

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870714

研究課題名(和文)染色体コピー数制御系の構築に向けた倍数体バクテリアDNA複製開始機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a polyploid bacterial DNA replication initiation for building of a chromosome copy number control system.

研究代表者

大谷 直人(Ohtani, Naoto)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・講師

研究者番号：70365451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアにおいて染色体のコピー数を自在に制御できる系の構築を目指し、倍数体の高度好熱菌を対象としてDNA複製開始機構の解明を試みた。複製開始に必須の領域を特定するため、ゲノムDNAライブラリーから自立的複製能を有するクローンのスクリーニング、染色体から環状DNAとしてコピーアウトした領域の複製能の検証を多数行ったが、未だ複製開始領域の特定には至っていない。一方、巨大な環状プラスミドの複製には、プラスミド上で真逆の位置にある2つの領域が必要であることを明らかにした。染色体の場合も離れて存在する複数の領域が複製開始に関わる可能性が考えられ、異なるアプローチを試みる必要が出てきた。

研究成果の概要(英文)：DNA replication initiation of an extremely thermophilic bacterium harboring multiple chromosomal copies in a cell was studied, aiming to build a chromosome copy number control system in bacteria. To identify an essential region for replication initiation on the chromosome, screening for a genomic DNA clone exhibiting autonomous replication ability was performed and the abilities of larger regions copied out of the chromosome were also examined. However, the essential region for replication initiation has not yet been identified. In this study, we have unveiled that the essential part for megaplasmid pTT27 replication consists of two regions positioned distantly on the plasmid. It implies that chromosomal replication initiation might also require distantly-positioned multiple regions on the chromosome. In this case, we must try different approaches to identify the essential region for chromosomal replication initiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：高度好熱菌 倍数性 DNA複製 メガプラスミド *Thermus thermophilus*

1. 研究開始当初の背景

『バクテリアは環状染色体を1コピーだけ有する一倍体の生物である。』大腸菌や枯草菌といったモデル生物での話が、バクテリア全体の周知の事実のように扱われている。これらのバクテリアは一倍体と単純であるが故に、モデル生物として成立したのかもかもしれない。実際のところ、シアノバクテリアの多くは細胞内に環状染色体を複数コピー持った倍数体であるし、アブラムシやゴキブリの共生細菌、ライム病を引き起こすポレリア菌、淋病菌、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii*、*Pseudomonas putida* などともそうである。放射線耐性菌として有名な *Deinococcus radiodurans* も倍数体のバクテリアで、環状染色体を複数コピー有することが放射線耐性に一役買っていると考えられている。単に調べられていないだけで、実際のところ倍数体のバクテリアは多いに違いない。理化学研究所を中心に研究が行われてきた、日本を代表するシステム生物学のモデル生物である高度好熱菌 *Thermus thermophilus* もその1つで、研究代表者はこれが倍数体のバクテリアであることを明らかにした。『バクテリアは一倍体』という固定観念によりマイナーな存在と思われがちな倍数体バクテリアは、その特徴的な複数コピーの染色体が如何にして複製され分配されるのか、未だ明らかにされていない。ランダムに分配されて不等価な染色体セットの娘細胞を生じるのかもかもしれないし、あるいは各染色体が複製と同時にそれぞれ分配されて等価な染色体セットを持った娘細胞を生じるのかもかもしれない。

大腸菌、枯草菌など一倍体のバクテリアに比べ、倍数体バクテリアの遺伝学は非常に厄介である。一倍体生物の遺伝子破壊実験では、破壊の可否を検証すれば良い。薬剤マーカーでの置換による遺伝子破壊では、薬剤耐性株が得られれば遺伝子はほぼ必ず薬剤耐性菌が出現し、見かけ上の遺伝子破壊株が得られることになる。研究代表者の経験上、生存に必須でない遺伝子の場合、容易く全コピーが破壊された株が得られる。必須遺伝子の場合、培養を繰り返しても元の遺伝子が存在し続ける。しかしながら、培養を続ける過程で対象遺伝子以外の領域にサプレッサー変異が生じ、全コピーが置換されてしまう可能性もあり得る。この場合、必須遺伝子であるはずのものが、見かけ上は必須遺伝子ではなくなってしまう、現象の解釈を複雑化させる。

倍数体バクテリアの *T. thermophilus* をモデル生物とする場合、染色体のコピー数を自在に制御することができれば遺伝学的研究が大いに進展すると期待される。しかしながら、そのような系は他の倍数体バクテリアにおいても

未だ存在していない。そのような系の確立には染色体の複製、分配機構の理解が重要と考えられる。

2. 研究の目的

そのバクテリアが一倍体なのか倍数体なのかは、現時点ではゲノム配列を決定したところで判断はつかない。従って、倍数体バクテリアの DNA 複製開始や分配に関わる特徴的な遺伝子および配列が特定できれば、それらを指標に一倍体か倍数体かの判別が可能になると予想される。あるいは、一倍体と倍数体の複製、分配メカニズムを比較することで、染色体のコピー数(倍数性)を自在に制御できる系を構築する手掛かりが掴めるかもしれない。このような系が確立できれば、バクテリアの倍数性の生理的意義の解明に繋がることは言うまでもなく、バクテリアを利用した有用物質生産(代謝)にも応用できると期待される。物質生産に関与する遺伝子が多くなると、対象とする DNA が全体として大きくなるため、プラスミド上よりも染色体上にクローニングする方がそれら遺伝子群は安定に維持されると推測される。染色体上に有用物質生産遺伝子群を集積クローニングし、染色体のコピー数を増やすことで、有用物質の生産性を向上させることが可能となるかもしれない。また、染色体のコピー数を増やすことは大規模な遺伝子重複とも言えるため、遺伝子(ゲノム)の分子進化的な研究にも応用可能となる。さらに、ライム病を引き起こすポレリア菌、淋病菌などは倍数体のバクテリアであり、他にも多くの倍数体の病原菌が存在すると考えられる。倍数体バクテリアの DNA 複製を理解することは、これら倍数体病原菌の増殖を阻害、抑制する新たな手法の開発にも繋がること期待される。

本研究課題では高度好熱菌 *T. thermophilus* を倍数体バクテリアのモデル生物とし、その複製開始領域をスクリーニングし、複製に関与する因子を特定、染色体 DNA の複製開始機構を解明することを目的とする。複製と分配は連動しているため、染色体 DNA 分配機構の解析も視野に入れつつ研究を進める。本菌を対象とするのは、1) 遺伝子組換え操作など本菌の扱いに慣れている、2) 本菌が倍数体であることを明らかにした、3) 本菌のゲノム配列のデータベースで公開されていないプラスミド(pVV8)の存在を明らかにし、配列を決定、複製開始領域を同定した、4) 本菌のメガプラスミド pTT27 の複製開始因子についての研究を進行中である、といった本研究課題遂行のための本菌に関するノウハウを、研究代表者が十分に身に付けているからである。また、*T. thermophilus* が病原菌ではないこと、日本を代表するモデル生物であるため様々なデータが蓄積されていることも魅力である。将来的には、本研究課題からの成果をバクテリアの染色体 DNA のコピー数を自在に制御できる系の構築に繋げ、バクテリアでの

有用物質生産に応用できればと考えている。

3. 研究の方法

(1)複製開始領域の特定

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB27 株の細胞内で複製できない DNA ベクター(大腸菌プラスミド)を用いて、制限酵素により断片化した高度好熱菌 DNA をクローニングし、ライブラリーを作製する。ベクターにはセレクションのための好熱菌用の薬剤耐性遺伝子を組込んでおき、複製開始領域がクローン化されたプラスミドのみが、薬剤存在下で好熱菌の形質転換体を生じるようにしておく。これを利用して、ライブラリーから複製開始領域を含むクローンを取得する。プラスミドのゲノムへの組込みを避けるため、形質転換には DNA 組換えに関わる *recA* 遺伝子を破壊した好熱菌株をホストとして用いる。以上の方法で取得できない場合には、染色体(1.85 Mbp)から 0.1 Mbp 程度のサイズの領域を環状状態でコピーアウトする手法を確立している(未発表)ので、これを利用して自立的複製能を持った 0.1 Mbp の染色体断片を取得する。いずれの方法においても、得られた断片をサブクローニングしていき、最終的に複製に必要な最小領域(ミニマムレプリコン)を特定する。

(2)複製開始領域の確認

二次元電気泳動法による複製中間体の解析を行い、(1)で特定された領域が複製開始領域に特有のパターンを示すのかを検証する。さらには、リアルタイム PCR によりゲノム領域の定量を行い、(1)で特定された領域が複製開始点であることを確認する。

(3)複製開始領域の欠失

仮に複製開始領域が複数箇所特定された場合には、その各々の欠失および多重欠失を試み、欠失の可否、各欠失株の表現型の違いなどを確認する。必要に応じて各欠失株それぞれについて(2)の解析を行う。複製開始における各領域の依存度が評価できる。

(4)複製開始領域の配列解析

特定された複製開始領域(ミニマムレプリコン)の類似配列が、他のバクテリアやアーキア、真核生物に存在するのかが調べる。特に、シアノバクテリアなどの倍数体のバクテリアにおける類似配列の有無に注意して解析を行う。繰り返し等の特徴的な配列や特殊な高次構造を形成しうる配列が含まれるか否か、さらにコードされる遺伝子についても注目する。

(5)複製開始領域の結合因子と結合領域の特定

ビオチンなどでラベルした複製開始領域の DNA を好熱菌抽出液と混合し、そのラベルを利用して複製開始領域を回収する。共に回収されるタンパク質および RNA あるいは DNA を同定する。同定された因子が実際に複製開始領域と結合するのかがどうかをゲル遅延法、フットプリ

ント法、ゲルシフトアッセイなどで検証し、結合領域を特定する。(4)の解析結果とともに、結合領域が他の生物でも特徴的に保存されているのかを考察する。ミニマムレプリコン中の遺伝子にコードされるタンパク質も結合因子の候補であり、これらについても同様の解析を行う。

(6)結合因子の機能解析

結合因子がタンパク質の場合は、大腸菌等で発現系を構築して大量に調製し、複製開始領域への結合特性などを生化学的に解析する。他の機能既知のタンパク質との相同性なども参考に解析を進めるが、相同性の低い新規のタンパク質の場合は立体構造解析による機能予測および解析も検討する。結合因子が RNA の場合は、特殊な高次構造を取りうるかなど配列の特徴を抽出する。変異導入により高次構造を変化させ、結合の変化を解析する。

(7)変異体の複製能の検討

(1)で得られたクローン(あるいはミニマムレプリコン)は *T. thermophilus* 細胞内でプラスミドのように自立的に複製できるはずである。これに含まれる(5)で明らかとなった結合領域に変異を導入し、それら変異体が細胞内で複製できるのか否かを検討する。同様の変異による *in vitro* での結合解析も行い、*in vivo* の結果との整合性を評価、検討する。あるいは(6)の結合因子(複製関連タンパク質)にアミノ酸変異を導入し、その *in vitro* での結合能と *in vivo* での複製能の整合性を同様に検証する。

(8)間接的因子の探索

複製領域に直接結合する因子以外に、これらに結合して間接的に作用する因子もあり得るため、プルダウン法などにより探索する。それらについて(6)、(7)のような解析を行う。

(9)DNA 複製開始の再構成

以上の結果に基づき、高度好熱菌の複製開始モデルを構築、*in vitro* での再構成を目指す。他の倍数体バクテリア(シアノバクテリアなど)における同様の機構の可能性を探索する。

4. 研究成果

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB27 を対象とし、細胞内に染色体を複数コピー有する倍数体バクテリアの DNA 複製開始機構の解明を目指した。高度好熱菌ゲノムの DNA ライブラリーを構築し、これを用いて高度好熱菌を形質転換することで、自立的複製能を持つ(複製開始領域を含む)クローンのスクリーニングを行った。しかしながら、形質転換体の多くは、高度好熱菌の高頻度の組換え能により、クローンがゲノム中に組込まれてしまったものであった。プラスミド状として細胞内に存在した一部のクローンも、再度形質転換を行

うと形質転換体は得られず、複製開始領域とは判断しがたい。これらについては細胞内で複製していた訳ではなく、一度ゲノムに組込まれたものがポップアウトしたものと推測される。高頻度の組換えを避けるため、DNA 組換えに関わる *recA* 遺伝子を破壊した株で同様の実験を行ったが、複製開始領域と判断できうるクローンは得られていない。

染色体から 0.1 Mbp 程度の領域を環状でコピーアウトする手法を用いて、コピーアウトされた部分に複製開始領域が含まれる場合にのみそれが複製しプラスミドとして存在するといった発想に基づき、複製開始領域の同定を試みた。しかしながら、こちらも高頻度の DNA 組換えにより、コピーアウトした領域が再度ゲノムに組込まれるという結果となり、複製開始領域の特定には至っていない。コピーアウトには DNA 組換え能が必須であり、*recA* 破壊株で行うことは不可能であるため、*recA* 遺伝子発現のオンオフを制御できるような系が必要となった。いずれにせよ、高度好熱菌の *in vivo* での DNA 組換え能は今後の高度好熱菌の遺伝学を進展させる上で非常に厄介である。

recA 遺伝子の発現を制御できる系の構築に着手した。高度好熱菌の誘導性のプロモーターについてはいくつか報告があるが、研究代表者が検討した限り、制御が厳密で使用に値する有効なものはない。したがって、*recA* 遺伝子の転写を制御するというアプローチは難しい。そのため、*recA* 遺伝子の存在自体を制御する系の構築にトライしている。高度好熱菌用のクローニングベクターの複製起点近傍に *recA* 遺伝子とマーカー遺伝子を配置し、このベクターと染色体との間の DNA 組換えにより特定領域をコピーアウトする系である。期待する DNA 組換えが起こった際には、ベクター由来の複製起点、*recA* およびマーカー遺伝子が目的の領域に置き換わる仕組みであり、宿主としては高度好熱菌 *recA* 破壊株、マーカーとしてはストレプトマイシン耐性遺伝子を用いる。この耐性遺伝子は、それが存在する限り、細胞はストレプトマイシン依存的な生育を示すと報告されたもの (*Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(16):5138-5145) を用いる。したがって、目的の組換えが生じて耐性遺伝子が消失することで、ストレプトマイシンを含まない培地で生育できるようになるため、目的の組換え体の選択が可能となるはずである。このとき同時に組換えに関わる *recA* 遺伝子も消失することとなり、*recA* の制御が実現できる。しかしながら、この論文に記載のストレプトマイシン依存的な変異体について検討を行ったが、研究代表者のところでは再現性が取れず、実現困難となっている状況である。

現在は、*recA* を条件付きで複製するベクターにクローニングし、不要となった際には複製を阻害してベクターを消失させることにより、*recA* 遺伝子が同時に消失するという系の構築を試みている。研究代表者が特定した *T.*

thermophilus HB8 の pV8 プラスミドの複製因子に変異を導入し、70 °C では複製できるが、75 °C 以上では複製できない温度感受性のプラスミドベクターを構築した(未発表)。本ベクターへの *recA* 遺伝子のクローニングが完了したところである。今後、*recA* を欠損させた高度好熱菌に導入し、その有効性を検討したい。

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB27 株には染色体の他に約 230 kbp もの巨大なプラスミドが存在する。染色体のモデルケースとして、このメガプラスミド pTT27 の複製開始領域の解析も行っている。プラスミド上の領域を段階的に欠失していくことで、pTT27 の複製に必要な最小領域(ミニマムレプリコン)を特定した。pTT27 のミニマムレプリコンは、プラスミド上で約 100 kb 離れた場所(環状プラスミド上で真逆)に位置する 2 つの領域により構成されている。一方が複製開始領域の本体であり、もう一方はサポート的な機能を担い、トランスでも作用するが、プラスミドの複製には必須である。おそらく、複製開始すなわち DNA 二本鎖の開裂には関与しないが、その後の DNA 複製の進行に何らかの機能を持っているのではないかと推測している。

高度好熱菌 *T. thermophilus* を対象とした倍数体バクテリアの DNA 複製開始機構の解明において最も重要なのは、複製開始領域を特定することである。これを是が非でも成し遂げなければ本研究課題の達成は有り得ない。残念ながら、未だその特定には至っていない。ライブラリーからのスクリーニングでは 1 クローンがカバーできる DNA サイズは数十 kb 程度であり、pTT27 メガプラスミドの解析からの知見のように、100 kb 以上も離れた距離に位置する複数の領域が複製開始に関わるような場合、この方法は有効ではない。*recA* 破壊株を用いたライブラリーからのスクリーニングでも目的のクローンを取得できていないのは、そのような理由からではないかと推測している。しかしながら、pTT27 で行ったような段階的に領域を欠失させていくというアプローチもまた、染色体上には多くの必須遺伝子が存在するため、不向きと考えられる。以上のことから、染色体から 100 kb 以上の領域をコピーアウトし、それが自立的に複製できるのかどうかを検証する方法が有効であろう。このためには *recA* 遺伝子発現が制御可能な系の構築が不可欠であり、それを早急に実現したい。

本研究の将来的な目標の 1 つとして、倍数体バクテリアの染色体複製機構を一倍体バクテリアと比較することで、細胞内の染色体のコピー数を自在に制御できる系を構築したいと考えている。メガプラスミド pTT27 の複製開始領域の解析の過程において、このプラスミドが欠落した高度好熱菌の取得に成功して

いる。詳細な解析はこれからとなるが、この pTT27 欠落株では染色体 DNA の量が野生型に比べ減少しているような傾向が見られた。pTT27 上の因子が染色体のコピー数に影響を及ぼす可能性が推測され、染色体コピー数制御系構築の布石として重要な知見となるかもしれない。

予想外に複製開始領域の特定に困難を極めているため、別のアプローチのための系の確立を余儀なくされている。そのためのツールとして、ある温度以上では複製できなくなる温度感受性プラスミドの開発、スクロース存在下で致死性を示す枯草菌 *sacB* 遺伝子を利用した遺伝子破壊株のネガティブスクリーニング系、さらに他の好熱菌由来のトキシン-アンチトキシンシステムを用いたネガティブスクリーニング系の開発を行っている。当該研究期間内では本課題の目標を達成することは出来なかったが、得られた知見や前述の開発した系を駆使し、近い将来には是が非でも倍数体バクテリアのモデルとしての高度好熱菌の DNA 複製開始領域の特定を実現し、複製開始メカニズムを解明したい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

大谷直人、富田勝、板谷光泰、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* で機能する温度感受性ベクターの構築、2014 年 11 月 25 日～27 日、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県)

大谷直人、富田勝、板谷光泰、*Thermus thermophilus* HB27 由来 233kb のメガプラスミド pTT27 のミニマルレプリコン、2013 年 12 月 2 日～9 日、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド (兵庫県)

大谷直人、富田勝、板谷光泰、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 pVV8 プラスミドの複製開始因子の同定、2013 年 9 月 10 日～14 日、第 86 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜 (神奈川県)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 直人 (OHTANI, Naoto)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任講師

研究者番号：70365451