

バクテリア環状ゲノム構造の構築原理の解明

●仁木 宏典

国立遺伝学研究所放射線・アイソトープセンター

〈研究の目的と進め方〉

バクテリアの染色体はその細胞長の千倍もの長さがあるにも関わらず、規則性をもった高次構造をとりつつ折りたたまれて核様体と呼ばれる構造体を形成し、細胞内に納められている。核様体の高次構造形成には、ゲノム上に配置された遺伝子の位置やシス領域が重要であると考えられるが、これらの機構をゲノム塩基配列情報からだけで解析する事は難しい。これまでに私たちは染色体分断法という一種の染色体工学的手法を用いて、大腸菌染色体上に分配時にシスに機能する領域をはじめて同定した。これはわずかに25bpの配列であり、バクテリアのセントロメアに相当するものであった。その一方で細胞内での核様体の形態を生きたまま明瞭に観察できる方法を確立した。この方法により、生細胞内での染色体の折りたたみの動態をはじめて解析することが可能となった。さらに、上記のバクテリアのセントロメア配列の欠失株では、核様体の形成に異常が見られることや、あるいは、染色体のoriC-ter軸で逆位を起こし、染色体の全体構造を変化させた変異株では、無核細胞や核様体のギロチン化現象が非常に高頻度で観察される事を示している。本研究では局所的な染色体上の配列や、染色体の全体構造そのものが核様体の形成にどのように関与しているかを解析し、染色体構造の仕組みの全体像を解き明かしたい。

〈研究開始時の研究計画〉

- (1)バクテリアセントロメア領域と相互作用する因子の解析; 核様体の形成と、染色体分配およびDNAの複製は互いに関連しあっているという観点から、migS配列と生化学的、あるいは遺伝学的に相互作用する因子を同定し、これらが染色体の高次構造形成にどのように関わっているかを調べる。そして、migSと相互作用する因子が同定されれば、それらの遺伝子産物（特に機能未知のもの）の機能解析を行う。具体的には生化学的性質や細胞内局在性、核様体形成に与える影響などについて調べる。
- (2)バクテリア染色体の高次構造に関わる染色体領域の解析; 様々な染色体の逆位変異株や分断変異株について、生細胞における核様体の構造変化の観察に加え、染色体の特定の領域（oriCや複製終点、逆位や分断を行った領域など）の局在性の変化の観察を同時に行い、核様体形成に機能する染色体領域を明らかにするとともにDNA複製・分配との関係について調べる。さらに、核様体形成に機能する染色体領域に加え、複製起点や複製終点領域、ダイマー解消のための配列特異的組換え機構、分配のためのシス配列など染色体の安定維持に必要な機構を備えた大腸菌のミニ染色体を作成し、これまでの染色体研究の成果を実験モデルに仕上げる。

〈研究期間の成果〉

- (1) migS配列と相互作用する因子を発見し、その遺伝子破壊株を作成した。これら破壊株では、migSの両極

移動活性が見られなかったことから、migSに機能に関与するものと考えられる。一つは新規遺伝子であったが、残りは電子伝達系の1番目の酵素であるComplexIのサブユニットの一つであるnuoG遺伝子によるものであった。

- (2) 染色体工学的手法を使って、大腸菌染色体に大規模でかつ体系的な逆位を導入した一連の変異株を作成した。染色体のoriC-difの中心軸で逆位を起こした変異株では、染色体の分配に異常が生じ、高頻度で無核細胞が出現した。しかも、逆位の位置によってdifの部位がOriドメインに近接する変異（83minと35min領域での逆位；Inv[84-35]）と、そうならずdifが残るような逆位変異（83minと33min領域での逆位；Inv[84-33]）では、無核細胞の発生頻度が11.7%と37.1%と非常に異なっていた。これら逆位変異において、Terドメイン内での複製フォーク停止活性、いわゆるTer活性が影響しているか否か検証するため、Ter活性に必須のtus遺伝子の破壊変異を導入した。その結果、Inv[84-35]逆位では36.7%と無核細胞が増えた。一方、Inv[84-33]逆位では、ほぼ影響を受けなかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

染色体複製や分配では細胞膜はその機能や調整に関与すると考えられてきたが、直接的にその関係を示す因子について明らかにされた例は少ない。NuoGという膜局在タンパクが染色体移動に関与するという成果はその点mで注目を浴びている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

逆位変異株では、複製フォークの停止が、染色体の複製倍加の速度を規定する。複製フォークの停止が解除され、染色体の倍加時間が早まることが複製した染色体の核様体へ再構成を乱し、その結果として染色体分配の異常を招くのではないかと推察される。このモデルを検証するため、これら逆位変異株での複製起点領域の分配・移動を解析することを試みたが、モデルを検証できなかった。

〈今後の課題〉

migS配列と相互作用する因子の分子機能についてさらに解き明かす。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

403011521 Ymaichi,y,and Niki,H.,migS,a cis-acting sit that affects bipolar positioning of oriC on the Escherichia coli chromosome,EMBO J.,23,221-233