

Subcellular dynamics of a chromosome partition factor CrfC protein in *Escherichia coli*

谷口, 紗輝

<https://hdl.handle.net/2324/2236161>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名	谷口 紗輝		
論 文 名	Subcellular dynamics of a chromosome partition factor CrfC protein in <i>Escherichia coli</i> (大腸菌の染色体分配制御因子 CrfC の細胞内動態)		
論文調査委員	主 査	九州大学	教 授 片山 勉
	副 査	九州大学	教 授 藤田雅俊
	副 査	国立遺伝学研究所	教 授 仁木宏典
	副 査	九州大学	准教授 尾崎省吾

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞が増殖するためには、遺伝情報の本体である染色体 DNA を正確に複製し、娘細胞へ均等に分配することが必須である。そのため染色体の分配過程は、原核生物、真核生物を問わず厳密に制御されている。また染色体分配のためには、多種多様なタンパク質が必要であり、しかも、それらの高次構造の形成や細胞内局在性の制御が重要である。染色体分配の異常は、染色体の異数化などの染色体異常を引き起こし、細胞死やがんなどの重篤な疾病の原因となる。そのため、染色体分配機構に関連するタンパク質因子の細胞内動態をより詳細に解明することは、生物学および薬学的に高い意義をもつ。

本論文では、分子生物学的解析に適したモデル生物である大腸菌を対象としている。大腸菌などの原核生物の染色体 DNA は、超らせん構造や多種の DNA 結合タンパク質の結合により凝集し核様体と呼ばれる高次構造体を形成する。そのような DNA 結合タンパク質として、核様体構成タンパク質 (H-NS、HU、IHF、Dps 等) に加えて、染色体コンデンシン因子 MukB、染色体 Ter マクロドメイン形成因子 MatP、および、細胞分裂の収縮環形成因子 FtsZ の制御因子 SlmA 等がそれぞれ重要な役割を持つことが知られている。

染色体の分配は DNA 複製とも共役している。例えば新生された姉妹 DNA 鎖の接着は DNA 複製と共役して起るが、これは分配機構に必須の動態である。大腸菌では染色体の複製開始点 *oriC* で複製開始タンパク質 DnaA と DNA 屈曲因子 IHF により複製開始反応が進み、形成された姉妹レプリソームおよび新生 DNA 領域は、細胞中央で一過的に共局在する。レプリソームの DNA 結合因子である β クランプは DNA 合成の後もしばらく新生 DNA 上に残留する。近年、新規の β クランプ結合タンパク質 CrfC が、核様体の配置および分配の制御因子であることが明らかとなった。CrfC はダイナミンタンパク質のホモログであり、N 末端領域にダイナミン様 GTP アーゼドメインおよび β クランプ結合モチーフをもつ。CrfC は細胞中央において β クランプとの結合を介して新生 DNA 領域と共局在し、一過的な姉妹レプリソームの共局在を支える。これが姉妹染色体の均等分配に必須となる。加えて、CrfC は、細胞両極近傍にも安定に局在するが、その局在メカニズムおよび CrfC の機能は不明である。

本論文では、細胞両極近傍への CrfC の局在メカニズムを解明するため、まず蛍光標識した CrfC と HU α サブユニットを新たに作成し、CrfC と核様体の細胞内動態を詳しく調べた。その結果、8~9 割の細胞で、CrfC 輝点は核様体両端かそのごく近傍に局在することがわかった。次に、CrfC の局在を制御するのは、「核様体」なのか「細胞極」なのか検討するため、遺伝子変異や細胞分裂阻害剤で生じた伸長細胞での CrfC の細胞内局在を調べた。その結果、細胞中央に核様体を 1 つ持つ伸長細胞においても CrfC は野

生型細胞と同程度の割合で核様体の端近傍に局在した。これらの結果から、CrfC は核様体を認識してその端近傍に局在していることが示唆された。

さらに本論文では、「CrfC は核様体の高次構造を認識して核様体の端に局在する」という独自の作業仮説を設け、核様体の構造形成に関わる DNA 結合タンパク質の欠失によって CrfC の局在に異常が生じるか詳しく調べた。その結果、まず、MukB、および、HUβサブユニットそれぞれの欠失変異株では、細胞あたりの CrfC 輝点数が野生株より減少していることがわかった。さらに、HUβサブユニット、および、SlmA それぞれの欠失変異株では、CrfC の核様体端への局在が阻害されていた。加えて、H-NS 欠失変異株では、CrfC が輝点を形成せずに核様体全体に存在した。この欠失株では *crfC* mRNA 量が野生株の約 20 倍に増加していた。IHF, Dps, MatP それぞれの欠失変異株では顕著な異常は見られなかった。H-NS 変異株以外では、*crfC* mRNA 量は野生株と同程度であった。

DNA 複製の影響を調べるため、各因子の欠失と DnaA 高温感受性変異の二重変異株を作成し、高温で CrfC 局在を観察した。その結果、HUβサブユニットまたは SlmA を欠失した二重変異株では CrfC が輝点を形成せずに拡散することがわかった。一方、同じく複製開始に関わる DnaC タンパク質の高温感受性変異との二重変異株では、そのような異常は生じなかった。これらの結果から、DNA 複製ではなく、DnaA が CrfC の局在制御を促進できることが示唆された。

最後に CrfC の部分欠失変異を体系的に作成して CrfC 局在を観察した結果、CrfC の C 末領域の一部が、核様体両端への CrfC 局在に必須であることがわかった。一方、βクランプ結合部位や GTP アーゼドメインをもつ CrfC の N 末領域は核様体両端への局在に不要であった。

総括して本論文では、CrfC は特異的な DNA 結合タンパク質または DNA 高次構造との相互作用を介して核様体の両端に局在するという分子機構が提案された。さらに、局在の分子機構には、(1) CrfC 分子の集合、および、(2) 核様体の端へのリクルート、という 2 段階の反応があることが考察された。まず CrfC 分子の集合には、H-NS による CrfC の量的制御のほか、H-NS, HU, MukB により形成される特異的な DNA 高次構造が重要と考察され具体的なモデルも提案された。この段階には DnaA が直接、あるいは、間接的な促進機能を持つ可能性も示された。次のリクルート段階には HU と SlmA とによって形成される核様体両端での局所構造の重要性が考察され具体的なモデルも提案された。加えて CrfC の C 末部位については、ダイナミンファミリーの機能構造の比較解析に基づき、C 末部位の機能構造が局在性を制御する多様性を持つことが考察された。

以上の本論文における結果および考察は、染色体やタンパク質の細胞内動態の理解において新規性や独創性をもつものであり、基礎薬学および生命科学の進展にとって重要な貢献をなすものである。よって本学位請求論文は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。