

氏 名	キム ジュン ベク 金 重 伯
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 109 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	The Architecture of Bacterial Chromosome from <i>Escherichia coli</i> (大腸菌染色体の構造構築に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 安 邦 夫 教 授 井 上 丹 教 授 下 遠 野 邦 忠

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌のゲノム DNA は種々のタンパク質と結合し、‘バクテリア染色体・核様体’として収納されている。このゲノム DNA の収納機構は、転写・翻訳・複製、さらには染色体分配の機構と密接に関わっている。生理塩濃度下で単離されたバクテリア染色体には RNA ポリメラーゼや Hu, H-NS, Fis といった DNA 結合性の核様体タンパク質が多く含まれており、これらのタンパク質と DNA との相互作用により高次構造体を形成していると考えられている。そこで、本研究では、染色体の高次構造体構築機構の解明を目指し、①原子間力顕微鏡を用いた大腸菌染色体全体の構造解析、②プラスミド（ミニ染色体）に含まれる核様体タンパク質の定量解析を行った。

生理塩濃度下で大腸菌の細胞膜を除去し、原子間力顕微鏡による解析を行った結果、細胞増殖期を通じて染色体構造が大きく変化することを見出した。対数増殖期では太さ 40nm・80nm 幅のファイバーとループ形の 80-nm ファイバー、定常期初期では珊瑚礁構造、定常期末期では大きな塊状複合体、をそれぞれ形成していた。さらに、核様体タンパク質欠損株を用いた解析から、Dps タンパク質が定常期末期の塊状集合体の形成に不可欠であることが分かった。また、Dps 欠損株の染色体を観察したところ、定常期に入っても染色体は 80-nm ファイバーを持っていた。このファイバーは全細胞増殖期を通じて染色体の基本構造である。

次に、このファイバー形成のメカニズムを解明するために、解析が容易なプラスミド・ミニ染色体をモデルとして、その構造及びタンパク質構成を解析した。14-Kbp のプラスミドを持つ対数増殖期の‘ミニセル’を回収し、ショ糖密度勾配法によって、タンパク質を含んだ状態でミニ染色体を単離し解析した。ミニ染色体は 80-nm ファイバーの環状構造・それから形成されるスーパーコイル的な構造であった。ウェスタンブロットによってミニ染色体に含まれるタンパク質の定量を行ったところ、80-nm ファイバーの 14-Kbp プラスミド環状複合体には、約200個の Fis 二量体、約130個の H-NS 二量体、約10個の Dps 十二量体、約45個の HU 二量体、約13個の RNA ポリメラーゼが含まれていた。他のスーパーコイル構造体のタンパク質構成と比べると Fis, H-NS, RNA ポリメラーゼは構造により数が変わるが、HU, Dps の数は変化がなかった。以上の結果は、大腸菌染色体では HU と Dps が基本構造を形成し、さらに転写が行われる部位では大量の Fis, H-NS, RNA ポリメラーゼが付加して 80-nm ファイバーを形成すると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

真核生物・原核生物を問わず、数 mm ～数 m 長さのゲノム DNA が数 μ m 直径の細胞（または核）内に収まっている。真核生物のゲノム DNA 折り畳み機構に関する研究に比べ原核生物の DNA 折り畳み機構は現在まで未知の領域であった。本研究は原核生物ゲノムの折りたたみ機構の解析するため、大腸菌染色体の構造解析又生化学的解析を行ったものであり、その評価できる点は以下の通りである。

1. 細胞内状態に近い構造のバクテリア染色体を可視化する事を試み、大腸菌染色体は細胞増殖期によって、その構造が

変化を観察することに成功している。その結果、非常にマイルドなリシス法により大腸菌染色体はファイバー、ビーズの対数期の緩いパッキング構造また定常期の塊状の堅いパッキング構造であることが分かった。

2. 定常期特異的な大腸菌の塊状は Dps 依存的な構築を持つことを欠損株の染色体構造解析やバイオインフォメティクス手法を基にする比較構造解析により明らかにした。また、*S. aureus* の染色体構造解析から、酸化ストレスによる Dps 依存的な塊状染色体の機構が存在したことを明らかにした。この酸化ストレスは大腸菌を含むガンマバクテリア染色体の塊状構造の一般的な構築機構であることが分かった。

3. 対数増殖期に同定されたファイバー・ビーズ状の大腸菌染色体構造はプラスミド構造を用いて詳細を解析し、その構成タンパク質、パッキング率が明らかにした。一個のビーズには約 700bp の DNA が含まれ、その長さを約30%に短くパッキングしている。ビーズには HU, H-NS, Fis といった重要染色体構造タンパク質と RNA ポリメラーゼが多く含まれている。また、DNA とほぼ同量の RNA が存在する結果からビーズ状は染色体の転写が行っている現場であることを明らかにした。

以上の結果は、バクテリア染色体の折り畳み構造・その構造の構築の機構機構に新しい知見をもたらした研究として、微生物学分野に限らず一般的な構造生物学にも寄与することが大きい。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成19年1月22日、論文内容及びそれに関連した分野にわたり口頭試問を行った結果、博士（生命科学）の学位を授与される能力が十分にあるものと認めた。