

複製開始タンパク質によるプラスミドpSC101の複製調節機構

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16274

氏名	古野茂一
生年月日	
本籍	石川県
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博甲第335号
学位授与の日付	平成12年3月22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	複製開始タンパク質によるプラスミド pSC101 の複製調節機構
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)	二階堂 修(薬学部・教授) 正宗 行人(研究科・教授) 岩見 雅史(研究科・助教授) 福森 義宏(理学部・教授)

学位論文要旨

Summary

Increased intracellular concentrations of the initiator protein Rep interfere with pSC101 DNA replication, and mutated Rep proteins which cause increase in the plasmid copy number do not inhibit the replication. A *rep* mutant (*rep^{mh}*) defective in the inhibitory activity was isolated and was found to be a new high copy number mutant. The inhibitory function of Rep was enhanced by the co-existence of the directly repeated sequences (DR; iterons) in the replication origin region (*ori*) but not by the inverted repeat sequences (IR) in *ori* and in the *rep* promoter. This synergistic effect of Rep and DR sequences for the replication inhibition was dependent on their intracellular concentrations. Considering that the DR sequences are the specific binding sites of the monomer form of Rep, the Rep monomer-DR complex might be responsible for the inhibition of the plasmid replication. Furthermore, the Rep monomer in the crude cell extracts facilitated dimerization of DR-DNA fragments by T4DNA ligase. Neither synergistic inhibitory function with DR nor Rep mediated dimerization of DR-DNA were observed in high copy number mutant Rep proteins. The role of the Rep-iteron complex in the copy number control of pSC101 is discussed.

1. はじめに

本研究の対象である pSC101 は、*Salmonella panama* より単離された全長 9263bp、宿主染色体あたり 5、6 個存在するプラスミドである。pSC101 にはテトラサイクリン耐性遺伝子と自己複製に必要な 37-kDa の Rep タンパク質などがコードされている。その自己複製に必要な領域は *ori* 領域と *rep* 遺伝子を含む約 1.3kbp である。*ori* 領域の上流に pSC101 が安定に分配されるのに必要な領域 *par* が存在している。その下流には宿主由来の DnaA タンパク質や IHF (Integration host factor) の結合部位である DnaA box、IHF box が存在する。IHF box 両側には 84% と高い割合の AT-rich 領域が存在している。また、さらにその下流には反復配列 (DR-1, DR-2, DR-3) と逆反復配列 (IR-1, IR-2) が存在する。

rep 遺伝子にコードされている Rep 蛋白質は、これまでの研究により細胞内ではモノマーとダイマーという 2 種類の異なる形態で存在し、その関係は平衡状態にあると報告されている。そして、モノマーとして 3 つの DR 配列 (DR-1, DR-2, DR-3) に結合し、複製を開始するイニシエーターとして働くと考えられている。また、ダイマーとしては、IR-1 に結合して複製のエンハンサーとして機能し、*rep* 遺伝子のプロモーター (Prep) 付近の IR-2 に結合して自己の転写

を autoregulation している。このように異なる分子形態の Rep タンパク質は、それぞれ異なる機能を発揮する多機能タンパク質である。

ところが更に Rep タンパク質を細胞内で大量発現させると pSC101 の複製を抑制するインヒビターとしての働きがあることが報告されている。一方、pSC101 の Rep タンパク質のコピー数上昇変異体である Rep1、Rep21、Rep28 (我々の研究室で以前、単離した変異 Rep)は、この複製阻害活性を示さない。また複製阻害活性欠損変異体(Rep^{mh})を単離したところ Rep^{mh}は Rep タンパク質の 113 番目のアミノ酸 Ser から Arg に置換を起こした新しい種類のコピー数上昇変異体であることが分かった(unpublished)。しかし、Rep タンパク質モノマー型あるいはダイマー型のどちらがインヒビターとして働くのか、また、複製阻害現象の機構がどのようなものであるのかは不明である。ところでプラスミド pSC101 の複製領域と非常に類似した構造を持つプラスミド P1、F は複製領域以外にも *rep* 遺伝子の下流に反復(DR)配列が存在している。この DR 配列に Rep タンパク質のモノマーが結合し DR-Rep complex を形作り、これが *ori* 領域中の DR-Rep complex と Rep タンパク質間の相互作用を介して pairing を形成する。このことにより複製開始を負に調節するというモデルが提唱された。また、それらのプラスミドのコピー数上昇変異体は、その pairing 活性が低下しているため、複製開始を抑制することができずコピー数の上昇をもたらすことが報告された。

以上の背景のもとに、我々はプラスミド pSC101 複製の負の調節機構として Rep タンパク質による複製阻害を取り上げ解析した。その結果、initiator-iteron complex の pairing が、その原因として存在する可能性があると考えられた。

2. Rep の過剰合成による pSC101 複製系の阻害

我々の研究室で pSC101 プラスミドを持つ細胞内で Rep タンパク質を過剰発現させたとき、時間を追う毎に pSC101 プラスミドのコピー数が減少することがサザンブロッティング実験で確認された。Rep 量が *rep* プロモーターから発現しているときの 2~3 倍増加で既に以上の現象が見られた。この複製阻害現象を解析するために我々は複製阻害欠損変異体(Rep^{mh})を単離した。この変異体は pSC101 のコピー数を約 3 倍上昇させる働きを持つコピー数上昇変異体であることが分かった。以前、我々の研究室で単離されたコピー数上昇変異体 Rep1、Rep21、Rep28 は複製阻害活性を欠いている事が既に知られている。このことはコピー数上昇現象と複製阻害現象とが密接に関係する可能性を示唆している。

3. 複製阻害に対する DR 配列と Rep タンパク質の相乗効果

プラスミド pSC101 は DR 配列を持つ他のプラスミドと同一細胞内で共存できない現象を不和合性として報告されている。その理由として DR 配列が initiator protein である Rep タンパク質のモノマー型を吸収することでプラスミド pSC101 の複製阻害が起きると考えられていた。たとえ Rep タンパク質のモノマー型が細胞内で不足しても、モノマー型とダイマー型は平衡状態にあるのでダイマー型からモノマー型が補われ、Rep タンパク質の発現系は negative feed back system であるため不足したダイマー型は *rep* 遺伝子から発現されるとすると、この説明では不十分であると考えられた。細胞内での Rep 蛋白質の過剰供給によりプラスミド pSC101 の複製阻害が起きるということは、少なくとも Rep タンパク質のモノマー型あるいはダイマー型がインヒビターとして関与していることが考えられる。そこで我々は以下に示す新たな実験系を考案した。

DR あるいは IR 配列を持つプラスミド(pACYA184 のテトラサイクリン遺伝子上の制限酵素サイトに合成 DNA、DR-3 あるいは IR-2 がタンデムに挿入してあるプラスミド、pSF 系)と Rep overproducer (*lac* promoter を持ち IPTG 誘導下で *rep* 遺伝子を発現できる様に工夫がしてあるプラスミド、pNR、pNC 系)の両方を持つ *E. coli* を様々な濃度の IPTG 誘導下で 50 μ g/ml

Amp, 20 μ g/ml kan, 20 μ g/ml クロラムフェニコール(Cm)を含む 10ml SOB 培地で対数増殖期になるまで培養した。Hanahan 法に従い pYUK101(mini-pSC101)を細胞内に形質転換し、50 μ g/ml Amp, 20 μ g/ml kan, 20 μ g/ml Cm と指示された濃度の IPTG を含む LB 寒天培地に蒔き一晩から二晩、37°C で培養しコロニーの数を数えた。pYUK101 による形質転換効率は pTW601 による形質転換効率で補正し、IPTG 誘導をかけない状態での HI1006/pACYC184(DR3 \times 0)の pYUK101 による形質転換効率を 100%として、それぞれ形質転換効率を算出した。そして Rep の結合配列である DR や IR 配列が同一細胞内に存在したとき Rep の複製阻害活性がどのような影響を受けるかを解析した。その結果、細胞内でトランス位に野生型 Rep タンパク質量と DR 配列の数が増えるに従い、相乗的に pSC101 の複製阻害の増大が見られた(Fig. 1)。

一方、細胞内で三つの IR 配列を持つプラスミド(pSF13)は mini-pSC101 による形質転換効率に影響を与えなかった。以上の結果から、Rep タンパク質の細胞内での大量発現が DR 配列の持つ不和合性を増幅したと考えられる。

Rep モノマーは特異的に DR 配列に結合することが報告されていることから、前の説明としてトランス位にあるプラスミド上の DR-Rep complex が pSC101 ori 上の DR-Rep complex に Rep タンパク質を介して結合する(pairing formation)ことにより、pSC101 ori 領域での複製を阻害するものであると考えられた。この説明に従うと、複製開始頻度の増加(コピー数の増大)を引き起こす変異体 Rep^{mh}、Rep1、Rep21、Rep28 は、pairing formation の形成能力が低下し、その結果、複製阻害活性が失われた(Table. 2)と理解することができる。

4. Rep タンパク質に依存した DR-DNA の二量体化

粗抽出液を用いることにより、Rep モノマーの DR 配列への特異的な結合を検出することにした。まず 1mM IPTG 誘導下で lac プロモーターから野生型 Rep、Rep^{mh}、Rep1、Rep21、Rep28 を発現させた細胞から粗抽出液を作製しウエスタンブロット解析にて各々の Rep タンパク質濃度を計算した後、Rep の DNA 結合性をゲルシフト法で見た。各々の Rep タンパク質を含む粗抽出液を Rep タンパク質を含まない粗抽出液で希釈し全タンパク質量と Rep 量を同じにして野生型 Rep、Rep^{mh}、Rep1、Rep21、Rep28 と DR-3 配列との結合能を従来の binding buffer[10mM Tris-Cl(pH7.5), 11mM EDTA, 10mM MgCl₂, 200mM KCl, 0.1mM dithiothreitol, 2mg/ml BSA, 50 μ g/ml sonicated calf thymus DNA]の条件下でゲルシフトアッセーにて観察した(Fig. 2)。DR-3 配列との結合能において野生型 Rep と Rep28 は、ほぼ同じなのに対し Rep^{mh}、Rep1、Rep21、は低下しており、特に Rep^{mh}は著しく低下していた。また 0mM KCl の Ligation buffer[50mM Tris-HCl(pH7.9), 11mM EDTA, 10mM MgCl₂, 20mM dithiothreitol, 1mM ATP, 0.25mg/ml BSA, 1mM spermidine, 50 μ g/ml sonicated calf thymus DNA]条件下での DNA 結合性を Fig. 2 と同様に見た。何故なら、次の ligation 実験において T4 DNA ligase 反応は高塩濃度で阻害されることから、従来の binding buffer が使えないからである。その結果 Fig. 2 と大差が認められなかった(data not shown)。

粗抽出液を用いることにより、Rep モノマーの DR 配列への特異的な結合を検出することができた。そこで DR-Rep complex の pairing を in vitro で解析することを試みることにした。Rep タンパク質を介して 2 分子の DR-DNA が pairing を起こせば、2 分子の DNA 末端は互いに近接する。その結果、T4DNA ligase による DNA 2 分子の結合頻度は高まると期待される。ここで問題となるのは、粗抽出液中には大量の大腸菌由来の超音波処理 DNA 断片が含まれていることである。この DNA 末端と DR-DNA 末端の結合を防ぐため、DR-DNA 末端は Xho I の cohesive end とした。その結果、Rep に依存しない DNA 末端の結合が効率よく起きると予想されるので、それに対してはプローブ DNA 濃度を低く抑えることで対応した。また、DR 配

列を3個持つ DR1~DR3 DNA をプローブに用いることで、低濃度プローブ DNA への Rep の結合頻度を高めることにした。Ligation buffer 内で Rep タンパク質とリン酸による末端ラベルした DNA プローブを 16℃、30 分反応させた後、DNA を抽出し 7.5% polyacrilamide gel に泳導した。Rep^{inh}を除いて、これらのタンパク質は DR 配列への結合が野生型より多少低いながらも検出されることから、これらのタンパク質に依存した DNA probe の二量体化を試みた。その結果、野性型 Rep (Fig. 3, lane 4) の場合、二量体化した DNA probe の band が見られるが、Rep^{inh}、Rep1、Rep21、Rep28 (Fig. 3) では観察されなかった。特に Rep28 は野生型 Rep と、ほぼ同等の DR 結合活性があるにもかかわらず (Fig. 2)、プローブ DNA の二量体化は全く検出できなかった。

5. まとめ

2 個の DR-Rep complex が Rep を介して pairing を形成するというモデルは DR 配列 DNA の二量体化が野性型 Rep により促進される (Fig. 3) という結果からも強く支持される。しかも Fig. 2 で示した様に野性型と大差のない DR 結合能を持つ Rep1、Rep28 を含め、いずれの変異体 Rep では二量体化の促進が見られなかった (Fig. 3)。つまり、Fig. 4 に示すように細胞内で Rep タンパク質モノマー型や DR 配列が増加すると DR-Rep complex が増加し Rep-Rep 間相互作用を介して pairing 構造を形成し複製を抑制すると考えられる。一方、コピー数上昇変異体は pairing 機構の欠損のため、ほとんどの DR-Rep complex は、initiation complex を形成し複製が促進され、コピー数の上昇を生じると考えられた。

Table 1 plasmids used

Plasmids	Relevant genotypes
pYUK 101	Amp ^r , par, ori, Prep-rep ⁺
pNR11-Kan	Kan ^r , lacI q, pBR322, P lac-rep ⁺
pNR11 ^{inh} -Kan	Kan ^r , lacI q, pBR322, P lac-rep ^{inh}
pNC1-Kan	Kan ^r , lacI q, pBR322, P lac-rep 1
pNC21-Kan	Kan ^r , lacI q, pBR322, P lac-rep 21
pNC28-Kan	Kan ^r , lacI q, pBR322, P lac-rep 28
pTW601	Sp ^r , Rts1
pBead DR-1~DR-3	Amp ^r , pBR322, DR-1~DR-3
pACYC184	Cm ^r , Tet ^r , p15A
pSF 1	Cm ^r , p15A, DR-3 X1
pSF 2	Cm ^r , p15A, DR-3 X2
pSF 3	Cm ^r , p15A, DR-3 X3
pSF 13	Cm ^r , p15A, DR-2 X3
pSF 21	Cm ^r , p15A, DR-1~DR-3

^a Amp^r, ampicillin (50 μg/ml) resistant; Kan^r, kanamycin (20 μg/ml) resistant; Cm^r, chloramphenicol (20 μg/ml) resistant; Sp^r, spectinomycin (30 μg/ml) resistant; Tet^r, tetracycline (10 μg/ml) resistant
pBR322, Rts1 and p15A mean the replication system of pBR322.
Rts1 and p15A, respectively. Definitions of other symbols are described in the legend of Fig. 1

Resident 1 (Rep overproducer)	Resident 2		Resident 2	
	pSF3 (DR-3 X 3) IPTG	pSF21 (DR-1-DR-3) IPTG	0 mM	1 mM
pNR11-Kan (rep ⁺)	45.5	0.0023	77.3	0.0024
pNR11 ^{inh} -Kan (rep ^{inh})	29.1	48.5	25.5	66.6
pNC1-Kan (rep 1)	17.9	63.6	27.3	100.0
pNC21-Kan (rep 21)	43.6	68.2	28.2	102.3
pNC28-Kan (rep 28)	34.5	93.2	22.3	91.8

Table 2. Transformation frequencies (%) of HI1006 cells carrying the Rep overproducer (Resident 1) and the plasmid retaining the DR sequence (Resident 2) with pYUK 101 in the absence or the presence 1mM of IPTG. Transformation frequencies were calculated as described in the legend of Fig. 11.

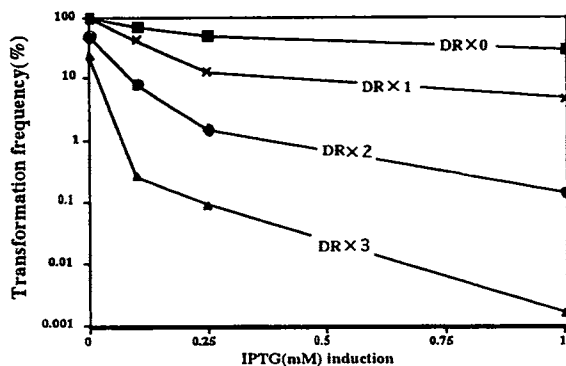


Fig. 1 Effects of DR sequences on the transformation frequency of cells overproducing the Rep protein with mini-pSC101 (pYUK101). Frequency of transformation with pYUK 101 of HI1006 cells carrying the Rep overproducer, pNR11-Kan, and the control vector, pACYC184 or DR repeats supplier (pSF1, pSF2, pSF3) containing more than one DR sequence were transformed with pYUK101. The number of colonies that appeared after incubation at 37°C for 18 to 24 hr was counted. Transformation frequency with pYUK 101 were normalized with those with pTW601. Normalized transformation frequency of cells carrying pACYC184 (DR-3 X 0) and pNR11-Kan without IPTG induction was defined as 100%. pACYC184 (■), pSF 1 (×), pSF 2 (●), pSF 3 (▲).

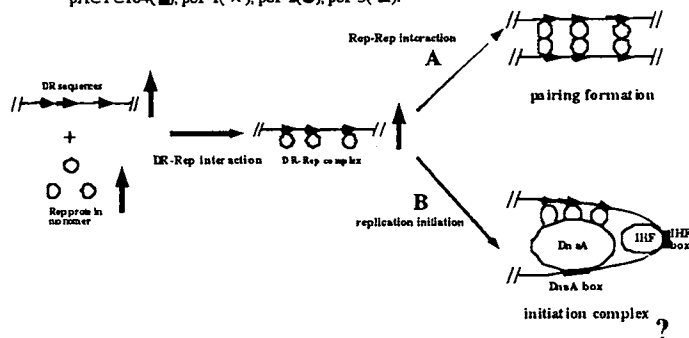


Fig. 4 Schematic presentation of the control of pSC101 replication initiation. Plasmid pSC101 has two kind of formation for control of replication: pairing formation to inhibit replication; initiation complex to start replication (but nobody knows the exact structure therefore question mark is put).

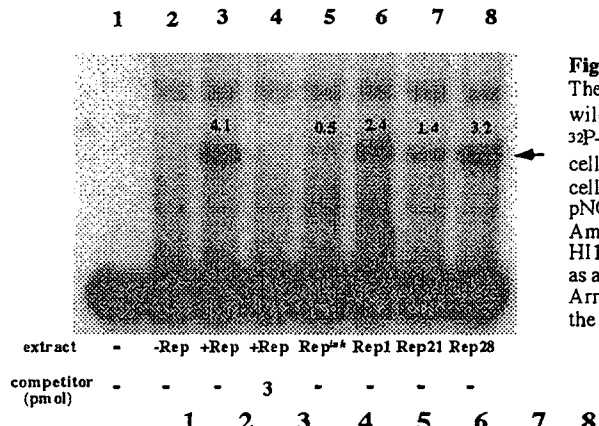


Fig. 2 Binding of Rep protein to DR-3 DNA or IR-2 DNA.
 The crude cell extracts containing 30 μg total protein and 3.1 pmol wild type or mutated Rep protein were incubated with 100 fmol ³²P-labeled DR-3 fragment (lanes 1 to 8) at 16°C for 30 min. Crude cell extracts were prepared from HI1006 cells (lane 2), or HI1006 cells carrying pNR11-Kan (lanes 3 and 4), pNR11^{inh}-Kan (lane 5), pNC1-Kan (lane 6), pNC21-Kan (lane 7) and pNC28-Kan (lane 8). Amounts of total protein were adjusted by addition of the extract from HI1006 cells. Thirty-fold molar excess of nonlabeled DNA were used as a competitor (lane 4). Arrows indicate DNA-protein complex bands. Arrow indicates DNA-protein complex bands. Numbers above (DR) the complex bands mean percentage of DNA bound.

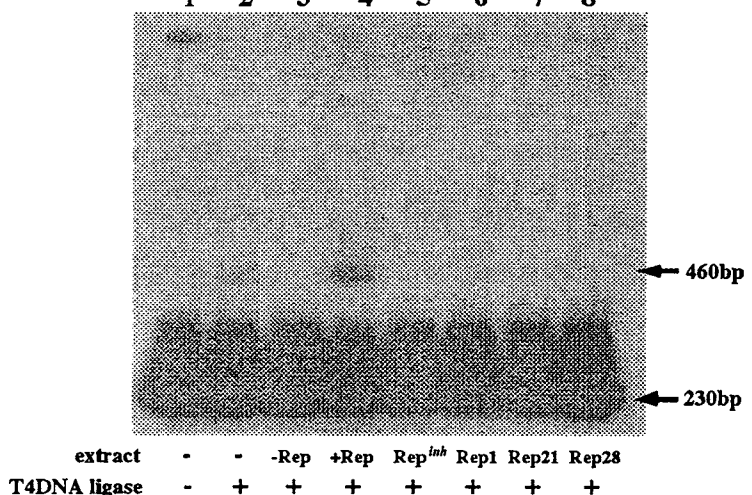


Fig. 3 Intermolecular ligation of the DR-DNA fragment in the presence of wild type and mutated Rep proteins.
 The DR1~DR3 DNA fragment with *Xho*I ends was end-labeled (lane 1) and incubated with T4-DNA ligase in the absence of crude cell extracts (lanes 2), or in the presence of crude cell extracts containing 3.1pmol wild type Rep (lane 4), Rep^{inh} (lane 5), Rep1 (lane 6), Rep21 (lane 7) or Rep28 (lane 8). After incubation at 16°C for 30 min, DNA was purified and loaded on 7.5% polyacrylamide gel. Arrows indicate molecular size markers.

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、その複製開始頻度の調節機構の解明を目指したものである。そしてプラスミドの複製開始に必須な Rep 蛋白質が過剰発現されると、逆にプラスミドの複製が抑制されることに注目し、以下のような新事実を明らかにした。

プラスミド pSC101 の複製開始蛋白質 (イニシエーター) である Rep 蛋白質の細胞内濃度が通常レベルの 3-4 倍以上になると、プラスミド複製が特異的に阻害され、プラスミド DNA を全く持たない細胞が急増することを確認した。Rep 蛋白質は、単量体と二量体の分子形態を取り、それぞれ反復配列 (DR) と逆反復配列 (IR) に結合することが知られていることから、単量体と二量体のいずれが複製阻害に関与するか調べた。すなわち、Rep の過剰発現による複製阻害が、同一細胞内に存在する DR あるいは IR 配列によってどう影響を受けるかを見た。その結果、DR 配列と高濃度 Rep が相乗的に複製阻害を起こすことが明らかになった。このことは DR-Rep 単量体の複合体が複製阻害を引き起こすことを示唆している。一方、複製開始頻度の上昇 (プラスミドコピー数の増加) をもたらす変異 Rep は過剰発現されても複製阻害を示さず、DR 配列との相乗的な効果も認められなかった。

そこで DR-Rep 単量体の性質を調べるために、細胞粗抽出液中の Rep 単量体と二量体が、それぞれ特異的に DR と IR 配列に結合するのを確認した。次に DR 配列を含む DNA 断片が T4DNA リガーゼによって DNA 二量体を形成する反応を Rep 単量体が促進することを見いだした。このことは DR-Rep 単量体同志が互いに相互作用することを示唆している。それに対して、コピー数上昇変異 Rep は、その単量体が DR 配列に結合するにもかかわらず、DNA 二量体の形成を促進することはなかった。そこで DR-Rep 単量体同志の相互作用が複製阻害をもたらすという仮説を提唱した。

以上の本研究により、プラスミド複製開始頻度の調節には、Rep 蛋白質の濃度上昇による複製阻害活性が深く関わるものと考えられ、DNA 複製開始頻度の調節機構の解明に一步前進したものと評価されることから、博士論文に値すると判定した。