

# プロテオバクテリアにおけるメチル化DNA関連遺伝子群の網羅的研究

●平賀壮太

熊本大学発生医学研究センター

プロテオバクテリアγサブグループ内の大腸菌近縁の細菌種のみが持つ遺伝子を中心にして、大腸菌染色体分配の分子機構について研究を行い下記のことを明らかにした。

1. 染色体DNAの複製の開始の調節機構に関与する半メチル化GATCに特異的に結合するSeqAタンパク質は複製開始タンパク質DnaAが半メチル化oriC領域のDnaAボックスに結合することを競合的に強く阻害することにより、複製の再開をしばらく抑制する。
2. SeqAは細胞内でクラスターを作って存在するが、このクラスターは複製フォークの半メチル化DNAに結合したSeqA分子の集合体であることを証明した。SeqAクラスターはDNA複製が開始すると細胞中心に現われ、複製途中で2分裂してそれぞれ細胞長の1/4, 3/4の位置に短時間の内に移動する。5BUDRでパルス標識した新生DNAの蛍光焦点とSeqAの蛍光焦点は一致する。DNAアデニンメチラーゼ欠損株ではSeqAは核様体に広く分布する。複製開始を同調した系をクロマチン免疫沈降法で解析して、二方向性の複製フォークの進行に伴い次々と複製直後のDNAが抗SeqA抗体と沈降することがわかった。
3. DNAポリメラーゼIIIホロ酵素のβサブユニット(DnaN, DNAスライディングクランプ)はDNA複製をしていない細胞では、細胞端に近いサイトゾール領域に存在するが、複製の開始とともに細胞中心に集まってきた、SeqA焦点が2分裂して1/4, 3/4の細胞内位置に移動する時期には同じく1/4, 3/4の位置に2つの蛍光焦点として存在していた。この実験は、高温感受性dnaC(DnaB DNAヘリカーゼのローディングタンパク質)変異株を使い、染色体DNA複製を同調して1回だけ行わせた系で解析したものである。したがって、この実験結果はoriCから開始した2方向の複製のための2組の複製装置が複製途中で2つに分かれ1/4, 3/4の位置に移動するという先に我々が提出したTranslocating Replication Factoriesモデルを支持するものである。
4. 染色体の分配に必須なMukFEBタンパク複合体とMukBタンパクの分子形態を電顕により解析しMukF

とMukEがMukBの両端の球状ドメインに結合することが明らかになった(生物分子工学研究所の森川耿博士らとの共同研究)。

5. 我々は先にフローサイトメーターで測定した細胞当りのoriCの平均コピー数とFISH法によるoriCの蛍光焦点の平均数との間に大きな差があることを報告した。今回、複製の同調系においてoriCおよび他の染色体領域をFISH法で解析し、複製後に姉妹染色体が接着(cohesion)している現象をバクテリアで初めて発見した。この接着した姉妹染色体の解離はSeqA焦点の2分裂の後、複製の後期に起った。DNAアデニンメチラーゼ欠損株でも姉妹染色体の接着は観察されたので、SeqA等の半メチル化GATC配列結合タンパク質はこの現象に関しない。一方、mukB欠損株では、姉妹染色体の接着は観察されなかった。
6. MukB-GFP隔合タンパク質は核様体に広く分布するが、一部が2ヶまたは4ヶの蛍光焦点として存在していた。新生細胞ではMukB-GFPの焦点が2ヶでSeqAの焦点は1ヶであった。細胞分裂前の細胞は4ヶのMukB-GFP焦点と2ヶのSeqA焦点を持っていた。このMukB-GFP焦点の機能については今後の課題である。
7. 理化学研究所の胡桃坂仁志博士らとの共同研究でSeqAの結晶化に成功して構造解析を行った。

## 成果公表リスト

1. Ohsumi, K., Yamazoe, M., and Hiraga, S. (2001) Different localization of SeqA-bound nascent DNA clusters and MukF-MukE-MukB complex in *Escherichia coli* cells. *Mol. Microbiol.* 40,835-845.
2. Onogi, T., Ohsumi, K., Katayama, T., and Hiraga, S. (2001) Replication-dependent recruitment of the β-subunit of DNA polymerase III from cytosolic spaces to replication forks in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184,867-870.
3. Kawakami, H., Iwura, T., Takata, M., Sekimizu, K., Hiraga, S., and Katayama, T. (2001) Arrest of cell division and nucleoid partition by genetic alterations in the sliding clamp of the replicase and in DnaA. *Mol. Genet. Genomics* 266, 167-179.
4. Sunako, Y., Onogi, T., and Hiraga, S. (2001) Sister chromosome cohesion of *Escheirchia coli*. *Mol. Microbiol.* 42, 1233-1241.