

氏 名 久田香織

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1159 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 19 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 大腸菌セントロメア様配列 migS を介した染色体分配時の
両極性移動に対する呼吸鎖複合体 I の遺伝子群の遺伝的影響に関する研究

論文審査委員 主 査 教授 嶋本 伸雄
教授 荒木 弘之
准教授 深川 竜郎
助教 岡田 聖裕
教授 秋山 芳展(京都大学)

論文内容の要旨

細胞が自身を複製し増殖するにあたり、最も基本的かつ重要な事柄に、遺伝情報を失うことなく安定に伝えるということがあげられる。遺伝情報は染色体を媒体として受け継がれてゆく。従って、染色体がいかんして娘細胞に受け継がれていくかという問題は生命の仕組みに直結した、重要な問題である。真核生物においては、その仕組みやこれに関わる因子が多数報告され解明がすすめられつつある。一方、真核生物よりも原始的な細胞構成である原核生物においては、どのようにして染色体が受け渡されているのかほとんど明らかになっていない。

仮説として、細胞膜の伸長とともに染色体が分配されていくという考えがまず、提唱された。この仮説では、複製起点である *oriC* が細胞膜に結合し、細胞の伸長に伴い受動的に細胞の両極へ分配されると仮定されていた。これは当時、真核細胞のような細胞骨格を持たないと考えられていたため、膜の伸長を染色体の分配装置と見なした。従って、膜に染色体が局在して機能するという考えは、合理的と思われた。実際、実験的に大腸菌細胞分画実験において *oriC* が細胞膜画分に検出されたことから、この仮説は長い間支持されてきた。しかし、その後の研究により、膜の生合成において方向性がない事、*oriC* 自身には染色体分配機能がない事、*oriC* の移動速度が膜の伸長速度よりもおよそ 10 倍速い事などが次々と実証され、その再考が起こった。さらに近年、染色体の特定領域を可視化する技術の進歩により、細胞の中の *oriC* 及び複製終結領域 (*TerC*) の局在に特異性がみられることや、複製された *oriC* が速やかに細胞の両極に移動することが明らかになった。これらの結果から、大腸菌の染色体分配には細胞膜の伸長とは異なる何らかの能動的な機構が関与している事が明らかになった。さらに、*oriC* 自身には染色体分配能がないものの、*oriC* 近傍領域内に染色体の分配に関わる機能性塩基配列が存在する事が示唆された。その結果、*oriC* の細胞両極性移動に関わる機能性塩基配列 *migS* が同定され、原核生物のセントロメア様配列である事が示された。現在の大腸菌の染色体の分配の考えでは、細胞中心に位置する複製装置による複製後の染色体の押し出し力と、セントロメア様配列 *migS* による細胞両極への方向づけ及び局在化、コンデンシンなどによる染色体凝縮の引っ張り力らが協調して働き、染色体分配を可能にしているものと推測される。しかし、*migS* 配列がどのような機構により娘染色体を細胞両極へ移動させるのか、また染色体がどのようにして特異的な局在を維持できるのかは未だ不明である。

大腸菌セントロメア様配列 *migS* と結合する蛋白質として、呼吸鎖複合体 I の触媒領域を構成するサブユニットである NuoG 蛋白質が単離されていた。本研究では *nuoG* 遺伝子の欠失株を作製し、この遺伝子産物と *migS* 配列による大腸菌の *oriC* の細胞両極性移動との関連を調べた。その結果、*nuoG* の欠失株においては *oriC* の細胞両極への分配が影響され、NuoG 蛋白質が *oriC* の細胞両極性移動に関与していることを明らかにした。さらに、*migS* 配列と *nuoG* 遺伝子の二重欠失株において、それぞれを単独で欠失させた時とほぼ同程度の *oriC* の分配異常が認められた。このことは、NuoG 蛋白質と *migS* 配列が相互作用しながら *oriC* の移動に働くことを強く示唆する。

大腸菌の呼吸鎖複合体 I は 13 個のサブユニットからなる巨大なタンパク質複合体である。*nuoG* 以外のサブユニットについてそれぞれの遺伝子欠失株も作製し、*oriC* の分配能の有無を調べた。その結果、*nuoA*、*CD* (*nuoCD* は一つの遺伝子)、*E*、*F*、*K*、*N* 遺伝子の欠失株にも IBP (染色体分離指数、Index of Bipolar Positioning) を指標とした *oriC* の細胞両極への移動の異常が見られた。呼吸鎖複合体 I の推定構造から、これらのサブユニットは膜領域 (NuoA、NuoK、NuoN)、コネクタ領域 (NuoCD)、触媒領域 (NuoE、NuoF、NuoG) をそれぞれ形成している。また、これらのサブユニットは、呼吸鎖複合体 I の中でさらにサブ複合体として会合していると予想される。従って、細胞質に露出している NuoG サブユニット単独で染色体の細胞両極性移動に関与しているというよりはむしろ、NuoG 蛋白質が、これらのサブユニット (NuoA、CD、E、F、K、N) と会合して細胞膜にアンカーされることが *migS* 配列を介した *oriC* の細胞両極性移動に機能しているのではない

かと考えられる。しかしながら、この仮説を証明するために、さらに単独では欠失しても *oriC* の分配に異常を示さなかった連結領域の NuoB、NuoI サブユニットに注目した。*nuoB* と *nuoI* 遺伝子の二重欠失株を作製し、*oriC* の分配能を調べた。その結果、*oriC* の細胞両極への移動に異常が見られた。従って、*migS* を介した *oriC* の細胞両極性移動に機能するには NuoG 蛋白質が細胞膜に留められることが必要であると考えられる。

また、大腸菌呼吸鎖複合体 I の 13 個サブユニットの中、NuoB、NuoH、NuoI、NuoJ、NuoL、NuoM サブユニットの欠失株においては、*oriC* の細胞両極への移動に異常が見られなかった。また *oriC* の分配異常で見たところ、*oriC* の分配異常は、NuoG 蛋白質の相対発現量の差に依存しなかった。また、これまでの報告と同様に呼吸鎖複合体 I を構成する 13 のサブユニットのいずれを欠失させても呼吸鎖の機能は失われていた。従って、呼吸鎖複合体 I において、*migS* を介した *oriC* の細胞両極性移動と呼吸鎖の機能は独立した別の機能であると考えられる。

旧来より染色体分配に膜あるいは膜蛋白質が関与しているという考えは強く示唆されていたが、それを実証するような染色体分配に関連する因子が未だ同定されていない。本研究において、初めて膜蛋白質である呼吸鎖複合体 I の一部分が *oriC* の細胞両極性移動に関与しているという事が明らかになり、染色体分配と細胞膜の関係が今後明らかにされてゆくものと期待される。

論文の審査結果の要旨

染色体は細胞分裂に伴って、正確に分配される。大腸菌では、DNA複製が始まると、複製開始点付近が最初に細胞の両極に移動し、複製の完了と共に全ゲノムが両極に分布されることが知られており、近年、大腸菌において、最初の両極への移動に必要な25 bpのDNA配列 *migS* が分離されている。しかし、*migS* が細胞内を移動する機構については全く未知であった。久田香織さんは、この機構に呼吸鎖複合体Iにかかわるタンパク質NuoGを含む複合体が、*migS* の移動に重要な役割を果たすという、多くの研究者が予想することができなかった重要な発見を行い、今後の染色体分配研究の指針になりうる研究をおこなった。

久田さんは、まず、大腸菌の複製開始点を可視化して、染色体の分配過程を顕微鏡観察し、*migS* の両極への移動を数値化してIndex of Bipolar Positioning (IBP) という指標を用いた。次に、*migS* DNAによるpull-down assayで候補としてあげられていた数個のタンパク質の遺伝子欠失変異体を選んで、IBPの値を検討し、残った2つの候補のうち*nuoG*を選んで研究を行った。*nuoG*は、13種の呼吸鎖複合体Iを構成するタンパク質をコードする*nuo*オペロンの中間に存在する遺伝子である。二つ以上の遺伝子を含むoperonの欠失株では、欠失遺伝子から下流の遺伝子の発現が、欠失の極性効果として乱されることがあるので、13種の*nuo*遺伝子に対して、極性効果のないin-frame 欠失株を作成してIBPを測定した。その結果、IBPの値が野生株より大きく変動する欠失遺伝子の産物は、電子顕微鏡での1粒子解析とクロスリンキング等により推定されていた、呼吸鎖複合体Iの細胞質側に出ている部分に多かった。一方、膜内に埋もれていると考えられている成分には、遺伝子の欠失によって、IBPが変動しないものが複数あった。また、細胞質に出ている部分と膜内部分とのリンカーと考えられているNuoBとNuoIにおいては、各々単一の遺伝子欠失株ではIBPは野生株に近いが、二重欠失株では、*nuoG*や*migS*の欠失株に近い値になることを見いだした。これらの結果は、NuoGを含む呼吸鎖複合体Iの細胞質部分が*migS*の標的の一部を構成していて、細胞内の移動の足場を与えている、というモデルにconsistentである。

次に、これらの*migS*の移動を支える*nuo*遺伝子群が呼吸鎖複合体Iの機能を要求するかどうかを、呼吸鎖複合体Iの活性測定法の一つである swarm plate assay を、*nuo*欠失株に用いたところ、IBPが異常を示さない*nuo*欠失株でも呼吸鎖複合体Iの活性が無いものが存在した。このことは、NuoG複合体の呼吸と*migS*の移動という2つの機能は独立していることを示唆する。

彼女はさらに、呼吸機能を維持しているNuoG-GFPが細胞内でラセン構造体を形成することを見いだした。このことは、低コピーplasmidの分配において、分配に必須の因子が類似したラセンを形成していることが発見されている現在、バクテリアの染色体分配において、移動のルールとモーターが何であるかという重要な問題のヒントになりうる研究である。

以上の久田さんによる研究は、学位の要件と水準を満たすものであることを確認した。