

氏 名	村 上 昭 弘
生 年 月 日	
本 籍	愛媛県
学 位 の 種 類	博士 (薬学)
学 位 記 番 号	博甲第221号
学位授与の日付	平成9年3月31日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	プラスミドpSC101の複製開始機構の研究：蛋白結合による複製開始領域の構造変化
論文審査委員	(主査) 山口 和男 (副査) 大場 義樹, 正宗 行人, 中西 義信, 山下 克美

学位論文要旨

A basic replicon of the plasmid pSC101 is composed of three genetic elements: the replication origin (*ori*); the *rep* gene encoding the replication initiator protein, Rep; and the *par* region required for stable maintenance of the plasmid in growing bacterial cells. The replication of pSC101 requires DnaA and IHF encoded by the host cell, and the DnaA binding site (DnaA box) and IHF binding site (IHF box) is located in the *ori*. Furthermore, the *ori* region contains three directed repeat sequences (DR-1 to DR-3) and two inverted repeat sequences (IR-1 and IR-2). The Rep exists in two forms of monomer and dimer *in vivo*. The monomer and dimer bind to three DRs and two IRs, respectively. The Rep monomer bound noncooperatively to three DRs and induced bending of the DNA helix axis in the same direction (about 100°). It is well known that IHF also strongly bends DNA at the IHF box in the *ori*. An AT-rich region between IHF box and DR-1 enhanced DNA bending by not only IHF but also the Rep protein. These Results suggest that these two DNA binding proteins and the DNA element cooperatively function for DNA bending in the replication origin. Furthermore, a Rep mutant (Rep^{IHF}) which can replicate in IHF-deficient host cells bent DNA more strongly than did the wild type Rep but required both enhancer regions, *par* and IR-1, in addition to “core-ori

” as a minimal essential *ori*, whereas only one of these two enhancer was necessary for the wild type Rep-dependent replication.

(目的) DNAの複製は、生命の連続性を維持するために厳密に制御されており、この複製開始のメカニズムを解析する有効なモデル系として、バクテリア細胞内で自律増殖するプラスミドが知られている。本研究では、プラスミドpSC101を実験材料に、その複製開始機構を研究した。

プラスミドpSC101のレプリコンは、3つの遺伝的要素から成る。すなわち、複製起点(*ori*)、複製開始蛋白質(Rep)をコードする*rep*遺伝子、そしてプラスミドの安定な分配に必要とされる*par*領域である。そして、*ori*領域には、宿主由来でpSC101の複製に必要なDnaA蛋白やIHF蛋白が結合する部位(DnaA box, IHF box)が含まれ、さらに3個の反復配列(DR-1, DR-2, DR-3)と2個の逆反復配列(IR-1, IR-2)を含んでいる。また、Rep蛋白質は、宿主細胞内では、モノマーとダイマーの2種類の形態で存在することが知られている。Repモノマーは、3個の反復配列(DR配列)に結合し、複製のイニシエーターとして作用すると考えられており、Repダイマーは、2個の逆反復配列(IR配列)に結合することができ、IR-1に結合して複製開始を促進するエンハンサーとして機能し、IR-2に結合して*rep*遺伝子の転写を自己調節している(Fig.1)。このように、*ori*領域内には、多くの蛋白結合部位が存在することから、これら結合部位に結合した蛋白質の相互作用により、複製を開始させるに必要な高次な複製開始複合体が形成されていくのではないかと考えられた。

本研究では、DnaA, IHFそしてRep蛋白が、*ori*領域内に結合してどのようなDNA構造変化をおこし高次な複製開始複合体を形成していくのかを解明して行くことを目的に実験を行った。その目的を達成するための第一歩として、IHFやRep蛋白が、*ori*領域に結合した時どのようにDNAをbending(曲げ)させているのかを調べた。さらに、DnaA, IHFそしてRep蛋白が*ori*領域内に結合した時、複製開始の最も初期段階にあたるunwinding現象(2本鎖DNAが部分的に開裂し1本鎖になること)を生じるかどうかを調べた。また、pSC101複製に必要なIHFを欠損した宿主株においても複製を行うことができるRep変異体(Rep^{IHF})の性質を調べることにより、IHFとRep蛋白の関係をさらに調べた。

(実験、結果、考察)

1.pSC101 *ori*のbending IHFとRep蛋白による*ori*領域のbendingは、2つの領域(DR-1~DR-3領域, IHF box~DR-1領域)において主に調べた。bendingの測定は、プラスミドpBend2とゲルシフトアッセイ実験を利用して行われた。pBend2は、bending能力を測定できるように設計されたプラスミドで、測定したい*ori*領域(DR-1~DR-3領域, IHF box~DR-1領域, IR-1領域など)をpBend2に挿入したプラスミド(pBendDR-1~DR-3, pBendIHF~DR-1, pBendIR-1など)を作成し、このプラスミドを適当な制限酵素で切断して生じる*ori*領域を含んだDNA断片をプローブとして、IHFやRep蛋白をこのDNA断片に結合させて、ゲルシフトアッセイを行い、各*ori*領域でのbending特性を調べた。

その結果、DR-1~DR-3領域においては、Repモノマーが1個のDR配列に1分子ずつ結合してゆき、3個存在するDR配列はRepモノマーの結合により、DNAらせん軸に対してすべて同じ方向に曲げられていた。その角度は、1分子のRepモノマーが結合した時39度、2分子そして3分子結合した時、それぞれ70度、100度であった(Fig.2)。プラスミド複製系でのイニシエーター蛋白質がDNA bending活性を持つことが明らかになったのは本研究が最初である。またDNaseIフットプリント実験から、3個存在するDR配列へのRepモ

ノマーの結合能力は、どのDR配列に対してもほぼ等しく、Repモノマーはランダムに3個のDR配列に結合していった。

また、IHF box~DR-1領域では、IHF boxへのIHF蛋白の結合によるbending、DR-1配列へのRepモノマーの結合によるそれぞれのbendingとIHF boxとDR-1配列の間に存在するAT-rich領域自身が、協力的に作用しあってIHF box~DR-1領域を同じ方向にbendingを強めていた。また、AT-rich領域が、IHFとRepモノマーの結合やbendingに深く関わっていることも示された。以上のことから、複製開始複合体が形成されていくためには、ori領域での特定部位への特異的な蛋白質の結合のみならず、特定のDNA領域も関与した厳密に制御されたbendingが行われなければならない可能性が示唆された。

2.pSC101 oriのunwinding DnaA, IHFそしてRep蛋白がori領域内に結合した時、複製開始の最も初期段階にあたるunwinding現象が生じるかどうかを調べた。実験は、DnaA蛋白、IHF蛋白そしてRep蛋白が同時に結合できるような*in vitro*実験条件下で、KMnO₄を作用させることによりunwindingした領域の検出を試みた。KMnO₄は、1本鎖となったDNAのチミン残基を特異的に酸化し、チミジングリコールに変換する。このような修飾を受けた1本鎖DNAを鋳型にしてprimer extension反応を行うと、修飾を受けたチミン+1塩基分、反応が進んだところでDNAの伸長が停止するので、origin領域のどの位置でunwindingをおこしたのか確認できる。このKMnO₄ oxidation assayを行うためには、*in vitro*実験条件下でDnaA蛋白、IHF蛋白そしてRep蛋白が同時に結合できるようにしなければならないので、結合条件をDNaseIフットプリントやゲルシフトアッセイ技術を用いて確立した。そのDNaseIフットプリント実験の際、新たな知見として、DnaA蛋白をori領域に結合させるとDnaA boxがDNaseIによる切断に対して抵抗性を示すだけでなく、DNaseIに切断されやすくなった超感受部位が、3個のDR配列中に共通に存在する塩基配列に見られた(Fig.3B)。このことは、DnaA蛋白がDnaA boxへ結合するだけでなく、DR配列に対しても構造変化を引き起こしていることを示唆しており、更にDR配列がRepモノマーの結合部位であることから、DnaA蛋白質によりRepモノマーのDR配列への結合が影響される可能性が考えられた。また、DnaA蛋白とIHF蛋白の両蛋白をorigin領域に結合させたDNaseIフットプリントパターンは、DnaA蛋白のみ、あるいはIHF蛋白のみを結合させたDNaseIフットプリントパターンには見られないフットプリントパターンが見られた(Fig.3)。このことは、DnaA蛋白とIHF蛋白は、DNAへの結合を介してなんらかの相互作用を及ぼしあっている可能性が示唆された。そこで、DnaA蛋白とIHF蛋白とRep蛋白をさまざまな組み合わせで結合させて、KMnO₄ oxidation assayによりunwindingした領域の検出を試みた(Fig.4)。しかし、IHF蛋白が反応系に加えられた場合にのみ、IHF box近傍で弱いunwindingが見られるのみであり、3者の蛋白質の協力的な作用は見られなかった。今回のIHF蛋白結合によるIHF box近傍でのunwindingをpSC101複製開始のためのunwindingと考えるのは難しい。なぜなら、IHFは、DNAを強く曲げる蛋白であり、折れ曲がったDNAは、部分的に1本鎖となる部分が生じ、その部分をKMnO₄が、修飾したにすぎないと思われるからであり、ori領域には多くの蛋白結合部位があることからなんらかの蛋白間での相互作用によりunwindingできるようになるであろうと考えるからである。本来の強いunwindingを検出するためには、HUやDnaBなどの蛋白が更に必要なのかもしれない。

3.IHF非依存性Rep蛋白質(Rep^{IHF})の性質 pSC101の複製は、DNAを強く曲げるIHFを必要とするのであるが、そのIHFを欠損した宿主株においても複製することができる変異

型Rep(Rep^{IHF})が、Cohen, S. N.らにより単離された。そして、その変異は、*rep*遺伝子の3番目のコドンGAA(グルタミン酸)をAAA(リジン)に置換したものであった。本研究では、このRep^{IHF}蛋白の性質を野生型Rep(Rep^{wild})と比較検討することにより、pSC101の複製開始時におけるIHFやRep蛋白の役割及び両蛋白間の関係を明らかにするために実験を行った。まず、Rep^{IHF}蛋白の性質を調べるために、Rep^{IHF}を大量に発現するプラスミドを構築し、大腸菌においてRep^{IHF}を大量発現させ精製した。その精製Rep^{IHF}蛋白は、精製された段階において野生型Rep(Rep^{wild})と同様に大部分ダイマーとして存在するが、6M塩酸グアニジンで変性させ、その後再生するとRep^{wild}と同様に一時的にモノマーとして存在することができた。ダイマー型のRep^{IHF}とRep^{wild}のIR-2への結合能、モノマー型のRep^{IHF}とRep^{wild}のDR-3への結合能を比較したところほぼ同程度であった。しかし、上述したpBend2を用いた同様なbending実験において、Repモノマーとして3個のDR配列に結合して生じるbendingは、Rep^{IHF}の方がRep^{wild}よりも強く、その差は、Repモノマー3分子が3個のDR配列に結合した時点で14度であった(Fig.5)。この結果は、Rep^{IHF}がIHFのDNAを強く曲げるという機能を部分的に補っている可能性を示唆するものである。我々はさらに別の角度から検証した。その実験は、3個のDR配列を持ったDNA断片にRep^{IHF}あるいはRep^{wild}をモノマーとして結合させてDNA断片を曲げ、その後T4 DNAリガーゼでライゲーション反応を行い、self-ligation(分子内結合)される効率をRep^{IHF}とRep^{wild}間で比較検討した。その結果、Rep^{IHF}を加えてライゲーション反応を行った方が、Rep^{wild}を加えた場合よりも多くのself-ligationしたDNAが見られ、Rep^{IHF}の方が、DR配列に結合してRep^{wild}よりも強くDNAを曲げているという結果を支持するものであった(Fig.6)。また、このライゲーション実験において、Repモノマーを加えてライゲーション反応を行うとself-ligationしたDNA以外に、DNAの分子間結合によるdimerやtrimerが多く見られた。これは、DR配列に結合したRepモノマー分子間でのRep-Rep相互作用により、DNA断片同士が接近しやすくなるために生じるものと考えられ、新たな蛋白間での相互作用として、DR配列への結合を介したRep-Rep相互作用の存在が明らかとなった。

bending実験とライゲーション実験からRep^{IHF}の方が、DR配列に結合してRep^{wild}よりも強くDNAを曲げていることが示されたが、このRep^{IHF}の性質だけで、何故Rep^{IHF}がIHFを欠損した宿主株においても複製することができるのかという疑問に答えることは難しい。なぜなら、IHFはDNAを120度曲げることができ、今回示されたRep^{IHF}とRep^{wild}間のbending力の差は、わずかに14度にすぎないからである。ところで、当研究室において大久保らは、Rep^{wild}の存在下での野生型宿主株中において、各種pSC101 origin領域を含んだプラスミドの複製頻度を調べた結果、DnaA box~DR-3下流領域だけで、頻度は非常に低い複製開始は可能であるが、*par*領域あるいはIR-1配列のいずれかが付加されることよりほぼ正常な複製頻度を保つことができたことより、DnaA box~DR-3下流領域を*core-ori*とし、*par*領域とIR-1配列を複製を促進するエンハンサーと定義している。そこで我々は、Rep^{IHF}の存在下でのIHF欠損株中において、pSC101が複製するために必要とする*ori*の必要最少領域の決定を行ったところ、*par*領域からIR-1領域までであることが明らかとなった(Fig.7)。すなわち、Rep^{IHF}に依存した複製は、*core-ori*に加えこのエンハンサー領域を2つとも複製のために必要とし、どちらか一方のエンハンサーを*core-ori*に加えれば、ほぼ正常な複製頻度を保つことのできるRep^{wild}に依存した複製と明らかに異なる。*par*領域は、DNA gyraseが結合してプラスミド全体の超らせん構造を変化させることが知られており、IR-1配列はRepダイマーが結合する部位であることから、

Rep^{IHF}はこれら *par* 領域上の DNA gyrase と IR-1 配列上の Rep ダイマーの両者によって引き起こされる DNA の高次構造変化の助けを借りて、初めて IHF の機能を補うことができるのかもしれない。

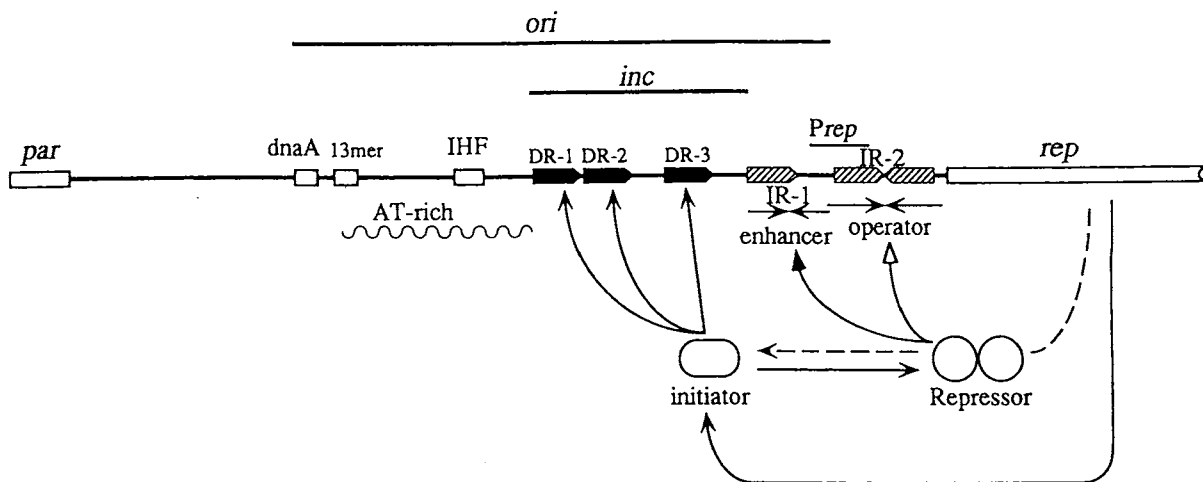


Fig. 1. The model of Rep-ori interaction.

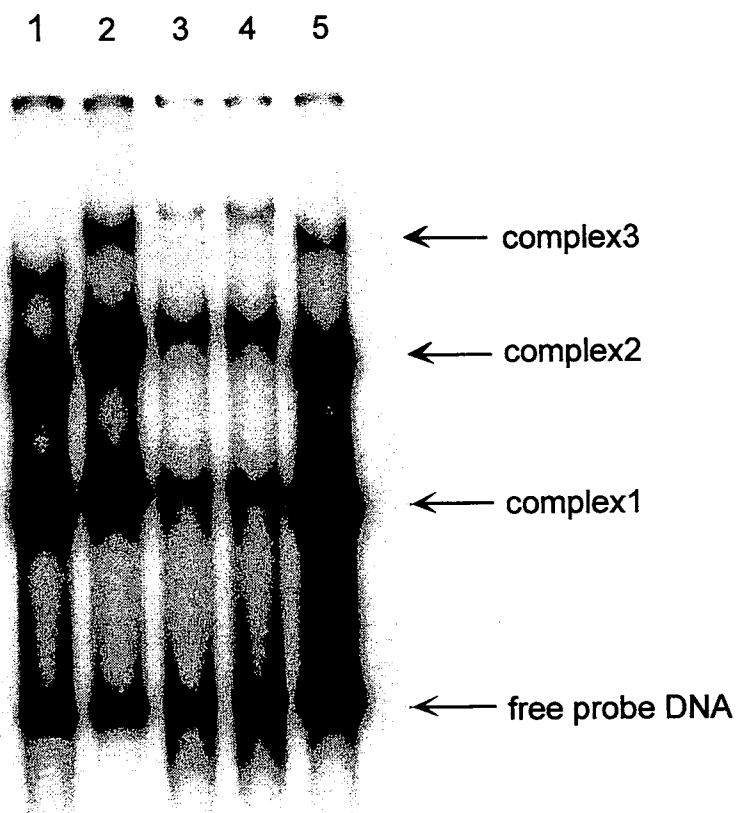


Fig.2 DNA bending induced by Rep.

The permuted fragments, 196bp in size, were prepared from pBend DR-1~DR-3 digested with *Bgl* II (lane 1), *Spe* I (lane 2), *Pvu* II (lane 3), *Nru* I (lane 4) or *Bam* HI (lane 5) and were 5'end-labeled. The reaction mixture contains 5 fmol of labeled DNA fragments and guanidine-treated Rep (9.3ng).

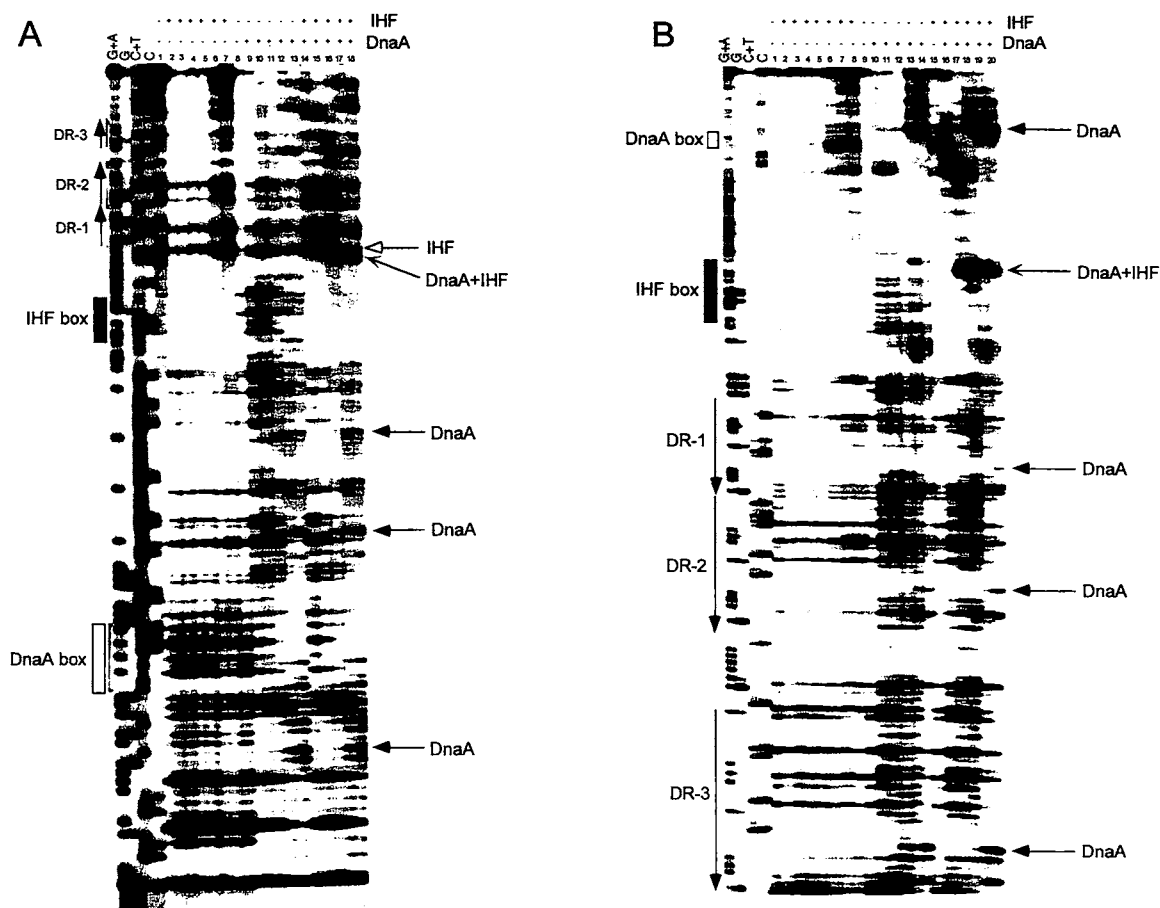


Fig.3 DNaseI footprints of DnaA and IHF on the linear *ori* fragment.

The 5'end-labeled DNA fragment (A; upper strand) and (B; lower strand) was incubated with various amounts of DnaA, IHF or both and then cleaved with DNaseI. A+G, G, C+T, C cleavage reaction of the same fragment were shown on the left side lanes in both (A) and (B).

(A) Lanes 1 to 18, IHF/DNA molar ratios are 0 (lanes 1 and 8 to 13), 2 (lane 2), 5 (lane 3), 7 (lane 4), 10 (lane 5), 40 (lane 6), 60 (lane 7) and 20 (lanes 14 to 18). DnaA/DNA molar ratios are 0 (lanes 1 to 8), 3.75 (lanes 9 and 14), 7.5 (lanes 10 and 15), 15 (lanes 11 and 16), 30 (lanes 12 and 17) and 60 (lanes 13 and 18).

(B) Lanes 1 to 20, IHF/DNA molar ratios are 0 (lanes 1 and 9 to 14), 2 (lane 2), 5 (lane 3), 7 (lane 4), 10 (lane 5), 20 (lane 6 and 15 to 20), 40 (lane 7) and 60 (lane 8). DnaA/DNA molar ratios are 0 (lanes 1 to 9 and 15), 3.75 (lanes 10 and 16), 7.5 (lanes 11 and 17), 15 (lanes 12 and 18), 30 (lanes 13 and 19) and 60 (lanes 14 and 20).

Positions of DnaA box, IHF box and three direct repeats (DR-1, DR-2, DR-3) are shown on the left side. The DNaseI sensitive sites by addition of DnaA only, IHF only or both DnaA and IHF are presented as arrows with DnaA, IHF and DnaA+IHF.

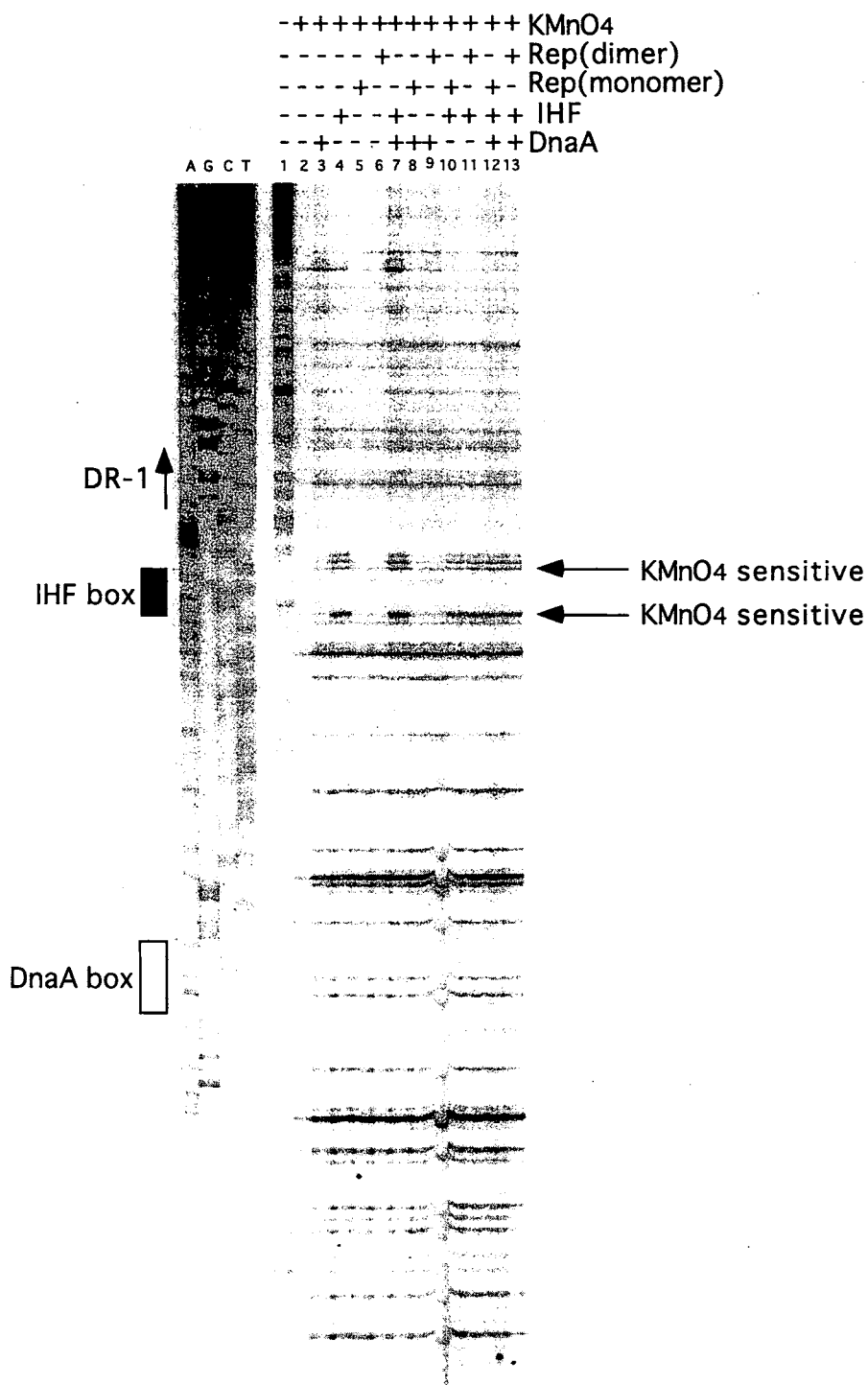


Fig.4 KMnO4 oxidation assay.

Supercoiled pYUK101 (0.4 pmol) were incubated with various combinations of DnaA (12 pmol), IHF (4 pmol), Rep monomer (12 pmol) and Rep dimer (12 pmol). The protein-bound DNA was treated with KMnO4, denatured with NaOH and used as a template for the primer extension. Positions of DnaA box, IHF box and DR-1 are shown on the left side and combinations of proteins are shown on the top. KMnO4 sensitive sites are presented as arrows.

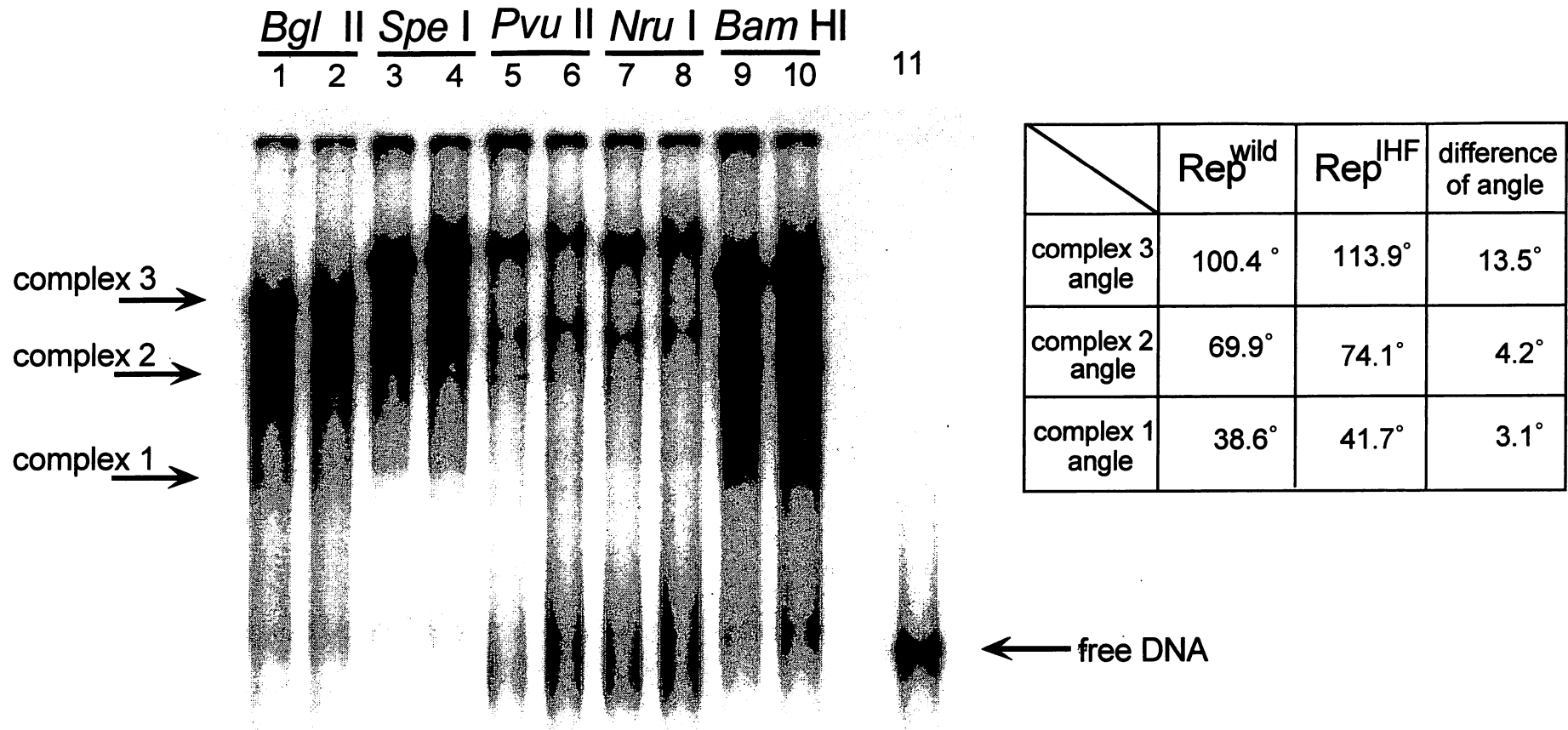


Fig. 5 DNA bending induced by guanidine-treated Rep^{IHF} and Rep^{wild}.

To prepare a set of permuted DNA fragments, *Bgl* II (lanes 1 and 2), *Spe* I (lanes 3 and 4), *Pvu* II (lanes 5 and 6), *Nru* I (lanes 7 and 8) and *Bam* HI (lanes 9 and 10) were used.

Ten fmol of 5'-end-labeled DR-1~DR-3 DNA fragment was incubated with 18.5ng of Rep^{wild} (lanes 1,3,5,7 and 9) or 18.5ng of Rep^{IHF} (lanes 2,4,6,8 and 10) at 25°C for 10min, then subjected to 10% acrylamide gel electrophoresis. The bending angles of DNA were calculated from the migrations of each protein-DNA complex.

lane	1	2	3	4	5	6	7	8
ligation	—	+	+	+	+	+	+	+
Rep ^{IHF}	—	—	—	—	—	+	+	+
Rep ^{wild}	—	—	+	+	+	—	—	—

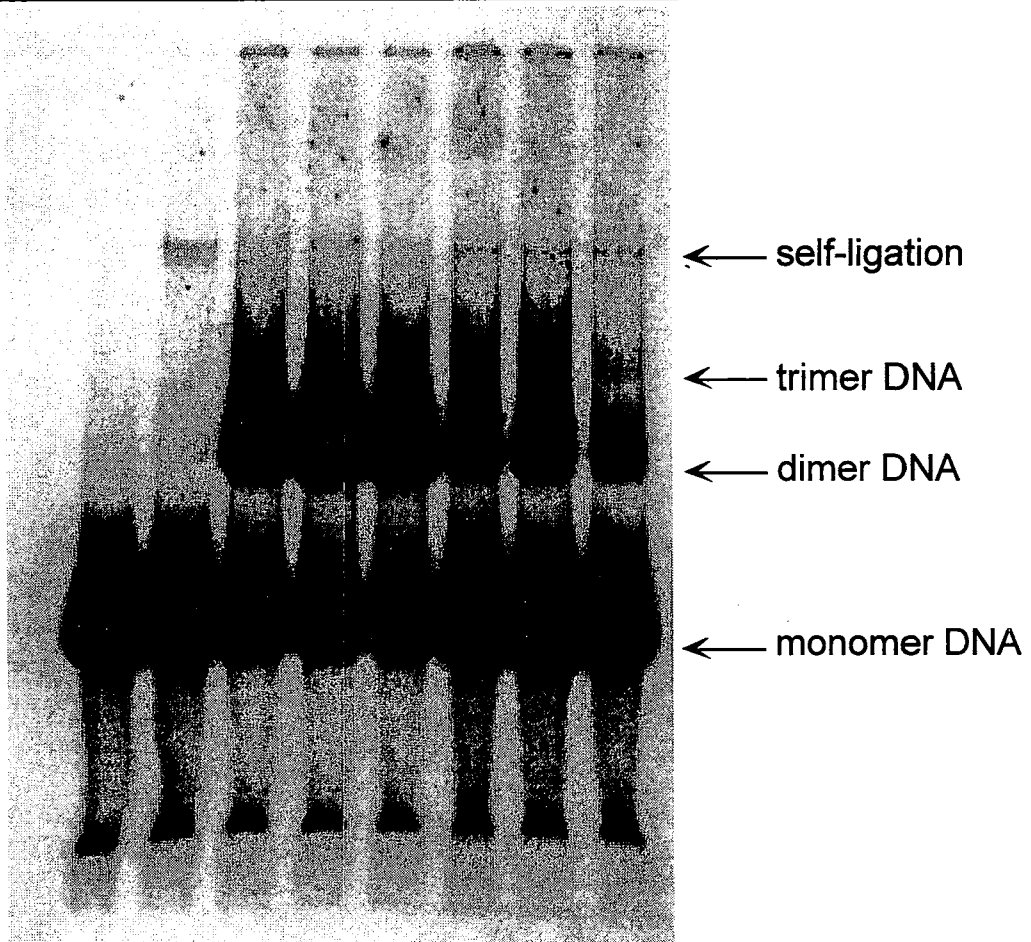


Fig. 6 Ligation of Rep-bound DR DNA fragments.

The DNA fragment prepared from pBend DR-1~DR-3 with *Xho* I digestion was blunt-ended with cold dATP, dGTP, dTTP and [α -³²P]dCTP using Klenow polymerase and incubated with T4 DNA ligase without Rep (lane 2), with Rep^{wild} (lane 3; 148ng, lane 4; 185ng, lane 5; 222ng) or Rep^{IHF} (lane 6; 148ng, lane 7; 185ng, lane 8; 222ng). The reaction mixtures were deproteinized and subjected to 5% acrylamide gel electrophoresis. Self-ligation DNA, dimer DNA, trimer DNA, monomer DNA were indicated at the right side.

<i>ori</i> regions of donor plasmids	Host cells / Helper plasmid			
	YK1100 (<i>himA</i> ⁺ <i>himD</i> ⁺)		YK2920 (<i>himA</i> <i>himD</i>)	
	pMIK6 (<i>rep</i> ⁺)	pAM01 (<i>rep</i> ^{IHF})	pMIK6 (<i>rep</i> ⁺)	pAM01 (<i>rep</i> ^{IHF})
	+	+	-	+
	+	+	-	-
	4.4	3.4	<0.0008	1.1
	3.3	2.7	<0.0008	<0.0008

Fig. 7 Ori activity in the absence of IHF.

Schematic structures of *ori* are shown at the left side. The transformation efficiencies of the first two plasmids were summarized from the published data (4,10) and our unpublished results (11). Plasmid DNA (30ng) was introduced into YK1100 (*himA*⁺*himD*⁺) or YK2920 (*himA* *himD*) carrying pMIK6 (*rep*⁺) or pAM01 (*rep*^{IHF}). Cells were plated on duplicate agar plates supplemented with 30 μ g/ml of ampicillin. The plates were incubated at 37°C overnight. The data are the mean number ($\times 10^5$) of transformants per μ g of donor DNA.

学位論文審査結果の要旨

本研究は原核細胞の中で自律複製をおこなっているプラスミドDNA分子を用い、その複製開始機構を解明する第一歩として、複製開始領域 (ori) に特異的に結合する蛋白質群がori領域に結合した際のDNA高次構造の変化を明らかにしようとしたものである。そして、以下のような新事実を明らかにした。

プラスミド pSC101ゲノムがコードする複製開始蛋白質 Rep は、単量体型でori領域内の3個の反復配列 (DR) に、二量体型で逆反復配列 (IR) に結合し、異なる機能を発揮する多機能蛋白質であるが、このRepの結合によりDNAは湾曲した。特に単量体型は結合する分子数の増加に従って湾曲は増加し、3分子結合した時は100度に達した。また、すでにDNAを湾曲させることが知られている宿主蛋白、IHFもori領域内の別の部位に結合し、約120度湾曲させるが、これら、Rep、IHF両蛋白質はori領域DNAの湾曲に対して協調的に働くことを見いだした。更に、両蛋白質の結合部位に介在するAT対に富むDNA配列も両蛋白質によるDNA湾曲を促進した。こうして、二種類の蛋白質とDNA配列そのものがori領域DNAの湾曲に協調的に関わる事が判明した。

次に、IHF蛋白が欠損していてもori領域からの複製を可能にする変異Rep蛋白質の存在に注目し、この変異Rep蛋白を初めて精製することに成功し、この変異Repが野性型Repより強くori領域DNAを湾曲させることを明らかにした。更に、野性型Repによる通常の複製には、DNAの超らせん度を変化させるDNAgyraseの結合部位 (par) と、ori領域内のRep二量体型が結合するIR配列のいずれか一方が存在すれば充分であるのに対して、この変異Rep蛋白によるIHF非依存性の複製には、両結合部位が必要であった。このことは、変異RepはDNAの高次構造を変化させるpar、IR両配列に結合する蛋白質の助けを借りて、IHF非依存性の複製を可能にしていることが示唆される。

以上の本研究により、複製開始領域への蛋白質の結合により、引き起こされる具体的なDNAの高次構造変化の一端が明らかにされ、DNA複製開始複合体の形成とその調節機構の解明に一步前進したものと評価され、博士論文に値すると判定した。