

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17080009

研究課題名（和文） バクテリア・セントロメア様領域の分子機能の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of microbial DNA partitioning : structure and function

研究代表者

仁木 宏典 (NIKI HIRONORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：70208122

研究成果の概要（和文）：バクテリアでは、プラスミドにセントロメア様の機能配列によるDNA分配機構が存在し、DNA分配のモデルシステムとして研究されている。プラスミドの分配機構についてその駆動メカニズムの一般性を検証したところ、SopA、ParAタンパク質によるDNA分配では、直接プラスミドを押し引きして分配移動させるというより、繊維状または核様体の上に重合中心を持ったSopAまたはParAタンパク質濃度勾配が形成され、これがDNA分配の移動方向をガイドしていると考えられる。一方、バクテリアの染色体の移動において、移動の方向性を決める機構には、新規因子としてMigPを、電子伝達系の複合体Iを構成するNuoGもまた作用因子を見いだした。MigPもNuoGは膜タンパク質であることから、膜を介したDNAの移動機構が示唆され、さらに研究を進めている。

DNAチェックポイントはDNA損傷時に細胞周期を一旦停止させる機構である。さらに、チェックポイントタンパク質がDNA修復経路そのものにも関与していることを明にした。また、菌糸形成を行なう分裂酵母の研究から、チェックポイントタンパク質であるChk1がDNA損傷に応答した菌糸誘導を起す事を見だし、チェックポイントタンパク質の新しい細胞周期制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Plasmids in bacterial cells have the centromere-based segregation system to ensure their faithful transmission to daughter cells, and is being studied as a model system for chromosome partitioning mechanism. We studied the general mechanism underlie these plasmid partitioning machineries, and found that SopA and ParA proteins do not directly pull or push plasmid DNA, but rather guide the plasmids to the right direction by making the gradient of protein concentrations. Notably, the gradient of SopA or ParA proteins were formed from the polymerizing center within the cell (SopA forms a filament within the cell, and ParA locates on the nuclear). We have been investigating transmission mechanism of bacterial chromosome as well. As the chromosome transmission guidance protein, we identified novel factor MigP and a component of the complex I of electron transport chain NuoG. both are membrane associating proteins and we expect DNA transmission mechanism could associates membrane localization.

DNA checkpoint mechanism in eukaryotic cells stops the cell cycle progression when the cell suffers from DNA damage. We identified the mechanism also affects DNA repair activities themselves besides its regulate cell cycle progression. We further studied the checkpoint mechanism in dimorphic yeast system. There we found that Chk1 could induce hypha formation in response to DNA damage, and thus we defined it as the novel cell cycle regulatory function of DNA checkpoint.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	20,100,000	0	20,100,000
2006年度	20,100,000	0	20,100,000
2007年度	20,100,000	0	20,100,000
2008年度	20,100,000	0	20,100,000
2009年度	20,100,000	0	20,100,000
総計	100,500,000	0	100,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体, 分配, DNA結合, 無核, 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

原核細胞においても、染色体やプラスミド DNA が能動的な分配機構によって娘細胞へと伝えられる。最近になって、今まで存在しないと思われていた細胞骨格タンパク質のチューブリンやアクチンのファミリーのメンバーが、実は原核細胞にも存在し、細胞質分裂や細胞形態形成に深く関わっていることが明らかになっている。この事実は、運動性のこれらの因子が原核細胞で染色体分配という動的な過程にも関与しているのではないかという考えをこの分野にもたらした。

私たちの研究室ではバクテリア染色体のセントロメアともいべき染色体移動のシス配列を世界にさががけて大腸菌に見出した (Yamaichi & Niki, 2004 EMBO. J)。わずか 25bp という配列ではあるが、この配列を含む染色体領域が複製し倍加すると、細胞の両極へ方向性を持って移動することが可能となる。一方、プラスミドの SopABC 分配機構においても、同様な両極性移動があることを初めて明らかにした (Niki & Hiraga, 1997 Cell)。

細胞学的な研究手法が原核細胞の研究分野でも積極的に取り入れられ、染色体のダイナミックな動きに基づいた研究が可能となってきた。しかし、まだその動態の解析ではその時間分解能が荒く、動的な染色体の動態を捉えるまでには至っていない。

国内でバクテリア染色体分配を中心課題として研究しているグループは私たち以外にはない。一方、海外では大腸菌だけではなく、枯草菌、ビブリオ菌、カロバクターなどの原核細胞で複製や分配といった染色体動態の研究が盛んになっている。私たちの研究成果はすでに EMBO workshop や Gordon Conference で発表し、独創的な方法とその成果に関して評価されていた。特に、原核細胞の染色体分配研究にいち早く、細胞学的な手法を取り入れ、この分野で先駆的な研究を行ってきており、今後もこの分野で貢献が期待が持たれた。

2. 研究の目的

原核細胞の染色体分配機構は、真核細胞とは非常に異なると思われていた。しかし、SMC ファミリータンパク質やチューブリン・アクチンファミリータンパク質の相次ぐ発見により、このような見方も変わり、染色体分配の原始的な機構を原核細胞に見出せるのではないかと考えられるようになった。染色体分配の原始的な機構の解析から、複雑な染色体分配移動の分子機構を試験管内で再構成するということが可能となるであろう。

本研究では、染色体やプラスミドの両極への方向性と、この運動を生み出す分子機構を、DNA-タンパク質の細胞内動態解析を通じ明らかにする。また、数ミクロンのバクテリア細胞内での蛍光シグナルの観察と解析方法は、酵母細胞でのより詳細な蛍光顕微鏡観察を可能にする。特に、染色体構造が明瞭に観察できる分裂酵母の一種である *Schizosaccharomyces japonicus* にこのよう

な方法を適応し、真核染色体の遺伝細胞生物学の新しいモデル細胞を育てる。

3. 研究の方法

本研究では一分子蛍光観察技術を生細胞の観察に応用し、リアルタイムでの観察を行う。また、タンパク質と染色体を同時に観察して、染色体を動かすタンパク質因子の駆動メカニズムを解き明かすことをめざしている。この必要性は認められながらも、その困難さから今日でも成功しておらず、本研究ではこれに挑み、移動の機構を分子のレベルで説明できるようにする。このために、DNA とタンパク質を同時に生きた細胞内で、しかもリアルタイムで観察し解析する方法を新しく開発する。

4. 研究成果

本特定領域では、大腸菌を使い原核細胞における DNA 分配の移動機構を明らかにすることを旨とした。そのため生細胞内での DNA 分子とタンパク質因子をそれぞれ視覚化し、その動態の変化から、染色体やプラスミド DNA が方向性を持って移動する機構の解明を試みた。また、この方法を用いて、分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* を使った染色体や核分裂の研究を始めた。

原核生物にも細胞骨格因子が見いだされ、そのうちのひとつであるバクテリアアクチン MreB が染色体の分配に関与するという考えが出されている。MreB はそもそも細胞形態に異常をきたす変異として見いだされ、細胞極性の決定因子と考えられてきた。私たちも、新規の細胞形態制御因子である RodZ の研究から、MreB が細胞の長軸方向を決める上で重要な働きをしていることを明らかにしているが、染色体分配への寄与については今のところ確かな結果は出ていない。しかし、R1 プラスミドの分配では、バクテリアアクチンである ParM が重合し分配装置として機能していることがすでに幾つかのグループより明らかになっている。ただ、F プラスミドや P1 フェージは、また別のタイプの分配装置をもっており、その機能は不明である。私たちは F や P1 の分配を調べ、これらの DNA 分配で中心となる ATPase タンパク質の ParA について調べた。ParA による分配については、まだ未解明な点もあるが、この分配では重合化によりプラスミド DNA が押し出されるということではなく、ParA の細胞内での濃度勾配がプラスミド DNA の位置を決めているのではないかと現在は考えている。一方、バクテリアの染色体の移動において、移動の方向性を決める機構については謎が多い。大腸菌の染色体では migS 配列による極性移動が見いだされている。この配列に相互作用する因子として MigP を見いだした。MigP は、細胞極のみに分布する。また、電子伝達系の複合体 I を構成する NuoG もまた作用因子である。NuoG は膜タンパク質であることから、膜を介した DNA の移動機構が示唆され、さらに研究を進めている。

japonicus 分裂酵母では、核内の紡錘体の伸長により、核も伸長し、最終的に核膜が引き裂かれて核分裂するという、これまでにない様式であることがわかってきた。また核分裂の際に、核小体の一部が細胞質に放出されることも見いだされ、*japonicus* 分裂酵母の特異な核分裂は、核分裂の仕組みを考える上で新しい研究材料である。

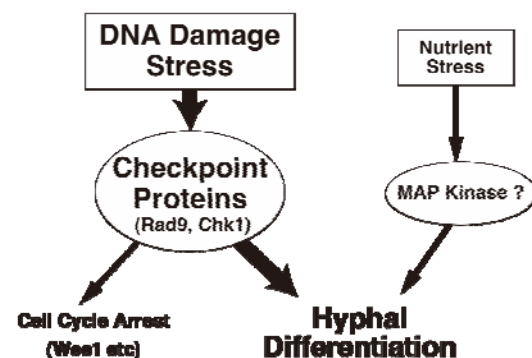
プラスミドで見つかった分配装置はタンパク質をコードする2つの遺伝子とセントロメア様のシス機能部位から構成されている。この分配機構は、未だ関連因子の実体がよく分かっていないバクテリアのセントロメア *migS* の機構を知る上で重要なモデル系である。このプラスミドの分配遺伝子群はWalker型ATPaseを含むか、あるいはアクチン型ATPaseを含むかで二分される。本研究ではWalker型ATPaseグループのプラスミドの分配の分子機構について調べてきた。FプラスミドのSopABC分配機構において、Walker型ATPaseであるSopAタンパク質を細胞内で蛍光標識タンパクとして観察すると、細胞内でらせん状の繊維状構造を形成していた。この構造には重合の中心と考えられる非常に蛍光強度の強い輝点が1ヶ所ある。しかもその輝点の細胞内局在は、一方の細胞極から他方へと周期的に変動した。この変動に対応して、プラスミドDNAはその移動方向を変えた。SopAの蛍光輝点は、バクテリアの核様体の端に位置し、核様体の端から端へとその位置を変えているようにみえる。しかし、無核細胞でのSopAの挙動を調べた結果から、これは見かけに過ぎず、核様体の端を決める細胞内の位置とたまたま同じであったことがわかった。また、バクテリアの形態形成に関わるバクテリアアクチン、MreBタンパク質も細胞内でらせん状のフィラメント形成していることから、SopAのらせん構造がMreBタンパク質に依存しているか否か問題になっていた。このためには、MreB欠損株でのSopAのらせん構造が形成を解析した。MreB欠損株でもSopAのらせん構造は形成され、MreBとは別に重合している。

プラスミドの分配に際して、細胞中央で複製されたプラスミドは速やかに将来の娘細胞の細胞中央となる細胞長の1/4、3/4の位置に移動することが観察されている。何がこのプラスミドの移動に必要な駆動力を与えているのだろうか? SopAタンパク質は、ATPase活性を有することと、またFプラスミドの両極方向への移動に必要であることから、分配の駆動力を生み出す、一種のモータータンパク質ではないかと考えられてきた。本研究でこの実証を試みた。その結果、SopA-YFPタンパク質は、細胞全体に繊維(らせん)状に構造体を形成していることが明らかになった。すなわち、SopAタンパク質は、直接プラスミドを押し引きして分配移動させるというより、プラスミドの移動の際の軌道として機能していると考えられる。同じファミリーであるが、不和合成を示さないプラスミド分配遺伝子であるP1ファージのParAについても、同様の研究を行った。これを調べる事で、分配ファミリーのメンバーの共通した機能に迫れると缶挙げられた。しかし、ParAはらせん状構造体を形成することはなく、核様体の上に不均一に分布している。最もその分布が高い領域が細胞の

中央部や細胞長の1/4と3/4の部位に形成され、ここにプラスミドは局在する。このことから、ParAファミリーは、細胞骨格様のポリマーによる駆動力の発生ではなく、ParAタンパク質の細胞内での不均一な分布を形成し、この分布状態がプラスミドの分配を担っていると思われる。S. *japonicus* による核と染色体に関する細胞生物学的研究から、核小体が分離するとき、その一部は核から取り除かれ、これは細胞中央に捨てられるという新規な知見が得られ、その生理的な意義について検討を始めた。

バクテリアの細胞で培って来たDNA-タンパク質の細胞内動態法を、酵母細胞へ応用し、染色体と核の研究に使える新しい真核細胞の細胞遺伝生物学のモデル系を開発もめざしている。分裂酵母の一種であるSchizosaccharomyces *japonicus* が、M期で3本の染色体が明瞭に観察可能であり、本研究目的に最適である。な野生株からそれぞれ接合型の異なるヘテロタリック株の分離を行った。これにより、遺伝学的な掛合せ実験が可能となった。また、公開されたS. *japonicus* ゲノム配列から、遺伝子産物のGFPなどによる標識が容易になった。本年度では、HistonH3-GFPにより、細胞周期を通じた核と染色体の動態が明らかにした。まず、染色体の凝集に続き、分離が始まる。M期後期では、核全体が紡錘形を呈し、その中に分配されていく染色体が見える。限界まで伸び切った紡錘形の核は、突然、破断を起こしそれぞれの娘染色体は細胞極へとさらに移動する。このとき、3本の染色体の一本が、別れていく娘染色体の間に、長い架橋として観察される。これは、この染色体が最後に分かれるため、実際、接着したこの染色体の末端部分が解離し、先に分離し移動したそれぞれの娘染色体へ引っ張り込まれる様子がしばしば観察される。この時、Gar2-GFPをマーカーにして核小体の分離・分配を観察してみると、核全体が紡錘形に変化するにつれて、核小体も細長く伸びる。これが、やがて中央部に2つに分離する。この核小体の位置と形の変化は、最後に分離する染色体の位置と形によく一致する。すなわち、この染色体を中心として核小体がまとわり付き、染色体の分配と共に核小体は分離・分配されている。

この分裂酵母は、菌糸へと分化する。これまでは、栄養条件による分化の誘導が知られていたが、DNA損傷により、Chk1の活性化による経路があることを新しく見いだした。そのため、カンプトテシンの添加により、容易に菌糸誘導が可能となり、菌糸の分化を研究する上で有用な系である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件) 記載全て査読有り

1. Furuya K, Niki H. The DNA damage checkpoint regulates a transition between yeast and hyphal growth in *Schizosaccharomyces japonicus*. *Mol. Cell. Biol.* **30**:2909–2917, 2010
2. Janakiraman, A., Fixen, K.R., Gray, A.N. Niki, H., Goldberg, M.B. A genome-scale proteomic screen identifies a role for DnaK in chaperoning of polar autotransporters in *Shigella*. *J. Bacteriol.* **191**: 6300–6311, 2009
3. Nozaki S, Niki, H., Ogawa, T. Replication initiator DnaA of *Escherichia coli* changes its assembly form on the replication origin during the cell cycle. *J. Bacteriol.* **191**: 4807–4814, 2009
4. Shiomi, D., Mori, H., and Niki, H. Genetic mechanism regulating bacterial cell shape and metabolism. *Communicative & Integrative Biology*, **3**号2巻、2009、219–220
5. Furuya, K., and NIKI, H. Isolation of heterothallic haploid and auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces japonicus*. *Yeast*, **4**号26巻、2009、221–233
6. Shiomi, D, Sakai, M., Niki, H. Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *EMBO J.*, **23**号27巻、2008、3081–3091
7. Natsume T, Tsutsui Y, Sutani T, Dunleavy E, Pidoux A, Iwasaki H, Shirahige K, Allshire R, Yamao F. A DNA polymerase α accessory protein, Mcl1, is required for propagation of centromere structures in fission yeast. *PLoS ONE* **3**: e2221, 2008.
8. Haruta, N., Akamatsu, Y., Tsutsui, Y., Kurokawa, Y., Murayama, Y., Arcangioli, B., Iwasaki, H. Fission yeast Swi5 protein, a novel DNA recombination mediator. *DNA Repair (Amst)*, **1**号7巻、2008、1–9
9. Hatano, T., Yamaichi, Y., and Niki, H. Oscillating focus of SopA associated with filamentous structure guides partitioning of F plasmid. *Mol. Microbiol.* **64**: 1198–11213, 2007
10. Kai M., Furuya, K., Paderi F., Carr AM, Wang TS. Rad3-dependent phosphorylation of the checkpoint clamp regulates repair-pathway choice. *Nature Cell Biology*, **6**号9巻、2007、691–697
11. Cu, i T., Moro-oka, N., Ohsumi K., Kodama, K., Ohshima, T., Ogasawara, N., Mori, H., Wanner, B., Niki, H., and Horiuchi, T. *Escherichia coli* with a linear genome. *EMBO Rep*, **2**号8巻、2007、

181–187

12. Gerding, M. A., Ogata, Y., Pecora, N. D., Niki .H., and de Boer, PA. The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. *Mol Microbiol.* **4**号63巻、2007、1008–1025
13. Y. Akamatsu, Y. Tsutsui, T. Morishita, MD Shahjahan P Siddique, Y. Kurokawa, M. Ikeguchi, F. Yamao, B. Arcangioli, and H. Iwasaki. Fission Yeast Swi5/Sfr1 and Rhp55/Rhp57 Differentially Regulate Rhp51-dependent Recombination outcomes. *The EMBO J.*, **5**号26巻、2007、1352–1362
14. Haruta, N., Kurokawa, Y., Murayama, Y., Akamatsu, Y., Unzai, S., Tsutsui, Y., Iwasaki, H. The Swi5-Sfr1 complex stimulates Rhp51/Rad51- and Dmcl-mediated DNA strand exchange in vitro. *Nature Struct. Mole. Biol.*, **9**号13巻、2006、823–830
15. Tsutsui Y, Morishita T, Natsume T, Yamashita K, Iwasaki H, Yamao F, Shinagawa H. Genetic and physical interactions between *Schizosaccharomyces pombe* Mcl1 and Rad2, Dna2 and DNA polymerase α : evidence for a multifunctional role of Mcl1 in DNA replication and repair. *Curr. Genet.* **48**: 34–43, 2005

[学会発表] (計 62 件)

1. Niki, H. CHK1 DEPENDENT TRANSITION OF YEAST GROWTH TO HYPHAL GROWTH IN SCHIZOSACCHAROMYCES JAPONICUS. The 5th International Fission Yeast Meeting, Pombe 2009, Tokyo, 2009. 10. 26
2. Niki, H. Segregation of nucleolus during mitosis. Gordon Research Conference "Chromosome Dynamics", Biddeford, ME, 2007. 8. 12
3. Hatano, T., Niki, H. Guidance of actively partitioning plasmid by a herical structure of the ATPase, SopA, ICGEB Workshop on chromosome duplication and segregation, Trieste, Italy, 2005. 5. 2–5

[図書] (計 2 件)

1. 柳原克彦、仁木 宏典、羊土社、原核生物の遺伝要素、2009、分子生物学イラストレイテッド 改訂第3版 75–90
2. 青木敬太、仁木宏典、共立出版、染色体の分配とM期制御、2009、蛋白質核酸酵素 3月増刊 406–408

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/NigPrjet/sensai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁木 宏典 (NIKI HIRONORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：70208122

(2) 研究分担者

筒井 康博 (TSUTSUI YASUHIRO)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・助教

研究者番号：00390625

木村 暁 (KIMURA AKATSUKI)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：10365447

古谷 寛治 (FURUYA KANJI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：90455204