

所属 (主指導教官)	細胞遺伝学講座 (小笠原 直毅 教授)		
氏名	小椋 義俊	提出	平成14年 1月 8日
題目	枯草菌における複製開始の制御機構に関する研究		
要旨	<p>細菌染色体の複製は複製起点 (<i>oriC</i>) あたりの細胞質量が一定の値 (開始質量) に達したときに始まり、しかもその複製開始は2回以上連続して起きないように (細胞周期当たり一度だけ) 厳密に制御されている。複製開始にはイニシエータータンパク質 DnaA が <i>oriC</i> 内に連続して存在するその結合配列 (DnaA box) に結合することが必須である。大腸菌では DnaA の過剰発現や <i>oriC</i> と同様に強く DnaA が結合する DnaA box クラスタ (<i>datA</i>) の欠失により開始質量が減少することから、複製開始時期は DnaA と DnaA box の量比によって決定されると考えるモデルが提唱されている (Titration model)。また、DnaA は ATP と ADP の両方と結合し、ATP 結合型 (活性型) の比率が複製開始直前に上昇することや、複製開始後の <i>oriC</i> の隔離に関与する SeqA の遺伝子破壊株で開始質量が減少することから、複製開始時期の決定には DnaA の活性変換や SeqA が関与する制御も重要であるとされている。しかし、これらのモデルは開始質量を認識する機構を説明するのにまだ不十分である。枯草菌では <i>dnaA</i> の発現制御が大腸菌と異なり、大腸菌で DnaA box を過剰供給すると DnaA がこれに結合し、<i>dnaA</i> の自己抑制が解除されて転写が増加するのに対して、枯草菌では DnaA box を供給しても <i>dnaA</i> の転写は増加せず、複製開始が阻害 (不和合性) される。また、枯草菌 <i>dnaA</i> は複製開始後の一定期間しか転写されないことが示唆されており、DnaA は複製開始以前から一回分の複製に十分な量が既に蓄積されていると予想されている。こうした事より、枯草菌では Titration model は考えにくい、複製開始制御に関わる他の因子は発見されていない。一方、2回以上の連続した複製開始を抑制する機構として、大腸菌では DnaN (b-subunit of DNA polymerase III) と Hda (Homologous to DnaA) による DnaA の不活化、SeqA による複製開始後の <i>oriC</i> の細胞膜への隔離が知られているが、枯草菌には SeqA や Hda が無いことから大腸菌とは異なる制御系が存在すると考えられる。</p> <p>上述のように枯草菌では Titration model は考えにくい、新たな制御系を知るためには DnaA 過剰発現の影響を解析することは重要である。その目的で、<i>dnaA</i> の発現を染色体上の別の位置から人為的に制御できる菌株を作製したが、DnaA 量を増加させると複製の伸長が阻害された。<i>dnaA</i> 上流に DnaA box、下流に <i>dnaN</i> がコードされていることから、<i>dnaA</i> と <i>dnaN</i> がオペロンを形成し、そして、このオペロンの転写が DnaA により制御されていると予想された。そこで、DnaA 量を変動させ、これらの遺伝子発現への影響を解析した結果、確かに両遺伝子がオペロンを形成し、その転写は DnaA により抑制された。これらのことから、DnaA 過剰発現に伴う複製伸長阻害は DnaN 枯渇が原因であると考えられたので、<i>dnaN</i> の発現を補える系を作製したところ、その複製伸長阻害は取り除かれた。この株で DnaA 量を変動させ、フローサイトメーターで複製開始点を解析した結果、DnaA 量が野生株の 1.5 - 3.3 倍に増加すると、<i>oriC</i> あたりの細胞質量 (mass/origin) が野生株に比べ 6 - 15% 減少したが、さらに DnaA 量を増加させても mass/origin はそれ以上減少しなかった。大腸菌でも DnaA 量を増加させると複製伸長阻害が生じ、複製開始へ</p>		

の効果は正確に解析されていないが、本研究では DnaN を補うことにより、複製伸長阻害が取り除かれることを見いだした。また、大腸菌では DnaA 過剰発現で mass/origin が野生株より 17 - 44%減少すると報告されているが、枯草菌ではその影響は大腸菌より小さかった。DnaA が複製開始以前から既に十分量蓄積されていると考えられることから、枯草菌では複製開始時期が来るまで DnaA の活性を抑制する機構が存在し、本研究による DnaA 過剰発現の効果はその抑制機構とのバランスが乱れたためではないかと考えられる。

DnaA 過剰発現株の解析から、DnaA の活性を抑制する機構の存在が示唆されたが、最近、酵母 2 ハイブリッド法による解析で DnaA と相互作用することが示された YabA がその制御に関わる可能性が考えられた。そこで、yabA 破壊株を作製したところ、細胞増殖には影響しないが複製開始に異常がみられた。その影響を詳細に解析するため、yabA 発現制御株を作製し、フローサイトメーターを用いて解析した結果、フマル酸を炭素源とする最少培地で、野生株では大部分の細胞が 2 個の *oriC* を持ち、一部の細胞が 4 個の *oriC* を持っているのに対して、yabA 発現制御株では、YabA 量が減少すると共に、4 個の *oriC* を持つ細胞の割合が上昇し、開始時期が早くなっていた。そのとき、奇数個の *oriC* を持つ細胞（開始の同調性の乱れにより生じる）や、5 個以上の *oriC* を持つ細胞（2 回以上の連続した複製開始により生じる）はほとんど検出されなかった。これらのことから、YabA は DnaA と相互作用することにより複製開始を抑制する能力を持つことを示しており、開始時期を制御しているシステムの一員である可能性が示された。

本研究ではさらに、染色体分配に関与する Soj と Spo0J が複製開始制御にも関わることを見いだした。Spo0J は *oriC* 近くに結合し、その挙動は *oriC* のそれとよく一致することから *oriC* の位置を知るためのマーカーとして用いられる。この目的で *spo0J-gfp* 融合株を作製したが、この株では mass/origin が野生株に比べ約 23% 減少し、タンパク質量あたりの DNA 量 (DNA/protein) は野生株の約 1.2 倍になることがわかった。この影響が GFP との融合による Spo0J 機能の部分的欠損であると考え、*spo0J* 破壊株で解析したところ、mass/origin が野生株に比べ約 33%減少し、DNA/protein は野生株の約 1.5 倍に上昇したので、*spo0J* 破壊により開始時期が早まることがわかった。ところが、*soj - spo0J* オペロンの破壊では複製開始にほとんど影響しなかった。これらのことから、Soj が複製開始を早める活性を持ち Spo0J がそれを抑制していると考えられた。そこで、Soj 過剰発現株を作製したところ、mass/origin が野生株に比べ約 25%減少し、DNA/protein は野生株の約 1.5 倍になった。以上の結果より、Soj は複製開始の正の制御因子であり、Spo0J が Soj のその機能を抑制していると考えられる。事実、Soj と Spo0J の同時過剰発現では、Soj 過剰発現による複製開始への影響が中和された。

本研究から枯草菌 DnaA による *dnaA-dnaN* オペロンの自己抑制が *in vivo* で初めて証明され、DnaA 過剰発現による複製開始への影響が複製伸長阻害が起こらない条件で正確に解析された。その結果、枯草菌では DnaA 量を増加させても大腸菌ほど複製開始時期は早まらないことがわかり、DnaA の活性制御が複製開始時期の決定により重要であると考えられた。さらに、YabA や Spo0J の枯渇によって複製開始時期が早まることも見いだした。この結果は、大腸菌のモデルとは異なり、枯草菌では DnaA も含めて複製開始に必須な因子群が複製開始以前から既に十分量準備されており、この開始ポテンシャルを正しい時期が来るまで抑制する制御系が存在していることを示している。YabA は DnaA の活性を制御してその抑制機構の 1 つに関わり、Soj - Spo0J システムはこの抑制機構のどれかに作用して開始ポテンシャルを解放させる役割を担っていると考えられる。*soj - spo0J* 破壊では複製開始に大きく影響しないことから、この制御を相補する別の制御系の存在も示唆される。今後、Soj と相互作用する因子の解析や YabA-DnaA 相互作用の生化学的解析等によってこのモデルの妥当性が証明されると思われる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 小椋 義俊

細菌染色体の複製開始は、細胞の増殖速度の変化すなわち分裂周期の変化に対応して、細胞分裂と同調して起こるように厳密に制御されている。細菌の染色体複製は開始蛋白質 DnaA が複製開始点に存在するその結合配列 DnaA box に結合することによって始まる。大腸菌においては、DnaA 蛋白質と染色体 DNA 上に散在する DnaA box の量比がある一定の値に達した時に複製が開始するように制御されているというモデルが古くから提唱されているが、その他の制御システムの存在も知られており、最終的な結論は出ていない。また、グラム陽性菌を代表する枯草菌についても、DnaA と DnaA box が複製開始に必須であることが実験的に証明されているが、開始時期の制御機構についての実験データはほとんど得られていない。申請者は、この問題に関して、以下の実験結果を得た。

1) 人為的に DnaA 蛋白質の発現量を制御できる菌株を作製し、DnaA 量が野生株の 0.8-1.5 倍の範囲にあれば、複製開始の制御に大きな影響を与えない。3 倍以上にした時にはやや複製開始時期が早まる。

2) 新規遺伝子 *yabA* を破壊すると、複製開始時期が早くなる。YabA 蛋白質は DnaA 及び複製装置の本体である DNA ポリメラーゼ III の β サブユニット (DnaN) と相互作用する (酵母 2 ハイブリッド系による解析結果)。

3) 染色体分配に関与すると考えられている *soj*, *spo0J* 遺伝子の破壊株や過剰発現株を作製、解析し、細胞内で Soj, Spo0J 両蛋白質の量比が崩れ Soj 量が増えるような事態になると、複製が通常よりも早く始まることを明らかにした。

これまで、枯草菌では DnaA 以外に複製開始を制御するような因子は見つかっていなかった。本研究により、*yabA*, *soj-spo0J* がそのような因子として新たに同定され、興味あることに、*yabA*, *spo0J* は破壊されると複製開始時期が早くなるという共通の性質を示した。この結果から、枯草菌では複製開始能力が複製開始以前から既に蓄積されているが、その能力は正しい開始時期が来るまで何らかの機構により抑えられていると考えられる。このような複製開始制御モデルは大腸菌でも提示されていない新しいモデルである。

以上のように、本論文は細菌における複製開始の制御機構に斬新なモデルを提案するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。