

論文内容の要旨

博士論文題目 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

氏名 奥村 元

(論文内容の要旨)

細菌の染色体複製は、複製開始タンパク質 DnaA が、複製開始点 *oriC* 領域内の 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 結合プロファイルの解析から、対数増殖期では、*oriC* 領域外に存在する 6 箇所の DBC に DnaA 分子が安定的に結合していることが明らかになった。本研究では、そうした DBC の機能を解明するため、6 DBC の欠損変異株 ($\Delta 6\text{DBC}$) を作製し、その表現型の解析を行った。

対数増殖期の $\Delta 6\text{DBC}$ 細胞について、フローサイトメトリー解析および *oriC/terC* 量比の計測を行い、野生株と比較したところ、 $\Delta 6\text{DBC}$ 細胞では過剰複製が誘導されていることが明らかになった。さらに、TetO/TetR system を利用した蛍光顕微鏡観察により *oriC* 領域の細胞内局在を観察し、細胞長と *oriC* の数と分布をヒストグラムにより解析した結果、 $\Delta 6\text{DBC}$ 細胞では複製開始時期が野生株に比べ早期に起きていることが明らかになった。

さらに、同様に染色体複製開始を負に制御している *spo0J* 遺伝子との二重欠損変異株 ($\Delta 6\text{DBC}-\Delta \text{spo0J}$ 株) を構築したところ、多面的な表現型 (複製開始頻度の上昇、染色体分離障害、細胞分裂障害) が誘導され、それを反映して著しい増殖障害が観察された。興味深いことに、DnaA 活性化能を持ち、その活性が Spo0J により負に制御されている Soj タンパク質をコードする遺伝子を欠失させることにより、この増殖障害は野生株と同等にまで回復した。こうした結果から、枯草菌では、Spo0J-Soj 系と共に、*oriC* 外の DBC と DnaA の相互作用が DnaA の活性を負に制御していることが強く示唆された。

また、各 DBC の一重及び二重欠損株の解析から、*yvdA-yycS* 間及び *ywcl-vpr* 間の DBC が、主要な DnaA 活性の制御配列であることが明らかになった。そして、DBC[*yvdA-yycS*]断片を $\Delta 6\text{DBC}$ 株染色体上の異なる位置に挿入したところ、コピー数依存的に過剰複製が抑制された。しかしながら、意外なことに、DBC[*yvdA-yycS*]断片をプラスミドから $\Delta 6\text{DBC}$ 株に供給した場合には効果がなかった。

大腸菌では *datA* と名付けられた DBC が、DnaA の *oriC* への結合を競合的に阻害し、染色体複製開始を負に制御することが報告されている。しかしながら、*datA* はプラスミド上でも機能することから、枯草菌における DBC-DnaA 相互作用による複製開始抑制機構は大腸菌と異なっていると考えられる。ChAP-chip 解析の結果からは、強い複製抑制能を持つ 2 箇所の DBC とそれ以外の DBC における DnaA 結合量に大きな違いが認められないことも考慮すると、*yvdA-yycS* 間及び *ywcl-vpr* 間の DBC においては、DnaA との複合体が特異的構造を形成し、その結果、複製開始タンパク質としての DnaA 機能が積極的に抑制されるという、新しい複製開始制御メカニズムが考えられる。

(論文審査結果の要旨)

細菌の染色体複製は、複製開始タンパク質 DnaA が、複製開始点 *oriC* 領域内の DnaA-box cluster (DBC) に結合することで開始されることが普遍的であることが知られている。一方、染色体の倍加は細胞分裂周期と同調的に進行し、倍加した染色体は娘細胞に正確に分配される。そのため、DnaA による *oriC* の活性化のタイミングは厳密に制御されていると考えられている。実際、グラム陰性菌を代表する大腸菌では、DnaA の活性を正あるいは負に制御する複数の制御系が明らかになっている。また、グラム陽性菌を代表する枯草菌においても、Spo0J-Soj システムと YabA タンパク質が DnaA 活性を負に制御することが報告されている。興味深いことに、両細菌における DnaA 活性の制御システムは、*dnaA* 遺伝子発現の自己抑制系を除いて、共通性はない。

申請者は、ChAP-chip 法による枯草菌の染色体全域に渡る DnaA 結合プロファイルの解析から、対数増殖期では、*oriC* 領域外に存在する 6 箇所の DBC に DnaA タンパク質が安定的に結合していることが明らかになったことに着目し、*oriC* 外の 6 DBC の欠損変異株 ($\Delta 6\text{DBC}$) を作製し、その表現型の解析を行った。その結果、 $\Delta 6\text{DBC}$ 株細胞では過剰複製が誘導されていることを見だし、そのメカニズムを明らかにするために、遺伝学的、細胞生物学的手法により徹底的な解析を行った。特に、*oriC* 領域の細胞内分布を蛍光標識により可視化し、細胞長との関係をヒストグラムにより解析することにより、細胞周期における染色体複製の進行パターンを明らかにする手法は、今後の他の研究にも活用できる独創的なものである。

そして、他の複製開始制御系との二重変異株の解析から、Spo0J-Soj 系と *oriC* 外の DBC と DnaA の相互作用が、DnaA の活性を負に制御し、複製開始を適切なタイミングに誘導するための、枯草菌における主要な制御系であることを強く示唆した。また、大腸菌では知られていることながら、負の制御が失われた DnaA の活性は細菌にとって致死となることを枯草菌でも示し、厳密な DnaA 活性の制御システムが細菌において普遍的に必須であると考えられることも明らかにした。さらに、複製開始を抑制する DBC の機能は、枯草菌においては、DnaA 結合量に依存するのではなく、配列特異的であり、複製開始タンパク質としての DnaA 機能を積極的に抑制するということを提唱した。この点は、今後の生化学的検証が必要ではあるが、新たな DnaA 活性の制御機構の提唱として、重要な研究成果である。

このように、本論文は、遺伝学的・細胞生物学的手法を駆使して、枯草菌細胞内での DBC と DnaA タンパク質相互作用の染色体複製開始制御における新たな機能を解明し、細菌における複製開始制御システムの理解に大きく貢献するものである。また、基礎生物学の上で重要な結果を得たのみでなく、得られた知見は病原性細菌や有用細菌の染色体複製制御システムの理解にも貢献するものであり、実用面でも意義のあるものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。