

氏名	まつなが ふじ ひこ 松 永 藤 彦
学位(専攻分野)	博士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1850 号
学位授与の日付	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科生物物理学専攻
学位論文題目	mini-F プラスミド複製開始調節機構の解析：複製開始因子 RepE の機能構造
論文調査委員	(主 査) 教授 山岸秀夫 教授 岡 穆宏 教授 永田和宏

### 論 文 内 容 の 要 旨

生命現象の基本過程である自己増殖は、遺伝子ゲノム DNA (または RNA) の複製によって達成される。とくにその調節・制御のメカニズムは、細胞の増殖および分化等との関連で中心的な役割を演じるのできわめて重要であり、その解明のために世界的にも活発な研究が進められている。

本研究はこの問題に取り組み、モデル・システムとして最も理想的な系の一つである大腸菌の mini-F プラスミドを実験材料として解析した。DNA 複製の調節メカニズムは、つきつめれば複製開始調節の遺伝子制御による分子メカニズムの問題である。そこで本研究では、大腸菌細胞の中にプラスミドとして存在する分子量の比較的小さい mini-F プラスミドの利点を生かし、その複製開始メカニズムの機能的構造的解明を目指して研究を進めた。

mini-F プラスミドの複製開始に必須のイニシエーター・タンパク質 RepE は、このプラスミド自身によってコードされ、プラスミド複製の開始頻度調節に鍵となる役割を担う。すなわち、RepE ダイマーは *repE* 遺伝子のオペレーターに結合して自己転写抑制を行う一方で、RepE モノマーは複製オリジンに結合して複製を開始する。これらの既知の事実に立脚し、本研究は RepE タンパク質の機能・構造と複製開始調節メカニズムとの関連を明らかにしようと試みた。

まず、RepE タンパク質が複製オリジンに結合したときに生じる構造変化を解析した。とくに RepE が結合するプラスミド DNA の複製オリジンには、19bp のいわゆるイテロン配列が 4 個の直列繰り返し配列として並んでいる。ここに RepE が結合すると、イテロン 1 個当たり約 50 度の DNA 折れ曲がり (ベンディング) が生じることを見いだした。このようなイテロンのベンディングがオリジンに高次構造変化をもたらし、二重鎖の開裂とそれに伴う DNA ヘリカーゼの誘導の契機となることが示唆された。

次いで RepE タンパク質の機能ドメインの解析を行った。上述のオリジンに存在するイテロンの 19bp の中には、*repE* 遺伝子のオペレーターに存在する逆向き繰り返し配列と共通する 8bp のコンセンサス配列がある。したがって RepE タンパク質には、オリジンとこのオペレーターとに共通の結合認識に関わる

ドメインの存在が予想され、まずその検証を行った。欠失変異を用いた解析により、N末端の33残基以上、あるいはC末端の7残基以上を欠失すると、オリジンとオペレーター両者ともに結合できなくなることがわかった。さらに *repE* 遺伝子の全域に変異を導入し、オリジンへの結合活性を失ったアミノ酸置換変異体を多数分離し、それらの RepE タンパク質を調べたところ変異は C 末端領域 (168~242残基) に集中していた。これはオペレーターへの結合能力をも失っていた。

RepE タンパク質は上述のようにモノマーとダイマーの両構造をとりうる。とくに非常に安定なダイマー形成を行い、これが複製開始頻度を低く抑えていて、プラスミドの細胞当りのコピー数が常に 1~2 にコントロールされて保たれている。ダイマーは、分子シャペロンの介助によってモノマーに変換され、オリジンへの結合が可能となって複製開始を引き起こす。そこで RepE タンパク質のダイマー形成に関与するドメインの同定を試みた。このために、ダイマー形成能が欠損して *repE* 遺伝子オペレーターへの結合能力を失った変異体を多数分離した。それらの RepE タンパク質を解析した結果、中央領域 (111~161 残基) がダイマー形成に関与するドメインであることが解明された。とくに S111P (111番目のセリンがプロリンに置換) と、R118P (118番目のアルギニンがプロリンに置換) の変異体における効果が顕著であった。これらは種々の解析の結果、ダイマー形成能を失うと共に、オペレーターへの結合能力を失い、逆にオリジンへの結合能力を高めていることが判明した。以上の結果は以前よりコピー数が上昇する (すなわち複製開始頻度が上昇する) 変異がこの領域に同定されていた事実とよく一致する。

さらにコンピューターの解析により、他の多くのプラスミド DNA 複製開始イニシエーター・タンパク質のアミノ酸配列との比較検討を行った結果、上述のそれぞれのドメイン間に高度のホモロジーが認められ、これらが進化的によく保存されていることが示された。また、mini-F の RepE タンパク質の二次構造予測を試みたが、実験により明らかにされたドメイン構造との関連について既知の法則性に当てはめることはできなかった。X 線回折を行うために必要な RepE タンパク質・オリゴマー DNA (イテロン) 共結晶の単離にも成功している。

なお参考論文 1, 2, 3 は、本論文の研究の基盤および端緒となった RepE タンパク質とオリジン・イテロンへの結合によるベンディングの発見等を報じ、DNA 結合ドメインの解析の報告、ダイマー形成ドメイン同定の報告等を共著者として発表または発表準備中のものである。

## 論文審査の結果の要旨

DNA 複製の開始調節機構が、生命現象の基本過程である自己増殖の調節メカニズム解明の鍵を握ることとは言うまでもなく明らかであろう。本論文の研究はこのテーマに真正面から取り組み、重要な成果をあげた。

まず申請者は実験システムとして大腸菌プラスミドの mini-F を選んだ。この系はすでに世界中で解析が非常に進んでいて、複製開始オリジンとそれに結合して開始シグナルを発するイニシエーター RepE タンパク質との相互作用に関する過去のデータの蓄積が顕著である。とくに申請者の属する研究室での過去の研究成果により、このタンパク質がモノマーのとき複製オリジンに結合してイニシエーターとして働く一方で、ダイマーのときは自身をコードする *repE* 遺伝子のオペレーターに結合して転写のリプレッサ

ーとして働く自己調節機能をもっていることが解明されていた。ダイマー→モノマーの変換には、分子シャペロンの介助が関与することが示唆されているが、さらにそれ以上の複製開始調節メカニズムに関わる機能と構造の詳細は未解明である。

そこで申請者は本研究においてこの問題にアタックした。まず RepE タンパク質がオリジンのイテロンに結合したときに何が起るかを解析し、各々のイテロン当たり約50度のベンディングが起ることを発見した。これは DNA に高次構造の変化をもたらす、大腸菌ゲノム DNA の複製オリジン *oriC* で確認されているようなレプリゾーム (DNA ヘリカーゼを含むタンパク質複合体) の呼び込みを可能とする高次構造変化と同質のものでありきわめて興味深い。

次いで申請者は、RepE タンパク質の機能ドメインの解析を行った。まず、複製オリジンに結合できなくなる変異体の分離を行い、それらの RepE を解析して変異が起きた領域を調べた。欠失変異体の解析結果では、N 末端と C 末端の両領域の重要性が示唆されたが、全域にわたる点突然変異体の分離による解析結果は C 末端に集中した機能領域の重要性を示した。このタンパク質のトポロジカルな構造はまだわかっていないので、N 末端と C 末端との相互作用の解明は今後の課題である。しかし少なくとも C 末端に集中した変異体では、すべてオリジンへの結合だけでなく、*repE* 遺伝子オペレーターへの結合能も失っていた。オリジンの直列配列イテロンとオペレーターの逆向き配列イテロンには 8bp のコンセンサス配列があり、RepE の C 末端ドメインはこの共通配列を認識することが示唆され、その結合メカニズムの解明に向けて一歩前進した。

さらに申請者は、ダイマー形成ドメインの同定を行った。ダイマーは *repE* 遺伝子のオペレーターに特異的に結合して転写のリプレッサーとなるので、リプレッサー活性を失った変異体をスクリーニングする巧妙なテクニックを用い、ダイマー形成不能変異体を多数分離し、それらの RepE タンパク質を調べた。その結果、典型的な変異はすべて中央領域に集中していた。とくに111番目のセリンがプロリンに置換したもの、および118番目のアルギニンがプロリンに置換したものの効果は顕著で、ゲル濾過および架橋実験などの解析結果によりダイマー形成能を失っていることが確認された。この中央領域は、以前よりコピー数変異やダイマー→モノマー変換に分子シャペロンの介助を必要としなくなる変異などの生起領域として同定されていた領域とぴったり一致する。つまり本研究の成果により、これらをすべての複製開始調節関連の機能表現型が構造的にダイマー形成ドメインの機能表現であることの確証に集約されたわけで、その意義はきわめて大きい。

また申請者は、コンピューター解析によりこれら重要ドメインが多くのプラスミドのイニシエーター・タンパク質において進化的によく保存されていることを示した。二次構造の予測モデルを提出したにもかかわらず、その構造的特性とドメイン機能との間に既知の法則性で関連付けを行うことができなかったのはある意味では予想外であったが、逆に新しい法則性のポテンシャルを含む可能性が示唆されているものとして興味深い。なお野生型の RepE タンパク質は凝集しやすく結晶化がテクニカルに困難である。しかし申請者はダイマー形成不能変異 RepE タンパク質がこの困難を回避できる性質をもつことを利用し、結晶化の試みを行った。現在までに RepE・オリジン DNA オリゴマー (イテロン) の共結晶を得るところまで成功しており、今後の X 線回折実験への道を開拓した。

以上の成果により本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成9年1月23日、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について諮問した結果、合格と認めた。