

バクテリアの多様なparAB分配遺伝子の基本分子機構の研究

●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〉

バクテリアのプラスミドDNAは独自の分配機構により娘細胞へと正確に分配されている。これにはParA, ParBとよばれるDNA結合性タンパクとプラスミド分配においてセントロメアとして機能するDNA領域が必須である。parAB遺伝子および分配のシス機能DNA領域は一つのオペロンとしてプラスミドやファージなどの染色体外因子の上に見出されてきた。バクテリアゲノムの解析はさらにこれらがバクテリアの染色体上にも広く保存されていることを明らかにした。この分配過程において、細胞中央部に局在していたプラスミドDNAが複製後、細胞長の1/4と3/4に移動し、細胞が分裂するまでこの位置に局在することが知られている。本研究課題ではParABタンパクの分配におけるこの局在と移動の機構、さらにその局在に関する宿主因子の解析を目的とした

〈研究開始時の研究計画〉

parAB遺伝子がプラスミドDNAの局在やその移動にどのような役割をはたしているか明らかにするため、parAB遺伝子の欠損下でプラスミドDNA分子がどのような細胞内局在をしているのか蛍光in situハイブリダイゼーションで調べる。

枯草菌のparABC遺伝子セット、soj, spoOJ, parSが大腸菌でも機能しプラスミドDNAが細胞の中央部と1/4と3/4に局在することを明らかにしている。さらに、他のバクテリアで見ついているこれらのファミリーのメンバーが同じく大腸菌で機能するか調べる。

プラスミドDNAは細胞内の特定の部位に局在化している。このとき、なんらかの宿主因子を認識し結合しているものと考えられている。この宿主因子を明かにする目的でTwo HybridシステムによりParABタンパク質と相互作用する大腸菌の染色体由来のタンパク質を検出する。

〈研究期間の成果〉

parAとparB遺伝子どちらか一方でも欠損した場合、どちらも、分配機能を全くもたないプラスミドと同等の宿主細胞保持率に低下する。しかしながら、プラスミドDNAの細胞内局在性は両者で全く異なっていた。parA欠損プラスミドでは細胞端の細胞質部分に位置する傾向にあった。これは分配遺伝子を全くもたない場合の細胞内分布と同じであった。一方、parB欠損プラスミドは正常な分配遺伝子をもつプラスミドと同様に細胞内中央部に局在するが、細胞中央部から1/4, 3/4部位への移動が阻害され正常な分配ができなくなっていた。このことから、ParBタンパク質が細胞中央部の細胞内の特定の位置にparC領域を介してプラスミドDNAを局在されていることが示唆された。このような現象はFプラスミド、P1ファージのどちらかの分配機構でも観察されParBの共通した役割と考えられる。

Vibrio cholerae, *Deiococcus radiodurans* 染色体ではそれぞれ2組と4組のparAB遺伝子がゲノム解析から見出されている。これら計6組のparAB遺伝子をPCRクローニ

ングして、プラスミドでの分配活性を大腸菌で調べた。これらのparAB遺伝子を持つプラスミドはいずれも容易に宿主細胞から脱落しプラスミドの分配機能は見出されなかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

分配遺伝子の変異により、プラスミドの局在性が異なっていることを初めて明らかにし、分配遺伝子の細胞内での役割について新しい知見をもたらした。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

他のバクテリア染色体由来のparABC遺伝子が必ずしも大腸菌内でプラスミド分配機構を発揮しなかった。これは単に遺伝子発現の問題もあるので、遺伝子発現を大腸菌の中で制御しながら分配活性を調べる必要がある。また、分配のシス機能部位に関しては全くといっていいほど共通する配列はなく、ただparB遺伝子下流に位置するという大腸菌の染色体外因子で見出されてきた特徴をもとに想定して調べているに過ぎない。そのため、分配のシス機能部位を同定する方法を開発する必要である。宿主因子の探索は準備がすすまず、計画が遂行できなかった。あらたにバクテリアでのTwo Hybridシステムが開発されており、これは本研究に有効であると考えられる。これを導入して本格的な探索を進めたい。

〈今後の課題〉

プラスミド分配の宿主因子の探索は長年多くの研究者が試みてきた課題である。より新たな実験技術を導入して因子の発見につなげたい。また、分配機構の解明にはDNAの動きとParABタンパク質の細胞内同時観察が必須と思われる。GFPタンパク質を使いこれを実現したいと思う。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

T.Inagawa, J.Kato, H.Niki, K.Karata, T.Ogura: Defective plasmid partition in ftsH mutants of *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics* 265, 755-762, 2001