

氏名	笛木 司
生年月日	
本籍	新潟県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第429号
学位授与の日付	平成13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	プラスミド複製開始タンパク質の構造と活性の相関に関する研究
論文審査委員(主査)	山口 和男(遺伝子実験施設・教授)
論文審査委員(副査)	正宗 行人(自然科学研究科・教授) 二階堂 修(薬学部・教授) 福森 義宏(理学部・教授) 花岡美代次(薬学部・教授)

学位論文要旨

Plasmid p SC101 encodes 37.5KDa Rep(RepA) protein. Rep binds to three 21-base repeated sequences (DR#1-#3) in the replication origin region (*ori*) of the plasmid to initiate the replication. On the other hand, Rep binds to two palindromic sequences (IR#1, IR#2) which overlap the *rep* promoter. Binding of Rep to IR#1 enhances the replication and to IR#2 represses the production of Rep itself. It is highly expectable that the balance of these functions of Rep plays the major role on the copy number control of pSC101. In this work, 34 replication-deficient (*Ini*⁻) mutants were isolated with newly developed "positive-selection system" and analysed to study the relations between the structure and the functions of Rep protein. Senenteen of these 34 *Ini*⁻ mutants were found to lack the auto-repressor activity as well as the initiator activity. DNA sequence analysis showed one third from the C-terminal of Rep is dispensible for the auto-repressor activity while the initiator activity seems to require the whole part of the protein. In comparison with the structure of F factor's RepE protein, which has very similar properties to Rep, a model for the function of the C-terminal region of Rep is proposed.

9263 塩基対からなる 2 本鎖閉環状のプラスミド pSC101 にコードされる Rep(RepA)は、316 アミノ酸 (N 末端の Met が切断されているため正確には 315 アミノ酸) から成る分子量 37.5KDa の比較的小さなタンパク質でありながら、このプラスミドの複製開始部位 (*ori*) に存在する 3 つの反復配列 (DR#1-#3) に結合した場合には複製開始タンパク質 (イニシエーター)、また、自らのプロモーターにオーバーラップして存在する 2 組の逆反復配列 (IR#1、#2) に結合し、前者への結合は複製を促進、後者に結合した場合にはオートリプレッサーという複数の活性を有している。またこれらの活性の発現にあたり、Rep はイニシエーターとして機能するときには単量体、オートリプレッサーとして機能するときには二量体の構造をとることが推定されており、pSC101 の複製開始頻度の調節にあたっては、この 2 つの活性のバランスが非常に重要な役割を果たしていると考えられている (図 1)。

近年、pSC101 の複製系、とくに複製開始領域と Rep をはじめとしたタンパク質の相互作用については、多くのことが明らかになりつつあるが、Rep タンパク質自身の構造と機能の相関については、Rep のアミノ酸配列から、タンパク-タンパク相互作用にあずかるロイシンジッパーの存在及び DNA 結合ドメインの存在が推定されているものの、実験的に検証されているのは宿主由来の DnaB タンパク質との相互作用ドメインのみであり、未だに多くは知られていない。したがって、Rep の構造と活性の相関を調べることは、単にタンパク質の構造活性相関という興味にとどまらず、いまだ完全には理解されていない、このプラスミドの複製開始機構と大腸菌内で約 5 個に保たれているコピー数の制御について多くの情報をもたらしてくれると考えられる。

そこで、この探究の初段階として Rep の複製開始活性とオートリプレッサー活性のどちらか、あるいは両方の活性を失った、複数の突然変異株の一次構造を比較し解析することを試みた。この目的のためには、できるだけ多くの突然変異株を単離することが必要であるが、とくに複製開始活性を失った突然変異株 (Ini⁻ 変異株) は、まさに「複製できない」

という理由から、その単離が容易でないことが予想され、事実 pSC101 や P1 に代表される複製開始タンパク質をコードするプラスミドについては、これまでその単離の報告が非常に少ない。そこで、まず、Ini^r 変異株を効率的に数多く得るための実験系を開発した (図 2)。

この系は、pTF001 (*Fori*, pSC101*ori*(Δrep), λcI , Km^r) と pTF005 (pBR*ori*, $\lambda P_L P_R$ -CAT, F_{inc}, Amp^r, *rep*) の 2 つのプラスミドから成っている。pTF001 を保持する宿主細胞に突然変異を誘発した pTF005 を導入すると、pTF005 の F_{incB} によって *Fori* からの複製が阻害されるために pTF001 の複製開始領域が切り替わり、pTF001 は、pTF005 から *trans* に供給される Rep に依存して pSC101*ori* から複製することになる。ここで目的とする、*rep* の Ini^r 変異によって pTF001 が複製不能となり脱落すると、宿主細胞中から λcI が失われ、pTF005 の $\lambda P_L P_R$ 支配下にある CAT が発現して細胞が Cm 耐性になるため、Ini^r 変異株を Cm 添加培地上でポジティブに選択することが可能である。

構築した実験系は、非常に高い信頼性を持って作動し、この系を用いることによって、GC→AT の突然変異を誘発するハイドロキシルアミン、あるいは AT→GT の突然変異を誘発する大腸菌 *mutT* 株で処理した pTF005 から、合計 34 株の Ini^r *rep* 変異株を単離することに成功した。うち 10 株はアミノ酸置換による点突然変異株であり、24 株はナンセンス変異またはフレームシフトによる C 末端の欠失変異株であった (図 3)。これらの変異株について、オートリプレッサー活性を調べたところ、17 株は、イニシエーター活性と同時にオートリプレッサー活性も喪失していた (図 4)。

これらの突然変異株のうち、欠失変異株の塩基配列の解析から、Rep は C 末端からわずか 15 残基のアミノ酸が欠失しただけで複製開始活性を喪失するのに対し、オートリプレッサー活性は C 末端から全長の約 1/3 (codon227 まで) が欠失しても維持されることが明らかになった。この結果は、以前に報告された *in vitro* における C 末端欠失変異 Rep 二量体の逆反復配列に対する結合の性質についての解析結果と非常によく一致している。また、Rep

の codon210-214 には、AT rich 塩基配列に特異的な DNA 結合モチーフ (-KRGRP-) が存在しており、この前後の領域は IR-DNA への結合に深く関与している領域であろうと推測される。

点突然変異株の解析から、今回得られた、Ini 点突然変異は、Rep の N 末端側 (特に codon35 から 134 の範囲) に比較的多く分布していることが明らかになった。以前得られた pSC101 のコピー数を上昇させる点突然変異は、同領域内に集中して報告されており、Rep のこの領域は複製開始活性になんらかの重要な役割を果たしていると推測される。また、これら N 末端側の点突然変異株は全てオートリプレッサー活性を維持していることから、この領域は宿主由来の複製開始タンパク質群との相互作用部位ではないかと推測される。(事実、codon120 の前後の領域は宿主由来の DnaB ヘリカーゼとの相互作用が示唆されている。)

先ごろ、pSC101 に複製系が類似した、大腸菌 F 因子の複製開始タンパク質 RepE についての X 線結晶解析結果が報告された。RepE は、pSC101 にコードされる Rep の、ほぼ 2/3 のサイズを持ったタンパク質であり、Rep と同様に、複製開始因子とオートリプレッサーという 2 つの機能を有している。この報告において、Rep と RepE の双方で保存されている、二回対称軸まわりの疎水性アミノ酸残基の相対位置が指摘された。X 線結晶解析から、RepE の単量体は図 5-A に示すような形状をとっていることが明らかとなったが、分子内に N 末端側と C 末端側の対称的な 2 つのコンポーネントが形成されているのは、指摘された二回対称性を持つ疎水性アミノ酸残基が、水溶液中で各々のコンポーネントの疎水性コアをなしているためと考えられている。これらの疎水性アミノ酸残基の相対位置は、Rep と RepE の間で極めてよく保存されており、このことから、この 2 つのタンパク質が立体構造的に非常に近い関係にあることが予想される。

そこで、報告された RepE の立体構造が Rep に適用可能であると仮定し、これに今回得られた突然変異株からの情報をあてはめてみると (図 5-B)、まず、本研究において明らかとなった、オートリプレッサー活性 (±) の切り替わり点は Leu224 と Gln227 の間に位

置しており、これは RepE の立体構造の $\beta 4'$ の終点とほぼ完全に一致している。

また、本研究で得られた Ini⁻、Rpr⁺ 点突然変異を、RepE の立体構造に位置を対応させてみると、そのほとんど (Asn35→His ($\alpha 2$), Tyr52→Asp ($\beta 2-\alpha 3$), Val111→Gly ($\beta 4$), Tyr119→Asp ($\alpha 5$), Phe121→Cys ($\alpha 5$), Val134→Ile ($\alpha 1'$), Gln221→His ($\beta 4'$)) が以前に報告された 3 種のコピー数上昇突然変異 (Arg46→Gln ($\beta 2$), Glu83→Lys ($\beta 2a$), Glu115→Lys ($\alpha 5$)) と同様に DNA 結合ドメインの逆側に位置している。このことは、これらの変異が宿主由来の複製開始タンパク質群との相互作用に影響を与えているのかもしれないという先の推定と矛盾しない。

このように、Rep の N 末端から 2/3 までの領域については、その構造と機能の相関について大まかな理解が可能になってきつつあると考える。しかし、C 末端からの 1/3 すなわち codon227 以降の構造と機能は、依然大きな謎である。複製開始活性とオートリプレッサー活性を同時に喪失した点突然変異株は、一株のみが得られたが、この点変異は C 末端に極めて近い codon306 に位置していた。codon306 は、欠失変異株の解析から、オートリプレッサー活性に不要であることが明らかになった C 末端からの 1/3 の領域内にあり、なぜこの変異がオートリプレッサー活性をも失活させるのかは、大きな謎である。

この現象を説明する仮説のひとつとして、変異によって、Rep がイニシエーターモードからオートリプレッサーモードに変化するためのスイッチが破壊されたとするモデルを提案する。すなわち、Rep の C 末端が、同時に二量体形成に関与する領域、例えば N 末端のロイシンジッパー領域を立体的に遮蔽しており、Leu306 付近と宿主由来の何らかの因子が相互作用する結果、この C 末端領域にフォールディング等の不可逆的な構造変化が生じて遮蔽が除去されて、Rep の複製開始活性が失われるとともに二量体形成活性 (オートリプレッサー活性) があらわれると推測するものである。

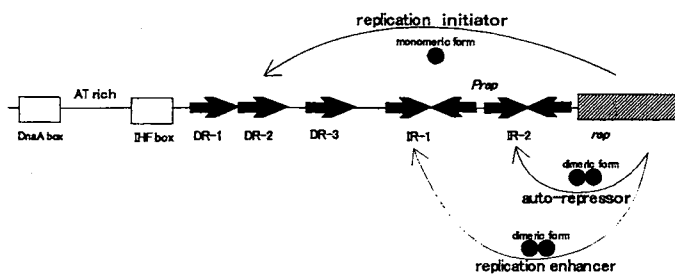


図1 Repタンパク質の機能

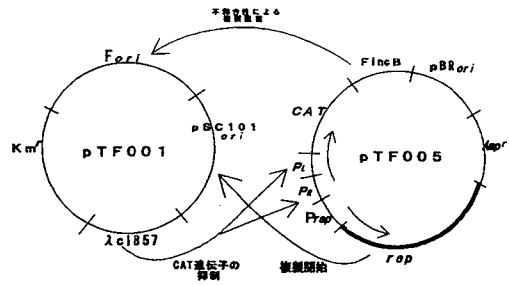


図2 Ini^- 変異株をポジティブに選択するための実験系

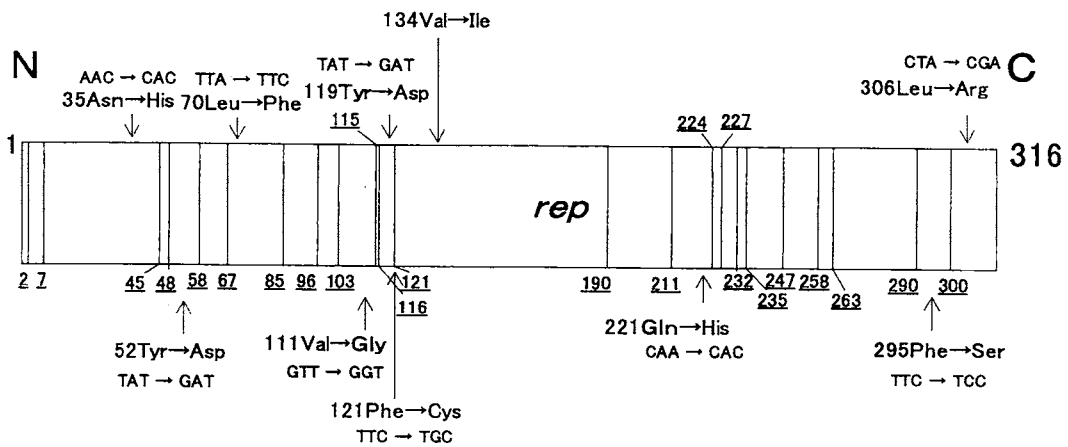


図3 単離された Ini^- 変異株の構造解析

図中の下線付きの数字は、ナンセンス変異またはフレームシフトの位置を示す。

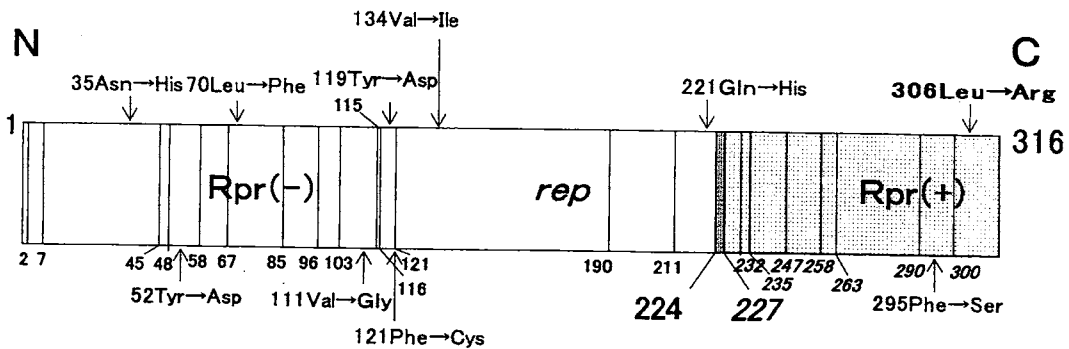


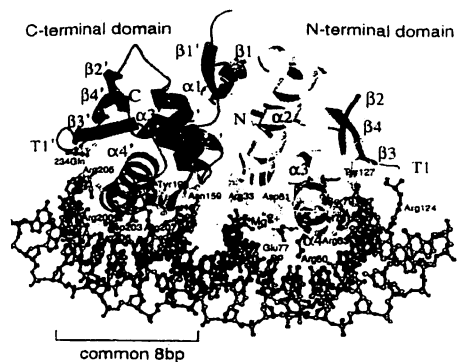
図4 Ini^- 変異株のオートリプレッサー活性

- C末端から欠失するとRepのオートリプレッサー活性が失われる領域
- 今回の実験からオートリプレッサー活性の有無が判定できない領域
- 欠損してもRepのオートリプレッサー活性が維持される領域

すなわち、C末端からの欠失がcodon227にいたるまでは、オートリプレッサー活性は維持される。

また、緑字のアミノ酸置換は、オートリプレッサー活性が維持されており、赤字のアミノ酸置換はオートリプレッサー活性が失われていた。

A



B

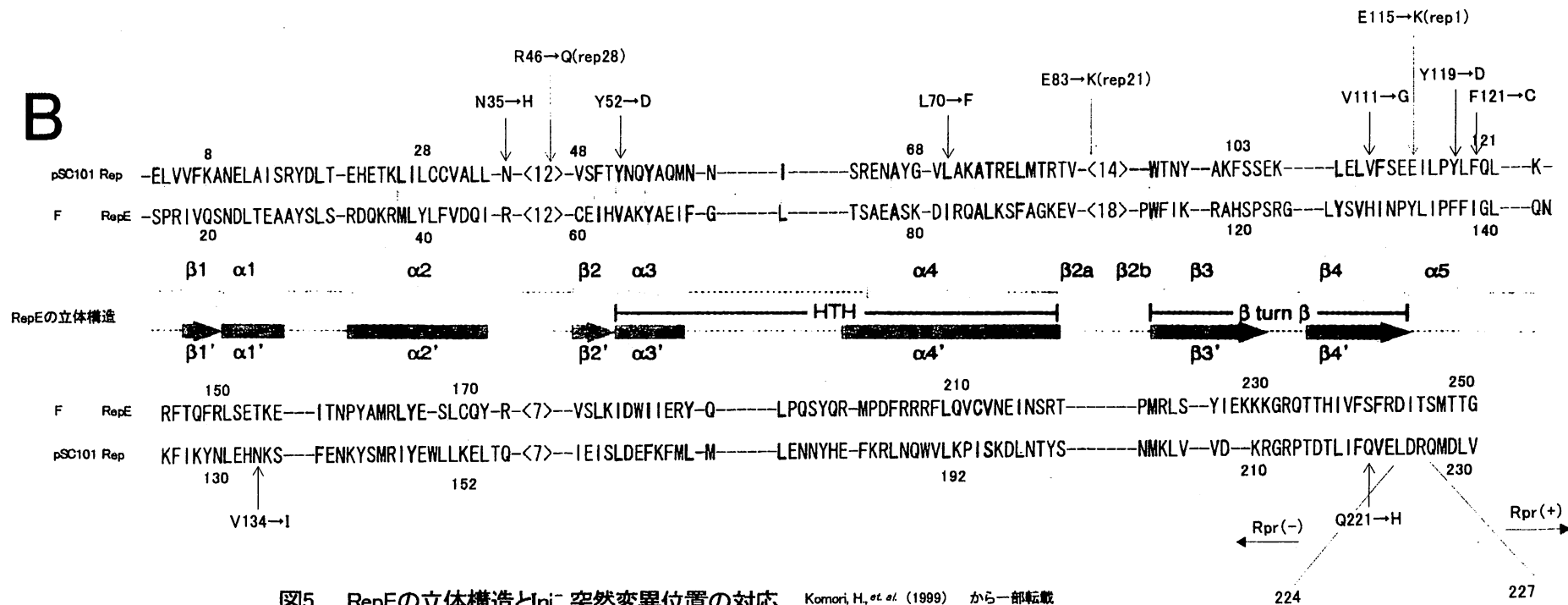


図5 RepEの立体構造とIni⁻突然変異位置の対応 Komori, H., et al. (1999) から一部転載

A: Fori-DNAと結合したRepEの立体構造
 B: 二回対称性を持つ疎水性アミノ酸残基の位置に基づく、RepEの立体構造とRepのIni⁻点変異の対応
 (青字はIni⁻点変異、緑字はコピー数上昇点変異、赤字は欠失変異株のオートリプレッサー活性の切り替わり点を示す。)

学位論文審査結果の要旨

本研究はバクテリア細胞の中で自律複製をおこなっているプラスミド DNA, pSC101 を用い、その複製開始に必須な Rep 蛋白質の構造と活性との相関を解明しようとしたものである。この Rep 蛋白質は、類似した異なる DNA 部位に結合して、複製開始反応、複製のエンハンサー、自己の遺伝子発現のリプレッサーという異なる機能を発揮する。そこで本研究ではこのような異なる機能が Rep 蛋白質のどの部分の構造に依存するかを明らかにするため、種々の Rep 変異株を単離し解析をおこなった。

本研究ではまず、複製開始活性とリプレッサー活性のいずれか、または両方の活性を失った変異 Rep 蛋白質を多数単離するために、変異株の巧妙な選抜法を考案した。従来は複製開始活性を失うとプラスミドの複製ができないため、条件致死的な方法でしか選抜できず、多大な労力を要するため pSC101 の場合、ただ 1 株高温感受性株が得られていたにすぎなかった。そこで、3 種類の DNA 複製系、1 種類の転写リプレッサー遺伝子、3 種類の薬剤抵抗性遺伝子駆使して、Rep 蛋白質の複製開始活性を失ったプラスミドを保持する大腸菌のみがクロランフェニコール添加倍地で生育できるというポジティブに選択できる系を構築した。いくつかのモデル実験を通してこの実験系が高い信頼性をもって働くことが確認されたので、2 種類の異なる突然変異誘起法を用いて Rep 変異株の単離を試みた。その結果 34 株の複製開始活性を失った変異株を単離した。

この 34 株のうち、17 株は同時にリプレッサー活性も失っていた。これら変異 Rep 蛋白質の変異部位を同定するなどした結果、リプレッサー活性は C 末端から全長の約 1/3 が欠失しても維持されることが明らかとなった。それに対して複製開始活性は Rep 蛋白質のほぼ全領域を必要としていた。また、複製開始活性のみを失った 1 アミノ酸置換突然変異のほとんどは N 末端側半分の領域に集中しており、高次構造との関連から他の複製開始に必要な宿主蛋白質との相互作用部位ではないかと推測された。

更に、リプレッサー活性には不必要な C 末端に極めて近い位置の 1 アミノ酸置換突然変異が、複製開始活性とリプレッサー活性を同時に失っていることから、これを説明するために、Rep 蛋白質が複製開始蛋白質の状態からリプレッサーの状態に変化するためのスイッチが破壊されたとするモデルを提唱した。

以上のように、本研究は複製開始活性を失った Rep 変異株をポジティブに選択する画期的方法を開発し、それを用いて Rep 蛋白質の構造と活性との相関に関して多くの新しい知見をもたらしたものであり、十分に博士論文に値すると判定した。