

大腸菌全蛋白の細胞内局在の網羅的な観察

●小方 康至

国立遺伝学研究所放射線・アイソトープセンター／仁木研究室

〈研究の目的と進め方〉

Background: 近年、バクテリアに於いて、蛋白の細胞内局在を観察する事に依り、此れ迄バクテリアには存在しないと考えられていた細胞骨格が発見されたり、DNA複製の「factory」モデルを支持する観察結果、即ち、複製装置は細胞中央に留まっており、複製された染色体が細胞両極へ移動していると解釈出来る検鏡像が得られたりする等、バクテリアのサイズの小ささと可視光線の分解能の限界故に詳らかにされなかったバクテリアの細胞内部の事象が明らかになって来ている。

Working hypothesis: 私達は、大腸菌 (W3110株) の全 ORF (4,388) と蛍光蛋白 (GFP) 遺伝子の融合遺伝子を発現させるプラスミドのライブラリー ("Archive clone library") (奈良先端科学技術大学院大学・森浩禎博士より分与) を用いて、大腸菌全蛋白の細胞内局在を網羅的に観察する事に依り、(1) 大腸菌全蛋白を細胞内局在性に基いて分類し、(2) 既に機能が知られている蛋白の細胞内局在性から、《蛋白の細胞内局在性と機能の相関》を見出し、更に、此の《相関》に基いて、(3) 今迄機能未知の遺伝子 (所謂"y-gene") 産物の細胞内局在性から、其の機能を推定する事を目指している。

New insight: 本研究の遂行に依り、バクテリアの細胞内に於いて、蛋白が機能を発揮する《時》と《場》を知る事が可能になると共に、"y-gene"の機能を推定し、此れを検証する事が可能になると思われる。

〈2003 年度の研究の当初計画〉

- (1) 《蛋白の細胞内局在性と機能の相関》が見出された蛋白に就いて、夫々の染色体上の遺伝子の上流、又は下流にgfp遺伝子を挿入し、染色体上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在を観察し、夫々の細胞内局在性を確認する。
- (2) 細胞骨格に似た細胞内局在性を示す繊維状の構造体を形成している蛋白は、a) 欠失株の表現型を観察すると共に、b) 精製蛋白の三次元構造を解析する。

〈2003 年度の成果〉

- (1) 既に4,351の大腸菌ORFとgfp遺伝子の融合遺伝子の産物に就いて細胞内局在を観察しており、其の結果、I. 強制発現条件下に於いて蛍光が検出された蛋白は、A. 細胞内全体とB. 輝点、II. 非強制発現条件下に於いて蛍光が検出された蛋白は、D. 細胞内全体、F. 核様体、G. 膜、H. 膜と細胞内全体、I. 膜と輝点、J. 輝点、K. リング (繊維状)、L. 核様体と輝点に分類された。
- (2) 《蛋白の細胞内局在性と機能の相関》としては、J. 輝点には、1. 所謂"replication factory"と呼ばれる、DNA複製装置の局在に似た局在を示す蛋白として、1-a. 複製酵素、1-b. 組換え酵素、1-c. 染色体分配に関与する蛋白が、2. 細胞内に於いて多数の輝点を形成している蛋白としては転写に関連する蛋白が、3. 細胞の両極に弧状の輝点を形成している蛋白としては膜成分の合成酵素が存在していた。又、K. リング (繊維状) には、

1. 所謂「Zリング」と呼ばれる、細胞分裂に於ける収縮環の構成成分であるチューブリン様FtsZ蛋白に似た、環状の構造体を細胞中央部に形成している蛋白、2. バクテリア・アクチンであり、細胞の形態保持に働くMreB蛋白やMbl蛋白に似た、繊維状の構造体が細胞を螺旋状に取り巻いている蛋白、3. R1プラスミドの分配に働くアクチン様ParM蛋白に似た、繊維状の構造体が細胞内に細胞の長軸方向に沿って緩やかな曲線を描いている蛋白が存在していた。更に、F. 核様体には、1. 核様体の構成成分、2. DNAのスーパーコイルングや染色体の折畳みに関与する蛋白、3. DNAの組換えや修復に関与する蛋白が存在していた。"y-gene"産物には、此れ等《蛋白の機能と相関の有る細胞内局在性》を示す蛋白が存在していた。

- (3) 《蛋白の細胞内局在性と機能の相関》が見出された蛋白や《蛋白の機能と相関の有る細胞内局在性》を示す"y-gene"産物の内の46種類に就いて、短い相同配列間で起こる組換えを利用したWanner法を用い、夫々のstop codonをgfp遺伝子に置き換え、染色体上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在を観察した処、其れ等の内の12種類の蛋白はプラスミド上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在と一致しており、夫々の細胞内局在性は、D. 細胞内全体 (4/5)、F. 核様体 (1/4)、J. 輝点 (5/12)、I. 膜と輝点 (1/10)、L. 核様体と輝点 (1/1) であった。此処で、プラスミド上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在性がF. 核様体やJ. 輝点であったにも拘わらず、染色体上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在性が其れとは異なる蛋白の殆ど (夫々3/3と6/7) はD. 細胞内全体に分類された。又、プラスミド上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在性がK. リング (繊維状) であった蛋白に就いては、染色体上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在性はK. リング (繊維状) では無く (0/7)、其れ等の半分はJ. 輝点 (3/7) に、残りの半分はD. 細胞内全体 (3/7) に分類された。従って、プラスミド上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在性の内、染色体上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在性と良く一致するのはD. 細胞内全体であって、F. 核様体やJ. 輝点に分類された蛋白の中にはD. 細胞内全体に存在する蛋白が有る可能性が残る。

〈国内外の成果の位置づけ〉

国内の研究者より、自身が研究対象としている蛋白の細胞内局在性に就いて問い合わせが複数有り、有益な議論が為された。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

細胞骨格に似た細胞内局在性を示すK. リング (繊維状) に分類された蛋白の内、"y-gene"産物を含め8種類の蛋白の精製を行い、其の内の4種類に就いて結晶化を試みたが、今の処、結晶化された蛋白は無い。此処で、此れ等の精製蛋白のゲル濾過を行った処、大部分の蛋白に大きな会

合体が認められたので、恐らくこれが蛋白の結晶化を困難にしている理由であると思われる。

<今後の課題>

F. 核様体に分類された蛋白、又はJ. 輝点に分類され、且つ其の輝点が細胞中央や "cell quarter positions" (細胞長の1/4と3/4の位置) に存在する (染色体の複製や分配に関与する可能性が有る) 蛋白の内、"y-gene" 産物に就いて、染色体上から発現されたGFP融合蛋白の細胞内局在を観察する。

<成果公表リスト>

0404131447

小方康至, 仁木宏典, 生化学, 第75巻, 第2号, 2003年2月, 137-143.