

氏 名	あ だ ち しゅん 足 立 隼
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 139 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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 高 次 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	大腸菌における染色体とプラスミドの分配の分子機構の研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 湊 長 博 教 授 石 川 冬 木 教 授 眞 貝 洋 一
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌の細胞内では複製起点*oriC*・複製終点*ter*・複製フォーク・MukB-GFPが規則的に配置される。我々はまず様々な条件下で培養した大腸菌の姉妹染色体分配に関わる現象を詳細に解析した。姉妹染色体のコヒージョンを調べるため、*oriC*と*ter*に関して蛍光顕微鏡で局在を調べ、フローサイトメトリーや新たに開発したBrdU染色法による解析でコピー数を調べた。*oriC*や*ter*のフォーカス数はコピー数よりも増殖速度の非常に遅い僅かな例外を除いて少なくなり、コヒージョンの存在を証明した。*mukB*欠失変異株では*oriC*・*ter*・複製フォークの局在が異常になるが、コヒージョンは見られた。複製フォークは貧栄養培地では二方向性複製に関与している1対が複製途中に分かれて移動するが、富栄養培地では近接して存在した。MukB-GFPフォーカスの数は複製フォークの数よりも常に多く、細胞長の伸長に従って数が増えた。これらの結果から大腸菌染色体動態に関わる現象のタイムコースを推測した。次に大腸菌の規則的局在の分子機構のモデル系としてFプラスミドの位置決定の機構を解析した。Fプラスミドはプラスミド自身にコードされるSopA・SopB・*cis*に作用する*sopC* DNA領域の機能で細胞内位置決定と娘細胞への適切な分配が行われる。免疫蛍光顕微鏡法によりSopAとSopBの細胞内局在を調べ、SopBは細胞長依存的に特定の数となるフォーカスを形成してFプラスミドDNAと共局在する他に二重螺旋状の局在を示し、SopAの二重螺旋状の局在と一部重なった。この結果と以前の生化学的なデータに基づき、「反応拡散分配モデル」という理論的モデルを構築し、SopA・SopBの動的局在とFプラスミドの位置決定を方程式によるシミュレーションで説明した。また、Fプラスミドの姉妹コピーがSopBのフォーカス内で適切な濃度を求めて排他的相互作用すると考え、同じ分配システムのプラスミドの不和合性も説明した。次に再び大腸菌のゲノムDNAの分配に立ち戻り、*secA*・*secY*・*acpP*の温度感受性変異株で染色体分配異常の見られることを発見した。さらにSecA・SecY・AcpP・MukB・ParC・ParE・GyrA・GyrB・SeqA・SetBのGFP融合タンパク質は濃度勾配が細胞の長軸に沿って往復運動をし、染色体と類似した二重螺旋状の局在を示していて、FプラスミドのSopシステムと類似することを発見した。これらのタンパク質には相互作用があった。SecAのATPase阻害剤であるアジ化ナトリウムの添加は*oriC*、MukB、SeqAのフォーカスの配向と上記のタンパク質群の動的局在を阻害したが、アジ化ナトリウム耐性の*secA*の変異株ではそれは見られなかった。*secY*・*acpP*の変異株でも上記タンパク質群の動的局在は阻害された。Fプラスミドの位置決定の「反応拡散分配モデル」と同様に、これらのタンパク質群が染色体の位置決定と分離に関わる反応拡散系を構築し、SecAをアクチベーター、SecYをインヒビターとしたPOC (*positioning of chromosomes*) システムを形成するという仮説を提唱した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

大腸菌は約2μmの長さの桿菌であるが、その中で1300μmほどの長さのゲノムDNAが高度に凝縮されて存在する。しかし、真核生物の場合に見られるような紡錘糸の存在は今まで確認されていなかった。バクテリアにおける姉妹染色体の分配機構は長らく謎であったが、新しい種々の細胞生物学的な技術が最近開発されてきて、それに伴い急速に知見が集積されつ

つあり、現在、バクテリアの分子遺伝学の中でも最もホットな研究分野になっている。学位申請者は大腸菌における染色体とプラスミドの分配機構について、様々な細胞生物学的手法や新たなに開発したBrdU染色法によりそれに関わるイベントのタイムコースを明らかにした。さらにFプラスミドの分配に関わるSopA・SopBタンパク質の生化学的な性質からプラスミド分配と細胞内位置決定機構を結びつける「反応拡散分配モデル」という理論的モデルを、シミュレーションをもとに提示した。そして、同様の「反応拡散分配モデル」が大腸菌ゲノムDNAの分配においても少なくとも10種類のタンパク質を含む形で存在する可能性をプロテオミクスのデータを利用して示唆した。これは発生学の理論的研究であるアラン・チューリングの「反応拡散系」をバクテリアの細胞内構造の構築に応用したもので、実験系の簡便さから今後の分子的な解析が容易に行われることが期待される。大腸菌の染色体分配における細胞内位置決定機構の重要性は以前から指摘されていたが、申請者の研究は染色体分配に関わる「反応拡散系」におけるアクチベーターとインヒビターの同定などその分子機構に初めて迫る重要なものである。また、そのアクチベーターとインヒビターを含め、新規に染色体分配に関わることが分かった遺伝子を幾つか同定することに成功した。さらにバクテリアの細胞内タンパク質の局在の振動はその意義が不明であったが、これが一連の化学反応と拡散の現象により細胞内での位置決定機構と結びつけて説明できることが提示された。このことにより、近年存在が明らかにされてきたバクテリアの細胞骨格や細胞内タンパク質の局在の振動の生理的意義が統合的に理解されることが可能になったと言える。これは真核生物における紡錘糸形成とは異なる「反応拡散系」に基づいたDNAトポロジーの創出という新たなパラダイムの形成につながるものである。

以上の結果は、バクテリアの染色体分配の研究に新しい展開をもたらすものであり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値のあるものと認めた。なお、申請者は平成20年1月21日に論文内容とそれに関連した口頭試問を受け、合格と認めたものである。