

# Studies on Protein Factors Which Interact with Autonomously Replicating Sequence ARS1 Region of *Saccharomyces cerevisiae*

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/8141">http://hdl.handle.net/2297/8141</a>               |

## パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の自律複製領域 ARS1 と相互作用するタンパク質因子に関する研究

金沢大学医学部生化学第二講座 (主任: 久野 滋教授)

久野 耕 嗣

(平成1年8月29日受付)

パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の自律複製配列 (autonomously replicating sequence, ARS) をもつプラスミドは, *S. cerevisiae* 細胞を高頻度に形質転換できるため, ARS は酵母染色体における複製開始点と考えられている. 真核生物における染色体複製開始機構を明らかにする目的で, *S. cerevisiae* 第4染色体のセントロメア付近に位置する ARS1 領域と相互作用するタンパク質因子を検索した. 最初に, ARS1 領域のうち Pst I 部位から Rsa I 部位の 6 bp 上流までの 97bp を含む DNA 断片 (K49) をプローブとして, それと特異的に結合するタンパク質因子をゲルシフトアッセイで調べた. その結果, 酵母核抽出液中に一本鎖 K-49DNA 断片に特異的に結合するタンパク質因子を検出した. 合成オリゴヌクレオチドを用いたコンペティション実験より, このタンパク質因子による複合体形成に関与する領域が, C6 合成オリゴヌクレオチド, すなわち, ⊖鎖側でコンセンサス配列とその近傍のコンセンサス類似配列を含む領域にあることが明らかとなった. 次に, C6 合成オリゴヌクレオチドをプローブに用いてゲルシフトアッセイを行い, 特異的なタンパク質因子を検出した. また, 同領域の⊕鎖側を持つ C5 合成オリゴヌクレオチドについても同様に, 特異的なタンパク質因子を検出した. コンセンサス配列とその近傍のコンセンサス類似配列を含む領域は, 高頻度形質転換活性に不可欠であるため, 今回検出されたタンパク質因子が, DNA 複製開始に関与する可能性が考えられた.

**Key words** *S. cerevisiae*, ARS1, DNA binding factor, gel shift assay, single-stranded DNA

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における DNA 複製は, 他の真核細胞と同様, 染色体 DNA 上の多数の部位からおこる<sup>1)</sup>. その開始点の数は, 1 倍体細胞当たり約150個で平均約 90kilobase (Kb) の間隔で存在している. また, これらの開始点の活性化は S 期にのみ起こるように制御されている.

このような複製開始点を含む DNA 断片をクローン化する試みが, 酵母において, 多数行われてきた<sup>2)</sup>. これらの DNA 断片は, 自律複製配列 (autonomously replicating sequence, ARS) と呼ばれるもので, ARS をもつプラスミドは, 酵母菌に対して高頻度

( $10^3 \sim 10^5$  コロニー/ $\mu\text{g}$  of DNA) 形質転換活性を有しており, 染色体外で自律的に複製される. また, ARS を含むプラスミドの複製は, 染色体 DNA と同様に S 期の制御を受けており, また, このうち ARS1 については, physical mapping によって, in vivo で実際に複製開始点として働いていることが明らかになった<sup>3)</sup>.

多数の ARS 断片の塩基配列の比較より, コンセンサス配列 5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3' が見い出され<sup>4)</sup>, また, このコンセンサス配列は高頻度形質転換活性に不可欠であることが示された<sup>5-7)</sup>.

Abbreviations: ABF I, ARS binding factor I; ARS, autonomously replicating sequence; bp, base pairs; DTT, dithiothreitol; *E. coli*, *Escherichia coli*; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Kb, kilobase; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; SV40, Simian virus 40

Palzkill ら<sup>9)</sup>は、ARS 断片には、多くのコンセンサス類似配列が存在していることを示した。

ARS1 は酵母第IV染色体の TRP1 遺伝子に隣接する約 800 base pairs (bp) の領域であるが、Celniker ら<sup>9)</sup>の欠損変異の研究により、A、B、C、3つのドメインに分けられている。ドメインAは、コンセンサス配列を含む 11~19bp の領域で、高頻度形質転換活性に必須な領域である。ドメインBは、ドメインAの上流、50~100bp の領域で、ARS プラスミドの安定性に関与しており、bending 領域が存在する<sup>9)</sup>。ドメインCは、ドメインAの下流、約 200bp の領域で、安定性に関与するが、その寄与率はドメインBよりも小さく、ドメインBを欠損したプラスミドでのみ、その影響がみられる。また、ドメインCは、in vitro DNA 複製系において、複製のバブルの形成が観察される場所である。

最近、ARS binding factor I (ABF I) がドメインBの bending 領域と重複した ABF I 部位に結合することが明らかにされ<sup>10-12)</sup>、また ABF I 部位の近傍に、ABFIII が特異的に結合していることが明らかとなっている<sup>13)</sup>。しかし、ドメインAおよびその近傍と相互作用するタンパク質因子については、未だ報告がない。

今回、筆者はゲルシフトアッセイを用いて、ARS1

領域と相互作用するタンパク質因子を調べ、その結果、ドメインAおよびその近傍の一本鎖 DNA と特異的に結合するタンパク質因子を見出したのでその結果についてのべる。

材料および方法

I. 使用菌株およびプラスミド、ファージ

1. 使用菌株

M13 ファージ組み換え体の増殖およびプラスミドの作成には、大腸菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) JM105 株 ( $\Delta$ lacpro, thi, strA, sbcB, hsdR, F'tra-D36, proAB, lacI<sup>q</sup>  $\Delta$ M15) を用いた。

また、酵母核抽出液の調製には、*S. cerevisiae* D13-1A (MATa, his3-532, trp1, gall) を用いた。

2. プラスミド、ファージ

YRp7 は、pBR322 の EcoRI 部位に、*S. cerevisiae* の ARS1、TRP1 の領域 (約 1.4kb) が挿入されたプラスミドである<sup>21)</sup>。K49 は、村上によって作成された M13 ファージの組み換え体で、ARS1 領域のうち Pst I 部位 (207) から Rsa I 部位の 6 bp 上流 (303) までを含んでおり (図 1)、ARS 活性を持っている (村上、未発表データ)。

II. 試薬類

各種制限酵素は宝酒造 (京都) あるいは、ニッポン

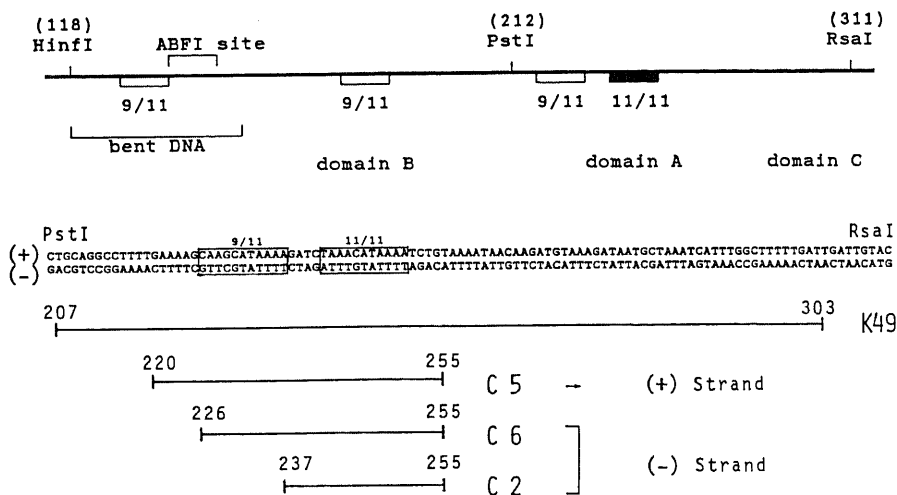


Fig. 1. The configuration of ARS1 region and maps of K49 deleted clone and synthetic oligonucleotides. The regions of domain A, B, and C are those from Celniker et al.<sup>9)</sup> Domain A contains the 11bp consensus sequence indicated with closed box. The ABF I binding site and bent DNA region are indicated in the map. Consensus related sequences as reported by Palzkill and Newlon<sup>9)</sup> are indicated with open boxes. Numbers above lines are the distance in the nucleotides from the Hind III site that is at position 837 in reference<sup>14)</sup>.

ジーン (富山) の製品を, Klenow fragment は宝酒造, ザイモリエイスはキリンビール (東京), T4 ポリヌクレオチドキナーゼは東洋紡 (大阪), プロテアーゼ K およびポヌクレアーゼ A は Sigma 社 (米国) の製品を用いた. DNA 標識の [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP, および [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP ( $\sim 3000$  Ci/mmol) はアマシャム・ジャパン (東京) より購入した. ヘパリン・アガロースおよび Ficoll は Sigma 社 (米国), DEAE-Sephacel, Percoll および DNA 交互配列ポリマー・poly (dI-dC) は, Pharmacia 社 (米国) より購入した. これ以外の試薬で特に会社名の記載のないものはいずれも和光純薬 (大阪), あるいは半井化学 (京都) の製品を用いた.

### III. 酵母核抽出液の調製および部分精製

#### 1. 酵母核抽出液の調製

S. *cerevisiae* D13-1A を YEPD 培地 [1% bacto-yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% グルコース], 30°C で, 対数増殖期 ( $OD_{600}=1.5$ ) まで培養したのち, 遠心によって集菌し S 緩衝液 [1M ソルビトール, 50mM リン酸カリウム (pH 7.8), 0.5mM 塩化カルシウム] で菌体 [約 10g] を洗浄した. 次に, 30mM dithiothreitol (DTT) を含む S 緩衝液に菌体を懸濁し, 30°C で 10 分間放置した後, Z 緩衝液 [1M ソルビトール, 25mM リン酸カリウム (pH 7.8), 25mM コハク酸ナトリウム, 0.5mM 塩化カルシウム, 0.5mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 3mM DTT] に懸濁しなおし, ザイモリエイス 60000 を加えて, 30°C で静かに振とうした. 約 30 分後に遠心 (3000rpm, 5 分) によりスフェロプラストを集め, S 緩衝液で洗浄した. 次にスフェロプラストを, 0.4% Triton X100, 18% Ficoll, 10 $\mu$ g/ml ロイペプチン, 10 $\mu$ g/ml アンチパインを含む PC 緩衝液 [20mM リン酸カリウム (pH 6.4), 0.5mM 塩化カルシウム, 0.5mM PMSF] に懸濁して破菌し, Potter-Elvehjem ホモジェナイザー (テフロンベッセル) を用いて溫和にホモジェナイズした. ホモジネートはあらかじめ調製しておいた 30% Percoll 濃度勾配 [30% Percoll, 1M ソルビトールを含む PC 緩衝液を 15000rpm 1 時間遠心したもの] にのせ, 水平ローターで 3000rpm 20 分遠心した. この操作によって核と, その他の細胞質成分を分離した. つぎに, Percoll 濃度勾配より核画分を取り出し, Percoll を除去するために 1M ソルビトールを含む PC 緩衝液を 10 倍量加えて攪拌し, 再び遠心で核を集めた. 核からの核抽出液の調製は, Dignam ら<sup>19)</sup> の方法に従って次のように行なった. 分離された核を, C 緩衝液 [20

mM HEPES (pH 7.5), 0.42M 塩化ナトリウム, 25% グリセロール, 1.5mM 塩化マグネシウム, 0.2mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml ロイペプチン, 10 $\mu$ g/ml アンチパイン] に懸濁して, Wheaton ホモジェナイザー (B 型ベッセル) を用いてホモジェナイズした. ホモジネートは, さらに 30 分間, スターラーで攪拌した後, 25,000xg で 30 分遠心した. 得られた透明な上清を, C 緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel カラム (カラム容量, 3ml) を通過せしめて核酸を除去した. この除核酸画分を, D 緩衝液 [20mM HEPES (pH 7.5), 0.1M 塩化カリウム, 20% グリセロール, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF] に対して透析した後, 再び遠心 (25,000xg, 20 分) して沈殿を除去した. この上清すなわち, 核抽出液は, 液体窒素中で凍結した後, -70°C で保存した. 核抽出液のタンパク質総量は通常 20mg (総容量, 5~20ml) であった. なお, タンパク質濃度は Bradford 試薬<sup>10)</sup> を用いて測定した.

#### 2. ヘパリンアガロース・クロマトグラフィーによるタンパク質因子の部分精製

核抽出液中のタンパク質因子の部分精製に, ヘパリンアガロース・クロマトグラフィーを用いた. 酵母核抽出液 (20ml, タンパク質濃度 1mg/ml) を D 緩衝液に対して透析し, あらかじめ同緩衝液で平衡化しておいたヘパリンアガロースカラム (カラム容量, 1.5ml) に添加する. カラムは 3 倍量の同緩衝液で洗浄したのち, 0.1M から 1M までの塩化カリウム濃度勾配 (18ml) を用いて溶出を行った. 溶出した各画分について,  $^{32}$ P で標識した DNA 断片との結合活性をゲルシフトアッセイで測定した. 今回, 主に用いた No.32 画分は, タンパク質濃度, 0.7 $\mu$ g/ $\mu$ l で, 0.45M KCl で溶出されたものである.

### IV. ゲルシフトアッセイによるタンパク質・DNA 複合体の検出

#### 1. $^{32}$ P-標識 DNA プロープの作成

K49 プロープの場合, M13 組み換え体の挿入 DNA 断片を, HindIII-Sac I で切り出し, ポリアクリルアミドゲルで精製した後, Klenow fragment と ( $\alpha$ - $^{32}$ P)-dCTP を用いて, HindIII の 3' 末端標識を行った. 合成オリゴヌクレオチドプロープの場合, T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより, ( $\gamma$ - $^{32}$ P)-ATP を用いて 5' 末端標識を行った.

#### 2. DNA・タンパク質複合体の同定

プロープおよびコンペティター DNA の熱変性は, 10mM Tris·HCl (pH 7.5)-1mM EDTA 溶液中,

90~95°C, 5分で行い, 迅速に氷槽中で冷却したのち, すぐに測定に用いた. ゲルシフトアッセイの反応液は, 20μl で 20mM Tris・HCl (pH 7.5), 50mM 塩化ナトリウム, 10%グリセロール, 1 mM DTT, 0.4~1 μg poly (dI-dC), <sup>32</sup>P-標識 DNA, コンペティター DNA および 0~5 μg の部分精製核タンパク質を含んでいる. 反応液を 22°C で 30分インキュベートしたのち, 5 μl のゲルローディング緩衝液 (40%グリセロールおよびプロモフェノールブルーを含む TBE 緩衝液 [90mM Tris・H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (pH 8.0), 2 mM EDTA]) を加え, 80V 電圧下で 6%ポリアクリルアミドゲルにのせた. 約10分後, 電圧を 160V に上げて, 4°C で 1~3 時間電気泳動を行った. 泳動には TBE 緩衝液を用いた. 泳動後, アクリルアミドゲルを Whatman 3MM のフィルターに移して乾燥し, X線フィルム X-Omat AR (Kodak, 米国), および増感スクリーンを用いて -70°C で 1~2 日間オートラジオグラフィーを行った.

なお, ヘパリンアガロース画分のリボヌクレアーゼ A による前処理およびプロテアーゼ K による前処理は, いずれも 100 μg/ml の酵素濃度で, 37°C, 30分間行った.

V. 合成オリゴヌクレオチド

合成オリゴヌクレオチドは, DNA シンセサイザー (ABI 社, 米国) で合成し, NENSORB, PREP (NEN, Research products, 米国) を用いて精製した. 本研究で用いた合成オリゴヌクレオチドの省略形および塩基配列を以下に示す.

C2

5'- CAGATTTTATGTTTAGATC -3' (19mer)

C5

5'- GAAAAGCAAGCATAAAAGATCTAAA CATAAAATCTG-3' (36mer)

C6

5'- CAGATTTTATGTTTAGATCTTTTAT GCTTG-3' (30mer)

YARS⊖

5'- GATCCGAATTCAGATTTTATGTTT A -3' (25mer)

G6PD⊕

5'- GGAGGGCATCCATGTGGCT -3' (19mer)

HE5

5'- CGTGGTGTGCACTGTGT -3' (17mer)

HE11

5'- GCCCCAGCCAGTGGGGGTTGCGTCAG CAAACACAG-3' (35mer)

成 績

I. ARS1 のドメイン A 近辺と結合するタンパク質因子

ARS1 領域の, ドメイン A および C と相互作用する因子を調べるために, K49 プローブを用いてゲルシフトアッセイを行った. 核抽出液は, *S. cerevisiae* の対数増殖期の細胞より調製し, さらにヘパリンアガロースクロマトグラフィーを用いて, タンパク質因子の部分精製をおこなった. ARS1 領域のうち Pst I 部位か

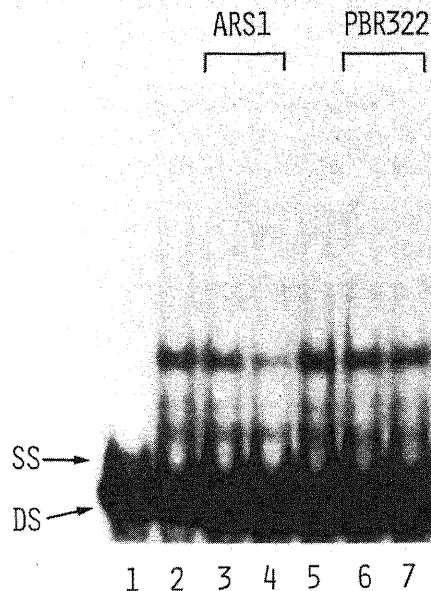


Fig. 2. Gel shift assay of K49 probe. End-labeled K49 fragment (0.2 ng) was incubated with heparin agarose No.32 fraction (1.4 μg protein) in the presence of 1 μg poly (dI-dC) and various amount of nonradioactive competitor DNA fragment as indicated, followed by electrophoretic analysis. Lane 1, the probe alone. Lane 2 and 5, binding reaction in the absence of competitor DNA. Lane 3 and 4, binding reaction in the presence of 50 and 100 ng of ARS1-0.8Kb (EcoR I-Hind III) fragment, respectively. Lane 6 and 7, binding reaction in the presence of 50 and 100 ng of pBR322-2.1Kb (Rsa I-Rsa I) fragment, respectively. DS and SS indicate bands of double strand and single strand probes.

ら Rsa I 部位の 6 bp 上流までの 97bp (図 1, 207-303) を含む K49DNA 断片をプローブに用いて, これらのヘパリンアガロースによる部分精製画分とゲルシフトアッセイを行なうと, ゲル上に 3~4 個のバンドが検出された. この論文では, これらバンドのうち, ARS1 特異的と思われるバンドについて詳しく調べた. 図 2 のレーン 2 に示すように, ヘパリンアガロース No.32 画分を用いると, 遊離の DNA プローブより, 移動度の小さいバンドが検出された. 図 3 に示すように, ゲルシフトアッセイで移動度の小さいバンドを示すタンパク質画分 (No.30~32 画分) はヘパリンアガロースクロマトグラフィーにおいて 0.38~0.45M KCl で主に溶出されるものである. この複合体のバンドは, ARS1-0.8Kb (HindIII-EcoR I) DNA 断片を 100ng まで加えた場合, 減少したが (図 2, レーン 3, 4), pBR322-2.1Kb (Rsa I-Rsa I) DNA 断片を加えた場合は, バンドに変化は見られなかった (図 2, レーン 6, 7). また, プロテアーゼ K でヘパリンアガロース画分を前処理したのちゲルシフトアッセイを行った場合, このバンドは検出されなかったが, リボヌクレアーゼ A による前処理の場合では検出された. これらの結果から, このバンドは ARS1 領域

に特異的に結合するタンパク質因子によって形成されたものと考えられた. しかし, K49 DNA 断片の高い AT 含有量のためか, K49 プローブ中には, わずかな量の一本鎖プローブが含まれていた (図 2, レーン 1). そしてこの一本鎖プローブのバンドは, タンパク質を加えたとき効率良く消失したため (図 2, レーン 2), 一本鎖 DNA プローブにタンパク質が結合している可能性が考えられた. そこで K49 二本鎖プローブを熱変性によって一本鎖として急冷したのち, ゲルシフトアッセイを行ったところ, 二つの強いバンドが検出された (図 4, レーン 4, 複合体 1, 複合体 2). このとき, 一本鎖 DNA プローブへの結合活性は非常に強く, プローブは全て複合体を形成していた. 一方, 熱変性しないプローブの場合, ごく弱いバンドしか検出されなかった (図 4, レーン 2). このことにより, 検出されたバンドは, 一本鎖 DNA プローブとタンパク質との複合体によるものと結論された.

## II. 一本鎖 DNA-タンパク質複合体の特異性

つぎに検出されたバンドが特異的な DNA-タンパク質複合体によるものかどうか調べるために, 合成オリゴヌクレオチドを用いてコンペティション実験を行った. 上記の熱変性した K49 プローブとともに, ⊖

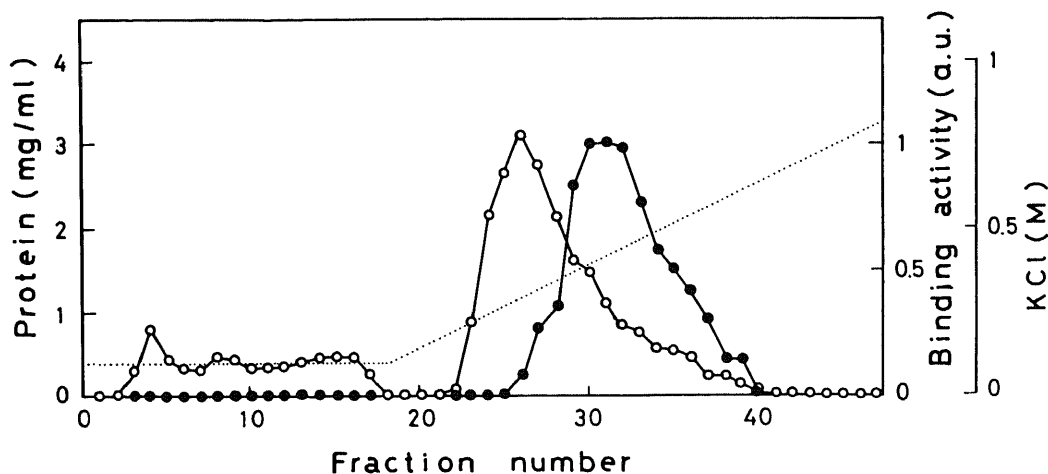


Fig. 3. Partial purification of K49 DNA binding factor by heparin agarose chromatography. The nuclear extract (volume 20 ml, total protein 20 mg) was dialyzed against buffer D and loaded onto heparin agarose column (volume 1.5 ml) equilibrated with buffer D. The column was washed with three column volume of the same buffer, and then eluted with a 18 ml linear gradient from 0.1M to 1M KCl in buffer D. Individual fractions (fraction volume; 1.5 ml (No.1~18), 0.5 ml (No.19~55)) were assayed by gel shift assay with double stranded K49 DNA probe as described under Materials and Methods. Intensity of K49 DNA-protein complex bands on autoradiographs shown in Fig. 2 was measured by a Simadzu CS-9000 densitometer. One a. u. (arbitrary unit) of binding activity corresponds to absorbance of 1.0 at 620 nm of desitometer. ○—○, protein concentration; ●—●, binding activity to K49 probe; ·····, KCl concentration.

鎖側でコンセンサス配列とその近傍のコンセンサス類似配列を含む 30mer の C6 合成オリゴヌクレオチドをコンペティターとして加えると、複合体 2 のバンドは 0.5ng のコンペティターでほとんど消失し、複合体 1 のバンドも弱いコンペティションをうけた (図 5, レーン 3, 4)。これに対し、ARS に無関係の合成オリゴヌクレオチド、HE11 (35mer) では、1 ng 加えても 2 つのバンドに変化は見られなかった (図 5, レーン 9, 10)。さらに HE5, G6PD<sup>+</sup> 合成オリゴヌクレオチドでも 1 ng でコンペティションは見られなかった (結果示さず)。この結果から、複合体 1 および 2 は特異的な 1 本鎖 DNA-タンパク質複合体であり、コンセンサス配列とその近傍を含む領域と相互作用していると考えられた。また、コンセンサス配列とリンカー配列を含む 25mer の合成オリゴヌクレオチドである YARS<sup>⊖</sup> をコンペティターとして加えた時、C6 と同様にコンペティションが見られたが (結果示さず)、コンセンサス配列のみを含む 19mer の C2 合成オリゴヌクレオチドでは、複合体 1, 2 のバンドの減少は見ら

れなかった (図 5, レーン 6, 7)。これらの結果から、今回検出され DNA-タンパク質複合体の形成には、C6DNA と YARS<sup>⊖</sup> の共通部分であるコンセンサス配列が重要であるが、コンセンサス配列のみでは不十分であり、その近傍の配列が必要であると考えられた。

また、検出される複合体 1 と複合体 2 の割合はタンパク質の濃度に依存していた。測定に用いるタンパク質濃度が低い時には、複合体 1 のバンドが主に検出されるが、タンパク質濃度の増加とともに、複合体 2 のバンドが増加し、高タンパク質濃度ではほとんど複合体 2 のバンドのみが検出された (結果示さず)。これは、タンパク質濃度に依存して、複合体 1 より複合体 2 が形成されたものと考えられ、おそらく、複合体 1 のバンドは 1 量体-DNA 複合体、複合体 2 は 2 量体-DNA 複合体によるものであろう。また、複合体 1 にさらに親和性の低い第二のタンパク質因子の結合に

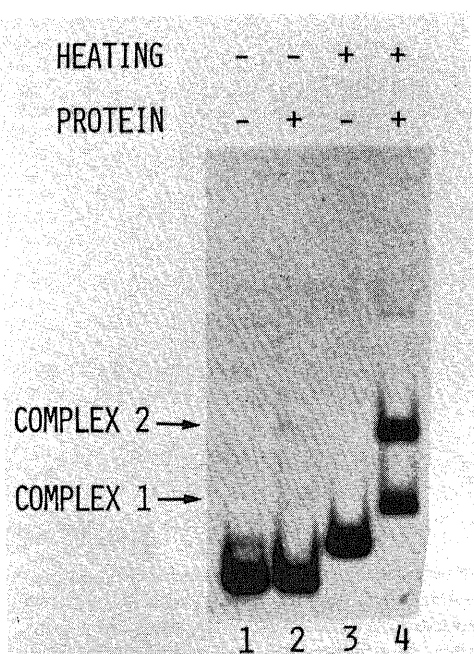


Fig. 4. Comparison of binding activity between double strand probe and single strand probe of K49 fragment. Either unheated (lane 1, 2) or heated (lane 3, 4) K49 probe was incubated without (lane 1, 3) or with (lane 2, 4) heparin agarose No.32 fraction (0.9 $\mu$ g protein) in the presence of 1 $\mu$ g poly (dI-dC).

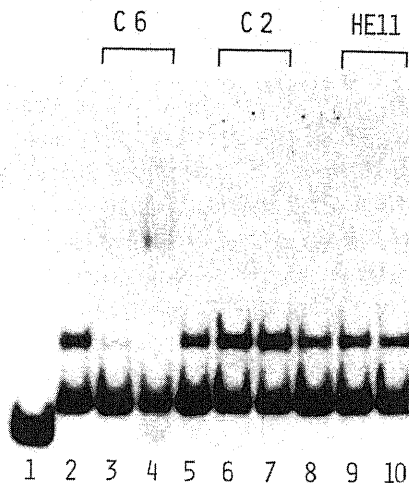


Fig. 5. Gel shift assay of K49 single strand probe. Heated K49 fragment (0.2 ng) which was end-labeled in <sup>⊖</sup> strand was incubated with heparin agarose No.32 fraction (0.7 $\mu$ g protein) in the presence of 1 $\mu$ g poly (dI-dC) and various amount of nonradioactive competitor DNA fragment as indicated, followed by electrophoretic analysis. Lane 1, the probe alone. Lane 2, 5, and 8, binding reaction in the absence of competitor DNA. Lane 3 and 4, binding reaction in the presence of 0.5 and 1 ng of C6 oligonucleotide, respectively. Lane 6 and 7, binding reaction in the presence of 0.5 and 1 ng of C2 oligonucleotide, respectively. Lane 9 and 10, binding reaction in the presence of 0.5 and 1 ng of HE11 oligonucleotide.

よって複合体2が形成された可能性も考えられる。

### III. 合成オリゴヌクレオチドプローブによる複合体形成

上記の実験結果により、複合体の形成に関与するK49プローブの領域は、C6合成オリゴヌクレオチドに含まれる領域にあると考えられたため、C6合成オリゴヌクレオチドをプローブとしてDNA-タンパク質複合体が形成されるかについて調べた。C6合成オリゴヌクレオチドプローブと、ヘパリンアガロースNo.32画分を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、図6のように、移動度の小さい強いバンド(複合体a)と、移動度の大きい弱いバンド(複合体b)の二つのバンドが検出された。これらの二つのバンドはプロテアーゼKによるヘパリンアガロース画分の前処理によって消失したが、リボヌクレアーゼAによる前処理では影響を受けなかったため、タンパク質因子によるものと考えられた。C6合成オリゴヌクレオチドをコンペティターとして加えた時、複合体aのバンドは、コンペティター0.5ngで完全に消失し、複合体bバンドは、0.5ngでいったん増加し、その後1ngで、完全に消失した(図6, レーン3~5)。しかし、

HE11合成オリゴヌクレオチドをコンペティターとして用いたとき、1ngでも両バンドは減少せず(図6, レーン8, 9)、熱変性したpBR322-2.1kb (Rsa I-Rsa I) DNA断片をコンペティターとして用いたときも、2ngで同様にバンドは減少しなかった(図6, レーン12~14)。また、HE5, G6PD $\oplus$ 合成オリゴヌクレオチドでも、1ngでコンペティションは見られなかった(結果示さず)。これらの結果より、両バンドは、特異的なタンパク質-DNA複合体によるものと考えられた。また、pBR322-2.1kb (Rsa I-Rsa I) DNA断片について、さらにコンペティターの量を増やしてコンペティション実験を行った結果、この検出されたタンパク質因子は熱変性したpBR322 DNA断片よりも約20倍強くC6合成オリゴヌクレオチドに結合することがわかった。検出された二つのバンドが、親和性の異なる2つのタンパク質因子によるものであるのか、1つのタンパク質因子のモノマーとオリゴマーの関係によるものであるのかは、現在のところ不明である。

つぎに、 $\oplus$ 鎖DNAにも同様なタンパク質因子が相互作用するかどうかを調べるために、 $\oplus$ 鎖のコンセン

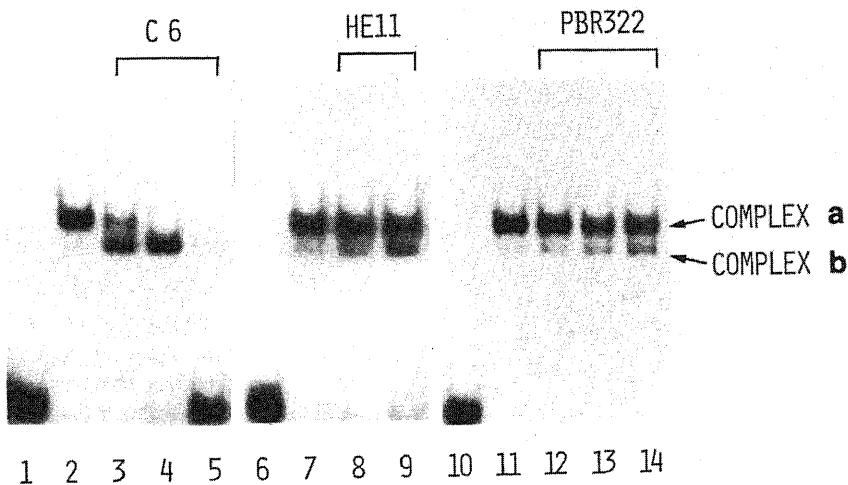


Fig. 6. Gel shift assay of C6 synthetic oligonucleotide probe. End-labeled C6 oligonucleotide (0.04 ng) was incubated with heparin agarose No.32 fraction (0.7  $\mu$ g protein) in the presence of 0.4  $\mu$ g poly (dI-dC) and various amount of nonradioactive competitor DNA fragment as indicated, followed by electrophoretic analysis. Lane 1, 6 and 10, the probe alone. Lane 2, 7, and 11, binding reaction in the absence of competitor DNA. Lane 3, 4 and 5, binding reaction in the presence of 0.25, 0.5 and 1 ng of C6 oligonucleotide, respectively. Lane 8 and 9, binding reaction in the presence of 0.5 and 1 ng of HE11 oligonucleotide, respectively. Lane 12, 13 and 14, binding reaction in the presence of 0.5, 1 and 2 ng of heat denatured pBR322-2.1Kb (Rsa I-Rsa I) fragment, respectively.



サス配列およびその近傍の類似配列を含む C5 合成オリゴヌクレオチドを用い実験を行った。C5 合成オリゴヌクレオチドプローブとヘパリンアガロース No.32 画分を用いてゲルシフトアッセイをおこなったところ、図 7 のように、強いバンドが検出された。このバンドはプロテアーゼ K によるヘパリンアガロース画分の前処理によって消失したが、リボヌクレアーゼ A による前処理では影響を受けなかったため、タンパク質因子によるものと考えられた。このバンドは、C5 合成オリゴヌクレオチドをコンペティターを加えたとき消失するが(図 7, レーン 3, 4), HE11 合成オリゴヌクレオチドでは、ほとんど変化しなかった(図 7, レーン 6, 7)。この結果から、⊕鎖にも、⊖

鎖と同様に特異的な一本鎖結合タンパク質が相互作用することが明らかとなった。

#### 考 察

*S. cerevisiae* の染色体複製開始に関与するタンパク質を検索する目的で、*S. cerevisiae* の ARS1 領域と相互作用するタンパク質因子の検出を、ゲルシフトアッセイを用いて行った。ドメイン A 近傍と、ドメイン C の一部を含む K49 DNA 断片をプローブとして用いたとき、*S. cerevisiae* 核抽出液のヘパリンアガロースクロマトグラフィーによる部分精製画分とのゲルシフトアッセイで、ゲル上に 3~4 のバンドを検出し、そのうちの一つは⊖側の一本鎖 DNA と結合したものであることが明らかとなった。さらに K49 プローブを用いたコンペティション実験と合成オリゴヌクレオチドプローブの実験より、検出された一本鎖 DNA 結合タンパク質因子が、⊖鎖のコンセンサス配列およびその近傍の類似配列を含む領域と特異的に結合していることが明らかとなった。また、同じ領域の⊕鎖にも、特異的な結合タンパク質が検出された。しかし、⊖鎖に結合するタンパク質因子と⊕鎖に結合するタンパク質因子がそれぞれ異なった因子であるのか同一の因子であるのかは、今までの実験データでは、明らかでない。特異的な配列を認識する一本鎖 DNA 結合タンパク質については、最近、幾つかの報告がなされている。Lannigan ら<sup>17)</sup>は、エストロゲンレセプターが、一本鎖の estrogen responsive element (ERE) のコーディング鎖に特異的に結合することを見い出しており、また、Gaillard ら<sup>18)</sup>は、simian virus 40 (SV40) の転写制御領域における、21bp 繰り返し配列の後期コーディング鎖側に特異的に結合するタンパク質を、monkey CV1 細胞から精製している。今回、*S. cerevisiae* で検出した一本鎖 DNA 結合タンパク質因子は、熱変性した pBR322DNA 断片と比較して、約 20 倍強く C6 オリゴヌクレオチドの一本鎖 DNA に結合するが、Gaillard らの見い出したタンパク質と比較すると、その特異性はやや低い。これは、タンパク質-DNA 複合体の形成に関して、特異的な認識による結合ばかりでなく、ある程度、非特異的な結合力が関与している可能性も考えられる。

ARS1 領域に特異的に結合するタンパク質については、現在までに、ABF I<sup>10-12)</sup>、ABFIII<sup>13)</sup> が報告されている。ABF I は、ARS1 領域、ドメイン B の、bending 領域と重複した ABF I 部位に結合するタンパク質因子で、ARS1 以外にも、ARS2、HMRE、2 μm プラスミド、HIS3-DED1 等の ARS に結合部位

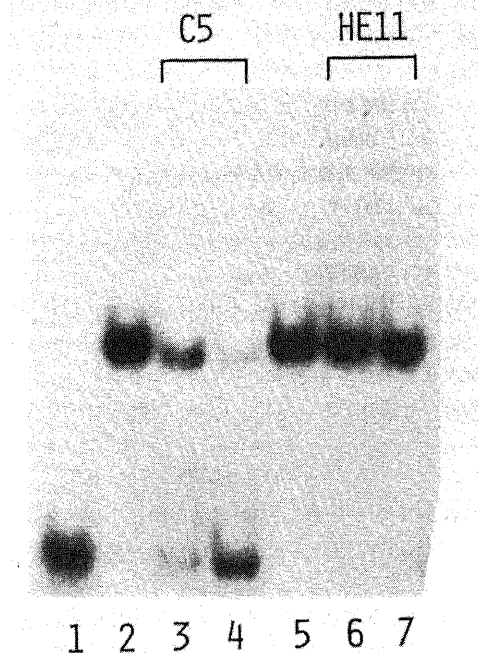


Fig. 7. Gel shift assay of C5 synthetic oligonucleotide probe. End-labeled C5 oligonucleotide (0.04 ng) was incubated with heparin agarose No.32 fraction (0.7 μg protein) in the presence of 0.4 μg poly (dI-dC) and various amount of nonradioactive competitor DNA fragment as indicated, followed by electrophoretic analysis. Lane 1, the probe alone. Lane 2, and 5, binding reaction in the absence of competitor DNA. Lane 3 and 4, binding reaction in the presence of 0.5 and 1 ng of C5 oligonucleotide, respectively. Lane 6 and 7, binding reaction in the presence of 0.5 and 1 ng of HE11 oligonucleotide, respectively.

を持っている。しかし、ABFI は、ヒストン H2B, H4, HMLE の ARS には結合しないし、ARS とは無関係な DED1 遺伝子の近傍の upstream activating sequence (UAS) に結合することが知られている。また、ARS1 における ABFI 結合部位の欠損変異は、ARS 活性に、わずかな影響しか及ぼさない<sup>912)</sup>。それゆえ、少なくともプラスミドにおいては、ABFI の ARS 活性への寄与は、少ないと考えられる。また、Sweder ら<sup>18)</sup>によって示された ABFIII についても、ABFI と同様に、その結合部位の欠損変異による ARS 活性への影響は少ない。これらのことより、ドメイン B と、ドメイン B を認識するタンパク質因子との相互作用だけでは、ARS1 の機能を説明することは不十分であり、ドメイン A 及びその近傍と相互作用するタンパク質因子を調べるのが重要だと考えられる。今回、検出した一本鎖 DNA 結合タンパク質因子が、直接に、DNA 複製開始に関わっているかどうかについては調べていないが、その認識部位が、コンセンサス配列およびその近傍のコンセンサス類似配列を含む領域であることは、重要であると思われる。コンセンサス配列を含む 19bp エレメントはセントロメアを含むプラスミドで、弱い ARS 活性をしめすが<sup>19)</sup>、セントロメアを含まないプラスミドでは、高頻度形質転換活性を示さない<sup>9</sup>。後者のプラスミドでは、コンセンサス配列に加えて、その近傍の領域 (PstI-BglII) が、高頻度形質転換活性に必要なものである。Palzkill ら<sup>9)</sup>は、C2G1 の ARS において、コンセンサス配列単独では ARS 活性を示さないが、コンセンサス配列と近傍のコンセンサス類似配列をもつものでは ARS 活性が見られることを示し、ARS 領域に複数存在するコンセンサス類似配列が ARS 活性にとって重要である報告している。これらの報告を考え合わせると、ARS1 において ARS 活性に重要なのは、コンセンサス配列およびその近傍のコンセンサス類似配列を含む領域と考えられ、この領域の一本鎖 DNA と特異的に相互作用するタンパク質因子を検出したことは、意義深いことと思われる。興味深いことに、SV40 の DNA 複製必須領域においても、特異的な一本鎖 DNA 結合タンパク質因子が、Traut ら<sup>20)</sup>によって見いだされている。Monkey kidney cell 由来のこのタンパク質因子は、二本鎖 DNA 複製必須領域に特異的に結合すると同時に、この領域のどちらの側の一本鎖 DNA にも特異的に結合すると報告されている。また、この SV40 結合タンパク質は、必須領域のうちパポーウイルスで保存されている 12bp の領域に変異をもち、かつ複製活性を持たない変異配列には結合しないため、

SV40 の DNA 複製に関与するタンパク質因子であると結論されている。今回、*S. cerevisiae* において、単一因子によるのか、複製の因子によるのか明らかでないが、ARS1 のドメイン A およびその近傍の領域について、⊖鎖、⊕鎖双方に、特異的なタンパク質が検出されたことから、SV40 複製必須領域と相互作用するタンパク質と *S. cerevisiae* で検出されたタンパク質が、同じような機能をもつものである可能性が考えられた。

DNA 複製開始機構が最もよく調べられているのは、*E. coli* であるが、*E. coli* における DNA 複製開始は、DNA 複製必須領域である *oriC* 領域でおこり、この際、プレプライミング複合体形成に、*dnaA*, *dnaB*, *dnaC* のタンパク質が関与することが、明らかとなっている。まず、4 個の *dnaA* ボックスを含む領域に、複数の *dnaA* タンパク質が結合することによって初期複合体が形成され、それによって、近接した 13mer のモチーフが 3 個並んで存在する領域が、二本鎖から一本鎖へ開かれる。続いて、その開かれた一本鎖の領域に、*dnaB*, *dnaC* タンパク質が導入されてプレプライミング複合体が形成される<sup>21)</sup>。今回、*S. cerevisiae* において、特異的な一本鎖 DNA 結合活性をもつ核タンパク質因子を検出したが、*E. coli* の基本的な機構 (二本鎖から一本鎖へのオープニング→プレプライミング複合体の形成→プライマーの合成) を参考にすると、これらのタンパク質因子が、複製開始領域の二本鎖 DNA が開かれた後の、プレプライミング複合体の形成に関与していることが予想された。

## 結 論

*S. cerevisiae* の ARS1 領域に結合するタンパク質因子を、ゲルシフトアッセイを用いて調べた結論を得た。

1. ARS1 領域のうち Pst I 部位から Rsa I 部位の 6 bp 上流までの 97bp を含む DNA 断片 (K49) と相互作用するタンパク質因子が検出され、その複合体は、⊖側の一本鎖 DNA とタンパク質との複合体であることが明らかとなった。

2. コンペティション実験より、上記のタンパク質因子の結合部位は、⊖鎖側のコンセンサス配列およびその近傍のコンセンサス類似配列を含む領域にあることが明らかとなり、また、この領域の⊖鎖側合成オリゴヌクレオチドをプローブに用いたときにも、特異的な結合タンパク質が検出された。

3. 同じ領域の⊕鎖側にも、特異的な結合タンパク質が検出された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った久野滋教授に深甚の謝意を表します。また、直接の御指導をいただいた金沢大学がん研究所生物物理学部門村上清史助教授に心から感謝致します。

合成 DNA を供与いただいた大阪大学医学部遺伝学教室小笠原直毅先生、金沢大学医学部生化学第一教室滝沢剛則先生および金沢大学がん研究所生物物理学部門内嶋雅人先生に感謝致します。併せて、本研究の遂行に際し、多大の御指導を賜りました金沢大学医学部生化学第二教室および金沢大学がん研究所生物物理学部門の諸先生方に深謝致します。

## 文 献

- 1) Campbell, J. L.: Eukaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 733-771 (1986).
- 2) Stinchcomb, D. T., Struhl, K. & Davis, R. W.: Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature*, **282**, 39-43 (1979).
- 3) Brewer, B. J. & Fangman, W. L.: The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell*, **51**, 463-471 (1987).
- 4) Broach, J. R., Li, Y. -Y., Feldman, J., Jayaram, M., Abraham, J., Nasmyth, K. A. & Hicks, J. B.: Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 1165-1173 (1983).
- 5) Celniker, S. E., Sweder, K., Srienc, F., Bailey, J. E. & Campbell, J. L.: Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 2455-2466 (1984).
- 6) Kearsley, S.: Structural requirements for the function of a yeast chromosomal replicator. *Cell*, **37**, 299-307 (1984).
- 7) Bouton, A. H. & Smith, M. M.: Fine-structure analysis of the DNA sequence requirements for autonomous replication of *Saccharomyces cerevisiae* plasmids. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2354-2363 (1986).
- 8) Palzkill, T. G. & Newlon, C. S.: A yeast replication origin consists of multiple copies of a small conserved sequence. *Cell*, **53**, 441-450 (1988).
- 9) Snyder, M., Buchman, A. R. & Davis, R. W.: Bent DNA at a yeast autonomously replicating sequence. *Nature*, **324**, 87-89 (1986).
- 10) Shore, D., Stillman, D. J., Brand, A. H. & Nasmyth, K. A.: Identification of silencer binding proteins from yeast: possible roles in SIR control and DNA replication. *EMBO J.*, **6**, 461-467 (1987).
- 11) Buchman, A. R., Kimmerly, W. J., Rine, J. & Kornberg, R. D.: Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 210-225 (1988).
- 12) Diffley, J. F. X. & Stillman, B.: Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2120-2124 (1988).
- 13) Sweder, K. S., Rhode, P. R. & Campbell, J. L.: Purification and characterization of proteins that bind to Yeast ARSs. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17270-17277 (1988).
- 14) Tschumper, G. & Carbon, J.: Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. *Gene*, **10**, 157-166 (1980).
- 15) Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G.: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.*, **11**, 1475-1489 (1983).
- 16) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- 17) Lannigan, D. A. & Notides, A. C.: Estrogen receptor selectively binds the coding strand of an estrogen responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 863-867 (1989).
- 18) Gaillard, C., Weber, M. & Strauss, F.: A sequence-specific single-strand-binding protein for the late-coding strand of the simian virus 40 control region. *J. Virology*, **62**, 2380-2385 (1988).
- 19) Srienc, F., Bailey, J. E. & Campbell, J. L.: Effect of ARS1 mutations on chromosome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1676-1684 (1985).
- 20) Traut, W. & Fanning, E.: Sequence-specific interactions between a cellular DNA-binding protein and the simian virus 40 origin of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 903-911 (1988).
- 21) Bramhill, D. & Kornberg, A.: Duplex

opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of *E. coli* chromosome. *Cell*, 52, 743-755 (1988).

**Studies on Protein Factors Which Interact with Autonomously Replicating Sequence ARS1 Region of *Saccharomyces cerevisiae*** Kouji Kuno, Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, 98,912—922 (1989)

**Key words** *S. cerevisiae*, ARS1, DNA binding factor, gel shift assay, single-stranded DNA

#### Abstract

Since plasmids containing ARSs can transform *S. cerevisiae* cells at high frequency, ARSs are considered to be replication origins of chromosomes. To study the mechanism of initiation of eukaryotic chromosomal replication, we examined protein factors which interact specifically with ARS1 region mapped on chromosome IV near the centromere in *S. cerevisiae*. Using gel shift assay, we found protein factors that bound to single stranded DNA of K49 containing 97 bp region from Pst I site to 6 bp upstream of Rsa I site of ARS1. Competition experiments with various synthetic oligonucleotides suggest strongly that the recognition site for these factors was included in C6 oligonucleotide containing the consensus sequence and adjacent consensus-related sequence of  $\ominus$  strand of K49. Indeed, when C6 oligonucleotide was used as the probe, sequence-specific oligonucleotide-protein complexes were detected. When C5 oligonucleotide, which contains  $\oplus$  strand of the same region, was used as the probe, a specific oligonucleotide-protein complex was also detected. Considering the fact that the region containing the consensus sequence and adjacent consensus-related sequence is essential for high frequency transformation activity, these results imply that these detected protein factors participate in DNA replication.