

氏名	尾崎 栄二郎
生年月日	
本籍	東京都
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第175号
学位授与の日付	平成8年3月25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 pKYM の複製に必要な宿主タンパクの精製とその性質 (Purification and characterization of a host protein required for the replication of plasmid pKYM)
論文審査委員	(主査) 正宗 行人 (副査) 山口 和男, 山下 克美 中西 義信, 小平 憲一

学位論文要旨

Plasmid pKYM, isolated from the Gram-negative bacterium *Shigella sonnei* is a multicopy plasmid of 2083 base pairs. pKYM can replicate in *Escherichia coli* (*E. coli*) and this plasmid replicates via a rolling-circle mechanism. The RepK protein, encoded by pKYM binds to PR I site in the replication origin. An *E. coli* protein binds two sites (PR II and PR III) downstream of PR I in the pKYM origin. PR I is in a core origin which is essential for initiation of DNA replication and PR II and PR III is in a replication enhancing region. I have purified the *E. coli* protein that binds to the replication enhancing region using ammonium sulfate precipitation, Heparin-Sepharose, hydroxyapatite and MonoS in this order and found that it is HU. HU binds these two sites specifically only when RepK binds PR I and enhances DNA replication of pKYM. PR III overlaps the promoter region of the *repK* and binding of HU to PR III inhibits transcription of *repK*. These results suggest that the synthesis of RepK is self-regulated via HU binding.

プラスミド pKYM はグラム陰性菌であるシゲラ菌より単離された全長 2083bp のマルチコピープラスミドである。このプラスミドはローリングサークル型複製を行い自らの複製に必須な Rep タンパク (RepK タンパク) をコードしている。RepK とローリングサークル型で複製するグラム陽性菌由来のプラスミドの Rep との間には相同性が見られ、特に DNA 鎖にニックを入れるのに働いていると考えられるチロシン残基及びその周辺のアミノ酸配列はお互い非常によく似ている。この Rep のアミノ酸配列の相同性から、pKYM はローリングサークル型複製をするプラスミドの中でも pUB110 に代表されるグループに属するものと考えられる。

しかし pKYM の複製開始領域はグラム陽性菌由来のプラスミドとは大きく異なっている。pKYM の複製開始領域はその機能から 3つの領域に分けることができる。それらは複製の開始と終結に必須な領域 (Core origin, PR I), その下流の複製開始を促進する領域 (Replication enhancing region, PR II, PR III), 及び上流の複製終結を促進する領域 (PR IV) である。それぞれの領域には異なる

タンパクが結合し、複製の開始と終結に必要な領域 PR I には RepK が、複製開始を促進する領域 PR II, PR III には RepK に依存して宿主である大腸菌の因子が結合する。グラム陽性菌由来のプラスミドの複製開始領域は複製開始タンパクである Rep が結合する領域のみからなる。この構造上の違いからも複製の調節機構はかなり異なることが考えられる。本研究では pKYM の複製開始に関与すると考えられる複製開始を促進する領域内に結合する宿主因子を明らかにし、その性質を解析した。

pKYM の複製開始領域



PRはrepKのプロモーター

pKYM の複製開始領域内に結合する宿主因子の精製

pKYM の複製開始領域内には、複製反応には必須でないが複製開始を促進する領域 (Replication enhancing region, PR II, PR III) が存在する。この領域には pKYM の複製開始タンパクである RepK に依存して宿主因子が結合する。そこで pKYM の複製開始を促進する領域に結合する宿主因子を Initiation Enhancing Protein (IEP) と名付け、精製を行った。

大腸菌 YS1 の抽出液を調整し、硫酸塩析を行った。続いて Heparin-Sepharose, Hydroxyapatite, MonoS の各カラムを用いて精製を行った。

精製したタンパクのアミノ酸配列を N 末端側より調べたところ、大腸菌の HU のアミノ酸配列と一致した。そこで HU 欠失菌の抽出液を用いてフットプリントを行った所、HU を発現する大腸菌では RepK に依存して PR II, PR III にフットプリントが見られたが HU 欠失菌を用いた場合フットプリントは見られなかった。よって IEP は HU であることがわかった。

pKYM は複製開始領域内の PR II, PR III を含む領域 (Replication enhancing region) を欠失すると大腸菌を形質転換出来ない。その原因は Replication enhancing region が複製開始を促進する役割をもっているためと考えられる。この領域による複製開始の促進が PR II, PR III に HU が結合することによりなされているならば、HU が存在しない場合は pKYM で大腸菌を形質転換出来ないと考えられる。そこで HU 欠失菌を pKYM で形質転換出来るか調べたところ、HU 欠失菌である YK1340 を形質転換する事が出来なかった。pKYM による形質転換には Replication enhancing region と同様に HU が必要であることがわかった。また pKYM は Replication enhancing region がなければ大腸菌を形質転換出来ないが、複製の反応は起こり、HU 欠失菌内でも低い効率ながら複製が起こる事がわかった。HU 結合の性質を調べるために複製開始領域の変異体で HU によるフットプリントが見られるか調べた。PR II, PR III の領域を欠失すると RepK が存在しても HU によるフットプリントは見られなかった。また PR I を欠失した時は RepK と PR II, PR III 領域が存在しても HU によるフットプリントは見られなかった。よって HU の結合には RepK が PR I に結合することと共に PR II, PR III の配列が必要と考えられる。PR I, PR II, PR III の間隔を変えた場合 HU によるフットプリントは見られなかったことより、各領域の位置関係も重要と考えられる。

HU は塩基配列非特異的に DNA に結合するタンパクであるが、最近の研究から cruciform や折れ曲がった DNA、一本鎖切断の入った DNA に結合しやすいことがわかっている。しかし pKYM の場合は RepK の PR I への結合に依存すること、RepK が結合しても DNA の折れ曲がりが見られないことや cruciform を形成すると考えられる反復配列が存在しないことより、これらとは異なる様式で結合することが考えられる。RepK は PR I だけで結合出来るが、PR II, PR III と HU が存在する

とより強いフットプリントが見られた。これはHUがPR II, PR IIIに結合するとタンパク-タンパク相互作用によりRepKがより強く結合するためかもしれない。HUはRepKをより強く結合させることにより複製開始を促進させている可能性が考えられる。

HUを介したRepKの自己転写抑制機構の解析

DNAの複製において複製開始タンパクの量は複製開始の頻度を決定する一つの要因になるため、複製開始タンパクの量の調節は複製の調節において重要な意味を持つ。pKYMにおいてはRepKの量が複製開始の頻度を通してコピー数を決めていると考えられるので、このプラスミドが大腸菌内に安定に存在するためにはRepKの量の調節が重要であると思われる。pKYMのRepKの発現調節機構として、RepKのmRNAに相補的なcopRNAがRepKの発現量を主に調節している。RepKタンパクは自己のプロモーター領域には結合しないことやプロモーター領域だけを用いた実験で自己転写抑制が見られなかったことより、RepKが自己の転写を抑制することはないと考えられた。しかしRepKがPR Iに結合することに依存してHUがPR II, PR IIIに結合することがわかり、さらにPR IIIとRepK遺伝子のプロモーター領域が重なっていることから考えて、PR IIIに結合したHUがRNAポリメラーゼの結合を阻害し、RepKはHUを介して自己の転写を抑制する可能性が考えられた。プロモーター領域だけを用いた実験で自己転写抑制が見られなかったのはPR Iが存在しないのでHUがPR IIIに結合できなかったことによると考えられる。そこでRepKが自己の転写を抑制するかPR Iまで含む複製開始領域全体を用いて調べた。

pKYMの複製開始領域の下流に存在するrepK遺伝子の途中にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を導入し、RepKが発現しないようにしたdr8CATを構築した。RepKによる複製の影響を除くため供給するRepKはDNA結合活性は保持するが、複製活性を失った変異体を用いた。dr8CATを導入した大腸菌とさらに変異RepKを供給するプラスミドを導入した大腸菌それぞれからRNAを調整し、P_Rプロモーターから転写されたRNAの検出を行った。HUを発現する大腸菌ではRepKを供給するとRNAの量が減少しており、HUを欠失した菌ではRepKを供給してもRNA量の減少は見られなかった。このことからRepKによるPRプロモーターからの転写の抑制はHUを介して行われることがわかった。

RepKはDNAに結合する複製開始タンパクであり、大量に存在すると菌に負担をかけpKYMは宿主と共存できなくなる可能性がある。それでRepKの量は低い水準に抑えられていると考えられる。RepKの発現を調節する機構としてはRepKのmRNAに相補的なcopRNAによるものが知られており、copRNAはRepKのmRNAに結合し転写及び翻訳の段階でRepKの発現を抑制している。copRNAはRepKの発現量を数十分の一に抑えているものと考えられているが、今回明らかになった自己転写抑制では通常存在するより大量にRepKを供給したにもかかわらず抑制は数分の一程度であった。従ってRepKの量は主にcopRNAにより調節されていると考えられる。しかしcopRNAによる調節はRepKの存在量には関係なく行われる。宿主となる菌は環境に合わせて増殖速度を変化させているので、何らかの理由でRepKの量が増える可能性もある。そのような場合にはRepKの量に応じて発現を調節する自己転写抑制機構が有用になると考えられる。

RepKタンパクの精製

pKYMの複製開始機構を調べるために、大腸菌を用いた実験と共に試験管内で反応を行いその結果を解析することは有効である。試験管内で種々の因子の作用を調べるには精製したRepKが必要となる。しかしこれまで精製したRepKはDNA結合活性はあるものの、複製開始活性を失っていた。そこで活性の失われた原因を調べるため、複製開始活性を調べながらRepKの精製を試みた。DNA結合活性の測定にはゲルシフト法を、複製開始活性の測定にはin vitroのDNA合成系を用いた。RepKはT7 RNAポリメラーゼ/プロモーターを用いた発現系で大量に生産し精製している。発現させた時

点で RepK は DNA 合成活性を有していた。RepK の精製を行ったところ、Heparin-Sepharose カラムの段階で DNA 複製開始活性の失活が起きていることがわかった。

精製すると失活する理由として RepK の活性を助けている補助因子があり、その因子が失われることによる可能性が考えられる。しかし *in vitro* の DNA 合成系には大腸菌の抽出液が含まれており、補助因子が有るとしても反応系に含まれていると考えられる。また失活した RepK は大腸菌の抽出液や Heparin-Sepharose カラムで分けられた他の分画と混ぜても活性は戻らなかった。よって可逆的に結合する補助因子が失われたために失活するのではないと考えられる。RepK の精製に伴う失活は DNA 結合活性には影響しないと考えられるので、複製開始のニックを入れるのに必要な場所に限られた部分的な構造の変化だと考えられる。

総 括

pKYM の DNA 複製開始機構とその調節を解明する研究の一環として、pKYM の複製開始領域内に RepK に依存して結合する宿主因子に着目してその因子の役割を調べた。本研究では複製開始領域内に結合する宿主因子が HU であること、また HU が pKYM の DNA 複製を促進する役割を持つことを明らかにした。次に RepK が HU を仲介して自己の転写を抑制し、RepK の発現量を調節出来ることを明らかにした。

pKYM の遺伝情報の発現に関する HU の役割を考えると、一つが DNA 複製の促進、もう一つが複製開始タンパクである RepK の発現を抑制することによる複製頻度の低下という相反する役割を持っている。しかし pKYM が HU 欠失菌を形質転換出来ないのは HU が主に促進因子として働いているためと考えられる。RepK の発現は主に copRNA により抑制されていて、自己転写抑制は RepK タンパクの量が増えすぎた場合に働くと考えられる。

学位論文の審査結果の要旨

本論文の審査は、各審査員が提出された論文の内容につき慎重な審査を行いかつ申請者と面接した結果、並びに口頭発表（平成 8 年 2 月 7 日開催）の内容を踏まえて、平成 8 年 2 月 7 日開催の論文審査委員会で行われ、以下の通り判定した。

本論文はプラスミド pKYM の複製に働く宿主因子の精製とその作用機構を解析した研究をまとめたものである。

プラスミド pKYM はローリングサークル型で複製するプラスミドである。pKYM はグラム陰性菌ではじめて見いだされたもので大腸菌でも正常に増殖する。著者はこのプラスミド自身がコードする複製開始に必須な蛋白 RepK の精製とその性質の解析を修士課程、博士課程を通して研究した。

次に、当研究室の安川の研究は宿主菌に、このプラスミドの複製開始を促進する因子のあることを示唆していたので、この因子の精製を試みた。このプラスミドは RepK のみでは複製開始頻度が低く宿主菌の増殖と協調して複製するためには宿主因子による促進が必要である。精製の結果この因子が DNA 結合蛋白 HU であることが分かった。一般に HU は DNA に非特異的に結合すると考えられている。しかし、pKYM の複製開始部位に結合する際にはこの部位の塩基配列を認識し、しかも RepK 蛋白がこの領域に結合した時のみ結合することが分かった。この領域内には特徴的な配列はみとめられず、HU がなにを認識しているのかいまのところ不明である。しかし、HU が結合することで RepK の結合がより強固になることが示唆され、HU が複製開始を促進することが推察された。

この HU 結合部位と repK-mRNA のプロモーター部位が重なっていることが分かった。そこで、HU の結合によるこの mRNA の転写阻害を調べたところ、repK-mRNA の転写は RepK 蛋白があると HU により阻害されることが分かった。従って、RepK は自身の転写を HU を介して、自己調節していることが分かった。

尾崎君の実験技術はなかなかしっかりしており、この複製領域に結合する蛋白が菌体内に多量にある HU 蛋白であることが幸いしたと思うが、フットプリント法のみしか検出手段のない精製法で短時間で精製に成功し、複製における役割も推察することが出来た。内容もまとまっており、博士論文に値する研究である。