

所属 (主指導教官)	細胞遺伝学講座 (小笠原 直毅 教授)		
氏名	小椋 義俊	提出	平成14年 1月 8日
題目	枯草菌における複製開始の制御機構に関する研究		

要旨

細菌染色体の複製は複製起点 (*oriC*) あたりの細胞質量が一定の値 (開始質量) に達したときに始まり、しかもその複製開始は2回以上連続して起きないように (細胞周期当たり一度だけ) 厳密に制御されている。複製開始にはイニシエータータンパク質 DnaA が *oriC* 内に連続して存在するその結合配列 (DnaA box) に結合することが必須である。大腸菌では DnaA の過剰発現や *oriC* と同様に強く DnaA が結合する DnaA box クラスター (*datA*) の欠失により開始質量が減少することから、複製開始時期は DnaA と DnaA box の量比によって決定されると考えるモデルが提唱されている (Titration model)。また、DnaA は ATP と ADP の両方と結合し、ATP 結合型 (活性型) の比率が複製開始直前に上昇することや、複製開始後の *oriC* の隔離に関与する SeqA の遺伝子破壊株で開始質量が減少することから、複製開始時期の決定には DnaA の活性変換や SeqA が関与する制御も重要であるとされている。しかし、これらのモデルは開始質量を認識する機構を説明するのにまだ不十分である。枯草菌では *dnaA* の発現制御が大腸菌と異なり、大腸菌で DnaA box を過剰供給すると DnaA がこれに結合し、*dnaA* の自己抑制が解除されて転写が増加するのに対して、枯草菌では DnaA box を供給しても *dnaA* の転写は増加せず、複製開始が阻害 (不和合性) される。また、枯草菌 *dnaA* は複製開始後の一定期間しか転写されないことが示唆されており、DnaA は複製開始以前から一回分の複製に十分な量が既に蓄積されていると予想されている。こうした事より、枯草菌では Titration model は考えにくい、複製開始制御に関わる他の因子は発見されていない。一方、2回以上の連続した複製開始を抑制する機構として、大腸菌では DnaN (β -subunit of DNA polymerase III) と Hda (Homologous to DnaA) による DnaA の不活化、SeqA による複製開始後の *oriC* の細胞膜への隔離が知られているが、枯草菌には SeqA や Hda が無いことから大腸菌とは異なる制御系が存在すると考えられる。

上述のように枯草菌では Titration model は考えにくい、新たな制御系を知るためには DnaA 過剰発現の影響を解析することは重要である。その目的で、*dnaA* の発現を染色体上の別の位置から人為的に制御できる菌株を作製したが、DnaA 量を増加させると複製の伸長が阻害された。*dnaA* 上流に DnaA box、下流に *dnaN* がコードされていることから、*dnaA* と *dnaN* がオペロンを形成し、そして、このオペロンの転写が DnaA により制御されていると予想された。そこで、DnaA 量を変動させ、これらの遺伝子発現への影響を解析した結果、確かに両遺伝子がオペロンを形成し、その転写は DnaA により抑制された。これらのことから、DnaA 過剰発現に伴う複製伸長阻害は DnaN 枯渇が原因であると考えられたので、*dnaN* の発現を補える系を作製したところ、その複製伸長阻害は取り除かれた。この株で DnaA 量を変動させ、フローサイトメーターで複製開始点を解析した結果、DnaA 量が野生株の 1.5 - 3.3 倍に増加すると、*oriC* あたりの細胞質量 (mass/origin) が野生株に比べ 6 - 15% 減少したが、さらに DnaA 量を増加させても mass/origin はそれ以上減

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

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

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

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

枯草菌における複製開始の制御機構に関する研究

小椋 義俊

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞遺伝学講座
小笠原 直毅 教授

平成14年 2月 1日 提出

目次

I 序論

1. 細菌の細胞周期__4
2. 細菌における複製開始の機構とその制御__6
 - a. 細菌の *oriC* と DnaA の普遍性__6
 - b. 複製開始に関与するその他の蛋白質__9
 - c. *dnaA* の発現制御__9
 - d. 複製開始時期の制御__11
 - e. 2 回異以上の連続した複製開始の抑制機構__13
3. 本研究の目的__14

II 材料と方法

1. 材料__16
 - a. 菌株とプラスミド__16
 - b. 培地__16
2. 方法__17
 - a. 大腸菌の形質転換とプラスミド DNA の調整__18
 - b. 塩基配列の決定__18
 - c. 枯草菌の形質転換__18
 - d. 酵母の形質転換__19
 - e. ノーザンハイブリダイゼーション__19
 - f. ウエスタンブロッティング__19
 - g. 蛍光顕微鏡による変異株の細胞形態および核様体の観察__20
 - h. フローサイトメーターを用いた細胞内 *oriC* 数の測定__20

III 結果

1. DnaA 量の変動が複製開始に及ぼす効果__25
 - a. DnaA 過剰発現株の解析__25
 - b. DnaA による *dnaA-dnaN* オペロンの転写制御__25
 - c. DnaA-DnaN 過剰発現株の作製__28
 - d. DnaA-DnaN 過剰発現株の細胞形態の観察__29
 - e. DnaA 量の変化が複製開始に及ぼす影響__31
2. DnaA と相互作用する YabA の解析__35

- a. 酵母2ハイブリッド法による DnaA、DnaN と YabA の相互作用解析__35
 - b. *yabA* 破壊株の作製と細胞形態と核様体の観察__36
 - c. *yabA* 発現制御株の作製とその解析__37
3. Soj-Spo0J システムによる複製開始制御の解析__41
 - a. *spo0J* - *gfp* 株と *spo0J* 破壊株の解析__41
 - b. *soj-spo0J* 欠失株、Soj 過剰発現株と Soj-Spo0J 過剰発現株の解析__43
 - c. *soj* と *spo0J* の点突然変異株の解析__47

IV 考察

1. *dnaA-dnaN* オペロンと DnaA によるそのオペロンの転写制御__50
2. DnaA 過剰発現に伴う複製伸長阻害__51
3. DnaA量の変動が複製開始に及ぼす効果__51
4. YabA は DnaA と相互作用して複製開始を抑制している__52
5. Soj-Spo0J システムによる複製開始制御__53
6. 本研究のまとめと枯草菌における複製開始制御のモデル__55

V 謝辞

VI参考文献

I 序論

1. 細菌の細胞周期

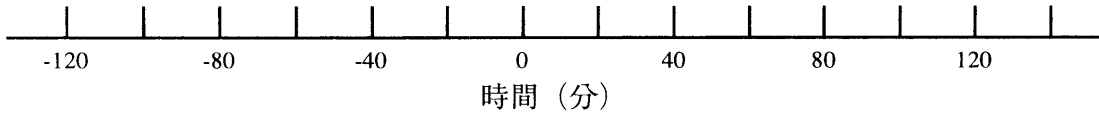
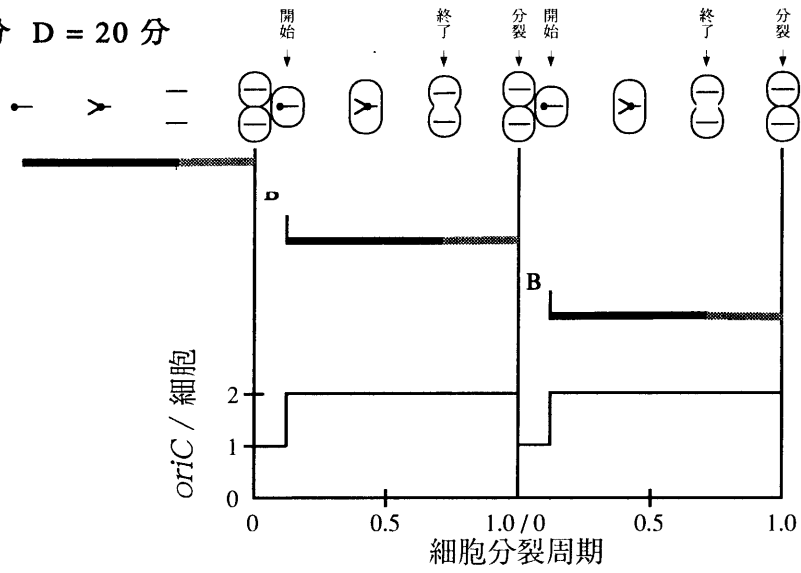
多くの細菌の染色体は環状分子であり、その複製はある決まった位置 (*oriC*: origin of chromosome) から開始して、両方向へ複製フォークが進み、一定の位置 (*terC*: terminus of chromosome) で終了する。複製されて倍加した染色体は染色体分配、細胞分裂によって娘細胞に2分され、細胞周期が完了する。こうした一連の細胞周期で、タンパク質合成を阻害すると、進行中の複製は最後まで正常に進行するが、複製開始は起こらない。このように、複製開始は新規のタンパク質合成を必要とする特異な反応であり、明らかに伸長反応とは区別することができ、染色体複製はその開始段階で厳密に制御されていると考えられている (von Meyenburg and Hansen, 1987)。

大腸菌や枯草菌などの細菌は、同じ 37°C でも、グルコースのみを栄養源とする最小培地では 60 分毎に分裂するが、その培地にアミノ酸や塩基などを加えると 20 分毎に分裂するようになる。このように、細菌は生育条件によってその世代時間 (*G*) を大きく変化させるが、同じ温度のとき、伸長反応にかかる時間 (*C*) と複製終了から細胞分裂にかかる時間 (*D*) は一定であることが示されている (Cooper and Helmstetter, 1968)。例えば、大腸菌では 37°C のとき、 $C = 40$ 分、 $D = 20$ 分であるが、増殖速度が遅いとき (例えば $G = 70$ 分: $G > C + D$ のとき)、分裂から最初の開始までの時間 (*B*) に 10 分かかる (図 1-A)。増殖速度が早くなると (例えば $G = 30$ 分: $G < C$ のとき)、複製開始は2世代前の細胞分裂と同時に起こり、細胞分裂周期を通して細胞あたりの *oriC* は4個である (図 1-B)。つまり、複製開始は前の周期の複製が終了する前に起こっている。この現象を多分岐複製といい、細菌の細胞周期で特異的に観察される現象である。このように、細菌は、複製開始の時期のみを変化させ、環境の変化に対応し、その世代時間を調節している。

ここまで述べてきたように、細菌の細胞周期は染色体複製の開始段階で制御されていると考えられているが、その複製開始のタイミングはどのようにして決められているのであろうか。細菌では増殖速度が早くなると細胞あたりの平均の *oriC* 数が増加すると共に、平均の細胞長も増加する。そして、増殖速度によらず、複製が起こるときの *oriC* あたりの細胞質量は一定であることが示されており、この値は開始質量と呼ばれている。(Donachie, 1968)。近年、この開始質量は増殖速度に応じて変動することが示されたが (Churchward *et al.*, 1981; Wold *et al.*, 1994)、対数増

(A) $G > C + D$

$G = 70$ 分 $C = 40$ 分 $D = 20$ 分



(B) $G < C$

$G = 30$ 分 $C = 40$ 分 $D = 20$ 分

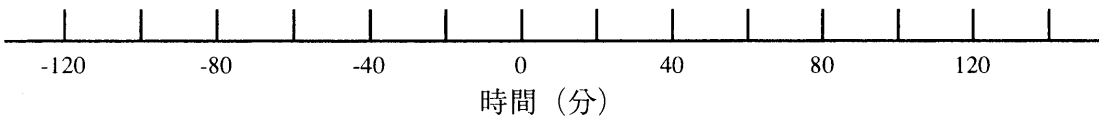
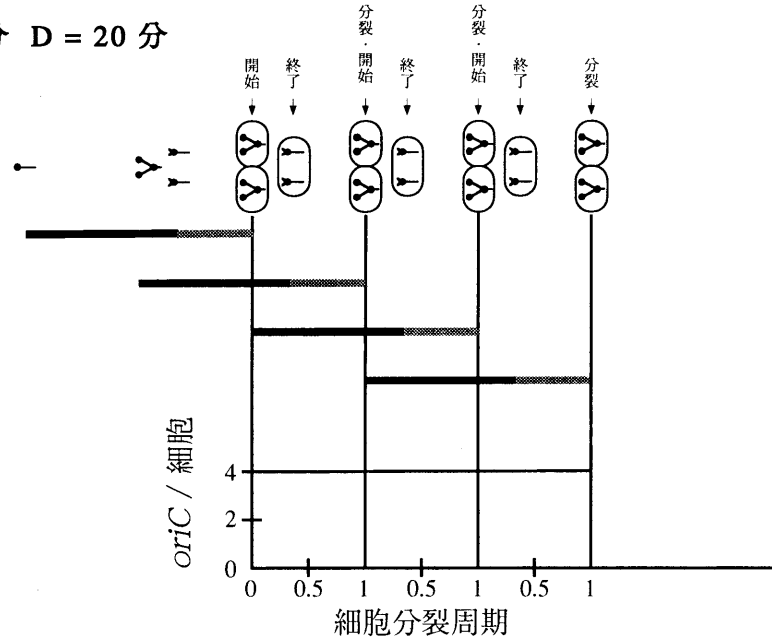


図 1. 細菌の細胞周期 [文献 (Helmstetter, 1996) を改変]

異なる増殖速度における染色体複製の開始、終了と細胞の成長、分裂の関係を模式的に示した。図では、染色体を直線で示し、複製フォーク（黒丸）は左から右へ進行している。また、細胞分裂周期における細胞あたりの *oriC* 数の変化をグラフで示した。

(A): 世代時間が70分のときの周期 (B): 世代時間が30分のときの周期

—— C: 伸長反応にかかる時間 ——— D: 終了から分裂までにかかる時間

G: 世代時間 B: 分裂から最初の開始までの時間

殖期の細胞集団では、個々の細胞の開始質量は狭い範囲内で一定であることも観察されている (Boye *et al.*, 1996)。こうしたことから、複製開始と細胞質量の増加には密接なつながりがあり、複製開始の制御は細胞質量の増加を認識して行われていると考えられる。この制御機構に関しては、本研究のテーマでもあり、I-2-dの項で詳しく述べたい。

2. 細菌における複製開始の機構とその制御

a. 細菌の *oriC* と DnaA の普遍性

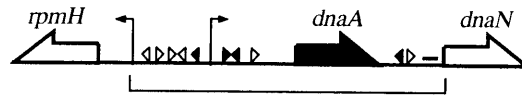
細菌の複製開始には *oriC* へのイニシエータータンパク質 DnaA の結合が必須である。細菌の *oriC* は、プラスミドとして複製できる染色体 DNA 断片をクローニングすることにより大腸菌で初めて単離され、わずか 245 bp の配列が必要かつ十分であった。(Yasuda and Hirota, 1977)。その *oriC* プラスミドの複製は染色体複製に必須な遺伝子群に依存すると共に、複製開始が起こる時期も染色体複製の開始と同調していたことから、その 245 bp の配列中には染色体複製の開始とその時期の制御に必要な情報が含まれていると考えられる (Helmstetter and Leonard, 1987)。その配列中には TTATCCACA を基本とする 9 塩基対からなる配列 (DnaA box) が繰り返して存在している。この配列に DnaA が結合し、その結果、DNA の高次構造が変化して、近傍の AT に富む領域で DNA の 2 本鎖が開裂する (Herrick *et al.*, 1996; Messer and Weigel, 1996)。

枯草菌でも、大腸菌と同様の方法で、吉川らの研究グループにより、*oriC* プラスミドの単離が試みられたが、成功しなかった。そこで、細胞内で最初に複製する制限酵素断片のクローニングと塩基配列の決定が行われた (Moriya *et al.*, 1985; Ogasawara *et al.*, 1985a)。そこには大腸菌 *dnaA* と相同な遺伝子が存在し、その前後には DnaA box のクラスターも見いだされた (Ogasawara *et al.*, 1985b)。この両方の DnaA box クラスターに DnaA が結合し (Fukuoka *et al.*, 1990)、その結合が複製開始に必須であることが明らかにされた (Moriya *et al.*, 1990)。その領域は約 2 kbp にも及ぶことから、*oriC* プラスミドが単離できなかった理由の 1 つであると考えられており、この領域をクローニングすることで、*oriC* プラスミドとして枯草菌の細胞内で複製することが示されている (Moriya *et al.*, 1992)。また、枯草菌でも、DnaA box に DnaA が結合することによって、その下流の AT に富む流域で DNA の 2 本鎖が開裂することが明らかにされている (Krause *et al.*, 1997)。

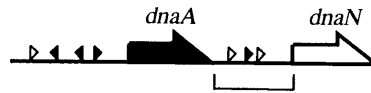
現在では、多くの細菌で *dnaA* 遺伝子と *oriC* 配列が同定されており (Moriya *et al.*, 1999; Schaper *et al.*, 2000; Zawilak *et al.*, 2001)、*oriC* 配列中には DnaA box が高く保存されていることから、DnaA box は複製開始に必要なシス配列として細菌で

グラム陽性細菌

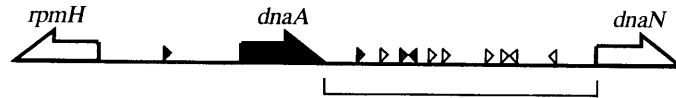
Bacillus subtilis



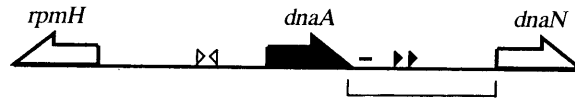
Spiroplasma citri



Streptomyces lividans



Mycobacterium smegmatis



グラム陰性細菌

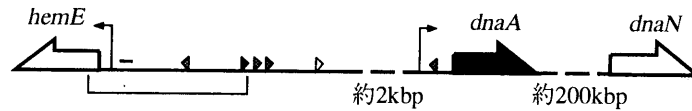
Escherichia coli



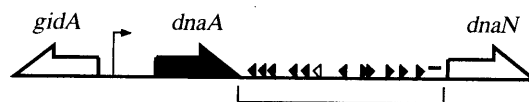
Pseudomonas putida



Caulobacter crescentus



Thermus thermophilus



Helicobacter pylori

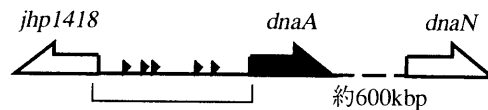


図2. 細菌oriC領域の構造

oriC配列が同定されている細菌のDnaA boxの位置と並びをグラム陽性細菌とグラム陰性細菌で分けて示した。

- ▶ : DnaA box コンセンサス配列
- ▷ : 1塩基違いの配列
- ◀ : 2塩基違いの配列
- : oriC
- : ATに富む配列

普遍的であると考えられる(図2)。そのDnaA boxはグラム陰性細菌ではdnaAの上流、もしくは下流の1カ所にクラスターとして存在しており、また、dnaAから離れた位置への転座も見られる。一方、グラム陽性細菌ではDnaAを挟んで2カ所に

クラスターが存在するのが特徴的である。枯草菌を除くグラム陽性細菌では *dnaA* 下流の DnaA box クラスターのみが複製開始に必須であるが、枯草菌ではこの両方が必須であり (Moriya *et al.*, 1992)、この領域間で DnaA の結合によりループ構造が形成されると考えられている (Yoshikawa and Wake, 1993)。事実、*in vitro* において、そのループ構造が確認されている (Krause *et al.*, 1997)。

一方、*dnaA* 遺伝子は複製開始が特異的に阻害される大腸菌の温度感受性変異体の単離とその解析によって発見された (von Meyenburg and Hansen, 1987)。DNA 複製に関与する遺伝子は細胞増殖にも必須であり、非許容温度で DNA 合成が阻害されることにより、細胞増殖が停止する温度感受性変異株として Kohiyama らにより最初に単離された (Kohiyama *et al.*, 1966; Kohiyama, 1968)。DNA 複製の変異株の内、伸長反応が阻害されるものは、非許容温度でも DNA 合成が直ちに停止するが、開始反応が特異的に阻害されるものは、非許容温度にしても進行中の伸長反応は最後まで進むため、DNA 合成は徐々に停止する。Kohiyama らに続いて、諸グループにより単離された *dnaA* の多くの変異は、そのすべてが開始反応のみを阻害した。そして、Kornberg らによる *in vitro* での複製開始の再構築実験から、DnaA がイニシエーターとしての機能を持つことが証明された (Fuller and Kornberg, 1983)。DnaA は現在までに全ゲノム配列が決定されたすべての真正細菌で高度に保存されており、真正細菌に普遍的なイニシエーター蛋白質であると考えられている。

DnaA の構造はアミノ酸配列の保存性から 4 つのドメインに分けられる (Messer *et al.*, 1999)。N 末端のドメイン I は最も短いドメインである。それに続くドメイン II は保存性の低い領域で、ドメイン III が最も保存されている。ドメイン IV もドメイン III に次いで保存性が高い領域である (図 3)。大腸菌では D

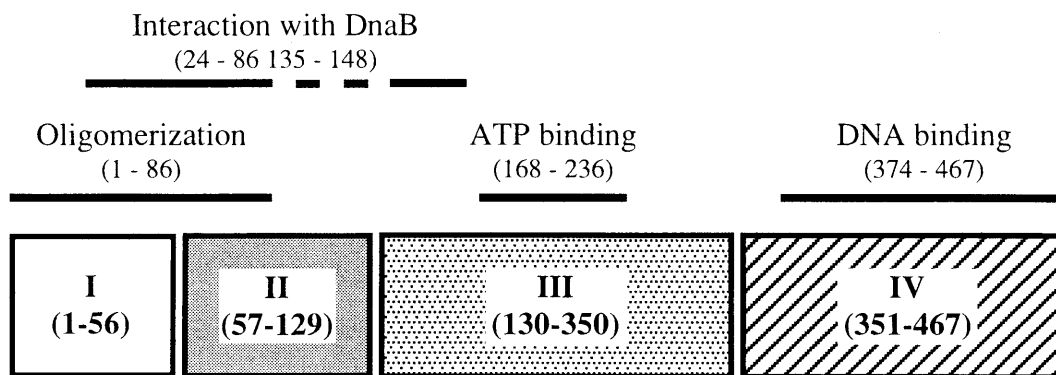


図 3. DnaA の構造

大腸菌 DnaA のドメイン構造を示した。()内はアミノ酸配列を表す。

メイン I と II の一部が DnaA の多量体形成と、DnaB ヘリケースとの相互作用に必要な領域であることが示されている (Sutton *et al.*, 1998 ; Weigel *et al.*, 1999 ; Seitz *et al.*, 2000) 。ドメイン III は ATP 結合ドメインで、多くのヌクレオチド結合タンパク質との相溶性が高い領域であり (Skarstad and Boye, 1994) 、ドメイン IV の大部分は DNA への結合に必要な領域である (Roth and Messer, 1995) 。また、ドメイン III の一部も DnaB との相互作用に必要な領域であることが示されている (Seitz *et al.*, 2000) 。

b. 複製開始に関与するその他のタンパク質

複製開始には、DnaA の結合により解離した DNA 上にヘリケースが導入されることが必要である。先に述べたように、大腸菌 DnaA にはヘリケース (DnaB) と相互作用するドメインがあり、このドメインと DnaB-DnaC (ヘリケースローダー) 複合体が相互作用し、ヘリケースが導入される (Fang *et al.*, 1999) 。枯草菌では DnaA と DnaC (枯草菌 DNA ヘリケース) 以外に、3 種類の複製開始に必須な蛋白質 (DnaB、DnaD、DnaI) が存在し、それらがヘリケースの導入に働いていると考えられている。DnaI は大腸菌 DnaC ヘリケースローダーと相溶性があり (Koonin and Bork, 1992) 、酵母 2 ハイブリッド法で枯草菌 DnaC ヘリケースとの強い相互作用が確認されている (Imai *et al.*, 2000) 。枯草菌 DnaB は一本鎖 DNA への強い結合能を持ち (Sueoka, 1998) 、大腸菌ヘリケースローダーも同様の活性を持つことから (Learn *et al.*, 1997) 、枯草菌では大腸菌ヘリケースローダーの働きを DnaB と DnaI の 2 つの蛋白で行っていると考えられている。DnaD は機能未知であるが、酵母 2 ハイブリッド法で DnaA と相互作用することが示されている (Ishigo-oka *et al.*, 2001) 。

c. *dnaA* 遺伝子の発現制御

大腸菌の *dnaA* は *oriC* から約 42 kb (1min) 離れた位置に存在し、下流の *dnaN* (DNA ポリメラーゼ III の β サブユニットをコードする遺伝子) 、*recF* (DNA 組み換えに関与する遺伝子) とオペロンを構成している (Perez-Roger *et al.*, 1991 ; Quinones and Messer, 1988 ; Sakakibara *et al.*, 1981) 。一方で、*dnaN* と *recF* はそれぞれのプロモーターからも転写される (Armengod *et al.*, 1988) 。*dnaA* 遺伝子上流には 2 つのプロモーター (*dnaA1p* と *dnaA2p*) があり (Hansen, 1982) 、その 2 つのプロモーターの間に 1 個の DnaA box が存在し、そこに DnaA が結合することにより、*dnaA* の転写は抑制される。DnaA 過剰発現株では両方のプロモーターからの転写が野生株の 25% まで減少し、*dnaA* 温度感受性株では、非許容温度で DnaA による自己抑制が

Kucherer *et al.*, 1986)。また、*oriC* プラスミドなどで DnaA box を過剰に供給すると、細胞内の DnaA がそれに結合するため、*dnaA* の自己抑制は解除され、転写が増加する (Hansen *et al.*, 1987)。こうした DnaA による自己抑制の他に、*dnaA* の転写は Dam methylase によるメチル化の影響も受ける。*dnaA* プロモーター付近には多くの GATC 配列 (Dam methylase の認識配列) が存在し、この領域のメチル化により *dnaA* の転写は増加し (Braun and Wright, 1986)、逆に、*dam* 変異株では DnaA 量が野生株に比べ減少する (Landoulsi *et al.*, 1989)。同調培養系で、経時的に *dnaA* の転写を解析すると、複製開始直後から細胞分裂周期の約 1/3 の間 *dnaA* は転写されない (Ogden *et al.*, 1988)。その期間は *dnaA* プロモーター領域が半メチルの状態 (複製後、片方の DNA 鎖のみがメチル化されている状態) である期間と一致し (Campbell and Kleckner, 1990)、複製開始後の *dnaA* プロモーター領域は *oriC* と同様に (I-2-e 参照) 細胞膜に隔離されていると考えられている (Lu *et al.*, 1994; Ogden *et al.*, 1988)。こうした制御により、*dnaA* の発現は細胞周期を通じて大きく変動して、細胞分裂周期の 1/3 が過ぎると *dnaA* の転写が始まり、一定期間経過するとその転写は停止する (Theisen *et al.*, 1993)。

一方、枯草菌では、DnaA box を含むプラスミドの共存は *oriC* からの複製に不和合性を示し、大腸菌と対照的である (Moriya *et al.*, 1988)。先に述べたように、大腸菌では DnaA box を過剰供給しても、自己抑制が解除され、*dnaA* の転写が増加するため、そのプラスミドは安定に維持される。しかし、枯草菌では、DnaA box を含むプラスミドを細胞に導入しても、*dnaA* の転写は増加せず (Moriya *et al.*, 1999)、染色体の複製開始が阻害される (図 3)。枯草菌 *dnaA* のプロモーターは多くの DnaA box に挟まれているため、そのプロモーターからの転写は DnaA により抑制されると考えられる。事実、DnaA の温度感受性変異株を非許容温度で培養すると、DnaA が不安定となり、分解されてその細胞内濃度は一時低下するが、ただちに *dnaA* の転写量が増大し、タンパク量も野生株レベルに回復する (Moriya *et al.*, 1990)。このように、枯草菌でも *dnaA* の転写は自己抑制されていると予想できるが、それは DnaA box の供給によっては解除されないため、大腸菌のような単純な自己抑制ではないと考えられるが、まだその制御の機構はわかっていない。

また、枯草菌では *dnaB* の温度感受性変異株を非許容温度で培養し、複製開始を抑制すると、*dnaA* の転写も同時に停止する。その細胞を許容温度に戻して、複製を再開させると、*dnaA* の転写は複製開始後すぐに起こり、一定期間経過すると停止する (Ogasawara *et al.*, 1985b)。この変異株では、非許容温度で *dnaA* の転写は起こらないにも関わらず、タンパク質合成を阻害するクロラムフェニコールの存在下で許容温度に戻すと、新規のタンパク質合成なしに、複製は一回だけ開始する

(Murakami *et al.*, 1976)。これらの事実から、枯草菌では、DnaA は複製開始後すぐに、次の複製開始に必要な量が合成され、その後、転写は自己抑制されると予想できる。このように、枯草菌と大腸菌では *dnaA* の発現様式が異なり、次で述べるように、複製開始制御の機構も異なっている可能性を示唆している。

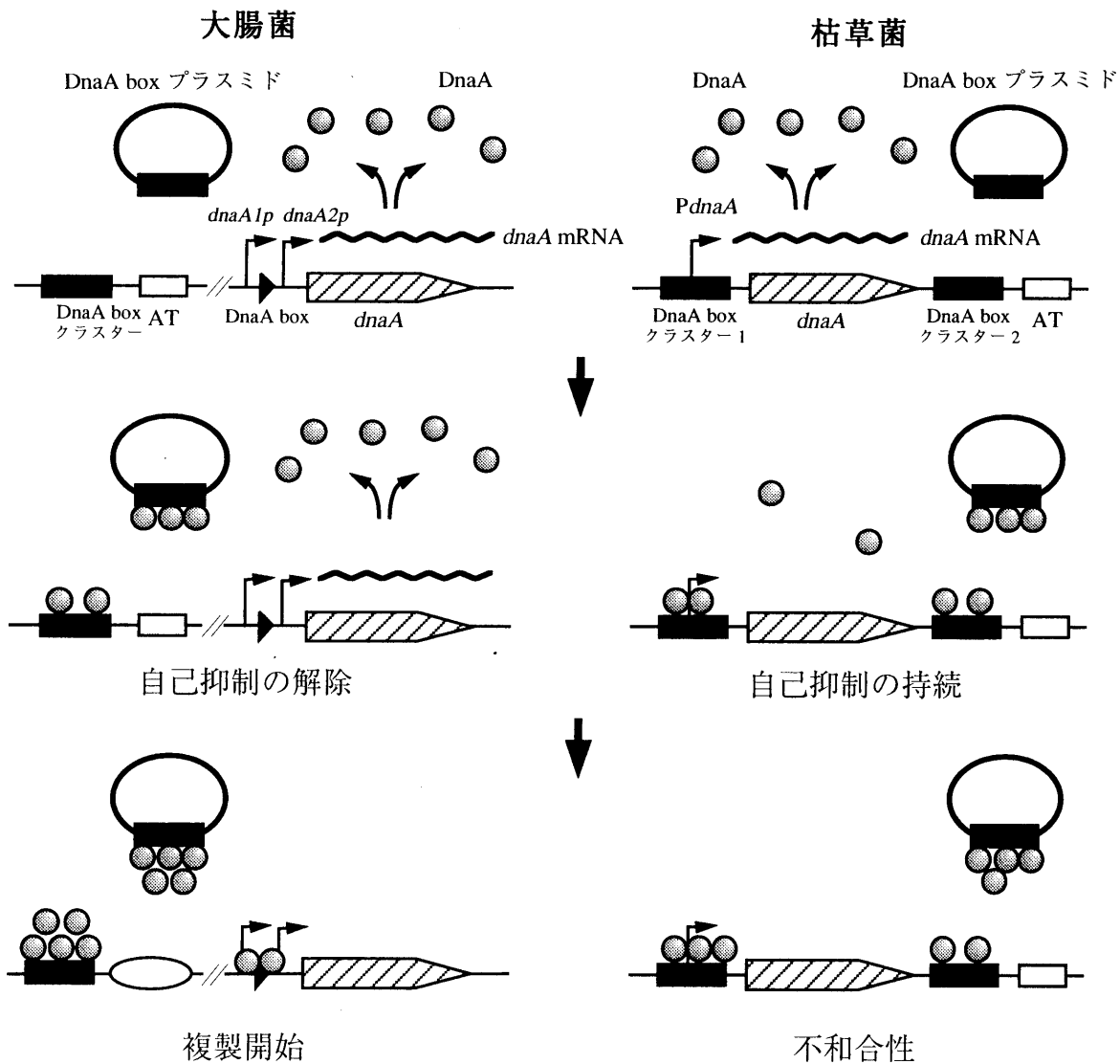


図4. DnaA box 過剰供給の効果 (大腸菌と枯草菌の比較)

大腸菌と枯草菌それぞれの *oriC* と *dnaA* プロモーター領域の構造を示し、DnaA box を含むプラスミドを細胞に導入したときの影響を模式的に示した。

d. 複製開始時期の制御

先に述べたように、細菌では、DNA 複製は細胞質量が一定量 (開始質量) に到達すると始まると考えられる。複製開始は新規のタンパク質合成を必要とする反

応でもあり、複製開始時期は、細胞質量の増加と同調して合成されるタンパク質性の因子によって規定されていると考えるモデルが提唱され (Autorepressor model : Sompayrac and Maaloe, 1973) 、その候補としてもっとも注目されたのが DnaA であった。

大腸菌では、DnaA の過剰発現により開始質量が減少することから、複製開始時期は細胞内 DnaA 量によって決定される可能性が考えられた (Lobner-Olesen *et al.*, 1989) 。その後、詳細な解析が行われ、DnaA 量の増加に伴い、*oriC* 数は野生株の 2 倍程度まで上昇するが、同時に、強い複製伸長阻害も生じることが明らかにされた (Atlung and Hansen, 1993) 。また、*dnaA* の発現を人為的に制御できる系を構築し、その発現を停止させて DnaA を枯渇させた後、3 段階の強さで発現を再開させても、DnaA の蓄積速度に関わりなく、一定量蓄積したときに複製は開始することが示された (Hansen and Atlung, 1995) 。先にも述べたが、大腸菌では DnaA box を過剰供給すると *dnaA* の発現量も増加することから、細胞内の DnaA と DnaA box の量比のバランスは特定の値に保たれるように制御されていると考えられる。細胞内で DnaA box に対する DnaA の量比が最も高くなるのは複製開始直前であるので、複製開始は DnaA と DnaA box の量比によって決定されると考える Initiator titration model が提唱された (Hansen *et al.*, 1991) 。このモデルでは、合成された DnaA は、まず、染色体 DNA 上に散在する親和性の高い DnaA box に結合し、DnaA が十分量蓄積すると、*oriC* 内に存在する親和性の低い 1 つの DnaA box (box R3 : Samitt *et al.*, 1989) へ結合し、複製開始複合体が形成され、複製が開始すると考えられている。事実、染色体上には、*oriC* 以外に DnaA との親和性の高い DnaA box が多数存在し (Roth and Messer, 1998) 、その内の一カ所の DnaA box クラスター領域 (*datA*) の欠失により複製開始時期が早くなり (Kitagawa *et al.*, 1998) 、逆に、DnaA box の過剰供給は複製開始時期を遅延させる (Christensen *et al.*, 1999) 。

こうした大腸菌で提示されている Initiator titration model では、DnaA と DnaA box の量比によって複製開始時期が決定されると仮定されているが、この考えは過去の解析結果や新たに行われた解析結果と一致していないことも指摘されている。

(1) 開始質量は栄養条件により変動するので (Churchward *et al.*, 1981 ; Frey *et al.*, 1981) 、このモデルに従うと、DnaA 量も栄養条件に応じて変動するはずであるが、そのような変動は起こらない (Chiaromello *et al.*, 1989 ; Frey *et al.*, 1981) 。(2) *dnaA* の発現は低温で誘導され、14 °C で DnaA 量は 37 °C の 2 倍程度まで増加するが、開始質量は変化しない (Atlung and Hansen, 1999) 。(3) *oriC* を一部欠失し、プラスミド由来の複製起点を染色体に組み込んだ細胞では、染色体複製がそのプラスミドの複製系に依存してランダムに開始するのに対し (Koppes and Nordstrom, 1986 ;

Eliasson et al, 1996)、その細胞に導入した *oriC* プラスミドは正常な細胞と同じ周期で複製を開始する (Eliasson and Nordstrom, 1997)。染色体の複製がランダムに開始するので、細胞内の DnaA と DnaA box の量比も無秩序に変動しているはずであるが、*oriC* プラスミドは正常な周期で複製を開始するので、Initiator titration model とは大きく矛盾が生じる。

このように、Initiator titration model は多くの矛盾を抱えており、現在は DnaA の活性変換や SeqA が関与する制御も合わせて幾つかの他のモデルが考えられている。DnaA にはアデニンヌクレオチド結合部位があり、DnaA は ATP と ADP の両方と高い親和性を持ち、ATP 結合型の DnaA (ATP-DnaA) が *in vitro* の複製開始に必須である (Sekimizu et al., 1987)。ADP-DnaA と ATP-DnaA はどちらも TTATCCACA を基本とする 9 塩基対の DnaA box には結合できるが (Schaper and Messer, 1995)、最近、ATP-DnaA のみが結合する ATP-DnaA box が *oriC* や *dnaA* のプロモーター領域に同定され (AGatct を基本とする 6 塩基対からなる配列)、それらへの DnaA の結合が開始反応や、*dnaA* の転写抑制に必須であると提案されている (Speck et al., 1999; Speck and Messer, 2001)。こうした ATP-DnaA と ADP-DnaA の細胞内での比率は細胞周期を通じて大きく変動しており、複製開始直前に ATP-DnaA が増加し、複製開始が起こるとすぐに ADP-DnaA が増加する (Katayama, 2001)。このことから、複製開始時期の決定には DnaA の活性変換も重要であると考えられている。また、SeqA は複製開始後の半メチル化状態にある *oriC* に特異的に結合し、*oriC* を細胞膜に隔離する働きを持っている (Lu et al., 1994)。この働きによって、2 回以上の連続した複製開始を抑制しているが (I-2-e 参照)、*seqA* 破壊株では開始質量も減少することが示されている (Boye et al., 1996)。このことから、複製開始時期の決定には、正の制御因子である DnaA と負の制御因子である SeqA のバランスが重要であると議論されている。しかしながら、これらのモデルは開始質量を認識する機構を説明するにはまだ不十分である。

一方、枯草菌では *dnaA* の発現制御が大腸菌と異なり、*dnaA* は複製開始後の一定期間しか転写されないことは先に述べた。このことから、DnaA は複製開始以前から一回分の複製開始に十分な量が既に準備されていると予想される。また、枯草菌では、DnaA box を供給しても *dnaA* の自己抑制は解除されないため、DnaA と DnaA box の量比で複製開始時期が決定されると想定されている Initiator titration model は考えにくい、それに代わるモデルはまだ提案されていない。

e. 2 回以上の連続した複製開始の抑制機構

複製開始はその時期の制御と共に、2 回以上連続して起こらないように厳密

に制御されている。この両方の制御によって、複製は正しい時期に細胞周期あたりただ一度だけ開始する。大腸菌では複製された DNA は片方の鎖のみがメチル化された状態となり、この半メチル化状態の *oriC* からは複製が開始されない (Russel and Zinder, 1987)。新しく複製された半メチル化状態の DNA は、大部分が5分以内に Dam メチレーズ (DNA-adenine methylase) によりメチル化され、全メチル化状態となるが、*oriC* 領域だけは細胞周期の約 1/3 もの間、半メチル化状態のままである (Lu *et al.*, 1994)。この 'Eclipse period' と呼ばれる期間の存在には SeqA が必要で、半メチル化状態の *oriC* DNA に特異的に結合して *oriC* を細胞膜に隔離し、Dam メチレーズによるメチル化を抑制していると考えられている (Onogi *et al.*, 1999)。このため、複製開始は 'Eclipse period' には起きない。

また、大腸菌では複製開始後に ATP-DnaA が急速に ADP-DnaA に不活化され (Kurokawa, *et al.*, 1999)、その不活化には DnaN (β -subunit of DNA polymerase III) と Hda (Homologous to DnaA) が関与していると考えられている (Katayama *et al.*, 1998; Kato and Katayama, 2001)。*dnaAcos* 変異株では、このような DnaA の不活化が行われず、2回以上の連続した複製開始が起こり、細胞分裂や細胞増殖が阻害される (Kellenberger-Gujer *et al.*, 1978; Katayama, 1994; Katayama and Kornberg, 1994; Katayama and Crooke, 1995)。*hda* の破壊によっても同様に連続した複製開始が起こり、細胞増殖が阻害される (Kato and Katayama, 2001)。こうした機構によって2回以上の連続した複製開始が抑制され、'Eclipse period' が過ぎたときには、DnaA が染色体上の DnaA box にタイトレートされており、複製は細胞質量が開始質量に達し、新たに開始ポテンシャルが形成されるまで開始しない。

一方、枯草菌には Dam のようなメチル化のシステムは無く、SeqA や Hda も保存されていないことから、大腸菌とは異なった制御系が存在すると考えられているが、その制御に関わる因子はまだ発見されていない。

3. 本研究の目的

複製開始制御に関わる因子として大腸菌で見いだされた SeqA や Hda は、一部のグラム陰性の腸内細菌にしか保存されてない。このことから、グラム陽性細菌とグラム陰性細菌では複製開始制御の様式が大きく異なっている可能性が考えられる。枯草菌はグラム陽性細菌の代表として、古くから大腸菌と共に複製に関する研究が盛んに行われ、染色体複製の機構の解明に大きく貢献してきた。しかし、複製開始制御に関しては、まだ大腸菌に比べ未知な部分が多く、DnaA 以外には、その制御に関わる因子は発見されていない。そこで、本研究では枯草菌を用いて、複製開

始制御機構の全容を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。

枯草菌では大腸菌で提案されている Initiator titration model は考えにくいですが、新たな制御系を知るためには DnaA 過剰発現の効果を解析することは重要である。そこで、*dnaA* の発現を人為的に制御できる菌株を作製し、DnaA 量の変動が複製開始に及ぼす効果を解析した。また、本研究では、枯草菌 YabA と Soj-Spo0J が複製開始制御に関わる因子であることを見いだした。YabA は、最近、酵母 2 ハイブリッド法による解析で DnaA と相互作用することが示されたタンパク質であり、複製開始制御に関わっている可能性が考えられたので、*yabA* 発現制御株を作製し、YabA 量を変動させ、その変動が複製開始に及ぼす効果を解析した。Soj-Spo0J はこれまで染色体分配に関わっていると考えられていたが、我々はこれらのタンパク質が複製開始制御において重要な働きをしていることを見だし、複製開始制御における役割を解析した。

II材料と方法

1. 材料

a. 菌株とプラスミド

本研究で使用した菌株を表1に、プラスミドを表2に示した。また、各プラスミドの作製に使用した合成プライマーの配列を表3に示した。

b. 培地

L broth (LB)

10 g	Bacto Tryptone (Difco)
5 g	Bacto Yeast Extract (Difco)
5 g	NaCl
	per liter

Penassay broth (PAB)

17.5 g	Antibiotic medium3 (Difco)
	per liter

S 750 - fumarate

1 X	S 750 salts
1 X	Metals
0.1 %	Glutamate
0.5 %	Fumarate

10 X S 750 salts

0.5 M	MOPS
100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
50 mM	KH ₂ PO ₄

KOH の添加により pH 7.0 に調整した。

100 X Metals

0.2 M	MgCl ₂
70 mM	CaCl ₂

5 mM	MnCl ₂
0.1 mM	ZnCl ₂
100 µg / ml	Thiamine - HCl
2 mM	HCl
0.5 mM	FeCl ₃

YPDA medium

20 g	Difco peptone
10 g	Yeast extract
50 ml	40 % glucose
	per liter

SD medium

6.7 g	Yeast nitrogen base without amino acids
100 ml	10X drop solution
	per liter

10 X drop solution (without Lysine and Tryptophan)

300 mg	L - Isoleucine
1500 mg	L - Valine
200 mg	L - Adenine hemisulfate salt
200 mg	L - Arginine HCl
200 mg	L - Histidine HCl monohydrate
300 mg	L - Lysine HCl
200 mg	L - Methionine
500 mg	L - Phenylalanine
2000 mg	L - Threonine
300 mg	L - Tyrosine
200 mg	L - Uracil
	per liter

2. 方法

a. 大腸菌の形質転換とプラスミド DNA の調製

大腸菌 C600 株、DH5 α 株、TC1963 株にエレクトロポレーションでプラスミド DNA を導入し、抗生物質を含む LB プレートで形質転換体を選択した。これを抗生物質を含む LB 培地 10 ml 中で 1 晩培養し、アルカリ SDS 法(Sambrook *et al* 1989) でプラスミド DNA を抽出した。

抗生物質は以下の濃度で使用した。

アンピシリン	50 $\mu\text{g/ml}$
テトラサイクリン	10 $\mu\text{g/ml}$
スペクチノマイシン	100 $\mu\text{g/ml}$
カナマイシン	50 $\mu\text{g/ml}$

b. 塩基配列の決定

目的とする配列を PCR により増幅し、それを鋳型に ABI 社の dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction あるいは BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction を用いて付属のマニュアルに従い反応し、ABI310 型シーケンサーで塩基配列を決定した。

c. 枯草菌の形質転換

枯草菌の形質転換は Kunst らの方法 (Kunst *et al.* 1994) に従い、形質転換体の選択は各抗生物質を含む PAB 寒天培地で行った。

抗生物質は以下の濃度で使用した。

エリスロマイシン	0.5 $\mu\text{g/ml}$
クロラムフェニコール	5 $\mu\text{g/ml}$
スペクチノマイシン	100 $\mu\text{g/ml}$
テトラサイクリン	10 $\mu\text{g/ml}$
ネオマイシン	5 $\mu\text{g/ml}$

d. 酵母の形質転換

酵母の形質転換は Ito らの方法 (Ito *et al.*, 1983) に従い、形質転換体の選択はロイシン、トリプトファンを含まない SD 寒天培地で行った。

e. ノーザンハイブリダイゼーション

枯草菌 RNA の調製：Igo & Losick の方法に従って枯草菌から全 RNA を抽出した (Igo and Losick, 1986)。まず、細胞を PAB 培地で $O.D._{600} = 0.3$ まで培養し、集菌した。その菌体に 0.55 ml の LETS buffer [100 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 % (w/v) SDS]、0.5 ml のガラスビーズ (直径 0.35 - 0.50 mm)、0.5 ml の水飽和フェノールを加え、4 分間ボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌し細胞を破碎した。遠心により細胞ザンサを除いた後、上清に等量の phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1 by volume) を加えて攪拌し、遠心後、水層を回収した。この溶液に 1/20 量の 4 M LiCl、2.5 倍量のエタノールを加えて遠心し、核酸を沈殿させた。風乾後、300 μ l の 1 % の DEPC 処理水に溶解し、3 倍量の 4 M NaOAc (pH 6.0) を加え -20 $^{\circ}$ C で 1 時間放置し、遠心することにより RNA のみを再度沈殿させた。この RNA を 50 μ l の DEPC 処理水に溶解し、260 nm の吸収を測定し、濃度を求めた。

ノーザンハイブリダイゼーション：1 %ホルムアミド変性ゲルを用いて 5 μ g の RNA を電気泳動により分離し、ナイロンメンブラン HybondTM N⁺ (Amersham) にブロットした。80 $^{\circ}$ C、3 時間のベーキングにより RNA をメンブランに固定後、メチレンブルーで rRNA を染色し、泳動した RNA 量がほぼ等しいことを確認した。

プローブには、以下のように調製した Anti-sense RNA を用いた。まず、T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を付加したプライマーを用いて PCR で目的遺伝子のコード領域約 300 bp を増幅し、アガロースゲル電気泳動後、この DNA 断片を BIO-RAD 社の Prep-A-Gene DNA Purification Kit を用いて精製した。この DNA 断片を鋳型とし、Boehringer Mannheim 社の DIG Labeling Kit (SP6/T7) を用いて T7 RNA ポリメラーゼにより DIG (digoxigenin) 標識された RNA プローブを作成した。

この RNA プローブとメンブラン上の RNA とのハイブリダイゼーションは Bohringer Mannheim 社の DIG Detection Kit により行った。ハイブリダイズしたシグナルは kit 中の AP (alkaline phosphatase) 標識抗 DIG 抗体と、蛍光色素 CSPD ($C_{18}H_{20}ClO_7PN_2$) を AP の基質として用いることにより、X 線フィルム上に検出した。

f. ウェスタンブロッティング

試料の調製：対数増殖期 [O.D. (600) = 0.4] の菌液 1 ml から菌体を集め、1 mg/ml のリゾチームを含む 10 % sucrose-50mM Tris-HCl 溶液 48 μ l に懸濁し、37 °C、5 分間処理した。その後、等量の 2 \times sample buffer (5 % glycerol, 2 % SDS, 0.01 % BPB, 2 mM DTT) を加え、沸騰水浴中で 5 分間処理し SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料とした。

ウエスタンブロッティング：この試料中の蛋白質を 10-20 % の SDS - ポリアクリルアミドグラディエントゲルを用いて電気泳動し、分離した。タンパク質の染色にはクマシー-G-250 を含む GelCode Blue Stain Reagent (PIERCE) を使用した。分離した蛋白質を PVDF 膜 HybondTM-P (Amersham) にブロットし、このメンブランをブロッキング溶液 (5 % ドライミルク、30 mM トリスバッファー pH 7.4、200 mM NaCl) で処理した。続いて、一次抗体 (枯草菌 DnaA に対するウサギ抗体) と反応させた後洗浄し、さらに HRP 標識抗ウサギーヤギ抗体 (BIO PAD) と反応させた。シグナルの検出には ECL+Plus (Amersham) を使用した。

g. 蛍光顕微鏡による変異株の細胞形態および核様体の観察

枯草菌を LB あるいは PAB 培地を用いて 37 °C で培養し、対数増殖期 [O.D. (600) = 0.4] で集菌した。その細胞を 70 % のエタノール中で 4 °C 一晩処理し、固定した。固定した細胞を 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) で 3 回洗浄後、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 10mM MgCl₂ 緩衝液に懸濁し、Poly-L-Lysine 処理したスライドガラス上に塗布した。風乾後、DAPI 染色し、落射蛍光顕微鏡 (オリンパス BX50-FLA-PDH) で観察した。さらに、カラー冷却 CCD カメラ (C5810 Hamamatsu) を用いて蛍光像を取り込んだ。

h. フローサイトメーターを用いた細胞内 *oriC* 数の測定

枯草菌を PAB 培地を用いて 37 °C で培養し、対数増殖期 [O.D. (600) = 0.4] でその一部を取り、集菌し、さらに細胞を 70 % のエタノールを用いて細胞を固定した (T0 試料)。残りの培養液は、クロラムフェニコール (最終濃度 200 μ g/ml) を加え、さらに 5 時間培養した後、集菌し、細胞固定を行った (T3 試料)。固定した細胞を 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) で 3 回洗浄後、10 mM Tris-HCl - 10 mM MgCl₂ 緩衝液に懸濁した。その後、ミスラマイシン (0.09 mg/ml) - エチジウムブロマイド (0.02 mg/ml) 溶液を加え、BRYTE HS フローサイトメトリーシステム (BIO RAD) を用いて細胞内 *oriC* 数に相当する染色体 DNA 数を測定した。

表1. 本研究に使用した菌株

菌株	遺伝子型	菌株の由来あるいは参考文献
<i>B. subtilis</i>		
CRK6000	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB.</i>	Moriya <i>et al.</i> , (1990)
<i>dnaA</i> 欠失株 (NIS6311)	CRK6000, <i>spoIIIJ::pRK1 (oriN), Δ dnaA</i> (ochre mutation).	Hassan <i>et al.</i> , (1997)
DnaA 過剰発現株 (NIS2020)	CRK6000, <i>purA::PrpmH-lacO-dnaA.</i>	今井 (1996)
DnaA-DnaN 過剰発現株 (NIS 2021)	NIS2020, <i>purA ::PrpmH-lacO -dnaA-dnaN.</i>	pSM5100→NIS2020
DnaA-DnaN 過剰発現、 <i>dnaA</i> 欠失株 (NIS 2022)	NIS 2021, $\Delta dnaA$ (ochre mutation).	NIS6311ゲノム→ NIS 2021
<i>yabA</i> 破壊株	CRK6000, $\Delta yabA \Omega$ pYO1 (spec ^r)	pYO 01→CRK6000
<i>yabA</i> 発現制御株	CRK6000, $\Delta yabA \Omega$ pYO1 (spec ^r) , <i>amyE :: Pspac - yabA.</i>	pYO 02→ <i>yabA</i> 破壊株
<i>spo0J - GFP</i> 株	CRK6000, <i>spo0J - GFP</i>	Imai <i>et al.</i> , (2000)
<i>spo0J</i> 破壊株	CRK6000, <i>spo0J :: ermC.</i>	研究室ストック
<i>soj - spo0J</i> 欠失株	CRK6000, $\Delta soj - spo0J \Omega$ pYO3 (tet ^r)	pYO 03→CRK6000
<i>Soj</i> 過剰発現株	CRK6000, <i>amyE :: Pspac - soj.</i>	pYO 04→CRK6000
<i>Soj-Spo0J</i> 過剰発現株	CRK6000, <i>amyE :: Pspac - soj - spo0J.</i>	pYO 05→CRK6000
<i>Spo0J</i> 過剰発現株	CRK6000, <i>amyE :: Pspac - spo0J.</i>	pYO 06→CRK6000
<i>Spo0J</i> 過剰発現株 (SD <i>rpmH</i>)	CRK6000, <i>amyE :: Pspac - SD rpmH - spo0J.</i>	pYO 07→CRK6000
<i>soj 12</i> 株	CRK6000, <i>amyE :: Pspac - soj 12- spo0J.</i>	pYO 31→ <i>soj - spo0J</i> 欠失株
<i>soj 16</i> 株	CRK6000, <i>amyE :: Pspac - soj 16- spo0J.</i>	pYO 32→ <i>soj - spo0J</i> 欠失株
<i>spo0J 13</i> 株	CRK6000, <i>amyE :: Pspac - soj - spo0J13.</i>	pYO 33→ <i>soj - spo0J</i> 欠失株
<i>spo0J 14</i> 株	CRK6000, <i>amyE :: Pspac - soj - spo0J14.</i>	pYO 34→ <i>soj - spo0J</i> 欠失株
<i>spo0J 17</i> 株	CRK6000, <i>amyE :: Pspac - soj - spo0J17.</i>	pYO 35→ <i>soj - spo0J</i> 欠失株
<i>E. coli</i>		
C600	<i>supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21.</i>	研究室ストック
DH5 α	<i>supE44, Δ lac U169 (φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, glrA96, thi - 1, relA1.</i>	研究室ストック
TC1963	<i>dnaA46 int(mini-R1)RB1-dnaA::lacZ, araD139. Δ (ara, leu)7697, Δ lacX74, galU, galK, strA.</i>	Andrup <i>et al</i> (1988)
<i>S. cerevisiae</i>		
AH109	<i>MATa, trp1 - 901, leu2-3, 112, ura3-52, his - 200, gal4 Δ, gal80 Δ, LYS2 :: GAL1UAS - GAL1TATA - HIS3, MEL1, GAL2_{UAS} - GAL2_{TATA} - ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS} - MEL1_{TATA} - lacZ.</i>	CLONTECH

→ は形質転換を示す

表 2-1. 本研究に使用したプラスミド

プラスミド	作成方法とプラスミドの説明	入手先と参考文献
pSM5100	図 6	Ogura et al., 2001
pBR322	大腸菌で複製できる複製起点と、大腸菌での選択マーカーとして用いるアンピシリンの耐性遺伝子 (<i>bla</i>) をコードしているプラスミド。	研究室ストック
pDLT3	大腸菌で複製できる複製起点と、 <i>bla</i> 、枯草菌での選択マーカーとして用いるクロラムフェニコール耐性遺伝子、IPTG で発現が制御できる Pspac をコードしているプラスミド。	Moriya et al., 1998
pYO 01'	プライマーセット YOFF 01 - YOFR 01 と YOBF 01 - YOBR 01 で増幅した <i>yabA</i> 上流断片 (<i>Hind</i> III - <i>Xho</i> I) と下流断片 (<i>Xho</i> I - <i>Bam</i> HI) を pBR322 の <i>Hind</i> III - <i>Bam</i> HI サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 01	プライマーセット YOSPF 01 - YOSPR 01 で <i>S. aureus</i> ゲノム DNA (トランスポゾン Tn554: Murphy et al., 1985) より増幅したプロモーター配列を含むスペクチノマイシン耐性遺伝子を pYO 01' の <i>Xho</i> I サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 02	プライマーセット YOF 02 - YOR 02 で増幅した SD 配列を含む <i>yabA</i> 全長を pDLT3 の <i>Hind</i> III - <i>Bam</i> HI サイト (Pspac プロモーターの下流) にクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 03'	プライマーセット YOFF 03 - YOFR 03 と YOBF 03 - YOBR 03 で増幅した <i>soj</i> 上流断片 (<i>Hind</i> III - <i>Xba</i> I) と <i>spo0J</i> 下流断片 (<i>Xba</i> I - <i>Bam</i> HI) を pBR322 の <i>Hind</i> III - <i>Bam</i> HI サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 03	pBEST307 (Itaya, 1992) より <i>Xba</i> I で切り出したテトラサイクリン耐性遺伝子を pYO 03' の <i>Xba</i> I サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 04	プライマーセット YOF 04 - YOR 04 で増幅した SD 配列を含む <i>soj</i> 全長を pDLT3 の <i>Hind</i> III - <i>Bam</i> HI サイト (Pspac プロモーターの下流) にクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 05	プライマーセット YOF 05 - YOR 05 で増幅した <i>soj</i> の SD 配列から <i>spo0J</i> の停止コドンまでを pDLT3 の <i>Bam</i> HI サイト (Pspac プロモーターの下流) にクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 06	プライマーセット YOF 06 - YOR 05 で増幅した SD 配列を含む <i>spo0J</i> 全長を pDLT3 の <i>Bam</i> HI サイト (Pspac プロモーターの下流) にクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 07	プライマーセット YOF 07 - YOR 05 で増幅した <i>rpmH</i> の SD 配列を含む <i>spo0J</i> 全長を pDLT3 の <i>Bam</i> HI サイト (Pspac プロモーターの下流) にクローニングしたプラスミド。	本研究
pGBT 9	酵母と大腸菌で複製可能な複製起点、GAL4 DNA binding ドメイン、酵母 (トリプトファン合成遺伝子) と大腸菌 (<i>bla</i>) での選択マーカーをコードしているプラスミド。	CLONTECH
pGBT 9 - <i>dnaA</i>	pGBT 9 の <i>Bam</i> HI - <i>Pst</i> I サイトに <i>dnaA</i> (- first 5 aa) をクローニングしたプラスミド。	Isigo-Oka et al., 2001
pGBT 9 - <i>dnaN</i>	プライマーセット YOF 11 - YOR 11 で増幅した <i>dnaN</i> 全長を pGBT 9 の <i>Bam</i> HI - <i>Pst</i> I サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pGBT 9 - <i>yabA</i>	プライマーセット YOF 12 - YOR 12 で増幅した <i>yabA</i> 全長を pGBT 9 の <i>Eco</i> RI - <i>Bam</i> HI サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pGAD 424	酵母と大腸菌で複製可能な複製起点、GAL4 アクチベーションドメイン酵母 (ロイシン合成遺伝子) と大腸菌 (<i>bla</i>) での選択マーカーをコードしているプラスミド。	CLONTECH
pGAD 424 - <i>dnaA</i>	pGAD 424 の <i>Bam</i> HI - <i>Pst</i> I サイトに <i>dnaA</i> (上流 5 アミノ酸欠失) をクローニングしたプラスミド。	Isigo-Oka et al., 2001
pGAD 424 - <i>dnaN</i>	プライマーセット YOF 11 - YOR 11 で増幅した <i>dnaN</i> 全長を pGAD 424 の <i>Bam</i> HI - <i>Pst</i> I サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pGAD 424 - <i>yabA</i>	プライマーセット YOF 12 - YOR 12 で増幅した <i>yabA</i> 全長を pGBT 9 の <i>Eco</i> RI - <i>Bam</i> HI サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究

表 2-2. 本研究に使用したプラスミド

プラスミド	作成方法とプラスミドの説明	入手先と参考文献
pYO 31	プライマーセット YOF 31 - YOR 05 で増幅した <i>soj</i> の SD 配列から <i>spo0J</i> の停止コドンまでを pDLT3 の <i>Bam</i> HI サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 32	プライマーセット YOF 32 - YOR 05 で増幅した <i>soj</i> の SD 配列から <i>spo0J</i> の停止コドンまでを pDLT3 の <i>Bam</i> HI サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 33	プライマーセット YOF 05 - YOR 33 と YOF 33 - YOR 05 で増幅した断片を、プライマーセット YOF 05 - YOR 05 で PCR ライゲーション法により接続し (<i>soj</i> - <i>spo0J</i> 13 断片)、pDLT3 の <i>Bam</i> HI サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 34	プライマーセット YOF 05 - YOR 34 と YOF 34 - YOR 05 で増幅した断片を、プライマーセット YOF 05 - YOR 05 で PCR ライゲーション法により接続し (<i>soj</i> - <i>spo0J</i> 14 断片)、pDLT3 の <i>Bam</i> HI サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究
pYO 35	プライマーセット YOF 05 - YOR 35 と YOF 35 - YOR 05 で増幅した断片を、プライマーセット YOF 05 - YOR 05 で PCR ライゲーション法により接続し (<i>soj</i> - <i>spo0J</i> 17 断片)、pDLT3 の <i>Bam</i> HI サイトにクローニングしたプラスミド。	本研究

表3. 本研究に使用した合成プライマー

プライマー	配列
YOFF 01 (<i>Hind</i> III)	aag aag <u>CTT</u> CAC TGC TGA CGG CCG
YOFR 01 (<i>Xho</i> I)	<u>ctc ctc gag</u> CGT TAA TCT GTG GTT TGT GC
YOFB 01 (<i>Xho</i> I)	<u>ctc ctc gag</u> CTT CCG CAT AAG ACG GGA GC
YOBR 01 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc</u> GCG ATT CGG AGA TGC TCG
YOSPF 01 (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Xho</i> I)	<u>gga gga tcc gaa ttc ctc gag</u> TTC AAA AAT TAT ATG GAG ATC TG
YOSPR 01 (<i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I, <i>Xho</i> I)	<u>aag aag ctt ggt acc ctc gag</u> GTT ATT GCA ATA AAA TTA GCC
YOF 02 (<i>Hind</i> III)	<u>aag aag ctt</u> GCA CAA ACC ACA GAT TAA CG
YOR 02 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc</u> TAT GCG GAA GCC TTT TCC C
YOFF 03 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc</u> GAT GGC ATG GCG AGA GCG G
YOFR 03 (<i>Xba</i> I)	<u>tct tct aga</u> CAT GAA CAT GTA CTA TCT TGC
YOFB 03 (<i>Xba</i> I)	<u>tct tct aGA</u> GCT TTT GTC TGA ACG AG
YOBR 03 (<i>Hind</i> III)	<u>aag aag ctt</u> GAA CAG ACC GTT CAA CCG G
YOF 04 (<i>Hind</i> III)	<u>aag aag ctt</u> GAT AGT ACA TGT TCA TGT G
YOR 04 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tCC</u> AAG GCC TTT AGC CAT TCG C
YOF 05 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc</u> GAT AGT ACA TGT TCA TGT G
YOR 05 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcC</u> ATT TAT GAT TCT CGT TCA GAC
YOF 06 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc</u> TTA GAT TTA GCA AAG GAA GTG GCT G
YOF 07 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc cag cta ttc ctc gag gga ggt gtc ata</u> aAT GGCTAA AGG CCT TGG AAA AGG
YOF 11 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc</u> GTA TGA AAT TCA CGA TTC AAA AAG ATC GTC
YOR 11 (<i>Pst</i> I)	<u>ctg ctg cag</u> TTA ATA GGT TCT GAC AGG AAG G
YOF 12 (<i>Eco</i> RI)	<u>gaa gaa ttc</u> TTG GAT AAA AAA GAG TTA TTT G
YOR 12 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc</u> CTA TTT TTT ATT TAA GAA TGA CAG
YOF31 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc</u> GAT AGT ACA TGT TCA TGT GAA AGT AGG TGA CAT CGT GGG AAA AAT CAT AGC AAT TAC GAA CCA AAA AGt CGG GG
YOF32 (<i>Bam</i> HI)	<u>gga gga tcc</u> GAT AGT ACA TGT TCA TGT GAA AGT AGG TGA CAT CGT GGG AAA AAT CAT AGC AAT TAC GAA CCA AAA AGG CGG GGT CG G CCA AAC AAC G
YOF 33	CCA AGA AAA CAC GCT GAT GAC GAG G
YOR 33	CCT CGT CAT CAG CGT GTT TTC TTG G
YOF 34	CGG CGT TTT GCA GCG GCA AAG C
YOR 34	GCTT TGC CGC TGC AAA ACG CCG
YOF 35	CGT TAA TGA GGG GAA TTG C
YOR 35	GCA ATT CCC CTC ATT AAC G

大文字はテンプレート DNA とアニールする配列、小文字はタグとして付加した配列、太字は *rpmH* の SD 配列、下線は制限酵素の認識配列で、() 内にその制限酵素名を示した。

III 結果

1. DnaA 量の変動が複製開始に及ぼす効果

a. DnaA 過剰発現株の解析

大腸菌の Initiator titration model では、DnaA の過剰発現や DnaA box クラスター (*datA*) の欠失で複製開始時期が早まることから、複製開始時期は DnaA と DnaA box の量比によって決まっていると考えられている。枯草菌では、*dnaA* の発現制御が大腸菌と異なるので、Initiator titration model は考えにくい。DnaA 過剰発現の効果解析することは重要である。その目的で、当研究室において、*dnaA* の発現を染色体上の別の位置 (*purA* 領域) から人為的に制御できる菌株が作製された (今井、1996)。その株には、IPTG で発現制御可能なプロモーター (枯草菌 *rpmH* プロモーターと大腸菌 *lac* オペレーターとの融合プロモーター) と *dnaA* が結合して *purA* 領域に組み込まれており、0, 5, 10, 20, 50 μM IPTG で発現誘導すると、DnaA 量はそれぞれ野生株の 1.1, 1.8, 2.3, 3.0, 4.8 倍になる (図 5-A, B)。しかし、この株は 50 μM IPTG を添加したとき、液体培地では一定期間増殖できるものの、寒天平板上にはコロニーを形成せず、100 μM IPTG では液体培地でも培養できなかった。20 μM IPTG を含む液体培地で培養した細胞を DAPI 染色し、蛍光顕微鏡下で観察すると、細胞は伸長し、核様体の分布も異常であった (図 5-C)。このような細胞形態の異常は SOS 応答が誘導されたときによく観察されることから、SOS 応答時に発現が誘導される *dinC* プロモーターの活性を指標に SOS 応答の有無を調べた。その結果、DnaA 量の増加と共にこのプロモーター活性が増大したので、この細胞では SOS 応答が誘導されていることが明らかとなった (今井、1996)。SOS 応答は複製伸長阻害によっても誘導されることが知られており、観察された SOS 応答は、DnaA 過剰発現によって DnaN が枯渇し、それが原因で複製伸長阻害が起きて誘導されたと考えられた。

b. DnaA による *dnaA-dnaN* オペロンの転写制御

枯草菌 *dnaA* の下流には *dnaN* がコードされ、*dnaA* の上流には DnaA box がクラスターを形成している。枯草菌ではこれまでに *dnaA* と *dnaN* がオペロンを形成し、その発現は DnaA による制御を受けていると考えられていたが、そのことはまだ *in vivo* で証明されていなかった。我々は DnaA 過剰発現によって引き起こされた

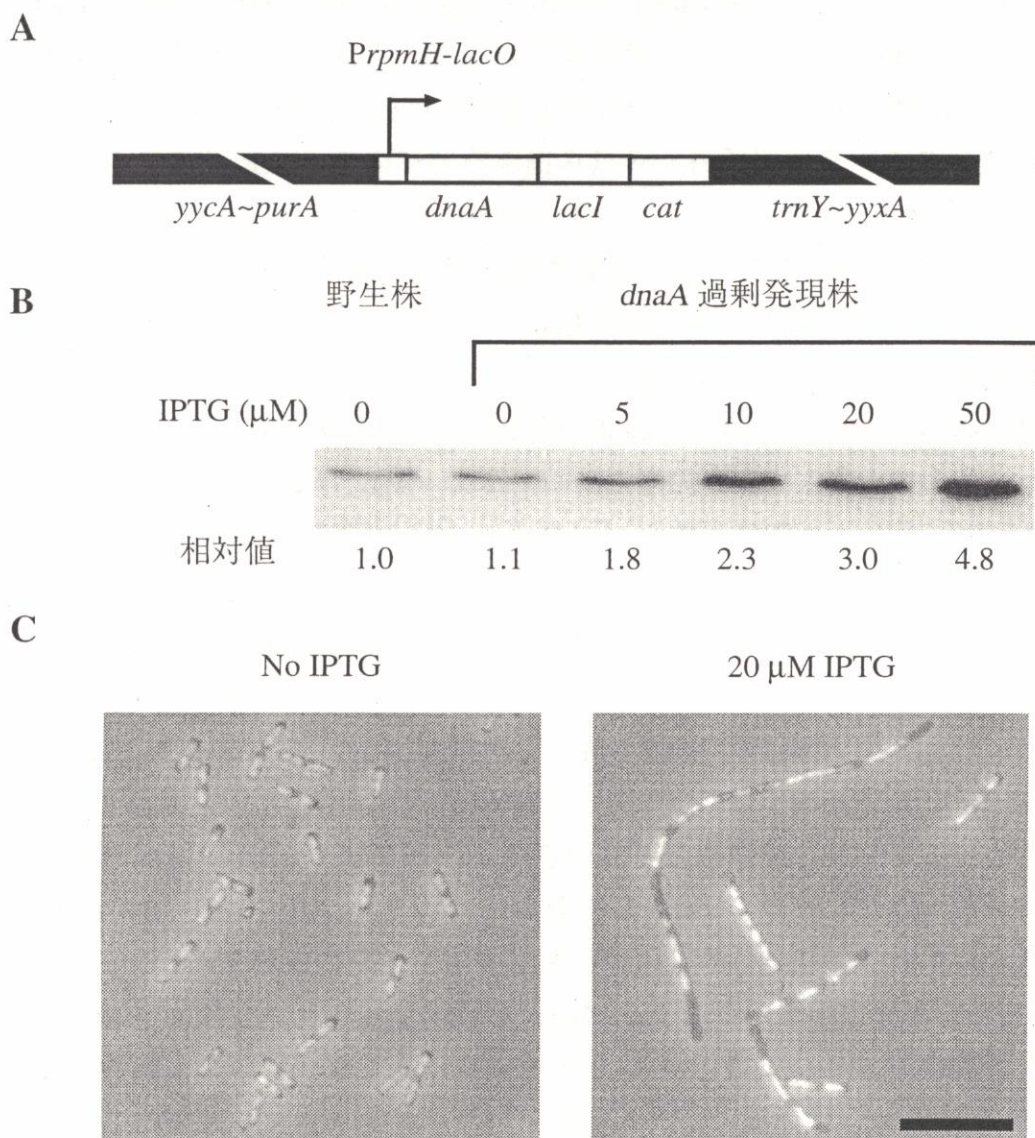


図5. DnaA 過剰発現株の構造、DnaA 発現量の解析、及び細胞形態の観察

A: DnaA 過剰発現株の *purA* 領域

dnaA 遺伝子を *purA* 領域に IPTG で発現誘導可能な *PrpmH-lacO* と結合して組み込んでいる。

cat: クロラムフェニコール耐性遺伝子、*lacI*: 大腸菌由来 *lac* オペロンの DNA 結合型転写抑制蛋白質をコードする遺伝子

B: 各 IPTG 濃度における DnaA 発現量のウェスタンブロット法による解析

各バンドのシグナル強度を NIHimage で定量し、野生株との相対値で表した。IPTG 濃度が高いサンプルはシグナル強度が高く検量線が直線にならないので、実際の定量には希釈したサンプルを用いた。

C: 蛍光顕微鏡による DnaA 過剰発現株の細胞の DAPI 像

20 mM IPTG を含む PAB 培地で O.D.(600) = 0.2 まで培養した DnaA 過剰発現の細胞をエタノールで固定後、DAPI 染色し、蛍光顕微鏡で観察した。図中のバーは 10 μm のスケールを表す。

複製伸長阻害が DnaA による *dnaA-dnaN* オペロンの転写抑制、すなわち DnaN (DNA ポリメラーゼ III の β サブユニット) 枯渇が原因であると予想した。そこ

で、DnaA 過剰発現株と *dnaA* 欠失株を用いて DnaA 量を変動させ、*dnaA* と *dnaN* の転写単位とその発現変化をノーザンハイブリダイゼーションで解析した。*dnaA* 欠失株では、*dnaA* が複製開始に必要な遺伝子であることから、*spoIIIJ* 領域に納豆菌低コピー数プラスミド pLS32 の複製起点を組み込み、複製開始をプラスミドの複製系に依存させた上で、*dnaA* にオーカー変異を導入している (Hassan et al., 1997)。このため、この株では *dnaA* の転写産物は野生株と同じサイズで検出できる。

野生株では、*dnaA* プローブで *dnaA* 単独の約 1.7 kb (矢印 ③, 図 6-C) と *dnaA-dnaN* オペロン由来の約 2.9 kb (矢印 ①, 図 6-C) の転写産物が検出された (図 6-A; レーン 1)。*dnaN* プローブでも約 2.9 kb (矢印 ①, 図 6-C) の転写産物が検出できたことから、*dnaA* と *dnaN* はオペロンを形成していることがわかった (図 6-B; レーン 1)。また、*dnaA* と *dnaN* の間には ρ 非依存性ターミネーター様の配列が存在し、*dnaA* 上流のプロモーターからの転写が一部この領域で停止すると予想される。そのために、*dnaA* プローブで *dnaA* 単独のサイズに相当する転写産物も検出されたと考えられる。

dnaA 欠失株では、*dnaA* プローブで約 1.7 kb (矢印 ③, 図 6-C) と約 2.9 kb (矢印 ①, 図 6-C) のバンドが、*dnaN* プローブでは約 2.9 kb (矢印 ①, 図 6-C) のバンドが増加し、*dnaA* プロモーターからの転写量が増加していることがわかった (図 6-A・B; レーン 2)。また、この株では *dnaN* プローブで他のレーンで弱く検出されていた *dnaN* 単独のサイズに相当する転写産物 (矢印 ④, 図 6-C) も増加した (図 6-B; レーン 2)。*dnaA* 内部から *dnaN* 上流までの領域とレポーター遺伝子として耐熱性菌由来の β -ガラクトシダーゼをコードする *bgaB* を融合させ、LacZ 活性を指標にこの領域のプロモーター活性を測定したが、活性は全く検出されなかった (結果は記載しない)。このことから、*dnaN* 単独の転写産物は *dnaA-dnaN* オペロンとして転写された後、プロセッシングを受けて切断された可能性が高いと考えられる。

DnaA 過剰発現株では、添加した IPTG 濃度の上昇に伴い *dnaA* プローブで約 1.7 kb のバンド (矢印 ③, 図 6-C) が、*dnaN* プローブでは約 2.9 kb のバンド (矢印 ①, 図 6-C) が減少し、*dnaA* プロモーター活性が抑制されていることがわかった (図 6-A・B; レーン 3~6)。しかし、*dnaA* プローブでは約 2.9 kb のバンド (矢印 ②, 図 6-C) が DnaA 過剰発現株で増加していた (図 6-A; レーン 3~6)。*dnaA* プローブは *dnaA-dnaN* オペロン由来の転写産物にハイブリダイズするが、*purA* 領域に挿入した *dnaA* 由来の転写産物ともハイブリダイズする。IPTG 添加濃度の上昇に比例して、この約 2.9 kb のバンドが強くなること、*purA* 領域の *dnaA-lacI* の長さがこの 2.9 kb とほぼ一致することから、この転写産物は *purA* 領域に挿入した *dnaA*

由来のものであると考えられる。

以上の結果から、*dnaA* と *dnaN* はオペロンを形成し、このオペロンの転写は DnaA による負の制御を受けることがわかった。このことから、DnaA 過剰発現株で観察された DnaA 量の増加に伴う複製伸長障害は DnaN 枯渇が原因である可能性が極めて高くなった。そこで、*dnaA* の発現誘導時に、*dnaN* も増加できる菌株を作製した。

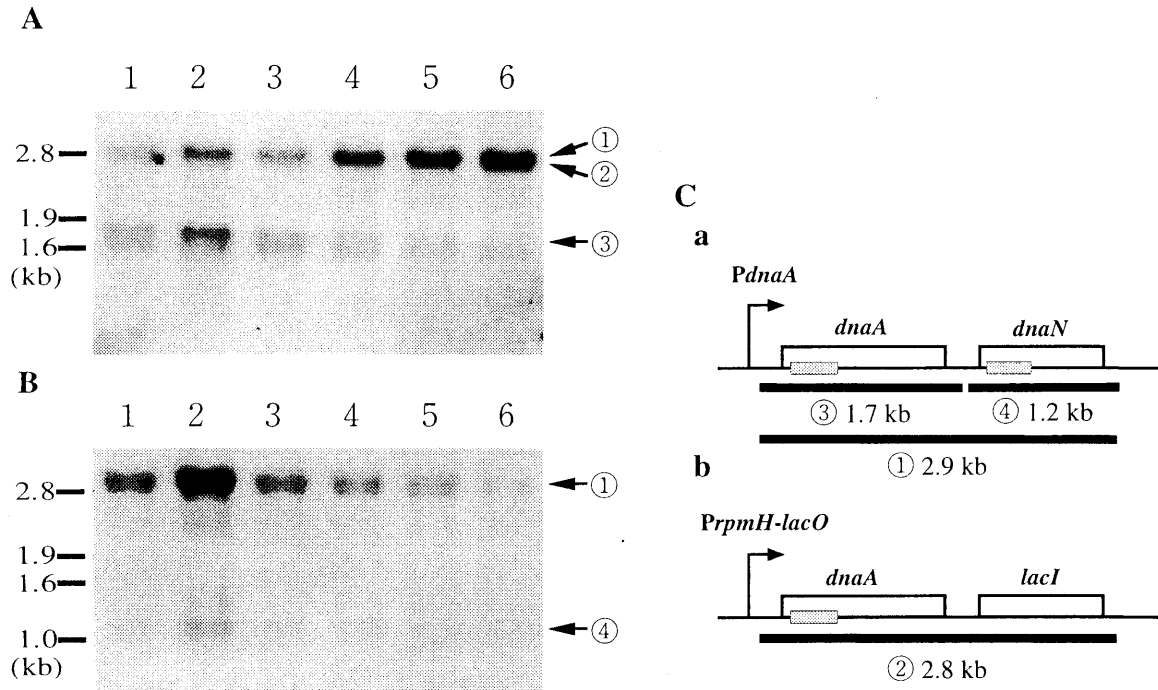


図6. DnaA 過剰発現株と *dnaA* 欠失株を用いた *dnaA-dnaN* オペロンの転写解析

A, B にはそれぞれ *dnaA* 及び *dnaN* プローブを用いて得られたノーザンハイブリダイゼーションの結果を示した。矢印は検出されたバンドを示し、その番号は C, D の模式図に示した予想転写物の番号と一致している。レーン 1: 野生株、レーン 2: *dnaA* 欠失株、レーン 3-6: 0, 5, 10, 20 μ M IPTG 存在下で培養した DnaA 過剰発現株

C - a, b にはそれぞれ *oriC* 領域、DnaA 過剰発現株の *purA* 領域の遺伝子構成を示した。また、予想される転写物とその長さそれぞれの遺伝子構成の下に示した。使用したプローブの位置は灰色の太線で示されている。

c. DnaA-DnaN 過剰発現株の作製

dnaA と *dnaN* の発現を同時に制御できる菌株を作成するためのプラスミド pSM 5100 を作成した。このプラスミドは、DnaA 過剰発現株の *purA* 領域に組み込まれた *PrpmH-lacO* の制御下にある *dnaA* の下流に、さらに *dnaN* を挿入することを

目的として、*dnaA* の *Sal*I 切断部位から下流の領域、*dnaN* 全長、*tet^r* (枯草菌での選択マーカーであるテトラサイクリン耐性遺伝子) を持っている (図 7-A)。このプラスミドを用いて DnaA 過剰発現株を形質転換し、*purA* 領域の *dnaA* 下流に *dnaN* を導入した (図 7-A)。このプラスミドは *purA* 領域の *dnaA* 以外に、*oriC* 領域の *dnaA-dnaN* オペロン部位でも組換えを起こす可能性があるが、*oriC* 領域で組換えを起こした形質転換体は IPTG 添加に伴い複製伸長阻害が生じ、生育できない。そこで、形質転換体の選択は 10 µg/ml のテトラサイクリンと 50 µM IPTG を含む培地で行った。得られた形質転換体で目的の位置にプラスミドが挿入されていることを PCR で確認した (結果は記載しない)。

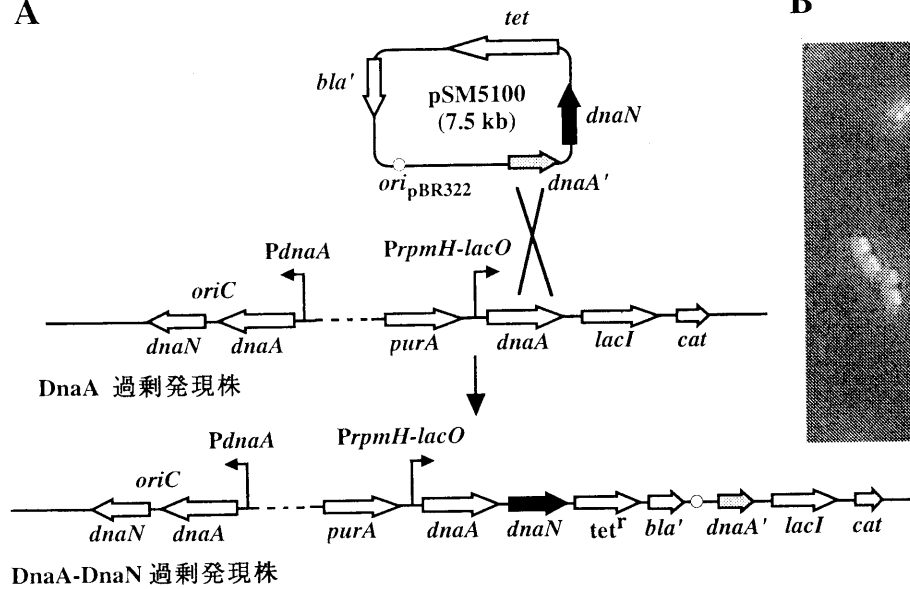
d. DnaA-DnaN 過剰発現株の細胞形態の観察

DnaA 過剰発現株では DnaA 量の増加に伴い複製伸長阻害が生じ、増殖速度が低下していた。ところが、本研究で作成した DnaA-DnaN 過剰発現株では、DnaA 量を増加させてもその増殖速度は低下せず、野生株と同じであった。このことは DnaA-DnaN 過剰発現株では複製伸長阻害が起きていないことを示唆している。複製伸長阻害が起きると細胞は伸長するので、DnaA-DnaN 過剰発現株でこの阻害が起きていないことを確認するために、この細胞を DAPI 染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、DnaA 過剰発現株では 20 µM IPTG を含む培地ですると細胞が伸長していたのに対し (図 5-C)、DnaA-DnaN 過剰発現株では同量の IPTG を添加しても細胞の伸長は観察されず、核様体の分布も正常であった (図 7-B)。これらのことから、DnaN の供給により、DnaA 過剰発現に伴う複製伸長阻害は取り省かれることがわかった。

e. DnaA 量の変化が複製開始に及ぼす影響

これまでの解析から、DnaA-DnaN 過剰発現株では DnaA 量を増加させても複製伸長阻害は起こらないことがわかり、この株を用いることによって、複製開始における DnaA 過剰発現の影響を正確に解析することが可能となった。しかし、この株では、発現制御可能な *purA* 領域 (*PrpmH-lacO* 制御下) の *dnaA* と本来の位置 (*oriC* 領域) の *dnaA* が共存しているため、DnaA 量が減少した場合の影響を解析することができない。そこで、本来の位置の *dnaA* にオーカー変異を導入し (5 番目のアミノ酸をコードするコドンにオーカーに代えた)、*dnaA* の発現が完全に *PrpmH-lacO* で支配される菌株を作製した。 (図 8-A)。ところが、この株を IPTG を含まない培地で培養すると野生株と同じ速度で増殖した。このときの DnaA をウエスタ

A



B

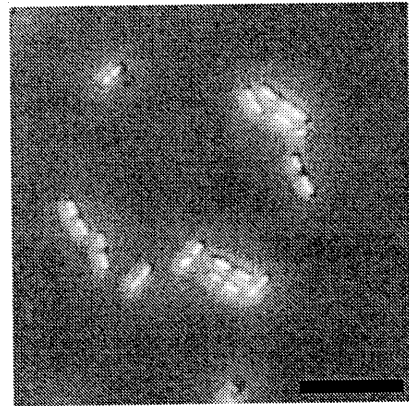


図7. DnaA-DnaN 過剰発現株の作製とその細胞形態と核様体の分布

A: DnaA-DnaN 過剰発現株作製模式図

pSM5100をDnaA過剰発現株の*purA*領域に存在する*dnaA* (*Sal*I切断部位下流)に1重交差で組み込んだ。形質転換体はテトラサイクリンと50 μ M IPTG (*oriC*領域への組み込みは生育できない)を含む培地で選択した。

pSM5100: pBR322に*dnaA*遺伝子の*Sal*I切断部位から下流の領域、*dnaN*遺伝子全長、*tet^r* (枯草菌での選択マーカーであるテトラサイクリン耐性遺伝子)が図に示すように挿入されている。

bla: アンピシリン耐性遺伝子、*cat*: クロラムフェニコール耐性遺伝子、*lacI*: 大腸菌由来 lac オペロンのDNA結合型転写抑制蛋白質をコードする遺伝子

B: 蛍光顕微鏡下で観察したDnaA-DnaN過剰発現株の細胞のDAPI像

20 μ M IPTGを含むPAB培地でO.D.(600)=0.2まで培養したDnaA-DnaN過剰発現株の細胞をエタノールで固定後、DAPI染色し、蛍光顕微鏡で観察した。図中のバーは10 μ mのスケールを表す。

ンブロット法で検出し、そのシグナル強度をNIH imageで定量した結果、DnaA量は野生株の約20%であった(図8-B)。これは、IPTGを含まない培地でも、LacIリプレッサーによる抑制が不十分であるため、*purA*領域のプロモーターからの漏れで*dnaA*が発現しているからであると考えられる。

野生株とDnaA-DnaN過剰発現株(IPTGを0-100 μ Mの範囲で培地に添加)をPAB培地(富栄養培地)で対数増殖期まで培養し、タンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコールを添加(新規の複製開始を阻害)し、さらに5時間培養(進行中の複製が終了)した細胞の細胞内DNA量(細胞内*oriC*数に相当)をフローサイトメーターにより測定した。クロラムフェニコールの添加により、新たな複製開始は阻害されるが、複製伸長は継続する。この薬剤の存在下で培養することによ

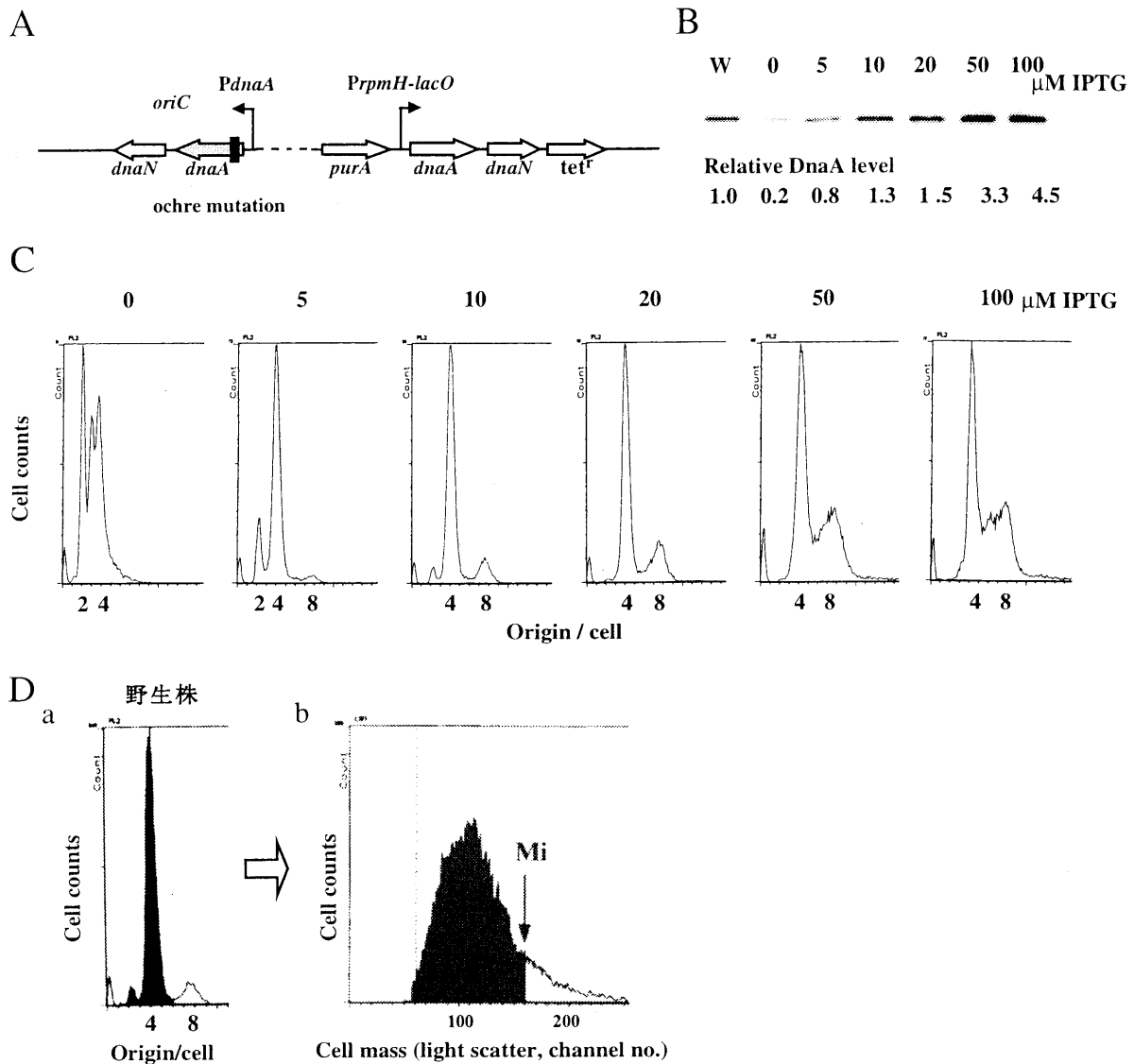


図8. *oriC* 領域の *dnaA* にオーカー変異を導入した DnaA-DnaN 過剰発現株の構造、及び、DnaA 発現量と複製開始の解析

A: *oriC* 領域の *dnaA* にオーカー変異を導入した DnaA-DnaN 過剰発現株の構造

B: DnaA 発現量のウエスタンブロット法による解析

各バンドのシグナル強度を NIH image で定量し、野生株との相対値で表した。IPTG 濃度が高いサンプルはシグナル強度が高く検量線が直線にならないため、実際の定量には希釈したサンプルを用いた。

C: DnaA-DnaN 過剰発現株のフローサイトメトリー

PAB 培地で増殖している対数増殖期の培養にクロラムフェニコールを添加し、さらに5時間培養した細胞を解析した。

D: 野生株のフローサイトメトリーと開始質量の計測方法

a: クロラムフェニコール処理後の細胞の DNA histogram. b: 対数増殖期の細胞の Light scatter histogram.

開始質量の計測方法を野生株の例で以下に示す。まず、DNA histogram から黒で示した4つの複製起点を持つ細胞（複製開始前の細胞）と白で示した8つの複製起点を持つ細胞（複製開始後の細胞）の比を求め、その値を元に Light scatter histogram から複製開始が起こる細胞質量(Mi: cell mass at initiation)を求める。その値を複製開始前の細胞に存在する *oriC* 数、この場合は4、で割った値が開始質量（複製開始が起こる *oriC* 数あたりの細胞質量）である。

り、複製は最後まで進行し、フローサイトメーターでこの細胞のDNA量を測定するとそれは細胞内に存在する染色体数を計測することになる。また、この染色体数は、クロラムフェニコール添加時に存在した複製開始点数に合致する。この原理で、細胞内*oriC*数を測定することができる。フローサイトメトリーの結果、野生株では、大部分が4個の*oriC*を持つ細胞（複製開始前の細胞）で、一部が8個の*oriC*を持つ細胞（複製開始後の細胞）であることがわかった（図8-D）。複製開始後の細胞数がかなり少ないことから、複製は細胞分裂の直前に開始していることがわかる。

一方、IPTGを含まない培地で培養したDnaA-DnaN過剰発現株には、*oriC*を2個持つ細胞、3個持つ細胞、そして4個持つ細胞の3種類が混在していた（図8-C）。このことから、この条件下では、複製開始の同調性（細胞内に複数個存在する*oriC*が同時に複製を始める現象）が失われ、細胞内に開始が遅れた*oriC*が存在すると思われる。このような場合、正確な開始質量を求めることができないので、細胞あたりの平均の*oriC*数と平均の細胞長を算出し、それらの値から*oriC*あたりの細胞質量（Mass/origin）を計算した。その結果、DnaA量が野生株の20%に減少するとMass/originは野生株に比べ約30%上昇し、全体として複製開始時期が遅くなることがわかった（表4）。増殖速度や細胞長が変化すると、フローサイトメトリーのパターンも変化するが、表4に示すようにこの培養条件では増殖速度も細胞長も野生株とほぼ同じであった。5あるいは10 μM IPTGを加えたときには、DnaA量が野生株のそれぞれ約80%と約130%で、（図8-B）開始質量も野生株とほぼ等しかった（図8-C）。これらの結果から、複製開始の同調性の維持や、正しい時期に複製が開始されるためには、野生株レベルのDnaA量があれば十分であり、DnaAによる転写制御は必要でないことがわかった。

20 μM IPTG存在下では、DnaA量は野生株の約1.5倍になり、*oriC*を8個持つ細胞の割合が少し上昇し、開始質量が野生株に比べ約10%減少した（図8-B, C, 表4）。DnaA量が約3.3倍増加すると（50 μM IPTGの添加）、さらに*oriC*を8個持つ細胞の割合が上昇し、Mass/originが野生株に比べ約15%減少し（図8-B, C, 表4）、全体的に複製開始時期が早くなっていることがわかった。このとき、*oriC*を5~7個持つと思われる細胞も検出された（図8-C）。これは、クロラムフェニコール存在下での培養で複製が終了していないために、本来は8個の*oriC*を持つ細胞であるにも関わらず、そのDNA量が少ないためにこの位置に検出された可能性も考えられた。しかし、サザンブロット法で同じサンプルの*oriC*と*terC*の比率を調べたところ、その量比はほぼ1であった（結果は記載しない）。従って、*oriC*を5~

7個持つ細胞に相当するピークの存在は、複製伸長阻害が原因ではなく、開始の同調性が乱れ、細胞内で開始を早めた *oriC* が存在するためであると考えられる。DnaA 量をさらに増加 (100 μ M IPTG の添加) させても、Mass / origin はそれ以上減少しなかった (図 8-B, 表 4)。また、100 μ M 以上の IPTG を添加しても DnaA 量はそれ以上増加しなかった。

以上の結果より、枯草菌でも、DnaA 量の増加と共に、Mass / origin が 15% まで減少し、複製開始時期が早まることがわかった。また、DnaA 量が野生株より低下すると、複製開始時期が遅くなったことから、複製開始時期は DnaA 量によって規定されている可能性が示唆された。しかしながら、枯草菌では、*dnaA* の転写が複製開始後の一定期間しか起こらない (I-2-c 参照) ことから、大腸菌で提示されている Initiator titration model (I-2-d 参照) は考えにくい。加えて、*dnaB* の温度感受性変異株では、非許容温度で *dnaA* の転写は起こらないにも関わらず、非許容温度で培養した後、クロラムフェニコールの存在下で許容温度に戻すと、複製は一回だけ開始する (I-2-c 参照)。これらのことから、DnaA は複製開始以前から既に十分量用意されていて、その活性は複製開始時期が来るまで抑制されていると考えられる。その抑制機構の存在のため、DnaA 過剰発現の影響が大腸菌に比べ小さかったと考えられる (大腸菌では Mass / origin が 17-44% まで減少 : Lobner-Olesen *et al.*, 1989 ; Atlung and Hansen, 1993)。これらのことから、本研究による DnaA 過剰発現の効果はその抑制機構とのバランスが乱れたためではないかと思われた。

表4. 野生株と種々の濃度の IPTG 存在下で培養した DnaA-DnaN 過剰発現株の世代時間、平均の細胞長、開始質量、Mass / origin

菌株と添加した IPTG 濃度 (μM)	世代時間 (分)	平均の細胞長 (相対値)	開始質量 (相対値)	Mass / origin (相対値)
野生株	54 \pm 2	1.00	1.00	1.00
DnaA-DnaN 過剰発現株				
0	58 \pm 2	0.98 \pm 0.04	-	1.32
5	56 \pm 2	0.94 \pm 0.02	1.01 \pm 0.01	1.07
10	56 \pm 1	1.01 \pm 0.06	0.98 \pm 0.05	1.01
20	58 \pm 4	1.06 \pm 0.01	0.90 \pm 0	0.94
50	57 \pm 1	1.07 \pm 0.03	-	0.85
100	56 \pm 2	1.14 \pm 0.05	-	0.89

すべての値は PAB 培地、30 °C で培養したサンプルから求めた。平均の細胞長は対数増殖期の細胞の Light scatter histogram から求め、3 回の実験の平均で表した。開始質量は図 8-D に示した方法により求め、3 回の実験の平均で表した。- は開始の同調性が乱れているため計算を行っていないことを示す。Mass / origin は平均の細胞長と対数増殖期の細胞をクロラムフェニコールで 5 時間処理した細胞の DNA histogram から求めた細胞あたりの *oriC* 数の平均値を元に計算し、3 回の実験で得た値の平均値を野生株との相対値で表した。

2. DnaA と相互作用する YabA の機能解析

a. 酵母 2 ハイブリッド法による DnaA、DnaN と YabA の相互作用解析

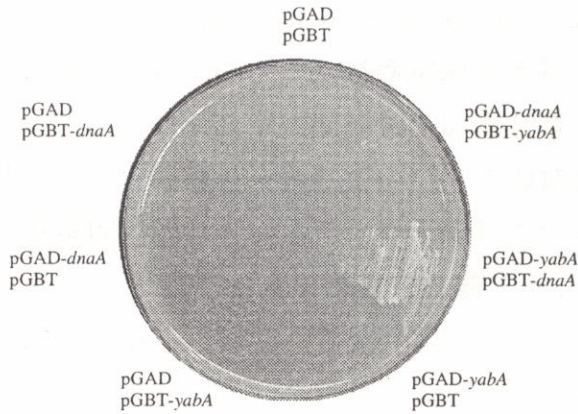
最近、フランスの Ehrlich らの研究グループにより、枯草菌の染色体複製に関するタンパク質と相互作用するタンパク質が、酵母 2 ハイブリッド法を用いた網羅的な解析によりスクリーニングされた。その結果、YabA が DnaA と DnaN の両方と相互作用することが示唆された。この解析には、枯草菌ゲノム DNA をランダムに切断し、その断片を GAL4 転写活性化ドメインと結合させたライブラリーが用いられていた。そこで、まず、Ehrlich らの結果を再確認するために、*yabA* 全長を GAL4 転写活性化ドメインあるいは GAL4 DNA 結合ドメインと融合させ、YabA と DnaA、YabA と DnaN の相互作用を調べた。

酵母 2 ハイブリッド法では、転写因子 Gal4 が DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインの 2 つのドメインで分断され、それぞれが大腸菌と酵母の両方で複製可能な pGBT9 と pGAD424 上にコードされている。それぞれのプラスミドに目的遺伝子をクローニングすることにより、各ドメインと融合したタンパク質を酵母細胞内で発現させることが可能である。DNA 結合ドメインと融合させたタンパク質と転写活性化ドメインと融合させたタンパク質とが酵母細胞内で相互作用すると、Gal4 の両方のドメインが接近し、転写因子としての活性が回復する。そして、Gal4 プロモーターの下流にコードされたレポーター遺伝子の発現を指標に目的蛋白質間の相互作用を評価することが可能である。本研究で用いたシステムではレポーター遺伝子としてアデニンとヒスチジン合成系の遺伝子が使用されている。

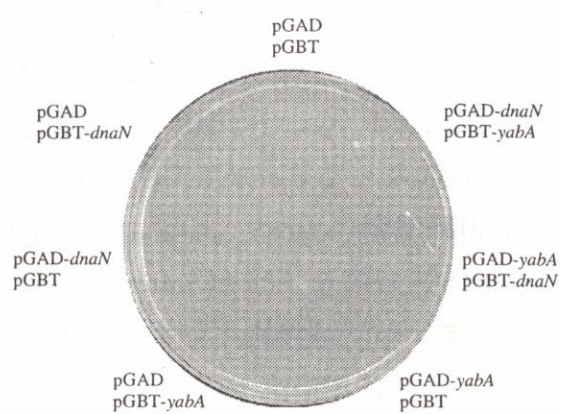
酵母 2 ハイブリッド法で用いるプラスミド pGBT9 (Gal4 DNA 結合ドメインと選択マーカーとしてトリプトファン合成系の遺伝子を持つ) と pGAD424 (Gal4 転写活性化ドメインと選択マーカーとしてロイシン合成系の遺伝子を持つ) に *dnaA* をクローニングしたプラスミドはすでに当研究室で作成されていたので、*yabA* と *dnaN* をそれぞれのプラスミドへクローニングした。各組み合わせのプラスミドで酵母 AH109 株を形質転換し、トリプトファンとロイシンを含まない SD 寒天培地で形質転換体を選択した。得られた形質転換体を 5 mM の 3AT (ヒスチジンの競合阻害剤) を加え、トリプトファン、ロイシン、アデニン、ヒスチジンを含まない SD 寒天培地で培養し、その増殖能を指標に 2 つのタンパク質間の相互作用を評価した。その結果、コントロールとして用いた片方のプラスミドにのみインサートを持つ組み合わせでは、いずれも 4 日間の培養でコロニーは形成されなかった (図 9)。一方、YabA と DnaA の組み合わせでは 2 日後に、YabA と DnaN の組み合わせでも 4

培養 2 日後

DnaA vs YabA



DnaN vs YabA



培養 4 日後

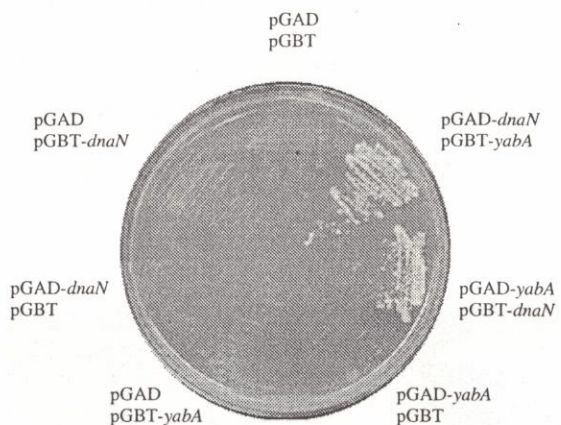
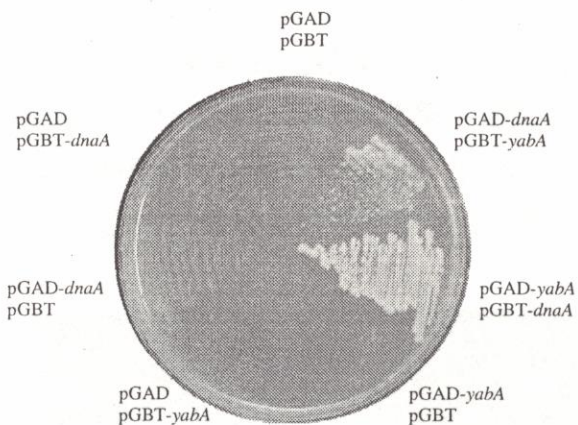


図 9. 酵母 2 ハイブリッド法による YabA と DnaA, DnaN との相互作用解析
各組み合わせのプラスミドで形質転換した酵母を SD 寒天培地 (-leu, -trp, -ade, -his, +5mM 3AT) 上で 30℃、2 日間 (上) と 4 日間 (下) 培養した。

日後にコロニーの形成が確認された (図 9)。また、融合する GAL4 ドメインを交換しても、同じ結果が得られた (例えば、pGAD-*dnaA*、pGBT-*yabA* の組み合わせと pGAD-*yabA*、pGBT-*dnaA* の組み合わせ)。これらのことから、YabA は確かに、DnaA、DnaN と相互作用することが酵母 2 ハイブリッド法を用いて明らかにされた。

b. *yabA* 破壊株の作製と蛍光顕微鏡による細胞形態と核様体の観察

YabA は DnaA、DnaN と相互作用することから、染色体複製に関与すると考

えられるが、その機能は明らかになっていなかった。細菌における YabA の保存性を探るために相同性検索を行った結果、YabA が保存されているのは、*Listeria monocytogenes*、*Listeria innocua*、*Bacillus halodurans*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*S. pyogenes*、*Lactococcus lactis* で、いずれも枯草菌と比較的近縁の Low GC グラム陽性細菌であり、枯草菌の複製開始に必須で、DNA ヘリケースのローディングに関与していると考えられている DnaB、DnaD、DnaI が保存されている生物種と一致していた。この結果は、YabA も DNA ヘリケースのローディング過程で働いていることを示唆しているのかもしれない。YabA の機能解析を行うために、まず、*yabA* 破壊株を作製することにした。*yabA* は 259 bp の比較的小さい遺伝子であったので、2重交差によってスペクチノマイシン耐性遺伝子で置き換えることにより、その全長を欠失させた（表 1）。*yabA* 下流に存在する遺伝子の発現はスペクチノマイシン耐性遺伝子のプロモーターによって保証されている。*yabA* 破壊株を PAB 培地で培養したところ、その生育速度は野生株とほぼ同じであった（結果は記載しない）。このときの細胞を DAPI 染色し、細胞形態と核様体の分布を蛍光顕微鏡下で観察した結果、野生株に比べ細胞長が長くなった細胞や 2 つの核様体がつながったような細胞が数多く見受けられた（図 10: 矢印）。伸長した細胞では複製開始の解析が難しくなることや、YabA 蛋白量の減少に伴う変化をより詳細に解析するために、*yabA* 発現制御株を作製した。

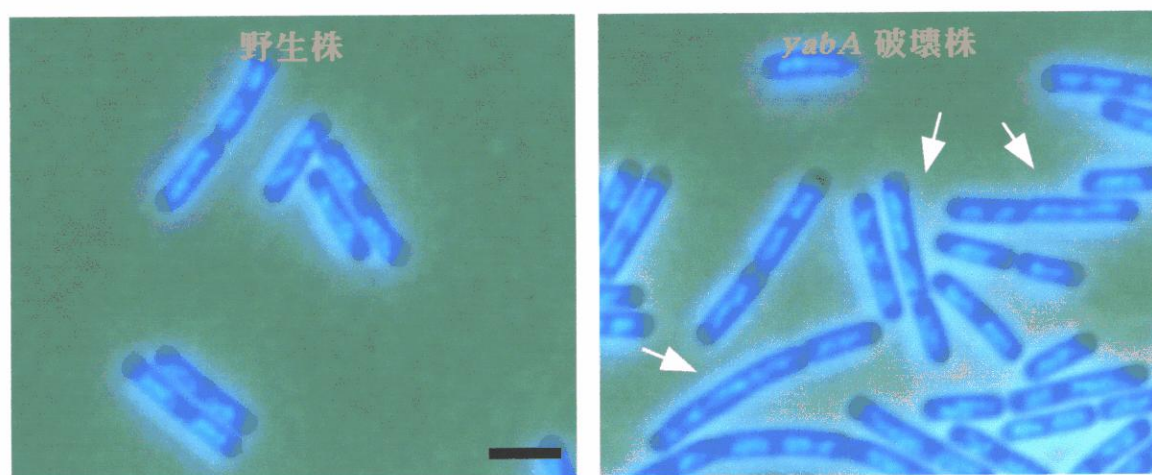


図 10. *yabA* 破壊株の細胞形態と核様態の分布
PAB 培地で培養した対数増殖期の野生株と *yabA* 破壊株の細胞をエタノールで固定後、DAPI 染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。図中のバーは 2 μ M のスケールを表す

c. *yabA* 発現制御株の作製とその解析

yabA 発現制御株は、*yabA* 破壊株の *amyE* 領域に IPTG で発現が制御できる *Pspac* プロモーターを *yabA* 全長と連結して組み込むことによって作製した（表 1、

図 1 1-A)。 *yabA* 発現制御株の解析には、フマル酸を炭素源とする最小培地を用いて行った。0 - 100 μ M IPTG を添加して 30 $^{\circ}$ C で培養した *yabA* 発現制御株の倍加時間は、いずれも野生株の 74 分とほぼ等しかった。これらの細胞を DAPI 染色し、細胞形態と核様態の分布を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、IPTG を含まない培地で培養すると、*yabA* 破壊株と同様に (図 1 0: 矢印)、細胞が伸長し (平均の細胞長が野生株の 1.24 倍: 表 5)、2 つの核様体がつながった細胞が多数観察された

(図 1 1-B)。10 μ M IPTG を添加しても、細胞長は野生株とほぼ等しかったが (表 5)、2 つの核様体がつながった細胞は観察された。それに対して、20 μ M IPTG 存在下では、細胞長、細胞形態、核様体の分布はいずれも正常であった (表 5、図 1 1-B)。これらのことから、IPTG 濃度を 20 μ M までの範囲で低下させることにより、細胞分裂や核様体の分布への影響がない条件下で、YabA 量の減少が複製開始におよぼす影響を解析することが可能であると考えられた。

野生株の細胞をフローサイトメーターで解析したところ、この最少培地で培養した場合には、大部分が 2 個の *oriC* を持つ細胞 (複製開始前の細胞) で一部が 4 個の *oriC* を持つ細胞 (複製開始後の細胞) であった (図 1 1-C)。このことから、複製は細胞分裂周期の後期に開始していることがわかる。*yabA* 発現制御株では、100 μ M IPTG を添加したとき、4 個の *oriC* を持つ細胞の割合が野生株よりわずかに減少し (図 1 1-C)、Mass / origin が野生株に比べて 9 % 増加した (表 5)。20 - 50 μ M IPTG 存在下では IPTG 量の減少に伴って、4 個の *oriC* を持つ細胞の割合が上昇し (図 1 1-C)、Mass / origin は野生株に比べて 15 % まで減少した。これらの条件下では、複製開始の同調性の乱れにより生じる *oriC* を奇数個持つ細胞や、2 回以上の連続した複製開始により生じる *oriC* を 5 個以上持つ細胞もほとんど検出されなかった。複製開始の同調性が維持されながら複製開始後の細胞数の割合が対数増殖期細胞集団中で増加することから、YabA 量 (*yabA* 発現量) の低下により複製開始時期が早くなっていることがわかる。20 μ M IPTG 以上では、増殖速度や細胞長にも変化が見られず、フローサイトメトリーにおけるこの変化は増殖速度や細胞長の変化に起因したものではない。これらのことから、YabA は DnaA の活性を制御し、複製開始を抑制している可能性が考えられた。また、IPTG を含まない培地で培養したときは、細胞が伸長し、核様体の分布にも異常が生じていた。この影響は複製開始時期が通常より早まりすぎたことによる 2 次的な影響で、細胞分裂や染色体分配などの細胞周期に影響した可能性が考えられる。

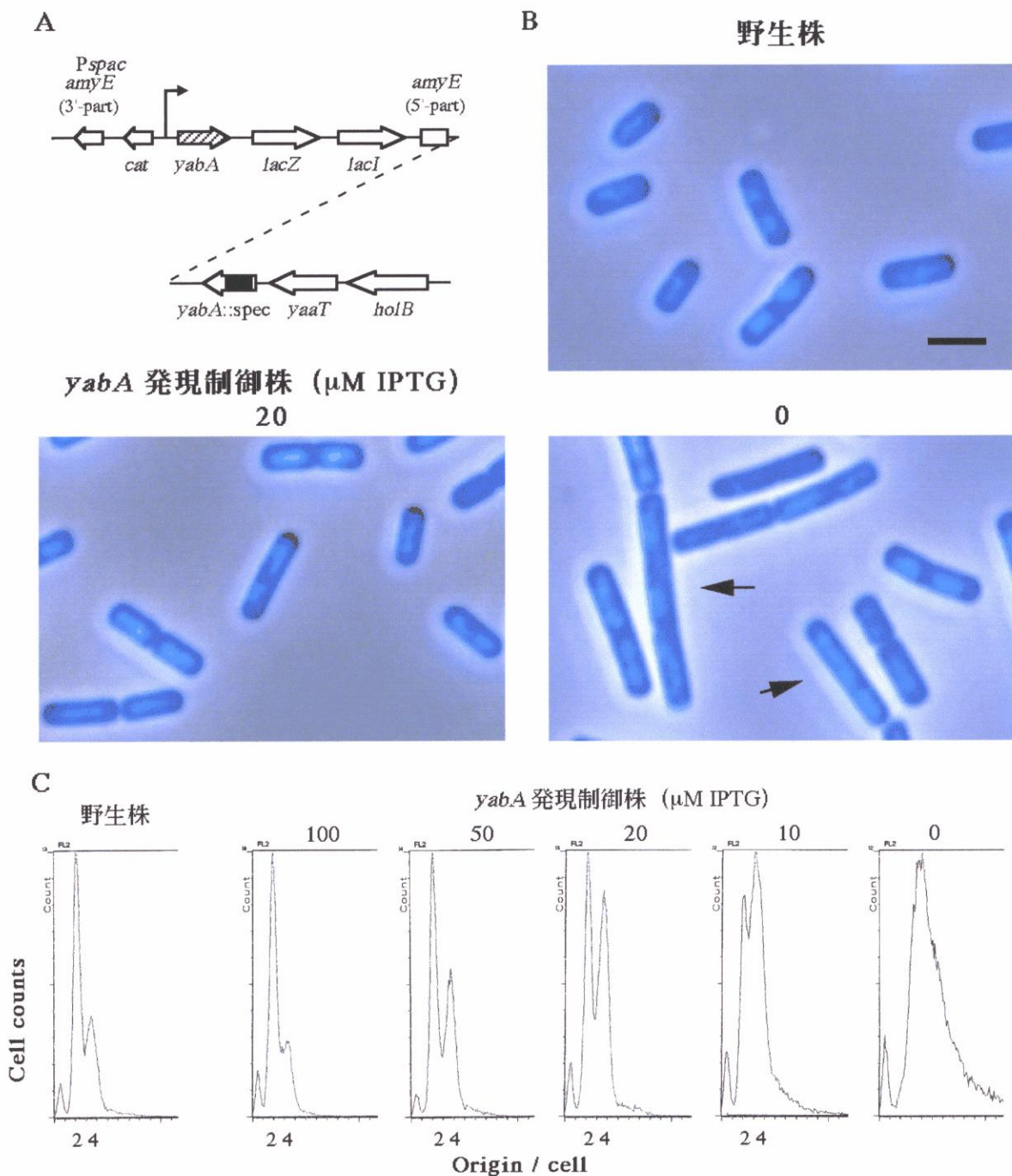


図1 1. *yabA* 発現制御株の構造と、種々の濃度の IPTG を含む培地で培養した *yabA* 発現制御細胞のフローサイトメトリー

A: *yabA* 発現制御株の構造

spec: スペクチノマイシン耐性遺伝子、*cat*: クロラムフェニコール耐性遺伝子、*lacZ*: β-ガラクトシダーゼ遺伝子、*lacI*: 大腸菌由来 *lac* オペロンの DNA 結合型転写抑制蛋白質をコードする遺伝子

B: 蛍光顕微鏡下で観察した野生株と *yabA* 発現制御株の細胞の DAPI 像

野生株と *yabA* 発現制御株 (20 μM IPTG の添加、あるいは添加しない) *S*₇₅₀-フマル酸培地で O.D.(600) = 0.2 まで培養した *DnaA-DnaN* 過剰発現株の細胞をエタノールで固定後、DAPI 染色し、蛍光顕微鏡で観察した。図中のバーは 2 μm のスケールを表す。

C: 野生株と *yabA* 発現制御株のフローサイトメトリー

30 °C、*S*₇₅₀-フマル酸培地で増殖している対数増殖期の培養にクロラムフェニコールを添加し、さらに 5 時間培養した細胞を用いた。

表 5 野生株と各 IPTG 濃度の培地で培養した *yabA* 発現制御株の世代時間、細胞長と細胞分裂から複製開始までの時間

菌株と添加した IPTG 濃度 (μM)	平均の細胞長 (相対値)	細胞あたりの 平均の <i>oriC</i> 数	Mass / origin (相対値)
野生株	1.00	2.7	1.00
<i>yabA</i> 発現制御株			
100	1.01	2.5	1.09
50	1.02	2.9	0.95
20	0.97	3.1	0.85
10	0.97	-	-
0	1.24	-	-

細胞長は、Mac SCOPE ver 2.58 (MITANI) をもちいて 300 個 DAPI 染色した細胞の長さを計測し、その平均値を野生株の平均細胞長に対する相対値で表した。細胞あたりの平均の *oriC* 数は図 10 の DNA histogram から求め、3 回の実験で得た値の平均値を示した。Mass / origin は平均の細胞長と、細胞あたりの平均の *oriC* 数の値より算出し、野生株に対する相対値で表した。

3. Soj-Spo0J システムによる複製開始制御

a. *spo0J-gfp* 株と *spo0J* 破壊株の解析

Soj と Spo0J は枯草菌の孢子形成の初期段階で機能していることが既に報告されている。Spo0J は染色体 DNA の *oriC* 領域を細胞極近くへ配向させ (Sharpe and Errington., 1996)、Soj は孢子形成の初期に発現する遺伝子群の転写を負に制御している。Soj のこの転写制御活性はまた Spo0J により抑制されている (Quisel and Grossman., 2000)。一方で、これら 2 つの遺伝子はオペロンを構成し、対数増殖期でも発現している。また、これら Soj と Spo0J はそれぞれ大腸菌低コピー数プラスミドの分配に必須な ParA と ParB のファミリーに属し、このことから両タンパク質は対数期の細胞の染色体分配にも関与していると考えられている。しかし、*spo0J* 破壊株において数パーセントの無核細胞が放出されるという報告 (Ireton *et al.*, 1994) があるものの、現実にはこれらのタンパク質が対数期の染色体分配に直接関与していることを示す明確な実験データは今のところ報告されていない。両タンパク質はプラスミド以外に、腸内細菌を除く、孢子を形成しない多くの細菌でも保存されていることから、対数期において重要な働きをしている可能性が考えられる。カウロバクターにおいては Soj と Spo0J のホモログの両方が細胞増殖に必須で (Mohl and Guber, 1997)、これらが細胞分裂に関与していることを示唆する結果が報告されている (Mohl *et al.*, 2001)。

枯草菌では、Spo0J は染色体 DNA 上で *oriC* を中心とした約 20% の領域に点在する 8 カ所の結合配列に結合する (Lin and Grossman., 1998)。細胞内での Spo0J-GFP の Foci の数とその挙動は *oriC* のそれと一致していることから (Lewis and Errington., 1997)、Spo0J は *oriC* の位置を知るためのマーカーとしてよく用いられる。我々もこの目的で *spo0J-gfp* 融合株を作製したが (図 1 2-A-a)、驚くべきことに、複製開始時期が野生株に比べて早くなっていることがわかった。この細胞をフローサイトメーターを用いて解析すると、野生株に比べて *oriC* を 8 個持つ細胞 (複製開始後の細胞) の割合が増加し (図 1 2-B)、また、Mass / origin も野生株に比べて約 23% 減少した (表 6)。増殖速度、細胞長共に野生株と同一であったことから、この結果は *spo0J-gfp* 株では複製開始時期が野生株よりも早くなっていることを示している。複製開始時期が早くなるとそれと同時に細胞内 DNA 量が増加する。そこで、この株の DNA / protein を求めたところ、フローサイトメーターによる解析結果と一致して、野生株の約 1.2 倍に増加した (表 6)。複製開始時期が早くなったのは GFP との融合によって Spo0J 機能が部分的に欠損したためであると考え

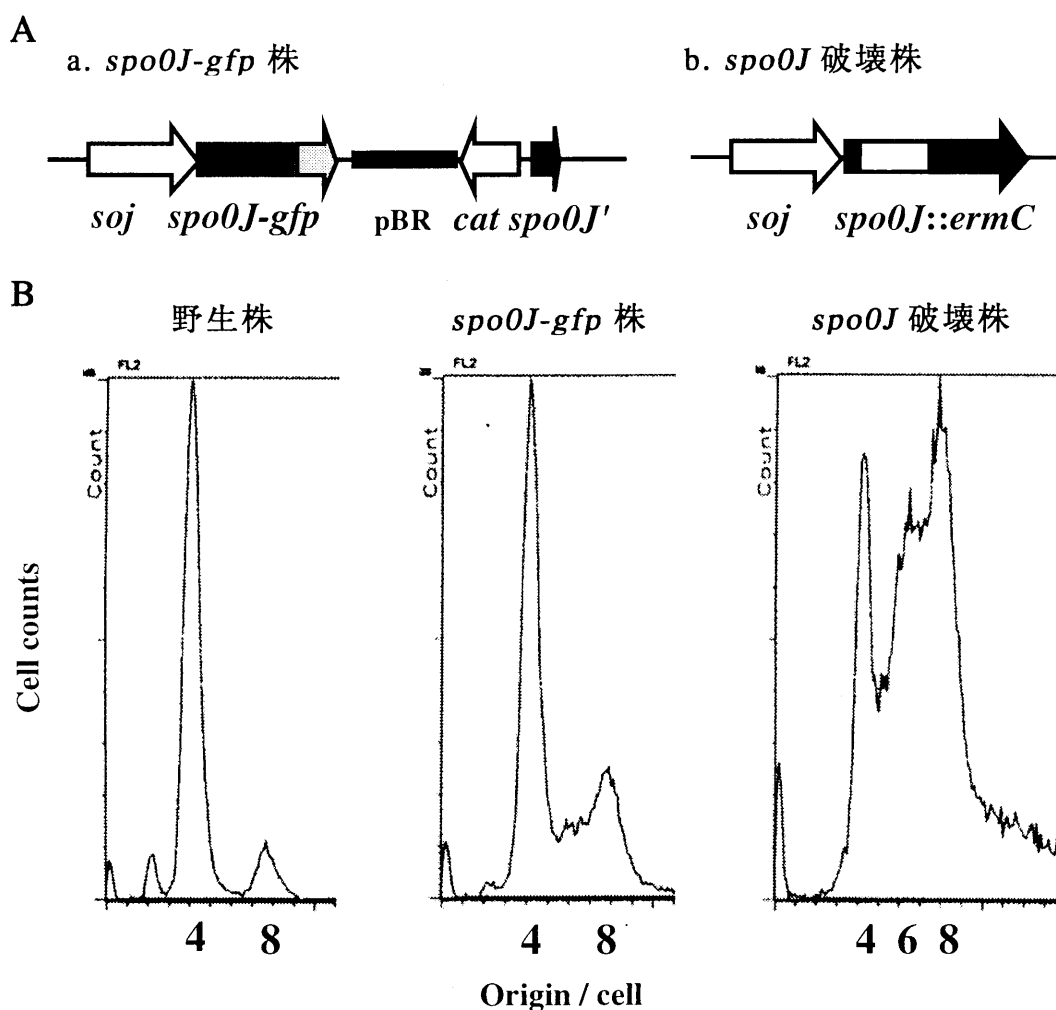


図 1 2. *spo0J-gfp* 株と *spo0J* 破壊株の構造とその細胞のフローサイトメトリー

A: *spo0J-gfp* 株 (a) と *spo0J* 破壊株 (b) の構造

pBR: pBR322 の配列、*cat*: クロラムフェニコール耐性遺伝子、*ermC*: エリスロマイシン耐性遺伝子

B: 野生株、*spo0J-gfp* 株及び *spo0J* 破壊株のフローサイトメトリー

PAB 培地で培養した対数増殖期の培養にクロラムフェニコールを添加し、さらに 5 時間培養した細胞を解析した。

られる。そこで、*spo0J* 欠損に伴うこの影響を確認するために、*spo0J* 破壊株を作製したところ (図 1 2-A-b)、*oriC* を 8 個持つ細胞の割合がさらに増加し (図 1 2-B)、*Mass / origin* が野生株に比べて約 33 % 減少し、*DNA / protein* は野生株の約 1.5 倍に上昇した (表 6)。また、*spo0J* 破壊株では、*spo0J-gfp* 株では見られなかった *oriC* を 6 個持つ細胞のピークが観察されたことから、開始の同調性も乱れていることがわかった (図 1 2-B)。これらのことから、*spo0J* 欠損に伴って複製開始時期が早くなり、開始の同調性も乱れることがわかった。

表 6. 各株の平均の細胞長、細胞あたりの平均の *oriC* 数、Mass / origin、DNA / protein

菌株	平均の細胞長 (相対値)	細胞あたりの 平均の <i>oriC</i> 数	Mass / origin (相対値)	DNA / protein
野生株	1.00	4.5 ± 0.1	1.00	0.041 ± 0.002
<i>spo0J-gfp</i> 株	0.98	5.8 ± 0.2	0.77	0.049 ± 0.001
<i>spo0J</i> 破壊株	1.17	8.0 ± 0.1	0.67	0.060 ± 0.001
<i>soj-spo0J</i> 欠失株	1.03	5.1 ± 0.2	0.92	0.044 ± 0.001
Soj 過剰発現株 (1mM IPTG)	1.16	7.0 ± 0.2	0.75	0.060 ± 0.001
Soj-Spo0J 過剰発現株 (1mM IPTG)	1.20	4.3 ± 0.1	1.27	0.034 ± 0.002

すべての値は PAB 培地、30 °C で培養したサンプルから求めた。細胞長は Mac SCOPE ver 2.58 (MITANI) をもちいて 300 個の細胞の長さを求め、その平均値を野生株との相対値で表した。細胞あたりの平均の *oriC* 数は対数増殖期の細胞をクロラムフェニコールで 5 時間処理した細胞の DNA histogram から求め、3 回の実験で得た値の平均値を表した。Mass / origin は平均の細胞長と細胞あたりの平均の *oriC* 数の値を元に計算し、野生株との相対値で表した。DNA / protein は核酸と Protein は Schneider の方法に従い分画し、DNA と Protein の濃度はそれぞれ Burton's と Lowry's の方法に従って求め、その DNA 濃度の値を Protein 濃度の値で割って求めた。

b. *soj-spo0J* 欠失株、Soj 過剰発現株と Soj-Spo0J 過剰発現株の解析

上述のように Soj と Spo0J は胞子形成に関与し、*spo0J* 破壊株では胞子形成が初期の段階で停止するが、*soj* を同時に破壊すると胞子形成は正常に進行する (Ireton *et al.*, 1994)。複製開始においても、同様の現象が観察される可能性が考えられたので、*soj-spo0J* 破壊株の作製を試みた。*soj* と *spo0J* はオペロンを形成しているので、このオペロンを 2 重交差でテトラサイクリン耐性遺伝子と置き換えることによって欠失させた (表 1)。この株をフローサイトメーターで解析した結果、DNA ヒストグラムのパターンが野生株とほぼ等しくなり (図 1 3-A)、Mass / origin と DNA / Protein も野生株とほぼ等しい値を示した (表 6)。この結果は、

spo0J 破壊による複製開始への効果が失われることを示している。この結果は、また、*Soj* が単独で発現すると複製開始時期が早められることを示唆している。そこで、この可能性を検証するために、*Soj* 過剰発現株を作製し、その過剰発現が複製開始に及ぼす影響を調べた。

Soj 過剰発現株は、*Pspac* プロモーターの下流に *soj* 遺伝子全長を結合して、それを *amyE* 領域に組み込むことにより作製した (表 1)。100 μ M IPTG を加えると、*Soj* 量は野生株の約 3.5 倍に増加し、*oriC* を 8 個持つ細胞の割合が野生株に比べて増加した (図 1 3 - A, B)。1 mM IPTG 存在下では、*Soj* 量は野生株の約 8.8 倍になり、*oriC* を 8 個持つ細胞の割合がさらに上昇すると共に 6 個持つと思われる細胞も多数検出された (図 1 3 - A, B)。このとき、Mass / origin を計算すると野生株に比べて約 25 % 減少し、DNA / protein は野生株の約 1.5 倍に上昇した (表 6)。これらのことから、*soj* が単独で発現したり、過剰発現すると複製開始時期が早まることがわかった。また、*oriC* を 6 個持つと思われる細胞が出現していることから複製開始の同調性も乱れていることがわかる。この結果は、さらに、*Spo0J* が *Soj* の機能を抑制していることを示唆している。そこで、この可能性を検証するために、*Soj* と *Spo0J* の同時過剰発現を行った。*Soj-Spo0J* 過剰発現株は、IPTG の添加で発現が誘導できる *Pspac* プロモーターの下流に *soj-spo0J* オペロン全長を結合して、それを *amyE* 領域に組み込むことにより作製した (表 1)。この株では、1 mM IPTG の添加で *Soj* 量が野生株の約 8.1 倍に、*Spo0J* 量が野生株の約 13.2 倍に上昇した (図 1 3 - B)。この細胞をフローサイトメーターで解析したところ、予想どおり *Soj* 過剰発現による複製開始への効果が失われていた (図 1 3 - A)。そして、*soj* 欠失株では、複製開始に大きな影響はなかった (結果は記載しない)。以上の結果から、*Soj* は複製開始時期を早め、*Spo0J* が *Soj* のその機能を抑制していると考えられた。

また、*Soj-Spo0J* 過剰発現株では、細胞が伸長することにより (平均の細胞長が野生株の約 1.2 倍)、Mass / origin が野生株に比べ約 27 % 増加し (表 6)、複製開始時期が遅くなっていることがわかった。このフローサイトメーターの結果と一致して DNA / protein も野生株に比べて約 20 % 減少した (表 6)。この影響が *Spo0J* 量の増加によって引き起こされている可能性を調べるため、IPTG の添加で発現が誘導できる *Pspac* プロモーターの下流に *spo0J* 遺伝子全長を結合して、それを *amyE* 領域に組み込むことによって、*Spo0J* 過剰発現株を作製した (表 6)。しかし、この株では、1 mM IPTG を含む培地で培養しても *Spo0J* 量は野生株の約 1.6 倍にしか増加しなかった (図 1 4 - B)。*spo0J* は構造遺伝子の N 末端側 5 bp が *soj* 遺伝子と重なっており、この重なりが *spo0J* の翻訳効率を上昇させている可能性が考えられ

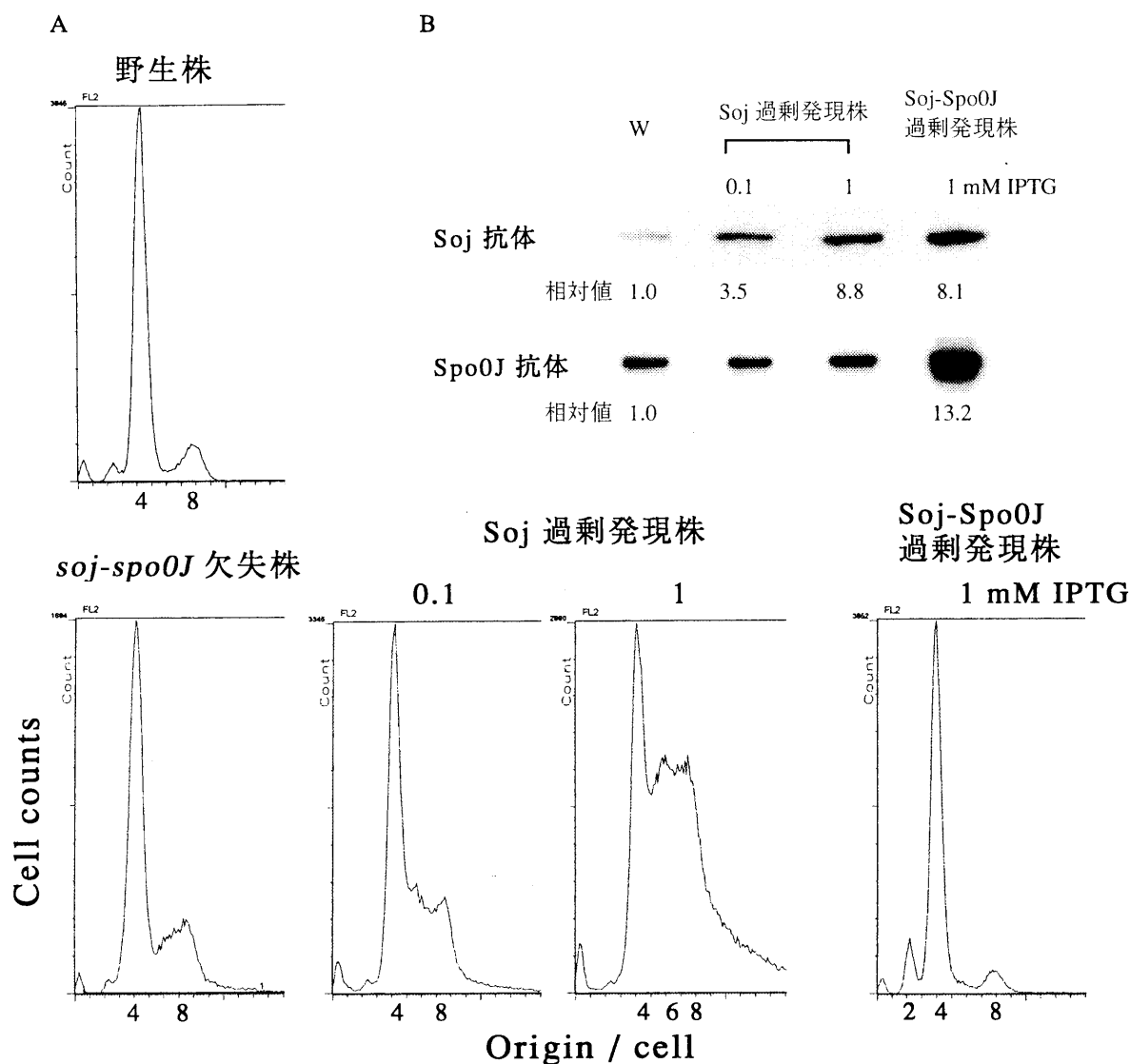


図 14. 野生株、*soj-spo0J* 欠失株、各 IPTG 濃度で培養した Soj 過剰発現株と Soj-Spo0J 過剰発現株のフローサイトメトリーと Soj、Spo0J の発現量

A: 野生株、*soj-spo0J* 欠失株、各 IPTG 濃度で培養した Soj 過剰発現株と Soj-Spo0J 過剰発現株のフローサイトメトリー

PAB 培地で培養した対数増殖期の培養にクロラムフェニコールを添加し、さらに 5 時間培養した細胞を解析した。

B: 各 IPTG 濃度における Soj 過剰発現株と Soj-Spo0J 過剰発現株の Soj、Spo0J 発現量。ウエスタンブロット法により Soj、Spo0J 蛋白質を検出した。各バンドのシグナル強度を NIH image で定量し、野生株との相対値で表した。実際の定量には希釈したサンプルを用いた。

る。これが原因となり、*spo0J* 単独では翻訳効率が低くなり、タンパク質量が思った程増加しなかったと思われる。事実、*soj* 破壊株では Spo0J 量が野生株より減少した (約 1/2)。そこで、*spo0J* の SD 配列を翻訳効率の高い *rpmH* (50S リボゾームを構成するタンパク質の 1 つである L34 をコードする遺伝子) の SD 配列と置き

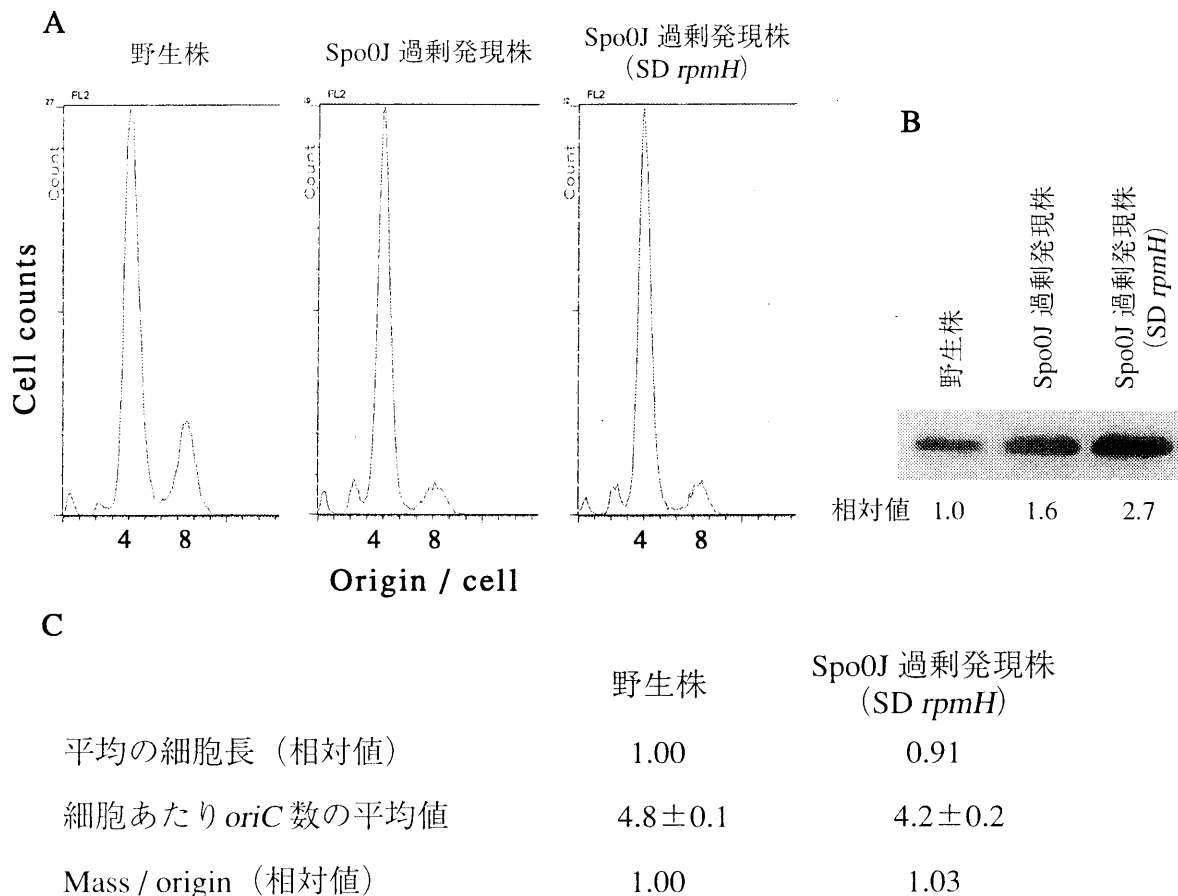


図 1 4. 野生株と 1mM IPTG を含む培地で培養した Spo0J 過剰発現株と Spo0J 過剰発現株 (SD *rpmH*) のフローサイトメーターによる *oriC* 数の測定、Spo0J の発現量、Mass / origin

A: 野生株と 1mM IPTG を含む培地で培養した Spo0J 過剰発現株と Spo0J 過剰発現株 (SD *rpmH*) のフローサイトメトリー

PAB 培地で培養した対数増殖期の培養にクロラムフェニコールを添加し、さらに 5 時間培養した細胞を解析した。

B: 1mM IPTG を含む培地で培養した Spo0J 過剰発現株と Spo0J 過剰発現株 (SD *rpmH*) の Spo0J 発現量

ウエスタンブロット法により Spo0J 蛋白質を検出した。各バンドのシグナル強度を NIHImage で定量し、野生株との相対値で表した。実際の定量には希釈したサンプルを用いた。

C: 野生株と Spo0J 過剰発現株 (SD *rpmH*) の細胞長、細胞あたりの平均の *oriC* 数、Mass / origin 値
細胞長は Mac SCOPE ver 2.58 (MITANI) をもちいて 300 個の細胞の長さを求め、その平均値を野生株との相対値で表した。細胞あたりの平均の *oriC* 数は対数増殖期の細胞をクロラムフェニコールで 5 時間処理した細胞の DNA histogram から求め、3 回の実験で得た値の平均値を表した。Mass / origin は平均の細胞長と細胞あたりの平均の *oriC* 数の値を元に計算し、野生株との相対値で表した。

換えた Spo0J 過剰発現株を作製した。その結果、この方法でも Spo0J 量は野生株の約 2.7 倍までにしか増加せず、フローサイトメーターを用いて解析しても、そのパターンには野生株と大きな違いは見られず、Mass / origin の値も野生株とほぼ等しかった。

た (図 1 4 - A, C) 。これらのことから、遺伝子の重なりによる翻訳効率の上昇に加え、Spo0J タンパク質の効率よい発現を与える何らかの機構が *soj-spo0J* 遺伝子間に存在していると考えられる。また、Spo0J 量が野生株の約 3 倍に上昇しても、その増加は複製開始時期を遅らせることはないということがわかった。これらのことから、Spo0J が 3 倍以上増加したときか、あるいは Soj と Spo0J が同時に過剰発現したときに、複製開始時期が遅くなると考えられた。

c. *soj* と *spo0J* の点突然変異株の解析

Soj は転写因子としての活性を持ち、胞子形成初期に働く遺伝子群の転写を抑制することが知られている (Quisel and Grossman., 2000) 。また、Soj-GFP 融合タンパク質を蛍光顕微鏡下で経時的に観察すると、核様体の両端間を (Marston and Errington., 1999) もしくは、細胞の両極間を (Quisel et al., 1999) 振動するように移動する。このような Soj の細胞内挙動は、*spo0J* 破壊により失われ、その代わり核様体全体に (Marston and Errington., 1999) もしくは、細胞全体に (Quisel et al., 1999) 拡散するように変化する。これらの観察結果と本研究結果 (*spo0J* 破壊で複製開始時期が早まる) を合わせて考えると、Soj の本来の局在能が失われることが、複製開始制御の乱れを生じさせているように考えられる。そこで、その可能性を確認するために、Soj の局在に異常が生じることが報告されている *soj* と *spo0J* の点突然変異株における複製開始を解析した。

soj 点突然変異株として、その ATP 結合部位に変異が導入され、その結果、Soj の局在に異常が生じる 2 株が単離されている (Quisel et al., 1999) 。この内、Soj12 は細胞全体に拡散し、Soj16 は細胞の一方の極に局在するが、移動能を失っている (表 7) 。*spo0J* 点突然変異株では、Soj は核様体全体に拡散する (Autret et al., 2001) 。その内、*spo0J13* 変異株では、Spo0J が細胞全体に小さな Foci として分散するのに対し、*spo0J14* と *spo0J17* 変異株では、Spo0J がその DNA 結合能を失うと共に細胞全体に拡散するようになる (表 7) 。既に報告されているこれらの変異株は、*soj-spo0J* 欠失株の *amyE* 領域に表 7 中に示す各変異を導入した *soj-spo0J* オペロンを組み込むことによって作製し (Soj-Spo0J 過剰発現株の作成と同様の方法)、解析は 50 μ M IPTG を添加して行った。

これらの変異株を PAB 培地で培養し、フローサイトメーターを用いてその複製開始を解析した。その結果、Soj が核様体全体に分散する *spo0J14* 株と *spo0J17* 株では、予想どおり野生型株 (*soj⁺ spo0J⁺* 株) に比べて *oriC* を 8 個持つ細胞の割合が増加し、Mass / origin が野生型株よりそれぞれ 27 % と 36 % 減少した (図 1 5、表

表 7. *soj* と *spo0J* の各変異株の表現系

菌株	変異の種類	核様態の分布	Spo0J の局在	Spo0J の DNA 結合能	Soj の局在
<i>soj</i> ⁺ <i>spo0J</i> ⁺	-	Normal	Normal	+	Normal
<i>soj</i> 12	G12V	ND	ND	ND	Throughout the cell
<i>soj</i> 16	K16Q	ND	ND	ND	Cell pole but no oscillation
<i>spo0J</i> 13	R80A	Abnormal	Fuzzy	+	Nucleoids
<i>spo0J</i> 14	N112A	Abnormal	Diffuse	-	Nucleoids
<i>spo0J</i> 17	E106G	Abnormal	Diffuse	-	Nucleoids

ND は解析が行われていないことを示す。

8)。このことから、これらの株では複製開始時期が早くなっていることがわかった。しかしながら、*spo0J13* 株でも同じように Soj が核様体全体に分散するにも関わらず、そのフローサイトメトリーや Mass / origin の値に野生型株と大きな違いは見られなかった (図 15、表 8)。これらのことから、Soj の細胞内挙動の変化と複製開始制御の乱れには密接な関係はないことが示唆された。また、Soj が細胞全体に分散する *soj12* 株では、*spo0J* 14, 17 株とは逆に、野生型株に比べて *oriC* を 2 個持つ細胞の割合が増加し、Mass / origin が野生型株より 13% 増加した (図 15、表 8)。このことから、この株では複製開始時期が遅くなっていることがわかった。この結果は、さらに、*spo0J* 破壊による複製開始制御の乱れ (複製開始時期が早くなる現象) は、Soj の細胞内挙動の変化によるものではないことを強く示唆している。加えて、*soj16* 株では Soj が細胞の一方の極に局在し、その位置で静止していることから、核様体と交わることはないと思われる。この株では、野生型株に比べて *oriC* を 8 個持つ細胞の割合が増加し、Mass / origin が野生型株より 14% 減少した (図 15、表 8)。これより、この株では複製開始時期が早くなっていることがわかった。この結果も、Soj が核様体と常に交わるように分布することが複製開始時期が早まる原因ではないことを示している。以上の結果から、*spo0J* 破壊で Soj は核様体全体や細胞全体に拡散し、核様体と常に交わるように分布するが、このことが複製開始時期が早まる原因ではないことがわかった。また、Spo0J 14, 17 変異タンパクは DNA 結合能を失い (表 7)、これらの変異を導入した株では複製開始時期が早まっ

たことから、Spo0J による Soj の抑制には DNA 結合能が必要である可能性が示唆された。そして、soj 12 株では複製開始時期が遅くなり、soj 16 株では複製開始時期が早くなった。このことは、Soj が複製開始を正負に制御できる機能を持っている可能性を示唆している。

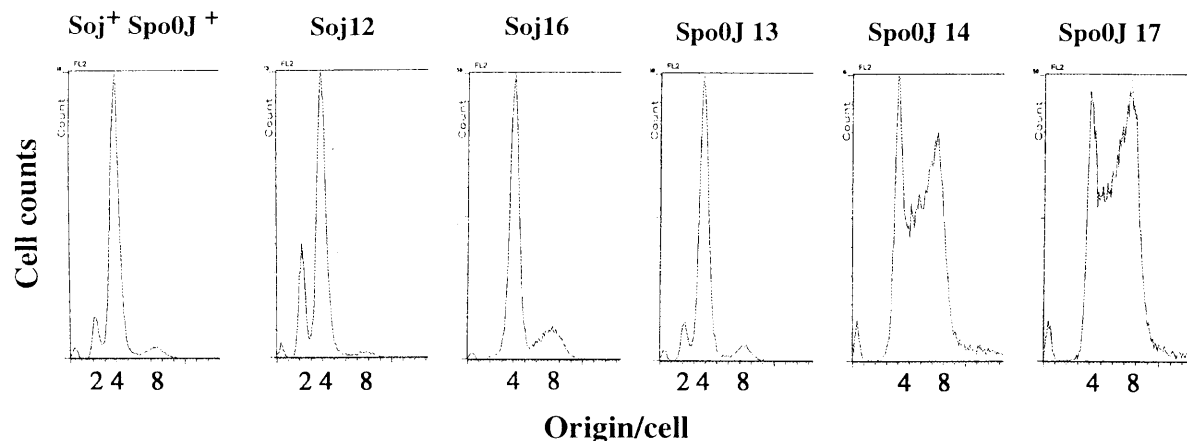


図 15. 各 soj、spo0J 点突然変異株のフローサイトメトリーによる oriC 数の測定
PAB 培地で培養した対数増殖期の培養にクロラムフェニコールを添加し、さらに 5 時間培養した細胞を解析した。

表 8. 各株の平均の細胞長、細胞あたりの oriC 数の平均値、Mass / origin の測定と計算

菌株	平均の細胞長 (相対値)	細胞あたりの 平均の oriC 数	Mass / origin (相対値)
Soj ⁺ Spo0J ⁺	1.00	4.0	1.00
Soj 12	1.07	3.8	1.13
Soj 16	1.01	4.7	0.86
Spo0J 13	0.96	4.1	0.93
Spo0J 14	1.16	6.4	0.73
Spo0J 17	1.02	6.4	0.64

すべての値は PAB 培地、30 °C で培養したサンプルから求めた。細胞長は Mac SCOPE ver 2.58 (MITANI) をもちいて 300 個の細胞の長さを求め、その平均値を野生株との相対値で表した。細胞あたりの平均の oriC 数は対数増殖期の細胞をクロラムフェニコールで 5 時間処理した細胞の DNA histogram から求め、3 回の実験で得た値の平均値を表した。Mass / origin は平均の細胞長と細胞あたりの平均の oriC 数の値を元に計算し、野生株との相対値で表した。

IV 考察

1. *dnaA* - *dnaN* オペロンと DnaA によるそのオペロンの転写制御

大腸菌では、*dnaA* プロモーター領域に DnaA box が存在し、そこに DnaA が結合することによって、*dnaA* の転写が抑制されることが知られている。ストレプトマイセス属においても、*dnaA* プロモーター領域の DnaA box を欠失すると、*dnaA* の転写が増加することから、自己抑制の存在が示唆されている (Jakimowicz *et al.*, 2000)。枯草菌にも、*dnaA* 上流には DnaA box のコンセンサス配列とその 1 塩基違いの配列が 8 個存在する。そこに DnaA が結合することが DNase I footprinting 法で確認されていることから (Fukuoka *et al.*, 1990)、DnaA による自己抑制の存在が予想されていた。そこで、DnaA 過剰発現株と *dnaA* 欠失株を用いて、DnaA 量を変動させ、ノーザンハイブリダイゼーション法により *dnaA* の発現変化を解析したところ、*dnaA* の転写が DnaA により抑制されていることが *in vivo* で初めて確認できた。このように、枯草菌と大腸菌では共に、*dnaA* の転写は自己抑制されていることがわかったが、大腸菌では DnaA box の過剰供給によりこの自己抑制が解除されるのに対し (Hansen *et al.*, 1987)、枯草菌では解除されない (Moriya *et al.*, 1999)。また、枯草菌の *dnaB* 温度感受性変異株を非許容温度で培養し、複製開始を抑制すると *dnaA* は転写されないが、許容温度に戻して、複製を再開させると *dnaA* の転写もそれと同時に起こり始める (Ogasawara *et al.*, 1985b)。これらのことから、枯草菌では *dnaA* プロモーター領域に結合した DnaA は複製が開始するまで、何らかの機構により外れなくなっており、転写は抑制され続けていると考えられる。

一方、本来の位置の *dnaA* にオーカー変異を導入した DnaA-DnaN 過剰発現株では、*dnaA* の発現が *purA* 領域の *PrpmH-lacO* により完全に制御され、DnaA による転写の制御が存在しないにも関わらず、DnaA 量が野生株と等しいときには、複製開始も野生株と変化はなかった。このような現象は大腸菌でも同様に観察されている (Lobner-Olesen *et al.*, 1989)。これらのことから、DnaA による転写の自己抑制は複製開始時期の決定には重要でなく、DnaA 量が一定量以上に増加しないようにするために必要であると思われる。

また、本研究の転写解析では、*dnaA* とその下流に位置する *dnaN* がオペロンを形成していることを明らかにした。*dnaA* 遺伝子内部から *dnaN* 上流領域のプロモーター活性を調べたが、その活性は検出できなかったことから、*dnaN* の転写は *dnaA* プロモーターに完全に依存していると考えられる。*dnaA* と *dnaN* の並びは多くの細菌で保存されており、大腸菌でもこれらの遺伝子がオペロンとなっている (Perez-Roger *et al.*, 1991 ; Quinones and Messer, 1988 ; Sakakibara *et al.*, 1981)。

2. DnaA 過剰発現に伴う複製伸長阻害

本研究から、DnaA を単独で過剰発現すると複製伸長阻害が生じることがわかった。大腸菌でも同様に、DnaA 過剰発現で複製伸長阻害が生じ、*oriC* から 50 kbp 以内の領域で、複製フォークが停止すると示されている (Atlung *et al.*, 1993)。本研究では、DnaN の供給により、DnaA 過剰発現に伴う複製伸長阻害が取り除かれることを明らかにした。大腸菌でも、*dnaA* と *dnaN* がオペロンを形成していることから、複製伸長阻害は DnaN 枯渇が原因である可能性が考えられる。

3. DnaA 量の変動が複製開始に及ぼす影響

これまでに、いくつかのグループが大腸菌を用いて、DnaA 過剰発現が複製開始に及ぼす影響を解析している。Lobner-Olsen らは DnaA 過剰発現により細胞質量あたりの *oriC* 数 (Origin / mass) が野生株に比べ 20 % まで増加 (Mass / origin は 17 % まで減少) すると報告しているが (Lobner-Olsen *et al.*, 1989)、Atlung らは 80 % まで増加 (Mass / origin は 44 % まで減少) すると報告している (Atlung *et al.*, 1993)。このように、DnaA 過剰発現の効果が 2 グループで大きく異なる理由の 1 つとして、Atlung らは DnaA を過剰発現すると複製伸長阻害が生じ、その度合が実験条件により異なるためであると説明している (Atlung *et al.*, 1993)。Xu と Bremer らのグループでは、DnaA 過剰発現で、30 °C では DNA の濃度が 20 % しか増加しないが、42 °C では 2 倍程度まで増加し、温度によって DnaA 過剰発現の効果が大きく異なることを示している (Xu and Bremer, 1988)。この結果も、複製伸長阻害の影響で実験条件 (温度) によって DnaA 過剰発現の影響に違いが生じたと説明されている。本研究では、DnaN の供給により、DnaA 過剰発現に伴う複製伸長阻害が取り除かれることを見いだした。大腸菌では、DnaN が DnaA の不活性化に関与していることが報告されている (Katayama *et al.*, 1998)。本研究で作製した DnaA-DnaN 過剰発現株では DnaN も同時に過剰発現されているので、DnaN 単独の過剰発現の影響を解析したが、DnaN を野生株の 10 倍程度に過剰発現させても、複製開始には影響しなかった (結果は記載しない)。このことから、DnaA-DnaN 過剰発現では、DnaN 過剰発現の影響はないと考えられ、この株を用いることにより、DnaA 過剰発現の影響を正確に解析することが可能となった。

DnaA-DnaN 過剰発現株で、DnaA 量を変動させ、複製開始への影響を解析した結果、DnaA 量が減少すると複製開始時期が遅くなり、増加すると早くなった。このことから、枯草菌でも大腸菌と同じように、複製開始時期は DnaA 量によって規定される可能性が示唆された。しかし、DnaA 過剰発現の影響は大腸菌に比べて小さ

く、枯草菌と大腸菌とでは複製開始制御の機構が異なっていることも示唆された。

大腸菌で提案されている Initiator titration model では、合成された DnaA は、まず、親和性の高い染色体上の DnaA box に結合し、DnaA が十分量合成されると、親和性の低い *dnaA* プロモーター領域に結合し、*dnaA* の転写は抑制され、それと同時に、*oriC* 内の親和性の低い DnaA box へ結合し、複製が開始されると考えられている (Hansen *et al.*, 1991)。DnaA box の過剰供給により、*dnaA* の転写が増加することや (Hansen *et al.*, 1987)、DnaA 過剰発現や *datA* 領域の欠失で、複製開始時期が早まることは (Kitagawa *et al.*, 1998 ; Lobner-Olsen *et al.*, 1989 ; Atlung *et al.*, 1993)、このモデルを支持する結果である。一方、枯草菌では、*dnaA* の転写が複製開始後の一定期間しか起こらないと考えられる上に (Ogasawara *et al.*, 1985b)、DnaA box を過剰供給しても *dnaA* の転写は増加しない (Moriya *et al.*, 1999)。これらのことから、DnaA は複製開始後すぐに次の複製開始に十分な量が合成された後、その転写は次の複製が開始するまで抑制されていると考えられ、Initiator titration model とは合わない。そして、合成された DnaA は複製開始時期が来るまで何らかの機構によりその活性が抑制されていると予想される。大腸菌では DnaA 過剰発現で mass / origin が 17-44% まで減少するのに対し、枯草菌では 15% までしか減少しなかったのは、この抑制機構が過剰発現した DnaA もある程度まで抑制したからであると思われる。この抑制機構を発見し、その活性を高めることができれば、DnaA を過剰発現しても複製開始時期は早まらなると考えられる。

4. YabA は DnaA と相互作用して複製開始を抑制している

本研究では、YabA 量の減少に伴って、複製開始時期が早くなることを見いだした。YabA は DnaA と相互作用することから、DnaA の活性を制御して複製開始を抑制している可能性が考えられる。大腸菌 Hda は DnaN と共に、DnaA の不活化 (ADP 結合型への変換) に関与していると考えられていて、*hda* 破壊株では 2 回以上の連続した複製開始が起こり、細胞増殖が阻害される (Kato and Katayama, 2001)。YabA は DnaN と相互作用することから、Hda と機能的に似た働きを持っていると考えられていた。しかし、*yabA* を破壊しても細胞が少し伸長するものの、細胞増殖には影響しなかった。また、*yabA* 発現制御株で YabA 量を細胞分裂に影響がでない範囲 (20 μ M IPTG 以上) で減少させても、2 回以上の連続した複製開始を起こした細胞はほとんど検出されなかった。YabA 量減少に伴い複製開始時期が早まったことから、YabA は大腸菌 Hda とは異なり、主に複製開始時期の決定に関与していると考えられる。IPTG を含まない培地で培養したときは、*oriC* 数が 2 倍以上

に増加した細胞も検出されたが、細胞が伸長していたので、その細胞が2回以上の連続した複製開始を起こした結果生じたかどうかは判断できなかった。細胞が伸長したのは恐らく、複製開始時期が早まった2次的な影響で、染色体分配や細胞分裂に異常が生じたためではないかと思われた。

また、我々は DnaA の ATP 結合部位にあたる 153 番目のバリンをイソロイシンに変えることによって (*dnaA V153 I* 変異)、2回以上の連続した複製開始が起こることを見出している (結果は記載しない)。大腸菌 *dnaA cos* 変異 (ATP結合部位の変異) によっても2回以上の連続した複製開始が起こり、この変異タンパクは ATP と ADP の両方と結合できなくなっていて、常時活性化状態である

(Kellenberger-Gujer *et al.*, 1978 ; Katayama, 1994 ; Katayama and Kornberg, 1994; Katayama and Crooke, 1995)。このことから、DnaA V153 I 変異タンパクも ATP や ADP との親和性が変化したか、ATP の加水分解能に異常が生じ、常時活性化型になっていると考えられる。フローサイトメーターによる解析でも、この変異を導入した株では、2回以上の連続した複製開始を起こした細胞が多数観察された。この株で YabA 量を減少させると、さらに過剰な複製開始が起こり、細胞増殖が阻害された (結果は記載しない)。これは、DnaA V 153 I 変異により、2回以上の連続した複製開始が起こっている上に、YabA 量の減少で複製開始時期が早まり、細胞が増殖できなくなるレベルで過剰複製が起こった結果であると考えられる。この結果は、さらに、YabA による複製開始時期の制御は、DnaA の ATP - ADP 結合型の変換とは独立して機能していることを強く示唆している。今後、この DnaA V153 I 変異タンパクを用いた YabA と DnaA の生化学的な解析 (*in vitro* 複製系、DnaA の ATP 加水分解の解析など) から、YabA による DnaA の活性制御機構がより明らかになると思われる。また、YabA は DnaA の活性を制御し、複製開始を抑制していると考えられるので、YabA を過剰発現した場合には、DnaA 量を増加させても、複製開始時期は早まらなると予想され、今後、このような実験も必要であると思われる。

5. Soj - Spo0J システムによる複製開始制御

Soj と Spo0J はそれぞれ大腸菌低コピー数プラスミドの分配に必須な ParA と PraB のファミリーに属する。さらに、*spo0J* 破壊株において数パーセントの無核細胞が放出されることから Soj と Spo0J は対数期の染色体分配に関与していると考えられている (Ireton *et al.*, 1994)。本研究では、これらのタンパク質が複製開始制御にも関与していることを見いだした。Soj 過剰発現株や *spo0J* 破壊株で複製開始時期が早まり、*soj-spo0J* 破壊株、*soj* 欠失、そして Soj-Spo0J 過剰発現株では複製開始に大きく影響しないことから、Soj は複製開始時期を早め、Spo0J が Soj のその機能を

抑制していると考えられる。

Soj は核様体の両端間を (Marston and Errington., 1999) もしくは、細胞の両極間を (Quisel et al., 1999) 振動するように移動するが、この局在は *spo0J* 破壊により異常が生じ、Soj は核様体全体に広がるような分布を示す。このことが、複製開始時期が早まる原因である可能性が考えられた。この考えと一致して Soj の局在が *spo0J* 破壊と同じになる *spo0J 14* と *spo0J 17* 株では複製開始時期が早くなっていた。しかしながら、同様に Soj が核様体全体に拡散する *spo0J13* 変異株では、複製開始に異常は見られなかった。また、*soj16* 株では、Soj が細胞極に局在し、そこからの移動能を失っているため、Soj と核様体は交わることがないと考えられるにも関わらず、この株では複製開始時期が早まった。これらの結果から、*spo0J* 破壊によって複製開始時期が早まったのは、Soj が核様体全体に拡散することが原因ではないことがわかった。また、*soj 12* 株では複製開始時期が遅くなった。*soj* を欠失しても、複製開始には大きな影響がないことから、この変異により、Soj が複製を抑制する活性を持ったと考えられ、この変異株のさらなる解析も興味深い。

また、Soj は転写因子としての活性を持つことが知られている。*spo0J* の破壊によって、対数期での発現が変化する遺伝子群をマクロアレイ法で解析したところ、*yvdC* の転写が増加し、*ydaS* と *ywzA* の転写が減少した (結果は記載しない)。Soj 過剰発現株でも、これらの遺伝子の発現が *spo0J* 破壊株と同様に変化することがノーザンハイブリダイゼーション法で確認できた (結果は記載しない)。これらの遺伝子は、複製開始制御に関与している可能性が考えられたが、いずれも機能未知の遺伝子であった。そこで、これらの遺伝子産物の複製開始制御への関与を調べるために、発現が増加したものはその過剰発現株を、減少するものはその破壊株を作製し、フローサイトメーターで解析したが、いずれもその複製開始は野生株と変化はなかった (結果は記載しない)。これらのことから、Soj は転写因子としての機能は持っているが、Soj による複製開始の制御は、この転写因子としての機能とは異なる可能性が高いと考えられる。

YabA や Spo0J の枯渇により複製開始時期が早まることから、複製開始に必要な因子群は複製開始以前から既に準備できていることがわかる。そして、この開始のポテンシャルは複製開始時期が来るまで何らかの機構により抑制されていると思われる。Soj はその抑制機構に関わる因子と相互作用し、開始ポテンシャルを解放させる働きを持っている可能性が考えられる。今後、酵母 2 ハイブリッド法や免疫沈降法などを用いて、Soj と相互作用する因子を探索する必要があると思われる。その因子の発見により、枯草菌における複製開始制御の機構がより明らかになると考えられる。

本研究から、Spo0J は Soj の活性を制御していることが示唆されたので、Spo0J と Soj は細胞内で相互作用している可能性が考えられる。P1 プラスミドにおいては、ParA (Soj ホモログ) と ParB (Spo0J ホモログ) の相互作用が生化学的な解析や、酵母 2 ハイブリッド法を用いた解析で証明されているが (Davis *et al.*, 1992; Surtees and Funnell, 1999)、枯草菌とカウロバクターでは、生化学的な相互作用解析が行われたものの、その相互作用は確認できていない (Mohl and Gober, 1997; Cervin *et al.*, 1998)。本研究でも、酵母 2 ハイブリッド法を用いて解析したが、その相互作用は確認できなかった (結果は記載しない)。Soj と Spo0J の相互作用は、今後の課題として残されたが、その解析には *in vivo* での実験系を用いる必要があると思われる。また、Soj-Spo0J 過剰発現株では、Soj 過剰発現の効果が失われると共に、複製開始時期が遅くなった。このことから、Spo0J は Soj の活性を抑制する以外に、別の機能も持っている可能性が考えられる。本研究では、Spo0J の過剰発現が十分に行えなかったが、今後、過剰発現の系を改良し、Spo0J 過剰発現の効果を詳細に解析する必要があると思われる。そして、Spo0J は Soj 以外の因子の活性を制御している可能性も考えられるので、Spo0J と相互作用する因子の探索も望まれる。

6. 本研究のまとめと枯草菌における複製開始制御のモデル

本研究から、YabA や Spo0J の枯渇により、複製開始時期が早まることがわかった。この結果は、枯草菌では複製開始以前から DnaA を含め複製開始に必須なすべての因子群が既に十分量準備されていることを強く示唆し、*dnaA* の転写が複製開始後の一定期間しか起こらないという過去の実験結果 (Ogasawara *et al.*, 1985b) と一致している。このように枯草菌では、複製開始以前から既に開始のポテンシャルは形成されていて、それを抑制している機構が存在すると思われる (図 16)。このため、枯草菌では、DnaA 過剰発現で Mass / origin が 15% までしか減少しないと考えられる (大腸菌では、17% - 44% まで減少: Lobner-Olsen *et al.*, 1989; Atlung *et al.*, 1993)。大腸菌で提案されている Initiator titration model では、DnaA box に対する DnaA の量が十分量蓄積したとき、すなわち、開始ポテンシャルが形成されたときに、複製が開始すると考えられているので、この点でこのモデルと大きく異なる。また、このような考えはその他の細菌でも想定されていなかった。

YabA は DnaA と相互作用し、その枯渇により開始時期が早まることから、DnaA の活性を制御し、開始ポテンシャルを抑制する機構に関与している可能性が考えられる (図 16)。*dnaA* の転写はこの抑制が働いているときでも自己抑制されるので、DnaA は DNA に結合できると思われる。このことから、YabA はこの DnaA の DNA への結合を阻害しているのではない可能性が高い。複製開始には DNA に結

合した DnaA 同士の相互作用により、*oriC* 領域でループ構造が形成されることが必須であると考えられている。よって、YabA は DnaA 同士の相互作用を阻害し、このループ構造の形成を抑制している可能性も考えられる。最近、当研究室の森本らにより枯草菌 GTP 結合蛋白質である Bex や YqeH 量の減少により、複製開始時期が早まることが示された。これらの因子もその抑制機構に関与している可能性が考えられる (図 16)。抑制された開始ポテンシャルは正しい時期に解放される必要があり、このタイミングこそがまさに複製開始時期である。よって、この解放の作業は細胞質の増加を認識して行われるはずであり、もっとも厳密に制御されるべき段階である。本研究から、Soj 過剰発現により開始時期が早まることが示されたが、Soj がこの開始ポテンシャルの解放に関わる因子の候補として挙げられ、Soj-Spo0J 過剰発現では開始時期は早まらないので、Spo0J が Soj のその機能を抑制していると考えられる (図 16)。*soj* 欠失や *soj-spo0J* 破壊では、複製開始に大きく影響しないことから、Soj-Spo0J システムを相補する別の制御系が存在するか、もしくは、別の系が主要な働きを行い、Soj-Spo0J システムが補佐的な役割をしていることも示唆される。また、この破壊により、わずかに複製開始の同調性や、複製開始時期に異常が生じるので、少なくとも、厳密な複製開始時期の制御にはこれらのタンパク質が必要であると言える。

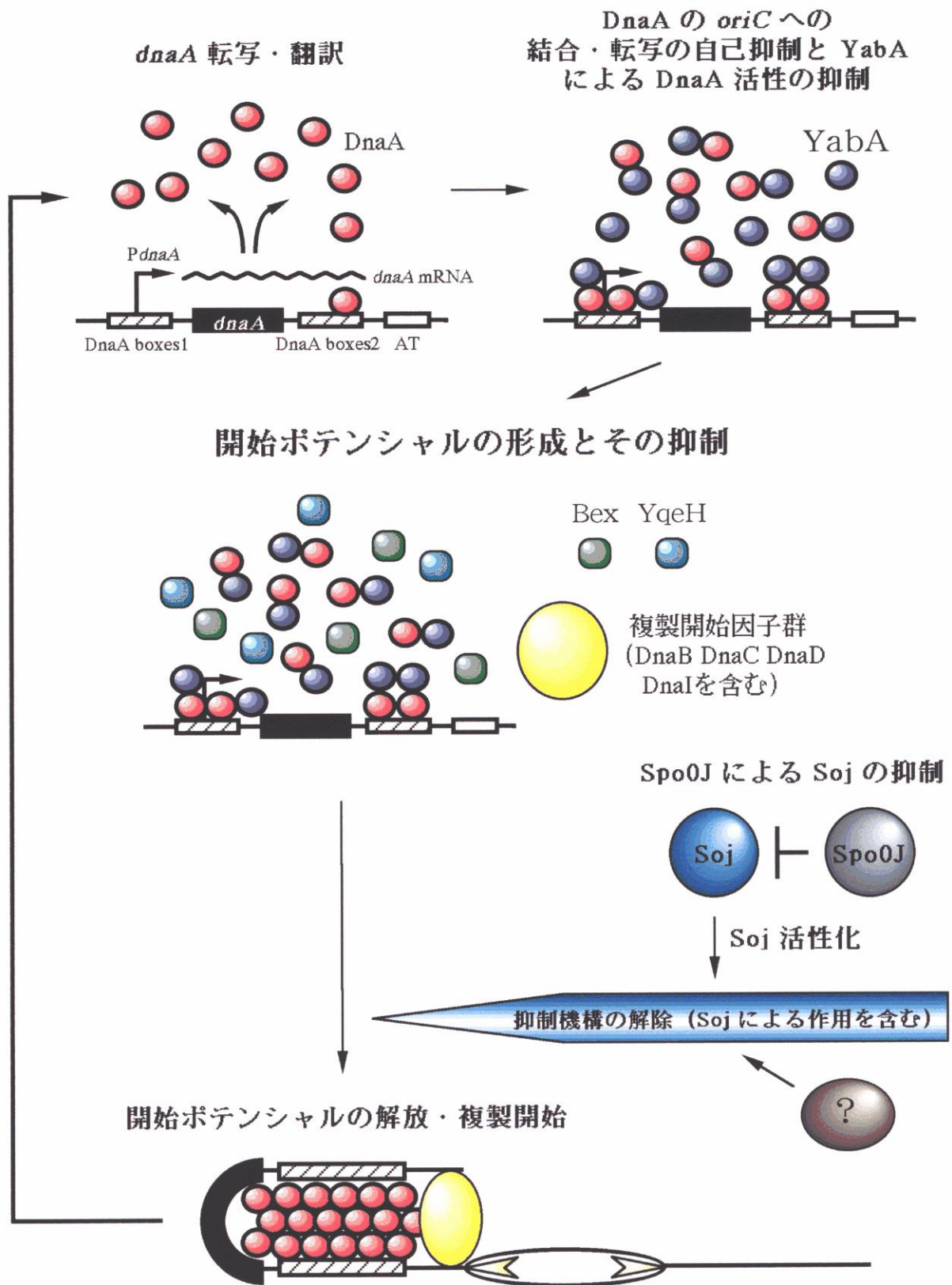


図 16. 枯草菌における複製開始制御のモデル

V. 謝辞

本研究にあたり、奈良先端科学技術大学院大学 細胞遺伝学講座 小笠原直毅教授には、あらゆる面で懇切丁寧な適切な御指導を受け賜り深く感謝致します。守家成紀助教授には、実験を行うにあたり多くの非常に有益な御指導、御鞭撻を頂き心より感謝いたします。なお、笠原康裕助手、小林和夫助手、石川周博士をはじめ、細胞遺伝学講座の皆様及び、株式会社ジェノックス 今井雪穂女史には有益なご助言並びに様々なご助力を頂き感謝し致します。

VI 参考文献

Anagostopoulos, C., and Spizizen, J.(1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**: 741-746.

Androp, L., Atlung, T., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., and Hansen, F. G.(1988). Interaction of the *Bacillus subtilis* DnaA-like protein with the *Escherichia coli* DnaA protein. *J Bacteriol.* **170**,1333-8.

Armengod, M.E., Garcia-Sogo, M., Lambies, E. (1988) Transcriptional organization of the *dnaN* and *recF* genes of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* **263** : 12109-12114.

Atlung, T., Clausen, E.S., Hansen, F.G. (1985). Autoregulation of the *dnaA* gene of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **200** : 442-450.

Atlung, T., Hansen, F.G.(1993). Three distinct chromosome replication states are induced by increasing concentrations of DnaA protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175** : 6537-6545.

Atlung, T., Hansen, F.G. (1999). Low-temperature-induced DnaA protein synthesis does not change initiation mass in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **181** : 5557-5562.

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** : 743-55.

Braun, R.E., O'Day, K., Wright, A. (1985). Autoregulation of the DNA replication gene *dnaA* in *E. coli* K-12. *Cell* **40** : 159-69.

Braun, R.E., Wright, A. (1986). DNA methylation differentially enhances the expression of one of the two *E. coli dnaA* promoters *in vivo* and *in vitro*. *Mol Gen Genet* **202** : 246-250.

Bremer, H., Churchward, G. (1991). Control of cyclic chromosome replication in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **55** : 459-475.

Boye, E., Stokke, T., Kleckner, N., Skarstad, K. (1996). Coordinating DNA replication initiation with cell growth: differential roles for DnaA and SeqA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** : 12206-12011.

Campbell, J.L., Kleckner, N. (1990). *E. coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell*. **62** : 967-79.

Cervin, M.A., Spiegelman, G.B., Raether, B., Ohlsen, K., Perego, M., Hoch, J.A. (1998). A negative regulator linking chromosome segregation to developmental transcription in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **29** : 85-95.

Chiaramello, A.E., Zyskind, J.W. (1989). Expression of *Escherichia coli dnaA* and *mioC* genes as a function of growth rate. *J Bacteriol* **171** : 4272-4280.

Cooper, S., Helmstetter, CE. (1968). Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J Mol Biol* **31** : 519-540.

Christensen, B.B., Atlung, T., Hansen, F.G. (1999). DnaA boxes are important elements in setting the initiation mass of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181** : 2683-2688.

Churchward, G., Estiva, E., Bremer, H. (1981). Growth rate-dependent control of chromosome replication initiation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **145** : 1232-1238.

Donachie, W. D. (1968) Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature* **219** : 1077-1079.

Davis, M.A., Martin, K.A., Austin, S.J. (1992). Biochemical activities of the *parA* partition protein of the P1 plasmid. *Mol Microbiol* **6** : 1141-1147.

Eliasson, A., Bernander, R., Nordstrom, K. (1996). Random initiation of replication of plasmids P1 and F (*oriS*) when integrated into the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Microbiol* **20** : 1025-1032.

Eliasson, A., Nordstrom, K.(1997). Replication of minichromosomes in a host in which chromosome replication is random. *Mol Microbiol* **23** : 1215-1220.

Fang, L., Davey, M.J., O'Donnell, M. (1999). Replisome assembly at *oriC*, the replication origin of *E. coli*, reveals an explanation for initiation sites outside an origin. *Mol Cell* **4** : 541-553.

Frey, J., Chandler, M., Caro, L. (1981). The initiation of chromosome replication in a *dnaAts46* and a *dnaA+* strain at various temperatures. *Mol Gen Genet* **182** : 364-366.

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 (Tokyo)* **107** : 732-739.

Fralick, J.A. (1978). Studies on the regulation of initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **122** : 271-86.

Fralick, J.A. (1999). Is DnaA the 'pace-maker' of chromosome replication ? An old paper revisited. *Mol Microbiol* **31** : 1007-1012.

Fuller, R.S., Kornberg, A. (1983) Purified *dnaA* protein in initiation of replication at the *Escherichia coli* chromosomal origin of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80** : 5817-5821.

Helmstetter, C.E., Leonard, A.C. (1987). Coordinate initiation of chromosome and minichromosome replication in *Escherichia coli*.
J Bacteriol **169** : 3489-3494.

Helmstetter, CE. (1996). Timing of synthetic activities in cell cycle. In "*Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Moleculular Biology*" 2nd ed., Vol. 2, pp. 1627-1636.

Herrick, J., Kohiyama, M., Atlung, T., and Hansen F. G. (1996). The intiation mass ? *Mol Microbiol* **19**, 659-666.

Hansen, F.G., Hansen, E.B., Atlung, T. (1982). The nucleotide sequence of the *dnaA* gene

promoter and of the adjacent *rpmH* gene, coding for the ribosomal protein L34, of *Escherichia coli*. *EMBO J* **1** : 1043-1048.

Hansen, F.G., Koefoed, S., Sorensen, L., Atlung, T. (1987). Titration of DnaA protein by *oriC* DnaA-boxes increases *dnaA* gene expression in *Escherichia coli*. *EMBO J* **6** : 255-258.

Hansen, FG., Christensen, B. B., Atlung, T. (1991). The initiator titration model: computer simulation of chromosome and minichromosome control. *Res Microbiol.* **142** : 161-167.

Hansen, F.G., Atlung, T. (1995). Initiation of chromosome replication after induction of DnaA protein synthesis in a *dnaA (null) rnh* mutant of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **15** : 149-54.

Hassan, A. K. M., Moriya, S., Ogura, T., Tanaka, T., Kawamura, F., and Ogasawara, N. (1997). Suppression of initiation defects of chromosome replication in *Bacillus subtilis dnaA* and *oriC*-deleted mutants by integration of a plasmid replicon into the chromosome. *J.Bacteriol* **8**, 2494-2502.

Ito, H., Fukada, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol* **153** : 163 – 168.

Igo, M., and R. Losick.(1986). Reguration of a promoter that is utilized by minor forms of RNA polymerase holoenzyme in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **191**:615-624.

今井 雪穂 (1996) 枯草菌 *dnaA* 遺伝子の人為的発現制御系を用いた染色体複製開始機構の解析。奈良先端大、修士論文。

Imai, Y., Ogasawara, N., Ishigo-Oka, D., Kadoya, R., Daito, T., Moriya, S. (2000). Subcellular localization of Dna-initiation proteins of *Bacillus subtilis*: evidence that chromosome replication begins at either edge of the nucleoids. *Mol Microbiol* **36** : 1037-1048.

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.

Ishigo-Oka, D., Ogasawara, N., Moriya, S. (2001). DnaD protein of *Bacillus subtilis* interacts with DnaA, the initiator protein of replication. *J Bacteriol* **183** : 2148-2150.

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.

Jakimowicz, D., Majka, J., Lis, B., Konopa, G., Wegrzyn, G., Messer, W., Schrempf, H., Zakrzewska-Czerwinska, J. (200). Structure and regulation of the dnaA promoter region in three *Streptomyces* species. *Mol Gen Genet* **262** : 1093-1102.

Katayama, T., Kornberg, A. (1994). Hyperactive initiation of chromosomal replication in vivo and in vitro by a mutant initiator protein, DnaAcos, of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269** : 12698-12703.

Katayama, T. (1994). The mutant DnaAcos protein which overinitiates replication of the *Escherichia coli* chromosome is inert to negative regulation for initiation. *J Biol Chem* **269** : 22075-22079.

Katayama, T., Crooke, E. (1995). DnaA protein is sensitive to a soluble factor and is specifically inactivated for initiation of in vitro replication of the *Escherichia coli* minichromosome. *J Biol Chem* **270** : 9265-9271.

Katayama, T., Kubota, T., Kurokawa, K., Crooke, E., Sekimizu, K. (1998). The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the *E. coli* chromosomal replicase. *Cell* **94** : 61-71.

Katayama, T. (2001). Feedback controls restrain the initiation of *Escherichia coli* chromosomal replication. *Mol Microbiol* **41** : 9-17.

Kato, J., Katayama, T. (2001). Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *EMBO J* **20** : 4253-4262.

Kellenberger-Gujer, G., Podhajska, A.J., Caro, L. (1978). A cold sensitive *dnaA* mutant of *E. coli* which overinitiates chromosome replication at low temperature. *Mol Gen Genet* **162** : 9-16.

- 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.
- Kohiyama, M., Cousin, D., Ryter, A., Jacob, F. (1966). Mutants thermosensibles d'*E. coli* K-12. I. Isolement et caracterisation rapide. *Ann Inst. Pasteur* **110** : 465-486.
- Kohiyama, M. (1968). DNA synthesis in temperature sensitive mutants in *E. coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* **43** : 317-324.
- Koonin, E.V. (1992). DnaC protein contains a modified ATP-binding motif and belongs to a novel family of ATPases including also DnaA. *Nucleic Acids Res* **20** : 1997.
- Koppes, L., Nordstrom, K. (1986). Insertion of an R1 plasmid into the origin of replication of the *E. coli* chromosome: random timing of replication of the hybrid chromosome. *Cell* **44** : 117-124.
- Krause, M., Ruckert, B., Lurz, R., Messer, W. (1997). Complexes at the replication origin of *Bacillus subtilis* with homologous and heterologous DnaA protein. *J Mol Biol* **274** : 365-380.
- Kucherer, C., Lothar, H., Kolling, R., Schauzu, MA., Messer, W. (1986). Regulation of transcription of the chromosomal *dnaA* gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **205** : 115-121.
- Kunst, F., Msadek., and Rapoport, G. (1994). Signal transduction network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*. In *Regulation of Bacterial differentiation*, P. J. Piggot, C. P. Moran Jr. and P. Youngman, eds. pp. 1-20.
- Kurokawa, K., Nishida, S., Emoto, A., Sekimizu, K., Katayama, T. (1999). Replication cycle-coordinated change of the adenine nucleotide-bound forms of DnaA protein in *Escherichia coli*. *EMBO J* **18** : 6642-6652.
- Landoulsi, A., Hughes, P., Kern, R., Kohiyama, M. (1989). *dam* methylation and the initiation of DNA replication on *oriC* plasmids. *Mol Gen Genet* **216** : 217-223.

Learn, B.A., Um, S.J., Huang, L., McMacken, R. (1997). Cryptic single-stranded-DNA binding activities of the phage lambda P and *Escherichia coli* DnaC replication initiation proteins facilitate the transfer of *E. coli* DnaB helicase onto DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** : 1154-1159.

Lewis, P.J., Errington, J. (1997). Direct evidence for active segregation of oriC regions of the *Bacillus subtilis* chromosome and co-localization with the SpoOJ partitioning protein. *Mol Microbiol.* **25** :945-954.

Lin, DC., Grossman, AD. (1998). Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* **92** : 675-685.

Lobner-Olesen, A., Skarstad, K., Hansen, F.G., von Meyenburg, K., Boye, E. (1989). The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K-12. *Cell* **57** : 881-889.

Ishigo-Oka, D., Ogasawara, N., Moriya, S. (2001). DnaD protein of *Bacillus subtilis* interacts with DnaA, the initiator protein of replication. *J Bacteriol* **183** : 2148-2150.

Lu, M., Campbell, J.L., Boye, E., Kleckner, N. (1994). SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell* **77** : 413-426.

Marston, AL., Errington, J. (1999). Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol Cell* **4** : 673-682.

Messer, W., Weigel, C. (1996). Initiation of chromosome replication. In "*Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*" 2nd ed., Vol. 2, pp. 1579-1601.

Messer, W., and Weigel, C. (1997). DnaA initiator - also a transcription factor. *Mol Microbiol* **24**, 1-6.

Messer, W., Blaesing, F., Majka, J., Nardmann, J., Schaper, S., Schmidt, A., Seitz, H., Speck, C., Tungler, D., Wegrzyn, G., Weigel, C., Welzeck, M., Zakrzewska-Czerwinska, J. (1999). Functional domains of DnaA proteins. *Biochimie* **81** : 819-825.

Mohl, D.A., Gober, J.W. (1997). Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell* **88** : 675-684.

Mohl, DA., Easter, J., Gober, JW. (2001). The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **42** : 741-755.

Moriya, S., Ogasawara, N., Yoshikawa, H. (1985). Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. *Nucleic Acids Res* **13** : 2251-2265.

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., Kato, K., Yoshikawa, H., and Ogasawara, N. (1990). Isolation of a *dnaA* mutant of *Bacillus subtilis* defective in initiation of replication: amount of DnaA protein determines cell initiation potential. *EMBO J* **9**, 2905-2910.

Moriya, S., Atlung, T., Hansen, F.G., Yoshikawa, H., Ogasawara, N. (1992) Cloning of an autonomously replicating sequence (ars) from the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol Microbiol* **6** : 309-315.

Moriya, S., Tsujikawa, E., Hassan, A.K., Asai, K., Kodama, T., Ogasawara, N. (1998). A *Bacillus subtilis* gene encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. *Mol Microbiol* **29** : 179-187.

Moriya, S., Imai, Y., Hassan, A.K., Ogasawara, N. (1999). Regulation of initiation of *Bacillus subtilis* chromosome replication. *Plasmid* **41** : 17-29.

Murakami, S., Yamaguchi, K., Yoshikawa, H. (1976). Macromolecular synthesis after a nutritional shift-up of *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **145** : 293-302.

Murphy, E., Huwyler, L., de Freire Bastos Mdo, C. (1985). Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. *EMBO J* **4** : 3357-3365.

Ogasawara, N., Moriya, S., Yoshikawa, H. (1985a). Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. IV. Transcription of the *oriC* region and expression of DNA gyrase genes and other open reading frames. *Nucleic Acids Res* **13** : 2267-2279.

Ogasawara, N., Moriya, S., von Meyenburg, K., Hansen, F.G., Yoshikawa, H. (1985b) Conservation of genes and their organization in the chromosomal replication origin region of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* *EMBO J* **4** : 3345-50.

Ogden, G.B., Pratt, M.J., Schaechter, M. (1988). The replicative origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated. *Cell* **54** : 127-35.

小椋 義俊 (1999). 枯草菌 DnaA 蛋白質による転写制御とその過剰発現による染色体複製開始への影響。奈良先端大、修士論文。

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** : 3833-3841.

Onogi, T., Niki, H., Yamazoe, M., Hiraga, S. (1999). The assembly and migration of SeqA-Gfp fusion in living cells of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31** : 1775-1782.

Perez-Roger, I., Garcia-Sogo, M., Navarro-Avino, J.P., Lopez-Acedo, C., Macian, F., Armengod, M.E. (1991). Positive and negative regulatory elements in the *dnaA-dnaN-recF* operon of *Escherichia coli*. *Biochimie* **73** : 329-334.

Russell, D.W., Zinder, N.D. (1987). Hemimethylation prevents DNA replication in *E. coli*. *Cell* **50** : 1071-1079.

Quinones, A., Messer, W. (1988). Discoordinate gene expression in the *dnaA-dnaN* operon of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **213** : 118-124.

Quisel, J.D., Lin, D.C., Grossman, A.D. (1999). Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell* **4** : 665-672.

Quisel, J.D., and Grossman, A.D. (2000). Control of sporulation gene expression in *Bacillus subtilis* by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB). *J Bacteriol* **18** : 3446-3451.

Richter, S., Hagemann, M., and Messer, W. (1998) Transcriptional analysis and mutation of *dnaA*-like gene in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **180** : 4946-4949.

Roth, A., Messer, W. (1995). The DNA binding domain of the initiator protein DnaA. *EMBO J* **14** : 2106-2111.

Roth, A., Messer, W. (1998). High-affinity binding sites for the initiator protein DnaA on the chromosome of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28** : 395-401.

Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning : A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol1, 1.21 – 1.39.

Sakakibara, Y., Tsukano, H., Sako, T. (1981). Organization and transcription of the *dnaA* and *dnaN* genes of *Escherichia coli*. *Gene* **13** : 47-55.

Samitt, C.E., Hansen, F.G., Miller, J.F., Schaechter, M. (1989). In vivo studies of DnaA binding to the origin of replication of *Escherichia coli*. *EMBO J* **8** : 989-993.

Schaper, S., Messer, W. (1995). Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. *J Biol Chem* **270** : 17622-17626.

Schaper, S., Nardmann, J., Luder, G., Lurz, R., Speck, C., Messer, W. (2000) Identification of the chromosomal replication origin from *Thermus thermophilus* and its interaction with the replication initiator DnaA. *J Mol Biol* **299** : 655-665.

Sekimizu, K., Bramhill, D., Kornberg, A. (1987). ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* **50** : 259-265.

Seitz, H., Weigel, C., Messer, W. (2000). The interaction domains of the DnaA and DnaB replication proteins of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **37** : 1270-1279.

Seror, S.J., Casaregola, S., Vannier, F., Zouari, N., Dahl, M., Boye, E. (1994). A mutant cysteinyl-tRNA synthetase affecting timing of chromosomal replication initiation in *B. subtilis* and conferring resistance to a protein kinase C inhibitor. *EMBO J* **13** : 2472-2480.

Sharpe, ME., Errington, J. (1996) The *Bacillus subtilis* *soj-spo0J* locus is required for a centromere-like function involved in prespore chromosome partitioning. *Mol Microbiol* **21**: 501-9.

Skarstad, K., Boye, E. (1994). The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. *Biochim Biophys Acta* **1217** : 111-30.

Sompayrac, L., Maaloe, O. (1973). Autorepressor model for control of DNA replication. *Nat New Biol* **241** : 133-5.

Speck, C., Weigel, C., Messer, W. (1999). ATP- and ADP-dnaA protein, a molecular switch in gene regulation. *EMBO J* **18** : 6169-6176.

Speck, C., Messer, W. (2001). Mechanism of origin unwinding: sequential binding of DnaA to double- and single-stranded DNA. *EMBO J* **20** : 1469-1476.

Sueoka, N. (1998). Cell membrane and chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **59**: 35-53.

Surtees, J.A., Funnell, B.E. (1999). P1 ParB domain structure includes two independent multimerization domains. *J Bacteriol* **181** : 5898-5908.

Sutton, M.D., Carr, K.M., Vicente, M., Kaguni, J.M. (1998). *Escherichia coli* DnaA protein. The N-terminal domain and loading of DnaB helicase at the *E. coli* chromosomal origin. *J Biol Chem* **273** : 34255-34262.

Theisen, P.W., Grimwade, J.E., Leonard, A.C., Bogan, J.A., Helmstetter, C.E. (1993) Correlation of gene transcription with the time of initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **10** : 575-584.

von Meyenburg, K., Hansen, F. G. (1987). Regulation of chromosome replication. In *"Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology"* p. 1555-1577.

Weigel, C., Schmidt, A., Seitz, H., Tungler, D., Welzeck, M., Messer, W. (1999). The N-terminus promotes oligomerization of the *Escherichia coli* initiator protein DnaA. *Mol Microbiol* **34** : 53-66.

Wold, S., Skarstad, K., Steen, H. B., Strokke, T., and Boye, E. (1994) The initiation mass for DNA replication in *Escherichia coli* K-12 is dependent on growth rate. *EMBO J* **13** : 2097-2102.

Xu, Y.C., Bremer, H. (1988). Chromosome replication in *Escherichia coli* induced by oversupply of DnaA. *Mol Gen Genet* **211** : 138-142.

Yasuda, S., Hirota, Y. (1977) Cloning and mapping of the replication origin of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** : 5458-5462.

Yoshikawa, H., Wake, R.G. (1993). Initiation and termination of chromosome replication. In *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria* p507-528

Zawilak, A., Cebrat, S., Mackiewicz, P., Krol-Hulewicz, A., Jakimowicz, D., Messer, W., Gosciniak, G., Zakrzewska-Czerwinska, J. (2001) Identification of a putative chromosomal replication origin from *Helicobacter pylori* and its interaction with the initiator protein DnaA. *Nucleic Acids Res* **29** : 2251-2259.