

Title	バクテリアDNA複製開始蛋白DnaAに関する比較分子遺伝学的考察
Author(s)	藤田, 眞幸
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37788
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	藤	田	真	幸
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9813	号	
学位授与の日付	平成3年5月28日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文名	バクテリアDNA複製開始蛋白DnaAに関する比較分子遺伝学的考察			
論文審査委員	(主査)			
	教授	松本	圭史	
	(副査)			
	教授	吉川	寛	教授 北村 幸彦

論文内容の要旨

〔目的〕

細胞増殖調節機構の解明は悪性腫瘍の研究における重要な課題であるが、その中でも、DNAの複製、特に複製開始機構に関する研究は中心的課題である。大腸菌のDNA複製開始蛋白であるDnaAは染色体上にある複製開始点 (*oriC*) に存在するTTATCCACAを基本とする配列：DnaA-box に結合し、複製を開始することが知られている。一方、枯草菌の複製開始領域の研究からもDnaA蛋白が独自に見いだされ、周辺領域の遺伝子構造も大腸菌と同じであることが明かとなっている。また枯草菌では*dnaA*周辺にDnaA-boxクラスターからなる大腸菌の*oriC*とよく似た構造が認められている。このような事実から、DnaAとDnaA-boxの相互作用による複製開始機構は細菌における普遍的な機構ではないかと考えた。細菌系統樹は大きく3つの枝に分けられるが、今回、グラム陰性菌の大腸菌、lowGCグラム陽性菌の枯草菌に加えて、もう1つの大きな枝であるhighGCグラム陽性菌に属するマイクロコッカス、大腸菌と近縁種であるシュードモナス、また、ゲノム構造が最も単純化されたと考えられる寄生細菌のマイコプラズマ (lowGCグラム陽性菌) から*dnaA*遺伝子領域のクローニングを行い、この領域の細菌間における普遍性および多様性について検討した。

〔方法〕

大腸菌*dnaA*構造遺伝子DNA断片をプローブとして用い、シュードモナスDNAから*dnaA*相同配列および周辺領域を含む2断片をクローニングし、合わせて約4.2kbの部分について塩基配列決定を行った。また、同様の方法でマイクロコッカスからも*dnaA*領域を含む3断片をクローニングし、合わ

せて約4.2kbの部分について塩基配列決定を行った。また、マイクロコッカス *dnaA* 遺伝子に関しては primer extension法により転写開始部位の決定も行った。さらに、DnaA蛋白内に見い出される上記4細菌間でのアミノ酸共通配列（後述）に相当する合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用い、マイコプラズマからも *dnaA* 領域約2.5kbのクローニング、塩基配列決定を行った。

〔結果・考按〕

dnaA 遺伝子が5細菌の間で保存されているばかりでなく、周辺領域の遺伝子配置 (*rnpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *recF*, *gyrB*) も同じであることが明かとなった。また、各細菌で *rpmH-dnaA* 間には左右両方向へのプロモーターが確認されたが、このように多数の遺伝子の配置が細菌間で保存されている例は他に類をみない。このことは、この領域が細菌にとって必須な生理機能装置として働いていることを強く示唆するものである。これらすべての細菌では *dnaA* の上流に約300-600bp の非翻訳配列がみられるが、この部分には大腸菌を除く4細菌でDnaA-boxクラスターがみられるのに対して、大腸菌では散在する僅か3つのDnaA-boxがみられるに過ぎない。大腸菌ではDnaA-boxクラスターを *oriC* 部分にみるが、これは *dnaA* の上流約45kbに位置するものである。最近、枯草菌、シュードモナスでこれらのDnaA-boxクラスター部分が *oriC* として働くことが明かにされており、これらのことから、細菌における基本構造としては *dnaA* の近傍に *oriC* が存在する構造が考えられ、大腸菌は進化の過程で例外的に *oriC* が転座したものではないかと思われる。一方 *dnaA* の下流についてみれば、グラム陽性菌ではここにもDnaA-boxクラスターを含む非翻訳配列がみられ、これはグラム陽性・陰性菌間での特徴的な違いであると考えられる。また、それぞれについて詳細な比較をしてみると非翻訳配列の大きさやDnaA-boxクラスターの大きさ、個数は細菌間で違いがみられ、特にマイクロコッカスではDnaA-boxの基本配列はTTGTCCACAに変化していた。これらのことは、*dnaA* 蛋白の構造にみられる細菌間での多様性（後述）や複製に関与する他の蛋白の違いに関係するものであろう。

5細菌のDnaA蛋白を比較したところ、DnaAは細菌間でのアミノ酸相同性が中等度、殆ど無い、高度である3つのdomain I, II, III (dI, dII, dIII) を有することがわかった。dIIIには5細菌間で完全にアミノ酸が保存されている部分がいくつか見いだされたが、この中にはDnaAの機能に関することが明かにされているATPのbinding siteも含まれていた。一方、dIIは、細菌間でその長さも大きく異なっていた（枯草菌：49～シュードモナス：112）。また、このdomainでは塩基組成(%GC)も細菌間で大きく異なっており、強いGC/AT pressureの影響が認められた。

〔総括・展望〕

1) *dnaA* 遺伝子領域は約1万bpにわたり細菌間で例外的に強く保存されている領域であり、細菌界に普遍的な必須生理機能装置であると考えられる。2) DnaAとDnaA-boxの相互作用による複製開始機構が細菌界において普遍的なものであることが強く示唆された。また、*dnaA* 遺伝子領域の細菌における基本構造および細菌間にみられる多様性を見いだした。これらの構造的な多様性は複製にお

ける種特異性に関与するものであろう。3) DnaA 蛋白には細菌間におけるアミノ酸相同性の高い領域 (dIII) が認められたが、これらの領域のうち特に強く保存されている部分がいくつか存在しており、これらをプローブとして探索すれば、真核生物からも DNA 複製開始蛋白を同定できる可能性があるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は DnaA 蛋白と DnaA-box との相互作用による複製開始機構が細菌に普遍的な機構であることを強く示唆したものである。13 億年も前に分かれて進化してきた細菌間でこのような共通機構を見出したことは非常に注目すべきことであり、これは従来の“細菌はそれぞれ独自の複製開始機構を有する”という考え方を大きくくつがえしたものである。また、本研究では細菌の複製開始領域の基本構造や、グラム陽性菌と陰性菌間にみられる構造的多様性についても新しい知見が示されており、複製開始機構や細胞増殖調節機構の解明に貢献するのみならず、生物進化学的な研究としても大きな意義を有するものである。これらのことから、本研究は医学博士の学位を与えるに極めてふさわしいものであると考えられる。