

博士論文

枯草菌染色体 *oriC* 近傍領域の  
DnaA 結合配列による染色体複製の開始制御

奥村 元

2011 年 8 月 23 日

奈良先端科学技術大学院大学  
情報科学研究科 情報生命科学専攻

本論文は奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科に  
博士（理学）授与の要件として提出した博士論文である。

奥村 元

審査委員：

小笠原 直毅	教授	(主指導教員)
湊 小太郎	教授	(副指導教員)
真木 寿治	教授	(副指導教員)
金谷 重彦	教授	(副指導教員)

# 枯草菌染色体 *oriC* 近傍領域の DnaA 結合配列による

## 染色体複製の開始制御\*

奥村 元

### 内容梗概

細菌の染色体複製は、複製開始タンパク質である DnaA が、複製開始点 *oriC* 内の DnaA-box cluster (DBC) に結合することで開始される。ChAP-chip 法による枯草菌の染色体全域に渡る DnaA の結合プロファイルの解析から対数増殖期では、染色体上の *oriC* 外に存在する 6 箇所の DBC に DnaA 分子が安定的に結合しており、その内のいくつかでは、近接遺伝子の転写を制御していることが分かった。また、多くの *Bacillus* 属細菌では DBC は異なる遺伝子上流にみられるが、*oriC* 近傍に存在するという共通点が見出された。本研究では DBC の新規機能を解明するため、6 箇所の DBC を削除した欠損変異株 ( $\Delta 6\text{DBC}$ ) を作製しその表現型の解析を行った。蛍光顕微鏡を用いた *oriC* 領域の細胞内局在解析から、この株では複製開始時期が早まることが明らかになった。さらに、 $\Delta 6\text{DBC}$  株に、*spo0J* 欠損変異を導入した場合、著しい増殖阻害が観察された。この二重変異株における細胞増殖阻害は、Spo0J を欠損時に DnaA を活性化する Soj への自然突然変異 (*SojT88M*)、あるいは欠損により回復された。一方で、二重変異株の表現型は、*oriN* システムによる条件下では全く観察されなかった。また、DBC[*yydA-yycS*]を $\Delta 6\text{DBC}$  株染色体上の異なる領域に挿入した場合、コピー数依存的に過剰複製が相補された一方、プラスミドによる DBC 供給では相補されなかった。さらに、DBC 断片挿入による $\Delta 6\text{DBC}-\Delta spo0J$  株の増殖阻害の回復には、領域依存性が依然としてあることが明らかになった。以上の結果から、枯草菌染色体上の *oriC* 外に存在する DBC は、大腸菌とは異なるメカニズムで複製開始を負に制御し、Spo0J/Soj と並んで、DnaA 活性を適切に維持する主要なシステムであると考えられる。

### キーワード

DnaA-Box, *oriC*, 複製開始, 枯草菌

\*奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科情報生命科学専攻学位論文,

NAIST-IS-DD0661005, 2011 年 8 月 23 日.

# Regulation of initiation of replication by *oriC*-proximal DnaA-box clusters in *Bacillus subtilis*\*

Hajime Okumura

## Abstract

Bacterial chromosomal replication is initiated by binding of DnaA to a DnaA-box cluster (DBC) within the replication origin (*oriC*). In *Bacillus subtilis*, six DBCs are also found outside of *oriC* and some are known to be involved in transcriptional regulation of neighboring genes.

A deletion mutant of the six DBCs ( $\Delta 6$ ) showed an early initiation of replication. Furthermore, inactivation of Spo0J in  $\Delta 6$  cells resulted in a pleiotropic phenotype, resulting in severe growth inhibition. However, a spontaneous suppressor in or a deletion of Soj, which stimulates DnaA activity in the absence of Spo0J, counteracted the effects. These abnormal phenotypic features were not observed in a mutant background in which replication initiation was driven by a plasmid-derived replication origin. Moreover, introduction of a single DBC at ectopic positions within the  $\Delta 6$  chromosome sometimes restored the early-initiation phenotype, but this was dependent on insertion location.

We propose that DBCs negatively regulate replication initiation by interacting with DnaA molecules and play a major role, together with Spo0J/Soj, to maintain appropriate DnaA activity for efficient chromosomal replication.

## Keywords:

*Bacillus subtilis*, DnaA box cluster, replication initiation, segregation, cell division

---

\*Doctoral Dissertation, Department of Information Systems, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-DD0661005, May 9, 2011.

# 目次

<b>I. 序論</b>	<b>3</b>
I.1. 細菌の複製開始機構	3
I.2. 複製開始の制御機構	5
I.3. 大腸菌における複製開始制御	6
I.4. 枯草菌における複製開始の制御機構	7
I.5. <i>oriC</i> 外の <i>DBC</i> による新規の機能	8
<b>II. 材料と方法</b>	<b>11</b>
II.1. 菌株とプラスミドおよびプライマー	11
II.2. 培地と培養条件	21
II.3. マーカーフリー遺伝子欠損法による <i>DBC</i> 欠損株の構築	22
II.4. <i>HO1009</i> 株 ( $\Delta 5DBC$ ) の構築	24
II.5. <i>oriC</i> 配列と <i>dnaA</i> 遺伝子欠損株 ( <i>MU01</i> ) の構築	25
II.6. <i>dnaA</i> 発現誘導株 ( <i>MU02</i> ) の構築	26
II.7. その他の株の構築	30
II.8. <i>Affymetrix tiling array</i> によるトランスクリプトーム解析	32
II.9. <i>Real-time PCR</i> による <i>DnaA</i> と共精製された <i>DNA</i> の定量	32
II.10. フローサイトメトリー解析	33
II.11. <i>qPCR</i> 法を利用した <i>oriC/terC</i> 比の計測	33
II.12. 蛍光顕微鏡を用いた生細胞の観察	34
II.13. ウェスタンブロットティング法	34
II.14. <i>SOS</i> 応答のモニタリングシステム	34
<b>III. 結果</b>	<b>36</b>
III.1. <i>DBC</i> 欠損領域の構造	36
III.2. <i>oriC</i> 外の 6 箇所の <i>DBC</i> 欠損により過剰複製が誘導される	36
III.3. $\Delta 6DBC$ 細胞の過剰複製は、6 箇所の <i>DBC</i> 欠損により相乗的に誘導される	42
III.4. $\Delta 6DBC$ 細胞の細胞形態および核様体構造の観察	48
III.5. $\Delta 6DBC$ 株では複製開始が早期に始まる	51

III.6.	$\Delta 6DBC$ と $\Delta spo0J$ の変異は相乗的に過剰複製を促進し、染色体分離阻害と著しい細胞増殖阻害を引き起こす	56
III.7.	<i>Soj</i> の欠損により $\Delta 6DBC$ - $\Delta spo0J$ 二重欠損株の増殖阻害は回復する	58
III.8.	<i>oriC</i> からの <i>DnaA</i> 依存的な複製開始により、 $\Delta 6DBC$ - $\Delta spo0J$ 細胞の増殖阻害が引き起こされる	61
III.9.	$\Delta 6DBC$ - $\Delta spo0J$ 二重欠損により <i>SOS</i> 応答が誘導される	63
III.10.	染色体上への <i>DBC</i> [ <i>yydA-yycS</i> ]断片導入による過剰複製と増殖阻害の回復	66
III.11.	プラスミドによる <i>DBC</i> の $\Delta 6DBC$ 細胞への導入では過剰複製は相補出来ない	69
<b>IV.</b>	<b>考察</b>	<b>72</b>
IV.1.	<i>oriC</i> 外の <i>DBC</i> による複製開始制御	72
IV.2.	$\Delta 6DBC$ 株における早期の複製開始	73
IV.3.	<i>DnaA</i> の構成的な活性化による増殖阻害	75
IV.4.	複製開始に関わるその他の制御機構	76
IV.5.	枯草菌における <i>DBC</i> の <i>DnaA</i> 制御メカニズム	77
IV.6.	枯草菌 <i>oriC</i> 外の <i>DBC</i> による複製開始制御	79
IV.7.	今後の課題	80
<b>V.</b>	<b>本研究のまとめ</b>	<b>81</b>
<b>VI.</b>	<b>参考文献</b>	<b>82</b>
<b>VII.</b>	<b>謝辞</b>	<b>89</b>

# I. 序論

## I.1. 細菌の複製開始機構

DnaA は、細菌染色体 DNA 複製の複製開始タンパク質であり、基本的に全ての細菌で保存されている。DnaA には、4 個の機能的ドメインが保存されている。ここでは、大腸菌 DnaA を例に挙げるが、各ドメインは以下に示す機能に関与している事が報告されている (図 I.1)。ドメイン I は、DnaA 間での相互作用、DiaA 結合および DnaB の *oriC*-DnaA 複合体への導入に関与している。ドメイン II は、立体構造上フォールディングされないフレキシブルなリンカー領域である。ドメイン III は、一般的な AAA+ Walker モチーフおよび特有の ATP 相互作用を示すモチーフを含んでいる。C 末端領域のドメイン IV は、DNA 結合ドメインであり、特に DnaA-box と特異的に結合する helix-turn-helix 構造を持つ。

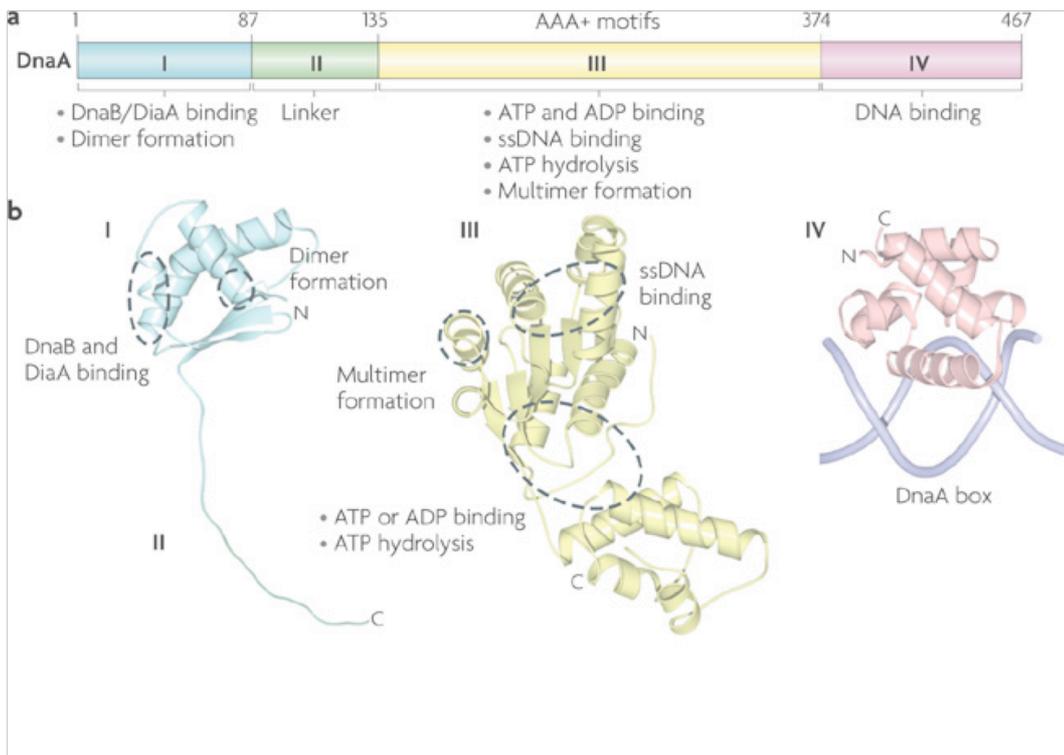


図 I.1 大腸菌 DnaA ドメインの三次元構造

- (a) 4 個の機能的ドメイン  
(b) ドメイン I-IV の立体構造

Nature Reviews Microbiology (Katayama et al, 2010) より引用

DnaA は、複製開始時において形成される DNA-タンパク質複合体形成の際、中核的な機能を担っている。細菌の染色体 DNA 複製は、複製開始点である *oriC* (origin of chromosome) と呼ばれる 1 箇所の領域から開始され、その後続く複製伸長反応は、環状染色体 DNA 鎖の反対側に位置する複製集結点 *terC* (terminus of replication) へと両方向（時計回り、反時計回り）に進行する。

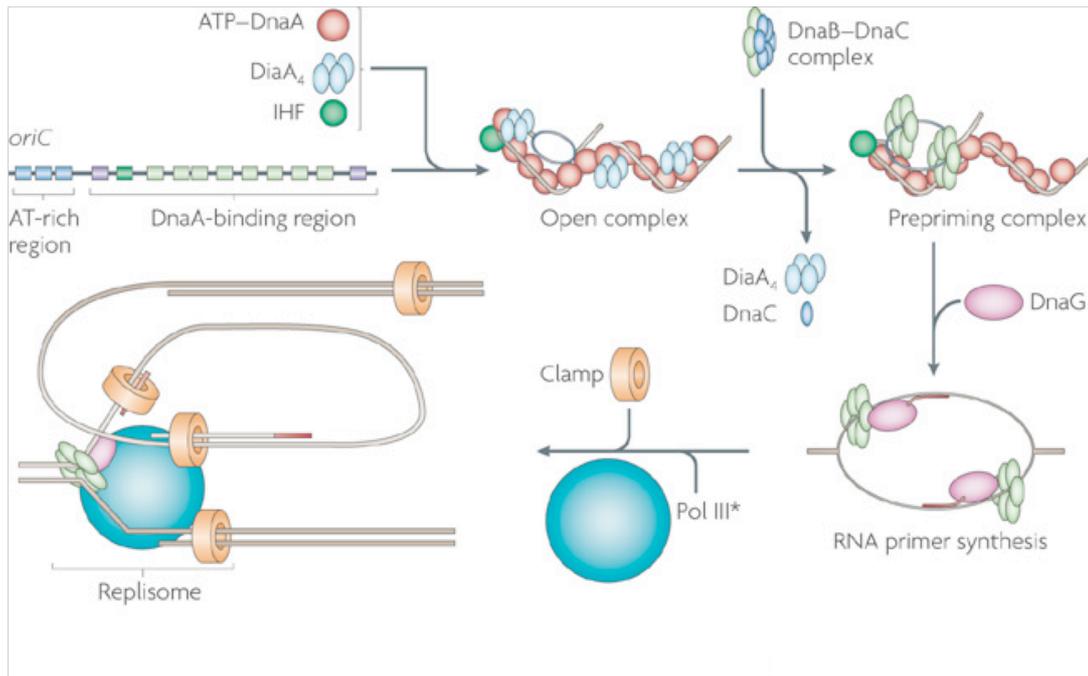


図 I.2 大腸菌 *oriC* における複製開始のメカニズム

*oriC* 領域は、13-bp の AT-rich な反復配列と DnaA 結合領域を含んでいる。DnaA 結合領域には、高親和性 (紫 box) と低親和性 (黄緑 box) 2 種類の DnaA-box および Integration host factor, IHF 結合サイト (緑 box) を含んでいる。ATP-DnaA 分子は、Aid of DnaA initiator-associating protein, DiaA の 4 量体および IHF と DnaA 結合領域に結合する。この結合により ATP-DnaA 分子が多量体化し AT 領域の二重鎖解裂が起きる。その後、DnaB-DnaC 複合体内の DNA ヘリケース, DnaB が、この一重鎖 DNA 領域に DnaA との相互作用を介して導入される。この DNA ヘリケース導入の過程において、DnaC および DiaA は *oriC* 複合体から放出される。導入された DnaB は、一重鎖の領域を拡大させ、DNA プライメース, DnaG 導入によりプライマーの合成が行われる。それに続いて、Pol III\* の構成要素である DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素とクランプ (DNA polymerase III subunit- $\beta$ , DnaN) が、導入され相補鎖 DNA の合成が開始される。岡崎フラグメント合成後、クランプは導入された DNA 鎖上に留まる。そして、Pol III\* が別のクランプ分子を導入し新たに岡崎フラグメントの合成を開始する。Nature Reviews Microbiology (Katayama et al, 2010) より引用。

複製開始段階において DnaA は、*oriC* 内に存在する DnaA 結合配列 (DnaA-box) に結合する。この結合配列は、9-bp の非対称性配列 (TTATNCACA) であり、*oriC* 内では複数の DnaA-box からなるクラスターを形成している (DnaA-box cluster, DBC)。DnaA と DBC

との結合により、DBC 下流に隣接する DNA-unwinding element (DUE) と呼ばれる AT-rich 領域の DNA 二重鎖解裂が促進される (Katayama et al, 2010)。この Nucleoprotein 複合体形成までの過程は、基本的に真核生物まで広く保存されており複製開始には必須の反応であると考えられている。大腸菌においては、二重鎖解裂に続いてヘリケース (DnaB) がヘリケースローダー (DnaC) により導入され、その後 DNA polymerase III holoenzyme の  $\beta$ -clamp subunit (DnaN) の導入へと続き、DNA 合成が開始される (図 I.2)。

## I.2. 複製開始の制御機構

DNA 複製が開始されるタイミングは、細胞周期当たり 1 回の複製しか起こらないよう厳密に制御されなければならない。この複製開始時期の制御は、負のフィードバック制御をおこなう複数のシステムにより制御されていると考えられている。(Katayama et al, 2010)。大腸菌および枯草菌において、これまで報告されてきた複製開始制御に関わる因子を表 I.1 に、制御システムの概略を図 I.3 (6 ページ参照) にまとめた。

表 I.1 複製開始を制御するメカニズム

制御因子	制御機構
<b>大腸菌</b>	
Hda, clamp	ADP-Hda-DNA-clamp 複合体による ATP-DnaA の加水分解
<i>datA</i>	DnaA 結合により複製開始へ利用される DnaA 分子数を減少させる
SeqA	<i>oriC</i> 内のヘミメチル化 GATC サイトへ結合し、DnaA の結合を阻害する <i>dnaA</i> プロモーター配列内のヘミメチル化 GATC サイトへ結合
DnaA	<i>dnaA</i> プロモーター領域内の DnaA-box へ結合
DARS	DBC による ADP-DnaA から ATP-DnaA への再活性化
<b>枯草菌</b>	
YabA, clamp	DnaD-DnaA との相互作用を YabA が競合的に阻害 DnaN-YabA-DnaA 複合体を介して DnaA を <i>oriC</i> から隔離
Soj, Spo0J	Soj 単量体による DnaA との相互作用により DnaA を不活化 Spo0J は、Soj の内在 ATPase 活性を促進する
DnaA	<i>dnaA</i> プロモーター領域内の DnaA-box へ結合

Nature Reviews Microbiology (Katayama et al, 2010) より引用し一部改編。

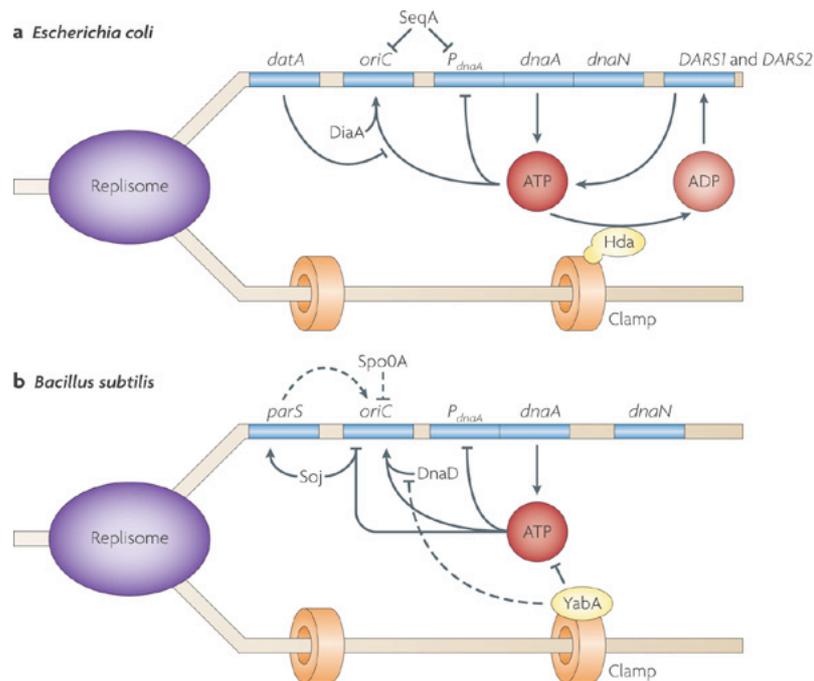


図 I .3 大腸菌および枯草菌における複製開始の制御システム

DnaA は、*oriC* に結合し複製を開始させる。DnaA は、また ATP および ADP を結合するが、複製開始を活性化するのは ATP 型の DnaA である。DNA polymerase III subunit- $\beta$  をコードする *dnaN* は、*dnaA* とオペロンを構成する。複数の重複したシステムが、ATP-DnaA の細胞内での濃度と *oriC* への結合を抑制制御している。Nature Reviews Microbiology (Katayama et al, 2010) より引用し一部改編。

### I.3. 大腸菌における複製開始制御

今日までの大腸菌における研究からは、複製開始を制御する 4 つの系が報告されている。

- 1) DnaA 分子が、*dnaA* 遺伝子のプロモーター下流の DnaA-box へ結合することにより *dnaA* 自身の転写を抑制するシステム (Transcriptional autoregulation of *dnaA*)。
- 2) 大腸菌では GATC 配列は Dam methylase により両鎖がメチル化されているが、複製されたばかりの DNA は片方の鎖のみがメチル化されている。SeqA は、半メチル化 DNA に結合し、*oriC* が Dam methylase によるメチル化されることを阻害している。半メチル化状態では複製開始が起こらないために、連続した複製開始を抑制することができる (*oriC* sequestration)。
- 3) DnaA のホモログである Hda が、DNA に結合した DnaN ( $\beta$ -clump subunit of DNA polymerase III) と複合体を形成すると、DnaA に結合している ATP の加水分解を促進する。これにより DnaA が不活化される (Regulatory inactivation of DnaA, RIDA)。

- 4) *datA* と呼ばれる領域には 5 つの高親和性 DnaA-box が存在しており、この領域に DnaA 分子を結合させ隔離することにより過剰な複製開始を抑制する (DnaA titration)。
- 5) DARS (DnaA-reactivating sequence) と呼ばれる 2 箇所の DBC (DARS1, DARS2) が、DnaA に結合する ADP を ATP に交換することで DnaA を再活性化する。

#### 1.4. 枯草菌における複製開始の制御機構

枯草菌における複製開始の反応も基本的には、大腸菌と同様であると考えられている。枯草菌 *oriC* 領域も複数個のクラスター化した DnaA-box と AT-rich 領域を含んでいる。そして *in vitro* の解析の結果では、DnaA の結合により誘導される *dnaA-dnaN* 間にある AT-rich 領域の DNA 二重鎖の解裂が、その後続く一連の複製装置の導入から伸長反応までを引き起こし、かつ ATP 依存的であることが分かっている (Fukuoka et al, 1990, Moriya et al, 1994)。また、*dnaA* 遺伝子の転写は、大腸菌同様にプロモーター配列下流の DnaA-box への DnaA 結合により DnaA 自身により自己抑制されている (Ogura et al, 2001a)。しかしながら、枯草菌では大腸菌の Hda および SeqA のホモログは、現在までのところ同定されていない。

一方、枯草菌では YabA、ParABS システムが、複製開始制御の機能を担っているとする報告がなされている。YabA は、低 (G+C) グラム陽性細菌の中で保存されているタンパク質である。大腸菌の Hda 同様に DnaA および DnaN と相互作用することが報告されている (Noirot-Gros et al, 2002)。YabA を欠損させた細胞では、同調性の乱れと共に過剰複製が誘導される (Hayashi et al, 2005, Noirot-Gros et al, 2002)。しかしながら、複製開始段階におけるその制御機構は、大腸菌 Hda とは異なっていると考えられている。当研究室での解析を通じて提案されたモデルは、DnaD (helicase loader component) と DnaA との相互作用を YabA が競合的に阻害することで過剰な複製開始を抑制しているというものである (Cho et al, 2008)。一方、Graumann らのグループは、DnaN-YabA-DnaA という三者の複合体を通じて DnaA を複製装置に結合させ細胞中央に隔離することにより、複製開始後すぐに細胞極へと移動する *oriC* から隔離するというモデルを提唱している (Soufo et al, 2008)。

ParABS システムは、元々大腸菌の低コピープラスミドから娘プラスミドの分配に必須の因子として同定された (Hiraga, 2000)。このシステムは 3 つの因子、Walker Box ATPase の ParA、DNA 結合タンパク質である ParB、そして ParB 結合配列でありセントロメアとして機能する *parS* サイトから構成されている。Livny らは、NCBI データベース中の 400 あまりのゲノム配列を用いた比較ゲノム解析から、ParA、ParB ばかりでなく *parS* サイト

と推定される配列が、69%の真生細菌染色体上に保存されていると報告している (Livny et al, 2007)。さらに、*parS* サイトは、染色体上の複製開始点近位の領域に集中していることから、*oriC* 領域に関与した何らかの制御に関わっていると提唱している (Livny et al, 2007)。

枯草菌では、染色体上に8箇所の *parS* サイトが存在し、それらもやはり *oriC* 近傍領域に集中している。また、Soj (ParA) と Spo0J (ParB) が、複製開始制御と染色体分離の制御に関わっていると報告がされてきたが、詳細な分子機構は不明であった (Lee & Grossman, 2006, Ogura et al, 2003)。しかし最近、Spo0J が *oriC* 近傍に存在する *parS* サイトへ結合することによって、SMC (Structural Maintenance of Chromosome) タンパク質の *oriC* 領域への結合を誘導し、そのことが効率的な染色体分離を促進させることがわかってきた (Gruber & Errington, 2009, Sullivan et al, 2009)。Gruber と Errington は、SMC が複製装置 (Replisome) から排出されてくる新生鎖 DNA を *oriC* 近傍領域で折りたたみむことにより “Organization center” として機能し、そのことが効率的な染色体分離を促進すると提案した (Gruber & Errington, 2009)。重要なことに、Spo0J と SMC 間の相互作用は Soj の欠損には影響されない。このことは、Spo0J が SMC 依存的であるが Soj 非依存的に染色体分離の過程に関わり機能していることを示している。

一方、Murray と Errington は、Soj がその細胞内局在に依存して、DnaA 活性の阻害および活性化を制御する分子スイッチとして機能すること、そして、Soj の活性と細胞内局在は Spo0J によって制御されることを示した (Murray & Errington, 2008)。彼らは、ヌクレオチドが結合していない Soj が DnaA に直接結合し、DnaA 活性を阻害することを明確に示した。さらに、*spo0J* 欠損株や ATP 加水分解能を失った変異型 Soj (SojD40A) を持つ変異株では、ATP-Soj が協調的かつ非特異的に染色体 DNA へ結合し、DnaA が活性化することを示した。しかし、DnaA と SojD40A 間の直接的な相互作用は、Two-hybrid 解析および *in vivo* の Pull-down 法のいずれでも観察されておらず、Soj がどのように DnaA を活性化するのかについては、未だそのメカニズムは明らかにされていない。このようにして Spo0J は、Soj の内在 ATPase 活性を促進し、DnaA 活性を負に制御している (Scholefield et al, 2011b)。

## 1.5. *oriC* 外の DBC による新規の機能

真核および原核生物いずれの場合においても、複製開始タンパク質への変異導入は多面的な表現型を誘導する。それらは、細胞周期の様々な過程 (染色体分離、細胞分裂、細胞増殖、転写制御) の機能不全として発現することが知られている (Scholefield et al, 2011a)。実際、

枯草菌においてもこのような細胞周期の過程に関わる多くの遺伝子がDnaAにより転写制御されていることがこれまでに報告されている (Breier & Grossman, 2009, Goranov et al, 2005)。我々の研究室ではこれまでに、対数増殖期において枯草菌 DnaA が安定的に結合する染色体上の領域を明らかにしてきた (Ishikawa et al, 2007)。その結果、DnaA は *oriC* 領域 (*dnaA* 上流[*oriC1*]および *dnaA-dnaN* の遺伝間領域[*oriC2*]) だけではなく、染色体上の 6 箇所の遺伝子間領域 ([*gcp-ydiF*], [*yqeG-sda*], [*ywIC-ywIB*], [*ywcl-vpr*], [*yydA-yycS*], [*thdF-jag*]) に結合していることが明らかになった。

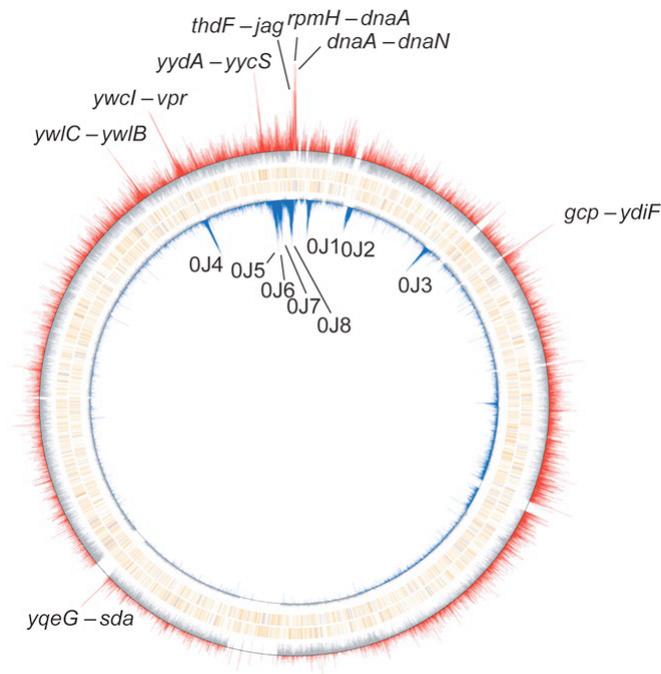


図 I .4 枯草菌染色体上の DnaA と Spo0J の結合プロフィール

DnaA (外周赤棒) および Spo0J (内周青棒) の結合シグナルは、ChAP 精製分画中に含まれるコントロール DNA のシグナル強度を減じて求めた。OJ1-OJ8 は、Lin と Grossman により報告された Spo0J 結合領域 (Lin DC & Grossman AD,1998) と一致する。DnaA-box は、DnaA 結合シグナル下の垂線として以下の通り表した。TTATCCACA: 赤, TTATACACA, TTATAGACA, TTATATACA: 青, 他の 1 ベースミスマッチを含む DnaA-box: オレンジ。(Ishikawa et al, 2010) より引用し一部改編。

また、[*yqeG-sda*]領域を除く 5 箇所の結合領域は、*oriC* 近傍領域に集中していた。一方で、DnaA が直接 DBC 下流に位置する遺伝子の転写を正 (*sda*) または負 (*dnaA*, *ywIC*, *yydA*) に制御していることも同時に明らかになった (Burkholder et al, 2001, Ishikawa et al, 2007)。他の *Bacillus* 属の染色体上においても DnaA が結合する DBC を推定したところ、枯草菌とは異なる遺伝子の 上流に位置しているが、それらの DBC も *oriC* 近傍に集中していることがわかった。これらの事実は、枯草菌 DnaA-box は、これまで報告されていない他の

機能を担っていることを強く示唆するものである。ひとつは、大腸菌で報告されている *datA* サイトと同様に、DBC が複製開始因子として活性型である ATP-DnaA の細胞内量を制御する可能性である (Kitagawa et al, 1998)。もうひとつは、上記の Spo0J の様に、DnaA が *oriC* 近傍の DBC への結合を介して *oriC* 周辺領域の構造の維持に働き、適切な染色体複製開始を促すという可能性である。

本研究では、*oriC* 外の DBC が担う新規の機能について明らかにすることを目指した。そのため *oriC* 外に位置する 6 箇所の DBC を同時に削除させた変異株 ( $\Delta$ 6DBC) を作製し、その細胞では複製開始時期が早まることを見出した。この表現型は、DBC を染色体へ再導入することにより相補されるが、導入する位置が *terC* 近傍など *oriC* から遠位であっても回復することが分かった。これらの結果は、*oriC* 外の DBC は、転写制御だけではなく、複製開始制御にも機能していることを示している。さらに、 $\Delta$ 6DBC 株において Spo0J を欠損させた場合には、多面的な表現型がみられ、その結果として著しい細胞の増殖阻害が引き起こされることがわかったが、この増殖阻害は、Soj への自然突然変異の導入や Soj 自身の欠損により回復することが明らかとなった。以上の結果から、枯草菌染色体上の *oriC* 外に存在する DBC は、過剰な DnaA 分子を隔離すること、または、ATP 加水分解を促進することにより DnaA を不活性化し複製開始を負に制御していることが明らかになった。さらに、これらの *oriC* 外 DBC は、Spo0J/Soj と並んで、適正な頻度で複製が開始されるように DnaA 活性を制御する主要なシステムであると考えられる。

## II. 材料と方法

### II.1. 菌株とプラスミドおよびプライマー

本研究で使用した枯草菌株を表II.1に、プラスミドを表II.2に示した。また、菌株およびプラスミド構築の際に用いた合成プライマーの配列を表II.3に示した。プラスミド構築の為に大腸菌 C600 (*F*- *tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1*  $\lambda$ -) 株および DH5 $\alpha$  (*F*- *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZAM15  $\Delta$  (lacZYA-argF) U169, hsdR17 (rK- mK+) ,  $\lambda$ -) 株を使用した。*

表 II.1 本研究で使用した菌株

菌株	遺伝子型	由来と参考文献 <sup>a</sup>
NIS2020	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, purA::PrpmH-lacO-dnaA-lacI-cat</i>	Y. Ogura et al., 2001
NIS2065	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, amyE::pDLAH (PdinC-bgaB-erm) , purA::PrpmH-lacO-dnaA-lacI-cat</i>	Y. Ogura et al., 2001
NIS6074	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, <math>\Delta</math>spo0J::erm</i>	Y. Ogura et al., 2003
NIS6077	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, <math>\Delta</math> (spo0J-soj) ::tet</i>	Y. Ogura et al., 2003
NIS6072	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, spo0J-gfpmut1 (cat)</i>	Y. Imai et al., 2000
JWV086	<i>amyE::Pxyl-tetR-mCherry (spec) , hutM (345°) ::tetO (kan)</i>	J. W. Veening et al., 2009
OC003	<i>abrB::spec</i>	O. Chumsakul et al., 2010
168SDC	<i><math>\Delta</math>sigD::cat</i>	M. Serizawa et al., 2004
168	<i>trpC2</i>	Laboratory stock
MYA024	<i><math>\Delta</math>DBC[yydA-yycS]::tet</i>	PCR product -> 168 (before removal of <i>tet</i> cassette)
MYA155	<i><math>\Delta</math>DBC[gcp-ydiF]</i>	PCR product -> 168
MYA156	<i><math>\Delta</math>DBC[yqeG-sda]</i>	PCR product -> 168
MYA157	<i><math>\Delta</math>DBC[ywlc-ywlB]</i>	PCR product -> 168
MYA018	<i><math>\Delta</math>DBC[ywcl-vpr]</i>	PCR product -> 168
MYA019	<i><math>\Delta</math>DBC[yydA-yycS]</i>	PCR product -> 168
MYA158	<i><math>\Delta</math>DBC[thdF-jag]</i>	PCR product -> 168
MYA143	<i><math>\Delta</math>DBC[gcp-ydiF], <math>\Delta</math>DBC[yqeG-sda], <math>\Delta</math>DBC[ywlc-ywlB], (<math>\Delta</math>6DBC) <math>\Delta</math>DBC[ywcl-vpr], <math>\Delta</math>DBC[yydA-yycS], <math>\Delta</math>DBC[thdF-jag]</i>	PCR products -> 168
HO1009	<i><math>\Delta</math>DBC[gcp-ydiF], <math>\Delta</math>DBC[yqeG-sda], <math>\Delta</math>DBC[ywlc-ywlB], (<math>\Delta</math>5DBC) <math>\Delta</math>DBC[ywcl-vpr], <math>\Delta</math>DBC[thdF-jag]</i>	PCR products -> MYA143
HO1001	<i><math>\Delta</math>yydA::tet</i>	PCR product -> 168
HO1010	<i><math>\Delta</math>yydA::tet, orf1 (ochre)</i>	PCR product -> 168
HO1011	<i><math>\Delta</math>yydA::tet, orf2 (ochre)</i>	PCR product -> 168

菌株	遺伝子型	由来と参考文献 <sup>a</sup>
HO1230	$\Delta$ DBC[ <i>gcp-ydiF</i> ], $\Delta$ DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]::tet	MYA024 -> MYA155
HO1231	$\Delta$ DBC[ <i>yqeG-sda</i> ], $\Delta$ DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]::tet	MYA024 -> MYA156
HO1232	$\Delta$ DBC[ <i>ywlC-ywlB</i> ], $\Delta$ DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]::tet	MYA024 -> MYA157
HO1233	$\Delta$ DBC[ <i>ywcl-vpr</i> ], $\Delta$ DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]::tet	MYA024 -> MYA018
HO1234	$\Delta$ DBC[ <i>thdF-jag</i> ], $\Delta$ DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]::tet	MYA024 -> MYA158
HO1243	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ [ <i>yydA-yycS</i> ] (353°) ::DBC[ <i>yqeG-sda</i> ] ( <i>tet</i> )	PCR product -> MYA143
HO1244	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ [ <i>yydA-yycS</i> ] (353°) ::DBC[ <i>ywlC-ywlB</i> ] ( <i>tet</i> )	PCR product -> MYA143
HO1245	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ [ <i>yydA-yycS</i> ] (353°) ::DBC[ <i>ywcl-vpr</i> ] ( <i>tet</i> )	PCR product -> MYA143
HO1246	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ [ <i>yydA-yycS</i> ] (353°) ::DBC[ <i>thdF-jag</i> ] ( <i>tet</i> )	PCR product -> MYA143
HO1247	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ [ <i>yydA-yycS</i> ] (353°) ::DBC[ <i>gcp-ydiF</i> ] ( <i>tet</i> )	PCR product -> MYA143
HO1030	$\Delta$ ( <i>soj-spo0J</i> ) ::tet	NIS6077 -> 168
HO1034	$\Delta$ <i>spo0J</i> ::erm	NIS6074 -> 168
HO1035	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ <i>spo0J</i> ::erm	NIS6074 -> MYA143
HO1225	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ <i>spo0J</i> ::erm, <i>sojT88M</i>	spontaneous <i>soj</i> mutant of HO1035
HO1031	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ ( <i>soj-spo0J</i> ) ::tet	NIS6077 -> MYA143
HO1065	<i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> )	JWV086 -> 168
HO1067	$\Delta$ 6DBC, <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> )	JWV086 -> MYA143
HO1069	$\Delta$ <i>spo0J</i> ::erm, <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> )	JWV086 -> HO1034
HO1071	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ <i>spo0J</i> ::erm, <i>sojT88M</i> , <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> )	JWV086 -> HO1225
HO1226	$\Delta$ 6DBC, <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> ), $\Delta$ <i>spo0J</i> ::erm	HO1035 -> HO1067
HO1176	$\Delta$ 5DBC, <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> )	JWV086 -> HO1009
HO1175	$\Delta$ 6DBC, <i>ypqA</i> (200°) ::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ] ( <i>tet</i> ), <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> )	JWV086 -> HO1021
HO1177	$\Delta$ 5DBC, <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> ), $\Delta$ <i>spo0J</i> ::erm	HO1034 -> HO1176
HO1179	$\Delta$ 6DBC, <i>ypqA</i> (200°) ::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ] ( <i>tet</i> ), <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> ), $\Delta$ <i>spo0J</i> ::erm	HO1034 -> HO1175
HO1194	$\Delta$ ( <i>soj-spo0J</i> ) ::tet, <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> )	JWV086 -> HO1030
HO1200	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ ( <i>soj-spo0J</i> ) ::tet, <i>amyE</i> ::Pxyl-tetR-mCherry ( <i>spec</i> ), <i>hutM</i> (345°) ::tetO ( <i>kan</i> )	JWV086 -> HO1301
HO1072	$\Delta$ <i>spo0J</i> ::tet	PCR product -> 168
HO1073	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ <i>spo0J</i> ::tet	HO1072 -> MYA143
HO1050	<i>spo0J-gfpmut1</i> ( <i>cat</i> )	NIS6072 -> 168
HO1051	$\Delta$ 6DBC, <i>spo0J-gfpmut1</i> ( <i>cat</i> )	NIS6072 -> MYA143

菌株	遺伝子型	由来と参考文献 <sup>a</sup>
168M	<i>amyE::Pxyl-MCS (tet)</i>	pXTt-MCS -> 168
MU01	$\Delta$ ( <i>oriC-dnaA</i> ) :: <i>repN PrpmGA-dnaN-rpmH (spec)</i>	PCR product -> 168
MU02	<i>amyE::Pxyl-dnaA (erm)</i>	PCR product -> 168M
MU03	$\Delta$ ( <i>oriC-dnaA</i> ) :: <i>repN PrpmGA-dnaN-rpmH (spec)</i> , <i>amyE::Pxyl-dnaA (erm)</i>	MU02 -> MU01
HO1201	$\Delta$ ( <i>oriC-dnaA</i> ) :: <i>repN PrpmGA-dnaN-rpmH (spec)</i> , <i>amyE::Pxyl-dnaA (erm)</i> , $\Delta$ <i>spo0J::tet</i>	HO1072 -> MU03
MU04	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ ( <i>oriC-dnaA</i> ) :: <i>repN PrpmGA-dnaN-rpmH (spec)</i>	MU01 -> MYA143
HO1203	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ ( <i>oriC-dnaA</i> ) :: <i>repN PrpmGA-dnaN-rpmH (spec)</i> , <i>amyE::Pxyl-dnaA (erm)</i>	MU02 -> MU04
HO1206	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ ( <i>oriC-dnaA</i> ) :: <i>repN PrpmGA-dnaN-rpmH (spec)</i> , <i>amyE::Pxyl-dnaA (erm)</i> , $\Delta$ <i>spo0J::tet</i>	HO1072 -> HO1203
HO1019	$\Delta$ 6DBC, <i>yabT</i> (7°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (tet)</i>	PCR product -> MYA143
HO1020	$\Delta$ 6DBC, <i>yhaR</i> (90°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (tet)</i>	PCR product -> MYA143
HO1238	$\Delta$ 6DBC, <i>cgeD</i> (180°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (erm)</i>	PCR product -> MYA143
HO1239	$\Delta$ 6DBC, <i>yonN</i> (190°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (cat)</i>	PCR product -> MYA143
HO1021	$\Delta$ 6DBC, <i>ypqA</i> (200°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (tet)</i>	PCR product -> MYA143
HO1022	$\Delta$ 6DBC, <i>yteA</i> (270°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (tet)</i>	PCR product -> MYA143
HO1023	$\Delta$ 6DBC, <i>yxbC</i> (353°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (tet)</i>	PCR product -> MYA143
HO1242	$\Delta$ 6DBC, <i>cgeD</i> (180°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (erm)</i> , <i>ypqA</i> (200°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (tet)</i>	HO1238 -> HO1021
HO1241	$\Delta$ 6DBC, <i>cgeD</i> (180°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (erm)</i> , <i>yonN</i> (190°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (cat)</i> , <i>ypqA</i> (200°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (tet)</i>	HO1239 -> HO1242
HO1041	$\Delta$ 5DBC, $\Delta$ <i>spo0J::erm</i>	HO1034 -> HO1009
HO1178	$\Delta$ 6DBC, <i>ypqA</i> (200°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (tet)</i> , $\Delta$ <i>spo0J::erm</i>	HO1034 -> HO1021
HO1254	$\Delta$ 6DBC, <i>cgeD</i> (180°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (kan)</i> , <i>yonN</i> (190°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (cat)</i> , <i>ypqA</i> (200°) :: <i>DBC[yyda-yyeS] (tet)</i> , $\Delta$ <i>spo0J::erm</i>	pME::km, HO1034 -> HO1241
HO1235	<i>amyE::pDLAH (PdinC-bgaB-erm)</i>	NIS2065 -> 168
HO1236	$\Delta$ 6DBC, <i>amyE::pDLAH (PdinC-bgaB-erm)</i>	NIS2065 -> MYA143
HO1237	$\Delta$ <i>spo0J::tet</i> , <i>amyE::pDLAH (PdinC-bgaB-erm)</i>	NIS2065 -> HO1072
HO1260	$\Delta$ 5DBC, $\Delta$ <i>spo0J::tet</i> , <i>amyE::pDLAH (PdinC-bgaB-erm)</i>	HO1072, HO1236 -> HO1009
HO1251	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ <i>spo0J::tet</i> , <i>amyE::pDLAH (PdinC-bgaB-erm)</i>	HO1072 -> HO1236
HO1248	<i>amyE::pDLAH (PdinC-bgaB-erm)</i> , <i>purA::PrpmH-lacO-dnaA-lacI-cat</i>	NIS2020 -> HO1235
HO1008	pO2HC	pO2HC -> 168
HO1015	$\Delta$ 6DBC, pO2HC	pO2HC -> MYA143

菌株	遺伝子型	由来と参考文献 <sup>a</sup>
HO1012	pBOX-DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	pBOX <i>yydA-yycS</i> -> 168
HO1016	Δ6DBC, pBOX-DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	pBOX <i>yydA-yycS</i> -> MYA143
HO1029	Δ5DBC, <i>dnaA-12his</i>	pMUTinAhisN -> HO1009
HO1128	Δ6DBC, <i>dnaA-12his</i>	pMUTinAhisN -> MYA143
HO1192	Δ6DBC, <i>dnaA-12his</i> , pBOX-DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	pBOX <i>yydA-yycS</i> -> HO1128

(a) “->” は、染色体、プラスミドおよび PCR 増幅産物などの DNA を用いた形質転換を表す。

表 II.2 本研究で使用したプラスミド

□□□□□	□□□□□□□□	□□□□□□□□
pMW118	Low copy vector with a replication origin of pSC101 ( <i>bla</i> )	NIPPON GENE CO., LTD.
pMW118FRT-Cm	pMW118 derivative with a FRT-flanked <i>cat</i> cassette used for a PCR template	This study
pMW118FRT-Spc	pMW118 derivative with a FRT-flanked <i>spc</i> cassette used for a PCR template	This study
pCP20	A plasmid with a temperature sensitive replication origin and a FLP gene ( <i>cat, bla</i> )	Cherepanov <i>et al.</i> , 1995
pCHE11	A shuttle vector in <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i> carrying a temperature-sensitive replication mutation in <i>B. subtilis</i>	Ochi <i>et al.</i> , 2009
pCH11FLP	pCHE11 derivative with a FLP gene	This study
pO2HC	Shuttle vector in <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i>	Ishikawa <i>et al.</i> , 2006
pBOX-DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	pO2HC derivative with insertion of a DnaA box cluster at an intergenic region between <i>yydA-yycS</i>	This study
pMUTinAhisN	pMUTinNC derivative to attach twelve histidine coding at 3' end of <i>dnaA</i> without plasmid sequence	Ishikawa <i>et al.</i> , 2007

表 II.3 本研究で使用した合成プライマー

- (a) 大文字はテンプレートへアニールする配列を、小文字は付加したタグ配列を、下線は制限酵素認識配列を示す。
- (b) 枯草菌ゲノム配列上の位置および方向を示す。start および end の値は、SubtiList database (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/index.html>) に対応したゲノム上の位置。strand は、プライマーがアニールするゲノム配列の方向性を示す。
- (c) 2 文字の略号は、以下に示す制限酵素を表す。Ba, *Bam*H I; Bb, *Bbe* I; Bg, *Bgl* II; Ec, *Eco*R I; Hi, *Hind* III; Kp, *Kpn* I; No, *Not* I; Sc, *Sac* I; Sa, *Sal* I; Sm, *Sma* I; Sp, *Spe* I; Xb, *Xba* I; Xh, *Xho* I

プライマー	配列 (5' -> 3') <sup>a</sup>	位置 <sup>b</sup> (Start, end, strand)		説明 <sup>c</sup>
<b>Deletion of multiple DnaA Box clusters from the <i>B. subtilis</i> genome</b>				
gcp-F1	GGACGATGGGATTGCCATATCC	643331	643352	+
gcp-R1	cgtaatcatgggtcatagctgTTA TCTCGTGAGACTTTGATAAGAAG	643820	643845	-

プライマー	配列 (5' → 3') <sup>a</sup>	位置 <sup>b</sup> (Start, end, strand)			説明 <sup>c</sup>
gcp-F2	ggatcctctagagtcgaccTTAA TCTTCTTCTGTGGATAGTTC	644075	644098	+	
gcp-R2	TTAGACAGCAAAGAAGTTCTCG	644554	644575	-	
sda-F1	GCAGGCAGAGCATATGGATACG	2647038	2647059	-	
sda-R1	cgtaatcatggatcatagctgCAG AACGATTGTTCTTATATGC	2646552	2646573	+	
sda-F2	ggatcctctagagtcgaccCCTG GTGAAGAAACCAATTTTTG	2646428	2646451	-	
sda-R2	TATGGTAGCCGTTTCGGTTTCC	2645936	2645957	+	
ywC-F1	GAAAAAGAAGACGGCACAGAAGT G	3793741	3793764	-	
ywC-R1	cgtaatcatggatcatagctgACT GCACTTATCCAGACGCT	3793182	3793201	+	
ywC-F2	ggatcctctagagtcgaccCGCT TGTTTTATTACAGGACATC	3793105	3793127	-	
ywC-R2	CTCCGCTTTTGTGGGACTTGGC	3792547	3792568	+	
vpr-F1	TGCTTTGGCGATTCCCTGAAGG	3906081	3906102	+	
vpr-R1	cgtaatcatggatcatagctgAGT TTTCAAAGCGGTCTCC	3906572	3906591	-	
vpr-F2	ggatcctctagagtcgaccAACA AAATCCAATAAATGGTCCAAATG	3906761	3906787	+	
vpr-R2	CCTTAACGTCTTTTACCGCTAG	3907242	3907263	-	
yydA-F1	CTTTAGTCTTCTGTAATGGTGG	4133429	4133451	+	
yydA-R1	cgtaatcatggatcatagctgCAA TATTGTGACAATCGGAAAAAC	4133909	4133931	-	
yydA-F2	ggatcctctagagtcgaccATTC GACAAACAAGCTGTTGATG	4134296	4134318	+	
yydA-R2	CCGGCTTTATTGCTGGTAATCCG	4134773	4134795	-	
thdF-F1	CTGATGTGACTGTTCAAGAAAAGC	4212593	4212615	-	
thdF-R1	cgtaatcatggatcatagctgGGA TACACCTAAAAAGAAAAAAC	4212109	4212131	+	
thdF-F2	ggatcctctagagtcgaccCAAA TCTTCCACTTCGAACCAAAC	4211989	4212012	-	
thdF-R2	CGCTCTGATTAAGTCCATAACCG	4211497	4211519	+	
FRT-F	CAGCTATGACCATGATTACG				Outside of MCS in pMW118FRT-Cm and pMW118FRT-Spc
FRT-R	GGTCGACTCTAGAGGATCC				Outside of MCS in pMW118FRT-Cm and pMW118FRT-Spc
FLT-F	gcggatccGTTGAACAAGTCTGG AAAGAAATGC				Outside of <i>Hind</i> III site in pCP20, Ba
FLT-R	gcggatccCTGAATCCGGTGAGA ATGGC				Ba
<b>Construction of pCHE11FLP</b>					
pMB0029	gcggatccGTTGAACAAGTCTGG AAAGAAATGC				Outside of <i>Hind</i> III site in pCP20, Ba

プライマー	配列 (5' -> 3') <sup>a</sup>	位置 <sup>b</sup> (Start, end, strand)		説明 <sup>c</sup>
pMB0030	gcggatccCTGAATCCGGTGAGA ATGGC			Ba
<b>Construction of pMW118FRT-Cm</b>				
pMB0033	gcgaattcgaagttcctatactt tctagagaataggaacttcCGGC AATAGTTACCCCTTATTATC			Ec
pMB0034	gcggatccgaagttcctattctc tagaaagtataggaacttcGATC TGGAGCTGTAATATAAAAAACC			Ba
<b>Construction of pMW118FRT-Spc</b>				
pMB0035	gcgaattcgaagttcctatactt tctagagaataggaacttcCGAG TTCAAAAATTATATGGAGATCTG			Ec
pMB0036	gcggatccgaagttcctattctc tagaaagtataggaacttcAGCC TAATTGAGAGAAGTTTCTATAG			Ba
<b>Real-Time PCR assay</b>				
RTrpmH-dna A.f	TTTAGTATCCACAGAGGTTATCG AC	17	41	+ amplification of <i>oriC1</i>
RTrpmH-dna A.r	CTTATCCACAAAGCGGACAAC	88	108	- amplification of <i>oriC1</i>
RTyydA-yyeS .f	TTGTGGATATCTTTTCTGTATTT TGTG	4133988	4134014	+ amplification of <i>yydA-yyeS</i>
RTyydA-yyeS .r	CATACTAACAGTTTATCCCACAG C	4134069	4134092	- amplification of <i>yydA-yyeS</i>
<i>oriC.f</i>	TGTCATCGGATCTGGAAACC	769	788	+ amplification of <i>oriC2</i>
<i>oriC.r</i>	GATCGCATGCATTAAGTGTG	882	901	- amplification of <i>oriC2</i>
<i>terC.f</i>	AGCGATCCAGCTCTACCTTC	2017136	2017155	+ amplification of <i>terC</i>
<i>terC.r</i>	GCATGAGCTTCTTGATGACG	2017262	2017281	- amplification of <i>terC</i>
oHO274	GGTGTACTATCAGAAATAAGCAA CTG	4139226	4139251	+ amplification of <i>rapG</i> (negative control)
oHO275	AGCATGCTAGCGATTTCTGC	4139303	4139322	- amplification of <i>rapG</i> (negative control)
<b>HO1001 (<math>\Delta</math>yydA::tet)</b>				
<i>yydA-yyeS.f5</i>	CGTGATTTCCCTGGCACTAAGT	4132943	4132963	+
<i>yydA-yyeS.r5</i>	cggaaggatactacatcctggGC ATCTCCACCATACAGAAAGAC	4133434	4133457	-
<i>yydA-yyeS.f6</i>	gctcttctggtggagtctatccT CACAGGTCATCCCCACTTTAAAA AC	4133936	4133961	+
<i>yydA-yyeS.r2</i>	GCGTATATTTCTAAGTCTGGACT GC	4134473	4134497	-

プライマー	配列 (5' → 3') <sup>a</sup>	位置 <sup>b</sup> (Start, end, strand)		説明 <sup>c</sup>
rPCR-tetF	ggatagactccaccagaagagcC AGGTCGATATGAACAGC			
rPCR-tetR	ccaggatgtagtatccttccgGG GTTATTGTCTCATGAGCG			
<b>HO1010 (<math>\Delta yydA::tet</math>, <i>orf1</i> (ochre))</b>				
och1-f	GTATTTTGTGTTAGATCATTC G	4134005	4134026	+
och1-r	CGAATGATCTAACACAAAAT AC	4134005	4134026	-
<b>HO1011 (<math>\Delta yydA::tet</math>, <i>orf2</i> (ochre))</b>				
och2-f	CACAAGAATATTACGCTTGT TTC	4134167	4134189	+
och2-r	GAAACAAGCGTAATATTCTT GTG	4134167	4134189	-
<b>HO1009 (<math>\Delta 5DBC</math>)</b>				
<i>yydA-yyeS.r2</i>	GCGTATATTTCTAAGTCTGGACT GC	4134473	4134497	-
<i>yydA-yyeS.f4</i>	TCTCAAAGTTGGATGTGTGC			
<i>yydA-yyeS.f2</i>	tctcaaagttggatgtgtgcAAC ATTGCATTGGTTGCTG	4133363	4133381	+
<i>yydA-yyeS.r3</i>	gcttgagtcaattccgctgtcgC CCACACATCGGTTACATCC	4134345	4134364	-
APNC-F	CGACAGCGGAATTGACTCAAGC			
chpA-R	gcatg <u>cg</u> gcccgc <u>ct</u> acgGGATCCT ACCCAATCAGTACGTTAATTTTG			No
<i>yydA-yyeS.f3</i>	cgtagcggcccgc <u>at</u> gcAACATTG CATTGGTTGCTG	4133363	4133381	+ No
<i>yydA-yyeS.r4</i>	TGCCACCGTTATTTCTCTGG	4134906	4134925	-
<b>HO1243, HO1244, HO1245, and HO1246</b>				
<i>yydA-yyeS.f5</i>	CGTGATTTCTGGCACTAAG T	4132943	4132963	+ HO1001 was used as a template
rPCR-tetF	ggatagactccaccagaagagcCAGGTC GATATGAACAGC			HO1001 was used as a template
oHO256	ccaggatgtagtatccttccgATTCGAC AAACAAGCTGTTGATG	4134296	4134318	+ HO1001 was used as a template
pMB0048	ATTCGACAAACAAGCTGTTG ATG	4134296	4134318	+ HO1001 was used as a template
oHO292	cggaaggatactacatcctggGACAATG AGAAGCTTAATCAGGAG	644126	644149	-
oHO258	gctcttctggtgagctatccGATTACG CTTGTCATTCTCC	643686	643706	+
oHO259	cggaaggatactacatcctggCATCAGA CAGTTTTCTCATGC	2646695	2646715	-
oHO260	gctcttctggtgagctatccATATTTTT TACAAACTCGTCAGG	2646292	2646314	+
oHO261	cggaaggatactacatcctggAAAAAA	3793185	3793206	-

プライマー	配列 (5' → 3') <sup>a</sup>	位置 <sup>b</sup> (Start, end, strand)			説明 <sup>c</sup>
	CGCTCTGGATAAGTGC				
oHO262	gctcttctggtgagctatccTCCGAA TGTGGACAATCAG	3792809	3792828	+	
oHO263	cggaaggatactacatctggCCGTAAT GCCTGTGGATAAC	3906920	3906939	-	
oHO264	gctcttctggtgagctatccGCTTTGA AAACTTTATACACAAG	3906580	3906602	+	
oHO265	cggaaggatactacatctggCAGCGA AAGAAAAATTATTCACG	4212316	4212338	-	
oHO266	gctcttctggtgagctatccTTGGTTC GAAGTGGAAAGATTTG	4211991	4212012	+	
<b>HO1019, HO1020, HO1021, HO1022 and HO1023</b>					
yabT-f1	AAGTCATCCGCACAAGATCC	72886	72905	+	
yabT-r1	gcagtcagacttagaaatatac gcGGCTACATGCCAAACTCGTC	73824	73843	-	
yabT-f2	ccaccattacagaaagactaaag AACGAAGACGCGATATACCC	74700	74719	+	
yabT-r2	TTGCTCATCTTCCGTCAGTG	75600	75619	-	
yhaR-f1	AATTCTGGCGAACATCAAGC	1059896	1059915	+	
yhaR-r1	gcagtcagacttagaaatatac gcGGCCGATTCAGGATAATCTC	1060838	1060857	-	
yhaR-f2	ccaccattacagaaagactaaag TAACAGATCAGCCGAAAGC	1061564	1061583	+	
yhaR-r2	CGAAAGAACGCTTGATCTCC	1062540	1062559	-	
ypqA-f1	ACGGTAACGATGCTCTCTCC	2335804	2335823	+	
ypqA-r1	gcagtcagacttagaaatatac gcTGAATGAAGGGATAACGGTTG	2336663	2336683	-	
ypqA-f2	ccaccattacagaaagactaaag TGGAACGAGCAGACAATGAC	2337143	2337162	+	
ypqA-r2	TTTCTTGGAAATTGGTCCTTC	2338116	2338135	-	
yteA-f1	TCTTGCTTGAAATCGGGAAC	3152191	3152210	+	
yteA-r1	gcagtcagacttagaaatatac gcATGTGATCGCCTCGTTTCTC	3153035	3153054	-	
yteA-f2	ccaccattacagaaagactaaag ATCTCCACGCTGATTGAACC	3153757	3153776	+	
yteA-r2	GGATGCGCTCTTGGAATATC	3154633	3154652	-	
yxbC-f1	GCAGGCAAGAGTAGGAGACG	4096759	4096778	-	
yxbC-r1	gcagtcagacttagaaatatac gcCCGATTCGGTTACAGCACTC	4095906	4095925	+	
yxbC-f2	ccaccattacagaaagactaaag TCCACGCAATTGGTATTCAG	4094963	4094982	-	
yxbC-r2	CAGGAGGAAATCTTCGCATC	4094026	4094045	+	
<b>HO1238</b>					
oHO249	TAAGTAACGAACGGCGATGC	2146792	2146811	+	For amplification of front region of <i>cgeD</i>
oHO250	cggaaggatactacatcctggGA TGACAGAGGCTCTGCTTGC	2147341	2147361	-	For amplification of front region of <i>cgeD</i>

プライマー	配列 (5' -> 3') <sup>a</sup>	位置 <sup>b</sup> (Start, end, strand)			説明 <sup>c</sup>
oHO253	ccaggatgtagtatccttccgGT TTTCCGATTGTCACAATATTG	4133909	4133931	+	For amplification of DBC[ <i>yydA-yyeS</i> ]
oHO254	ggagtccttgacagtcctggagCAT CAACAGCTTGTTCGAAT	4134296	4134318	-	For amplification of DBC[ <i>yydA-yyeS</i> ]
oHO255	ctccaggactgcaagactccGAA TTATTTCTCCCGTTAAATAATA G				pMUTinNC was used as a template
rPCR-ErmF	ggatagactccaccagaagagcA ACAAATAGGGGTTCGCGCA				pMUTinNC was used as a template
oHO251	gctcttctggtggagtctatccA TTTAAAAAGCACCCAGCTTAC	2147362	2147384	+	For amplification of back region of <i>cgeD</i>
oHO252	CCTCCTTCTGTTGCAGTTGG	2147937	2147956	-	For amplification of back region of <i>cgeD</i>
<b>HO1239</b>					
oHO276	CAAGGTGTACAGCGATTTTACC	2224314	2224335	+	For amplification of front region of <i>yonN</i>
oHO277	cggaaggatactacatcctggGG TAGCCTTTCCTGTCGTCC	2224823	2224842	-	For amplification of front region of <i>yonN</i>
oHO280	ctccaggactgcaagactccATC ATCGGCAATAGTTACCC				pDLT3 was used as a template
oHO281	gctcttctggtggagtctatccC GGCGTAGAGGATCTGGAGC				pDLT3 was used as a template
oHO278	ggatagactccaccagaagagcG CACGCTTTGTCAAAAGAGC	2224844	2224864	+	For amplification of back region of <i>yonN</i>
oHO279	CCGCAATTAATATTCAGGGATAC	2225350	2225372	-	For amplification of back region of <i>yonN</i>
<b>HO1012 and HO1016 (pBOX<i>yydA-yyeS</i>)</b>					
<i>yydA-yyeS</i> .f1	atagggccatagtcgacGTTTT CCGATTGTCACAATATTG	4133909	4133931	+	Bb, Sa
<i>yydA-yyeS</i> .r1	catgaattcCATCAACAGCTTGT TTGTCTGAAT	4134296	4134318	-	Ec
<b>HO1072 and HO1073 (<math>\Delta</math><i>spo0J::tet</i>)</b>					
spo0J.f1	AAACAACGACGTCTGTCAACC	4206116	4206136	-	
spo0J.r1	gctcttctggtggagtctatccA AATAACGCATTAATCCCTTTTCC	4205390	4205413	+	
spo0J.f2	cggaaggatactacatcctggTA GAGCTTTGTCTGAACGAG	4204588	4204608	-	
spo0J.r2	GAACAGACCGTTCAACCGG	4204075	4204093	+	
<b>MU01</b>					
rpmH-r3	CGTAGTTATCTCCCGTCAATTTTC GC	4213449	4213473	+	
SDrpmH-f-d naN3'	ccttcctgtcagaacctattaaG GGAGGTGTCATAAATGAAAAG	4214406	4214427	-	
SDdnaN-f-Pr pmGA-SD	gtaaagtatttttagtttGGAGGA TAAAAATGAAATTCACG	1928	1950	+	

プライマー	配列 (5' -> 3') <sup>a</sup>	位置 <sup>b</sup> (Start, end, strand)			説明 <sup>c</sup>
dnaN-r	TTAATAGGTTCTGACAGGAAGG	3054	3075	-	
PrpmGA-f	TCTTCAATAATTCAGCAATTCAT TG	2573874	2573898	-	
PrpmGA-SD -r	CCTCCAAACTAAAAATCATTTAC	2573797	2573818	+	
doriC2-f-rep N	gccgttttataattggtttagata attaaACCTATTAATCCGATACA C	3067	3085	+	
doriC2-r3	CTCTTGAGATGCCTGCATGGATG GG	4061	4084	-	
rpmH-r-4	CATACGTAATGAGTTCAGACAAT GG	4213476	4213500	+	
doriC2-r4	CTGCGCCCATTTCTCGAGCTGTG C	4037	4060	-	
PrepN-F	CCTAAAATTAACATAAAAAATC CCAC				mini-pLS32 was used as a template
repN-R	TTAATTATCTAACCAATTATAAA ACGGC				mini-pLS32 was used as a template
SpecR-Prpm GA	CAATGAATTGCTGAATTATT				pUC19 spec was used as a template
SpecF-PrepN	gtgggatttttttatgtttaatt ttaggTCAAAAATTATATGGAGA TCTG				pUC19 spec was used as a template
<b>MU02</b>					
dnaAF-SDR2	ggcagattaggaggatttagcAT GGAAAATATATTAGACCTGTGG	410	433	+	
dnaAr-ErmF 2	gtgctagaggatcaattcttgaa CCGGTCCTGCTATTTAAGCTGTT C	1736	1759	-	
Pxyl-F	TCCTTCTAAGTCGGTTAGAATTC C				pXTt-MCS was used as a template
Pxyl-SD-R2	gctaaatcctcctaactctgccGA TTTAAGTGAACAAGTTTATCC				pXTt-MCS was used as a template
amyE-backF	ATCCGTTTAGGCTGGGCGGTG				pXTt-MCS was used as a template
amyE-backR	GTTGACTGCTAATGGAACGCACG				pXTt-MCS was used as a template
Erm-F2	TTCAAGAATTGATCCTCTAGCAC				pMUTinNC was used as a template
Erm-R	cacccgcccagcctaaacggatC TAACATTCCCTTTAGTAACGTGT AAC				pMUTinNC was used as a template
<b>Construction of pXTt-MCS</b>					
pUCMCS-F- adapter	aaaaagcaggctcGTTGTAAAAAC GACGGCCAGTG				
pUCMCS-R- adapter	agaaagctgggtcTGACCATGAT TACGCCAAGC				

## II.2. 培地と培養条件

細胞の培養には、富栄養培地としてLB (Luria-Bertani) 培地、最小培地としてSMM (Spizizen's minimal medium) (Spizizen, 1958) を使用した。上記の培地に、抗生物質を以下に示す終濃度で適宜加えた；50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  アンピシリン、0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  エリスロマイシン、5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  クロラムフェニコール、10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  テトラサイクリン、100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  スペクチノマイシン、5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  カナマイシン。蛍光顕微鏡を用いた解析には、SMM を使用し、25°Cで細胞の培養を行った。培地には、0.5% Glucose、0.5% Glycerol、1 g L<sup>-1</sup> L-グルタミン酸、微量金属溶液および要求性のアミノ酸を以下の濃度で適宜加えた；50 mg L<sup>-1</sup> L-トリプトファン、240 mg L<sup>-1</sup> L-スレオニン。フローサイトメトリー解析には、SMM を使用し、30°Cで細胞の培養を行った。培地には、0.5% glucose、Trace elements、50 mg L<sup>-1</sup> L-トリプトファン、3 g L<sup>-1</sup> L-グルタミン酸、3 g L<sup>-1</sup> L-アスパラギンおよび0.5g L<sup>-1</sup> カザミノ酸を加え使用した。

### LB (Luria-Bertani)

Bact Tryptone (Difco)	10 g
Bact Yeast Extract (Difco)	5 g
NaCl	5 g
Per liter	

### SMM (Spizizen's minimal medium)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
Na <sub>3</sub> citrate.2H <sub>2</sub> O	1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
2 mg mL <sup>-1</sup> FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	10 mL
0.1 mg mL <sup>-1</sup> MnSO <sub>4</sub>	10 mL
5 mg mL <sup>-1</sup> L-tryptophan	10 mL
50 % (w/v) D-glucose	10 mL
100x Trace elements [1]	10 mL
Per liter	

### [1] 100x 微量金属溶液

49.7 $\mu\text{M}$	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
12.5 $\mu\text{M}$	ZnCl <sub>2</sub>
2.5 $\mu\text{M}$	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
2.5 $\mu\text{M}$	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
2.5 $\mu\text{M}$	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O

### II.3. マーカーフリー遺伝子欠損法によるDBC欠損株の構築

枯草菌染色体上からの DBC の削除には、大腸菌で用いられてきたマーカーフリー遺伝子欠損法 (Cherepanov & Wackernagel, 1995, Datsenko & Wanner, 2000) を応用し利用した。この方法は、以下に示す 3 段階から成っている。(1) DBC を含む標的配列を薬剤耐性マーカーカセットにより置換する。なお、このカセットの両端には、FRT (FLP recognition target) 配列が付加されている。(2) ヘルパープラスミドから FLP recombinase を発現させ、マーカーカセットを除去する。(3) ヘルパープラスミドを枯草菌細胞内から除去する。

FRT 配列を両端に付加した薬剤耐性マーカーカセットを持つプラスミドを構築するために、クロラムフェニコール (*cat*) 耐性カセットを pDL2 (Fukuchi et al, 2000) を鋳型として、プライマー (pMB0033, pMB0034) を用いて PCR で増幅した。プライマー (pMB0033, pMB0034) 配列には FRT 配列と制限酵素認識配列 (*Bam*HI、*Eco*RI) が付加されている。同様に、スペクチノマイシン (*spc*) 耐性カセットをプラスミド pJL62 (Ishikawa et al, 2006) からプライマー pMB0035 と pMB0036 を用いて増幅した。PCR 増幅産物は、*Bam*HI と *Eco*RI で処理した後、プラスミド pMW118 plasmid (Nippon Gene Co., Ltd.) の *Bam*HI/*Eco*RI サイトに挿入した。こうして獲得したプラスミドを、各々 pMW118FRT-Cm と pMW118FRT-Spc とした。

FLP recombinase を枯草菌の細胞内で発現させるためのヘルパープラスミドを構築するために、FLP 遺伝子を pCP20 (Cherepanov & Wackernagel, 1995) から *Bam*HI 認識配列を付加したプライマー (pMB0029, pMB0030) を用いて増幅した。*Bam*HI 処理した PCR 産物は、pCHE11 (Ochi et al, 2009) の *Bam*HI サイトにクローニングした。pCHE11 は、枯草菌で自立複製可能な pUB110ts-2 の温度感受性複製開始システムをもち、大腸菌では pBR322 由来の複製が可能なシャトルベクターであり、得られたプラスミドを pCHE11FLP とした。

枯草菌染色体上から DBC を欠損させるために、FRT 配列を付加した薬剤耐性カセット (*cat* または *spc*) をプラスミド (pMW118FRT-Cm または pMW118FRT-Spc) からプライマー pMB0065 と pMB0066 を用いて増幅した。また、相同組み換えのための配列として標的配列の上流と下流約 500bp の領域を 168 株の染色体から PCR により増幅した。用いたプライマーセットは、各々上流領域が F1 と R1、下流領域は F2 と R2 である (表 3 参照)。またプライマー R1 と F2 は、各々 FRT-F と FRT-R の相補配列を含んでいる。3 個の PCR 産物

(上流領域、薬剤耐性カセット、下流領域) は、もっとも外側にアニールするプライマーF1とR2を用いてリコンビナントPCRにより1個の断片として増幅した。最終的に得られたDNA断片は、168 (wild-type) 株への形質転換に用いた。枯草菌への形質転換は、標準的方法是 (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961) により行い、二回交差の相同組換えによる形質転換体の選択には、クロラムフェニコールまたはスペクチノマイシンを使用した。

続いて薬剤耐性カセット配列を除去するために、形質転換体に pCHE11FLP を通常の形質転換法により導入し、カナマイシンを含む LB 培地上で 30°C、24 時間培養することにより、FLP recombinase による薬剤耐性カセットの 5'、3'末端にある 2 つの FRT サイト間での相同組換えを誘導し、カセットを除去した。さらに、プラスミドを除去するために数個の形質転換体を、抗生物質を含まない培地に植え継ぎ、pCHE11FLP の非許容温度である 37°C で一夜培養した。この時、pCHE11FLP の枯草菌細胞内からの除去を確認するために、カナマイシン感受性のクローンを選択した。選抜したクローンは、標的領域内の DBC が欠損していることをシーケンスにより確認した。

以上の過程により、以下に示す 6 株の欠損株を構築した。各々の株は、標的 DBC を欠損する意外は、168 (*trpC2*) 株と同様の遺伝的バックグラウンドを有している。MYA018 ( $\Delta$ DBC[ $\Delta$ ywcl-vprl]), MYA019 ( $\Delta$ DBC[yydA-yycS]), MYA155 ( $\Delta$ DBC[gcp-ydiF]), MYA156 (DBC[yqeG-sda]), MYA157 ( $\Delta$ DBC[ywlB-ywlC]), MYA158 ( $\Delta$ DBC[jag-thdF])。また、同様に 6 領域を同時に欠損させた株 $\Delta$ 6DBC も構築した。これは、単一領域欠損の過程 (薬剤耐性カセットを用いた DBC の置換とそれに引き続くカセットの除去) を 168 (wild-type) に対して繰り返し行うことで作製した。

## II.4. HO1009株 ( $\Delta 5\text{DBC}$ ) の構築

$\Delta 6\text{DBC}$  株染色体上の *yycA-yycS* 遺伝子間領域の欠損を、図 2.1 に示すように *mazF* 毒素遺伝子を有するネガティブセレクションのマーカークセット (Morimoto et al, 2009) を利用して、野生型に戻した (図 II.1)。

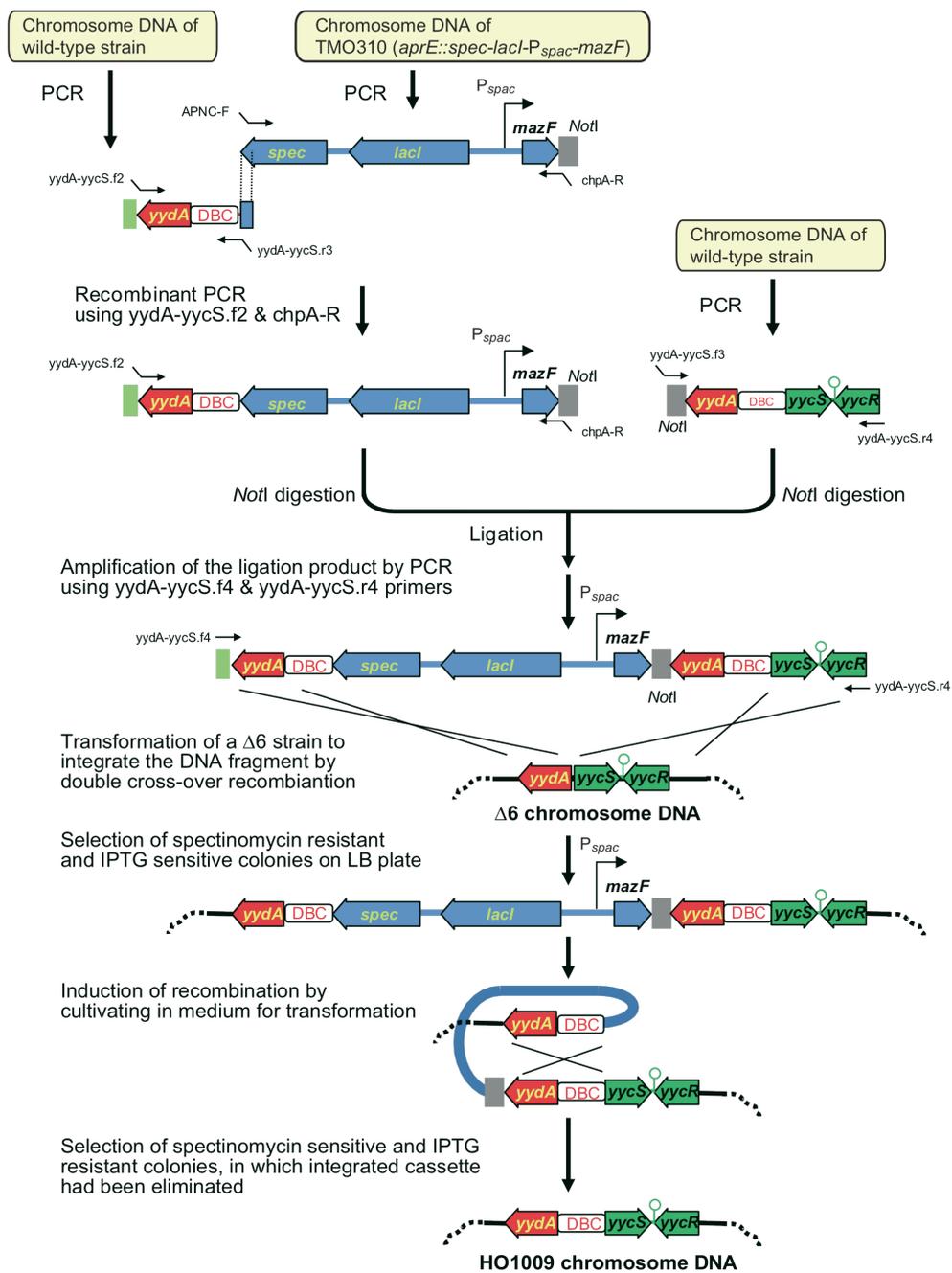


図 II.1 HO1009 ( $\Delta 5\text{DBC}$ ) の構築

## II.5. *oriC*配列と *dnaA*遺伝子欠損株 (MU01) の構築

DnaA 非依存的に染色体複製が開始する株 (MU01) を構築するために、*B. subtilis* var. *natto* 株のプラスミド pLS32 (Tanaka et al, 2005) 由来の *oriN* (*repN* 遺伝子とそのプロモーター配列) を用いて 168 (wild-type) 株染色体の *dnaA* を含む *oriC* 領域全域を置換した (詳細は図 II.2 を参照)。

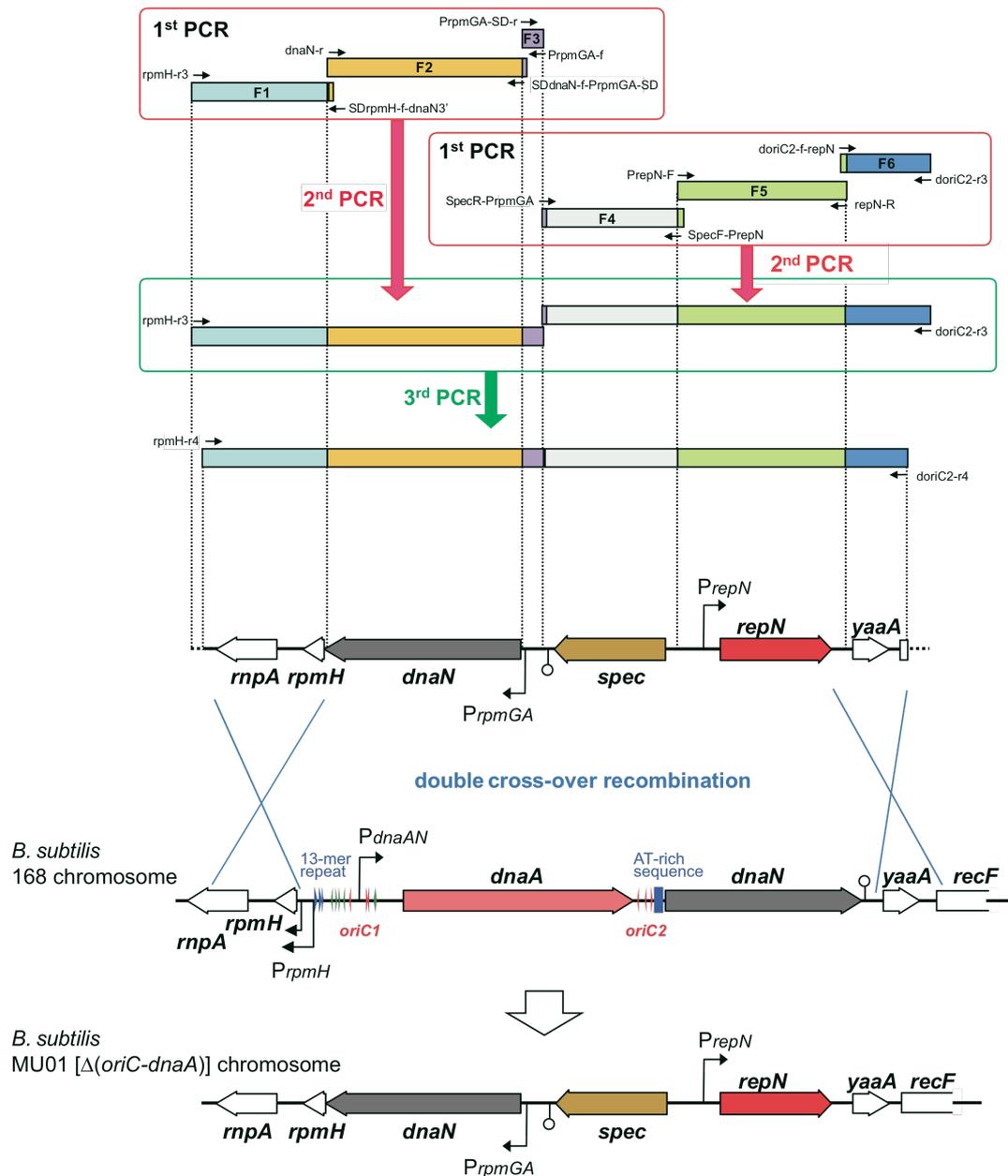


図 II.2 MU01 ( $\Delta(oriC-dnaA)::repN$ ) 株の構築

野生株 168 染色体上の *rpmH* (50S ribosomal protein L34) と *yaaA* (機能未知遺伝子) 間の *oriC* 領域を含む約 3.3Kbp の領域をスペクチノマイシン耐性カセット (*spec*) と *oriN* を含む配列により、2 回交差の相同組換えにより置換した。また、生育に必須である *dnaN* (DNA polymerase III (β subunit)) と *rpmH* の発現を確保するため、*dnaN* を *rpmGA* プロモーター (*PrpmGA*) の制御下に置き、さらに *rpmH* の上流に配置することで、*dnaN-rpmH* をオペロンとして恒常的に転写させた。このように配置した断片を構築するため、以下に示す DNA 断片、F1-F6 を PCR により増幅した (使用したプライマーセットは、19-20 ページの表 II.3 に示す)。F1 (*rnpA* と *rpmH* を含む相同組換え領域)、F2 (*dnaN* コーディング配列)、F3 (*PrpmGA*)、F6 (*yaaH* を含む相同組換え領域)。これらの断片は、168 株染色体 DNA をテンプレートとして作製した。一方で、F4 (*spec*) はプラスミド pAPNC213 (Morimoto et al, 2002) から、F5 (*oriN* 配列) は *B. subtilis* NIS6301 (*spoIIIJ::pRK1, ΔoriC*) 染色体 DNA (Moriya et al, 1997) から各々 PCR により増幅した。得られた PCR 増幅産物は、図 II.2 に示したように 3 段階から成るリコンビナント PCR により (F1-F2-F3-F4-F5-F6) の順序で単一の DNA 断片として結合した。得られた DNA 断片により、168 (wild-type) 株を形質転換にし、スペクチノマイシンにより形質転換体を選択した。

上記の過程により構築して得られた MU01 株 ( $\Delta$  (*oriC-dnaA*) ::*repN PrpmGA-dnaN-rpmH* (*spec*)) についてフローサイトメトリー解析を行ったところ、2N と 4N のピークが融合したパターンを示す結果が得られた。このことから、MU01 株では複製開始は同調性を欠いていることが示唆される。しかしながら、LB 培地と SMM 培地における増殖速度と細胞形態は、何れも野生株と同等であった (結果は示さない)。

## II.6. *dnaA* 発現誘導株 (MU02) の構築

*dnaA* を Xylose で誘導可能な *Pxyl* プロモーターの制御下に置き、枯草菌染色体上 *amyE* の位置に挿入するためのプラスミドを構築するために、Gateway Cloning システム (Invitrogen) の Destination vector、pXTt-MCS を構築した。プラスミド構築過程の概要を、図 II.3 (27 ページ参照) に示した。

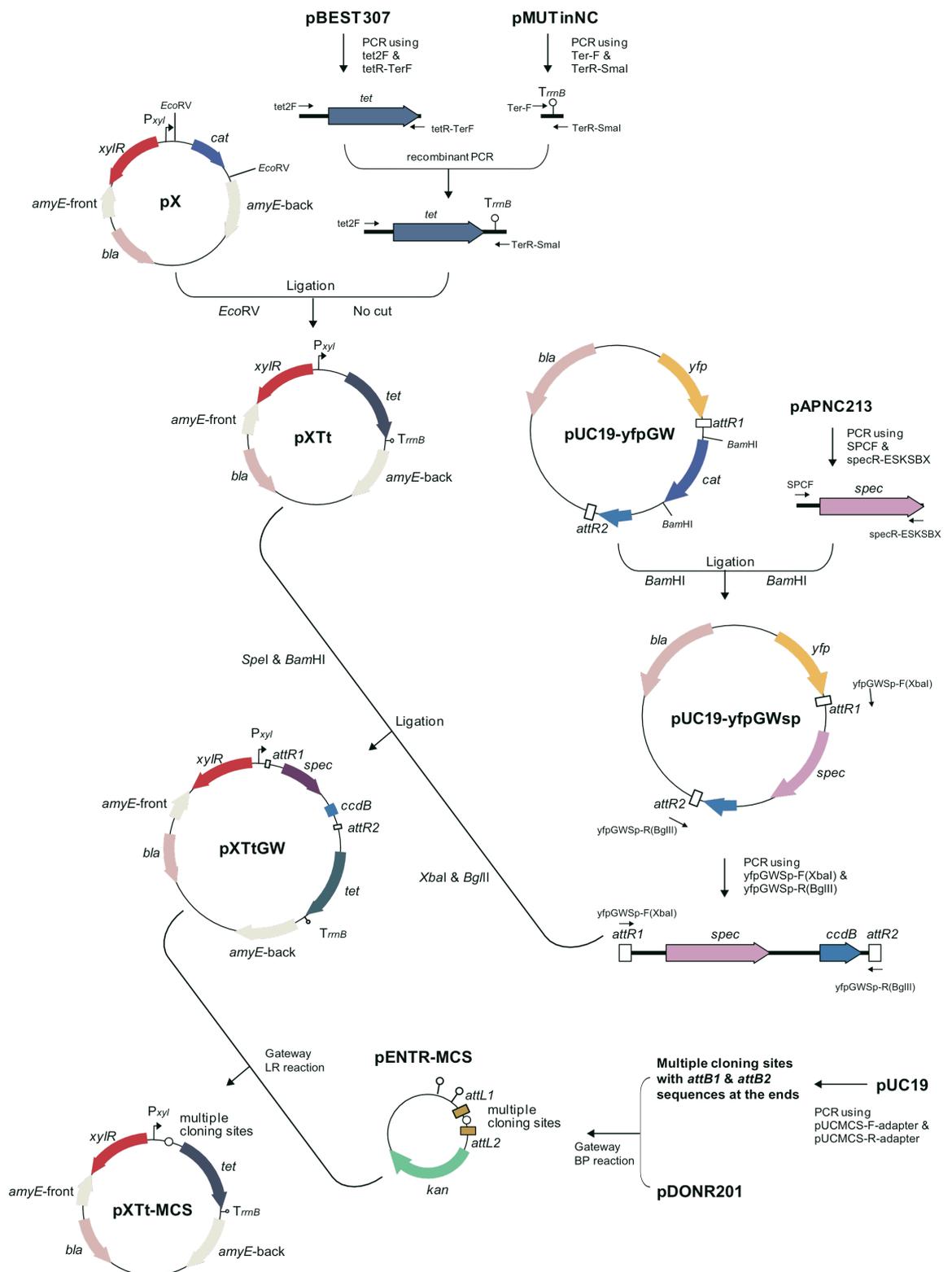


図 II.3 プラスミド pXTt-MCS の構築

強力な大腸菌 *rrnB* ターミネーター配列をプラスミド pMUTinNC (Morimoto et al, 2002) から Ter-F と TerR-SmaI のプライマーセットを利用して PCR で増幅した。また、テトラサイクリン耐性カセット (*tet*) をプラスミド pBEST307 から tet2F と tetT-TerF のプライマーセットを利用して PCR で増幅した。この *rrnB* ターミネーター断片と *tet* カセット断片を、PCR ligation により結合した後、プラスミド pX (*amyE* の上流及び下流領域の配列に加えて、P<sub>xyl</sub> プロモーター配列と *xyR* リプレッサー遺伝子を有するプラスミド) (Kim et al, 1996) 上の 2 箇所の *EcoRV* サイトに挿入し、プラスミド pXTt とした。次に、pXTt を Destination vector に変換するために、yfpGWSp-F (*XbaI*) と yfpGWSp-R (*BglIII*) のプライマーセットを用いてスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc*) と大腸菌の育成を阻害する *ccdB* を含む Gateway カセットをプラスミド pUC19-yfpGWsp から増幅した。pUC19-yfpGWsp は、プラスミド pUC19-yfpGW (Ishikawa et al, 2006) のクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) を pAPNC213 (Morimoto et al, 2002) から SPCF と specR-ESKSBX で増幅したスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc*) により 2 箇所の *BamHI* サイトを介して置換したものである。得られた Gateway カセット断片は、pXTt に *XbaI* と *BglIII* サイトを介して挿入し、pXTtGW を作製した。次に、作製した pXTtGW と pENTR-MCS を用い Gateway LR 組換え反応を行い、pXTtGW へ新たに MCS (multiple cloning site) を追加した。pENTR-MCS は、pUCMCS-F-adaptor と pUCMCS-R-adaptor を用いて増幅された pUC19 由来の MCS を持ち、pDONR201 との Gateway BP 組換え反応により構築した Gateway entry clone である。pENTR-MCS との Gateway LR 組換え反応により MCS を付加したプラスミドを pXTt-MCS とした。

当初は、*dnaA* 発現誘導株を構築するために pXTtGW を利用した Gateway システムを介して *dnaA* をクローニングさせるか、あるいは pXTt-MCS の MCS へ *dnaA* を挿入し枯草菌染色体へ導入しようと予定していた。しかしながら、この方法では、P<sub>xyl</sub> と MCS 間にある Ribosome binding sequence (RBS) によって DnaA の発現量が減少することが明らかになった (結果は示さない)。そこで図 II.4 に示すように、染色体への挿入配列から RBS を除くためにリコンビナント PCR を用いて *dnaA* を直接 P<sub>xyl</sub> へ融合し、その構築した配列断片を 168M 株染色体へ導入することとした (図 II.4, 29 ページ参照)。

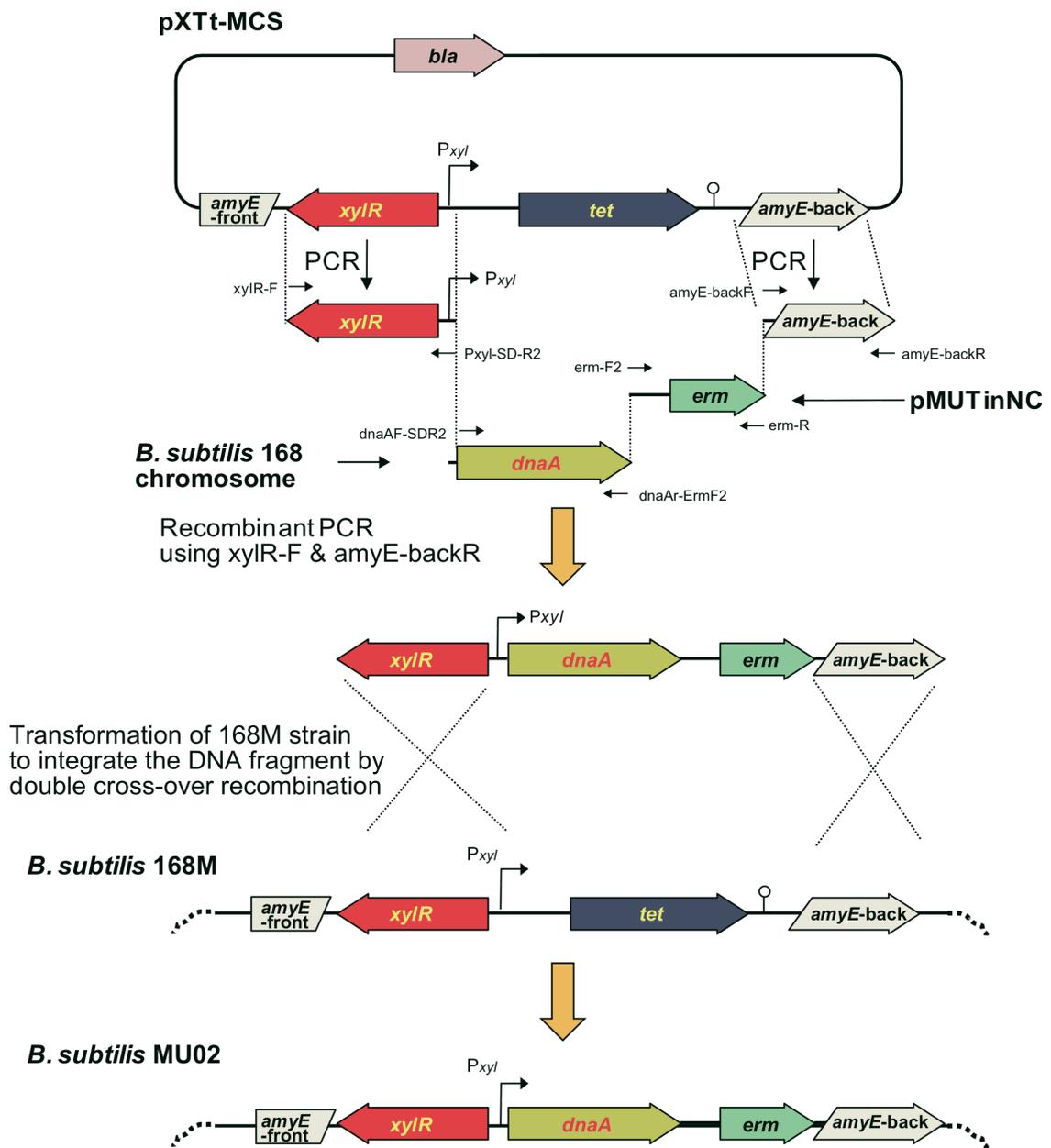


図 II.4 MU02 (*amyE::Pxyl-dnaA*) 株の構築

そのため、*xyIR-Pxyl*と *amyE-back* を含む配列は、プラスミド pXTt-MCS からプライマーセット *Pxyl-F/Pxyl-SD-R2* と *amyE-backF/amyE-backR* を用いてそれぞれ増幅した。また、エリスロマイシン耐性カセット (*erm*) は、プラスミド pMUTinNC からプライマーセット *erm-F2/erm-R* を用いて増幅した。さらに、*dnaA* は、168 (wild-type) 株染色体 DNA からプライマーセット *dnaAF-SDR2/dnaAr-ErmF2* を用いて増幅した。4 個の断片は、*[xyIR-Pxyl]-[dnaA]-[erm]-[amyE-back]* の順にリコンビナント PCR を用いて 1 つの断片へと

融合した。この得られた断片を 2 回交差の相同組換えを介して 168M 株染色体へ導入し、得られた形質転換体を MU02 株とした。

## II.7. その他の株の構築

### HO1001 ( $\Delta yydA::tet$ )

*yydA* 遺伝子上流および下流領域の配列を、それぞれプライマーセット *yydA-yycS.f5/yydA-yycS.r5* と *yydA-yycS.f6/yydA-yycS.r2* を用い、168 (wild-type) 染色体 DNA から増幅した。またテトラサイクリン耐性カセットは、プラスミド pBEST307 (Itaya, 1992) からプライマーセット rPCR-tetF/rPCR-tetR を用いて増幅した。これら 3 つの断片をリコンビナント PCR により融合し、168 (wild-type) 株を形質転換し、得られた形質転換体を HO1001 ( $\Delta yydA::tet$ ) とした。

### HO1010 ( $\Delta yydA::tet, orf1[ochre]$ ) および HO1011 ( $\Delta yydA::tet, orf2[ochre]$ )

*yydA* と *yycS* の遺伝子間領域で予測された 2 つの small orf (*orf1, orf2*) へ *ochre* 変異を導入するために、HO1001 ( $\Delta yydA::tet$ ) 染色体 DNA から、*orf1* の 3'側領域と *tet* カセットを含む 5'側領域を、それぞれプライマーセット *yydA-yycS.f5/och1-r* と *och1-f/yydA-yycS.r4* を用いて増幅した。この時、プライマーの *och1-r* と *och1-f* には *orf1* へ *ochre* 変異を導入するため塩基置換が挿入されている。得られた 2 つの PCR 増幅産物は、リコンビナント PCR により融合し、168 (wild-type) 株へ形質転換した。得られた形質転換体を HO1010

( $\Delta yydA::tet, orf1[ochre]$ ) とした。同様の方法によりプライマーセット *yydA-yycS.f5/och2-r* と *och2-f/yydA-yycS.r4* を用いて HO1011 ( $\Delta yydA::tet, orf2[ochre]$ ) 株を構築した。

### HO1072 および HO1073 ( $\Delta spo0J::tet$ )

*spo0J* 遺伝子上流領域と下流領域を 168 (wild-type) 染色体 DNA からプライマーセット *spo0J.f1/spo0J.r1* と *spo0J.f2/spo0J.r2* を用いてそれぞれ増幅した。この 2 つの断片と pBEST307 から増幅した *tet* カセットをリコンビナント PCR によりひとつの断片として融合した。この断片を用いて 168 (wild-type) と  $\Delta 6DBC$  株をそれぞれ形質転換し、得られた形質転換体を HO1072 ( $\Delta spo0J::tet$ ) と HO1073 ( $\Delta 6DBC \Delta spo0J::tet$ ) とした。

## HO1019, HO1020, HO1238, HO1239, HO1021, HO1022, HO1023, HO1242 および HO1241

Δ6DBC 株染色体上の *terC* 近傍領域へ DBC[*yydA-yycS*]領域を導入するために、*tet* カセット配列を含む DBC[*yydA-yycS*]領域を HO1001 (Δ*yydA::tet*) 染色体 DNA からプライマーセット *yydA-yycSr2/yydA.f1* を用いて増幅した。また、挿入する部位の上流および下流領域を 168 (wild-type) 染色体 DNA から増幅した (用いたプライマーセットは表 2.3 に記載)。増幅した 2 つの PCR 断片を、pBEST307 から増幅した *tet* カセットとリコンビナント PCR により融合し、最終的に得られた PCR 断片を用いて Δ6DBC 株を形質転換した。本研究では、7 箇所の染色体部位 (*yabT* (7°)、*yhaR* (90°)、*cgeD* (180°)、*yonN* (190°)、*ypqA* (200°)、*yteA* (270°)、*yxbC* (353°)) に位置する遺伝子を DBC[*yydA-yycS*]領域を含む *tet* カセットで置換した。得られた形質転換体を、それぞれ HO1238, HO1239, HO1021, HO1022, HO1023, HO1242 および HO1241 とした。なお、タイリングアレイ法 (Ishikawa et al, 2007) による転写プロファイルの解析から、上記の 7 遺伝子の転写は、対数増殖期において認められないことを確認している。

## HO1243, HO1244, HO1245, HO1246 および HO1247

Δ6DBC 株染色体上の *yydA* (353°) 領域へ異なる DBC 領域の配列を導入するために、各々の DBC 領域と挿入する領域の上流および下流の配列を HO1001 (Δ*yydA::tet*) 染色体 DNA からプライマーセット (表 II.3 参照) を用いて増幅した。増幅した 3 個の PCR 断片を、リコンビナント PCR により 1 個の断片へと融合し、最終的に得られた PCR 断片を用いて Δ6DBC 株を形質転換した。得られた形質転換体は染色体を抽出し、*yydA-yycS* 領域に変異が導入されていないことをシーケンスにより確認した。得られた形質転換体を、それぞれ HO1243, HO1244, HO1245, HO1246 および HO1247 とした。

## *tetO* array/TetR-*mCherry* を有する株

*oriC* 領域の細胞内局在を観察するために *tetO/tetR* system を利用した。JWV086 (Veening et al, 2009) 株の染色体上には、*hutM* (345°) 領域に *tetO* array (*kan*) が、また *amyE* 領域に *P<sub>xyI</sub>tetR-mCherry* (*spc*) が挿入されており、*tetO* array および *P<sub>xyI</sub>tetR-mCherry* は、解析に用いた株に形質転換により導入した。

## HO1029 ( $\Delta 5$ DBC *dnaA*-12his) および HO1128 ( $\Delta 6$ DBC *dnaA*-12his)

*dnaA* の 3'末端に 12-histidine タグ配列を付加するために、プラスミド pMUTinAhisN (Ishikawa et al, 2007) を HO1009 ( $\Delta 5$ DBC) および  $\Delta 6$ DBC 株に導入した。続いて導入した pMUTinAhisN を細胞内から除去し、12-histidine タグ配列を付加のみが *dnaA* に付加された株を、それぞれ HO1029 ( $\Delta 5$ DBC *dnaA*-12his) および HO1128 ( $\Delta 6$ DBC *dnaA*-12his) とした。

## pBOX-DBC[*yydA*-*yycS*]を有する株

DBC を含む *yydA*-*yycS* の遺伝子間領域をマルチコピープラスミドに挿入するために、DBC[*yydA*-*yycS*]配列を 168 (wild-type) 株染色体 DNA からプライマーセット *yydA*-*yycS*.f1/*yydA*-*yycS*.r1 を用いて PCR で増幅した。得られた PCR 断片は、*BbeI* と *EcoRI* で制限酵素処理した後、プラスミド pO2HC (Ishikawa et al, 2006) に挿入し、得られたプラスミドを pBOX-DBC[*yydA*-*yycS*]とした。この pBOX-DBC[*yydA*-*yycS*]を 168 (wild-type)、 $\Delta 6$ DBC 株および HO1128 ( $\Delta 6$ DBC *dnaA*-12his) に導入し、得られた形質転換体を HO1012 (pBOX-DBC[*yydA*-*yycS*])、HO1016 ( $\Delta 6$ DBC pBOX-DBC[*yydA*-*yycS*]) および HO1029 ( $\Delta 6$ DBC *dnaA*-12his pBOX-DBC[*yydA*-*yycS*]) とした。

## II.8. Affymetrix tiling arrayによるトランスクリプトーム解析

DBC の欠損が、近接遺伝子の転写へどのような影響を与えるのか評価するために Affymetrix tiling array (Chumsakul et al, 2011) を用いて DBC 欠損株の転写プロファイルを 168 (wild-type) 株のものと比較解析した。RNA 抽出、cDNA 合成、DNA 断片の標識および Tiling array とのハイブリダイゼーションの各過程は、Affymetrix の取り扱い説明書に従った。データ解析では、各サンプル間でシグナル強度が平均値で 500 となるよう標準化し、各遺伝子の配列内におけるプローブの平均シグナル強度を算出した (図 III.1)。解析で使用した Tiling array のデザインとデータは、ArrayExpress database

(<http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>) に登録した。Accession コードは、それぞれ A-AFFY-161 (array design) および E-MEXP-3069 (transcriptome) である。

## II.9. Real-time PCRによるDnaAと共精製されたDNAの定量

C 末端に 12histidine を付加した DnaA を利用した ChAP 法 (Chromatin Affinity

Purification) (Cho et al, 2008, Ishikawa et al, 2007) を用いて、DnaA 分子に結合した DNA を DnaA-His と共沈させ精製させた。また、超音波処理後の粗抽出液から同様の方法で染色体 DNA も精製し、Quantitative PCR (qPCR) 解析における標準試料として使用した。

DnaA と共沈した DNA を定量するために、qPCR 解析に使用したプライマーセットの一覧を表 II.3 に示した。またプライマー配列のデザインは、ソフトウェア Primer3

(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) を使用して行った。qPCR は、LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) を使用し、メーカー推奨のプロトコルに準じて解析を実施した。

## II.10.フローサイトメトリー解析

SMM、30°C で対数増殖期 ( $OD_{600}=0.3$ ) まで培養した細胞に、クロラムフェニコールを  $200 \text{ mg mL}^{-1}$  になるよう添加した。その後、さらに 5 時間培養することで、進行中の複製フォークを終結させ、さらに新規の複製開始と細胞分裂を阻害した。回収した細胞は、70% (v/v) エタノール中で 4°C にて 1 夜静置し、細胞を固定化させた。固定化した細胞は、遠心してエタノールを除去し、バッファー[10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 15 mM NaCl; 1 mM EDTA]に再懸濁した後、 $250 \text{ mg mL}^{-1}$  RNaseA を加え 37°C で 1 時間、震盪させながら反応させた。その後、超音波処理により連鎖を形成している細胞を解離させた。超音波破碎装置は、Bioruptor UCD-250 (Cosmo Bio Co., Ltd.) を利用し、Low レベルの出力で 2 分 (1 サイクル; 2 秒 “on”, 8 秒 “off”) の照射を行った。処理した細胞懸濁液は、上記のバッファーで  $OD_{600}=0.008$  になるよう調整し、DNA を染める蛍光色素 SYTO16 (Molecular Probes) を  $1 \mu\text{M}$  になるよう加え、室温にて遮光状態で 1 時間反応させた。細胞当たりの DNA 量 (*oriC* 数) の計測には、FACScan (Becton Dickinson) を使用し、またデータの解析には CellQuest software (Becton Dickinson) を使用した。

## II.11.qPCR法を利用した*oriC/terC*比の計測

細胞中の *oriC* および *terC* 領域のコピー数を定量するために qPCR 法を利用した。*oriC* および *terC* 領域のコピー数定量には、LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) を使用し、メーカー推奨のプロトコルに準じて解析を実施した。qPCR 解析に使用したプライマーセットの一覧は表 II.3 に示した。またプライマー配列のデザインは、ソフトウェア

Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) を使用した。サンプルとして使用した染色体 DNA は、フローサイトメトリー解析と同様の条件で培養した対数増殖期 ( $OD_{600}=0.3$ ) の細胞から抽出した。同時に、全ての進行中の複製フォークを終結させ、*oriC* と *terC* の比を 1:1 にした野生株細胞から抽出した染色体 DNA を標準試料として利用した。

## II.12. 蛍光顕微鏡を用いた生細胞の観察

細胞形態、核様体構造および蛍光タンパク質の局在観察は、蛍光色素を加えた後に蛍光顕微鏡を用いて実施した。使用した蛍光色素は、核様体 DNA 観察のためには DAPI (Dojin; 1-5 ng mL<sup>-1</sup>)、細胞膜観察のためには FM4-64 (Invitrogen; 1 mg mL<sup>-1</sup>) あるいは MitoTracker Green FM (Invitrogen; 100 nM) を使用した。蛍光シグナルの取得には、DMRE-HC microscope (Leica Microsystems) と冷却デジタル CCD カメラ (model 1300Y; Roper Scientific) を利用した。この時使用したフィルターセットは、DAPI, Filter Cube A4 [Leica Microsystems; GFP/MitoTracker Green FM, Filter Cube L5 [Leica Microsystems]; mCherry/FM4-64, Filter Cube N3 [Leica Microsystems]; YFP, XF104-2 [Omega Optical, Inc.] である。細胞長の測定および蛍光 foci の細胞内局在の解析は、MetaMorph software (Universal Imaging) を利用して行った。

## II.13. ウェスタンブロッティング法

細胞粗抽出液の調整と SDS-PAGE を利用したタンパク質分画の方法については、以前に報告された方法 (Ogura et al, 2001b) に従って実施した。PVDF 膜は、Amersham Hybond-P polyvinylidene difluoride membrane (GE Healthcare) を使用した。一次抗体には、Anti-DnaA rabbit polyclonal antibody を使用し、また二次抗体には、goat anti-rabbit immunoglobulin G-horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad) を使用した。また、化学発光シグナルの検出には、ECL Plus western blotting detection reagents (Amersham) を利用した。

## II.14. SOS 応答のモニタリングシステム

SOS 応答は、*bgaB* 遺伝子の発現モニタリングシステムを利用することにより解析した。*bgaB* は、*Bacillus stearothermophilus* の耐熱性  $\beta$ -galactosidase をコードする遺伝子であ

る。このモニタリングシステムの系において *bgaB* は、細胞障害により誘導されるプロモーター ( $P_{dinC}$ ) により制御されるよう染色体 *amyE* 領域に配置されている (Ogura et al, 2001)。測定法の詳細は、Ogura らの方法に従って実施した (Ogura et al, 2001)。

## III. 結果

### III.1. DBC欠損領域の構造

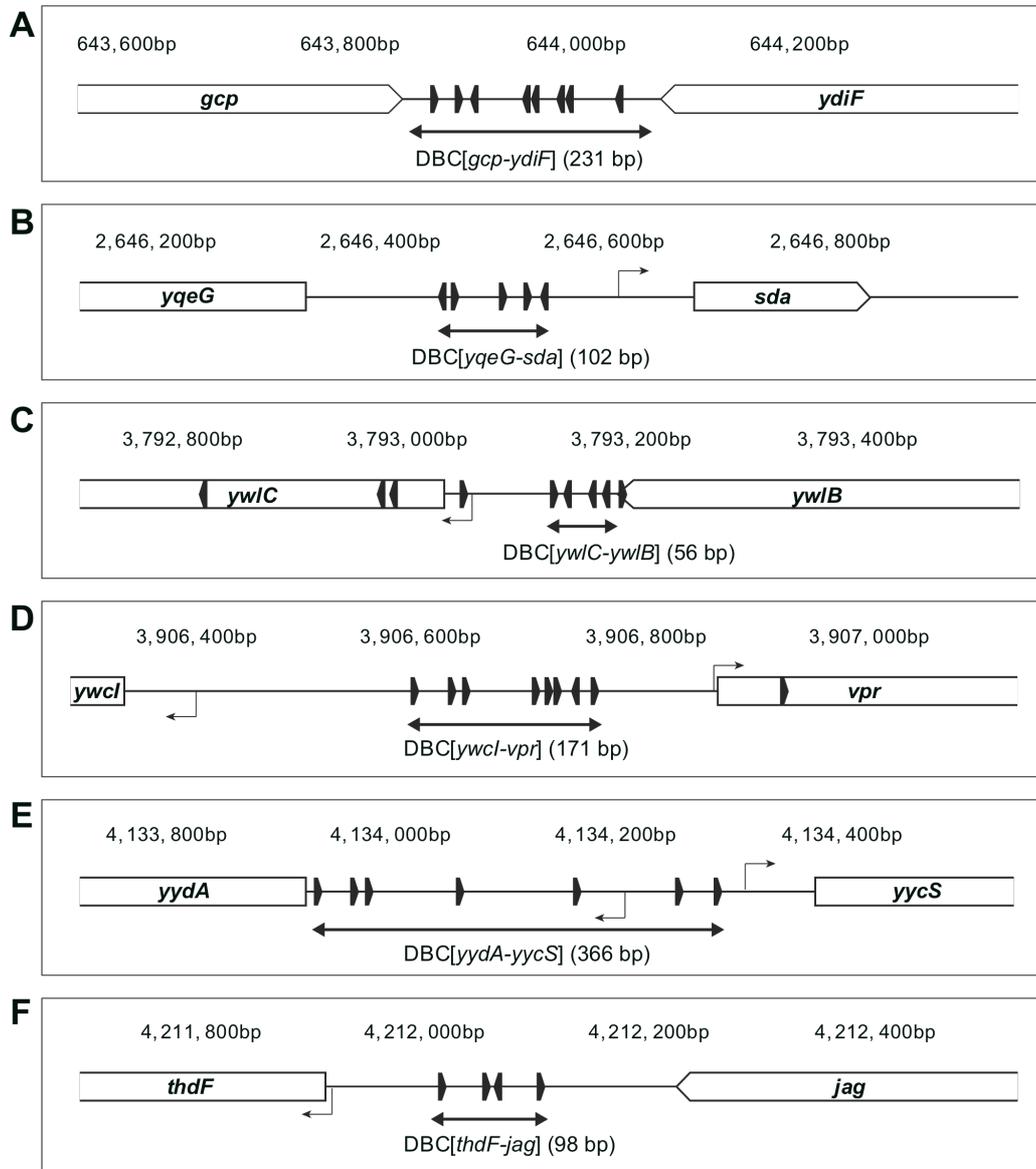
我々が、以前報告したトランスクリプトーム解析の結果から、枯草菌染色体上の *oriC* 外にあるいくつかの DBC は、DBC に近接した遺伝子の転写制御に関与していることが分かっている (Ishikawa et al, 2007)。しかしながら、転写制御への関与が認められない DBC 領域もあり、これらの DBC が、細胞周期の中で染色体の複製開始制御、あるいは *oriC* 周辺領域の核様体構造維持にも関与しているのではないかと予想した。そこで本研究では、*oriC* 外の DBC が担う新規の機能を明らかにするために、6 箇所の *oriC* 外 DBC を枯草菌染色体上から削除した欠損株 MYA143 ( $\Delta$ 6DBC) を構築しその表現型を詳細に解析することにした。

$\Delta$ 6DBC 株は、DBC を含む 6 箇所の遺伝子間領域を染色体上から欠損させたものであるが、変異を導入する際にマーカーとして用いた薬剤耐性遺伝子は染色体上に残っていない。なお、構築した  $\Delta$ 6DBC 株細胞の増殖速度および細胞長は、野生株細胞と同等であった (後述)。欠損変異株の構築方法については、II.3 マーカーフリー遺伝子欠損法による DBC 欠損株の構築の項で詳述してあり、欠損領域の構造については図 III.1 に示した。

### III.2. *oriC* 外の 6 箇所の DBC 欠損により過剰複製が誘導される

対数増殖期における  $\Delta$ 6DBC 株の複製開始頻度について検証するために、野生株細胞および各 DBC 領域の欠損変異株細胞を比較し解析した。解析には、細胞当たりの *oriC* 数の測定をフローサイトメトリー解析で測定し (図 III.2)、また *oriC* と *terC* 領域それぞれのコピー数の比 (*oriC*/*terC* 比) を qPCR 法により測定した (表 III.1)。SMM 合成培地 (L-グルタミン酸, L-アスパラギン, カザミノ酸を添加)、30°C (倍化時間  $\approx$  45 分) の条件で培養し、対数増殖期に達した培地中にクロラムフェニコール ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) を添加し更に 5 時間培養した細胞をエタノール固定し解析に使用した。解析の結果、野生株細胞では、2N (*oriC*=2 を示すピーク) および 4N (*oriC*=4 を示すピーク) に相当する 2 個の DNA ピークが観察された。観察されたそれぞれのピークは、互いに重なり合うことなく分離していた。また、この 2 個のピーク中で 2N のピークが、4N に比較して優勢であったことから、解析で使用した培養条件 (SMM 30°C) により培養した細胞集団中では、2 個の *oriC* を持つ細胞が大多数を占

めていると考えられる (図III.2.B)。

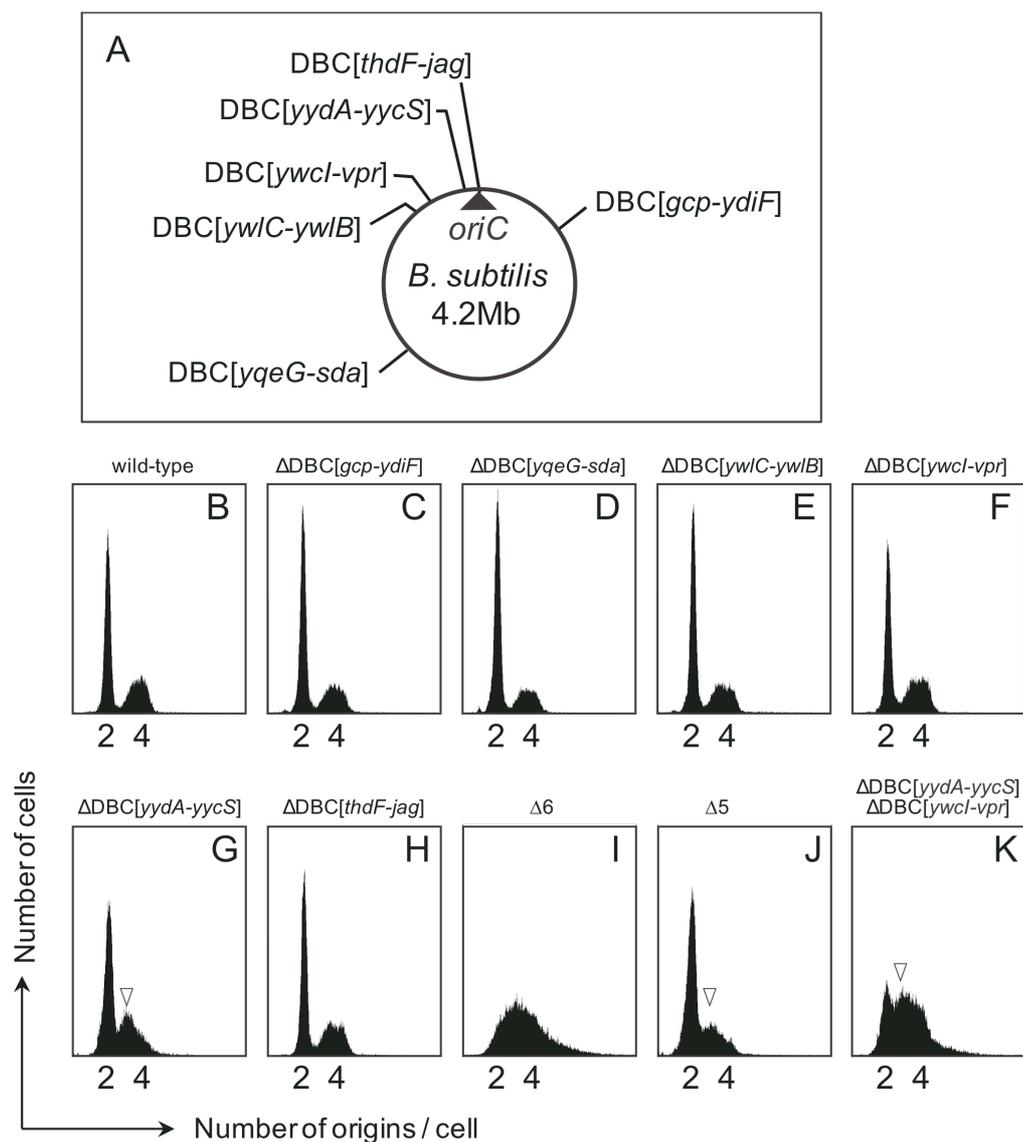


図III.1  $\Delta 6\text{DBC}$  株における 6 箇所の DBC 欠損領域の概要

DBC を含む遺伝子間領域の配列構造の概要を、近接遺伝子 (白抜き矢印) DnaA-box (黒の矢印)、推定されるプロモーター配列 (細い矢印) と共に図示している。欠損領域を図の下端に両向きの矢印で示し、括弧内には欠損領域の長さを示した。ゲノム上の位置は上端に示した (Kunst et al, 1997)。各々の遺伝子間領域は、以下の通りである。 *gcp-ydiF* (A) , *yqeG-sda* (B) , *ywIC-ywIB* (C) , *ywcl-vpr* (D) , *yycS-yycS* (E) , *thdF-jag* (F)。

一方、 $\Delta 6\text{DBC}$  株を解析した結果、明確に分離した染色体 DNA のピークを検出することは出来ず、4N 以上に渡る幅広の単一ピークが観察された (図III.2.I)。野生株細胞ではクロラムフェニコール処理により進行中の複製伸張反応が *terC* まで継続され、複製フォークが完

全に終結した状態を反映し、明確に分離した2個のDNAピーク ( $oriC=2$ ,  $oriC=4$ ) が観察される。ところが、 $\Delta 6$ DBC 細胞では幅広の単一ピークのみが観察されたことから、複製フォークが終結せずに途中で停止している可能性が考えられた。つまり、 $\Delta 6$ DBC 株では、クロラムフェニコール添加により新規の複製開始を阻害出来ていないのではないかと考え、



図Ⅲ.2 DBC 欠損株のフローサイトメトリーのプロファイル

(A)  $\Delta 6$ DBC 株において DBC を欠損させたゲノム上の位置  
 (B-J) 野生株および DBC 欠損株のフローサイトメトリーのプロファイル。培養は、SMM を使用し  $30^{\circ}\text{C}$  で行った。詳細は、2.10 フローサイトメトリー解析の項を参照。(B) 168 (wild-type), (C) MYA155 ( $\Delta\text{DBC} [gcp-ydiF]$ ), (D) MYA156 ( $\Delta\text{DBC} [yqeG-sda]$ ), (E) MYA157 ( $\Delta\text{DBC} [ywlC-ywlB]$ ), (F) MYA018 ( $\Delta\text{DBC} [ywcl-vpr]$ ), (G) MYA019 ( $\Delta\text{DBC} [yydA-yycS]$ ), (H) MYA158 ( $\Delta\text{DBC} [thdF-jag]$ ), (I) MYA143 ( $\Delta 6$ DBC), (J) HO1009 ( $\Delta 5$ DBC)。白三角は、3N ピークを示す。

表Ⅲ.1 *oriC/terC* 比

Strain	Relevant genotype	<i>oriC/terC</i> <sup>a</sup>	Relative ratio <sup>b</sup>
168	wild-type	2.32 ± 0.43	1.00
MYA155	ΔDBC[ <i>gcp-ydiF</i> ]	2.30 ± 0.13	0.99
MYA156	ΔDBC[ <i>yqeG-sda</i> ]	2.23 ± 0.20	0.96
MYA157	ΔDBC[ <i>ywlc-ywlB</i> ]	2.34 ± 0.25	1.01
MYA018	ΔDBC[ <i>ywcl-vpr</i> ]	2.16 ± 0.21	0.93
MYA019	ΔDBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	2.22 ± 0.18	0.96
MYA158	ΔDBC[ <i>thdF-jag</i> ]	2.11 ± 0.15	0.91
HO1009	Δ5DBC	2.38 ± 0.32	1.03
MYA143	Δ6DBC	3.17 ± 0.28	1.37
HO1019	Δ6DBC, 7°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	2.45 ± 0.42	1.06
HO1020	Δ6DBC, 90°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	2.25 ± 0.46	0.97
HO1021	Δ6DBC, 200°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	2.49 ± 0.20	1.07
HO1022	Δ6DBC, 270°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	2.67 ± 0.17	1.15
HO1023	Δ6DBC, 353°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	2.14 ± 0.30	0.92
HO1242	Δ6DBC, 200°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ], 180°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	2.48 ± 0.59	1.07
HO1241	Δ6DBC, 200°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ], 180°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ], 190°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	2.13 ± 0.22	0.92
HO1015	Δ6DBC, pO2HC	3.15 ± 0.50	1.36
HO1016	Δ6DBC, pBOX <i>yydA-yycS</i>	3.13 ± 0.59	1.35
HO1230	ΔDBC[ <i>yydA-yycS</i> ], ΔDBC[ <i>gcp-ydiF</i> ]	2.24 ± 0.18	0.97
HO1231	ΔDBC[ <i>yydA-yycS</i> ], ΔDBC[ <i>yqeG-sda</i> ]	2.37 ± 0.25	1.02
HO1232	ΔDBC[ <i>yydA-yycS</i> ], ΔDBC[ <i>ywlc-ywlB</i> ]	2.48 ± 0.21	1.07
HO1233	ΔDBC[ <i>yydA-yycS</i> ], ΔDBC[ <i>ywcl-vpr</i> ]	2.71 ± 0.28	1.17
HO1234	ΔDBC[ <i>yydA-yycS</i> ], ΔDBC[ <i>thdF-jag</i> ]	2.76 ± 0.25	1.19
HO1247	Δ6DBC, 353°::ΔBC[ <i>gcp-ydiF</i> ]	3.13 ± 0.14	1.35
HO1243	Δ6DBC, 353°::ΔBC[ <i>yqeG-sda</i> ]	3.22 ± 0.24	1.39
HO1244	Δ6DBC, 353°::ΔBC[ <i>ywlc-ywlB</i> ]	2.98 ± 0.05	1.28
HO1245	Δ6DBC, 353°::ΔBC[ <i>ywcl-vpr</i> ]	2.68 ± 0.15	1.16
HO1246	Δ6DBC, 353°::ΔBC[ <i>thdF-jag</i> ]	3.02 ± 0.28	1.30
HO1034	Δ <i>spo0J</i>	2.46 ± 0.18	1.06
HO1030	Δ( <i>soj-spo0J</i> )	2.43 ± 0.15	1.05
HO1035	Δ6DBC, Δ <i>spo0J</i>	5.02 ± 0.33	2.17
HO1225	Δ6DBC, Δ <i>spo0J</i> , <i>sojT88M</i>	3.54 ± 0.31	1.53
HO1031	Δ6DBC, Δ( <i>soj-spo0J</i> )	3.88 ± 0.56	1.67

(a) *oriC* および *terC* のコピー数は、qPCR 法を利用し定量した。各々、独立した複数回の実験 (n≥5) から得た平均値と±SDを示す。

(b) 野生株細胞に対する相対値。

通常の 10 倍量のクロラムフェニコール ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) を添加し、フローサイトメトリー解析を再度実施した。しかしながら、DNA ピークのプロファイルに変化は認められず、フローサイトメトリー解析を用いて $\Delta 6\text{DBC}$  細胞の正確な複製開始頻度を求めることは出来なかった。一方で、qPCR による $\Delta 6\text{DBC}$  細胞の *oriC/terC* 比を測定したところ、その値は野生株に比べ 1.37 倍高い値を示した。この結果は、 $\Delta 6\text{DBC}$  株細胞では過剰複製が誘導されていることを強く示唆するものである (表 III.1)。以上の結果から、 $\Delta 6\text{DBC}$  細胞で観察された異常なピークのプロファイルは、過剰複製と、クロラムフェニコール処理中に複製が不完全に終結してしまったという両方の影響を反映しているものと考えられる。

6 箇所の単一 DBC 領域欠損株のパターンにおいては、概ね野生株のパターンと同等のものであった (図 III.2.C-H)。しかしながら、*yydA-yyeS* 領域 (DBC[*yydA-yyeS*]) 欠損株については、他の単一領域欠損株と比較して僅かではあるが明確に 2N ピークの減少が認められた (図 III.2.G)。このことから、 $\Delta \text{DBC}[yydA-yyeS]$  株細胞では軽微な過剰複製が起きていると考えられるが、qPCR 法により測定した *oriC/terC* 比からは、野生株との明確な差異は認められなかった (表 III.1)。さらに、この DBC[*yydA-yyeS*] 領域を $\Delta 6\text{DBC}$  株染色体上元の領域へ再導入させたところ ( $\Delta 5\text{DBC}$ )、 $\Delta 6\text{DBC}$  株で見られた過剰複製の DNA ピークのパターンが部分的に相補されることが明らかになった。これらの結果は、DBC[*yydA-yyeS*] 領域は、 $\Delta 6\text{DBC}$  株で観察された過剰複製の誘導に関与することを示している。

さらに DBC[*yydA-yyeS*] 領域以外の DBC 領域が、 $\Delta 6\text{DBC}$  株の過剰複製に関与しているのか調べるために $\Delta \text{DBC}[yydA-yyeS]$  と他の領域との二重欠損変異株を構築した。二重欠損変異株の構築は、 $\Delta \text{DBC}[yydA-yyeS]$  株 (MYA019) 染色体上に残っている他の DBC 領域を耐性カセットで置換する事により獲得した。獲得した二重欠損変異株細胞を用いて、フローサイトメトリー解析と *oriC/terC* 比の算出を実施した。その結果、 $\Delta \text{DBC}[yydA-yyeS]$   $\Delta \text{DBC}[ywcI-vpr]$  二重欠損変異株では、複製開始頻度が $\Delta 6\text{DBC}$  株と同等のレベルにまで亢進することが明らかになった (図 III.2.K)。さらに、 $\Delta 6\text{DBC}$  株染色体上の *oriC* 近傍にある *yydA* 領域 (353°) に DBC[*ywcI-vpr*] を再導入すると $\Delta 6\text{DBC}$  株の過剰複製が顕著に回復することも同時に明らかになった。ただし、DBC[*yydA-yyeS*] を $\Delta 6\text{DBC}$  株染色体へ導入した場合 (HO1009) に比べ、過剰複製回復の度合いは少なかった (図 III.3.J)。

これらの結果から、 $\Delta 6\text{DBC}$  株における過剰複製の表現型は、主に 2 箇所の領域 (DBC[*yydA-yyeS*] および DBC[*ywcI-vpr*]) の欠損によるものであると考えられる。しかし、フローサイトメトリー解析から得られた結果では、 $\Delta \text{DBC}[yydA-yyeS]$  DBC[*ywcI-vpr*] 二重

欠損株の DNA ピークプロファイルには、2N のピークが依然として検出されており $\Delta$ 6DBC 株のパターンとは異なるものであった (図 III.3.D)。この結果から、単独領域欠損株のフローサイトメトリー解析では、DNA ピークプロファイルに変化は認められないものの、DBC[*yydA-yycS*]および DBC[*ywcl-vpr*]以外の 4 箇所の DBC 領域も、 $\Delta$ 6DBC 株における過剰複製の誘導に僅かではあるが関与すると考えられる。

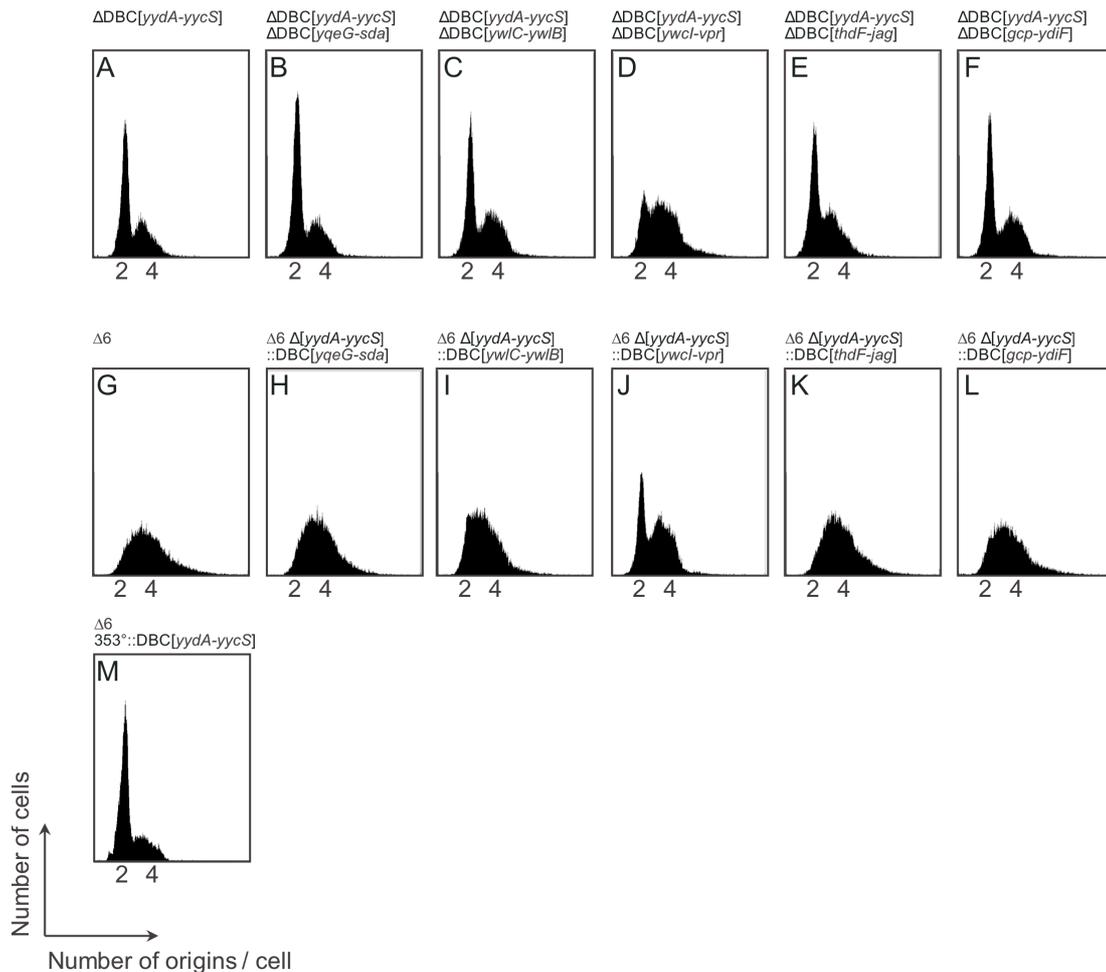


図 III.3 複製開始制御への関与を示す DBC 領域

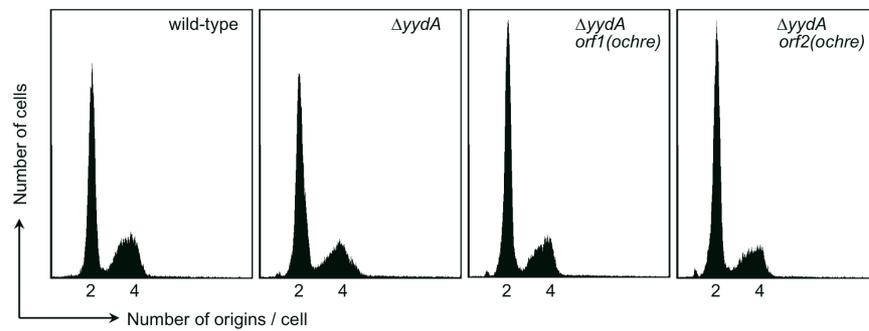
(A-M) DBC 欠損株および再導入株のフローサイトメトリーのプロファイル。培養は、SMM を使用し 30°C で行った。詳細は、2.10 フローサイトメトリー解析の項を参照。

(A) MYA019 ( $\Delta$ DBC [*yydA-yycS*]), (B) HO1231 ( $\Delta$ DBC [*yydA-yycS*],  $\Delta$ DBC [*yqeG-sda*]), (C) HO1232 ( $\Delta$ DBC [*yydA-yycS*],  $\Delta$ DBC [*ywIC-ywIB*]), (D) HO1233 ( $\Delta$ DBC [*yydA-yycS*],  $\Delta$ DBC [*ywcl-vpr*]), (E) HO1234 ( $\Delta$ DBC [*yydA-yycS*],  $\Delta$ DBC [*thdF-jag*]), (F) HO1230 ( $\Delta$ DBC [*yydA-yycS*],  $\Delta$ DBC [*gcp-ydiF*]), (G) MYA143 ( $\Delta$ 6DBC), (H) HO1243 ( $\Delta$ 6DBC,  $\Delta$ [*yydA-yycS*]::DBC [*yqeG-sda*]), (I) HO1244 ( $\Delta$ 6DBC,  $\Delta$ [*yydA-yycS*]::DBC [*ywIC-ywIB*]), (J) HO1245 ( $\Delta$ 6DBC,  $\Delta$ [*yydA-yycS*]::DBC [*ywcl-vpr*]), (K) HO1246 ( $\Delta$ 6DBC,  $\Delta$ [*yydA-yycS*]::DBC [*thdF-jag*]), (L) HO1247 ( $\Delta$ 6DBC,  $\Delta$ [*yydA-yycS*]::DBC [*gcp-ydiF*]), (M) HO1009 ( $\Delta$ 5DBC)

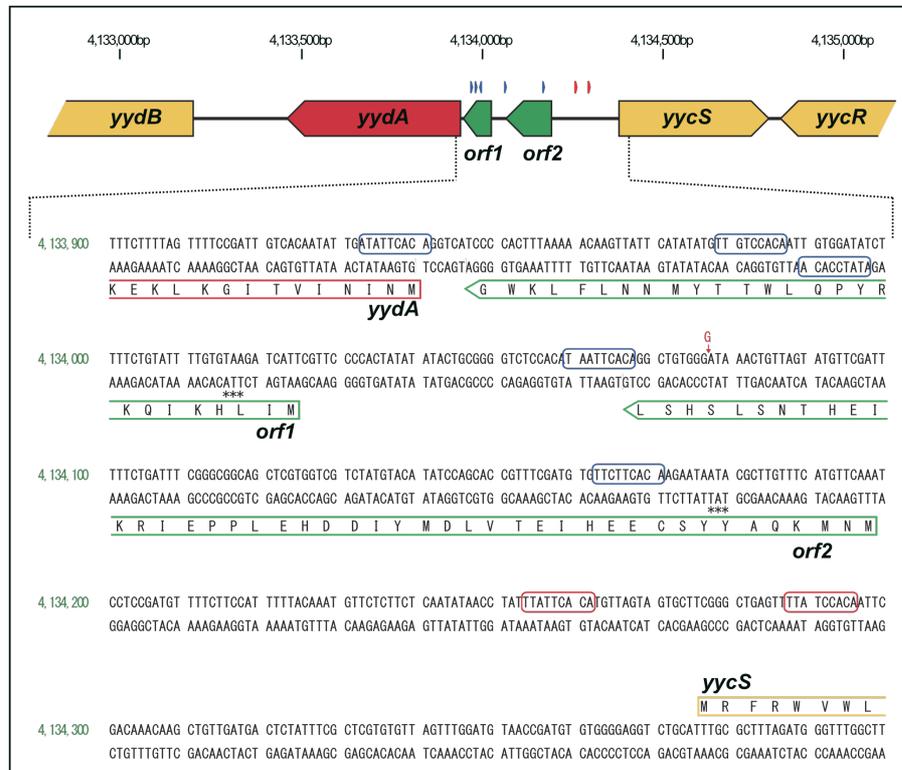
### III.3. Δ6DBC細胞の過剰複製は、6箇所のDBC欠損により相乗的に誘導される

フローサイトメトリー解析の結果、Δ6DBC株では過剰複製の表現型は、幅広いピークとして観察された。しかし、DBC 単一領域の欠損株では野生株と比べてピークのプロファイルに著しい変化は見られなかった。このことは、Δ6DBC 細胞の表現型が複数の DBC 欠損の相乗効果により引き起こされた可能性を示唆している。

A



B



興味深い事に、 $\Delta$ 6DBC 株で欠損している DBC[*yydA-yycS*]配列を染色体上の元の位置に回復させた株 (HO1009 [ $\Delta$ 5DBC], 図III.2.J) では、フローサイトメトリーのピークのプロファイルおよび *oriC/terC* 比が、DBC[*yydA-yycS*]の単一領域欠損株 ( $\Delta$ DBC[*yydA-yycS*]) と同等にまで回復した (図III.2.G, 表III.1 参照)。DBC [ *yydA-yycS* ]領域の下流に位置する *yydA* の転写については、トランスクリプトーム解析の結果から、*yydA* 上流の DBC の欠損により *yydA* 自身の転写は減少することがこれまでの解析から分かっている。これは、削除した DBC [ *yydA-yycS* ]領域中に *yydA* のプロモーター配列が含まれているためであると考えられる。

一方で、本研究で削除した DBC [ *yydA-yycS* ]領域中において、枯草菌ゲノム配列中 (Kunst et al, 1997) には登録されていない ORF が新たに 2 個発見された (図III.4.B)。この 2 個の ORF (*orf1*, *orf2*) は、初めて報告された枯草菌ゲノム配列 (Kunst et al, 1997) 中には登録されていないが、後に改訂されたゲノム配列では *orf2* の 3'領域に "G" が挿入され一つの ORF として融合した形で登録されている (Barbe et al, 2009)。今回、我々が解析に用いた研究室保存の枯草菌株には、そのような塩基の挿入は見つからなかったことをシーケンスにより確認している。このように、 $\Delta$ DBC[*yydA-yycS*]株で見られる複製開始への影響は、*yydA* の転写量の減少が原因なのか、あるいは、*orf1* と *orf2* の欠損が原因であるのか、それを確認するために *yydA* 欠損株、さらに *orf1* と *orf2* に *ochre* 変異を導入した株を構築し、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、フローサイトメトリーのピークのプロファイルに影響は認められなかった (図III.4.A)。これらの結果から、 $\Delta$ DBC[*yydA-yycS*]株で誘導された過剰複製の表現型は、*yydA* 領域の DnaA 結合能欠損によるものであることが明らかになった。

枯草菌では、これまで DnaA による *sda* の発現誘導と *dnaA* 自身の発現自己抑制について詳しく解析され報告がなされてきた (Burkholder et al, 2001, Veening et al, 2009)。

---

#### 図III.4 $\Delta$ *yydA*, *orf1* (*ochre*), *orf2* (*ochre*) 株のフローサイトメトリーの プロファイル

- (A) wild-type (168), HO1001 ( $\Delta$ *yydA*), HO1010 ( $\Delta$ *yydA orf1[ochre]*), HO1011 ( $\Delta$ *yydA orf2[ochre]*) のフローサイトメトリーのプロファイル。培養は、SMM を使用し 30°C で行った。詳細は、2.10 フローサイトメトリー解析の項を参照。
- (B) *yydA-yycS* 遺伝子間領域の塩基配列。青および赤の box は、それぞれ 1-bp ミスマッチの DnaA-box とパーフェクトマッチの DnaA-box を示す。二つの *orf* (*orf1*, *orf2*) は緑の box として表し、*ochre* 変異を導入したそれぞれの位置は、"\*" で示した。改訂されたゲノム配列 (NC\_000964.3) において "G" が挿入されていた位置は、赤い矢印で示した。

また、当研究室においても PAB 培地で培養した対数増殖期の枯草菌細胞において、DBC をプロモーター領域に持つ *ywlC* と *yydA* の転写が、DnaA により直接抑制されることを報告している (Ishikawa et al, 2007)。

今回、新たに構築した 6 箇所の DBC を同時に削除した欠損変異株 ( $\Delta$ 6DBC 株) では、DBC 周辺遺伝子の転写にどのような影響が現れているのかを調べるために、タイリングアレイによる転写プロファイル解析を行うと共に DnaA タンパク質量をウエスタンブロッティング法により解析した。DBC に隣接した遺伝子の転写量は、表 III.2 に、欠損変異株のウエスタンブロッティング法の結果を図 III.5 に示す。

以前に行われたトランスクリプトーム解析から、DnaA タンパク質を過剰発現 (野生株の 5 倍量) させた時、*dnaA* および *dnaN* プロモーター領域の転写量は、減少することが報告されている (Ishikawa et al, 2007)。本研究で構築した  $\Delta$ 6DBC 株においても同様に *dnaA-dnaN* オペロンの転写量は、野生株に比べおよそ 0.6-0.7 倍にまで減少していた (表 III.2)。

表 III.2 野生株および  $\Delta$ 6DBC 株における DBC 近接遺伝子の転写

gene		1st experiment			2nd experiment			Average ratio
direction & DnaA box cluster <sup>a</sup>	name	168 (wild-type)	MYA143 ( $\Delta$ 6)	ratio	168 (wild-type)	MYA143 ( $\Delta$ 6)	ratio	
DBC-neighboring genes								
»								
↓	<i>dnaA</i>	706.1	445.6	0.6	974.0	809.4	0.8	0.7
»								
↓	<i>dnaN</i>	820.8	393.3	0.5	965.6	603.4	0.6	0.6
↓	<i>gcp</i>	577.2	440.0	0.8	679.8	683.8	1.0	0.9
»								
↑	<i>ydiF</i>	311.2	263.0	0.9	445.6	372.8	0.8	0.8
↑	<i>yqeG</i>	491.1	413.6	0.8	678.9	682.4	1.0	0.9
»								
↓	<i>sda</i>	87.4	124.6	1.4	198.1	226.0	1.1	1.3
↑	<i>ywlC</i>	276.6	333.9	1.2	284.0	322.5	1.1	1.2
»								
↓	<i>ywlB</i>	216.4	398.7	1.8	194.8	300.6	1.5	1.7
↑	<i>sacT</i>	221.1	3258.6	14.7	292.4	1818.9	6.2	10.5
↑	<i>ywvI</i>	280.0	4551.9	16.3	426.9	3000.3	7.0	11.6
»								
↓	<i>vpr</i>	160.1	877.7	5.5	190.4	801.3	4.2	4.8
↑	<i>yydA</i>	228.4	75.2	0.3	266.7	85.6	0.3	0.3
»								
↓	<i>yycS</i>	110.5	146.6	1.3	133.2	173.6	1.3	1.3
↑	<i>yyaA</i>	1748.4	710.4	0.4	1652.4	868.7	0.5	0.5
↑	<i>gidB</i>	1898.1	351.7	0.2	2058.9	479.8	0.2	0.2
↑	<i>gidA</i>	1583.6	310.9	0.2	1840.3	448.6	0.2	0.2
↑	<i>thdF</i>	934.3	177.3	0.2	1047.6	258.5	0.3	0.2
»								
↓	<i>jag</i>	2590.7	1785.1	0.7	2527.1	2317.5	0.9	0.8

(a) オペロン単位にわけ、遺伝子の方向を矢印で示した。「»」は遺伝子間領域における DBC の位置を表す。

このことから、 $\Delta 6$ DBC 株においても DnaA による *dnaA* 遺伝子の自己転写抑制制御が機能していると考えられる。一方で、*sda* については DnaA により転写が促進されることが報告されている (Ishikawa et al, 2007) が、 $\Delta 6$ DBC 株における *sda* 転写の変化は明確には認められなかった (表 III.2)。これは、本研究で使用した SMM、25°C の培養条件において *sda* 自体の転写レベルが低いためであると考えられる。*sda* 同様、以前の解析から DnaA による転写制御 (抑制制御) が報告されている *ywIC* (Ishikawa et al, 2007) は、 $\Delta 6$ DBC 株における転写の影響は認められなかった (表 III.2)。

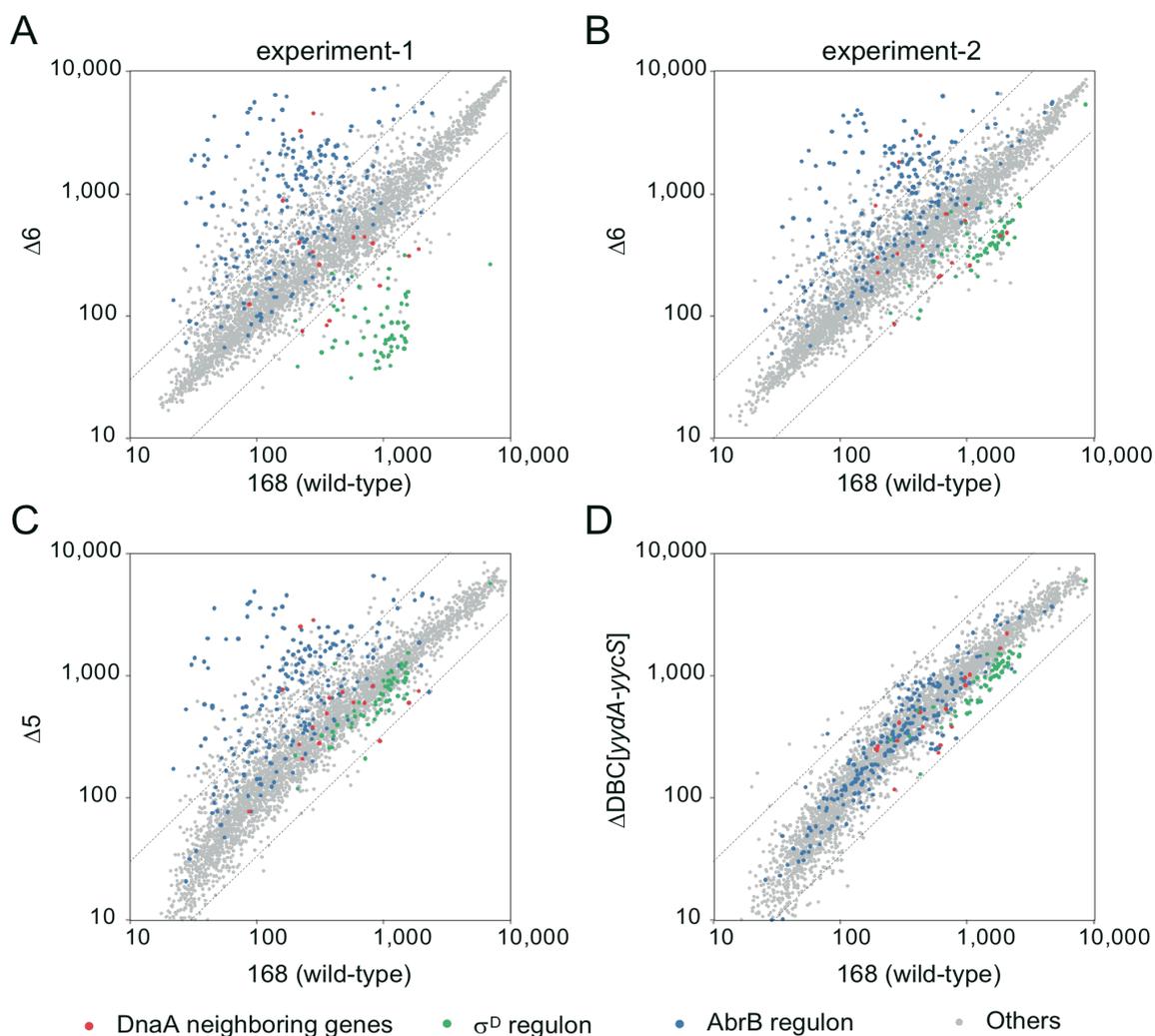
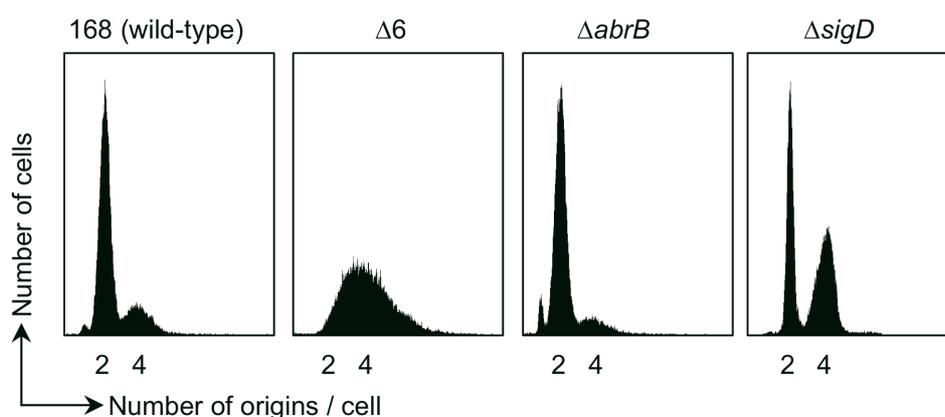


図 III.5  $\Delta 6$ DBC 株,  $\Delta 5$ DBC 株,  $\Delta$ DBC[*yvdA-yycS*]株および野生株における転写プロファイルの比較

A-D それぞれの遺伝子の転写強度を対数スケールで表したスカッタープロット図。y 軸は、それぞれ  $\Delta 6$ DBC 株 (A, B),  $\Delta 5$ DBC 株 (C),  $\Delta$ DBC[*yvdA-yycS*]株 (D) を表し、x 軸は野生株を表している。 $\Delta 6$ DBC 株と野生株との比較解析は、2 回実施した。

この結果は、*ywIC* プロモーター下流に残る DnaA-box が *ywIC* の転写抑制に重要である可能性を示唆している。また、DnaA による転写抑制が報告された *yydA* については、今回  $\Delta 6$ DBC 株では転写量が明らかに減少していた。この結果は、DBC 領域削除の際、*yydA* のプロモーター配列も同時に削除したためと考えられる (表III.2)。一方、以前の解析では明確に転写制御の関与は認められなかった領域である *vpr* と *ywcl-sacT* については (Ishikawa et al, 2007)、転写量が上昇しており、DnaA 結合により発現抑制された状態から脱抑制されたものと考えられる (表III.2)。また *thdF-gidAB-noc* オペロンの転写は、以前の解析結果と同様 (Ishikawa et al, 2007) に転写の抑制が認められた (表III.2)。

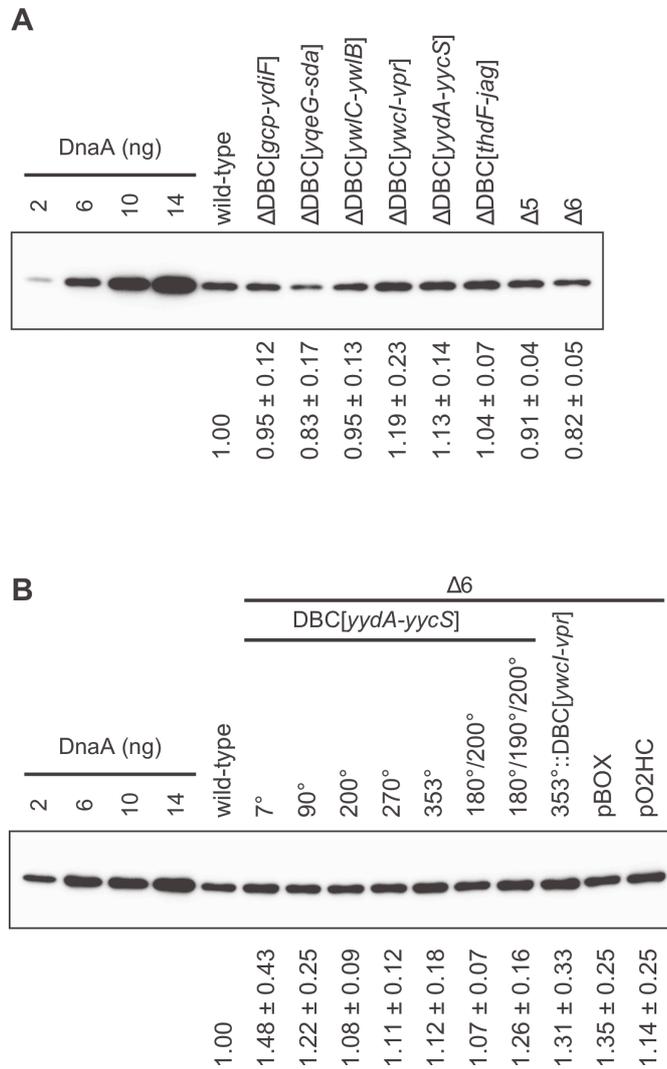


図III.6  $\Delta abrB$  株および  $\Delta sigD$  株のフローサイトメトリーのプロファイル  
wild-type (168), MYA143 ( $\Delta 6$ DBC), OC003 ( $\Delta abrB$ ), 168SDC ( $\Delta sigD$ , (Serizawa et al, 2004)) のフローサイトメトリーのプロファイル。培養は、SMM を使用し 30°C で行った。詳細は、2.10 フローサイトメトリー解析の項を参照。

これらの結果から、少なくとも今回使用した条件下 (SMM 25°C) においても、DnaA はリプレッサーあるいはアクチベーターとして機能していることが示された。しかしながら、DBC を削除したことにより同時に他の転写制御因子の結合サイトも削除している可能性も依然として考えられる。実際に、DBC[*thdF-jag*]に近接する 2 箇所の ComK 結合サイトは、*thdF* オペロンの転写を正に制御することが報告されている (Ogura et al, 2002)。さらに、DBC[*ywcl-vpr*]領域内の LexA 結合サイトは、*vpr* の転写抑制に関与していると予測されている (Au et al, 2005)。これらの遺伝子間領域における DnaA を介した直接的な転写制御の関与を明らかにするためには、さらなる解析が必要である。

さらに興味深い事に、 $\Delta 6$ DBC 株のトランスクリプトーム解析を通じて、*AbrB* レギュロンの転写が、上昇していることが明らかになった (図III.5.A, B)。*AbrB* レギュロンは、対数増

殖期から定常期への移行期に発現する遺伝子群であり、対数増殖期には AbrB により転写が抑制されている (Chumsakul et al, 2011)。



図Ⅲ.7 DBCの欠損株および再導入株におけるDnaAタンパク質の発現量

対数増殖期の細胞 (SMM, 30°C, OD<sub>600</sub>=0.3) を集菌し、同量の細胞粗抽出液に含まれる DnaA タンパク質を抗 DnaA 抗体によるウエスタンブロッティング法により見積もった。ウエスタンブロッティング法については、II.13 ウエスタンブロッティング法の項を参照。下段の数字は、野生株に対する相対値±SD。

- (a) 168 (wild-type), MYA155 ( $\Delta$ DBC[*gcp-ydiF*]), MYA156 ( $\Delta$ DBC[*yqeG-sda*]), MYA157 ( $\Delta$ DBC[*ywlC-ywIB*]), MYA018 ( $\Delta$ DBC[*ywcl-vprI*]), MYA019 ( $\Delta$ DBC[*yydA-yycS*]), MYA158 ( $\Delta$ DBC[*thdF-jagI*]), HO1009 ( $\Delta$ 5DBC), MYA143 ( $\Delta$ 6DBC) .
- (b) 168 (wild-type), HO1019 ( $\Delta$ 6DBC  $\Delta$ yabT::DBC[*yydA-yycS*]), HO1020 ( $\Delta$ 6DBC  $\Delta$ yhaR::DBC[*yydA-yycS*]), HO1021 ( $\Delta$ 6DBC  $\Delta$ ypqA::DBC[*yydA-yycS*]), HO1022 ( $\Delta$ 6DBC  $\Delta$ yteA::DBC[*yydA-yycS*]), HO1023 ( $\Delta$ 6DBC  $\Delta$ yxbC::DBC[*yydA-yycS*]), HO1242 ( $\Delta$ 6DBC DBC  $\Delta$ cgeD::DBC[*yydA-yycS*]  $\Delta$ ypqA::DBC[*yydA-yycS*]), HO1241 ( $\Delta$ 6DBC DBC  $\Delta$ cgeD::DBC[*yydA-yycS*]  $\Delta$ yonN::DBC[*yydA-yycS*]  $\Delta$ ypqA::DBC[*yydA-yycS*]), HO1245 ( $\Delta$ 6DBC  $\Delta$ DBC[*yydA-yycS*::DBC[*ywcl-vprI*]), HO1016 ( $\Delta$ 6DBC pBOX $\Delta$ yydA-yycS), HO1015 ( $\Delta$ 6DBC pO2HC)

今回の解析では、対数増殖期にある $\Delta 6\text{DBC}$ 株細胞において、その遺伝子群の転写が明らかに誘導されていた。さらに、2回の独立な実験で完全には再現されていないが、 $\text{SigD}$ レギュロン (Serizawa et al, 2004) の転写が、やはり $\Delta 6\text{DBC}$ 株において減少していた (図III.5.A, B)。このような現象の解明は、興味深く、今後重要であると考えられる。

この  $\text{AbrB}$  および  $\sigma\text{D}$  両レギュロンの転写量の変化が、 $\Delta 6\text{DBC}$ 株の過剰複製にやはり何らかの影響を与えているのか確認するために、*abrB*欠損株および *sigD* ( $\sigma\text{D}$ をコードする)欠損株を構築しフローサイトメトリー解析を行った。結果は、両欠損変異株共にDNAピークのプロファイルに変化は認められなかった (図III.6)。

$\text{DnaA}$ による他の遺伝子の転写制御の解析とは別に、 $\text{DnaA}$ 自身の発現量と複製開始頻度の関係について、Oguraらは解析している。それらの報告によると枯草菌において $\text{DnaA}$ の発現量を増加させると過剰複製が誘導されるとしている (Ogura et al, 2001)。しかしながら、今回の解析で過剰複製の誘導が明らかになった $\Delta 6\text{DBC}$ 株では、*dnaA*の転写量は野生株に比べおよそ0.7倍に減少していた (表III.2)。 $\Delta 6\text{DBC}$ 株では、この結果を反映して $\text{DnaA}$ 量も減少しているのか、あるいは一定であるのかウェスタンブロッティング法により解析を実施した。しかしながら、解析の精度が十分確保出来ず、細胞当たりの $\text{DnaA}$ 量の評価を実施する事は出来なかった (図III.7)。

以上の結果から、 $\Delta 6\text{DBC}$ 株における過剰複製の表現型は、特定の遺伝子の発現量の変化に基づくものではなく、むしろ $\text{DnaA}$ 分子と $\text{DBC}$ 間での相互作用に何らかの変化が生じた結果として現れたものであると考えられる。しかしながら、その相互作用の違いを生み出すものが $\text{DnaA}$ のタンパク質量によるものであるのか、あるいは $\text{oriC}$ 外の $\text{DBC}$ と $\text{DnaA}$ 間の相互作用を介し抑制制御されていたものが脱抑制された結果によるものであるのか、今回の解析では明らかにすることが出来なかった。

#### III.4. $\Delta 6\text{DBC}$ 細胞の細胞形態および核様体構造の観察

$\Delta 6\text{DBC}$ 細胞の表現型をさらに詳細に解析するために、ゆっくりと増殖する培養条件で細胞を培養し、細胞および核様体の形態を野生株のものと比較しながら観察した。この際、培地としてSMMを用い培養は $25^{\circ}\text{C}$ で行った。この培養条件の時、野生株の倍化時間は、およそ120分であった。また、これまで $\Delta 6\text{DBC}$ 細胞と同様に過剰複製の表現型が報告されている  $\text{Spo0J}$ 欠損株 (HO1034)についても同様に解析した。 $\text{Spo0J}$ 欠損株では、複製開始時期が早まり、染色体分離の異常が起きると報告されている (Gruber & Errington, 2009,

Ireton et al, 1994, Lee & Grossman, 2006, Ogura et al, 2003, Sullivan et al, 2009)。

$\Delta$ 6DBC 株においても過剰複製に加えて核様体の構造異常が見られるのか、顕微鏡観察を通じて *Spo0J* 欠損株および野生株細胞との比較解析を行った。

生細胞の観察においては、分裂後の枯草菌細胞は明確に分離せずに鎖状に連なるため、分裂した細胞を見分けるのが困難である。そこで分裂した細胞を厳密に評価するため、生細胞を FM4-64 (細胞膜) と DAPI (染色体 DNA) を用いて二重染色し、蛍光顕微鏡で画像を取得した。得られた画像から、細胞当たりの核様体数を計測しその内訳を表 III.3 にまとめた。また、細胞長を計測しそのヒストグラムを作製した (図 III.8)。

表 III.3 細胞当たりの核様体数の内訳

菌株	遺伝子型	解析した細胞数		
		計	n=1 <sup>a</sup>	n=2 <sup>b</sup>
HO1065	wild-type	589	561 (95.2)	28 (4.8)
HO1067	$\Delta$ 6DBC	561	523 (93.2)	38 (6.8)
HO1069	$\Delta$ <i>spo0J</i>	532	513 (96.4)	19 (3.6)
HO1194	$\Delta$ ( <i>soj-spo0J</i> )	578	562 (97.2)	16 (2.8)
HO1200	$\Delta$ 6DBC, $\Delta$ ( <i>soj-spo0J</i> )	590	551 (93.4)	39 (6.6)
HO1176	$\Delta$ 5DBC	596	580 (97.3)	16 (2.7)
HO1175	$\Delta$ 6DBC, 200°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	626	614 (98.1)	12 (1.9)
HO1177	$\Delta$ 5DBC, D <i>spo0J</i>	632	612 (96.8)	20 (3.2)
HO1179	$\Delta$ 6DBC, 200°::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ], $\Delta$ <i>spo0J</i>	572	549 (96.0)	23 (4.0)

(a) 1 個の核様体 (n=1) を持つ細胞数。括弧内は解析した全体の細胞数に対する比率。

(b) 2 個の核様体 (n=2) を持つ細胞数。括弧内は解析した全体の細胞数に対する比率。

FM4-64 (細胞膜) と DAPI (染色体 DNA) を用いて二重染色した生細胞を観察し、細胞当たりの核様体数を計測した。野生株細胞の大部分 (95.2%) は、1 個の核様体を保持しており、少数の長い細胞集団 (4.8%) については 2 個の核様体を有していた (表 III.3)。 $\Delta$ 6DBC 細胞および  $\Delta$ *spo0J* 細胞においても同様の傾向がみられた。

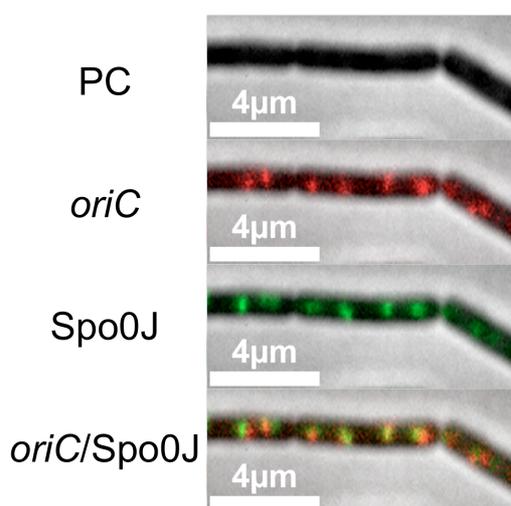
これらの結果から、解析で用いた培養条件 (SMM 25°C) において、野生株および変異株の細胞では、染色体複製の後、2 個の娘染色体が分離すると、速やかに細胞分裂が起きると考えられる。



FM4-64 染色を実施した生細胞を解析し各細胞の細胞長の分布をヒストグラムに表した結果、 $\Delta 6\text{DBC}$  細胞の細胞長 ( $2.82 \mu\text{m}$ ) は、野生株の細胞長 ( $2.96 \mu\text{m}$ ) と同様であることが明らかになった (図III.8.A-B)。一方、*spo0J* 欠損株 ( $\Delta spo0J$ ) では、これまで報告されている結果と一致するように、細胞の伸長が僅かではあるが観察された ( $3.23 \mu\text{m}$ ) (図III.8.C,) (Autret et al, 2001, Ogura et al, 2003)。

### III.5. $\Delta 6\text{DBC}$ 株では複製開始が早期に始まる

核様体構造の詳細な解析を行うために、*oriC* 領域の細胞内での相対的な位置を測定した。Lee と Grossman は、*oriC* の細胞内局在を統計的に解析した結果、*Spo0J* 欠損株では、過剰複製に加えて *oriC* の細胞内局在にバラつきを生じ、さらに複製後の娘 *oriC* の分離阻害が起きると報告している (Lee & Grossman, 2006)。



図III.9 *oriC* foci と *Spo0J* foci の共局在

HO1074 染色体の *oriC* 近傍 (*hutM*:345°) に挿入した *tetO* array に結合する TetR-mCherry と *Spo0J*-GFP の蛍光シグナルを用いて、*oriC* 領域を視覚化した。細胞は、SMM 25°C で培養した後、位相差像 (PC), TetR-mCherry (*oriC*), *Spo0J*-GFP (*Spo0J*), TetR-mCherry と *Spo0J*-GFP のオーバーレイ画像 (*oriC/Spo0J*) の蛍光像を撮影した。詳細は 2.12 蛍光顕微鏡を用いた生細胞の観察を参照。

### 図III.8 野生株および変異株の細胞長の分布

各々の変異株および野生株細胞を対数増殖期 (SMM 25°C) まで培養し、膜染色 (FM4-64) を行った後、500-1000 個の生細胞の細胞長を計測した。ヒストグラムにおける細胞長の区間は  $0.5 \mu\text{m}$  で作製した。それぞれに、計測した細胞数 (n) および平均細胞長 ( $\text{Av} \pm \text{SD}$ ) を示す。(A) wild-type (168), (B) MYA143 ( $\Delta 6\text{DBC}$ ), (C) HO1034 ( $\Delta spo0J$ ), (D) HO1030 ( $\Delta [soj-spo0J]$ ), (E) HO1035 ( $\Delta 6\text{DBC} \Delta spo0J$ ), (F) HO1225 ( $\Delta 6\text{DBC} \Delta spo0J sojT88M$ ), (G) HO1031 ( $\Delta \Delta 6\text{DBC}, \Delta [soj-spo0J]$ ), (H) HO1009 ( $\Delta 5\text{DBC}$ ), (I) HO1021 ( $\Delta 6\text{DBC} 200^\circ::\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (J) HO1041 ( $\Delta 5\text{DBC} \Delta spo0J$ ), (K) HO1178 ( $\Delta 6\text{DBC} \Delta spo0J 200^\circ::\text{DBC}[yydA-yycS]$ ) .

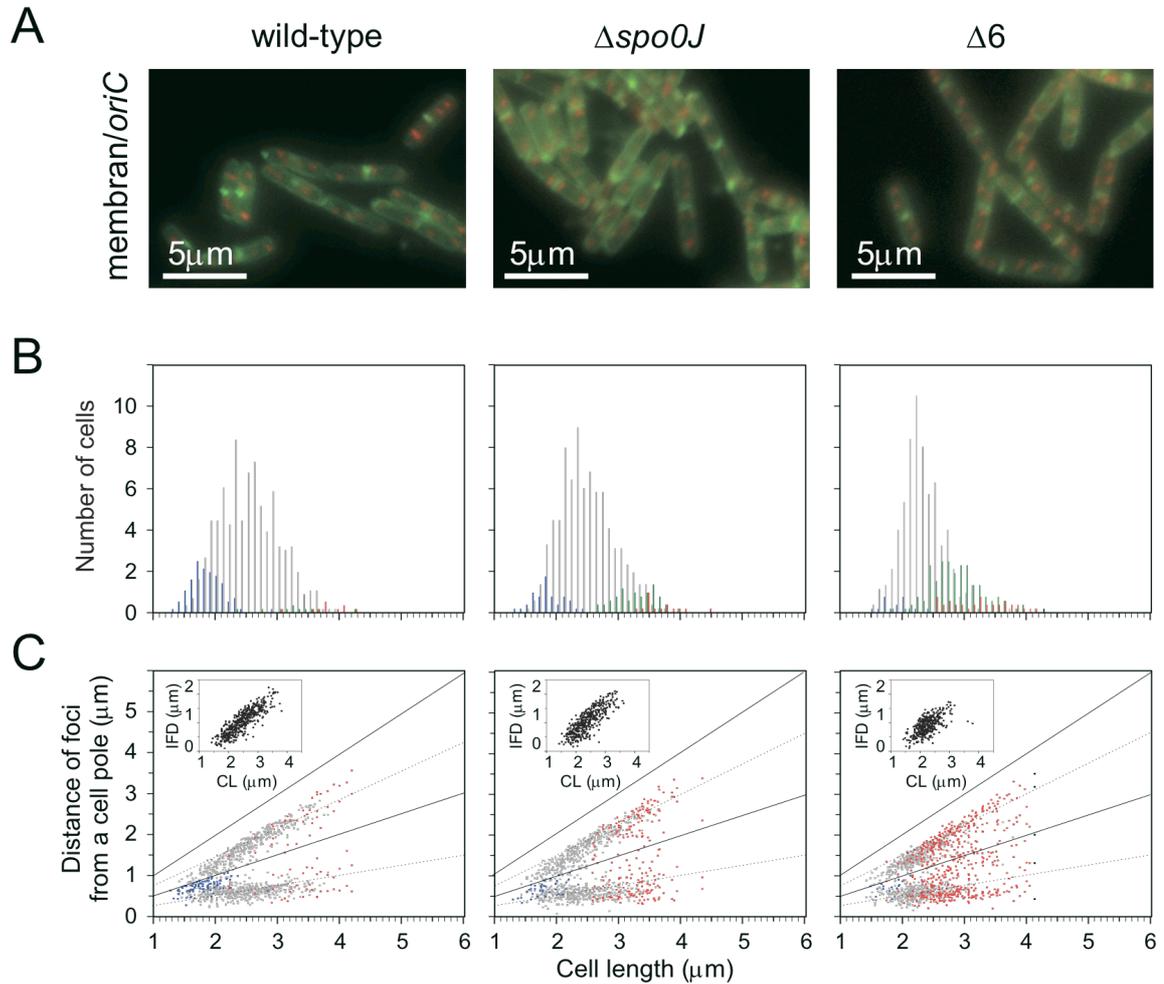
表Ⅲ. 4 細胞当たりの *oriC* foci数の内訳<sup>a</sup>

菌株	遺伝子型	解析した細胞数	細胞 (n=1) 当たりの <i>oriC</i> 数の比率 <sup>b</sup>					細胞当たりの平均 <i>oriC</i> 数 <sup>c</sup>
			<i>oriC</i> =1	<i>oriC</i> =2	<i>oriC</i> =3	<i>oriC</i> =4	<i>oriC</i> ≥5	
HO1065	wild-type	561	14.8 (83)	81.5 (457)	2.0 (11)	1.8 (10)	0.0 (0)	1.98 (1.00)
HO1067	Δ6DBC	523	3.1 (16)	66.3 (347)	23.5 (123)	6.9 (36)	0.2 (1)	2.45 (1.24)
HO1069	Δ <i>spo0J</i>	513	7.2 (37)	80.5 (413)	9.4 (48)	2.9 (15)	0.0 (0)	2.12 (1.07)
HO1194	Δ( <i>soj-spo0J</i> )	562	18.5 (104)	73.0 (410)	6.0 (34)	2.3 (13)	0.2 (1)	1.95 (0.98)
HO1200	Δ6DBC, Δ( <i>soj-spo0J</i> )	551	6.2 (34)	63.7 (351)	24.7 (136)	10.2 (56)	1.5 (8)	2.42 (1.22)
HO1176	Δ5DBC	580	4.7 (27)	82.9 (481)	7.1 (41)	5.3 (31)	0.0 (0)	2.16 (1.09)
HO1175	Δ6DBC, 200 <sup>+</sup> ::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ]	614	4.9 (30)	84.5 (519)	7.0 (43)	3.6 (22)	0.0 (0)	2.12 (1.07)
HO1177	Δ5DBC, Δ <i>spo0J</i>	612	4.1 (25)	32.0 (196)	32.5 (199)	21.9 (134)	9.5 (58)	2.63 (1.32)
HO1179	Δ6DBC, 200 <sup>+</sup> ::DBC[ <i>yydA-yycS</i> ], Δ <i>spo0J</i>	549	4.0 (22)	31.5 (173)	36.1 (198)	17.1 (94)	11.3 (62)	2.54 (1.28)

(a) 表Ⅲ.3でn=1の細胞集団を対象にする。

(b) n=1細胞集団の中で各々の *oriC* 数 (*oriC*=1, =2, =3, =4, ≥5) を持つ細胞の比率。括弧内はその数。

(c) n=1細胞 (1個の核様体) 当たりの平均 *oriC* 数。括弧内は野生株細胞との相対値。



図Ⅲ.10 *oriC* 領域の細胞内局在

wild-type 株 (HO1065),  $\Delta 6$ DBC 株 (HO1067),  $\Delta spo0J$  株 (HO1069) の *oriC* 近傍 (*hutM::345°*) に挿入した *tetO* array に結合する TetR-mCherry を用いて、*oriC* 領域の視覚化した。細胞は、SMM 25°C で培養した後、MitoTracker Green FM (細胞膜) および mCherry (*oriC*) の蛍光像を撮影した。詳細は 2.12 蛍光顕微鏡を用いた生細胞の観察を参照。

- (A) MitoTracker Green FM (緑) および mCherry (赤) の Overlay 画像。  
 (B) 区間の長さが 0.1 $\mu$ m の細胞長のヒストグラム。1 個, 2 個, 3 個, 4 個,  $\geq 5$  個の *oriC*-foci を有する  $n=1$  細胞 (1 個の核様体を持つ細胞) について、各々青, 灰, 緑, 赤, 黒で示す。  
 (C) 細胞内における *oriC* foci の位置を散布図として表した。x 軸に近接の細胞極から *oriC* foci までの距離をとり、y 軸には細胞長をとった。1 個, 2 個,  $\geq 3$  個の *oriC* foci を有する  $n=1$  細胞 (1 個の核様体を持つ細胞) について、各々青, 灰, 赤で示す。(B) および (C) の x 軸は同じスケール細胞長で示されており、細胞長は (C) の下端に表している。(差し込み図) は、x 軸; 2 個の *oriC* foci 間の距離 (interfocal distance, IFD) と y 軸; 細胞長 (CL) の分布図である。

$\Delta spo0J$  株同様に、過剰複製を示す  $\Delta 6$ DBC 株においても *oriC* 領域の局在異常が起きているのか、確認するために *tetO*-TetR fluorescent repressor operator system (FROS) を利用し生細胞の蛍光顕微鏡観察を行った。解析を行う各株について、*tetO* array 配列を *oriC* から

167Kbp 離れた領域 (*hutM*::345°) へ挿入し、*amyE* 領域に挿入したカセットから発現する TetR-mCherry 融合タンパク質により *tetO* array を赤色蛍光でラベルし、蛍光顕微鏡で観察した (Veening et al, 2009)。なお、*hutM*::345°からの蛍光シグナルが、*oriC* 領域の位置を反映していることを確認するために、これまで *oriC* 領域の細胞内局在マーカーとして用いられてきた Spo0J-GFP と TetR-mCherry の両 foci が共局在することを確認している (図III.9)。解析の結果として明らかになった、細胞当たりの *oriC* foci 数を表III.4 に、画像と細胞長のヒストグラム、および細胞長と *oriC* foci の局在位置の散布図を図III.10 に示す。

枯草菌では過去の解析から、複製が開始された後、2 個の娘 *oriC* は直ちに分離するということが分かっている (Webb et al, 1998)。今回の解析で用いた培養条件 (SMM 25°C) において野生株細胞では、2 個の *oriC* foci を持つ細胞集団が大部分を占めた (81.5%) (表III.4, 図III.10.B グレー)。一方、1 個の *oriC* foci を持つ細胞長の短い細胞は少数であった (14.8%) (表III.4, III.10.B 青)。また、わずかではあるが 3 個あるいは 4 個の *oriC* foci を有する細胞 (3.8%) も観察された (表III.4, 図III.10.B 緑赤)。これらの結果から、今回解析に用いた増殖速度の遅い培養条件下 (SMM 25°C) では、野生株の細胞は、細胞分裂が完了する前に複製が終結しており、さらに細胞分裂完了に続いて、新たな複製開始が、1 個の *oriC* から始まることを示している。

それに対して、 $\Delta$ 6DBC 株の細胞では 1 個の *oriC* foci を持つ細胞は、わずかしこ検出されず (3.1%) (表III.4, 図III.10.B 青)、それに代わり 3 個ないし 4 個の *oriC* foci を持つ細胞集団の割合が増加 (27.4%) した (表III.4, 図III.10.B 緑赤)。この結果から、 $\Delta$ 6DBC 細胞では、野生株細胞とは異なり、複製開始が細胞分裂前の 2 個の *oriC* から起きていると考えられる。 $\Delta$ 6DBC 細胞では、*oriC* *terC* 比が野生株細胞に比べ 1.37 倍高い値を示すことを III.3 項で示したが (表III.1)、それは、細胞周期における複製開始の時期が早まったためであると考えられる。

一方、 $\Delta$ spo0J 細胞では、1 個の *oriC* foci を持つ細胞が 7.2% (表III.4, 図III.10.B 青)、また 3 個ないし 4 個の *oriC* foci を持つ細胞は 12.3% (表III.4, 図III.10.B 緑赤、) と、ほぼ同等の比率になっていた。このように  $\Delta$ spo0J 細胞では、1 個の *oriC* foci を持つ細胞 (複製開始前の集団) と、3 個ないし 4 個の *oriC* foci を持つ細胞 (細胞分裂前に複製が開始した集団) が、ほぼ等しい比率で存在していた。これは、 $\Delta$ spo0J 細胞においては複製開始時期と細胞分裂時期が一致していることを示唆している。すなわち、 $\Delta$ spo0J 細胞においても  $\Delta$ 6DBC 細胞ほど顕著ではないが、早期の複製開始が起きていると考えられる。また、本研究で得られた

これらの結果は、これまで報告されてきた $\Delta spo0J$ 欠損株の解析結果とも一致するものである (Gruber & Errington, 2009, Ireton et al, 1994, Lee & Grossman, 2006, Ogura et al, 2003, Sullivan et al, 2009)。

蛍光顕微鏡を用いた *oriC* foci の解析から、 $\Delta spo0J$ 株および $\Delta 6DBC$ 株では、3個の *oriC* を保持する細胞 (3-*oriC*) が増加していることが明らかになった。特に $\Delta 6DBC$ 株細胞では、その傾向が顕著であり、細胞当たりの *oriC* foci のヒストグラム解析では、3-*oriC*細胞の占める比率が野生株 (2.0%) に比較しておよそ 10 倍高い値 (23.5%) を示すことが明らかになった。この 3-*oriC*細胞が検出されたことについては、二つの可能性が考えられる。一つは、2個の *oriC* からそれぞれ複製が開始されてはいるが、複製された 2 対 (4 個) の娘 *oriC*のうち 1 対 (2 個) の娘 *oriC* の分離が阻害されるというものである。この場合、本研究の解析で使用した蛍光顕微鏡が持つ解像度の制限から、分離阻害により近接したままの 2 個の *oriC* を認識することは出来ない。しかしながら、フローサイトメトリー解析においては、2-*oriC* から複製された 4-*oriC* の DNA 量を反映して 4N (*oriC*=4) の DNA ピークが顕著に増加するはずである。ところが、実際には DBC 欠損変異株では 4N ピークの亢進は僅かに認められるものの、それ以上に 3N ピークが亢進していることが明らかになった。一方、もう一つの可能性であるが、核様体分離が起きる前の段階において 2 個の *oriC* からの複製開始のタイミングにバラつきが生じるというものである。前述の通り、フローサイトメトリー解析において観察された DBC 欠損変異株のパターンでは、3N (*oriC*=3) に相当する DNA ピークが確かに亢進することが観察されている (図III.2)。これらの結果から、DBC 欠損変異株で観察された 3 個の *oriC* foci を保持する細胞では、2 個の *oriC* からの複製開始時期にバラつきが生じており、片方の *oriC* の複製が開始されていないままに細胞分裂が生じていると考えられる。

次に、細胞内での *oriC* の相対的な局在位置を解析した (図III.10.C)。野生株細胞では、1 個の *oriC* は細胞中央に局在している (図III.10.C 青)。そして、細胞長が複製開始を行う長さには達すると、2 個に分離した *oriC* が細胞の 1/4 および 3/4 の位置に移動することが観察された (図III.10.C グレー)。このような *oriC* foci の細胞内挙動は、今までされてきた報告と一致するものである。 $\Delta spo0J$ 株および $\Delta 6DBC$ 株においても、基本的には 1 個の *oriC* と 2 個の *oriC* の局在分布のパターンは、同様のものであった。しかし、この 2 株の細胞では、細胞の 1/8、3/8、5/8、7/8 の位置に局在する 3 個~4 個の *oriC* foci が増加していた (図III.10.C 赤)。これは、 $\Delta spo0J$ 細胞および $\Delta 6DBC$ 細胞における過剰複製を反映したものであると考

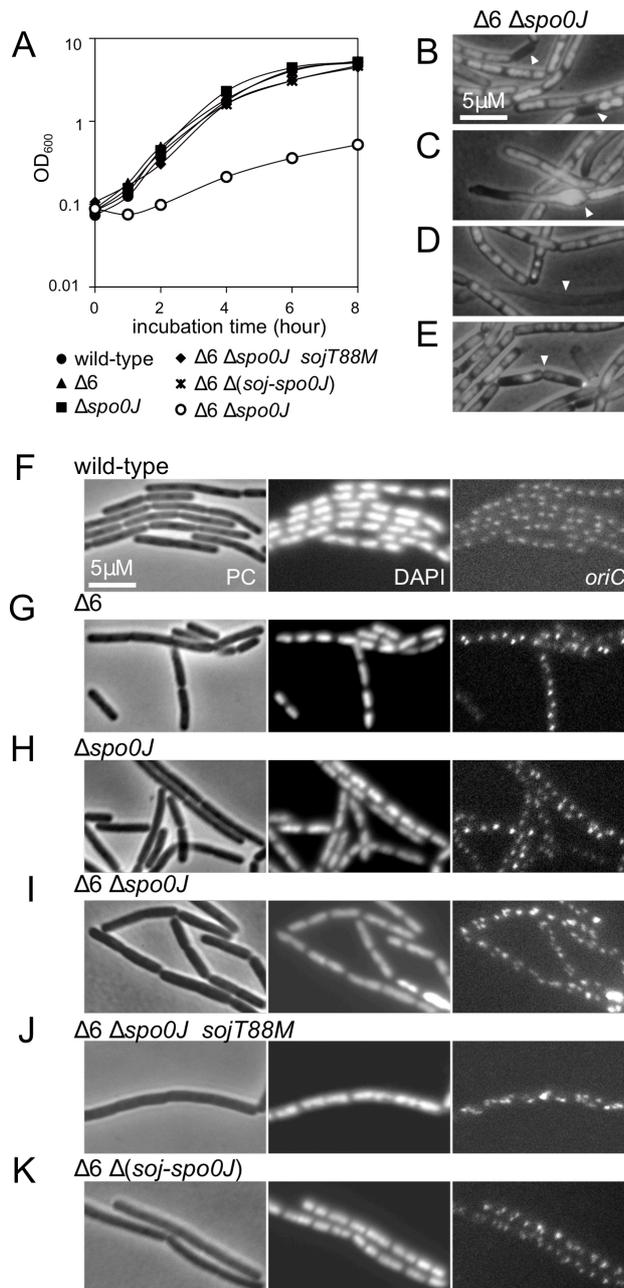
えられる。

さらに、複製後に分離した 2 個の *oriC* が正確に分配されたかを判断するために、2 つの *oriC* 間の距離 (interfocal distance = IFD) を計測し、細胞長との関係を散布図として示した (差し込み図 III.10.C)。野生株細胞では、細胞長 (CL) に比例して 2 つの *oriC* 間の距離 (IFD) も伸張していくことが分かった。 $\Delta spo0J$  株および  $\Delta 6DBC$  株においても同様の傾向にあるが、 $\Delta 6DBC$  株では、長い細胞長を持つ細胞は 2 個以上の *oriC* を持つため、IFD を計測する 2 個の *oriC* を持つ細胞の分布は分布図からは消失している。しかしながら、IFD の分布について著しい偏りは見られなかった。

今回 *tetO/TetR* システムを用いて、細胞当たりの *oriC* foci の数と細胞長の関係 (図 III.10.B) と、細胞内での *oriC* の相対的な局在位置の解析 (図 III.10.C) および、2 つの *oriC* 間の距離 (IFD) と細胞長との関係 (差し込み図 III.10.C) を解析した。これらの結果から、 $\Delta spo0J$  株および  $\Delta 6DBC$  株において、複製開始時期が早期に起きていることを示唆する結果が得られた。一方、染色体分離については、解析で使用した遅い増殖速度の培養条件下では、 $\Delta spo0J$  株および  $\Delta 6DBC$  株において染色体分離に異常を来すような表現型は検出されなかった。以上の結果から、今回の遅い増殖速度における培養条件下では、 $\Delta spo0J$  細胞および  $\Delta 6DBC$  細胞の *oriC* の細胞内局在が見かけ上乱れることはないということが分かった。なお、 $\Delta spo0J$  細胞でみられる染色体分離異常の表現型は、増殖速度が遅い培養条件下では抑制されるという報告があり (Autret et al, 2001)、今回の解析結果と一致する。

### III.6. $\Delta 6DBC$ と $\Delta spo0J$ の変異は相乗的に過剰複製を促進し、染色体分離障害と著しい細胞増殖障害を引き起こす

III.5 項で述べた通り、 $\Delta 6DBC$  株で観察された早期の複製開始は、そのタイミングが異なっているが  $\Delta spo0J$  株においても観察された。さらに、DnaA 結合領域である DBC と Spo0J 結合サイトの *parS* サイトは、両者ともに *oriC* 近傍領域に分布している (Ishikawa et al, 2007)。これらの事実は、 $\Delta 6DBC$  株の表現型が Spo0J の機能が部分的に損なわれたことに起因するかあるいは、DnaA の *oriC* 外 DBC への結合が Spo0J の担う機能と重複していることを示唆している。これらの可能性を確かめるために、 $\Delta spo0J$  欠損変異を  $\Delta 6DBC$  株に導入し表現型を解析することにした。



図Ⅲ.11 ( $\Delta 6DBC-\Delta spo0J$ ) 二重欠損株における表現型 (増殖阻害と形態異常) と Soj 機能欠損によるその抑制

- A. 細胞増殖曲線 (SMM 37°C); 168 (wild-type; 黒丸), MYA143 ( $\Delta 6$ ; 黒三角), HO1034 ( $\Delta spo0J$ ; 黒四角), HO1035 ( $\Delta 6DBC-\Delta spo0J$ ; 白丸), HO1225 ( $\Delta 6DBC-\Delta spo0J-sojT88M$ ; 黒菱), and HO1031 ( $\Delta 6DBC-\Delta (soj-spo0J)$ ; アスタリスク)
- B-E. HO1035 ( $\Delta 6DBC-\Delta spo0J$ ) 生細胞 (SMM 25°C) の位相差像と DAPI 像の Overlay 画像。無核の細胞 (B), 膨張した細胞 (C), ゴースト細胞 (D), ギロチン効果が見られる細胞 (E)。
- F-K. *tetO/tetR-mCherry* を有する生細胞 (SMM 25°C) の位相差 (PC), DAPI (DAPI) および *oriC* foci (*oriC*) の画像。(F) HO1065 (wild-type), (G) HO1067 ( $\Delta 6DBC$ ), (H) HO1069 ( $\Delta spo0J$ ), (I) HO1226 ( $\Delta 6DBC-\Delta spo0J$ ), (J) HO1071 ( $\Delta 6DBC-\Delta spo0J-sojT88M$ ), (K) HO1200 ( $\Delta 6DBC-\Delta (soj-spo0J)$ )

その結果、 $\Delta 6\text{DBC}$  と  $\Delta\text{spo0J}$  の欠損が相乗的に細胞増殖阻害 (SMM 37°C) を引き起こすことが明らかになった (図III.11.A)。また、Autret らは、増殖速度が遅い培養条件において  $\Delta\text{spo0J}$  単独欠損株による染色体の分離阻害は抑制されると報告している (Autret et al, 2001) が、 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta\text{spo0J}$  二重欠損株の増殖阻害はそうした条件 (SMM 25°C) においても観察された。さらに、 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta\text{spo0J}$  株では、複製後に分離の出来ない核様体と思われる DNA が細胞内に広く拡散していることが観察された (図III.11.F)。顕微鏡像の観察から、 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta\text{spo0J}$  株では少なくとも 10% 程度の細胞では染色体分離に異常を来しており、無核の細胞が出現していた (図III.11.B)。この様に異常な細胞形態および核様体形態を示す頻度は、 $\Delta\text{spo0J}$  単独欠損株よりも顕著に高い (Autret et al, 2001, Ireton et al, 1994)。従って、二重欠損変異株では、染色体の分離が著しく阻害されていることが明らかになった。また、その平均細胞長は  $8.67\mu\text{m}$  と、野生株の 2 倍以上に達しており (図III.8.E)、細胞分裂もまた阻害されていることも明らかになった。

これらの結果と一致するように、異常に膨らんだ細胞 (図III.11.C)、細胞質を失ったゴースト細胞 (図III.11.D) さらに、核様体上での分裂 (ギロチン現象) (図III.11.E) など異常な細胞形態を示す細胞が観察された。

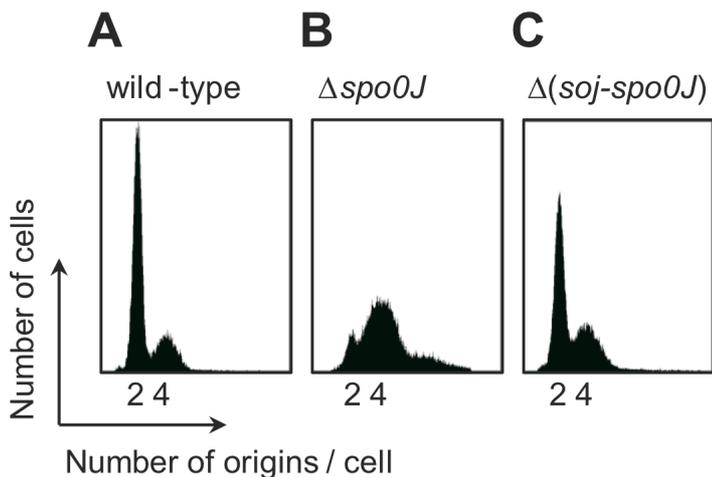
以上の結果から、 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta\text{spo0J}$  二重欠損変異により、細胞形態および核様体形態が著しく影響を受けることが明らかになった。 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta\text{spo0J}$  株細胞では、生細胞数 ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ) の減少も顕著であることから (結果は示さない)、細胞および核様体に形態異常を来するような細胞は、培養中においてに速やかに死に至ると予想される。そのため、 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta\text{spo0J}$  株細胞を対象とした *oriC* の細胞内局在の詳細な解析は、行うことが出来なかった。しかしながら、蛍光顕微鏡観察では、*oriC* が細胞内でランダムに位置することが見られ、かつその数も  $\Delta 6\text{DBC}$  株および  $\Delta\text{spo0J}$  株に比べ著しく増加していた (図III.11.I)。また、qPCR 法による解析では、*oriC/terC* 比が野生株のおよそ 2 倍にまで増加していることが分かった (表III.1)。これら結果から、 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta\text{spo0J}$  株細胞においては、 $\Delta 6\text{DBC}$  株に比べて過剰複製が一層促進されていると考えられる。

### III.7. *Soj* の欠損により $\Delta 6\text{DBC}-\Delta\text{spo0J}$ 二重欠損株の増殖阻害は回復する

興味深いことに、解析を続ける中で  $\Delta 6\text{DBC}-\Delta\text{spo0J}$  二重欠損変異株における増殖抑制の復

帰変異株 (HO1225) が出現することが明らかになった。この変異株では、増殖速度が野生株と同等まで回復しており (図III.11.A)、*soj* 遺伝子へ点変異 (T88M) が導入されていることが分かった。さらに、 $\Delta soj$  欠損変異を $\Delta 6DBC\text{-}\Delta spo0J$  二重欠損変異株に導入したところ ( $\Delta 6DBC\text{-}\Delta (soj\text{-}spo0J)$ )、やはり増殖阻害は *Soj*T88M 変異導入と同様に回復した (図III.11.A)。この結果から、*Soj*T88M タンパク質の詳細な性質に関する解析は行っていないが、機能損失型の変異であると考えられる。

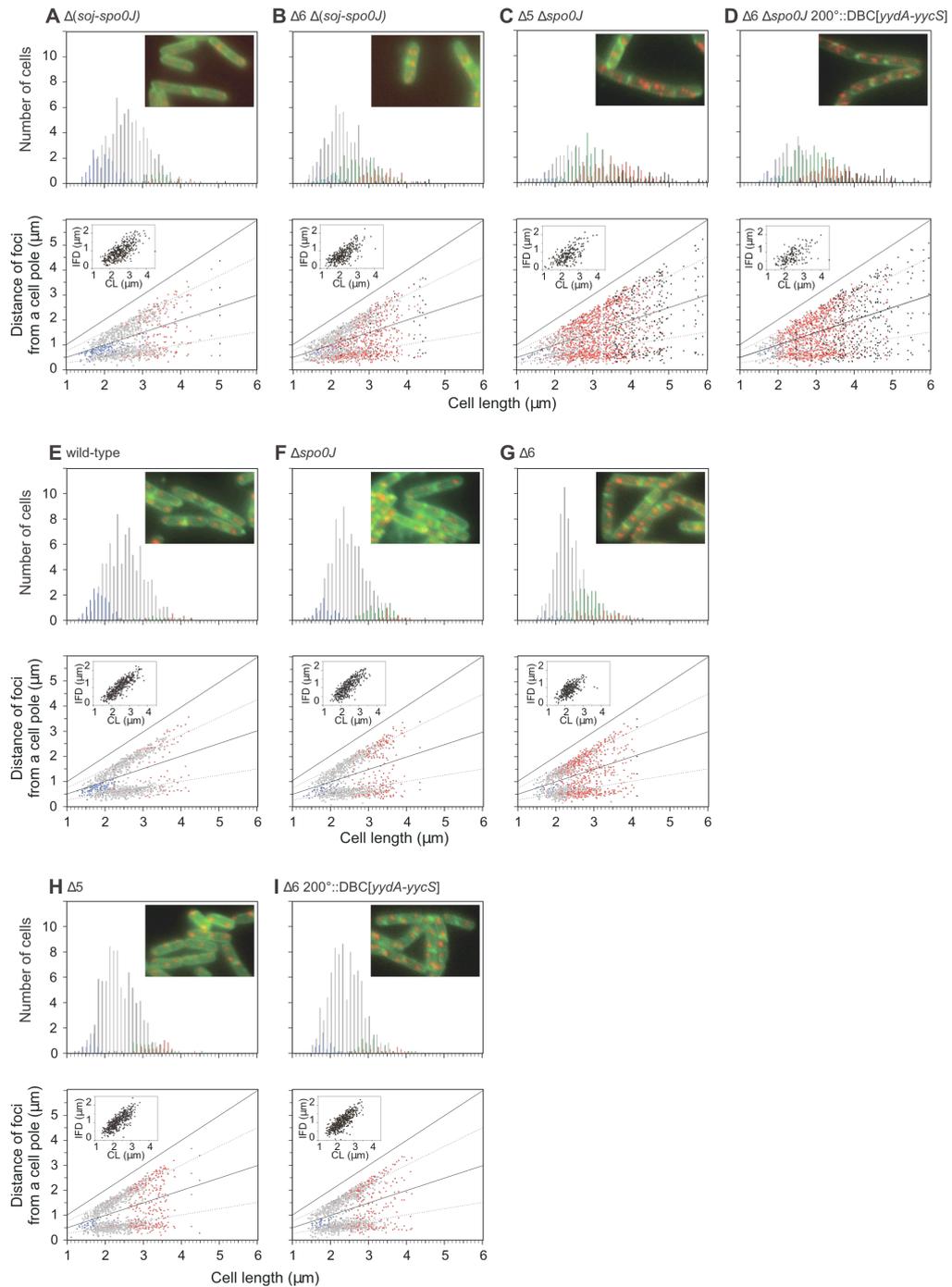
最近、Murray と Errington および Scholefield らは、*Soj* が *DnaA* を活性化し、その活性化は *Spo0J* によって抑制されると報告している (Murray & Errington, 2008, Scholefield et al, 2011b)。本研究において行ったフローサイトメトリー解析でも、 $\Delta spo0J$  欠損変異により誘導される過剰複製は、*soj* の同時欠損により部分的に相補されることが、本研究で使用した菌株の遺伝的背景においても確認されている (図III.12)。



図III.12  $\Delta spo0J$  株および  $\Delta (soj\text{-}spo0J)$  株のフローサイトメトリー解析の DNA ピークのプロファイル

(A) wild-type (168), (B) HO1034 ( $\Delta spo0J$ ), (C) HO1030 ( $\Delta [soj\text{-}spo0J]$ ) のフローサイトメトリーのプロファイル。培養は、SMM を使用し 30°C で行った。詳細は、2.10 フローサイトメトリー解析の項を参照。

フローサイトメトリー解析で見られた  $\Delta spo0J$  変異による表現型の  $\Delta soj$  変異による部分的相補については、*oriC* の細胞内局在解析においても観察された。 $\Delta (soj\text{-}spo0J)$  株では、1 個の *oriC* を持つ細胞が 18.5% と野生株と比較して同等の程度まで回復しているが、3 個ないしは 4 個の *oriC* を持つ細胞も依然として高いことが顕微鏡観察で明らかになった (図III.13.A, 表III.4)。



図Ⅲ.13 各変異株における *oriC* 領域の細胞内局在

図中の表記および解析方法については図Ⅲ.10と同様。(上側のパネル); 区間の長さが $0.1\mu\text{m}$ の細胞長さ数分布図。1個, 2個, 3個, 4個,  $\geq 5$ 個の *oriC*-fociを有する  $n=1$ 細胞 (1個の核様体を持つ細胞) について、各々青, 灰, 緑, 赤, 黒で示す。差し込み図の写真は、赤が *oriC*-foci 緑が細胞膜を表す。(下側のパネル); 細胞内における *oriC*-fociの位置の散布図。1個, 2個,  $\geq 3$ 個の *oriC*-fociを有する  $n=1$ 細胞 (1個の核様体を持つ細胞) について、各々青, 灰, 赤で示す。(差し込み図) は、x軸; 2個の *oriC*-foci間の距離 (interfocal distance, IFD) と y軸; 細胞長 (CL) の分布図である。(A) HO1194 ( $\Delta$  (*soj-spo0J*)), (B) HO1200 ( $\Delta 6\text{DBC-}\Delta$  (*soj-spo0J*)), (C) HO1177 ( $\Delta 6\text{DBC-}\Delta$  (*spo0J*)), (D) HO1179 ( $\Delta 6\text{DBC-}\Delta$  (*spo0J*)  $200^\circ::\text{DBC}[\text{yydA-yyeS}]$ ), (E) HO1065 (wild-type), (F) HO1069 ( $\Delta$  (*spo0J*)), (G) HO1067 ( $\Delta 6\text{DBC}$ ), (H) HO1176 ( $\Delta 5\text{DBC}$ ), (I) HO1178 ( $\Delta 6\text{DBC } 200^\circ::\text{DBC}[\text{yydA-yyeS}]$ ) .

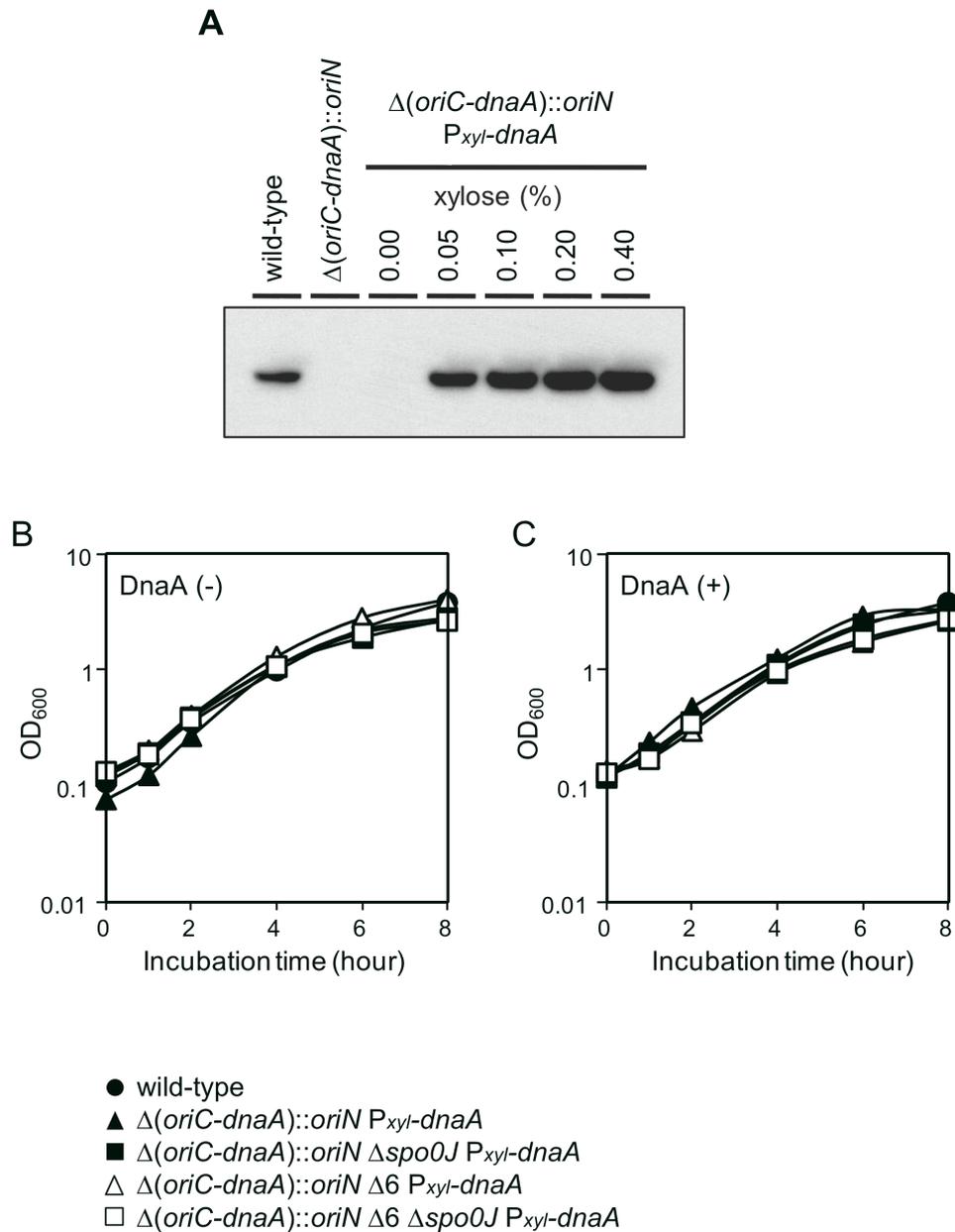
これらの結果は、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損変異株において、 $\text{Spo0J}$  の抑制制御から脱抑制された  $\text{Soj}$  により  $\text{DnaA}$  の活性化が構成的に起きており、さらなる過剰複製を引き起こすことで増殖阻害が起きていることを示唆している。実際に、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損株に  $\text{soj}$  欠損変異を導入すると、平均細胞長の伸張は回復することが本研究で行った顕微鏡観察で分かっている。 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損株へ  $\text{soj}$  機能欠損変異を導入した株の平均細胞長は、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}\text{-}\text{sojT88M}$  株が  $3.48\mu\text{m}$ 、また  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta$  ( $\text{soj}\text{-}\text{spo0J}$ ) 株では  $3.10\mu\text{m}$  であった (図III.8.F, III.8.G)。一方、 $\text{oriC/terC}$  比は  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}\text{-}\text{sojT88M}$  株が 3.83 に、また  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta$  ( $\text{soj}\text{-}\text{spo0J}$ ) 株では 3.79 となり、 $\Delta 6\text{DBC}$  細胞の 3.09 と比べても依然として高い値を示した (表III.2)。その結果を反映して、 $\text{oriC}$  の細胞内局在解析においても  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta$  ( $\text{soj}\text{-}\text{spo0J}$ ) 株 (図III.13.B) では、3 個ないしは 4 個の  $\text{oriC}$  を持つ細胞の比率が、 $\Delta 6\text{DBC}$  株 (図III.13.G) および  $\Delta\text{spo0J}$  株 (図III.13.F) に比較して依然として高かった。以上の結果から、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  株へ  $\text{soj}$  機能欠損変異を導入することで、増殖速度および細胞長伸張は、ほぼ相補されることが明らかになった。それに対して、複製開始頻度は依然として亢進したままであった。Lee と Grossman の解析によると、 $\Delta$  ( $\text{soj}\text{-}\text{spo0J}$ ) 欠損変異株においても過剰複製の表現型は、依然として残っていると報告している (Lee & Grossman, 2006)。したがって、 $\Delta$  ( $\text{soj}\text{-}\text{spo0J}$ ) 欠損変異が  $\Delta 6\text{DBC}$  に加わることにより、 $\Delta$  ( $\text{soj}\text{-}\text{spo0J}$ ) - $\Delta 6\text{DBC}$  株では  $\Delta 6\text{DBC}$  株に比べ、さらに過剰複製が促進されていると考えられる。Scholefield らは、 $\text{Soj}$  による  $\text{DnaA}$  活性の阻害と活性化のバランスは、 $\text{Spo0J}$  により制御されていると報告している (Scholefield et al, 2011b)。つまり、Murray と Errington らが提唱するように、 $\text{Soj}$  は細胞周期の大半の期間で  $\text{DnaA}$  の活性を抑制しており (Murray & Errington, 2008)、そのため  $\text{Soj}$  を欠損により細胞中では  $\text{DnaA}$  の構成的な活性化が引き起こされると考えられる。

### III.8. $\text{oriC}$ からの $\text{DnaA}$ 依存的な複製開始により、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$ 細胞の増殖阻害が引き起こされる

III.7 項で示した通り、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損変異による増殖阻害は、 $\text{Soj}$  への変異導入 ( $\text{SojT88M}$ ) により野生株と同等のレベルにまで回復することが明らかになった。また、同様の増殖阻害の抑制は  $\text{soj}$  欠損によっても観察されたことから、 $\text{SojT88M}$  は機能欠損型の変異であると考えられる。このように  $\text{Soj}$  機能欠損による  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  株の表現型 (過剰複

製のさらなる亢進、染色体分離阻害、細胞分裂阻害、細胞増殖阻害)の抑制が観察されたことから、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$ 株の致命的な表現型の発現は、DnaAの構成的な活性化により引き起こされていると予想した。

そこで、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$ 二重欠損変異株におけるDnaAの構成的活性化の効果を直接証明するために、*oriC*配列と*dnaA*をプラスミド由来の複製開始点(*oriN*)で置換した株(MU01 [ $\Delta(\textit{oriC}\text{-}\textit{dnaA})::\textit{oriN}$ ]; 図II.2)を構築した。



構築した MU01 株から染色体 DNA を抽出し、 $\Delta 6\text{DBC}$  株、 $\Delta\text{spo0J}$  株および  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$

株と共に形質転換することで各変異株の染色体上 *oriC* と *dnaA* を含む領域を *oriN* 配列で置換した。加えて、*P<sub>xyl</sub>* プロモーターの制御下に置いた *dnaA* を *amyE* に挿入し (図 II.4)、*DnaA* を過剰発現させた条件下での観察も同時に実施した。なお解析を行うに当たって、*P<sub>xyl</sub>* プロモーターの制御下に置いた *dnaA* が予想の通り発現されるのか、抗 *DnaA* 抗体を用いたウェスタンブロッティング法で確認している (図 III.14.A)。

その結果、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  株の増殖阻害は、野生株細胞とほぼ同等にまで回復した (図 III.14.B)。さらに、*amyE* から *DnaA* を過剰発現させた条件で培養しても増殖に影響はなかった (図 III.14.C)。一方、細胞形態についても *DnaA* の過剰発現を誘導する条件 (図 III.15.A) と、誘導しない条件 (図 III.15.B) で解析したが、異常な形態は認められなかった。

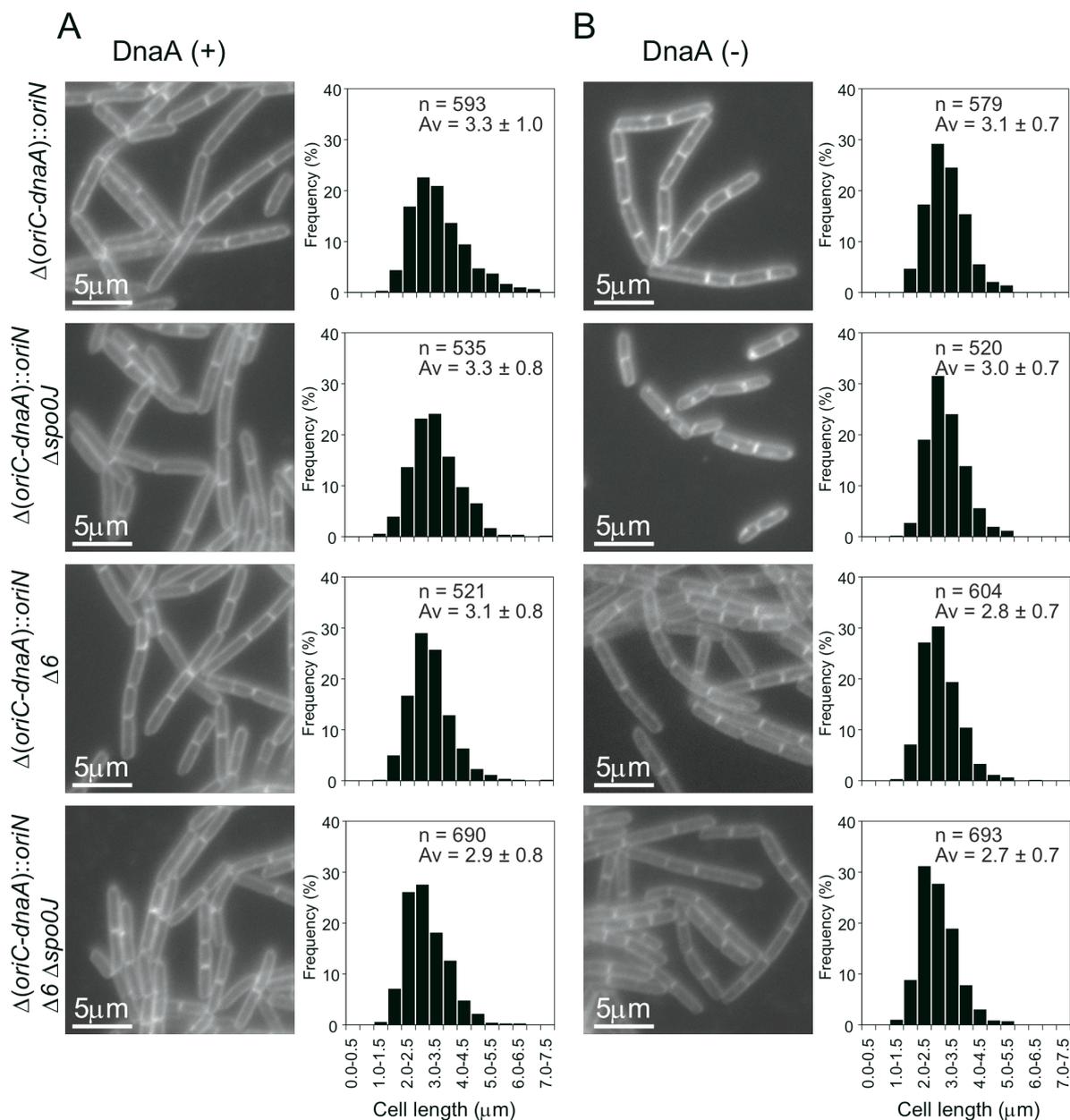
これらの結果から、 $\Delta 6\text{DBC}$  株で誘導される過剰複製の表現型は、*oriC* から開始される *DnaA* 依存の複製開始を必要としており、このことは  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  株での致死的な表現型が、*DnaA* の構成的な活性化に起因していることを強く示唆している。

### III.9. $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$ 二重欠損により SOS 応答が誘導される

前述の通り、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損株細胞では、致死に近い増殖阻害が誘導され、かつ誘導された増殖阻害は *DnaA* 依存的であった。さらに *soj* 欠損により増殖阻害の表現型は回復するすることも同時に明らかになった。これらの結果は、これまで報告されて来た *Soj* による *DnaA* の活性化モデルを支持するものである (Murray & Errington, 2008, Scholefield et al, 2011)。これらの結果は、抑制機構が不活化され恒常的に活性化された *DnaA* は細胞を致死に至らすことを示しており、そのため *DnaA* 活性は、いくつかの異なる系により抑制制御されていると予想される。

#### 図 III.14 MU03 における Xylose による *DnaA* の発現誘導と *oriN* を持つ変異株の細胞増殖曲線

- (A) SMM には、Xylose による *DnaA* の発現誘導が効率的に行われるように炭素源としての Glucose (0.5%, v/v) に代えて Glycerol (0.5%, v/v) を使用した。また、*DnaA* の発現を誘導するための Xylose は、0.00, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 % (v/v) に加えた。各々の株は、37°C で対数増殖期 ( $\text{OD}_{600}=0.3$ ) まで培養し、同量の細胞粗抽出液中の *DnaA* を抗 *DnaA* 抗体によりウェスタンブロッティング法で検出した。
- (B, C) 各株は、SMM (Glycerol (0.5%, v/v)) を使用し 37°C で培養した。*DnaA* の発現を誘導するための Xylose は、0.20 % (v/v) に加えた (C)。wild-type (168; 黒丸), MU03 ( $\Delta$  (*oriC-dnaA*) ::*oriN**P<sub>xyl</sub>*-*dnaA*; 黒三角), HO1201 ( $\Delta$  (*oriC-dnaA*) ::*oriN* $\Delta$ *spo0J**P<sub>xyl</sub>*-*dnaA*; 黒四角), HO1203 ( $\Delta$  (*oriC-dnaA*) ::*oriN* $\Delta$ 6DBC*P<sub>xyl</sub>*-*dnaA*; 白三角), HO1206 ( $\Delta$  (*oriC-dnaA*) ::*oriN* $\Delta$ 6DBC $\Delta$ *spo0J**P<sub>xyl</sub>*-*dnaA*; 白四角)



図Ⅲ.15 *oriN* による複製開始システム制御下での細胞形態と核様体構造

*oriC* および *dnaA* を *oriN* で置換した株; MU03 ( $\Delta[\text{oriC-dnaA}]::\text{oriN } \textit{amyE}::\textit{Pxyl-dnaA}$ ), HO1201 ( $\Delta[\text{oriC-dnaA}]::\text{oriN } \Delta\textit{spo0J } \textit{amyE}::\textit{Pxyl-dnaA}$ ), HO1203 ( $\Delta[\text{oriC-dnaA}]::\text{oriN } \Delta 6\textit{DBC } \textit{amyE}::\textit{Pxyl-dnaA}$ ), HO1206 ( $\Delta[\text{oriC-dnaA}]::\text{oriN } \Delta 6\textit{DBC } \Delta\textit{spo0J } \textit{amyE}::\textit{Pxyl-dnaA}$ ) を対数増殖期まで培養し FM4-64 (細胞膜) 染色画像取得した。SMM には、Xylose による DnaA の発現誘導が効率的に行われるように炭素源としての Glucose (0.5%, v/v) に代えて Glycerol (0.5%, v/v) を使用した。各々の株は、25°C で対数増殖期まで培養した。また、DnaA の発現を誘導するための Xylose は、0.2% (v/v) に加えた (A)。

DnaA を過剰発現させた条件下における枯草菌の表現型については、これまでに Ogura らが詳細な解析の結果を報告している。それによると、枯草菌では、*oriC* 外からの DnaA の過剰発現により *dnaA-dnaN* オペロンが自己転写抑制されることで、DnaN が枯渇し SOS 応答が誘導されるとしている。さらに、この SOS 応答により細胞分裂が阻害され、細胞長の伸張まで来すことが分かっている (Ogura et al, 2001)。

そこで、DnaA の構成的な活性化が誘導されていると考えられる  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta spo0J$  二重欠損株細胞においても SOS 応答が誘導されているか調べるために、細胞障害により誘導されるプロモーター *dinC* (*PdinC*) 制御下の耐熱性  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*bgaB*) 遺伝子の発現をモニターする系を利用し解析を実施した。

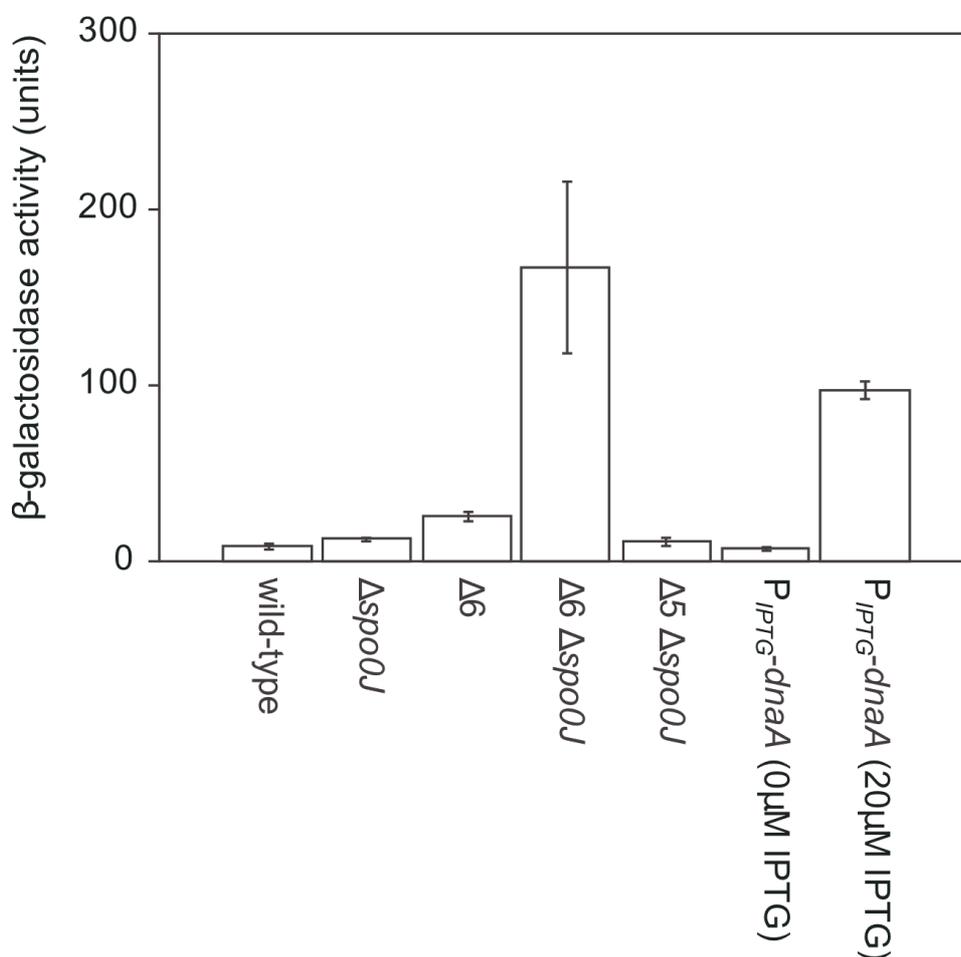


図 III.16 SOS 応答のモニタリング

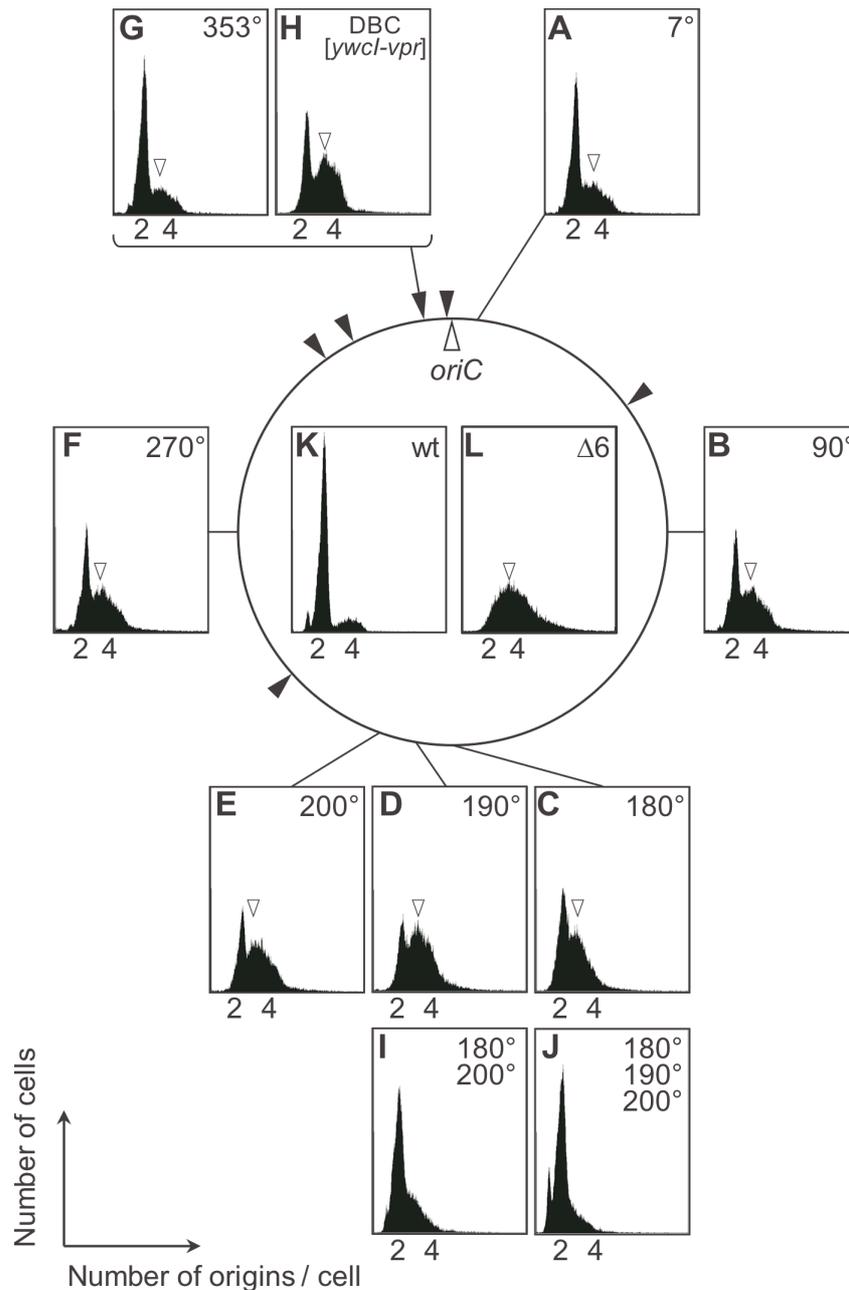
SMM合成培地 (30°C) でOD600=0.4まで培養した細胞を使用した。HO1248にはIPTGを加えたもの (20 $\mu$ M) と加えないものを使用している。wild-type (HO1235),  $\Delta spo0J$  (HO1237),  $\Delta 6\text{DBC}$  (HO1236),  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta spo0J$  (HO1251),  $\Delta 5\text{DBC}\text{-}\Delta spo0J$  (HO1260),  $P_{rpmH-dnaA}$  (IPTG 0 $\mu$ M) (HO1248),  $P_{rpmH-dnaA}$  (IPTG 20 $\mu$ M) (HO1248) .

その結果、SOS応答は $\Delta 6\text{DBC}$ 株では誘導されないが、 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta \text{spo0J}$ 二重欠損株では著しく高いレベルで誘導されることが明らかになった (図III.16)。しかしながら、 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta \text{spo0J}$ 株細胞では、細胞分裂が通常の核様体の存在しない領域と、さらに分離していない核様体上においても観察されている (図III.11.E)。結果として無核の細胞や核様体のギロチン効果が高い頻度で出現するのを顕微鏡観察で確認している (図III.11.E)。これらの結果から、 $\Delta 6\text{DBC}-\Delta \text{spo0J}$ 株細胞におけるSOS応答は、DnaAの恒常的な活性化による過剰複製により直接的に誘導されたものではなく、重篤な核様体分離阻害とそれに引き続き引き起こされるギロチン効果により染色体DNAに障害を与えることで間接的に誘導されたものであると考えられる。

### III.10. 染色体上へのDBC[*yjdA-yycS*]断片導入による過剰複製と増殖阻害の回復

*datA* サイトは、大腸菌染色体上において *oriC* の近位に存在し 5 個の高親和性 DnaA-box を含む 950bp に渡る領域である。大腸菌では、この *datA* サイトを欠損 ( $\Delta \text{datA}$ ) させることにより過剰複製が誘導されるが、増殖速度にまで影響を及ぼすことはない。また、誘導された過剰複製は、*datA* サイトを染色体上の他の領域に再導入するか、あるいはプラスミド上から再導入することにより相補される。これらの結果から、*datA* サイトは、複製開始後、新生鎖上の *datA* サイトに遊離型の DnaA 分子を大量に結合しトラップさせることで *oriC* からの複製開始に利用される DnaA 分子を適量に調節し、過剰な複製開始を抑制させていると提案されてきた (タイトレーションモデル) (Kitagawa et al, 1998)。一方、枯草菌においても DnaA 分子を大量にトラップしているとされる *oriC* 外の DBC は、これまでも予測されてきたが、実験的な検証についてはこれでのところ報告されていない (Smits et al, 2011)。

本研究では、 $\Delta 6\text{DBC}$  株の染色体上へ DBC[*yjdA-yycS*]断片を元の領域へ再導入 ( $\Delta 5\text{DBC}$ ; 図III.2.J) することにより過剰複製が抑制されることを明らかにしてきた。この結果は、枯草菌においてもタイトレーションモデルに従い複製開始が抑制されていることを示唆するものである。このことから、枯草菌 DBC も大腸菌 *datA* サイトと同様に、大量の DnaA 分子を結合しトラップすることで、DnaA 分子の量的調節を行うのではないかと予想した。



図Ⅲ.17 DBC 欠損および再導入株のフローサイトメトリー解析の DNA ピークのプロファイル

(A) HO1019 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta yabT$  ( $7^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (B) HO1020 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta yhaR$  ( $90^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (C) HO1238 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta cgeD$  ( $180^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (D) HO1239 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta yonN$  ( $190^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (E) HO1021 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta ypqA$  ( $200^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (F) HO1022 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta yteA$  ( $270^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (G) HO1023 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta yxbC$  ( $353^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (H) HO1245 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta yydA$  ( $353^\circ$ ) :: $\text{DBC}[ywcI-vpr]$ ), (I) HO1242 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta cgeD$  ( $180^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$   $\Delta ypqA$  ( $200^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (J) HO1241 ( $\Delta 6\text{DBC } \Delta cgeD$  ( $180^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$   $\Delta yonN$  ( $190^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$   $\Delta ypqA$  ( $200^\circ$ ) :: $\text{DBC}[yydA-yycS]$ ), (K) 168 (wild-type), (L) MYA143 ( $\Delta 6\text{DBC}$ ). 白三角は、3N ピークを示す。培養は、SMM を使用し  $30^\circ\text{C}$  で行った。詳細は、2.10 フローサイトメトリー解析の項を参照。

そこで、DBC 配列を染色体上の異なる箇所に導入し供給することで、 $\Delta 6$ DBC 株の過剰複製が回復するのか検証することにした。DBC を導入した染色体上の領域は、 $7^\circ$  (*yabT*) ,  $90^\circ$  (*yhaR*) ,  $180^\circ$  (*cgeD*) ,  $190^\circ$  (*yonN*) ,  $200^\circ$  (*ypqA*) ,  $270^\circ$  (*yteA*) ,  $353^\circ$  (*ymbC*) の 7 箇所であり、それぞれの箇所に DBC[*yydA-yyeS*]を導入した。また、元の領域である *yydA* ( $353^\circ$ ) 領域には、別に DBC[*ywcI-vpr*]断片を導入した (図III.17.A-G)。これらの株を用いてフローサイトメトリー解析と qPCR 解析を実施し、複製開始頻度が親株である $\Delta 6$ DBC 株からどの程度回復するのかを検証した。

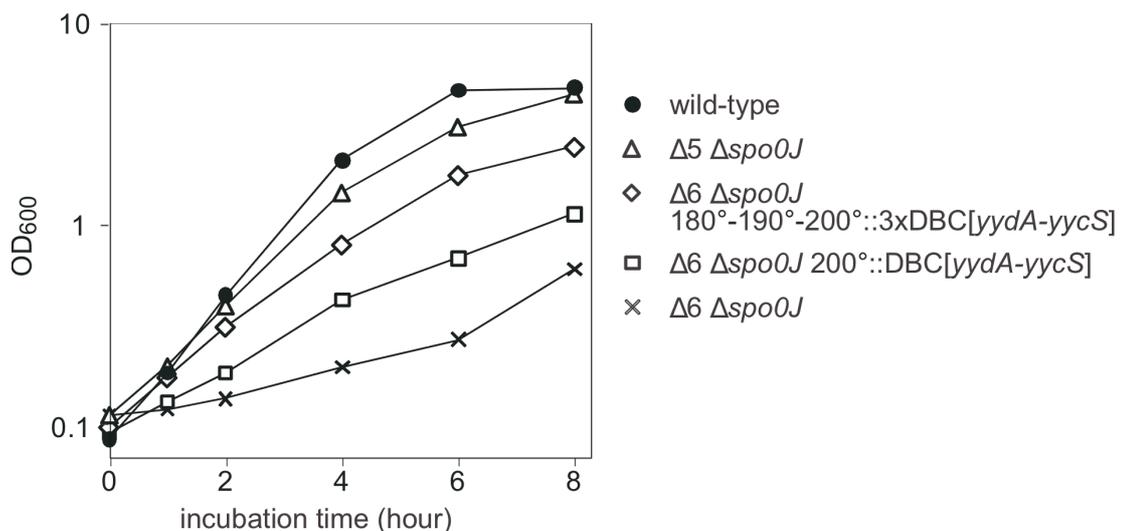
その結果、当初予測された通り DBC の挿入により $\Delta 6$ DBC 株で誘導された過剰複製は、抑制されることが明らかになった。さらにその抑制の効果は、DBC を挿入した染色体上の位置に依存していることも同時に分かった (図III.17.A-G)。

DBC[*yydA-yyeS*]断片を *oriC* 近傍領域 ( $7^\circ$ ,  $353^\circ$ ) へ挿入した場合、過剰複製の回復は  $\Delta 5$ DBC 細胞と同等まで回復しするが (図III.17.A, G)、一方で *oriC* から遠位 ( $90^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $190^\circ$ ,  $200^\circ$ ,  $270^\circ$ ) に DBC[*yydA-yyeS*]を挿入した場合、パターンは回復するものの回復の程度は、近位 ( $7^\circ$ ,  $353^\circ$ ) に導入した場合に比べ限定的なものであった (図III.17.B-F)。さらに qPCR 法により算定した *oriC/terC* 比の結果においても、フローサイトメトリー解析と同様に、 $\Delta 6$ DBC 株の過剰複製が回復するという結果が得られた (表III.1)。

対数増殖期にある枯草菌細胞内では、相対的な遺伝子量は *oriC* から *terC* にかけて連続的に低下する。本研究で使用した培養条件 (SMM 合成培地,  $30^\circ\text{C}$ ) における両者の比

(*oriC/terC*) は、野生株細胞で 2 以上あることが qPCR 解析によりすでに分かっている (表III.1)。さらに、 $\Delta 6$ DBC 株染色体上へ導入する DBC[*yydA-yyeS*]断片のコピー数を 2 および 3 へと増加させた場合、過剰複製は $\Delta 5$ DBC 細胞と同等のレベルまで抑制されることが明らかになった (図III.17.I, J, 表III.1)。この結果は、染色体上の領域依存的な過剰複製の抑制が、挿入断片 (DBC[*yydA-yyeS*]) のコピー数の差によるものであることを示唆している。

一方で、 $\Delta 6$ DBC- $\Delta spo0J$ 株細胞で観察された致死的な増殖阻害についても、DBC 断片導入により回復するのか検証した。 $\Delta 6$ DBC- $\Delta spo0J$ 株染色体  $200^\circ$ の領域へ DBC[*yydA-yyeS*]を 1 コピー挿入すると ( $\Delta 6 \Delta spo0J 200^\circ::\text{DBC}[yydA-yyeS]$ )、増殖速度は部分的にはあるが回復した (図III.18)。また、挿入する DBC 断片のコピー数を 3 コピーにまで増やすことで ( $\Delta 6 \Delta spo0J 180^\circ-190^\circ-200^\circ::3x\text{DBC}[yydA-yyeS]$ )、増殖速度はさらに回復することも明らかになった (図III.18)。しかしながら、その回復の程度については DBC[*yydA-yyeS*] オリジナルの領域に挿入した株 ( $\Delta 5 \Delta spo0J$ ) までには回復しなかった。



図Ⅲ.18 DBC[yydA-yycS]再導入による増殖阻害の抑制

SMM 37°C での細胞増殖曲線。168 (wild-type; 黒丸), HO1041 ( $\Delta 5$ DBC  $\Delta spo0J$ ; 白三角), HO1254 ( $\Delta 6$ DBC- $\Delta spo0J$  180°-190°-200°::3xDBC[yydA-yycS]; 白四角), HO1178 ( $\Delta 6$ DBC- $\Delta spo0J$  200°::DBC[yydA-yycS]; 白四角), HO1035 ( $\Delta 6$ DBC- $\Delta spo0J$ ; ×印)。

この結果から、 $\Delta 6$ DBC- $\Delta spo0J$ 株細胞の増殖阻害は、DBC[yydA-yycS]断片を染色体上へ再導入することにより回復するが、回復の程度については領域依存性を依然として示すことが明らかになった。

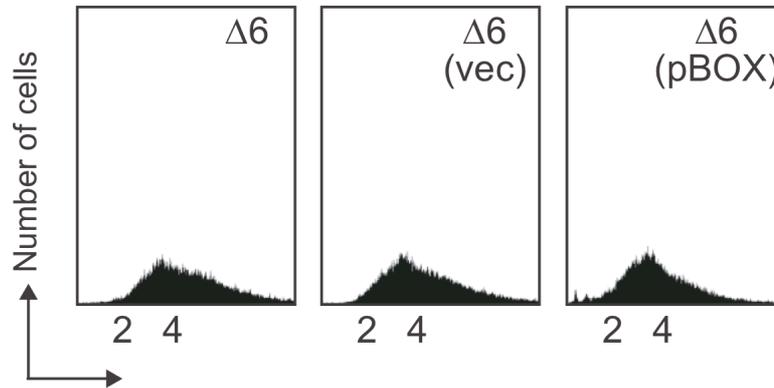
### Ⅲ.11. プラスミドによるDBCの $\Delta 6$ DBC細胞への導入では過剰複製は相補出来ない

大腸菌 *datA* サイト欠損により誘導される過剰複製は、*datA* 断片をプラスミドから供給することで回復することが可能であると報告されている (Kitagawa et al, 1998)。そこで、DBC[yydA-yycS]断片を挿入したマルチコピープラスミド (pBOX DBC[yydA-yycS]) を構築した。そして、そのプラスミドを $\Delta 6$ DBC細胞へ導入し、フローサイトメトリー解析およびqPCR解析を実施し複製開始頻度の測定を行った (図Ⅲ.19)。結果は、DBC[yydA-yycS]をマルチコピープラスミドから $\Delta 6$ DBC細胞に供給した場合、フローサイトメトリー解析および *oriC/terC* 比の解析では、過剰複製の回復は認められなかった (図Ⅲ.19.A)。

この結果については、枯草菌 DnaA タンパク質が、プラスミド上の DBC[yydA-yycS] に結合していない可能性も考えられたため、それを確認するために ChAP-qPCR 法を実施し、*in vivo* において DnaA が DBC に結合していることを確認した。この解析により、DnaA-12His と共に精製された DNA-タンパク質複合体中の DNA 断片を qPCR 法により定量することで、

DBC に結合した DnaA 量を間接的に推計した。その結果、DBC を挿入したプラスミドを有する株 ( $\Delta 6$  pBOX) では、DBC を染色体上に導入した株 ( $\Delta 5$ ) に比べおよそ 40 倍量の DnaA 共精製 DNA 断片が検出された (図 III.19.B)。

**A**



**B**

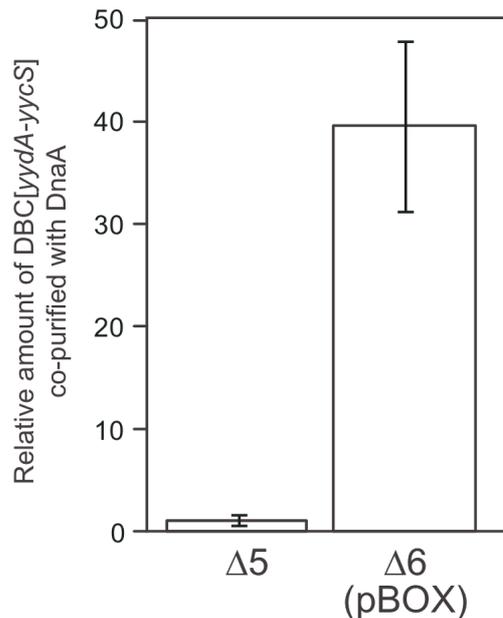


図 III.19 pBOX-DBC[yydA-yyeS]の $\Delta 6$ DBC 細胞への導入による影響

- (A) MYA143 ( $\Delta 6$ ) ;  $\Delta 6$ DBC, HO1015 ( $\Delta 6$  vec) ;  $\Delta 6$ DBC (pO2HC) , HO1016 ( $\Delta 6$ , pBOX) ;  $\Delta 6$ DBC (pBOX[yydA-yyeS]) の DNA ピークプロファイルを解析した。培養は、SMM を使用し 30°C で行った。詳細は、2.10 フローサイトメトリー解析の項を参照。
- (B) 細胞内の DnaA タンパク質が、プラスミド上の DBC[yydA-yyeS] に結合していることを ChAP-qPCR 法で確認した。HO1029 ( $\Delta 5$ DBC *dnaA-12his*) および HO1192 ( $\Delta 6$ DBC *dnaA-12his* pBOX-DBC[yydA-yyeS]) の細胞は、LB 培地 37°C で対数増殖期まで培養し、ChAP-qPCR 法は、2.9 Real-time PCR による DnaA が結合した DNA の定量の方法により実施した。

これは、解析で使ったプラスミド (pBOX[yydA-yycS]) の細胞当たりのコピー数 (30-40 copies/cell) に相当する量であり、枯草菌細胞内で DnaA タンパク質がプラスミド上の DBC に結合していることを間接的にはあるが裏付けるものである。以上の結果は、少なくとも複製開始制御の過程において、枯草菌と大腸菌では、DnaA と DBC 間の相互作用の性質が異なっている可能性を示唆している。

## IV. 考察

本研究における枯草菌の染色体複製の開始制御に関する新規の重要な知見として、枯草菌では *oriC* 外に位置する DBC と Soj/Spo0J システムが、協調して DnaA 活性を負に制御していることを示唆する結果を得る事が出来た。この二つのシステムの欠損は、DnaA 活性の脱抑制を引き起こし、DnaA は構成的な活性化状態に陥る。それにより過剰複製が促進され、致命的な影響を及ぼすことが明らかになった。また、 $\Delta 6\text{DBC}$  株の過剰複製は、DBC を染色体上へ再導入させることでコピー数依存的に相補された。さらに  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  株の増殖阻害は DBC の染色体上への再導入により領域依存的に回復することも明らかになった。しかしながら、その過剰複製はプラスミドからの DBC 供給では相補されなかった。このことから、枯草菌 DBC は、大腸菌で提唱されている *datA* サイトによるタイトレーションモデルとは、異なるメカニズムで複製開始制御に関与していると考えられる。

### IV.1. *oriC* 外の DBC による複製開始制御

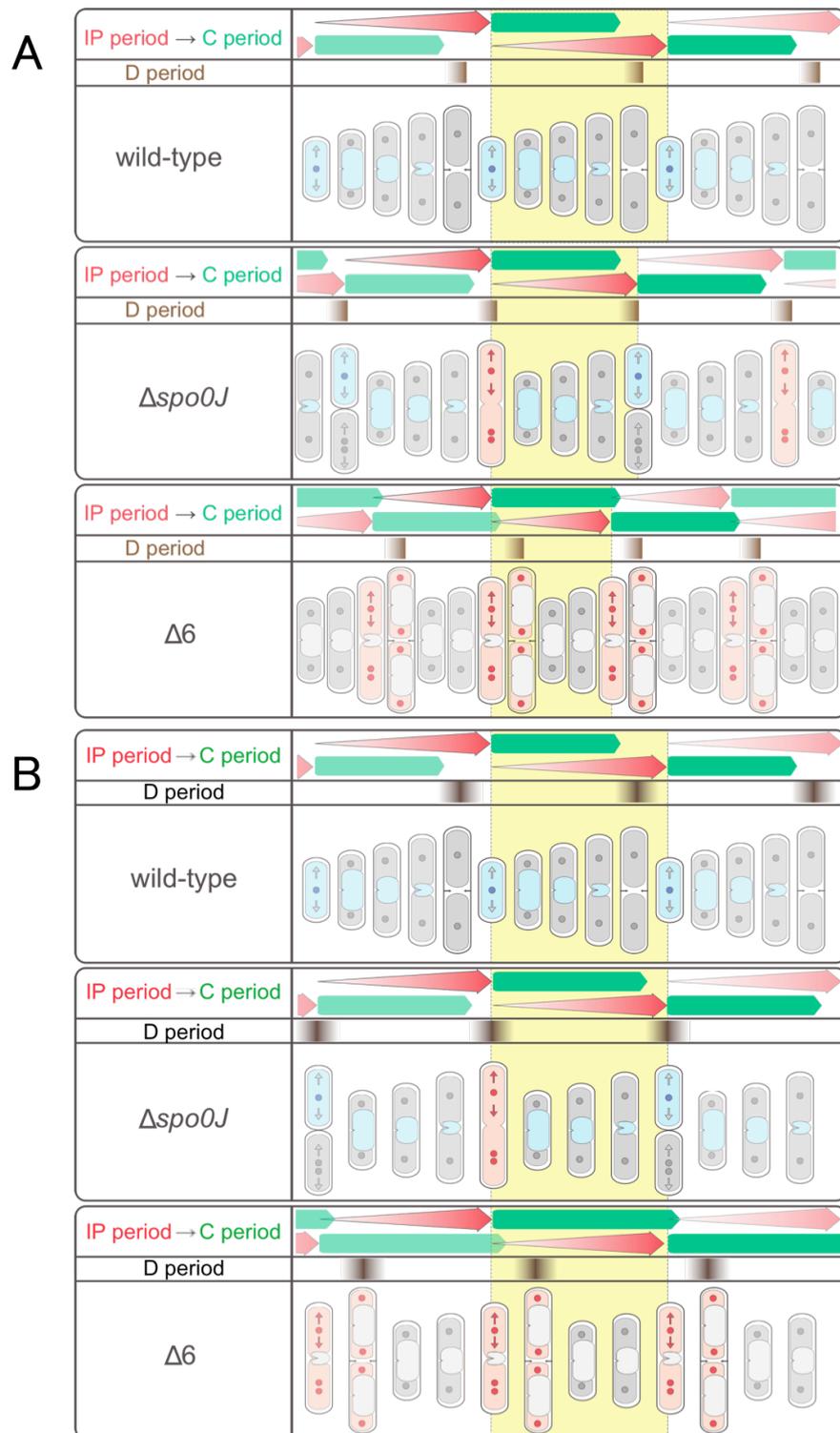
本研究において、枯草菌染色体上 *oriC* 外に存在する 6 箇所 of DBC を同時に欠損したところ、複製開始時期が早期に起こることにより、見かけ上の過剰複製が誘導された。6 箇所の領域中で DBC[*yydA-yyeS*] 領域を欠損させた株では、フローサイトメトリー解析において僅かではあるが明らかに過剰複製が誘導されていることが観察された。この DBC[*yydA-yyeS*] 領域を  $\Delta 6\text{DBC}$  株に再導入することで過剰複製は部分的に回復し、さらに回復の割合は導入した DBC 領域のコピー数に依存していた。また、DBC[*yydA-yyeS*] 領域と同様に DBC[*ywcl-vpr*] 領域についても DBC 領域断片を  $\Delta 6\text{DBC}$  株に導入することで過剰複製を回復させることが出来た。DBC[*ywcl-vpr*] 領域欠損株では、フローサイトメトリー解析において過剰複製を示すパターンは観察されなかったが、DBC[*yydA-yyeS*] 領域と同時に欠損させることで  $\Delta 6\text{DBC}$  株と同程度の過剰複製が誘導された。これらの結果から、*oriC* 外の DBC 領域による複製開始制御は、主に DBC[*yydA-yyeS*] 領域と DBC[*ywcl-vpr*] 領域が関与していると考えられる。ただし、 $\Delta\text{DBC}[*yydA-yyeS*]$ 、 $\Delta\text{DBC}[*ywcl-vpr*]$  二重欠損株で見られる過剰複製は、 $\Delta 6\text{DBC}$  株での過剰複製の程度まで亢進していない。このことから他の DBC 領域についてもやはり僅かではあるが、複製開始制御に関与していると思われる。本研究では、上に

挙げた複製開始制御に関与していると考えられる DBC [*yydA-yyeS*]および DBC [*ywcI-vprI*] について、残念ながらその配列構造について何らかの特徴や性質を同定することは出来なかった。これは、今後の課題として解析すべきものである。

## IV.2. $\Delta 6$ DBC株における早期の複製開始

蛍光顕微鏡による生細胞の観察から、*oriC* foci の数と細胞長の関係を解析した結果、 $\Delta spo0J$ 株および $\Delta 6$ DBC株では1個の*oriC*を持つ細胞の比率が減少し、代わって3個および4個の*oriC*を持つ細胞の比率が上昇した。この*oriC* foci の数と細胞長の解析から本研究で解析に使用した培養条件 (SMM 25°C) における複製開始時期を推定すると、野生株では細胞分裂の直後に1個の*oriC*から複製が開始され、2個の娘*oriC*が複製されることになる (1-*oriC*  $\rightarrow$  2-*oriC*)。一方、 $\Delta spo0J$ 株では細胞分裂が起きる時期と重なるタイミングで複製が開始されていると推測され、さらに $\Delta 6$ DBC株では細胞分裂時期の前に複製が開始されていると考えられる。つまり2個の*oriC*から複製が開始され、4個の娘*oriC*が複製される (2-*oriC*  $\rightarrow$  4-*oriC*) ことになる。Webb らが、報告するように複製された娘*oriC*が複製開始後、速やかに分離する (Webb et al, 1998) ならば、 $\Delta 6$ DBC株と $\Delta spo0J$ 株では、複製開始の時期が野生株に比べ早まっていることになる。

本研究での*oriC* foci の解析を通じて得られた結果から、複製開始から細胞分裂に至るまでの細胞周期モデルを考察すると、野生株細胞では、1個の*oriC*から複製が開始され、2個の娘*oriC*が複製されると考えられる。この複製開始に至るまでの過程についてMoriyaらは、複製開始のためのポテンシャル (IP) を定義し説明している。つまりIPは、*oriC*からの複製開始に利用出来るDnaA分子の量により決定され、そして、野生株では細胞周期の適切な時期に蓄積するよう制御されていると指摘している (Moriya et al, 1990)。したがって、蓄積されたIP (赤矢印) は複製開始の直前に最大になり、そのポテンシャルが複製開始に費やされた後、また次の周期の複製のために細胞周期を通じて増加していく。一方で早期の複製開始が起きている $\Delta 6$ DBC株および $\Delta spo0J$ 株では、複製開始に利用される活性型のDnaA量が相対的に多くなり、複製開始ポテンシャルが早期に蓄積していると考えられる。この時、細胞周期の中でCピリオドが、一定であると仮定した場合、DピリオドもIPピリオド短縮に従い短くなるはずである (図IV.1A)。



図IV.1 早期の複製開始を示す変異株の細胞周期モデル

緑矢印; 複製伸張反応に係る時間 (C ペリオド)、赤矢印; 複製開始のためのポテンシャルが蓄積される時間 (IP ペリオド)、茶四角; 複製集結から細胞分裂に係る時間 (D ペリオド)。(A) C ペリオドを一定にした場合のモデル、(B) C ペリオドを延長させた場合のモデル。説明は、本文を参照。

しかしながら、実際にはDピリオド短縮を示すような結果は観察されていない。 $\Delta spo0J$ 株では平均細胞長が野生株に比べ僅かに伸張していたが、 $\Delta 6DBC$ 株細胞および $\Delta spo0J$ 株細胞において、増殖速度および細胞長の分布に影響を認めるような結果は観察されなかった。少なくとも本研究で使用した培養条件下では、野生株を含めた3株ともに、複製後の染色体分離は、正常なかたちで細胞分裂と協調して起きていると考えられる。今回の解析から複製終結時期を知る情報は得られていないが、これまでの結果から、複製終結のタイミング、染色体の分離および細胞分裂は、 $\Delta 6DBC$ 株および $\Delta spo0J$ 株においても基本的に影響を受けていない。Dピリオドが一定であることを考慮した細胞周期のモデルでは、Cピリオドの延長が引き起こされてしまう。Cピリオドが延長される様な現象について複製伸長速度自体が一貫して遅延しているというよりは、複製フォークの一時的な停滞が起きていると考えられる(図IV.1.B)。その可能性としては、培地中の染色体複製に利用できる基質量には限りがあり、複製開始頻度の上昇に従いDNA合成に利用する基質の欠乏を招く。そのため複製フォークの停滞が引き起こされるというものである。最近、DNA複製と中心的な炭素代謝とが直接的にリンクしていることが、枯草菌および大腸菌の解析から遺伝学的に証明された(Janniere et al, 2007, Maciag et al, 2011)。詳細なメカニズムは未だ不明であるが、このことは染色体複製が何らかのフィードバックシステムによって能動的に制御されている可能性を示唆している。

### IV.3. DnaAの構成的な活性化による増殖阻害

今回の解析で $\Delta 6DBC$ - $\Delta spo0J$ 二重欠損変異は、致死に近いレベルの増殖阻害を細胞に引き起こすことが明らかになった。この表現型は、DnaA依存的に起こり、*soj*欠損により解除されるが、この結果は、SojがDnaA活性を活性化するという報告(Murray & Errington, 2008, Scholefield et al, 2011b)を支持するものである。またこれらの結果は、脱抑制されたDnaA活性が、細胞にとって致命的な影響を与えるため、DnaA活性は複数のシステムにより厳密に制御されていることを示唆している。

枯草菌においては、DnaAを別の領域から過剰発現させた場合、SOS応答が誘導されることが報告されている(Ogura et al, 2001a)。これは、過剰発現したDnaAが*dnaA-dnaN*オペロンの転写を自己抑制するため、複製装置のサブユニットであるDnaN(DNA polymerase III,  $\beta$  clamp)の枯渇を引き起こし、その結果として、細胞長の伸張と増殖阻害が起こると考えられている。しかしながら、細胞分裂を積極的に阻害するSOS応答と対照的に(Kawai

et al, 2003)、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損株では、細胞質内で核様体の無い場所や分離が不十分な核様態の上で頻繁に細胞分裂が起こっているのが観察され、それが原因となり無核細胞や核様体上でのギロチン効果を誘導していた。この様に、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損株で誘導される SOS 応答は、*oriC* からの Hyperinitiation の結果直接誘導されたのではなく、核様体分離阻害の結果として核様体上のギロチン効果からもたらされた DNA ダメージによる間接的な誘導によるものなのかもしれない。

一方、大腸菌では、DnaA の過剰発現は、SOS 応答に非依存的に過剰複製および複製フォークの停滞を引き起こすが、これに伴い細胞分裂阻害による細胞伸長、核様態の伸長、生存率（生細胞数）の低下も観察されている（Grigorian et al, 2003）。また、二重鎖切断（DSB）の修復システムに関わる遺伝子の欠損によっても生存率がさらに減少することから、おそらく新規の複製フォークと停滞している複製フォークの間で起きた衝突により発生した DSB が、過剰複製による生存率低下の主な原因であると考えられている。興味深いことに、DnaA 過剰発現による引き起こされる複製フォークの不完全な終結は、フローサイトメトリー解析では広範囲にわたるピークとして観察されており（Grigorian et al, 2003）、本研究で観察された枯草菌細胞のパターンと類似している。それに加えて、大腸菌 DnaA の過剰発現による致死的影响は、*oriC* からの複製開始に依存していることも報告されている（Felczak & Kaguni, 2009）。これらの類似点から、 $\Delta 6\text{DBC}$  細胞においても先に述べた様な複製フォークの停滞と崩壊が起きており、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損株における致死的な増殖阻害の原因であることも考えられる。

興味深いことに過剰複製が誘導された条件において、大腸菌では SOS 応答比依存的に細胞分裂の阻害と複製フォークの停滞が誘導されることで、核様体の致死的な崩壊から細胞が免れる機会が与えられることになる（Grigorian et al, 2003）。一方枯草菌では、大腸菌同様のシステムは存在するが、こちらは SOS 応答依存的に機能する。また、大腸菌では DSB がグローバルな SOS 応答を誘導するが、枯草菌では誘導されない（Simmons et al, 2009）。これらのことから、 $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損株の致死性は、DSB が直接の原因ではあるが、SOS 応答はギロチン効果による核様体の断片化の様な DSB 以外の DNA ダメージにより間接的に誘導されるものであると考えられる。

#### IV.4. 複製開始に関わるその他の制御機構

今回の研究結果から、枯草菌においては *oriC* 外に存在する DBC と Soj タンパク質が DnaA

活性の制御における主要な機能を担っていることが明らかになった。 $\Delta 6\text{DBC}$  および  $\Delta\text{spo0J}$  の単独欠損株と、両者の二重欠損株で観察される表現型には、明らかな違いが認められた。この違いは、システム的一方が機能不全に陥ったとしても、互いの機能を相補し合うことで複製開始は十分に制御出来ること示唆している。一方、本研究で用いた培養条件において、168 株の遺伝背景をもつ *yabA* 欠損株 (168 株を NIS6050 ( $\text{CRK6000}::\text{yabA}::\text{spc}$ ) の染色体 DNA を用いて形質転換し獲得した) でも、これまでの報告と同様に変異株細胞の増殖阻害は観察されなかった (Cho et al, 2008, Hayashi et al, 2005)。さらに、現在行っている予備実験では、 $\Delta 6\text{DBC}\cdot\Delta\text{yabA}$  二重欠損変異株では親株に比べて過剰複製が促進されているが、細胞増殖速度に影響は認められなかった。 $\Delta 6\text{DBC}\cdot\Delta\text{yabA}$  株における複製開始の過剰な活性化は、 $\Delta 6\text{DBC}\cdot\Delta\text{spo0J}$  株よりも軽微であるが、この結果は、*oriC* 外の DBC が DnaA を制御するメカニズムとは異なる形で、YabA もまた DnaA 活性を負に制御することを示唆している。現在、*oriC* 外の DBC、Soj、および YabA がどのようにして、DnaA を介した複製開始の制御に関与しているのか包括的な解析を進めている。

## IV.5. 枯草菌における DBC の DnaA 制御メカニズム

本研究では、*yydA*-*yycS* および *ywcl*-*vpr* の両遺伝子間領域の DBC が複製開始制御に関与しており、その抑制制御の度合いは染色体上の位置に依存していることを明らかにした。また、3 コピーの DBC を *terC* 領域へ導入することで  $\Delta 6\text{DBC}$  株の過剰複製は相補され、 $\Delta 6\text{DBC}\cdot\Delta\text{spo0J}$  株については、1 コピーの DBC を *oriC* 領域へ導入した株と同等のレベルまで増殖速度は回復することが明らかになった。これらの結果から、過剰複製と増殖阻害において観察された染色体上の位置に対する依存性は、対数増殖期にある細胞中の *oriC* に対する相対的な DBC の量に相関すると考えられる。

大腸菌 *datA* サイト欠損による過剰複製の程度は、*oriC*/*terC* 比で評価すると野生株の 1.3 倍程度であり (Kitagawa et al, 1998)、 $\Delta 6\text{DBC}$  株が示す 1.37 倍とほぼ同等である。しかしながら、*datA* サイトはプラスミドから過剰複製を抑制出来るのに加え、さらにコピー数を増やした場合には正常な複製の抑制も引き起こすことが報告されている (Kitagawa et al, 1998)。一方、枯草菌ではこれまでに *datA* 様の DBC が同定されたという報告はないが、DBC による DnaA のタイトレーションを示唆する報告がなされている。Moriya らは、枯草菌 *oriC* 領域の DBC 断片をプラスミドにクローニングし、枯草菌細胞に導入することで染色体 *oriC* との間での不和合性が誘導され、さらに、プラスミドを導入した細胞では、複製開始

頻度が抑制されると報告している (Moriya et al, 1988)。しかしながら、本研究で実施した解析では、プラスミド上からの DBC 供給によってでは過剰複製は抑制されなかった。この結果は、DnaA 分子と DBC 間での相互作用における特徴性質が、枯草菌と大腸菌間さらには、*oriC* の DBC と *oriC* 外の DBC 間においても異なっていることを示唆している。

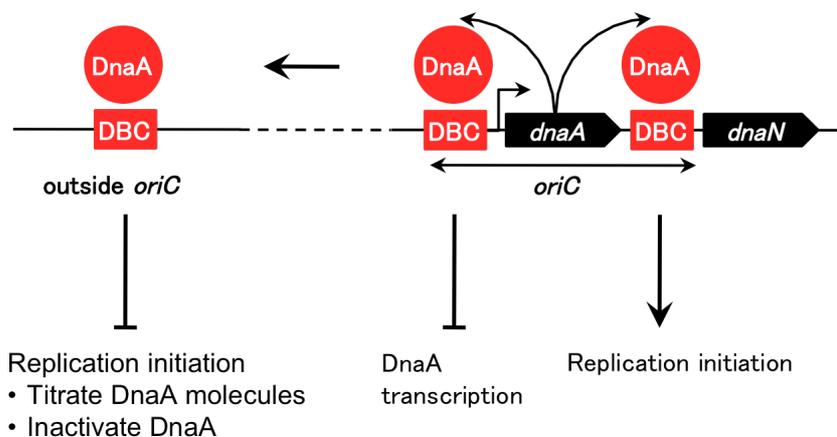
Fujimitsu らの解析によると、大腸菌染色体上で同定された *oriC* 外の DBC (DARS; DnaA-reactivating sequence) は、ADP と ATP の変換を介して DnaA の再活性化に関与すると報告している (Fujimitsu et al, 2009)。よって、枯草菌の DBC[*yydA-yycS*] および DBC[*ywcl-vpr*]については、DARS とは逆に ATP-DnaA を加水分解することで不活性化に関与している可能性が考えられる。これまで報告されてきた *in vivo* における ChIP-chip 解析では、全ての DnaA 結合領域において同程度の DnaA 分子量の結合が示されているが、本研究において同定した複製開始を負に制御する DBC は、2 箇所のみであった (Breier & Grossman, 2009, Ishikawa et al, 2007, Smits et al, 2010, Smits et al, 2011)。これらの結果は、DnaA 活性を変換する特定の DnaA-DBC 間の相互作用が、複製開始を制御するというモデルを支持するものである。本研究で同定した 2 箇所の DBC が枯草菌細胞内でどのような分子メカニズムを担っているのか解明するには、さらなる解析が必須である。

枯草菌細胞内において DBC がどのような挙動を示すのか、その分子機構を理解する上でひとつの手がかりとなるのが、DBC 欠損による DnaA 発現量への影響である。タイトレーションモデルにおいては、大量の DnaA 分子が DnaA 結合領域にトラップされることで過剰な複製開始を抑制するとされている (Nozaki et al, 2009)。一方、*dnaA* 遺伝子の自己転写抑制は、DnaA 分子のプロモーター配列領域への結合によりなされることが分かっている

(Ogura et al, 2001)。ここで、DnaA 分子をトラップする染色体上の DBC を削除した場合、細胞中で遊離型 DnaA が増加し *dnaA* の転写量がさらに自己抑制され、その結果を反映して細胞中の DnaA 分子数は減少するものと予想される。実際、本研究で実施したトランスクリプトーム解析では、 $\Delta$ 6DBC 株の *dnaA-dnaN* オペロンの転写量が、野生株のおよそ 0.7 倍にまで減少することが明らかになった (表 III.2)。この結果は、遊離型 DnaA の増加により *dnaA* 遺伝子の転写がさらに自己抑制された結果であると考えられる。しかしながら、本研究で実施したウェスタンブロッティング法によるタンパク質レベルの解析では、十分な解析の精度を確保出来ず、細胞当たりの DnaA 分子数が一定であるのか、あるいは抑制された *dnaA* 転写量を反映して減少しているのか、判断することが出来なかった (図 III.7)。

## IV.6. 枯草菌 *oriC* 外の DBC による複製開始制御

本研究における解析の結果から予想される枯草菌染色体上 *oriC* 外の DBC による複製開始制御のモデルは、以下の様なものである (図IV.2)。対数増殖期にある枯草菌細胞では、複製開始に活性を示す ATP-DnaA が、*oriC* 内の DBC に結合し DNA 二重鎖の解離を誘導することで複製を開始させる。また、同様に *dnaA* 遺伝子プロモーター配列上流にある DBC にも DnaA 分子が結合することで、*dnaA* の転写を自己抑制する。これにより、細胞内の DnaA 分子数は、一定に保たれていると考えられる。



図IV.2 枯草菌染色体 *oriC* 外の DBC による複製開始制御

説明は本文を参照。

一方、複製開始後に新生された *oriC* 外 DBC には、遊離型 ATP-DnaA が結合しトラップされる。複製開始制御に関与する 2 箇所の *oriC* 外 DBC、DBC[*lydA-yycS*]および DBC[*ywcl-vpr*]は、共に *oriC* 近傍にあり細胞内における DBC のコピー数量は、相対的に高く維持されている。このため、DBC に効率的に DnaA 分子がトラップされることが可能になる。*oriC* 外の DBC にトラップされた ATP-DnaA 分子は、複製開始に活性を示すが、DBC 上で何らかの機構により、不活性な ADP-DnaA へと変換される。このことにより、*oriC* 内において複製開始へと利用される活性型 ATP-DnaA 分子数を抑制し、連続的な複製開始が起こらないよう制御されていると考えられる。しかしながら、DBC 上の DnaA 分子がどのように不活性化されるのか。その詳細なメカニズムについては、未だ解明されていない。考えられる可能性としてひとつは、同定されていない何らかの因子により ATP 加水分解反応が誘導され ATP-DnaA が ADP-DnaA へと変換されるというものである。これは、大腸菌 DARS による DnaA の活性化とは逆の反応であるが、今までの解析から枯草菌 DBC 配列内でその

ような特徴的な配列構造は、同定されていない。もうひとつの可能性は、DnaA タンパク質そのものの分解が促進されるというものである。つまり、*oriC*外 DBC 上において ATP-DnaA 分子は不安定であり、DBC から容易に解離してしまい、遊離型の DnaA となる。この時、細胞質内のプロテアーゼによるアタックを受けやすくなり、DnaA タンパク質の分解が促進されていくというものである。

今後、*oriC*外 DBC が、どのように複製開始制御に関与しているのか、更なる理解を進めるために、DnaA 自身の転写量とタンパク質量および他の制御因子らを含めた包括的な解析が必要であると考えられる。

## IV.7. 今後の課題

枯草菌において、染色体複製開始を制御している以下に示す全ての DBC と DnaA の相互作用を定量的に測定することが今後重要になる。

- 1) *dnaA* プロモーター上流および下流の DBC (DnaA 量を一定に保つ)
- 2) 複製開始制御に関わる DBC (*oriC* との相互作用する DnaA 量を調節する)
- 3) *oriC* 領域内の DBC (複製開始に関わる)

以上に挙げた過程の詳細な解析により包括的なメカニズムが明らかになると期待される。

一方で、DBC が *oriC* 近傍領域に分布しているのは、枯草菌だけではない。Firmicutes や Actinobacteria でも同様の分布が見られることが分かっている (Ishikawa et al, 2007)。実際に、*Streptomyces coelicolor* 染色体上の *oriC* 近傍領域に位置する DBC が、複製開始制御に関与しているという報告がある (Smulczyk-Krawczynszyn et al, 2006)。本研究の結果は、DnaA 結合配列が *oriC* 近傍領域に存在したときに、DnaA と DBC 間の複製開始制御に関わる相互作用がもっとも効果的であることを示唆している。従って、SeqA および Hda を欠いている枯草菌などの細菌において、*oriC* 近傍領域にある DBC が、複製に利用される DnaA 分子数を調節するシステムは共通のものであり、また、重要であると考えられる。

## V. 本研究のまとめ

本研究では、枯草菌染色体上の *oriC* 外に分布する 6 箇所の DBC が担う新規の機能について解析した。これまで枯草菌において報告されて来た、DnaA の結合を介した DBC の機能としては、転写制御に関わるものが主であった。*oriC* 外の DBC が、細胞周期の過程の中において転写制御以外にどのような機能を担っているのか、それを明らかにするために、本研究では新たに欠損変異株 ( $\Delta 6\text{DBC}$ ) を構築した。

この欠損変異株は、*oriC* 外に位置する 6 箇所の DBC を同時に削除させたものである。これを用いて、詳細な表現型の解析を進めた結果、 $\Delta 6\text{DBC}$  細胞では、細胞周期の中で複製開始の時期が早まるという現象を見出した。この表現型は、DBC を染色体上へ再導入することにより相補されるが、その効果の程度は導入した DBC 断片のコピー数に依存することが明らかになった。しかし、プラスミドによる過剰複製の抑制はみられず、さらに DBC 断片導入による  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  株の装飾阻害の回復では、染色体の領域依存性が依然として残っていることが明らかになった。これらの結果から、*oriC* 外の DBC は、転写制御だけではなく、複製開始制御にも機能しており、その制御は DnaA 分子と DBC 間の相互作用の変化によるものと考えられる。

一方、 $\Delta 6\text{DBC}$  株において *Spo0J* を欠損させた場合は、多面的な表現型（過剰複製の更なる亢進、染色体分離阻害、細胞分裂阻害、細胞増殖阻害）が観察され、その結果として著しい細胞の増殖阻害が引き起こされることが分かった。この  $\Delta 6\text{DBC}\text{-}\Delta\text{spo0J}$  二重欠損変異株における著しい増殖阻害は、*Soj* への自然突然変異 (*SojT88M*) の導入または、*Soj* 自身の欠損により回復することも明らかになった。

以上の結果から、本研究では枯草菌染色体上の *oriC* 外に存在する DBC は、*oriC* からの染色体複製開始制御に関わっていることが、初めて明らかになった。その制御は *oriC* 外の DBC と DnaA 分子との相互作用により、過剰な DnaA 分子が DBC 上にトラップされ不活化されることで複製開始を負に制御していると予想される。また、このシステムは、DnaA 活性の制御システムである *Spo0J/Soj* と並んで、適正な頻度で複製が開始されるように DnaA 活性を制御する主要なシステムであると考えられる。

## VI. 参考文献

- Anagnostopoulos C & Spizizen J (1961) Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**: 741-746
- Au N, Kuester-Schoeck E, Mandava V, Bothwell LE, Canny SP, Chachu K, Colavito SA, Fuller SN, Groban ES, Hensley LA, O'Brien TC, Shah A, Tierney JT, Tomm LL, O'Gara TM, Goranov AI, Grossman AD, & Lovett CM (2005) Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J Bacteriol* **187**: 7655-7666
- Autret S, Nair R, & Errington J (2001) Genetic analysis of the chromosome segregation protein Spo0J of *Bacillus subtilis*: evidence for separate domains involved in DNA binding and interactions with Soj protein. *Mol Microbiol* **41**: 743-755
- Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Medigue C, & Danchin A (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**: 1758-1775
- Breier AM & Grossman AD (2009) Dynamic association of the replication initiator and transcription factor DnaA with the *Bacillus subtilis* chromosome during replication stress. *J Bacteriol* **191**: 486-493
- Burkholder WF, Kurtser I, & Grossman AD (2001) Replication initiation proteins regulate a developmental checkpoint in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 269-279
- Cherepanov PP & Wackernagel W (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14
- Cho E, Ogasawara N, & Ishikawa S (2008) The functional analysis of YabA, which interacts with DnaA and regulates initiation of chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *Genes Genet Syst* **83**: 111-25
- Chumsakul O, Takahashi H, Oshima T, Hishimoto T, Kanaya S, Ogasawara N, & 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
- Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-5
- Felczak MM & Kaguni JM (2009) DnaAcos hyperinitiates by circumventing regulatory pathways that control the frequency of initiation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **72**: 1348-1363
- Fujimitsu K, Senriuchi T, & Katayama T (2009) Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA. *Genes Dev* **23**: 1221-1233
- Fukuchi K, Kasahara Y, Asai K, Kobayashi K, Moriya S, & 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
- Fukuoka T, Moriya S, Yoshikawa H, & Ogasawara N (1990) Purification and characterization of an initiation protein for chromosomal replication, DnaA, in *Bacillus subtilis*. *J Biochem* **107**: 732-739
- Goranov AI, Katz L, Breier AM, Burge CB, & Grossman AD (2005) A transcriptional response to replication status mediated by the conserved bacterial replication protein DnaA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12932-12937
- Grigorian AV, Lustig RB, Guzman EC, Mahaffy JM, & Zyskind JW (2003) *Escherichia coli* cells with increased levels of DnaA and deficient in recombinational repair have decreased viability. *J Bacteriol* **185**: 630-644
- Gruber S & Errington J (2009) Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* **137**: 685-696
- Hayashi M, Ogura Y, Harry EJ, Ogasawara N, & Moriya S (2005) *Bacillus subtilis* YabA is involved in determining the timing and synchrony of replication initiation. *FEMS Microbiol Lett* **247**: 73-79

- Hiraga S (2000) Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes. *Annu Rev Genet* **34**: 21-59
- Ireton K, Gunther NW, 4th, & Grossman AD (1994) spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 5320-5329
- Ishikawa S, Kawai Y, Hiramatsu K, Kuwano M, & Ogasawara N (2006) A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **60**: 1364-80
- Ishikawa S, Ogura Y, Yoshimura M, Okumura H, Cho E, Kawai Y, Kurokawa K, Oshima T, & Ogasawara N (2007) Distribution of stable DnaA-binding sites on the *Bacillus subtilis* genome detected using a modified ChIP-chip method. *DNA Res* **14**: 155-68
- Itaya M (1992) Construction of a novel tetracycline resistance gene cassette useful as a marker on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 685-686
- Janniere L, Canceill D, Suski C, Kanga S, Dalmais B, Lestini R, Monnier AF, Chapuis J, Bolotin A, Titok M, Le Chatelier E, & Ehrlich SD (2007) Genetic evidence for a link between glycolysis and DNA replication. *PLoS One* **2**: e447
- Katayama T, Ozaki S, Keyamura K, & Fujimitsu K (2010) Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*. *Nat Rev Microbiol* **8**: 163-170
- Kawai Y, Moriya S, & Ogasawara N (2003) Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **47**: 1113-1122
- Kim L, Mogk A, & Schumann W (1996) A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* **181**: 71-76
- Kitagawa R, Ozaki T, Moriya S, & Ogawa T (1998) Negative control of replication initiation by a novel chromosomal locus exhibiting exceptional affinity for *Escherichia coli* DnaA protein. *Genes Dev* **12**: 3032-3043
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P,

- Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V et al (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256
- Lee PS & Grossman AD (2006) The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **60**: 853-869
- Livny J, Yamaichi Y, & Waldor MK (2007) Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J Bacteriol* **189**: 8693-8703
- Maciag M, Nowicki D, Janniere L, Szalewska-Palasz A, & Wegrzyn G (2011) Genetic response to metabolic fluctuations: correlation between central carbon metabolism and DNA replication in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **10**: 19
- Morimoto T, Ara K, Ozaki K, & Ogasawara N (2009) A new simple method to introduce marker-free deletions in the *Bacillus subtilis* genome. *Genes Genet Syst* **84**: 315-318
- Morimoto T, Loh PC, Hirai T, Asai K, Kobayashi K, Moriya S, & Ogasawara N (2002) Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**: 3539-3552
- Moriya S, Fukuoka T, Ogasawara N, & Yoshikawa H (1988) Regulation of initiation of the chromosomal replication by DnaA-boxes in the origin region of the *Bacillus subtilis* chromosome. *EMBO J* **7**: 2911-2917
- Moriya S, Firshein W, Yoshikawa H, & Ogasawara N (1994) Replication of a *Bacillus subtilis* *oriC* plasmid in vitro. *Mol Microbiol* **12**: 469-478
- Moriya S, Hassan AK, Kadoya R, & Ogasawara N (1997) Mechanism of anucleate cell production in the *oriC*-deleted mutants of *Bacillus subtilis*. *DNA Res* **4**: 115-126
- Moriya S, Kato K, Yoshikawa H, & Ogasawara N (1990) Isolation of a *dnaA* mutant of *Bacillus subtilis* defective in initiation of replication: amount of DnaA protein determines cells' initiation potential.

*EMBO J* **9**: 2905-2910

Murray H & Errington J (2008) Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by

Soj/ParA. *Cell* **135**: 74-84

Noirot-Gros MF, Dervyn E, Wu LJ, Mervelet P, Errington J, Ehrlich SD, & Noirot P (2002) An

expanded view of bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8342-8347

Nozaki S, Yamada Y, & Ogawa T (2009) Initiator titration complex formed at *datA* with the aid of IHF

regulates replication timing in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **14**: 329-341

Ochi K, Kim JY, Tanaka Y, Wang G, Masuda K, Nanamiya H, Okamoto S, Tokuyama S, Adachi Y, &

Kawamura F (2009) Inactivation of KsgA, a 16S rRNA methyltransferase, causes vigorous emergence of mutants with high-level kasugamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*

**53**: 193-201

Ogura M, Yamaguchi H, Kobayashi K, Ogasawara N, Fujita Y, & Tanaka T (2002) Whole-genome

analysis of genes regulated by the *Bacillus subtilis* competence transcription factor ComK. *J*

*Bacteriol* **184**: 2344-2351

Ogura Y, Imai Y, Ogasawara N, & Moriya S (2001) Autoregulation of the *dnaA-dnaN* operon and

effects of DnaA protein levels on replication initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:

3833-41

Ogura Y, Ogasawara N, Harry EJ, & Moriya S (2003) Increasing the ratio of Soj to Spo0J promotes

replication initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 6316-6324

Scholefield G, Veening JW, & Murray H (2011) DnaA and ORC: more than DNA replication initiators.

*Trends Cell Biol* **21**: 188-194

Scholefield G, Whiting R, Errington J, & Murray H (2011) Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to

trigger its switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation. *Mol Microbiol*

**79**: 1089-1100

Serizawa M, Yamamoto H, Yamaguchi H, Fujita Y, Kobayashi K, Ogasawara N, & Sekiguchi J (2004)

- Systematic analysis of SigD-regulated genes in *Bacillus subtilis* by DNA microarray and Northern blotting analyses. *Gene* **329**: 125-136
- Simmons LA, Goranov AI, Kobayashi H, Davies BW, Yuan DS, Grossman AD, & Walker GC (2009) Comparison of responses to double-strand breaks between *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* reveals different requirements for SOS induction. *J Bacteriol* **191**: 1152-1161
- Smits WK, Goranov AI, & Grossman AD (2010) Ordered association of helicase loader proteins with the *Bacillus subtilis* origin of replication in vivo. *Mol Microbiol* **75**: 452-461
- Smits WK, Merrikh H, Bonilla CY, & Grossman AD (2011) Primosomal proteins DnaD and DnaB are recruited to chromosomal regions bound by DnaA in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**: 640-648
- Smulczyk-Krawczynszyn A, Jakimowicz D, Ruban-Osmialowska B, Zawilak-Pawlik A, Majka J, Chater K, & Zakrzewska-Czerwinska J (2006) Cluster of DnaA boxes involved in regulation of *Streptomyces* chromosome replication: from in silico to in vivo studies. *J Bacteriol* **188**: 6184-6194
- Soufo CD, Soufo HJ, Noirot-Gros MF, Steindorf A, Noirot P, & Graumann PL (2008) Cell-cycle-dependent spatial sequestration of the DnaA replication initiator protein in *Bacillus subtilis*. *Dev Cell* **15**: 935-941
- Spizizen J (1958) Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**: 1072-8
- Sullivan NL, Marquis KA, & Rudner DZ (2009) Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* **137**: 697-707
- Tanaka T, Ishida H, & Maehara T (2005) Characterization of the replication region of plasmid pLS32 from the Natto strain of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**: 4315-4326
- Veening JW, Murray H, & Errington J (2009) A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **23**: 1959-1970
- Webb CD, Graumann PL, Kahana JA, Teleman AA, Silver PA, & Losick R (1998) Use of time-lapse

microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **28**: 883-892

## VII. 謝辞

本研究を行うにあたり、奈良先端科学技術大学院大学細胞機能システム研究室小笠原直毅教授には、あらゆる面で懇切丁寧なご指導を受け賜り深く感謝致します。

石川周助教には、実験を行うにあたり多くの有益なご指導、ご鞭撻を頂き心より感謝致します。

小林和夫助教、大島拓助教をはじめ、細胞機能システム研究室の皆様には有益なご助言並びにご強力を頂きましたことを感謝致します。

吉村美香博士ならびに植木美哉子さんには、本研究で使用した枯草菌菌株を構築し供与していただきましたことに深く感謝致します。

本論文の審査を快く引き受けて下さった湊小太郎教授、真木寿治教授、金谷重彦教授の皆様のご厚意に深く感謝致します。