

所属 (主指導教官)	細胞遺伝学講座 (小笠原 直毅)		
氏名	門屋 亨介	提出	平成 14 年 5 月 13 日
題目	枯草菌染色体の正確な分離に必要なシス配列の同定		

遺伝物質本体であるゲノム DNA をきちんと子孫に伝えるために、複製された DNA が 2 つの娘細胞に正確に分配されることは極めて重要である。しかしながら、細菌においては近年に至るまでこの重要な機構はほとんど研究されておらず、染色体 DNA が複製起点 (*oriC*) を介して細胞膜または細胞壁に結合し、細胞膜・細胞壁の伸長に伴って 2 つの娘細胞に受動的に分離される古典的モデル (Jacob、1963) が支持されてきた。しかし近年、大腸菌において、平賀らによる先駆的研究により染色体分配に関与する遺伝子として *muk* 遺伝子群が同定され、また、細胞生物学的技法の発展に伴って、*oriC* 領域の特徴的な挙動が明らかとなった。枯草菌では、*oriC* 領域は細胞周期を通じて核様体の両端近くに規則正しく配置され、複製後直ちに倍加した複製起点の一方が対極に向かって移動する。これに対して大腸菌では、複製は核様体の中央近くで始まり、倍加した *oriC* 領域は細胞周期のかなり長期間 (細胞周期の 1/2〜2/3) 対合してそこに留まり、突然素早く核様体の両端に向かって移動する。このような実験結果は、細菌においても染色体を積極的に分離させる装置が存在することを示唆している。当初、大腸菌 MukB、枯草菌 SMC 及び Spo0J タンパク質などが分配装置の構成因子ではないかと推定されたが、*smc*-null、*spo0J*-null 変異株においても *oriC* 領域は素早く移動することから、その可能性は否定的である。従って、現在、染色体分配装置の実体は、それが認識する染色体 DNA 上のシス配列を含めて不明なままである。

枯草菌では複製開始に *dnaA* 遺伝子上流と下流の 2 つの非コード領域を必要とし、複製はこの下流の領域から始まる。両領域には複製開始タンパク質 DnaA の結合配列 (DnaA box) が繰り返し存在している。枯草菌で複製可能な低コピー数プラスミド (mini-pLS32) を染色体に組み込ませることにより *dnaA* 遺伝子下流の DnaA box クラスターを欠失させた *oriC* 欠失株を作成できる (Hassan ら、1997)。この株での染色体複製はプラスミドの複製開始機構に依存して開始する。Hassan らはプラスミドを染色体上 120° の位置 (枯草菌染色体のマッピングは 360°) に組み込み、その *oriC* 欠失株が染色体分離異常の際に見られる染色体 DNA が無い細胞 (無核細胞) を高頻度で放出する事を見いだした。しかし、この株では過剰な細胞分裂が起きていた。この効果を除くため、また、複製開始位置の効果を検討するために、プラスミドを染色体上 260° あるいは *oriC* 近傍の 360° に組み込んだ *oriC* 欠失株を作製した。これらの株を資化性の低い炭素源 (フマル酸) を含む最小培地で培養し、フローサイトメーターを用いて細胞内の複製開始点数を解析すると、複製開始頻度は野生株とほぼ同様であった。この時、プラスミドを *oriC* 近傍に組み込んだ *oriC* 欠失株ではほとんど無核細胞を出現しなかったのに対して、260° に組み込んだ株では 5% 程度の無核細胞が測定された。これらの結果から、複製開始位置の変化が染色体分離に影響を及ぼすこ

とが分かり、また、正確な染色体分離に必要な配列は *oriC* 近傍に存在する可能性が示唆され、本件研究ではその詳細な解析を行った。

初めに、染色体分離に必要なシス配列が *oriC* を含む *dnaA* オペロン内に存在する可能性を検討した。そのためこの領域を 260° の位置に移動した *oriC* 移動株を作製した。この位置にプラスミドが挿入された *oriC* 欠失株は約 5% の無核細胞が出現していたのに対し、*oriC* 移動株で無核細胞出現頻度は大幅に減少した (約 1%)。この結果は、染色体分離に必要な配列が移動した *dnaA* オペロン内に存在することを示している。

続いて、オペロン内のどの領域に染色体分離に必要なシス配列が存在するかを調べるために、360° にプラスミドを組み込んだ株を利用して *dnaA* オペロンの様々な領域を欠失した株を作製した。予想に反し、*dnaA* オペロン全体を欠失しても無核細胞の出現頻度は約 1% にとどまった。しかし、*dnaA* オペロン全体を欠失した株では、*dnaA* 遺伝子下流の DnaA box クラスターのみを欠失した株に比べ、染色体分離異常によってギロチン現象 (核様体が細胞隔壁により分断される) を呈した細胞が多く (約 4%) 観察された。このような細胞も含めた染色体分離異常の細胞の頻度を指標にして *dnaA* オペロン内に存在するシス配列を調べたところ、*dnaA* 遺伝子下流に存在する AT に富んだ領域を欠失すると *dnaA* オペロン欠失株と同程度の頻度で染色体分離異常の細胞が現れているのが分かった。この結果は、この AT に富んだ配列が染色体分離のために必要な配列であることを示唆している。

この AT に富んだ配列が正確な染色体分離に必須であることを確認するために、染色体分離異常が原因で無核細胞を出現している *oriC* 欠失株 (プラスミドが 260° に組み込まれている) の複製開始点近傍 (260°) にこの AT に富んだ配列を加え、染色体分離異常が改善されているか検討した。予想に反し、この株は依然として無核細胞を出現した。ところが、*dnaA* 遺伝子 3' 末端領域 (549bp) まで含めた幅広い領域を加えると、無核細胞出現頻度は *oriC* 移動株とほぼ同じレベルにまで減少した。*dnaA* 遺伝子 3' 末端部分だけでは AT に富んだ配列を加えた場合と同様に約 5% の無核細胞が出現した。これらの結果から、正常な染色体分離には *dnaA* 遺伝子下流の DnaA box クラスターを挟んで存在する 2 つの配列 (*dnaA* 遺伝子 3' 末端と AT に富んだ配列) が必要であることが明らかになった。

この 2 つの配列が染色体分離にどのように貢献しているかを調べるために、0° と 260° の 2 つの領域の細胞内分布を蛍光 in situ hybridization を用いて解析した。野生株では、*oriC* 領域 (0°) は細胞極近傍に局在し、260° の領域は細胞中央付近に分布した。これに対して *oriC* を 260° に移動させた株では、260° の領域が細胞極近くに局在するようになった。この結果は、*dnaA* オペロン内に存在する 2 つのシス配列がこの領域を細胞極近くに規則正しく配置させる役割を担っていることを示唆している。そこで 260° の位置にプラスミドを組み込んだ *oriC* 欠失株とこの位置にこれらのシス配列を付加した株において、260° の領域の細胞内分布を比較検討した。その結果、無核細胞をより高頻度で出現させる *oriC* 欠失株では、260° の領域が細胞内にランダムに分布するのに対し、260° にシス配列を付加した株では、この領域は細胞両極近傍に規則正しく局在した。これらの結果は、*dnaA* オペロン内に存在する 2 つの配列がこの配列を含む DNA 領域を細胞極近くにきちんと配置させることによって正確な染色体分離に貢献していることを強く示唆している。

本研究により、枯草菌では *dnaA* 遺伝子とその下流にある 2 つの DNA 配列が染色体分離のシス配列として働いていることを明らかにした。細菌において染色体分離に働くシス配列が同定されたのは、本研究が初めてであり、今後その領域に結合するタンパク質の同定が興味深い。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 門屋 亨介

遺伝物質本体であるゲノム DNA をきちんと子孫に伝えるために、複製された DNA が 2 つの娘細胞に正確に分配されることは極めて重要である。しかしながら、細菌においては近年に至るまでこの重要な機構はほとんど研究されておらず、染色体 DNA が複製起点 (*oriC*) を介して細胞膜または細胞壁に結合し、細胞膜・細胞壁の伸長に伴って 2 つの娘細胞に受動的に分離される古典的モデルが支持されてきた。しかし近年、枯草菌や大腸菌において、*oriC* 領域が複製後素早く核様体の両端に向かって移動することが観察され、細菌においても染色体を積極的に分離させる装置が存在すると考えられるようになった。しかし、その後の精力的な研究にも拘らず、染色体分配装置の実体は、その認識 DNA 配列を含めて、ほとんど明らかになっていない。

申請者は、この問題に関して、以下の実験結果を得た。

1) 低コピー数プラスミドの複製に必須な領域 (*oriN*) を染色体上に組み込み、それを新たな複製起点として利用することにより、種々の *oriC* 欠失株を作製した。*oriN* を *oriC* 領域から遠く離れた位置に組み込むと、多数の無核細胞を放出し、染色体分離に異常が生じた。ところが、*oriN* の代わりに *oriC* を含む *dnaA-dnaN* オペロンを同じ位置に組み込んで複製を始めた場合には、異常はほとんど観察されなかった。この結果は、このオペロン内に染色体分配に働くシス配列が存在することを示唆している。

2) この配列を同定するために、オペロン内に種々の欠失を導入して解析した結果、*dnaA* 遺伝子下流に存在する AT に富んだ配列が染色体の正確な分離に必須であることが分かった。ところが、この配列を *oriN* 近くに組み込んでも、*oriC* 欠失株で観察された染色体分離異常は回復しなかった。そこで、その周辺配列も含めてさらに検討を加えた結果、2 つの配列 (AT に富んだ配列と *dnaA* 遺伝子内の配列) が染色体の正確な分離に必要であることが分かった。

3) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションで複製起点領域の細胞内分布を調べた結果、*oriN* は細胞内にランダムに分布するのに対し、その近くに (2) で同定した 2 つの配列を加えると、複製起点 (*oriN*) は細胞両極近くに規則正しく局在した。

本研究は、*dnaA* 遺伝子内とその下流にある 2 つの DNA 配列が、複製起点領域を細胞両極近くへ規則正しく配置させることにより、枯草菌の染色体分配に大きく貢献していることを明らかにした。細菌において染色体分離に働くシス配列を同定したのは、本研究が初めてである。

以上のように、本論文は細菌における染色体分配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。