

Title	Suppression of initiation defects of chromosome replication in <i>Bacillus subtilis</i> dnaA and oriC-deleted mutants by integration of a plasmid replicon into the chromosomes.
Author(s)	Hassan, K.M. Anwarul
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40774">https://hdl.handle.net/11094/40774</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	ハッサン ケイエム アンワール Hassan K.M. Anwarul
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 3 3 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 6 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学 位 論 文 名	Suppression of initiation defects of chromosome replication in <i>Bacillus subtilis dnaA</i> and <i>oriC</i> -deleted mutants by integration of a plasmid replicon into the chromosomes. (枯草菌 <i>dnaA</i> 変異株の integrative suppression とその性質を利用した <i>oriC</i> 欠失変異株の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 長田 重一 (副査) 教 授 花岡 文雄 教 授 杉野 明雄

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

細菌の細胞周期は主に染色体複製、染色体分配、細胞分裂の三過程から構成されている。しかし、栄養のよい培地で速く成長している細胞では DNA 合成が細胞周期を通じて行われており、1 細胞周期を真核生物の S 期、M 期のようには明確に区分できない。そのため、染色体分配や細胞分裂が染色体複製の完了に伴って開始するのか、あるいはこれら三過程が独立に進行しているのかははっきりとは分かっていない。しかし、細胞分裂により同じ大きさの娘細胞が生じ、しかも染色体がそれらに過不足なく分配されることから、これら三過程の間には厳密な協調制御機構が働いていると推測できる。原核生物の研究には歴史があり、かなり多くのことが明らかにされていると思われがちであるが、この細胞周期の協調制御系についてはまだほとんど研究されていない。私は、本来の染色体複製の開始点 (*oriC*) を欠失させた枯草菌を作成し、その後の細胞周期 (染色体分配や細胞分裂) の進行にどのような影響が現れるか検討した。

### [方法ならびに成績]

染色体複製は細胞の生存に必須であるので単純に *oriC* を欠失させることはできない。そこで、まず枯草菌で複製可能なプラスミドを染色体に組み込み、*oriC* からの複製開始が阻害されてもプラスミドの複製系に依存した染色体複製が生じることにより生存可能となる菌株の構築を行った。このように、本来の複製開始点からの複製開始阻害がプラスミドを染色体に組み込むことにより解除される現象を integrative suppression と呼ぶ。大腸菌ではこの現象が確認されているが、枯草菌では多くの研究者が試みたにも拘わらずこの現象を証明できる菌株の構築に成功していなかった。その理由の一つは、枯草菌で複製可能な多くのプラスミドがローリングサークル型の複製をすることである。そこで、 $\theta$  型複製をすると予想された納豆菌 (*Bacillus natto*) 由来の低コピー数プラスミド pLS32 (染色体当り 1-2 コピー) を、高温で染色体複製開始が特異的に阻害される枯草菌 *dnaA* 変異株の染色体 (360° のマップ上 115° の位置にある *proA* 遺伝子内) に組み込んだ。クロラムフェニコール耐性を指標に組み込み体を選択しその高温感受性を調べた結果、高温で生存可能となることが分かった。また、*oriC* からの複製開始に必要な DnaA 蛋白質を完全に欠失した

*dnaA*-null 変異株もこのプラスミドを染色体に挿入しておけば作成可能となることがわかった。このように、本研究は枯草菌でも integrative suppression の現象があることを初めて証明した。

次いで、pLS32 のこの性質を利用して本来の染色体複製開始点である *oriC* を欠失した菌株の構築を行った。枯草菌の染色体複製開始のためには *dnaA* 遺伝子上流と下流にある非コード配列部がともに必要であることがわかっていいる。これらの領域には DnaA 蛋白質の結合配列が繰り返して存在しているが、実際の複製はこの下流領域から開始する。pLS32 を *proA* 遺伝子内に組み込んだ後、この下流領域の103 bp を欠失した。欠失に伴って代わりに *EcoRI* リンカーが挿入されるように設計し、その *EcoRI* 切断部位の挿入を指標にサザン法で *oriC* の欠失を確認した。次に、染色体上の色々な位置の遺伝マーカーの遺伝子量を形質転換法を用いて定量した。その結果、*proA* 遺伝子に近いマーカーの遺伝子量が最も高く、遠ざかるにつれて左右対称的に遺伝子量は減少した。これは染色体複製が組み込んだ pLS32 から始まり、両方向に進行していることを示している。

枯草菌の孢子形成初期に染色体 DNA が母細胞から未成熟孢子へ移動することが知られている。この過程で複製開始領域は真核生物のセントロメアのように染色体移動の中心となることが示唆されている。もし *oriC* がその移動の中心として機能しているならば、今回作成した *oriC* 欠失変異株では孢子形成能が減少すると予想できる。事実、*oriC* 欠失変異株の孢子形成率は野生株の 1-5 % 程に低下していた。次に、栄養細胞増殖期の染色体分配における *oriC* の重要性を検討した。*oriC* 欠失変異株の対数増殖期細胞集団における無核細胞の割合を DAPI 染色後蛍光顕微鏡下で計測した結果、pLS32 を染色体に組み込んだだけでは野生株と同様にほとんど無核細胞を認めることができないのに対し、*oriC* の欠失に伴い対数期細胞集団の約40%の細胞が無核細胞になることが分かった。この結果は、*oriC* からの複製開始が染色体分配に重要な機能を果たしていること、また細胞分裂は染色体複製と独立に制御されていることを示唆している。今回作成した *oriC* 欠失変異株では、複製開始機構が変化する(*oriC* からプラスミド系へ)とともに複製開始点の染色体上の位置(0° から115° へ)も変化している。この変化のどちらが無核細胞形成の主要原因となっているかを調べるのが今後の課題である。

#### [総括]

1. 枯草菌で初めて integrative suppression の現象が起きることを証明した。
2. *oriC* 欠失変異株が高頻度で無核細胞を放出する現象を見出し、*oriC* からの複製開始は染色体分配を含めた細胞周期の正常な進行に重要であることを示した。

## 論文審査の結果の要旨

細菌の細胞周期は主に染色体複製、染色体分配、細胞分裂の三過程から構成され、均等な娘細胞が生じるようにこれら三過程は相互に厳密に制御されている。しかし、この協調制御系についてはまだほとんど研究されていない。ハッサンアンワル君は、染色体の複製開始点(*oriC*)が欠失した枯草菌株を作成し、その欠失が細胞周期制御に及ぼす効果を検討した。

彼は、*oriC* の代わりにプラスミドを染色体に組み込んで *oriC* 欠失株の構築に成功した。このように、*oriC* からの複製開始が阻害されても染色体に組み込まれたプラスミドの複製系を利用して染色体複製が生じ、結果として細胞が生育可能となる現象を integrative suppression と呼ぶ。大腸菌ではこの現象が知られているが、枯草菌では彼が本研究で初めて証明した。さらに、この株を解析し、非常に高頻度で染色体 DNA を持たない無核細胞(対数期細胞集団の約4割)が出現していることを見出し、*oriC* からの複製開始が染色体分配にも重要であることを示した。参考論文ではこの現象を詳細に解析し、複製開始点の染色体上の位置が染色体分配に大きく影響することを見出し、細菌ではまだ同定されていないセントロメアが *oriC* 周辺に存在する可能性を示唆した。

本論文の実験は良く考案され、しかも注意深く行われている。その結果、上述したように、いくつかの新規事実が本論文により明らかとなった。特に、彼の作成した *oriC* 欠失株は枯草菌の細胞周期制御を研究する上で重要な材料になると多くの海外の研究者が認めている。以上のことから、本論文はハッサンアンワル君の学位論文として十分な内容を含んでいると考えられる。