPとSigAが減少したせいで、RNAPコアをめぐる各シグマ因子の競争状態が変化し、そのためSigXのGIも変化していると予想された。伸長因子P(EF-P)は全生物において保存されており、翻訳中タンパク質のXPPXモチーフでのリボソーム停止を緩和する機能を持っている。祖先株NCIB3610については、ゲノムワイドなりボソーム停滞アトラスがRibo-seqにより作成されている(Hummels and Kearns, 2019)。しかし、リボソーム停滞が必ずしも細胞中のタンパク質レベルを低下させるわけではないとの報告もある(Peil et al., 2013)。*efp*変異体におけるタンパク質レベルの変化を明らかにするため、実験室株ベースの*efp*変異体についてiTRAQプロテオミクス解析を実施した。翻訳への影響を評価するには、mRNA分子あたりのタンパク質量を決定する必要があるから、RNA-seq実験も行った。iTRAQ解析で検出された2187タンパク質の中から、XPPXモチーフを含む84タンパク質が同定され、これらはEF-Pに依存して翻訳されることが判明した。*efp*株で量が減少したタンパク質には、主要シグマ因子SigA、鞭毛リング構成成分FliY、鞭毛モータータンパク質MotB、

チオレドキシンTrxA、マンガン輸送体MntGが含まれていた。FliYとMotBの減少は運動性欠損を引き起こし、TrxAの減少は耐熱性の喪失をもたらした。さらに、MntGの減少は低温下での成長に必要なマンガンの要求量を変化させた。以上の解析で *B. subtilis* 細胞機能におけるEF-Pの多面的な役割を明らかにし、トランスクリプトームとプロテオーム間の複雑な相互作用に光を当てた。この研究で初めて個別遺伝子とその転写因子の相互作用から始まった筆者の転写制御研究が、翻訳過程も包含しながら、細胞の全体像レベルにまで拡張されたと思う。プロテオーム解析も21世紀当初は2次元電気泳動でのspotをエドマンシーケンスで解析する手法でせいぜい数百のタンパク質しか同定できなかった。まだまだ、細胞機能そのものを遺伝子やタンパク質の挙動から全的に理解することは単細胞生物においてすら不可能ではあるが、その展望は開けてきている。題名のオーケストレーションとはそのような期待を込めて使ってみた言葉であるが、もっと単純にシステム生物学といった方が良いのかもしれない。

最後に

筆者の遺伝学研究は野外から分離した放線菌から始まったから、世界で自分一人だけがその菌株を扱っているわけで孤独だった。枯草菌研究の世界では研究コミュニティが機能していて、どんどん研究が進むと言う感覚が常にあった。日本や世界の研究者の最新論文に接して興奮させられる瞬間が幾度もあった。また、筆者の研究は他大学の共同研究者の助力なしにはなし得なかった、多岐に渡るから一々のお名前は省略するが、厚く御礼申し上げたい。ま

た、1994年から2007年の間、筆者の指導で研究に勤しんでくれた以下の大学院生、大城康弘、平尾重晴、橋本仁志、松澤充史、嶋根加奈、大沢拓、林健太郎、塚原健介、の諸君にもここで感謝の意を記しておきたい。

References

- Banse, A.V., E.C. Hobbs, and R. Losick. (2011) Phosphorylation of Spo0A by the histidine kinase KinD requires the lipoprotein *med* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 193, 3949-3955.
- Berka, R.M., J. Hahn, M. Albano, I. Draskovic, M. Persuh, X. Cui, A. Sloma, W. Widner, and D. Dubnau. (2002) Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK. *Mol Microbiol*, 43, 1331-1345.
- Cairns, L.S., V.L. Marlow, E. Bissett, A. Ostrowski, and N.R. Stanley-Wall. (2013) A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 90, 6-21.
- Charbonnier, T., D. Le Coq, S. McGovern, M. Calabre, O. Delumeau, S. Aymerich, and M. Jules. (2017) Molecular and physiological logics of the pyruvate-induced response of a novel transporter in *Bacillus subtilis*. *mBio*, 8, e00976-17.
- Delumeau, O., F. Lecointe, J. Muntel, A. Guillot, E. Guédon, V. Monnet, M. Hecker, D. Becher, P. Polard, and P. Noirot. (2011) The dynamic protein partnership of RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *Proteomics*, 11, 2992-3001.
- Diethmaier, C., R. Chawla, A. Canzoneri, D.B. Kearns, P.P. Lele, and D. Dubnau. (2017) Viscous drag on the flagellum activates *Bacillus subtilis* entry into the K-state. *Mol Microbiol*, 106, 367-380.
- Do, T.H., Y. Suzuki, N. Abe, J. Kaneko, Y. Itoh, and K. Kimura. (2011) Mutations suppressing the loss of DegQ function in *Bacillus subtilis* (natto) poly-gamma-glutamate synthesis. *Appl Environ Microbiol*, 77, 8249-858.
- Fleischmann, R.D., M.D. Adams, O. White, et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269, 496-512.
- Fujita, Y., Y. Miwa, A. Galinier, and J. Deutscher. (1995) Specific recognition of the *Bacillus subtilis* *gnt* cis-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol Microbiol*, 17, 953-960.
- Gallegos-Monterrosa, R., and A.T. Kovács. (2023) Phenotypic plasticity: The role of a phosphatase family Rap in the genetic regulation of *Bacilli*. *Mol Microbiol*, 120, 20-31.
- Hamoen, L.W., A.F. Van Werkhoven, G. Venema, and D. Dubnau. (2000) The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 9246-9251.
- Hamoen, L.W., G. Venema, O.P. Kuipers. (2003) Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, 149, 9-17.
- Harwood, C.R., and A. Wipat. (1996) Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Lett*, 389, 84-87.
- Hayashi, K., T. Ohsawa, K. Kobayashi, N. Ogasawara, and M. Ogura. (2005) The H₂O₂ stress-responsive regulator PerR positively regulates *srfA* expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 187, 6659-6667.
- Hayashi, K., T. Kensuke, K. Kobayashi, N. Ogasawara, and M. Ogura. (2006) *Bacillus subtilis* RghR (YvaN) represses *rapG* and *rapH*, which encode inhibitors of expression of the *srfA* operon. *Mol Microbiol*, 59, 1714-1729.
- Heidrich, N., A. Chinali, U. Gerth, and S. Brantl. (2006) The small untranslated RNA SR1 from the *Bacillus subtilis* genome is involved in the regulation of arginine catabolism. *Mol Microbiol*, 62, 520-536.
- Hemm, L., A. Miucci, M. Riediger, S. Tholen, A. Kraus, J. Georg, O. Schilling, and W.R. Hess. (2024) Interactors and effects of overexpressing YlxR/RpnM, a conserved RNA binding protein in *cyanobacteria*. *RNA Biol*, 21, 1308-1326.
- Hummels, K.R., and D.B. Kearns. (2019) Suppressor mutations in ribosomal proteins and FliY restore *Bacillus subtilis* swarming motility in the absence of EF-P. *PLoS Genet*, 15, e1008179.
- Ishii, H., T. Tanaka, and M. Ogura. (2013)

- The *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is positively regulated by CcpA and by catabolite-repressed synthesis of ClpC. *J Bacteriol*, 195, 193-201.
- Isogai, A., S. Sakuda, S. Matsumoto, M. Ogura, K. Furihata, H. Seto, and A. Suzuki. (1984) The structure of leucanicidin, a novel insecticidal macroride produced by *Streptomyces halstedii*. *Agric Biol Chem*, 48, 1379-1381.
- Itaya, M., and T. Tanaka. (1991) Complete physical map of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome constructed by a gene-directed mutagenesis method. *J Mol Biol*, 220, 631-648.
- Kobayashi, K., M. Ogura, H. Yamaguchi, K. Yoshida, N. Ogasawara, T. Tanaka, and Y. Fujita. (2001) Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *J Bacteriol*, 183, 7365-7370.
- Kobayashi, K., et al. (Ogura M, 46th author in the total 99 authors). (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 4678-4683.
- Kobayashi, K., and M. Iwano. (2012) BslA (YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol Microbiol*, 85, 51-66.
- Kosono, S., M. Tamura, S. Suzuki, Y. Kawamura, A. Yoshida, M. Nishiyama, and M. Yoshida. (2015) Changes in the acetylome and succinylome of *Bacillus subtilis* in response to carbon source. *PLoS One*, 10, e0131169.
- Kovacs, A.T. (2019) *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiol, 27, 724-725.
- Kunst, F., M. Debarbouille, T. Msadek, M. Young, C. Mauel, D. Karamata, A. Klierw, G. Rapoport, and R. Dedonder. (1988) Deduced polypeptides encoded by the *Bacillus subtilis* *sacU* locus share homology with two-component sensor-regulator systems. *J. Bacteriol*, 170, 5093-5101.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, et al., (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256.
- Mijakovic, I., C. Grangeasse, and K. Turgay. (2016) Exploring the diversity of protein modifications: Special bacterial phosphorylation systems. *FEMS Microbiol Rev*, 40, 398-417.
- Mohanty, B.K., and S.R. Kushner. (2022) Inactivation of RNase P in *Escherichia coli* significantly changes post-transcriptional RNA metabolism. *Mol Microbiol*, 117, 121-142.
- Msadek, T., F. Kunst, A. Klier, and G. Rapoport. (1991) DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. *J Bacteriol*, 173, 2366-7237.
- Mukai, K., M. Kawata-Mukai, and T. Tanaka. (1992) Stabilization of phosphorylated *Bacillus subtilis* DegU by DegR. *J Bacteriol*, 174, 7954-7962.
- Ogura, M., H. Nakayama, K. Furihata, A. Shimazu, H. Seto and N. Otake. (1985) Structure of a new antibiotic curromycin A produced by a genetically modified strain of *Streptomyces hygroscopicus*, a polyether antibiotic producing organism. *J Antibiotics*, 38, 669-673.
- Ogura, M., T. Tanaka, K. Furihata, A. Shimazu, and N. Otake. (1986) Induction of antibiotic production with ethidium bromide in *Streptomyces hygroscopicus*. *J Antibiotics*, 39, 1443-1449.
- Ogura, M., T. Tanaka, H. Seto, and N. Otake. (1990) Molecular cloning and characterization of the gene conferring curromycin resistance on a curromycin non-producing mutant derived from *Streptomyces hygroscopicus* 358AV2. *J Antibiotics*, 43, 873-882.
- Ogura, M., T. Takatori, and T. Tsuruo. (1992) Purification and characterization of NF-R1 that regulates the expression of the human multidrug resistance (MDR1) gene. *Nucleic Acids Res*, 20, 5811-5817.
- Ogura, M., M. Kawata-Mukai, M. Itaya, K. Takio, and T. Tanaka. (1994) Multiple copies of the *proB* gene enhance *degS*- dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 176, 5673-5680.
- Ogura, M., and T. Tanaka. (1996) Transcription of *Bacillus subtilis degR* is sigmaD dependent and suppressed by multicopy *proB* through sigmaD. *J Bacteriol*, 178, 216-222.
- Ogura, M., Y. Ohshiro, S. Hirao, and T. Tanaka. (1997) A new *Bacillus subtilis* gene, *med*, encodes a positive regulator of *comK*. *J Bacteriol*, 179, 6244-6253.
- Ogura, M., L. Liu, M. LaCelle, M.M. Nakano,

- and P. Zuber. (1999) Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 32, 799-812.
- Ogura, M., H. Yamaguchi, H. K. Yoshida, Y. Fujita, and T. Tanaka. (2001) DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. Nucleic Acids Res, 29, 3804-3813.
- Ogura, M., and T. Tanaka. (2002) Recent progress in *Bacillus subtilis* two-component regulation. Front Biosci, 7, d1815-11824.
- Ogura, M., H. Hashimoto, and T. Tanaka. (2002a) Med, a cell-surface localized protein regulating competence transcription factor gene, *comK*, in *Bacillus subtilis*. Biosci Biotech Biochem, 66, 892-896.
- Ogura, M., H. Yamaguchi, K. Kobayashi, N. Ogasawara, Y. Fujita, and T. Tanaka. (2002b) J Bacteriol, 184, 2344-2351.
- Ogura, M., K. Shimane, K. Asai, N. Ogasawara, and T. Tanaka. (2003) Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 49, 1685-1697.
- Ogura, M., A. Matsuzawa, H. Yoshikawa, and T. Tanaka. (2004) *Bacillus subtilis* SalA (YbaL) negatively regulates expression of *scoC*, which encodes the repressor for the alkaline exoprotease gene, *aprE*. J Bacteriol, 186, 3056-3064.
- Ogura, M., K. Tsukahara, K. Hayashi, and T. Tanaka. (2007) The *Bacillus subtilis* NatK-NatR two-component system regulates expression of the *natAB* operon encoding an ABC transporter for sodium ion extrusion. Microbiology, 153, 667-675.
- Ogura, M., T. Ohsawa, and T. Tanaka. (2008) Identification of the sequences recognized by the *Bacillus subtilis* response regulator YrkP. Biosci Biotech Biochem, 72, 186-196.
- Ogura, M., and T. Tanaka. (2009) The *Bacillus subtilis* late competence operon *comE* is transcriptionally regulated by *yutB* and under post-transcription initiation control by *comN* (*yrzD*). J Bacteriol, 91, 949-958.
- Ogura, M., K. Tsukahara, and T. Tanaka. (2010) Identification of the sequences recognized by the *Bacillus subtilis* response regulator YclJ. Arch Microbiol, 192, 569-580.
- Ogura, M., and K. Tsukahara. (2010) Autoregulation of the *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is coupled with the proteolysis of DegU-P by ClpCP. Mol Microbiol, 75, 1244-1259.
- Ogura, M. (2011) ZnuABC and ZosA zinc transporters are differently involved in competence development in *Bacillus subtilis*. J Biochem, 150, 615-625.
- Ogura, M., and K. Tsukahara. (2012) SwrA regulates assembly of *Bacillus subtilis* DegU via its interaction with N-terminal domain of DegU. J Biochem, 151, 643-655.
- Ogura, M., H. Yoshikawa, and T. Chibazakura. (2014) Regulation of the response regulator gene *degU* through the binding of SinR/SlrR and exclusion of SinR/SlrR by DegU in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 196, 873-881.
- Ogura, M., and K. Asai. (2016) Glucose induces ECF sigma factor genes, *sigX* and *sigM*, independent of cognate anti-sigma factors through acetylation of CshA in *Bacillus subtilis*. Front Microbiol, 7, 918.
- Ogura, M., and Y. Kanesaki. (2018) Newly identified nucleoid-associated-like protein YlxR regulates metabolic gene expression in *Bacillus subtilis*. mSphere, 3, e000501-18.
- Ogura, M. (2020) Glucose-mediated protein arginine phosphorylation/dephosphorylation regulates *ylxR* encoding nucleoid-associated protein and cell growth in *Bacillus subtilis*. Front Microbiol, 11, 2382.
- Ogura, M., M. Matsutani, K. Asai, and M. Suzuki. (2023) Glucose controls manganese homeostasis through transcription factors regulating known and newly identified manganese transporter genes in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem, 299, 105069.
- Ogura, M., Y. Kanesaki, H. Yoshikawa, and K. Haga. (2025) The DnaJK chaperone of *Bacillus subtilis* post-transcriptionally regulates gene expression through the YlxR(RnpM)/RNase P complex. mBio, 16, e0405324.
- Ohsawa, T., K. Tsukahara, T. Sato, and M. Ogura.

- (2006) Superoxide stress decreases expression of *srfA* through inhibition of transcription of the *comQXP* quorum-sensing locus in *Bacillus subtilis*. J Biochem, 139, 203-211.
- Ohsawa, T., K. Tsukahara, K, and M. Ogura. (2009) *Bacillus subtilis* response regulator DegU is a direct activator of *pgsB* transcription involved in gamma-poly-glutamic acid synthesis. Biosci Biotech Biochem, 73, 2096-2102.
- Patrick, J.E., and D.B. Kearns. (2009) Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. J Bacteriol, 191, 7129-7133.
- Peil, L., A.L. Starosta, J. Lassak, et al. (2013) Distinct XPPX sequence motifs induce ribosome stalling, which is rescued by the translation elongation factor EF-P. Proc Natl Acad Sci USA, 110, 15265-15270.
- Que, Q., and J.D. Helmann. (2000) Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. Mol Microbiol, 35, 1454-1568.
- Rojas-Tapias, D.F., and J.D. Helmann. (2018) Induction of the Spx regulon by cell wall stress reveals novel regulatory mechanisms in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 107, 659-674.
- Roney, I.J., and D.Z. Rudner. (2022) Two broadly conserved families of polyprenyl-phosphate transporters. Nature, 613, 729-734.
- Schmidt, A., D.B. Trentini, S. Spiess, J. Fuhrmann, G. Ammerer, K. Mechtler , and T. Clausen. (2014) Quantitative phosphoproteomics reveals the role of protein arginine phosphorylation in the bacterial stress response. Mol Cell Proteomics, 13, 537-550.
- Schäfer, H., and K. Turgay. (2019) Spx, a versatile regulator of the *Bacillus subtilis* stress response. Curr Genet, 65, 871-876.
- Shimane, K., and M. Ogura. (2004) Mutational analysis of the helix-turn-helix region of *Bacillus subtilis* response regulator DegU, and identification of cis-acting sequences for DegU in the *aprE* and *comK* promoters. J Biochem, 136, 387-397.
- Shiwa, Y., H. Yoshikawa, T. Tanaka, and M. Ogura. (2015). *Bacillus subtilis degSU* operon is regulated by the ClpXP-Spx regulated proteolysis system. J Biochem, 157, 321-330.
- Stanley, N.R., and B.A. Lazazzera. (2005) Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly-gamma-dl-glutamic acid production and biofilm formation. Mol Microbiol, 57, 1143-1158.
- Stülke, J., A. Grüppen, M. Bramkamp, and S. Pelzer. (2023) *Bacillus subtilis*, a swiss army knife in science and biotechnology. J Bacteriol, 205, e0010223.
- Tanaka, K., T. Shiina, and H. Takahashi. (1988) Multiple principal sigma factor homologs in eubacteria: identification of the "rpoD box". Science, 242, 1040-1042.
- Tanaka, T., M. Kawata, Y. Nagami, and H. Uchiyama. (1987) *prtR* enhances the mRNA level of the *Bacillus subtilis* extracellular proteases. J Bacteriol, 169, 3044-3050.
- Tanaka, T., and M. Kawata. (1988) Cloning and characterization of *Bacillus subtilis iep*, which has positive and negative effects on production of extracellular proteases. J Bacteriol, 170, 3593-3600.
- Thiaville, P.C., B.E.I. Yacoubi, C. Köhrer, J.J. Thiaville, C. Deutsch, et al. (2015) Essentiality of threonylcarbamoyladenosine (t(6)A), a universal tRNA modification, in bacteria. Mol Microbiol, 98, 1199-1221.
- Tsukahara, K., and M. Ogura. (2008) Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla/che* operon and *sacB*. BMC Microbiology, 8, 8.
- Vlamakis, H., Y. Chai, P. Beauregard, R. Losick, and R. Kolter. (2013) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. Nat Rev Microbiol, 11, 157-168.
- Wang, L., R. Grau, M. Perego, and J.A. Hoch. (1997) A novel histidine kinase inhibitor regulating development in *Bacillus subtilis*. Genes Dev, 11, 2569-2579.
- Wicke, D., P. Neumann, M. Gößringer, et al., (2024) The previously uncharacterized RnpM (YlxR) protein modulates the activity of ribonuclease P in *Bacillus subtilis* in vitro. Nucleic Acids Res, 52, 1404-1419.
- Zeigler, D.R., Z. Prágai, S. Rodriguez, B. Chevreux,

- A. Muffler, T. Albert, R. Bai, M. Wyss, and J.B. Perkins. (2008) The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *J Bacteriol*, 190, 6983-6995.
- Zuber, P. (2009) Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annu Rev Microbiol*, 63, 575-597.