

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

生物物理学専攻

松永藤彦

要旨

大腸菌の mini-F プラスミドの複製開始蛋白質 RepE はプラスミド自身にコードされ、プラスミド複製開始頻度の調節において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自己転写抑制を行い、RepE モノマーは複製オリジンに結合し DNA 複製を開始する。本研究は、mini-F プラスミド複製調節機構を RepE の機能と構造の関連に着目し解析を行った。

mini-F の複製オリジンは RepE の結合配列である 19 bp のイテロンが4つ直列に並んでいる。イテロンに結合した際に DNA に与える影響を調べたところ、RepE の結合によってイテロン当たり約50度の DNA ベンディングが起る事が分かった。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、二重鎖開裂とそれに伴う DNA ヘリカーゼ誘導の契機となることが示唆された。

次に RepE 蛋白質の機能ドメイン解析を行った。オリジンのイテロンは *repE* 遺伝子のオペレーター (逆向き繰り返し配列) と共通する 8 bp の配列を持つ。まず、オリジンとオペレーターの認識に関わる DNA 結合ドメインを解析した。欠失変異を用いた解析から、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・オペレーター両方の DNA に結合できなくなる事が分かった。しかし、*repE* 遺伝子全域に変異を導入しオリジン結合活性を失ったアミノ酸置換変異 RepE を分離したところ、変異はC末端領域 (168-242残基) に集中していた。これらはオリジン結合効率が著しく減少しているのみならず、オペレーターへの結合も観察されなかった。この事から RepE のC末端領域がオリジンとオペレーターへの結合で主要な役割を果たす DNA 結合ドメインを形成し、双方に共通する 8 bp 配列の認識に関わっている事が示唆された。

RepE は非常に安定なダイマーを形成し複製開始頻度を低く抑えてお

り、複製開始型であるモノマーには分子シャペロンによって変換される。次に、RepE の機能調節の鍵となるダイマー形成ドメインの同定を試みた。RepE ダイマーはリプレッサーとして働く。リプレッサー活性が低下し、オペレーター DNA に特異的に結合できなくなった変異体をスクリーニングする事で、ダイマー形成能が欠損した変異体の分離を試みた。変異は RepE 蛋白質の中央領域 (111-161 残基) から 8 個、C 末端領域 (195-208 残基) から 5 個得られたが、そのうち S111P (111 番目のセリンがプロリンに置換、独立に 2 個分離された) は、精製蛋白質のオリジン結合効率が約 500 倍上昇し、オペレーター結合効率が 1/100 以下に落ちていた。更に、ゲル濾過および架橋実験から S111P はダイマーが形成できず、モノマーとして安定に存在することが分かった。他の変異体はオペレーターへの DNA 結合効率が低下しているものの、ダイマー形成は可能であった。しかし RepE の 111-161 残基は、以前同定されたプラスミドのコピー数が上昇しシャペロン要求性がなくなる変異 (ダイマー形成効率が落ちていることを示唆する) の集中する領域 (93-135 残基) と重なっていた。さらに、その中の変異の一つ R118P (118 番目のアルギニンがプロリンに置換) は S111P と同様ダイマーが形成できないことから中央領域、とくに 111 番目と 118 番目の残基がダイマー形成において中心的役割を果たしていることが示唆された。また、N 末端 42 残基あるいは C 末端 57 残基を欠失してもダイマーを形成できる事も、中央領域がダイマー形成ドメインであるという考えを支持した。

RepE の N 末端領域の機能についてははっきり分からなかったが、N 末端 33 残基の欠失によって DNA 結合活性が失われた事、同じく 42 残基の欠失によってダイマー形成の効率がやや低下した事から、N 末端領域が副次的にこれらの活性に関与する事も示唆された。

RepE に類似する複製開始蛋白質を検索しホモロジーの認められたものをアラインメントしたところ、これらのドメイン構造がプラスミドの複製開始蛋白質間で保存されていることも示唆された。

目次

序論	5
材料と方法	8
菌株、ファージ、プラスミド	
培地	
欠失変異 RepE の作成	
リプレッサー活性欠損 RepE の分離	
RepE蛋白質の精製	
細胞粗抽出液の調製	
PCR による突然変異導入	
DNA 結合能のゲルシフトアッセイによる判定	
DNA ベンディングアッセイ	
精製 RepE 蛋白質のゲル濾過実験	
精製 RepE 蛋白質の架橋実験	
その他の方法	
結果	
RepE 蛋白質のベンディング活性	13
DNA 結合ドメインの解析	15
N末端、C末端両側からの欠失はともにDNA 結合活性に影響する	
DNA 結合能力の低下した変異 RepE の分離	
DNA 結合活性欠損変異はC末端領域に集中した	
ダイマー形成ドメインの解析	21
リプレッサー活性を失った変異体の分離	
<i>repE</i> 変異の位置決定	
精製変異 RepE 蛋白質の DNA 結合活性	
ゲル濾過による精製変異 RepE 蛋白質のダイマー/モノマー判定	
変異 RepE 蛋白質の架橋実験	
RepE 蛋白質のコンピューター解析	30
mini-F プラスミド複製の物理化学的アプローチによる解析	31
考察	
RepE の DNA ベンディング活性	32
DNA 結合ドメイン	32
ダイマー形成ドメイン	34
その他の機能ドメイン	36
構造面から見た他の複製因子との類似性	36
構造面から見た mini-F プラスミド複製開始調節のモデル	36
参考文献	38

序論

遺伝情報の複製は生命の根本をなす事象である。多くの生物は DNA を遺伝情報の担体としており、DNA 複製機構の解明は生命現象の理解には欠かせない。例えば細胞複製において、必要な遺伝情報は発現の量・時期・場所・活性の調節などが厳密に制御されているが、その際に染色体 DNA の複製も厳密に制御されていることは容易に想像される。実際に、これまで調べられたところ生物は極めて精巧な調節機構によって染色体 DNA を増幅・維持していることが明らかになってきた。

DNA 複製の過程は複製開始、新生鎖合成伸長、複製終結の三つの過程に分けられる (以下、包括的な総説として、Kornberg & Baker, 1992; DePamphilis, 1996)。DNA 複製の伸長過程については、DNA ヘリカーゼ、一本鎖結合蛋白質、プライマーゼ、そして DNA ポリメラーゼ等の一連の蛋白質因子が DNA 鎖の一定方向に効率よく合成を進めること、その際に生じる DNA 損傷は修復システムと協調して修復されることなどが明らかとなってきた。また、DNA 複製の終結段階においては合成反応を停止させると共に、倍加した染色体 DNA を分裂していく細胞に正確に分配する機構が働く。一方、DNA 複製の初期段階においては複製開始反応の場所と頻度の調節が特に重要である。染色体 DNA の不特定の位置や無秩序な頻度で複製開始が起これば、細胞あたりの遺伝情報の安定な維持、調和を保った発現が乱され正常な細胞増殖制御が出来なくなるからである。複製開始機構の解析における作業仮説は、Jacob *et al.* (1963) によって提唱されたレプリコン

説は、Jacob *et al.* (1963) によって提唱されたレプリコン仮説で基本が示された。これは、DNA 上の特定の位置 (複製オリジン) に複製開始因子が結合し DNA 複製が開始する、自律複製単位 (レプリコン) における正の調節機構を想定したモデルである。レプリコン仮説が大筋において正しいことは、その後多くの系で証明され、Bramhill & Kornberg (1988) はこのモデルを発展させ複製開始因子の持つ三つの機能を提示した。すなわち、複製オリジンの認識、オリジン内の局所的な二重鎖開裂、そして蛋白質-蛋白質間の相互作用を通じた複製関連因子の誘導であり、これらの要素は原核・真核生物を問わず DNA 複製開始の調節機構を考える上での基礎となっている (Fig. 1)。DNA 複製の開始段階の理解は未だ不十分であり、現在もなお様々なレプリコンを用いて、複製開始の調節機構の解析が行われている。

§

mini-F プラスミドは大腸菌 F 因子由来のプラスミドで、細胞周期のある特定の時期に複製が起こり、細胞あたり 1-2 コピーで安定に保たれる。プラスミド複製にはシス因子である複製オリジン (*ori2*) の他に幾つかのトランスに働く蛋白質因子を要求する。mini-F プラスミドにコードされる RepE 蛋白質 (251 残基、29 kDa) の他に、宿主因子である分子シャペロン (DnaK, DnaJ および GrpE) (Ezaki *et al.*, 1989; Kawasaki *et al.*, 1990)、大腸菌染色体の複製開始因子である DnaA 蛋白質 (Kline *et al.*, 1986; Hansen *et al.*, 1986; Murakami *et al.*, 1987)、DNA ヘリカーゼ DnaB とその活性調節を行う DnaC (我々の未発表データ) そしてヒストン様蛋白質 HU (Ogura *et al.*, 1990; Wada *et al.* 1988) が必要である。

mini-F プラスミドの解析においては通常自律複製可能な最小単位を用いている (Fig. 2)。ミニ F プラスミドの最

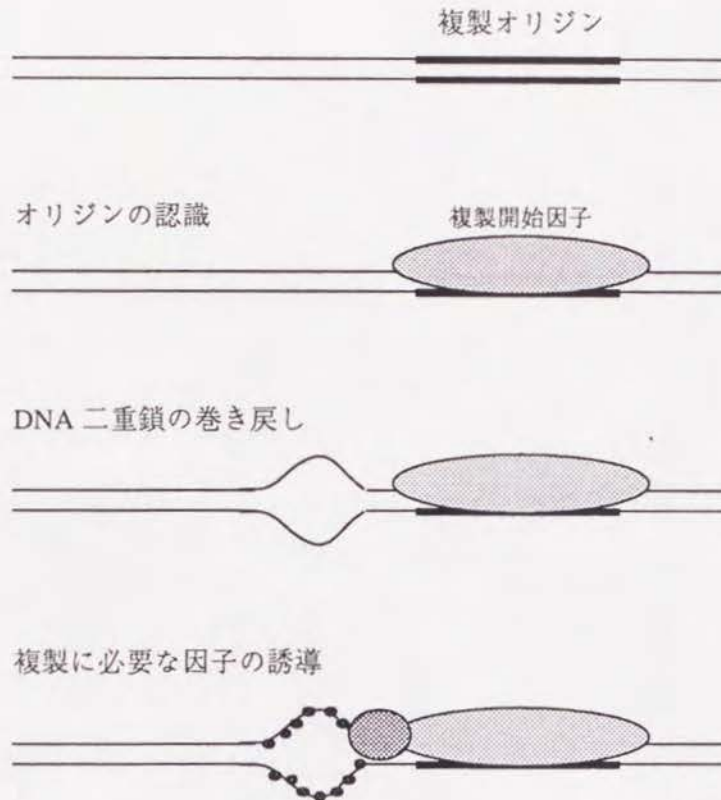


Fig. 1 Bramgill & Kornberg (1988) の提唱した複製開始蛋白質の機能のモデル。複製開始因子が持つと考えられる3つの機能、オリジンの認識、二重鎖開裂、そして複製蛋白質の誘導が示してある。Diffley (1996) より改変し転載した。

小単位は複製オリジン (*ori2*)、*repE* 遺伝子および薬剤耐性遺伝子から構成され、コピー数を負に調節する *incC* 領域を欠いているためコピー数が細胞あたり 10-15 コピーに上昇している (Kawasaki *et al.*, 1991)。*ori2* は DnaA 蛋白質の結合配列である DnaA box (2個)、アデニンまたはチミンに富む配列 (A/T rich 領域)、大腸菌オリジン *oriC* の 13mer と相同な 13 bp 配列 (13mer)、4個の 19 bp イテロン配列が直列に並んだ direct repeat (DR) からなる。また、*repE* 遺伝子のプロモータ領域にはイテロンと共通する 8 bp 配列が逆向きに配置した inverted repeat (IR) があり、オペレーターとして機能する (Fig. 2)。

RepE 蛋白質は mini-F プラスミドの複製の頻度調節の鍵となる二つの重要な機能を持ち、プラスミドの複製開始 (イニシエーター)、および *repE* 遺伝子自身の転写抑制 (リプレッサー) を行う (Kline, 1985; Muraiso *et al.*, 1987; Wada *et al.*, 1987)。それぞれの機能は RepE 蛋白質が塩基

配列特異的に *ori2* の DR (Tokino *et al.*, 1986) と *repE* 遺伝子の IR (Masson and Ray, 1986) に結合することで発揮される。さらに、この2つの機能は RepE の2つの異なるフォーム、モノマーとダイマーによって分担されている。つまり、RepE モノマーがオリジンの DR に結合 (イテロンあたりモノマー1分子) することで DNA 複製が開始され、RepE ダイマーが *repE* 遺伝子の IR に結合することで転写を抑制する (Fig. 2, Ishiai *et al.*, 1994)。RepE はダイマーとして非常に安定であり (解離常数は 0.3 nM 程度、Ishiai *et al.*, 1994)、かつ *repE* 遺伝子の転写を抑制し複製開始因子である RepE の発現を抑えることから、RepE ダイマーは DNA 複製に関しては強力な負の制御因子であるといえる。また、ダイマーから複製開始型であるモノマーへの変換は分子シャペロン (DnaK, DnaJ および GrpE) によって促進されることが *in vitro* の実験で明らかになっている (我々の未発表データ)。

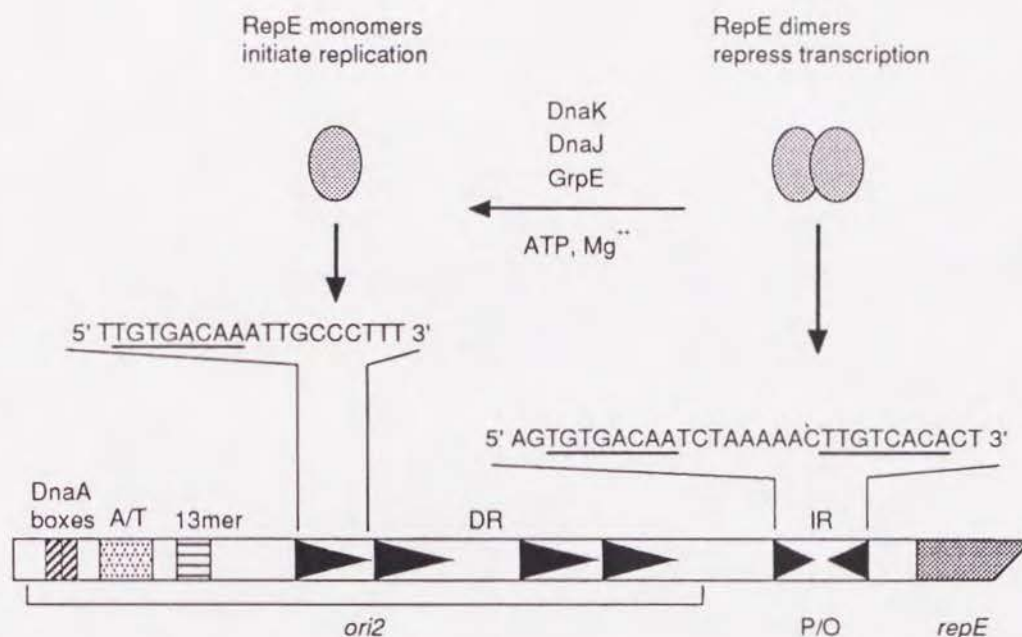


Fig.2 mini-F プラスミドの構造および複製調節のモデル図。複製オリジン (*ori2*) は、2つの DnaA 蛋白質結合サイト (DnaA boxes), A/T rich region (A/T), 大腸菌複製オリジン *oriC* の 13mer 配列に似た 13 bp の配列 (13mer), 4つの 19 bp イテロン (direct repeat, DR) からなる。その右隣の *repE* 遺伝子の プロモーター/オペレーター領域 (P/O) には、inverted repeat (IR) が存在する。DR には RepE モノマーが、IR にはダイマーが結合し (Ishiai *et al.*, 1994)、それぞれ DNA 複製開始および *repE* 遺伝子の転写抑制を行う。1つ目のイテロンと、IR の塩基配列を示した。下線は両者に共通する 8 bp 配列である。

§

本研究では、mini-F プラスミドの複製開始機構を理解する上で不可欠な、機能と構造との関連を軸に解析を進めた。

複製開始因子がオリジンに結合することによって DNA の湾曲 (ベンディング) を引き起こすことが、大腸菌の *oriC* (Schaper & Messer, 1995), λ ファージ (Zahn & Blattner, 1985), プラスミド R6K (Mukherjee *et al.*, 1985), pT181 (Koepsel & Khan, 1986), P1 (Mukhopadhyay & Chattoraj, 1993) および SV40 ウイルス (Fanning & Knippers, 1992 の総説を参照) において明らかになっている。複製開始蛋白質によって引き起こされるベンディングはオリジン領域の高次構造を変化させ、DNA 二重鎖の開裂が起こると考えられている。同様のことが RepE 蛋白

質と mini-F プラスミドのオリジンとの間でも起こるのか未解明であった。本研究ではまず、RepE がオリジンに結合することでベンディングが起こるかどうかを調べた。

イテロンと inverted repeat は共通する 8 bp 配列を持っており (Fig. 2)、この配列が RepE 蛋白質の DNA 結合の特異性を決めていると考えられる。しかし、この二つの DNA 配列の全体構造は異なり、オリジンのイテロンが直列に並んでいるのに対して、オペレーターである IR はパンドローム様の構造を持つ。RepE 蛋白質のどの領域がこれら DNA 配列の結合に関わっているのか、それが単一の領域であるのかを明らかにするため、RepE の DNA 結合ドメインの同定を試みた。また、先に述べたようにオリジン・オペレーターへは二つの異なる形態の RepE が結合する (それぞれモノマーおよびダイマー)。そして、非常に安定な RepE ダイマーは分子シャペロンによってモノマーに

変換される。この形態の違いによる機能調節に重要な役割を果たすダイマー形成ドメインの解析も行った。

さらに、コンピューター解析による RepE 類似蛋白質の検索や高次構造予測、あるいは RepE とオリジン DNA 複合体の結晶構造解析や原子間力顕微鏡による観察を行い、遺伝・化学的アプローチ以外から複製機構に迫る試みも行った。

略語

IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galactoside; X-gal, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis; BSA, bovine serum albumin; Mes, 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid; DSP, dithiobis(succinimidylpropionate)

材料と方法

菌株、ファージ、プラスミド

本研究で使用した大腸菌株、ファージ、プラスミドを合わせて Table 1 に示した。菌株 KY1461 は HI2017 (Hirano *et al.*, 1987) に P1 トランスダクションによって *thy*⁺ 遺伝子を導入することで作製した。KY1462 と KY1463 は KY1461 に、KY1464 は MC4100 に λ P *repE-lacZ* を溶原化し作製した。融合遺伝子 *ParaB-DR₂-lacZ* を持つ λ ファージは、pMS434 の *Hind*III サイトにオリジンの DR 配列を逆向きに 2 つ配し、*in vivo* recombination により λ pF13 へ移し作製した (Hirano *et al.*, 1987)。ペンディングアッセイ用のプラスミド pKV7205 は pBend2 (Kim *et al.*, 1989) の *Xba*I-*Sa*I サイトに 19 bp イテロン配列を含む合成オリゴマー DNA をクローニングし作製した。合成

オリゴマーは 5'-GCTCTAGA-CTGTGACAAATTGCCCTCA-GTCGACGC-3' と 5'-GCGTCGAC-

TGAGGGCAATTTGTCACAG-TCTAGAGC-3' をアニーリングし作製した (両端に *Xba*I と *Sa*I の認識配列を含む)。RepE 蛋白質の N 末端にヒスチジンが 6 個付加した His₆-RepE を産生するプラスミド pKV7202 は、*repE* 遺伝子の 5' 側に *Bam*HI, 3' 側に *Hind*III を付加するように作製したプライマーを用い pKV7190 をテンプレートにして *repE* 領域を PCR 増幅し、pQE9 の *Bam*HI-*Hind*III サイトにクローニングし作成した (Fig. 3)。ヒスチジntag のない RepE を発現する pKV7203 の作製は、pKV7202 の *Eco*RI-*Sma*I 領域を、ヒスチジんクラスター部分を欠失する形で PCR 増幅したものを、pKV7202 の対応するサイトに再度クローニングすることで作製した (Fig. 3)。これらのプラスミドを持つ菌の培養液に IPTG を加えると改変されたファージ T5 のプロモーター (*E. coli* の RNA polymerase によって読まれる) から His₆-RepE または His₆ のない RepE の発現が誘導される。プラスミド pRep4 は pKV7202 または pKV7203 と共存でき、*lacI* 遺伝子を持つことで非誘導時の RepE の発現を抑制する。pKV815 はファージ T7 のプロモーター下に *repE* 遺伝子を持ち、菌株 BL21 (DE3) 中で、IPTG により RepE の発現が誘導される (Studier *et al.*, 1990)。 Δ N11, Δ N17 の精製には、pBK819, pBK820 (Kline *et al.*, 1992) を用いた。変異 RepE 蛋白質の精製、またはそれを含む細胞粗抽出液の調製に際しては必要に応じて、変異 *repE* 遺伝子の *Xma*I-*Eco*RV 断片をそれぞれ pBK815 または pKV7203 の野生型 *repE* の対応する部位と入れ替えた。pKV7204 は pKV718 と同様 *ori2* プラスミドで、トランスに補われる RepE 蛋白質に依存して複製する。作製は、*cat* 遺伝子を持つ mini-F プラスミド (我々の未発表データ) の *repE* 遺伝子の *Sma*I-*Eco*RV 領域を欠失する事で行った。新たに作製したプラスミドの構造はシーケンスによって確認した。

Table 1. Bacterial strains, phage, and plasmids

Strain, phage, or plasmid	Relevant genotype	Reference or source
Strains		
KY1461	F ⁻ Δ (<i>ara-leu</i>)697 Δ (<i>lac-pro</i>) <i>thi trpA38</i> (Oc)	this work
MC4100	F ⁻ Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL relA flbB deoC ptsF rbsR</i>	Casadaban, 1976
KY1462	KY1461 (λ <i>PrepE-lacZ</i>) pRep4	this work
KY1463	KY1461 (λ <i>PrepE-lacZ</i>)	this work
KY1464	MC4100 (λ <i>PrepE-lacZ</i>)	this work
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> (λ DE3)	Studier <i>et al.</i> , 1990
M15	F ⁻ <i>lac ara gal mtl</i>	Beckwith, 1963
KD1087	F ⁻ <i>mutD5</i> Δ (<i>tonB-trpA,B</i>) <i>leu argE his spcA</i>	Degnén & Cox, 1974
Phage		
λ pF13	<i>imm</i> ²¹ <i>ParaB-lacZ</i>	Hirano <i>et al.</i> , 1987
λ <i>ParaB-DR₂-lacZ</i>	<i>imm</i> ²¹ <i>ParaB-DR₂-lacZ</i>	this work
λ <i>PrepE-lacZ</i>	<i>imm</i> ²¹ <i>PrepE-lacZ</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , 1991
λ DE3	<i>imm</i> ²¹ <i>lacI</i> phage T7 RNA polymerase	Studier <i>et al.</i> , 1990
Plasmids		
pKV7190	<i>ori</i> (pMB1) <i>cat trpR repE</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , 1991
pMS434	<i>ori</i> (ColE1) <i>bla ParaB-lacZ</i>	Hirano <i>et al.</i> , 1987
pQE9	<i>ori</i> (ColE1) <i>bla</i>	QIAGEN
pRep4	<i>ori</i> (p15A) <i>neo lacI</i>	QIAGEN
pKV7202	<i>ori</i> (pMB1) <i>bla His₆-repE</i>	this work
pKV7203	<i>ori</i> (pMB1) <i>bla repE</i>	this work
pBK815	<i>ori</i> (pMB1) <i>repE</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , 1992
pBK819	<i>ori</i> (pMB1) <i>repE</i> Δ N11	Kline <i>et al.</i> , 1992
pBK820	<i>ori</i> (pMB1) <i>repE</i> Δ N17	Kline <i>et al.</i> , 1992
pLysS	<i>ori</i> (p16A) <i>cat</i> phage T7 lysozyme	Studier <i>et al.</i> , 1990
pKV531	mini-F <i>ori2 bla repE602</i>	Ishiai <i>et al.</i> , 1992
pKV718	mini-F <i>ori2 bla</i>	Kawasaki <i>et al.</i> , 1991
pKV7204	mini-F <i>ori2 cat</i>	this work
pBend2	<i>ori</i> (pMB1) <i>bla</i>	Kim <i>et al.</i> , 1989
pKV7205	<i>ori</i> (pMB1) <i>bla iteron</i>	this work

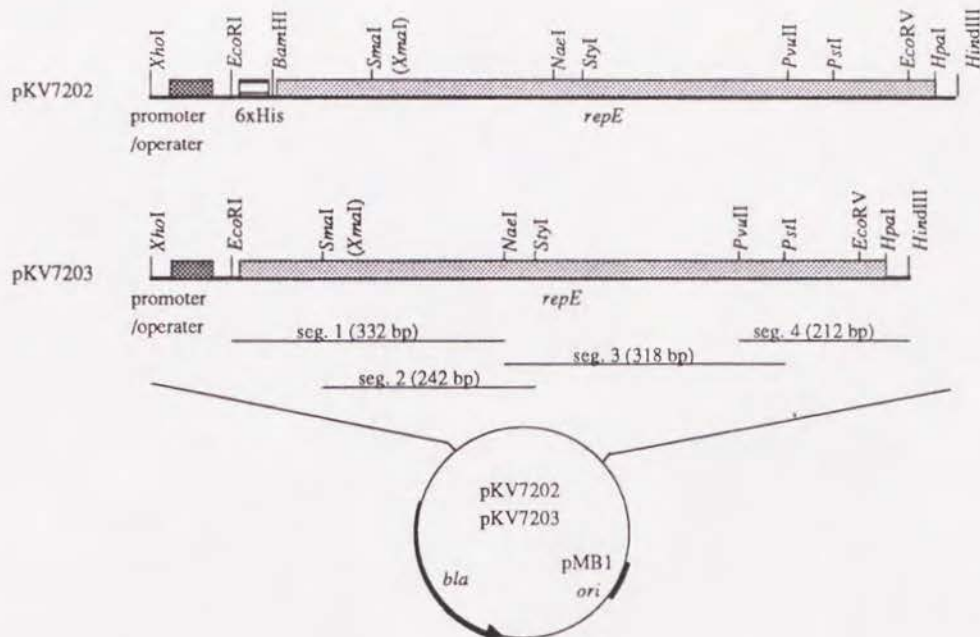


Fig. 3 RepE 発現プラスミド pKV7202, pKV7203 の構造及びおもな制限酵素サイトの位置。pKV7202 はN末端にヒスチジンタグの付いた RepE (His₆-RepE) を発現するのに対して、pKV7203 は本来の RepE を発現する。His₆-RepE はN末端側に16残基の付加がある：(M)RGSHHHHHHGSIEGR, EGR が RepE の二番目のコドンに続く。repE 遺伝子の下に示した4つの互いに重なる segment (1-4) は、DNA 結合能欠損変異体 (Table 2) を分離する際に PCR で変異を導入した単位を示す。

培地

菌の培養は L-broth (Wada *et al.*, 1986), medium E (Vogel & Bonner, 1956) supplemented with 0.2% glucose, 0.5% casamino acid and 2 μ g/ml thiamine または MacCONKEY AGAR (DIFCO) を用いた。プラスミドを持つ菌株の選択のために、50 μ g/ml ampicillin, 20 μ g/ml chloramphenicol, 20 μ g/ml kanamycin を適宜培地に加えた。

欠失変異 RepE の作成

N末端から33, 68 または 103 残基欠失した変異 RepE (Δ N33, Δ N68 および Δ N103) は pKV7202 をもとに、適当な二つの制限酵素サイト間 (それぞれ BamHI と SmaI, NruI または NaeI) の DNA 断片を欠失する事で作製した。開始コドンの次に repE 遺伝子の43番目のコドンが来る Δ N42 の 作製は、プライマーとして

GGAATTCCATATGGTTGACCAGATCAGA-3' および 5'-

TGGAAGTGATATCGCGGA-3' を用いて pKV7203 に対する

PCR を行い、できた断片を NdeI および EcoRV で切断、pBK815 の対応する制限酵素サイトにクローニングすることで作製した。C末端からの欠失変異 (602, 701, Δ C10, Δ C57 および Δ C148) は pKV7190 をもとに作成した。

RepE602 は以前に我々の研究室で分離されたフレームシフト変異で、C末端の6残基が欠失、かわりにイソロイシン・プロリンの2残基が付加している (Ishiai *et al.*, 1992)。

RepE701 (C末端の7アミノ酸を欠き、ロイシンが付加) および Δ C57 (C末端の57アミノ酸が欠失) は、XbaI リンカー (CTCTAGAG) をそれぞれ repE の EcoRV または PvuII サイトに挿入し作製した。RepE Δ C10 はアンバーコドンを含むプライマーを用いた PCR により作製した、C末10アミノ酸欠失変異である。 Δ C148 は NaeI と HpaI サイトの間の断片を欠失し作製した。

リプレッサー活性欠損 RepE の分離

変異体分離は、変異導入の方法、用いた菌株、プラスミド、インディケータープレートの組み合わせを変え、三通りに(以下 A, B および C、Fig. 9 参照)行った。スクリーニングは以下のように4つのステップから成る。

(1) A, B では *repE* を持つプラスミド (A, pKV7190 ; B, pKV531) を *mutD5* 変異を持つ KD1087 中で複製させることで変異を導入した。また、C では pKV7203 に対しプライマー 5'-ATCGTCCAGTCAAACGACCTCACT-3' および 5'-TAATTAAGCTTTCCACTGAGCGTCAGA-3' を用い *repE* の *XmaI*-*EcoRV* を含む領域に対してエラーブローンな PCR (後述) を行い、増幅断片を *XmaI*-*EcoRV* 切断の後、pKV7190 の対応する部位に挿入することで、変異を導入した。

(2) A, B では KY1463、C では KY1464 に対し、変異を導入したプラスミドをトランスフォームした。インディケータープレート上で 37℃、一晚インキュベートした後、 β -galactosidase 活性を発現し発色しているコロニーをピックアップした。

(3) 各コロニーをシングルコロニーアイソレーションによって精製したあと、それぞれの細胞中で発現する *repE* 遺伝子産物をイムノブロッティングで確認し、欠失あるいは野生型よりも量の少ない RepE 蛋白質を発現しているものを排除した。C の場合さらに pKV718 (*ori2* プラスミド) の複製をサポートできるか否かを調べ、イニシエーター活性を持たない物は排除した。

(4) それぞれの変異 *repE* 遺伝子産物を含む細胞粗抽出液を調整し、これを用いたゲルシフトアッセイを行いオリジン・オペレーターDNAへの結合活性を調べた。その結果、オリジンへの結合効率を野生型と同程度かそれ以上に保ち、かつオペレーターへの結合効率が著しく低下したものを、ダイマー形成能欠損変異体の候補として選択した。

インディケータープレートとしてはAおよびBでは

MacCONKEY AGAR を用い、*repE* 遺伝子の発現は特に誘導がされていない。Cではトリプトファン抜きのみ medium E プレート (60 μ g/ml X-gal) を用い、*repE* 遺伝子の発現が誘導される (medium E 液体培地で RepE の発現量を比較した場合、トリプトファンの量が 0 μ g/ml の時は 50 μ g/ml の時の約5倍高い、Kawasaki, 1992)。

Bタイプスクリーニングで RepE を発現するプラスミドとして用いた pKV531 (mini-F プラスミド) はC末端を6アミノ酸欠いた RepE602 に複製を依存している為にコピー数が野生型の70%に落ちている。これは、コピー数を著しく上昇させる変異が導入された場合にオーバーイニシエーションによる宿主の増殖阻害が起こるのを防ぐためである (Ishiai *et al.*, 1992)。プレートからの選択後は、*repE* の *XmaI*-*EcoRV* 断片を発現ベクターの対応する部位に入れ替え C末端は野生型に戻した。

B の pKV531 は自身の持つ *repE* 産物に複製が依存しており、C では前述のようにイニシエーター活性を持っていることをスクリーニングの条件とした。これに対して、A ではイニシエーター活性の有無は問わなかった。

RepE蛋白質の精製

野生型 RepE の精製法は基本的に文献の記載に従い行った (Kawasaki *et al.*, 1992; Ishiai *et al.*, 1994)。若干の変更点は、陰イオン交換カラムとして、MonoS HR5/5 の代わりに、HiTrapSP (Pharmacia) を用い、カラムに吸着した RepE を 450, 600, 750 mM KCl で段階的に溶出したことである。RepE は 600 mM KCl の分画に溶出された。本研究で得られた S111P 以外の変異体蛋白質はすべて野生型の場合と同じく、大量発現後に集菌しソニケーション・遠心すると沈殿分画に回収され、野生型の場合と同様に精製が出来た。S111P は約40%が上清に、残りは沈殿分画に回収された。上清からは RepE54 と同様に (ただし DEAE カラムの過程は省いた)、沈殿分画からは野生型と同様に精製を行ったが、いずれもイオン交換カラム、サイズカラム

における溶出パターンに違いはなかった。精製蛋白質を用いた実験には沈殿分画から精製したものをを用いた。

また、より簡便な方法で純度の高い蛋白質を高収量得るため、DNA 結合ドメイン解析における欠失変異 RepE (RepE602 を除く) はヒスチジンクラスターとの融合蛋白質として Ni²⁺-nitrilotriacetic acid (NTA) resin (QIA express system; QIAGEN) を用いて精製した。pKV7202 (または変異 repE 遺伝子を持つ派生プラスミド) および pRep4 を持つ M15 株をアンピシリン、カナマイシンを含む L 培地 100 ml 中、30℃ で対数増殖後期まで培養する。1 mM IPTG を加え 4 時間発現誘導したのち集菌、10 mM β-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を加えた 5 ml Buffer A (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 6 M guanidine hydrochloride, pH adjusted to 8.0) 中で 1 時間溶菌する。上清を Ni²⁺-NTA column (0.5ml) に吸着、Buffer A / 8 mM イミダゾールで洗浄した後 Buffer A / 40 mM イミダゾールで溶出し、得られたフラクションを MES-0.5M KCl バッファー (20 mM MES-KOH, pH 6.0, 0.1 mM EDTA, 500 mM KCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol) に対し 5 時間透析、50% glycerol の状態で -20℃ 保存した。精製は室温で行い、この結果 0.5-1 mg の RepE 蛋白質が 90% 以上の純度で得られた (SDS-PAGE 後の、クーマシー・ブルー染色で判定)。

細胞粗抽出液の調製

ゲルシフトアッセイに用いた細胞粗抽出液の調製は pKV7203 (またはその派生プラスミド) を持つ KY1462 か、pKV7190 (またはその派生 プラスミド) を持つ KY1464 で行った。前者の組み合わせの場合、対数増殖後期の培養液 (L 培地 5 ml) に 0.1 mM IPTG を加え 1.5 時間発現誘導したのち集菌した。後者の場合、overnight culture を medium E 培地 (10 μg/ml indole acrylic acid, tryptophan free) にイノキュレート、37℃ で対数増殖後期まで培養し

たのち集菌した。集菌後は 1 ml の Buffer I (20 mM HEPES [N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; pH 8.0], 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 7 mM β-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10% glycerol, Zerbib *et al.*, 1987 参照) にリサスペンドし、ソニケーションで溶菌したあと遠心 (14,000 x g for 15 min)、上清を試料とし -20℃ で保存し、適宜一部をゲルシフトに用いた。細胞粗抽出液中の RepE の濃度は、精製 RepE を参照にしイムノブロットングで測定した (抽出液中の他の蛋白質は測定に影響を与えなかった、データ提示せず)。抽出液中の RepE 濃度は 0.09 - 0.18 mg/ml で、ゲルシフトでは RepE 特異的な DNA との複合体のみが観察され、精製 RepE 蛋白質と変わらない程度の結合効率を示した。

PCR による突然変異導入

repE 遺伝子への塩基置換変異導入は PCR を利用した (Leung *et al.*, 1989)。Taq DNA polymerase (Wako Chemical) を用い、100 μl の反応液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.8], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) に対し、DNA 結合ドメイン解析の際は 0.1 mM MnCl₂, ダイマー形成ドメイン解析の際は 25 μM または 50 μM MnCl₂ を反応液に加えた。各 200 μM の dATP, dTTP, dGTP, dCTP を加え、94℃ / 30秒 - 50℃ / 1分 - 70℃ / 2分 を 1 サイクルとし、計 25 サイクル反応した。得られた DNA 断片は両端を適当な制限酵素で切断し、対応する領域をあらかじめ除去しておいた pKV7203 または pKV7190 ヘライゲーションした。

DNA 結合能のゲルシフトアッセイによる判定

ゲルシフトアッセイは、オリジンの direct repeats (DR, 130 bp) またはオペレータである inverted repeat (IR, 180 bp) の断片を ³²P で末端ラベルしたものをプローブとし、Kawasaki *et al.*, (1992) に記載の方法でおこなった。RepE は精製蛋白質、または細胞粗抽出液をもちいた。反応液の

組成は 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mg/ml BSA, 10 μg/ml poly(dI-dC) である。20 μl 反応液に 5 fmol のプローブ DNA と、最後に RepE 蛋白質、もしくは RepE を含む細胞粗抽出液を加え、30℃で30分インキュベートの後、2 μl のダイを加え 10% ポリアクリルアミド・ゲルで泳動した。ゲルは乾燥後にバイオイメージ・アナライザー (BAS2000, Fuji) で解析した。

DNA ベンディングアッセイ

オリジンへの RepE 蛋白質結合によるベンディングは、基本的には Kim *et al.* (1989) に記載の方法に従った。プラスミド pKV7205 の DNA を *Mlu*I, *Nhe*I, *Xho*I, *Eco*RV, *Sma*I, *Nru*I, *Rsa*I または *Bam*HI の各制限酵素で切断すると、一定長 (140 bp) の DNA 断片中のさまざまな位置にイテロンを持つ断片が切り出される (Fig. 4)。1 μg の各断片と 1.7 pmol の精製 RepE 蛋白質を 15 μl のゲルシフトバッファー中で混ぜ、30℃で 30分間インキュベートした。反応終了後ダイを加え、10% ポリアクリルアミド・ゲル中、4℃、10 V/cm 以下の定電圧で泳動した。ゲルはエチジウムブロマイドで染色の後、イメージアナライザー (PDI) で解析した。ベンディングの角度は、Thompson and Landy (1988) に記載の関係式、 $\mu_M / \mu_E = \cos \alpha / 2$ に従って算出した。ここで、 μ_M は DNA 断片の中央に蛋白質が結合した場合の泳動度、 μ_E は DNA 断片の端に蛋白質が結合した場合の泳動度、そして α はベンディングの角度である。

精製 RepE 蛋白質のゲル濾過実験

サイズカラム Superdex75 HR10/30 (Pharmacia) を用い、20 mM Mes (pH 6.0), 0.5 M KCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol のバッファー中、室温、0.5 ml/min の流速でクロマトグラフを行った (TOSO HPLC

System)。250-500 μg/ml の蛋白質を 100 μl アプライし、検出は 280 nm の吸収で行った。

精製 RepE 蛋白質の架橋実験

DSP (Pierce) を用い、基本的にはサプライヤーの指示に従い精製 RepE 蛋白質の架橋を行った。DSP のストック液は 10 mg/ml の濃度で dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かし作成した。架橋反応は PBS バッファー (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH7.5) 50 μl 中、80 nM RepE 蛋白質、5 μg/ml DSP (最後に加えた) の条件で行った。DSP を加える直前 (0 time) と、氷中でインキュベート開始後、10, 20, 40 分の各点で 10 μl のサンプルをとり 1 μl の 1 M Tris (pH 7.5) を加え反応を停止した。各サンプルは等量の 2x sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.65% SDS, 15% glycerol, 0.005% bromophenol blue) を加え、2 分間ボイルの後 12.5% SDS-PAGE で展開した。泳動後にゲルをニトロセルロース・メンブレンに転写の後、ECL Western blotting system (Amersham) によって RepE 蛋白質を検出した。

その他の方法

菌株・ファージの取り扱い、DNA、蛋白の取り扱い、SDS-PAGE などは標準的な方法によった (Sambrook *et al.*, 1989)。シーケンスは、dye terminator cycle sequencing kit および ABI 373A sequencer (Perkin Elmer) を用い行った。

結果

RepE 蛋白質のベンディング活性

RepE 蛋白質がオリジンに結合した際に、オリジンにベンディングを引き起こすのかどうかを検定した。一定長

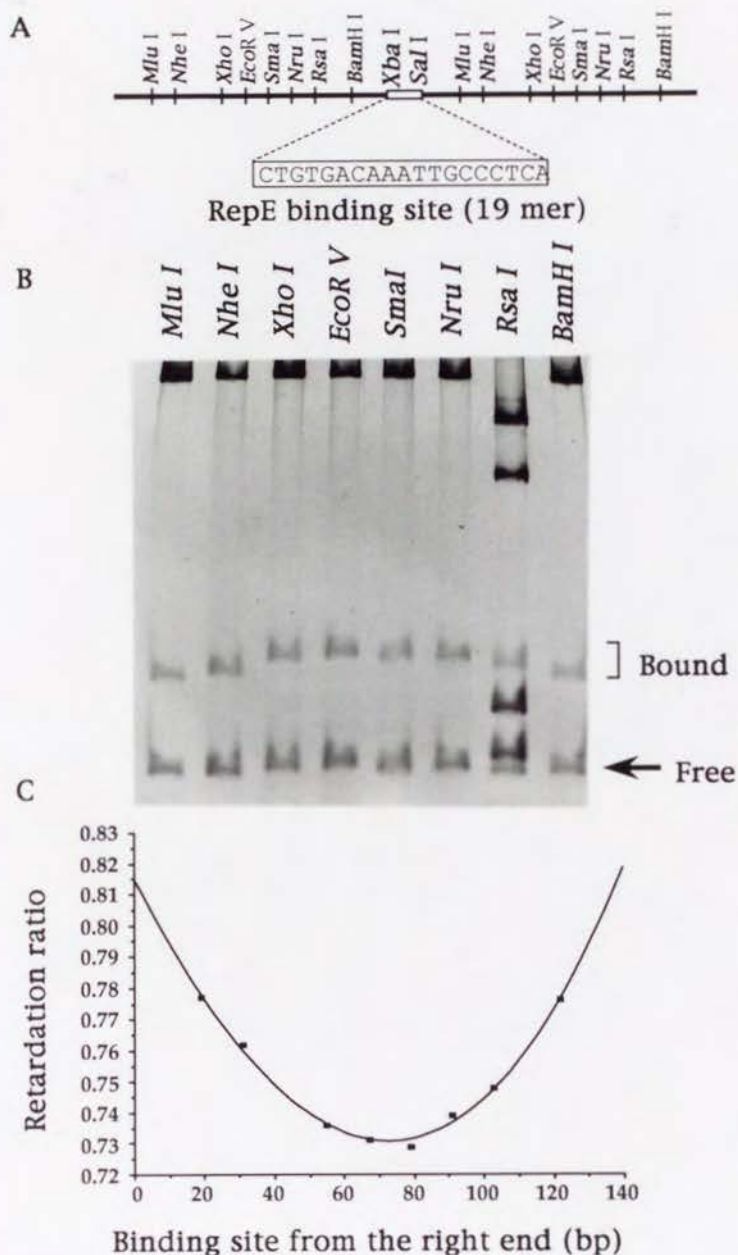


Fig. 4 RepE-イテロン複合体のベンディングアッセイ。(A) プラスミド pKV7205 のベンディングアッセイに関わる領域。制限酵素サイト及び RepE の結合配列 (19 bp イテロン) が示してある。(B) プラスミド pKV7205 DNA を *Mlu*I, *Nhe*I, *Xho*I, *EcoRV*, *Sma*I, *Nru*I, *Rsa*I または *Bam*HI で切断して出来た、イテロンがさまざまな位置にある 140 bp DNA 断片を RepE とインキュベートし、10% ポリアクリルアミド・ゲルで電気泳動後エチジウムブロマイド染色した (詳細は材料と方法参照)。(C) RepE-DNA 複合体の泳動度を 140 bp 断片中のイテロンの位置に対してプロットした。Retardation ratio は DNA 単独 (Free) に対する RepE-DNA 複合体 (Bound) の泳動度の比である。

(140 bp) の DNA 断片の様々な位置に RepE 蛋白質の結合部位であるオリジンの 19 bp イテロンが配置される様にし、この DNA と RepE 蛋白質とのゲルシフトアッセイによってベンディングの有無を判断した(詳細は材料と方法に記載)。ベクターの *XbaI*-*SaII* サイトにイテロンを一個挿入したプラスミド DNA を、*MluI*, *NheI*, *XhoI*, *EcoRV*, *SmaI*, *NruI*, *RsaI* または *BamHI* で制限酵素処理することによって 140 bp DNA の様々な位置にイテロンが挿入された断片ができる (Fig. 4A)。この DNA と野生型 RepE 蛋白質とをインキュベートし、ポリアクリルアミド・ゲルで電気泳動したところ、DNA 単独の場合は全て 140 bp の長さに相当する泳動度を示した。これに対して RepE-DNA 複合体の場合は、イテロンが DNA 上のどの位置にあるかによって異なる泳動度を示した (Fig. 4B, C)。泳動度はイテロンが DNA 断片の中央付近にあるとき最も小さく、端の方にあるほど大きかった。これは RepE の結合によって DNA のベンディングが起り、その際 DNA 上にイテロンの存在する位置の違いから RepE-DNA 複合体の形状に差が出たためと判断できた。Thompson and Landy, 1988 に記載の関係式により、RepE 蛋白質がイテロンに引き起こすベンディングの角度を推定したところ、約 50 度であった。オリジンにはイテロンが 4 つ存在し、それぞれに RepE 蛋白質が結合する。各イテロンに RepE 蛋白質が結合することでオリジン領域の高次構造変化が起り、二重鎖開裂とそれに続くヘリカーゼの導入の契機になると考えられた。

§

DNA 結合ドメインの解析

N 末端、C 末端両側からの欠失はともに DNA 結合活性に影響する

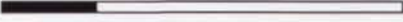
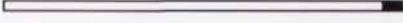
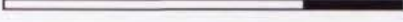
これまでに RepE の 63-82 残基 (Masson & Ray, 1986) と

C 末端 (221-242 残基、Bex *et al.*, 1986) の 2 箇所ヘリックス・ターン・ヘリックス・モチーフ様の配列が存在すると報告されていたが、DNA 結合への関与は明らかでなかった。DNA 結合ドメイン同定のため、まず N 末端、C 末端両側から幾つかの欠失変異を作成し *in vivo* のイニシエーター活性とリプレッサー活性、さらに DNA 結合活性を調べた。欠失変異体の蛋白質の精製を容易にするため、ヒスチジン 6 残基のクラスターを N 末端に付加する形 (His₆-RepE) で作製した。野生型 RepE はヒスチジンを付加しても、*in vivo* におけるイニシエーター活性、リプレッサー活性を失わず、また *in vitro* においても DNA 結合活性に影響は見られなかった (データ提示せず)。

N 末端からの欠失が 33, 68 あるいは 103 アミノ酸残基まで欠失すると *in vivo* でイニシエーター活性、リプレッサー活性がともに失われ、*in vitro* でもオリジンの direct repeat (DR), オペレーターである inverted repeat (IR) それぞれの DNA に結合できなくなる事が分かった (Fig. 5)。一方、N 末端から 17 残基欠失した場合、*in vivo* におけるイニシエーター活性は失われるが、オリジン・オペレーター双方に対する DNA 結合能は保持していることが以前に報告されている (Kline *et al.*, 1992)。これらの結果から、RepE 蛋白質の N 末端 17-33 残基にかけて、直接あるいは間接に DNA 結合に関与する領域があると考えられた。

C 末端を 6 残基欠失した場合 (RepE602)、*in vivo* でのイニシエーター活性、リプレッサー活性は野生型 RepE と同程度で、*in vitro* でもオリジンあるいはオペレーターに対する結合能への影響はわずかであった。これは、以前の我々の結果とも一致している (Ishiai *et al.*, 1992)。欠失が 10 残基あるいはそれ以上に及ぶと (Δ C10, Δ C57 および Δ C148)、*in vivo* で活性を失うだけでなく、*in vitro* においても DNA 結合活性を失っていた (Fig. 5)。C 末端が 7 残基欠失した RepE701 の場合は *in vivo* の活性は完全に失われていたが (細胞蛋白質量に差はない)、オリジン・オペレーターに対する *in vitro* の結合活性は保持していた (Fig. 5)。

A

	RepE (251 residues)	<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>	
		Initiator	Repressor	DR	IR
WT		100	100	100	100
ΔN33		ND	<5	<1	<1
ΔN68		ND	<5	<1	<1
ΔN103		ND	<5	<1	<1
602		67	112	78	65
701		ND	16	77	50
ΔC10		ND	<5	<1	<1
ΔC57		ND	<5	<1	<1
ΔC148		ND	<5	<1	<1

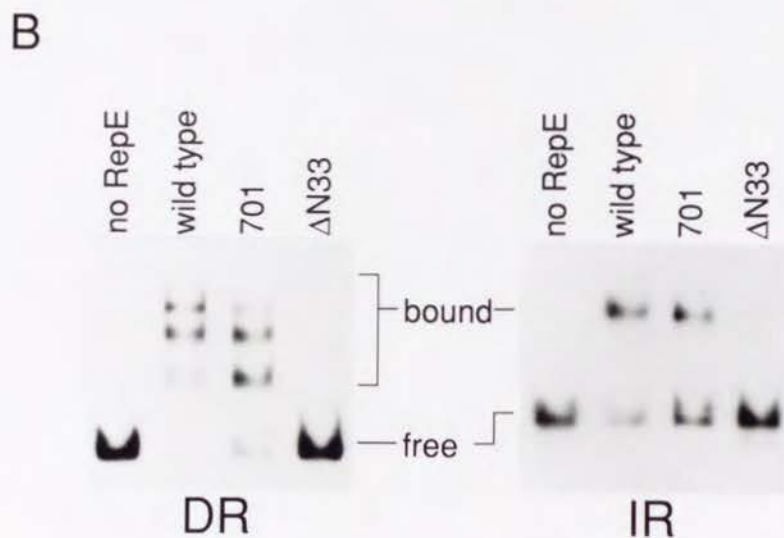


Fig. 5 (A) RepE のN末およびC末端領域欠失変異の位置と活性。イニシエーター活性はRepEをトランスに補った際の *ori2* プラスミド (pKV718 または pKV7204) のコピー数により測定した (Kawasaki *et al.*, 1991)。リプレッサー活性はオペロンフュージョン遺伝子 *PrepE-lacZ* から発現される β -ガラクトシダーゼ活性 (トランスに補われる RepE によって転写が抑制される) により測定した (Kawasaki *et al.*, 1991)。 *in vivo* の活性はヒスチジンタグ付き (Δ N33, Δ N68, Δ N103 および Δ N148) または無し (602, 701, Δ C10 および Δ C57) の RepE を発現する菌株を用いて測定した。 *in vitro* の DNA 結合活性は RepE602 を除き、ヒスチジンタグ付きの状態に精製した蛋白質を用いた。結合効率は、50% 結合に必要な RepE 量を野生型 (WT) と比較した。黒塗りの部分が欠失した領域である。ND, not detected (*ori2* プラスミドのトランスフォーマントが得られなかった)。 (B) ゲルシフトアッセイの例 (実験条件の詳細は材料と方法に記載)。それぞれ 3 pmol の His₆-RepE を用いた。DR, direct repeat; IR, inverted repeat.

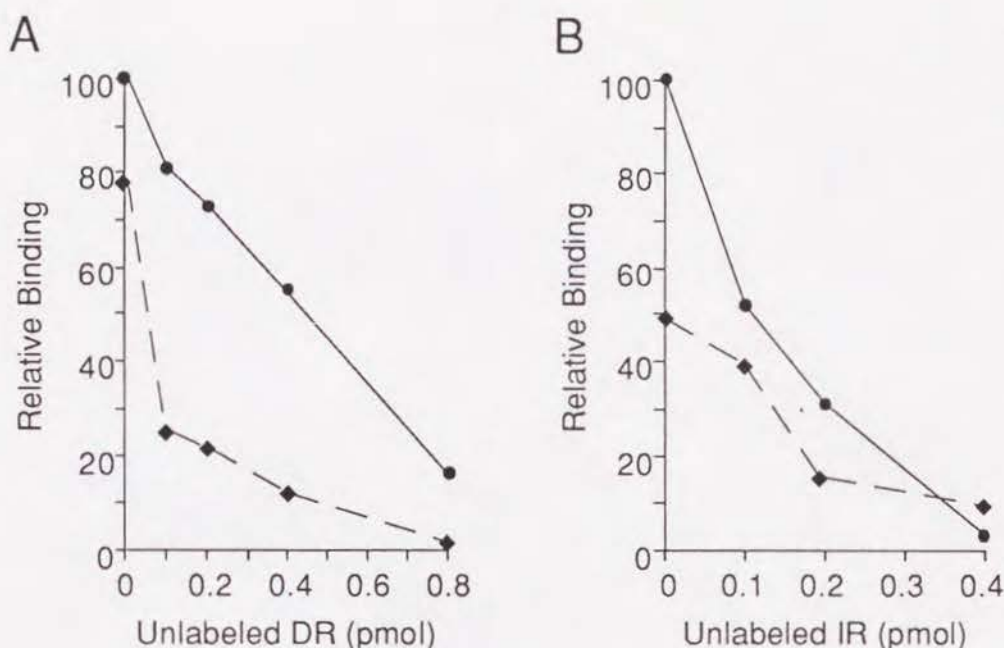


Fig. 6 野生型及び RepE701 のゲルシフトアッセイにおいて非標識 DNA を用いた競合実験。実験条件は、非標識の direct repeat (DR) または inverted repeat (IR) を図に示した量加えた以外は、Fig. 5 と同様に行った。標識 DNA の全体量のうち、精製 RepE 蛋白質 (野生型および RepE701) と結合したものの割合を、加えた非標識 DNA 量に対してプロットした。非標識 DNA を加えない場合の野生型の結合効率を100%とした。

この矛盾の原因を知るためにゲルシフト・アッセイにおいて競合実験を行った。その結果、RepE701 の DNA 結合が不安定になっていることが一因として挙げられた。過剰量の非標識 DNA をコンペティターに用いゲルシフト・アッセイを行うと、RepE701-DR 複合体は野生型 RepE-DNA 複合体に比べ競合されやすくなっていた (Fig. 6A)。一方 RepE701-IR の方は、野生型と競合の程度に関しては大きな違いはなかったが、結合効率の面で RepE701 は野生型の約半分であった (Fig. 6B)。以上の事から RepE の C 末端領域は DNA 結合に重要な働きをしている事が明らかになった。しかし、欠失変異を用いた解析からは DNA 結合に重要な領域の情報はこれ以上得られなかった。

DNA 結合能力の低下した変異 RepE の分離

つぎに DNA 結合に特異的に影響を与えるアミノ酸置換変異 RepE を分離するために、オリジン (ori2) のイテロ

ンへ結合できなくなった変異 RepE を直接スクリーニングした。この目的のために、ori2 のイテロンに結合できない変異 RepE を lacZ の発現によってモニターする系を作成した (Fig. 7)；araB プロモーターと lacZ 構造遺伝子の間に ori2 のイテロン (オリジンの DR を2組逆向きに計8個のイテロン、DR₂) が挿入された融合遺伝子を持つ入ファージを KY1462 に溶原化し、それに対して RepE 蛋白質がプラスミドからトランスに補われた。この系で野生型 RepE 蛋白質が補われた場合はイテロンに結合し araB プロモーターからの転写は阻害され、lacZ の発現が抑制される。それに対して、DNA に結合できない変異 RepE が供給された場合は β -ガラクトシダーゼの発現が起こる。araB プロモーターを0.05%アラビノースによって誘導する条件下、マックコンキー・プレート上で野生型 RepE を産生するコロニーは白色コロニーを、DNA 結合能欠損変異 RepE (Δ C57 または Δ C10) を産生するコロニーでは赤色コロニーが形成

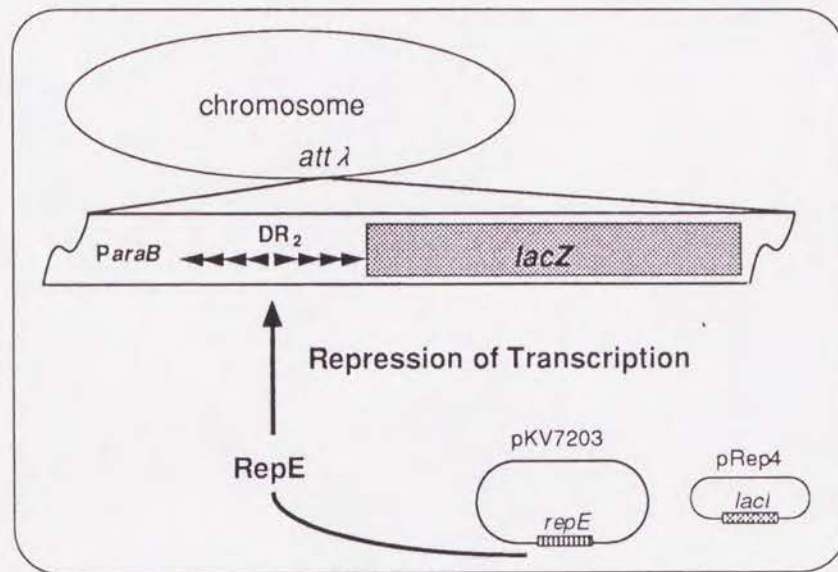


Fig. 7 DNA 結合能欠損 RepE 変異体を分離する系。変異を導入した *repE* segment を持つプラスミド pKV7203 の DNA を KY1462 (λ P *araB*-DR₂-*lacZ* が溶原化しており、プラスミド pRep4 を持つ) にトランスフォームする。IPTG またはラクトースによって発現が誘導された RepE が正常な場合はイテロン配列 (DR₂, 8つのイテロン) に結合し *araB* プロモーターからの *lacZ* の転写を抑制する。それに対して、トランスに供給される RepE がイテロンに結合できない場合は *lacZ* の転写がおこる。

されることが確かめられた。

変異導入には PCR mutagenesis 法を用いた (Leung *et al.*, 1989)。これは、反応液中の Mn²⁺ イオン濃度に依存して *Taq* DNA polymerase の忠実度が下がり塩基置換が導入される事を利用する方法である。特定の領域内にのみ変異を導入できる点、変異導入効率が非常に高く偏りが比較的少ない点で有効である。材料と方法に記載した条件下、*repE* 遺伝子を互いにオーバーラップする 4 つの segment (Fig. 3 参照) に分け増幅した。得られた各 DNA 断片の両端を制限酵素処理し、プラスミド pKV7203 の対応する部位へクローニングした。その結果得られたプラスミドを上記の系の菌株 KY1462 にトランスフォームし、30℃でインキュベート、18時間後赤くなったコロニーを

ピックアップした。各断片について約1,000個程度のトランスフォーマントをスクリーニングし、segment 1 から16個、segment 2 から8個、segment 3 から39個、segment 4 から89個の赤色コロニーが得られた。

DNA 結合活性欠損変異はC末端領域に集中した

上記のスクリーニングで得られた各クローンについて、抗 RepE 血清を用いたイムノブロットングによって *repE* 遺伝子産物の大きさと量を確認した。多くのクローンは欠失した RepE または、野生型より量の少ない RepE を産生しており、これらは排除した。残った28個のクローンはC末端に集中していた (segment 1 は 0個、segment 2 は1個、segment 3 は5個、segment 4 は22個)。次に、これら変異体の変異導入があった segment に関しシーケンスを

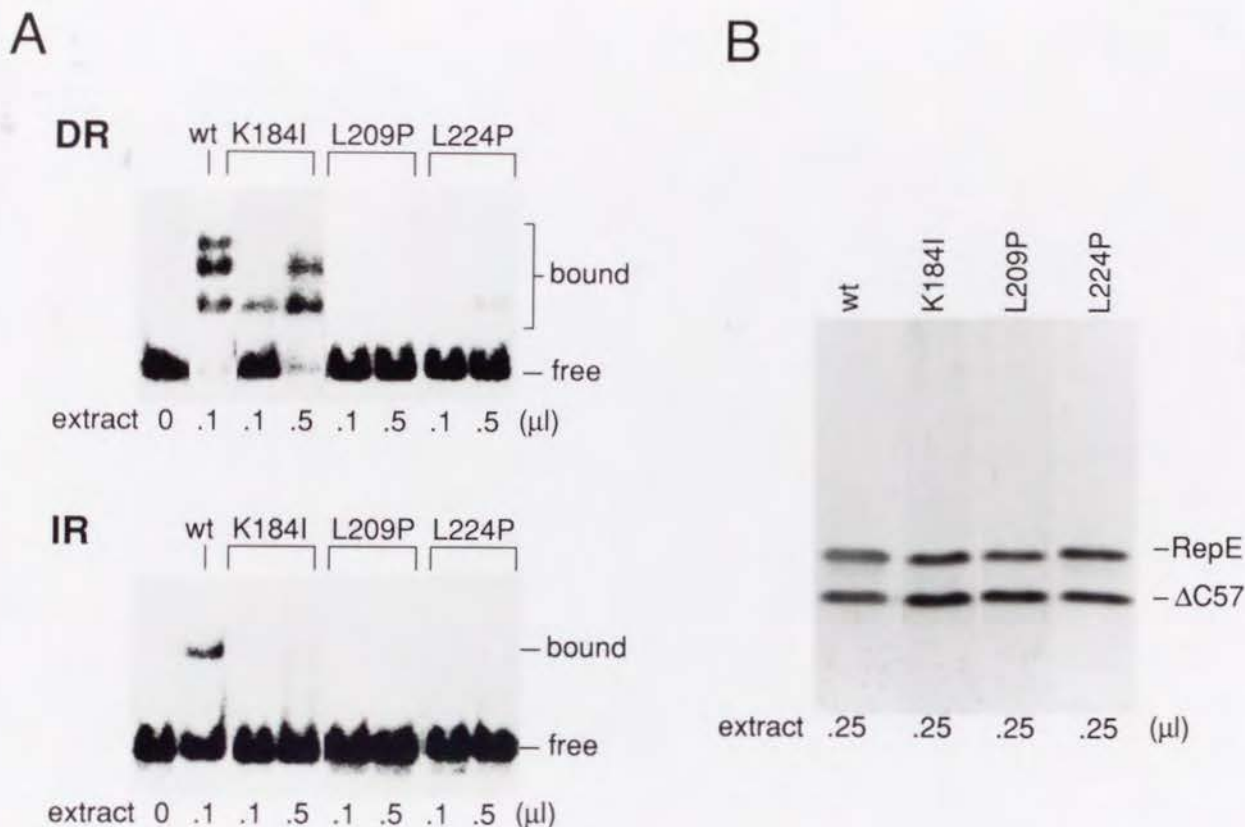


Fig. 8 (A) 細胞粗抽出液を用いたゲルシフトアッセイの例。direct repeat (DR) または inverted repeat (IR) の DNA 断片をプローブとして用いた。示された量の細胞粗抽出液を用い、材料と方法の記載に従って反応を行った。(B) イムノブロットイングによる細胞粗抽出液中の RepE 蛋白質定量。各レーンとも野生型 (wt) または変異体の抽出液 0.25 μl にリファレンスとして 31.6 ng の精製 RepE ΔC57 を加えた。抽出液中の wt, K184I, L209P および L224P の濃度は、それぞれ 0.13, 0.10, 0.16 および 0.18 mg/ml である。抽出液中の RepE と ΔC57 の位置が示してある。

行い変異の位置を決定すると共に、細胞粗抽出液を用いたゲルシフトアッセイによって DR, IR に対する DNA 結合能を調べた。期待された通り、これらの変異体の殆どはオリジン・オペレーター双方への結合に欠損が見られた (Fig. 8 にゲルシフトアッセイの一例を示した)。

DNA 結合能が欠損した変異体に関しその変異の様子をまとめたのが Table 2 である。これら変異の位置は何れも C 末端 (segment 3 と segment 4) に集中しており、多くは 1 アミノ酸置換変異であった (少なくとも 10 個の独立な変異)。また、フレームシフト変異も 1 つあった。興味深いこ

とに、これらの変異は 168-242 残基の範囲内に集中して起こっていた。

何れの変異体もオリジン・オペレーター双方への DNA 結合効率が著しく低下していたが、そのうち 8 つはオペレーターへの結合は検出されなかったのに対し、弱いながらもオリジンへの結合が観察された。RepE はモノマーがオリジンに、ダイマーがオペレーターに結合することから、これらの変異がダイマー形成に関与している可能性も考えられたが、オリジン・オペレーターへの結合活性が大きく落ちていることから、ダイマー形成への関与はあったとし

Table 2. DNA-binding defective RepE mutants with amino acid alterations

Mutant RepE ^a	Amino acid (codon) change(s)		Segment no. ^b	DNA binding activity ^c	
				DR	IR
S168P	S(UCC) →	P(CCC)	3	<1	<1
K184I	K(AAA) →	I (AUA)	3	21	<1
I188N	I (AUC) →	N(AAC)	3	<1	<1
Q193L	Q(CAG) →	L(CUG)	4	21	<1
M201T*	M(AUG) →	T(ACG)			
L194P	L(CUG) →	P(CCG)	3	5	<1
L194P	L(CUG) →	P(CCG)	4	1	<1
S197R	S(AGU) →	R(AGA)	4	7	<1
M201T	M(AUG) →	T(ACG)	4	<1	<1
S225P*	S(UCA) →	P(CCA)			
R207P	R(CGC) →	P(CCC)	4	<1	<1
F208L*	F(UUC) →	L(CUC)			
L209P	L(CUG) →	P(CCG)	4	<1	<1
N217D	N(AAC) →	D(GAC)	4	5	<1
T236S*	T(ACU) →	S(UCU)			
L224P	L(CUC) →	P(CCC)	4	3	<1
F240S	F(UUU) →	S(UCU)	4	3	<1
F242S	F(UUC) →	S(UCC)	4	9	<1
FS219-247 ^d	Frameshift (219-247)		4	<1	<1

^a Mutant RepEs are designated by a codon number (#1 for AUG) flanked by one letter amino acid codes of wild type (left) and the mutant (right). Those with asterisks were found simultaneously with another mutant (shown immediately above) in the same clone; the DNA binding activities of the double mutants are presented.

^b The numbers refer to those indicated in Fig. 3.

^c The DNA binding activity was determined using several dilutions of crude extract, and corrected for the amount of RepE in the extract used. Values are presented as % of the wild type RepE. Averages of two experiments are shown. DR, direct repeat; IR, inverted repeat.

^d The predicted amino acid sequences of the C-terminal end (from residue 219) are: Wild type: ...RTPMRLSYIEKKKGRTTHIVFSFRDITSMTTG (251 residues), Mutant: ...KLQCASHTLRKRKAARRLISYFPSAISLP (247 residues)

でも副次的と考えられた。オリジン・オペレーター双方に全く結合の観察できなかったのは、1アミノ酸置換変異では S168P (168番目のセリン残基がプロリンに置換、以下同様)、I188N および L209P の3つであった。これらアミノ酸残基は、DNA 結合に極めて重要な働きをしていると考えられる。

Table 2 に掲載していない変異体としては、6アミノ酸欠失変異 (*Pvu*II サイトにまたがる191番目のチロシンから196番目のセリンを欠失) が7つあり、これも DR, IR への結合は観察されなかった。また、候補のなかに DR, IR 両方に対し野生型 RepE と同程度の結合活性を示す物が segment 2 から1 個、segment 3 から1個、segment 4 から2 個取れたがこれらの原因に関しては分からない(データ提示せず)。

以上の結果と、欠失変異体を用いた結果 (Fig. 5) を合わせて、RepE 蛋白質のC末端領域 (アミノ酸残基 168-242) がオリジンのイテロンだけでなく、オペレーターへの結合にも、極めて重要な働きをしている事が示唆された。ただし、他の領域の関与も否定は出来ない。

§

ダイマー形成ドメインの解析

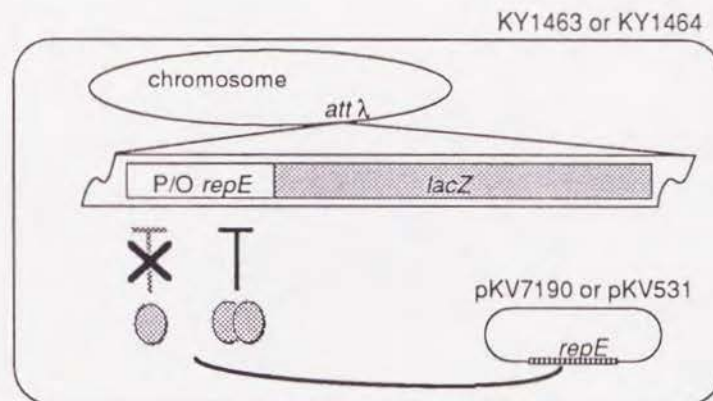
リプレッサー活性を失った変異体の分離

以前、我々の研究室で mini-F の複製にシャペロンの要求性が無くなった変異体を分離したところ、イニシエーター活性の上昇を示した RepE 変異体が多数分離され、それら変異は RepE の93-135残基に集中していた (Ishiai *et al.*, 1992)。コピー数上昇の説明の一つとしては、RepE 蛋白質がダイマー化しにくくなった可能性が挙げられ、実際その中の RepE54 (R118P) は全くダイマー形成が出来なくなっていた。一方、RepEを含む複数のイニシエーター

蛋白質においてN末端領域に ロイシン-ジッパー・モチーフ様の配列があるが (RepE では21-55残基、Giraldo *et al.*, 1989)、プラスミド pPS10 のイニシエーター蛋白質 RepA ではこの配列内のロイシンを別のアミノ酸に置換するとダイマー形成能が下がるとの報告があった (García de Viedma *et al.*, 1996)。また、プラスミド R6K ではイニシエーター蛋白質 π のN末端側半分でダイマー形成可能なことも分かっている (Levchenko *et al.*, 1994)。前述の DNA 結合ドメインに加え、次に RepE 蛋白質のダイマー形成ドメインの同定を試みた。

RepE ダイマーは *repE* 遺伝子のオペレーターに結合しリプレッサーとして働くのに対して、モノマーにはこの機能はない。従ってリプレッサー活性を失った変異体を分離すればその中にはダイマー形成能を失った物が含まれると期待される。*repE* 遺伝子のプロモーター/オペレーター領域と *lacZ* 構造遺伝子との融合遺伝子である *PrepE-lacZ* を持つ λ ファージを KY1461 または MC4100 に溶原化し (それぞれ KY1463 および KY1464)、プラスミドからトランスに RepE 蛋白質を補うことでリプレッサー活性を測定した。野生型 RepE が補われた場合は *lacZ* の転写が抑制されるが、リプレッサー活性を失った変異 RepE がトランスに補われた場合は転写抑制が起こらず、 β -ガラクトシダーゼ活性を発現し、マッコンキープレートでは赤色コロニーを、medium E, X-gal プレートでは青色コロニーを形成する (Fig. 9)。リプレッサー活性を失った変異体はイムノブロットイングによって *repE* 遺伝子産物を確認し、欠失した RepE または野生型に比べて量の少ない RepE を発現していた変異体は排除した。残った変異体の細胞粗抽出液を調製し、これを用いたゲルシフトアッセイで DNA 結合活性を測定した。そのうちダイマー形成能欠損変異に期待される性質を示した変異体、すなわちオリジン結合能を野生型と同じかそれ以上に保持し、かつオペレーター結合活性が欠損している物に関して、更に解析を進めた。

このスクリーニングはダイマー形成能の有無を直接見



Screening type	strain	plasmid	mutagenesis	indicator plate	number of isolated mutants
A	KY1463	pKV7190	<i>mutD5</i>	MacCONKEY	6
B	KY1463	pKV531	<i>mutD5</i>	MacCONKEY	2
C	KY1464	pKV7190	PCR	Medium E, X-gal	5

Fig. 9 リプレッサー活性を失った変異 RepE の分離方法。融合遺伝子 *PrepE-lacZ* を持つ λ ファージの溶原菌では、トランスに野生型 RepE が供給された場合、オペレーターに結合することで *lacZ* の転写が抑制される。それに対してダイマーを形成できない変異 RepE が供給された場合は転写が抑制されず、マッコンキープレートでは赤色のコロニーを、medium E, X-gal プレートでは青色のコロニーを形成する。変異を導入したプラスミド (pKV7190 または pKV531) を大腸菌にトランスフォームし、インディケーター・プレート上で発色しているトランスフォーマントのみを選択した。下部に示したように、スクリーニングはプラスミド、ストレイン、変異導入の方法、インディケーター・プレートの組み合わせを変えて3通りに行った。詳細は本文及び材料と方法を参照。

ているわけではない。バイアスを出来るだけ下げるために、スクリーニングはストレイン、プラスミド、変異導入の方法、インディケーター・プレートの組み合わせを変えて三通り (A, B および C) に行った (Fig. 9、詳細は材料と方法を参照)。ここまでの段階で、Aタイプ・スクリーニングでは約 10^4 の細胞をスクリーニングし6個、Bでは約 10^5 の細胞から2個、Cでは 10^5 の細胞から5個の候補が得られた。

なお、途中で排除したオリジン・オペレーター双方への結合が欠損している変異 RepE は、Aタイプ・スクリーニングでは12個、Bでは2個、Cでは5個あった。

repE 変異の位置決定

得られた変異の位置をシーケンスによって決定した。前述のスクリーニングにおける、細胞粗抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果とあわせて Table 3 に示した。独立な13個の候補の変異はいずれも1塩基置換変異であり、その変異によって RepE 蛋白質上の11箇所にわたって1アミノ酸置換が起こっていると推定された (S111P と T154A は同じ変異の物が独立に2個ずつ分離された)。これらの変異位置は2つの領域、すなわち中央領域 (111-161 残基) と C末端領域 (195-208 残基) に集中していた (Table 3 および Fig. 16)。中央領域は、オリジンへの結合が著しく上昇している変異体 (S111P と F112S) が見られる点、先に述べたシャペロンの要求性を無くしたコピー数上昇変異が多数

Table 3. Amino acid alterations and DNA-binding activities of autoregulation defective RepE mutants

Mutant RepE ^a	Amino acid (codon) change	Screening type ^b	Relative DNA-binding activity ^c	
			DR	IR
S111P	S(tct)→P(cct)	B & C	>50.0	<0.1
F112S	F(ttt)→S(tct)	A	12.2	0.6
L135F	L(ctc)→F(ttc)	A	1.8	<0.1
T154A	T(aca)→A(gca)	A & B	1.3	<0.1
E156G	E(gaa)→G(gga)	A	2.6	<0.1
Y161C	Y(tat)→C(tgt)	A	1.3	<0.1
P195S	P(cct)→S(tct)	C	3.5	<0.1
R200H	R(cgt)→H(cat)	C	3.0	<0.1
M201T	M(atg)→T(acg)	A	0.8	<0.1
D203A	D(gac)→A(gcc)	C	1.8	<0.1
F208L	F(ttc)→L(ctc)	C	2.9	<0.1

^aMutant RepEs are designated by a codon number (1 for AUG) flanked by the one-letter amino acid codes of the wild type (left) and the mutant (right).

^bSee text and Fig. 9 for details of three screening types (A, B and C).

^cDNA-binding activities determined with crude extracts. Relative activities to those of wild type are presented. DR, direct repeat; IR, inverted repeat.

分離された領域 (93-135 残基, Ishiai *et al.*, 1992) とオーバーラップする点で注目された。実際 L135F は共通してみられる変異だった。また、C 末端にマップされた変異体のうち、M201T と F208L は DNA 結合能欠損変異として取られたものと同じ変異 (この場合は他の変異とのダブル変異、Table 2) であった。アミノ酸置換の様子については、疎水性・極性・酸性・塩基性、いずれのタイプのアミノ

酸残基にも変異が起こっていたが、極性のあるアミノ酸残基と疎水性のアミノ酸残基との間の置換が全体の半分を占めていた (S111P, F112S, T154A, P195S および M201T)。また、三つのスクリーニング・タイプの差はとくに見られなかった。

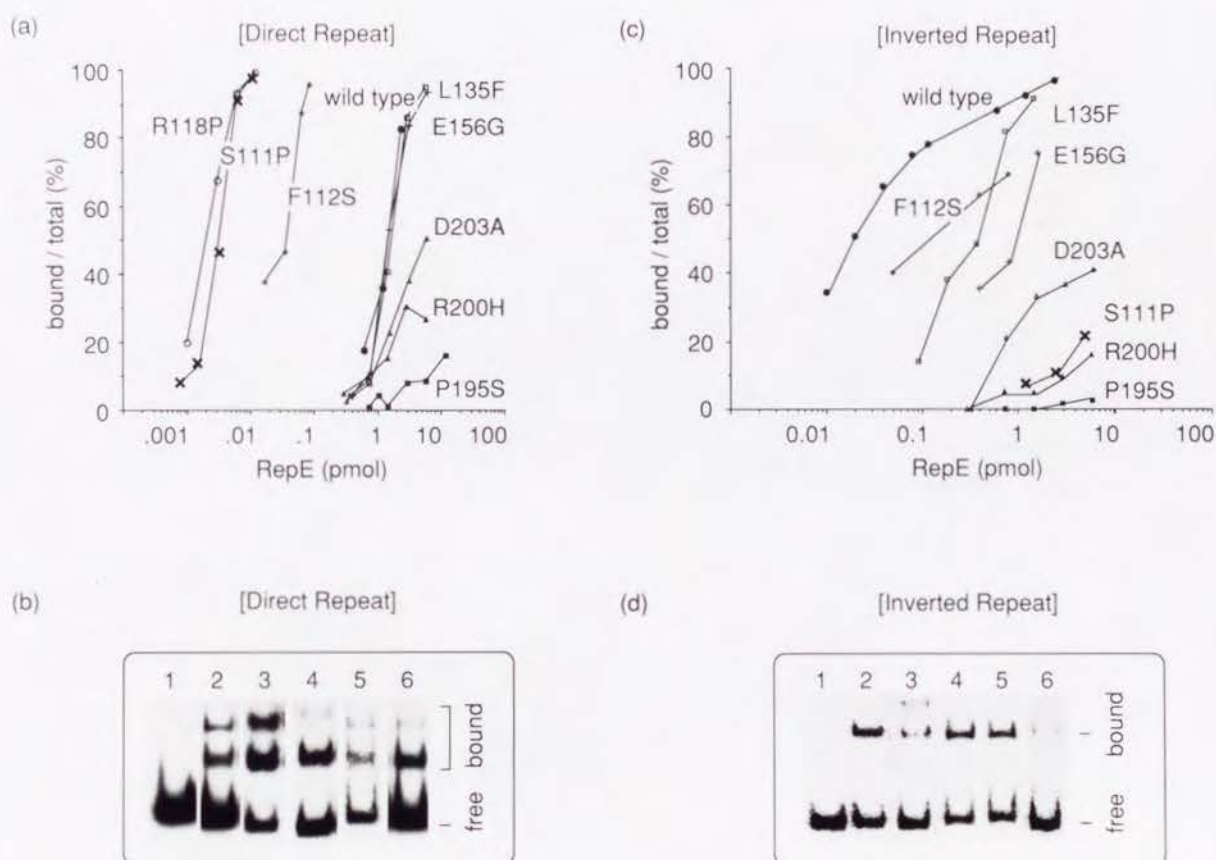


Fig. 10 変異 RepE の精製蛋白質を用いたゲルシフトアッセイ。 ^{32}P で標識した 5 fmol の direct repeat (DR) または inverted repeat (IR) の DNA 断片をプローブに用いた。(a および c) 用いた RepE 量 (モノマーとして算出した量) に対し、トータルのバンド中 RepE の結合によってシフトしたバンドの割合をプロットした。水平軸は対数プロットである。(b および d) ゲルシフトアッセイの一例。実験によってバンドの移動度が若干異なる場合があったが、野生型に対する相対的な移動度に違いはなかった。また、使用した IR のプローブには僅かに DR が混じっており、S111P は IR との複合体の他に DR との複合体も僅かに見られる (d のレーン 3)。Lane 1, no RepE; lane 2, wild type (1.2 pmol for DR and 10 fmol for IR); lane 3, S111P (3.0 fmol for DR and 2.5 pmol for IR); lane 4, F112S (17 fmol for DR and 44 fmol for IR); lane 5, E156G (1.6 pmol for DR and 0.4 pmol for IR); lane 6, R200H (2.9 pmol for DR and 0.7 pmol for IR)

細胞粗抽出液を用いたゲルシフトアッセイでオリジン・オペレーター双方への結合が低下していたためスクリーニングの過程で排除された DNA 結合欠損変異のうち、AタイプとBタイプのスクリーニングから分離された14個についても同様に変異位置の同定を行った。変異はN末端領域(27-94残基、8個の変異体)とC末端領域(166-230残基、6個の変異体)の、2つの領域にマップされた(すべて1塩基置換)。C末端の変異のうち3個は以前 DNA 結合欠損変異として分離された物と同じ変異か、同じ位置への変異であり(L194P, S197G および R207C、Table 2)、C末端領域が DNA 結合に主要な役割を果たしていることが再確認された。しかし、N末端領域の変異体はこのスクリーニングで始めて分離された。これらの変異体が RepE に与える影響については、なお研究を要する。中央領域からは DNA 結合能欠損変異は見つからなかった。

精製変異 RepE 蛋白質の DNA 結合活性

得られた変異体の内、S111P, F112S, L135F, E156G, P195S, R200H および D203A については蛋白質を精製し、改めてオリジン(DR)、オペレーター(IR)へのDNA結合活性をゲルシフトアッセイによって調べた(Fig. 10)。結合効率はグラフからプローブ DNA が50%シフトするのに要する RepE 蛋白量を読みとり、野生型の50%結合に必要な量(DRには1.3 pmol, IRには20 fmol)と比較することで行った。50%シフトに達しない変異体の場合は、最大限シフトするのに必要な蛋白量を野生型と比較した。最も目立ったのはS111Pで、先に述べたダイマー形成できない RepE54(R118P)と同様、オリジンへの結合効率が約500倍上昇していた。また、オペレーター結合効率もR118Pと同様に著しく低下していた。ただし、R118Pの場合はオペレーターへの結合は観察されなかったのに対し、S111Pは弱いながらもオペレーター結合能は残っており、野生型の1%以下の効率で結合した。後述のようにS111Pはダイマーを形成できないが、S111P蛋白質のご

く一部がダイマーを形成していてオペレーターに結合したか、あるいはモノマーがIRのハーフシーケンスに結合したと考えられる。S111Pの隣の変異F112Sもオリジン結合効率がかなり上昇しており、野生型の約50倍の効率で結合し、逆にオペレーターへの結合効率は野生型の1/5に落ちていた。L135FとE156Gのオリジンへの結合効率は野生型とほぼ同程度、オペレーター結合はそれぞれ7%と2.5%だった。また、P195S, R200H および D203A は細胞粗抽出液で得られた結果と異なりオリジンへの結合効率は野生型の25%以下に落ちており、オペレーター結合効率は野生型の1%以下であった。モノマーがオリジンに、ダイマーがオペレーターに結合する RepE 蛋白質の性質から、オリジンへの結合が上昇し、オペレーターへの結合が低下している変異体、特にS111Pはダイマー形成が出来なくなっていることが期待された。

ゲル濾過による精製変異 RepE 蛋白質のダイマー/モノマー判定

次に、これら変異蛋白質の形態を直接調べるために、精製蛋白質を用いてゲル濾過による形態決定を行った。サイズカラム(Superdex 75)を用いると野生型の精製蛋白質は約20.5分(サンプル注入後のカラム保持時間)の位置に、それに対してR118P精製蛋白質は約24分の位置に単一のピークが検出された(Fig. 11)。分子量マーカー蛋白質、creatine kinase (81 kDa), BSA (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) そして RNaseA (13.7 kDa) を用いた検量線で溶出される分子の大きさを推定すると、野生型が約60 kDa、R118Pが約30 kDaに相当し、野生型 RepE はダイマーとして、R118Pはモノマーとして存在しているという以前の結果(Ishiai *et al.*, 1994)を再確認できた。同様にS111P, F112S, L135F, T154A, E156G, R200HそしてD203Aの精製蛋白質をサイズカラムにかけ、その形態を推定した。その結果、S111PはR118Pと同様モノマーに相当する位置(約24分)にピークを作ることが分かった。

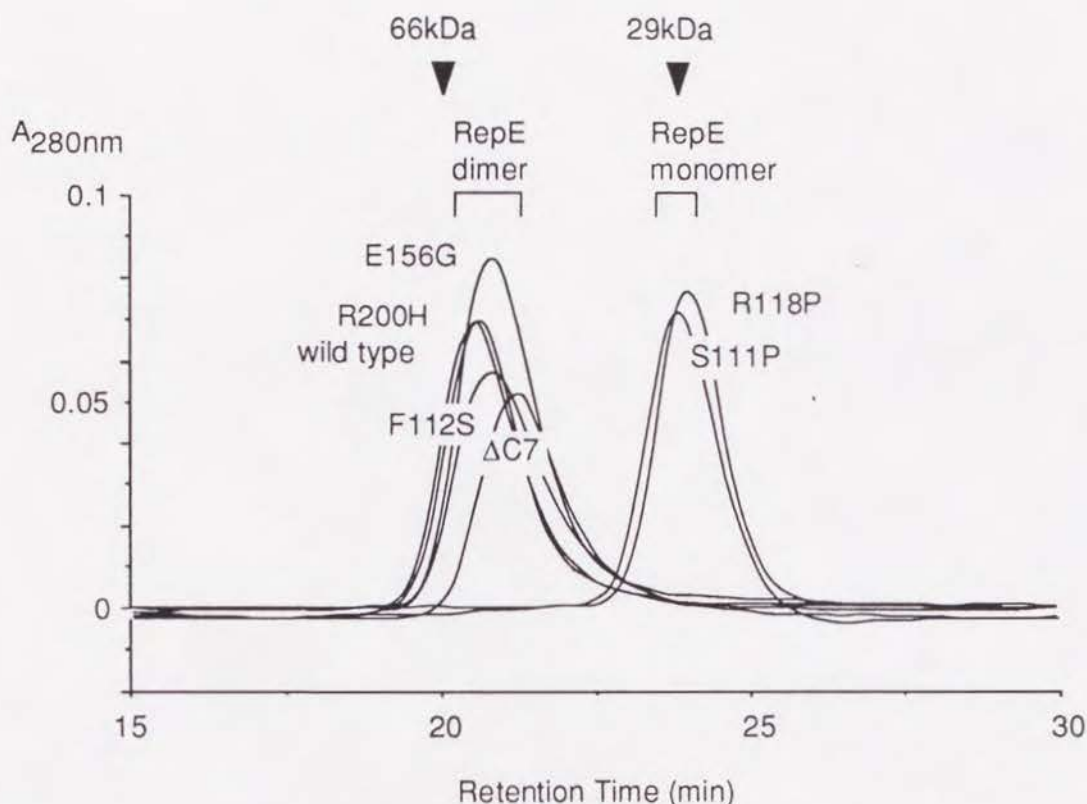


Fig. 11 変異 RepE のゲル濾過による形態決定。精製 RepE 蛋白質をサイズカラムにかけ、サイズマーカーを用いた検量線から分子量の判定を行った。RepE 蛋白質をアプライしてからのカラム保持時間 (Retention Time) に対して、各 RepE 蛋白質の 280 nm の吸収パターンを重ね合わせてプロットした。BSA (66kDa), carbonic anhydrase (29kDa) のピークの位置が上に示してある。

しかし、そのほかの変異体は、野生型と同じく約21分の位置に溶出され、大部分がダイマーであることが分かった (Fig. 11、L135F, T154A および D203A についてはデータ提示せず)。なお各変異体とも、280 nm の吸収において、モノマーあるいはダイマーのいずれかに対応する単一のピークしか検出できなかった。次に、RepE 蛋白質の N 末端からの欠失変異体 Δ N11, Δ N17 (それぞれ11および17アミノ酸残基欠失、Kline *et al.*, 1992) および、C 末端からの欠失変異体 RepE701 (7アミノ酸残基欠失、以下 Δ C7) をゲル濾過にかけた。これら変異体は約21分の位置に溶出され、ダイマーを形成している事が分かった (Fig. 11、 Δ N11と Δ N17 についてはデータ提示せず)。 Δ N11と Δ N17 については既に双方ともダイマーを形成しているこ

とが報告されている (Kline *et al.*, 1992)。

以上の実験で、RepE の111及び118番目のそれぞれセリン、アルギニン残基がプロリンに置換することでダイマー形成能に重大な欠損を与え、ダイマー形成能が殆ど出なくなる事が分かった。一方、他の変異はダイマー形成能に大きな影響は与えていないことが分かった。しかし、これらの変異はオペレーターへの結合が下がると同時にオリジンへの結合が上昇していることから (特に F112S、Fig. 10)、野生型に比べダイマー化しにくくなっている可能性が考えられた。また、欠失変異を用いた結果から N 末端の17残基、C 末端の7残基はダイマー形成に必要でないことが分かった。

変異 RepE 蛋白質の 架橋実験

変異 RepE の性質及び RepE のN末・C末両端のダイマー形成への関与を更に詳しく調べるために精製 RepE 蛋白質を用いた架橋実験を行った。DSP は homobifunctional NHS-Ester Crosslinker で、第一級アミンを持つ二つのアミノ酸残基間(主にリジン)を共有結合で架橋する(詳細は Pierce の説明を参照)。野生型 RepE と DSP を反応させ SDS-PAGE を行くと、約 60 kDa の位置に架橋された産物が現れた (Fig. 12)。架橋は主としてダイマーを構成するプロトマー間のみで起こっているとみられ、三量体あるいはそれ以上の架橋産物は観察されなかった。また、ダイマー化できない RepE54 (R118P) はダイマーに相当する架橋産物は観察されず、ほとんどがモノマーのまま存在していた (Fig. 12)。従って、架橋は主として二つのプロトマー間に特異的に起こっており、非特異的な架橋はほとんど起こっていないと考えられた。

前述のゲル濾過実験でダイマー化出来なくなっていることが分かった S111P を調べると、やはり架橋された二量体産物は検出されず、モノマーとして安定であることが分かった (Fig. 12)。この事からも、111番目のセリン及び118番目のアルギニン残基への変異がダイマー形成ドメインに重大な障害を与え、RepE 蛋白質がダイマー化できなくなっていることが明らかになった。他の変異体、F112S, L135F, T154A, E156G, Y161C, R200H そして D203A については、すべて二量体に相当する産物が観察された (Fig. 12 ただし L135F, T154A, E156G, Y161C および D203A についてはデータ提示せず)。この架橋実験は、ゲル濾過の際の約 1/100 の蛋白濃度である 80 nM の RepE を用い行ったが、オリジン結合効率が50倍上昇していた F112S も含め、これら変異 RepE の二量体の架橋効率は野生型 RepE と大きな差は見られなかった(架橋の効率は実験によってやや振れたが、インキュベーション40分後に10%以下の蛋白がモノマーとして検出される点で差はなかった)。ダイマー形成能へのこれらの変異の影響はあっ

たとしても、S111P や R118P の様に極端なものではないと考えられた。F112S, L135F, T154A, E156G および Y161C に関しては、それぞれの変異 RepE を プラスミド pKV7190 の *trp* プロモーターから最大限に発現すればリプレッサー活性が現れることから(データ提示せず)、*in vivo* においてもダイマー形成が可能であると考えられた。

RepE 蛋白質のN末端およびC末端領域のダイマー形成への関与を見るために、 Δ N17, Δ N42, Δ C7 および Δ C57 (それぞれN末端の17または42残基、あるいはC末端の7または57残基欠失)の精製蛋白質を用いて架橋実験を行った。その結果、これら欠失変異体はダイマーを形成することが可能であり、N末の42残基およびC末の57残基はダイマー形成に必要なではないことが分かった (Fig. 12)。ただし、ロイシン・ジッパー様配列が中断された Δ N42 はダイマー形成効率が野生型や他の変異体に比べてやや悪いことから (Fig. 12)、ロイシンジッパー様の配列がダイマー形成に補助的に関わっている可能性があると考えられた。

なお、精製した Δ C57 蛋白質には欠失による短い産物が僅かに含まれ、この欠失 Δ C57 のホモダイマーあるいは Δ C57 とのヘテロダイマーと思われるバンドが、 Δ C57 ホモダイマーのバンドの下に見られた。また、 Δ N42 は一部が凝集し大きな複合体を形成していたと思われ、ゲルの最上部にもバンドが見えている (Fig. 12)。

本研究で分かった事実は、RepE のダイマー形成に111番目のセリンと118番目のアルギニン残基を中心とする RepE 蛋白質の中央領域が極めて重要であり、N末端およびC末端を欠いてもダイマー形成が可能であることを示した。RepE の中央領域にダイマー形成ドメインが存在することが強く示唆された。

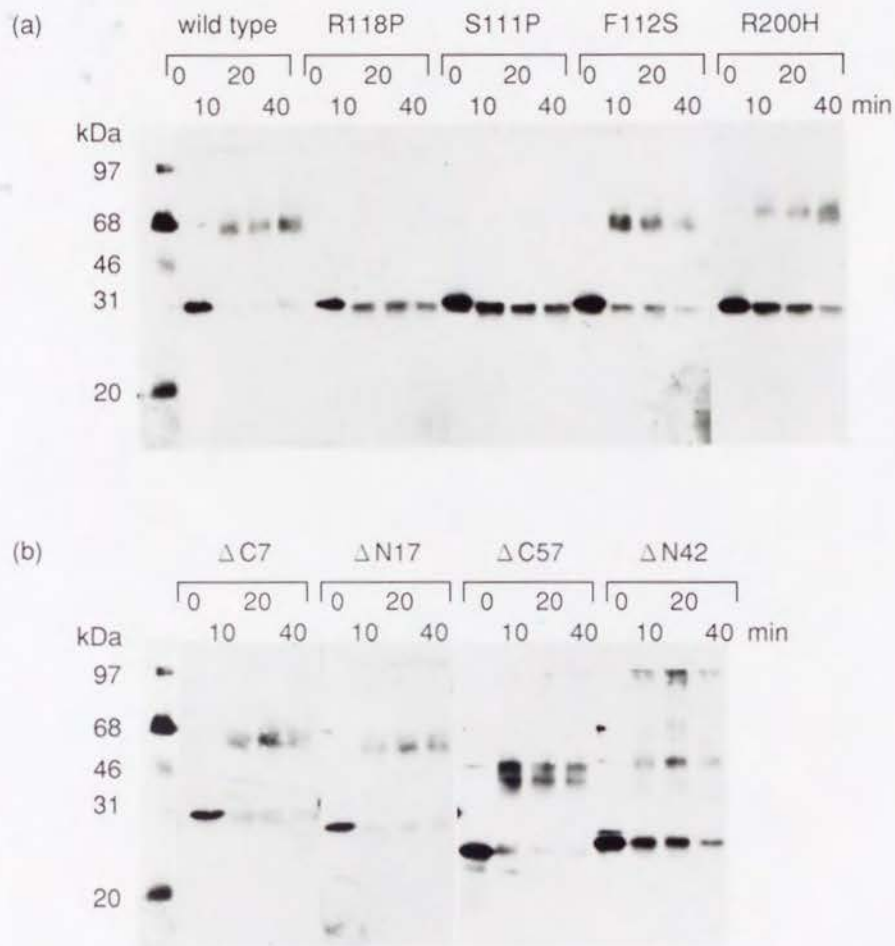


Fig. 12 DSPによる変異 RepE の架橋実験。反応は 材料と方法の記載に従った。反応液にサンプル・ローディングバッファを加え、SDS-PAGE 後、ゲルをニトロセルロースメンブレンに転写した。RepE 蛋白質の検出は ECL-Western blotting system (Amersham) によった。(a) wild type, RepE54 (R118P) および他のアミノ酸置換変異 RepE。(b) N末端およびC末端欠失変異 RepE。各蛋白質について4つのレーンは左から、DSPを加える直前 (0 time)、加えてから 10, 20 および 40 min 後の順である。ECLシステム用の分子量マーカーのパターンを左に示した。

a mini-F MAETAVINHKKRKNSPRIVQSNDLTEAAYSLSRDQKRMLYLFVDQIRKSDGTLQEHDGIC-----EIHVAKYAEIF-GLTSAEASKDIRQALKSFAGKE 93
b R6K ---MRLKVMMDVNKKTKIRHRNELNHTLAQLPLPAKRVM--YMALAPIDSKEPLERGRV-----FKIRAEDLAALA-KITPSLAYRQLKEC GKLLGASK 88
c pSC101 -----MSELVVFKANELAISRYDLTEHETKLILCCVALLNPTIENPTRKERT-----VSFTYNQYVQMM-NISRENAYGVLAATRELMTRT 81
d pCU1 -----MDKLLNKKIKVKQSNELTEAAYYLSLKAKRVLWLCLMQTYFTASVSEDDDEMAVLGDSTFKVKVADYQQIF-QVSRNQAIKDVKEGVFELSRSR 93
e pPS10 -----MMVENKVTQSNKLISSHTLTLEKRLV-LCAASL-IDSRKPLPKDGY-----LTIRADTFAEVF-GIDVKHAYAALDDAATKLFNRD 80
f pFA3 -----MPNDLVVVKANSLEANYRLSIDEIRIL----ALT-IGTMDPKSNQKI-----FDFTVADFVREFPEISQDNAYKQIQAAIKRIYDRS 78
g pGSH500 ...DTQALLPATKTFKKRASIKQSNELTEAAYYLPQAKRVLWLCLMQAYFNDSQEDDSVDLPL----FKISVSDYVKYF-NVATSVASRDVKAGVNALGEST 151

* * * * *

a mini-F V-VFYRPEEDAG-----DEKGYESFPWF IKRAHSPSRGLYSVHINPYLIPFFIGL---QNRFTQFRLSETKEITNPYAMRLYE-SLCQY-RKPDG 177
b R6K ISLRGDDIIALAKELNLPFTAKNSHEELDLNIIIEWIAYSPDEGYLSLKFTRTIEPYISSLIGKKNKFTTQLLTASLRLSSQYSSSLYQLIRKHY-SNEKK 187
c pSC101 VEIRNPLVKGFE-----IFQ-----WTNYAKFSSEK--LELVFSEEILPYLFQL---K-KFIKYNLEHVKSFENKYSMRIYEWLLKELTQKKTH 159
d pCU1 V-IFYPKEGSFD-----CVAR---PWLTEAGSRARGIWEIEFNHKLRLRYIYGL---TNQFTTYSLRDCGSLRNPRTIRLYE-SLAQF-K---S 170
e pPS10 I-RRYVKGKVVE-----RMR-----WVFHVKYREGQGCVELGFSPTIIPHLTML---HKEFTSYQLKQIGSLSSFYAVRLYE-IMSQF-I---K 155
f pFA3 V-KTEDKDRVTE-----FR-----WVSSRTYFKKEGRFRIAMTDEVMPYLTQL---KGQFTQYQLKHIAYFNSVHSIRIYE-LITQY-R---S 152
g pGSH500 V-TFYPKGEFE-----EVKR---PWLAEEAGMKRGRGWSQIEFNKVMFPVLVGL---TSQFTTYSLYDCGQLNSVRVIRLYE-SLCQF-R---S 228

* * * * *

a mini-F SGIVSLKIDWIIERYQ-----LPQSYQR-MPDFRRRLQVCVNEINSRTPMRLS--YIEKKKGRQTTHIVFSE RDITSMTTG----- 251
b R6K KNYFIISVDELKEELIAYTFDKDGNIEYKYPD-FPIFKRDVLNKAIAEIKKKTEISFVGLTVHEKEGRKISKLFKEFVVDDEDEFSGDKDDEAF FMNLSEA 286...
c pSC101 KANIEISLDEFKFMMLM-----LENNYHE-FKRLNQVWLKPI SKDLNTYSNMKLVS--VD--KRGRTDTLIFQVELDRQMDLVTELENNQIKMNGDK 245...
d pCU1 SGLWVTTHAWLNDRLFL-----LPESQQKNLAELKRSFLDPALKQINEKTPLLAK--YSIDDSGK----FLFSIIDKQNPV----- 239
e pPS10 LKQRECTLAQLREMFD-----LGDKYQD-VKDMRKRVLYPALEEVNKNNTDLTVA--VEPRRQGRRIIGFSFTIAKNDQLALSLE----- 231
f pFA3 VGSREITVEKLKEWLQ-----VENKYPR-FNSLNQRVLEPAITEINEKSDLVVE--VEQIKRGRTHISLNFVIGSKKRTAQKIEEVAKRPVFPHPKN 240...
g pGSH500 TGVWITTHDWLCERFM-----LPASQKNNIAEMKRTFLEPALKKINEKTPLKVS--YKTEEDGR----LLFNFLDGKQ----- 295

* * * * *

Fig. 13 RepE および他の類似複製開始蛋白質のアミノ酸配列アラインメント。ホモロジー検索によって RepE と類似性が認められた6つの複製開始蛋白質を並べた。アスタリスクは、同一または類似のアミノ酸残基 (太字で書かれている) が7つの蛋白質の内5つ以上で認められた箇所を示す。白抜き四角と影の付けられた四角で囲われた部分はそれぞれ コピー数上昇変異の分離される領域と DNA 結合に関わる領域である (考察参照)。矢尻は DNA 結合欠損変異の位置を示す (Table 2 参照)。a, RepE (mini-F, *E. coli* [Murotsu et al., 1981]); b, π (R6K, *E. coli* [Germino & Bastia, 1982]); c, RepA (pSC101, *E. coli* [Armstrong et al., 1984]); d, ORF239 (pCU1, *E. coli* [Krishnan et al., 1990]); e, RepA (pPS10, *Pseudomonas syringae* [Nieto et al., 1992]); f, 39K basic protein (pFA3, *Neisseria gonorrhoeae* [Gilbride & Brunton, 1990]); g, RepB (pGSH500, *Klebsiella pneumoniae* [Da Silva-Tatley & Steyn, 1993])。蛋白質によってはN末端またはC末端の配列を省いてある。

RepE 蛋白質のコンピューター解析

RepE 蛋白質のコンピューター解析を国立遺伝学研究所生命情報研究センターの西川建教授との共同研究により行った。まず、RepE とアミノ酸配列のホモロジーが認められる蛋白質をデータベースに対して検索した。RepE 蛋白質は幾つかのプラスミド複製開始因子と相同性を示したが、そのうち RepE と97%の相同性を示し RepE の突然変異体であると思われるプラスミド R27 の Protein E を除き、RepE 蛋白質と30%前後のホモロジーが認められたプラスミド複製開始因子をアミノ酸配列の類似性に従って整列させた (Fig. 13)。これら複製開始蛋白質の間には、全アミノ酸配列にわたって良く保存されたアミノ酸残基が多数見られ、蛋白質全体の構造としては近縁関係にあることが示唆された。先に述べたように RepE で DNA 結合ドメインとして知られるヘリックス-ターン-ヘリックス

ス・モチーフ (63-82残基および221-242残基の2箇所) および、ダイマー形成ドメインとして知られるロイシン-ジッパー・モチーフ (21-55残基) との相同性が指摘されていたが、これらを含め既知の機能ドメインとのホモロジーは見つからなかった。

つぎに、複数の二次構造予測法の結果からコンセンサスを取るジョイント法 (Schulz *et al.*, 1974) により RepE 蛋白質の二次構造予測を行った。Fig. 14 に示したように、RepE のN末端領域 (1-89残基) は α ヘリックスに比較的富むが、それ以外は α ヘリックス、 β ストランド、コイル構造の入り交じった構造を取っていると予測された。多くの DNA 結合蛋白質は、DNA のメジャーグループに α ヘリックスが入り込む形で塩基を認識することが知られている (Suzuki *et al.*, 1996 の総説参照)。しかし、RepE において DNA 結合に関与しているとみられるC末端領域 (168-242残基) には、 α ヘリックスを形成していると予想されるまとまった残基は 224-229 残基のみで、 α ヘリックスによる DNA 認識が RepE においても当てはまるのかどうかは分からないままである。

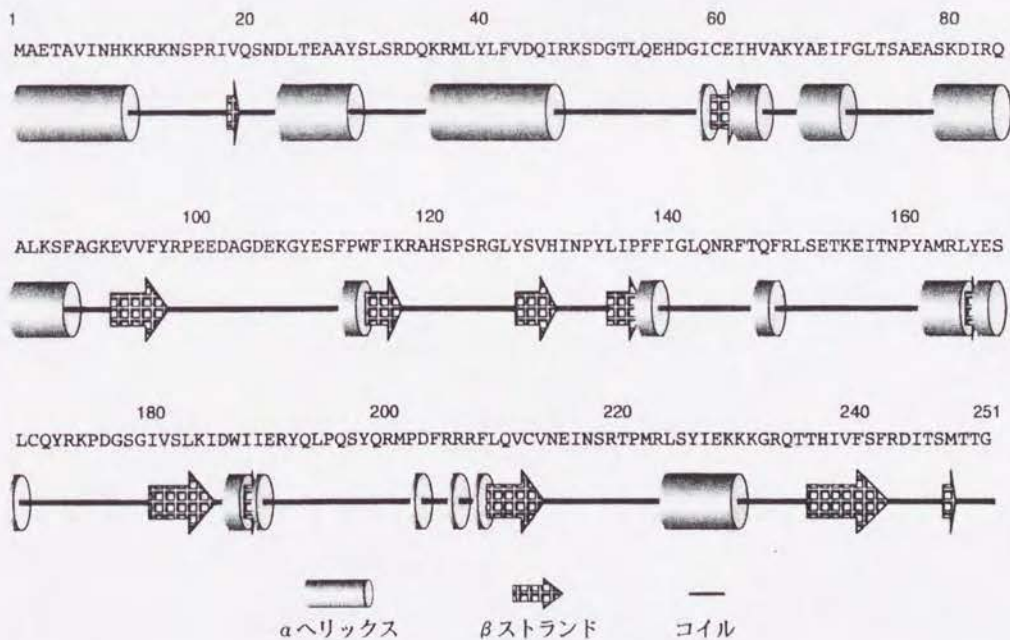


Fig. 14 RepE 蛋白質の二次構造予測。ジョイント法 (Schulz *et al.*, 1974) によって得られた二次構造予測の結果を RepE のアミノ酸配列の下に示した。

蛋白質の構造解析の結果、一次構造で相同性が認めれなくても立体構造では高い類似性を持つ例が知られてきている (Reizer *et al.*, 1993)。そこで、蛋白質の立体構造データベースに対して未知蛋白質の一次構造を重ね合わせ、適合する物がないか検索する 3D-1D 法 (Bowie *et al.*, 1990) を RepE 蛋白質で行った。しかし、RepE 蛋白質と適合する立体構造を持つ蛋白質は見つからず、現時点では RepE 蛋白質の高次構造予測は難しいことが分かった。

§

mini-F プラスミド複製の物理化学的アプローチによる解析

遺伝学、生化学的アプローチ以外にも物理化学的側面から mini-F プラスミドの複製調節機構の解明を試みた。

京都大学大学院理学研究科化学専攻生物構造化学講座の三木邦夫教授のグループとの共同研究で、X線結晶学に

よる RepE 蛋白質の立体構造決定を試みた。結晶化には高濃度の RepE 蛋白質を用意する必要があるが、野生型の RepE 蛋白質は凝集しやすく、十分な濃度まで濃縮することが出来なかった。そこで、蛋白質の凝集が起こりにくく、ダイマー形成ができないためオリジンへの結合効率が約500倍上昇している変異体 RepE54 を用いて結晶化を試みた。精製にはヒスチジン・タグ付きの RepE54 (His₆-RepE54) を用い Ni²⁺-NTA カラムによって精製した (詳しくは材料と方法に記載)。His₆-RepE54 は最大 50 mg/ml まで濃縮が可能であり、蛋白質の単独結晶およびオリジンのイテロン配列を含むオリゴマー-DNA との共結晶の両方を試みた。前者では現在の所 X線回折実験可能な結晶は出来ていないが、オリゴマー DNA との共結晶は良好なものが得られ (Fig. 15)、X線を照射したところ分解能3.0 Å以上の回折が得られた。現在、多重同型置換法での結晶構造解析を行うために、この共結晶に重原子化合物をソーキングさせた誘導体結晶の調製が試みられている。



Fig. 15 His₆-RepE54 と オリゴマー DNA (イテロン) との共結晶。結晶の一辺は約 0.1 mm。写真提供は、京都大学化学専攻生物構造化学講座三木教授グループ。

また、京都大学総合人間学部生物・地球環境論講座の竹安邦夫教授のグループとの共同研究では、原子間力顕微鏡 (AFM, atomic force microscope) を用いた複製開始構造体の観察を試みている。原子間力顕微鏡はマイカプレートに広げたサンプルに対し極小のチップをタップしていき、高分子の立体構造の凹凸像を直接得る方法である (Engel, 1991 参照)。mini-F プラスミドの複製オリジン領域を含む DNA と RepE 蛋白質との複合体を直接観察し、複製初期段階の様子を解析しようと現在試みている。

考察

RepE の DNA ベンディング活性

幾つかのレプリコンで、複製開始蛋白質の結合によるオリジン領域のベンディングが報告されており、その結果起こるオリジン領域の高次構造変化が DNA 二重鎖の開裂の原因になると考えられている (総説として Kornberg & Baker, 1992)。本研究で、mini-F プラスミドにおいてもオリジン (*ori2*) のイテロンに RepE 蛋白質が結合することによって約50度のベンディングが起こることが明らかになった (Fig. 4)。*ori2* にはイテロンが直列に4つ並んでいるが (Fig. 2)、スパーサー配列の長さから4つのイテロンは DNA の異なる側面に並んでいると予想される。従って、RepE 蛋白質4分子とその周りを DNA が覆い包む単純なヌクレオソーム様の構造を取るとは考えにくい (Fig. 17c)。実際 RepE 単独ではオリジン DNA の二重鎖開裂は起こらず、大腸菌のヒストン様蛋白質である HU が同時に存在して初めてオリジンの 13mer 領域からの特異的な二重鎖開裂が起こり、さらに DnaA 蛋白質が加わって A/T に

富む領域に開裂が広がる事が分かっている (Kawasaki *et al.*, 1996)。DnaA 蛋白質1分子は1つの DnaA box に結合し約40度のベンディングを引き起こし (Schaper *et al.*, 1995)、HU 蛋白質もやはり DNA に結合しベンディングさせる働きがある (Drlica & Rouviere-Yaniv, 1987 の総説参照)。これら蛋白質がそれぞれ mini-F オリジンに結合し DNA-蛋白質複合体を作り、DNA のベンディングを含む高次構造が作られることで、オリジン DNA の二重鎖が開裂すると考えられる。この際に蛋白質間の相互作用が重要であることも予想される。

§

DNA 結合ドメイン

本研究において、RepE のC末端領域 (168-242 残基) が *ori2* の4つのイテロン (direct repeat, DR) とオペレーター (inverted repeat, IR) 両方の結合に重要であることが明らかとなった。このC末端領域がイテロンと IR に共通する 8 bp の配列 (TGTGACAA, Fig. 2 参照) を認識していることが示唆された。R6K プラスミドの π 蛋白質は、オリジンの直列配列とオペレーターである逆向き反復配列の間で共通する配列を認識することが分かっている (Germino & Bastia, 1983; McEachern *et al.*, 1985)。一方で、mini-F の場合 DR と IR の DNA 配列の全体構造は異なり、それぞれに結合する RepE のフォームも異なる：直列に並んだ DR のイテロンにはモノマーフォームが、逆向き反復配列である IR にはダイマーフォームが結合する (Ishiai *et al.*, 1994)。更に、既に述べたように *ori2* に RepE モノマーが結合した場合は DNA のベンディングが起こり (Fig. 4)、DnaA, HU 蛋白質と協調して DNA の二重鎖を開裂させる。それに対してオペレーターにダイマーが結合した場合は RNA ポリメラーゼの結合またはその機能を妨げ *repE* 遺伝子の転写を抑制する。従って 19 bp イテロンにおいてオペレーターと共通な 8 bp 以外の部分は、RepE モノマーが複製開始を行う上で特異的な機能、例えばベンディングに重

要である可能性がある。

RepE のC末端領域内にヘリックス・ターン・ヘリックス・モチーフ様の配列があると報告されているが(221-242残基、Bex *et al.*, 1986)、現在の知見からすればこの配列がヘリックス-ターン-ヘリックス構造を取っている可能性は低い(Dodd & Egan, 1990)。また、DNA 結合に欠損を示した変異体はC末端領域の特定の部位に集中することはなかった(Table 2 および Fig. 13)。コンピューター解析でもこの領域に既知のDNA 結合モチーフと類似する配列は見つからず、本研究で明らかになった RepE の168-242 残基の領域は、既知のものとは異なる性質を持つ DNA 結合ドメインである可能性のあることが示唆された。一方、C末端領域とは別の位置にヘリックス-ターン-ヘリックス・モチーフ様の配列のあることが指摘されている(63-82残基、Masson and Ray, 1988)。実際、ヘリックス-ターン-ヘリックス・モチーフ間で保存度の高いアミノ酸残基の変異(A68R)は *in vivo* におけるイニシエーター活性・リプレッサー活性を失い、また *in vitro* における DNA 結合活性が著しく低下していた(データ提示せず)。RepE のC末端領域とこの領域との間で相互作用があることによる間接的効果か、あるいは直接 DNA 結合に関与している可能性がある。本研究および Klein *et al.* (1992) の結果は、RepE の N末端領域の欠失が17から33残基に及ぶと DNA 結合活性が失われることを示した(Fig. 5 および Kline *et al.*, 1992)。この領域は RepE と他の複製開始因子間で良く保存されていると同時に(Fig. 13、RepE の18-39残基)、ロイシン-ジッパー様配列(21-55残基)にかかっている。ダイマー形成ドメイン解析の際に得られたリプレッサー活性を失った変異体のうち細胞粗抽出液を用いたゲルシフトアッセイで DNA 結合欠損変異と認められた物が、N末端領域(27-94残基)から少なくとも8つ分離されたこともこの領域が何らかの形で DNA 結合に関与することを示唆した。しかし、RepE とアミノ酸配列の相同性を示す R6K プラスミドの π 蛋白質(305残基)はN末端の1/3の領

域を DNA 結合に必要としない(Fig. 13, Germino & Bastia, 1984)。RepE のN末端領域がどのような機能を果たしているのかは、今後さらに解析を必要とする。

pSC101 プラスミドの複製開始因子 RepA 蛋白質(316残基)は mini-F プラスミドと同様、オリジン領域の直列配列にはモノマーが結合し、*repA* 遺伝子のオペレーター領域のバリンドローム配列にはダイマーが結合すると報告されている(Manen *et al.*, 1992)。また、RepA の場合C末端から89残基欠失しても DNA 結合能は失われないが、欠失が105残基に及ぶと DNA には結合できなくなることが *in vitro* の実験で分かっている(Manen *et al.*, 1992)。RepA 蛋白質におけるC末端の89および105残基欠失を Fig. 13 のアラインメントで見ると、RepE 蛋白質のC末端のそれぞれ4および20残基の欠失に相当し、本研究で明らかになったC末端の欠失変異の結果と良く一致する(Fig. 5)。R6K プラスミドの複製様式は mini-F や pSC101 とはやや異なるが(π 蛋白質の場合 RepE と異なりオリジン・オペレーター両方にダイマーで結合することが示唆されている、York *et al.*, 1993)、やはり π イニシエーター蛋白質も二つの機能を持つ： γ オリジン(直列配列)に結合した場合は複製を開始させ、オペレーター(逆向き反復配列)に結合した場合は転写のリプレッサーとして機能する。この π 蛋白質の DNA 結合ドメインは117-278残基の領域に存在するが(Germino & Bastia, 1984; Greener *et al.*, 1990)、やはり RepE 蛋白質で得られた結果とよく一致する(Fig. 13)。

ダイマー形成ドメイン解析の過程でリプレッサー活性欠損変異体のスクリーニングを行った際、細胞粗抽出液を用いたゲルシフトアッセイでオリジンとオペレーター双方への結合効率が減少し、ダイマー形成能ではなく DNA 結合能に欠損があるとみられた変異体を得られた。これらのうち少なくとも6つはC末端領域に変異が存在していた(166-230残基)。また、細胞粗抽出液を用いたゲルシフトでオペレーター結合活性が特異的に落ちているように見えたC末端の変異は5つあったが、これら変異のうち少なく

とも3つは精製蛋白質を用いて再度 DNA 結合活性を調べた場合、オリジンとオペレーター双方への結合活性が低下しており、この場合もダイマー形成でなく DNA 結合に欠損があると分かった。これらの結果は、C末端領域が DNA 結合において極めて重要な働きをしているという考えを支持した。

§

ダイマー形成ドメイン

RepE はダイマーが自己転写抑制機能を持つので、リプレッサー活性を失った変異 RepE を分離することでダイマー形成能に欠損のある変異体を得ようと試みた。リプレッサー活性を失った変異 RepE は二つの領域、中央領域(111-161残基)とC末端領域(195-208残基)に集中して分離された (Table 3 および Fig. 16)。中央領域に落ちた変異体の一つ S111P はオリジン結合効率が野生型の約500倍に上昇し、オペレーターへの結合効率は野生型の1%以下であった (Fig. 10)。また、ゲル濾過・架橋実験では S111P のモノマー分子しか検出されず、ダイマー化できなくなっていることが分かった (Fig. 11 および 12)。以前我々はシャペロン欠損株でも複製可能な変異 mini-F プラスミ

ドを分離した (Kawasaki *et al.*, 1991; Ishiai *et al.*, 1992)。その際に得られた *repE* 変異はすべて1アミノ酸置換変異で、中でも RepE54 (R118P) 変異は S111P と同様の DNA 結合活性を示し、ダイマー形成できなくなっていた (Fig. 10, 11, 12 および Ishiai *et al.*, 1994)。また、S111P 変異が mini-F プラスミドの *repE* に導入された場合、R118P と同様にシャペロン (*dnaJ*) 変異株においてもプラスミドの複製が可能となる (データ提示せず)。この事は、複製開始調節においてシャペロンが RepE ダイマーをモノマーへ変換する事の重要性を強く示唆している。実際、*in vitro* ではシャペロンによる RepE ダイマーのモノマーへの変換が観察されている (我々の未発表データ)。中央領域の他の変異体 (112-161 残基、Table 3 および Fig. 16 参照) についてはゲル濾過・架橋実験いずれも、これらの変異体がダイマーを形成する能力を十分に保持していることを示唆した (Fig. 11 および 12)。しかし、これらの変異体もダイマー形成能が欠損した変異体に期待される性質を示した。すなわちオリジンへの結合効率が上昇または野生型と同程度で、オペレーターへの結合効率が特異的に下降していた (Table 3 および Fig. 10)。特に F112S はオリジンへの結合能が約50倍上昇しているのに対し、オペレーター結合効

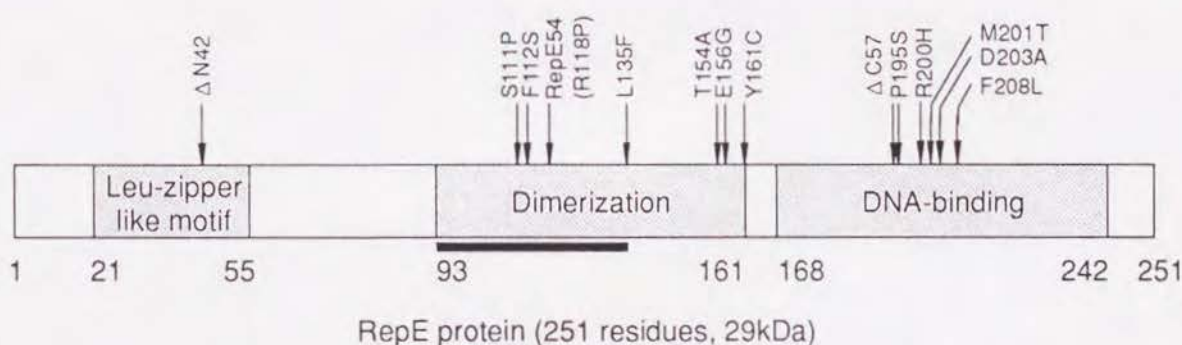


Fig. 16 RepE 蛋白質の機能構造モデル。リプレッサー活性欠損変異体 (R118 を含む) のアミノ酸置換部位と欠失変異 NΔ42 および CΔ57 の末端の位置を示した。黒いバーは以前シャペロン要求性なくなったコピー・アップ変異が分離された領域である。ロイシンジッパー様配列および、ダイマー形成と DNA 結合にかかわると考えられる領域の位置を影付きの四角で示した。

率は野生型の1/5であった。そして S111P を含めこれらの変異が分離された領域 (111-161 残基) は、上述のシャペロン要求性が無くなる変異の分離された領域 (93-135 残基) と重なる (Fig. 16)。これらシャペロン要求性のない変異体はイニシエーター活性が上昇しており (Kawasaki *et al.*, 1991; Ishiai *et al.*, 1992)、本研究で得られた変異体と同様 (実際 L135F は共通する変異である) オリジンへの結合効率が上昇すると共にオペレーターへの結合効率が減少していた (Kawasaki *et al.*, 1992; Ishiai *et al.*, 1994)。本研究では S111P と R118P しかダイマー形成能の欠損は検出できなかったが、これら二つの領域を合わせた 93-161 残基がダイマー形成に関与していることが示唆された。

Jones & Thornton (1995) は Brookhaven Protein Data Bank に登録されたホモダイマーを形成する蛋白質の立体構造を用い、そのダイマー形成部位の性質を調べた。その結果、ダイマー形成面には、疎水性の残基だけでなく極性やチャージのある残基も好まれていた。このことは、疎水性相互作用だけでなく、水素結合や塩橋もダイマー形成に重要であること示している。今回ダイマー化出来なくなるアミノ酸置換の起こったアルギニン・セリン両残基は、ともにダイマー形成面にしばしば見られる残基であり、この両残基が RepE のダイマー形成に重要な働きをしているという結果に良くあう。これら変異によってモノマー化した理由としては、プロリンへの置換によってダイマー形成ドメインに歪みが生じ、プロトマー間でダイマー形成面の相補性が失われたか、あるいはこれら残基がプロトマー間を強固に結びつける水素結合や塩橋の形成に関わっている可能性が考えられる。なお、ゲルシフト実験におけるバンド・シフトのパターンが野生型と殆ど同じであること、二つの変異体はイニシエーター活性を持っていることなどから、プロリンへの置換によって蛋白質全体への極端な構造変化がおきた可能性は低いと考えられる。ダイマー形成面は複数のペプチド・セグメントから形成されており、その中でも特定

のセグメントがダイマー形成面の大部分を占め、プロトマー間で水素結合や塩橋を多く形成している (Jones & Thornton, 1995)。RepE 蛋白質では 111 および 118 番目の残基を中心とした領域が、ダイマー形成面の中心となっていると推定される。

先に DNA 結合ドメインの項で論じたように、C 末端の変異は DNA 結合に関与しているものばかり分離された。ただし、C 末端から分離された DNA 結合能欠損変異体は、オペレーター結合 (ダイマーが結合する) において、より強く欠損の効果が出ていた (Table 2)。二量体を形成する DNA 結合蛋白質では、DNA 結合ドメインとダイマー形成ドメインが 3 次元構造上で近い位置にあることがしばしばある (典型的な例として、helix-turn-helix, basic leucine-zipper, basic helix-loop-helix ドメインを持つ蛋白質)。C 末のある部分が、三次元構造で見た場合にはダイマー形成ドメインの近傍に存在している、あるいはダイマー形成面の一部を構成している可能性は否定できない。

プラスミド R6K の π 蛋白質は N 末側半分でダイマー形成可能であることが分かっている。中でも中央領域は mini-F と同様コピー数のコントロールに関わっており、蛋白質間の相互作用に関わるモチーフ (RGD、RepE には存在しない) を中心とした領域が π ダイマーの形態調節に関わっていると考えられている (York & Filtowicz, 1993 参照)。一方、 π 蛋白質やプラスミド pPS10 のイニシエーター蛋白質 RepA をはじめとして、mini-F 類似のプラスミドの複製開始蛋白質において、N 末端付近にロイシン-ジッパー様配列がある (Giraldo *et al.*, 1989)。 π 蛋白質においては、離れたサイトに結合した π 蛋白質間の相互作用にこの領域が関与していることが分かっており (Miron & Bastia, 1992)、また pPS10 の RepA 蛋白質においては、ダイマー形成や、オリジンのイテロンへの協同的結合、宿主因子との相互作用に関与していることが報告されている (García de Viedma *et al.*, 1996)。これらのイニシエーター蛋白質と RepE はアミノ酸配列にホモロジーがあり (Fig. 13)、また

ロイシン-ジッパー様配列を欠く $\Delta N42$ の架橋効率が野生型に比べ若干落ちることから (Fig. 12 および Fig. 16), RepE の中央領域だけでなくN末端にあるロイシンジッパー様配列もダイマー形成に関わっている可能性は考えられる。N末端領域の機能については、今後も解析が必要である。

何れにせよ、本研究で明らかにしてきたデータは RepE 蛋白質の中央領域、特にアミノ酸残基111番目のセリンおよび118番目のアルギニンを中心とした領域がダイマー形成において中心的な役割を果たしており、ダイマー形成ドメインの主要な部分をなすことを強く示唆している。

§

その他の機能ドメイン

DNA の新生鎖合成には DNA ポリメラーゼに先立ち二重鎖を巻き戻していく DNA ヘリカーゼが必要であり、大腸菌では主に DnaB ヘリカーゼがこの役割を担っている (Kornberg & Baker, 1992)。大腸菌染色体およびプラスミド R6K の複製開始因子 (それぞれ DnaA および π) はこの DnaB ヘリカーゼと直接相互作用することが分かっている (Marszalek *et al.*, 1994; Ratnakar *et al.*, 1996)。また、 λ ファージの複製開始因子 O 蛋白質は P 蛋白質を介して DnaB と相互作用することが分かっている (Mallory *et al.*, 1990)。複製開始蛋白質はオリジン結合によって生じた二重鎖開裂部位に DnaB ヘリカーゼを誘導し、DNA 合成を開始させると考えられている。mini-F プラスミドの RepE に DnaB ヘリカーゼ誘導につながるドメインがあるのか興味を持たれる。なお、DnaA も *ori2* に結合すると思われ、DnaB の誘導に関わる可能性がある。また、RepE ダイマーは分子シャペロンによってモノマーに変換されるが、これらの蛋白質間の相互作用ドメインの同定も今後の課題である。すでに RepE の中央領域とシャペロンが相互作用するという予備的な結果があり、本研究で明らかに

なったダイマー形成ドメインがこれに重なることは大変興味深い。

§

構造面から見た他の複製因子との類似性

Fig. 13 は、RepE とホモロジーのあるプラスミド複製開始蛋白質のアミノ酸配列をアラインメントした物である。先に述べたように、mini-F の RepE と R6K の π の間で DNA 結合ドメインが良く一致し、またC末端領域の欠失によって DNA 結合に影響を与える範囲が pSC101 の RepA とも一致する。この他に、これら3つの蛋白質間ではコピー数上昇変異の分離される位置が一致する。コピー数上昇は複製開始因子の形態変化によると考えられ、少なくとも RepE と π ではこの中央領域はダイマー形成に関わっている。これらイニシエーター蛋白質は、類似の高次構造をとり、DNA 結合ドメインあるいはダイマー形成ドメインも共通の構造を取っている可能性が高いと考えられる。

§

構造面から見た mini-F プラスミド複製開始調節のモデル

分子量 5,000 - 3,000 Da の蛋白質の露出表面積 A_s は蛋白質の形状に関係なく分子量 M_r の関数 ($A_s = 0.111 M_r^{2/3}$) で表されるとの報告がある (Chothia, 1984 参照)。また、球状蛋白質の体積は $0.75 \text{ cm}^3/\text{g}$ で表されるとの報告もある (Freifelder, 1982 参照)。低角レーザー光散乱法で RepE の分子量を測定した際に、RepE が球状であると仮定して矛盾の無かったこと (Ishiai *et al.*, 1994)、RepE をトリプシンにより部分分解したとき僅かなアミノ酸残基の欠失しか観察されなかったこと (我々の未発表データ)、あるいは静止期の細胞中で観察される RepE の分解産物はN末端部分が17残基分解された物であったことから (Kline *et al.*,

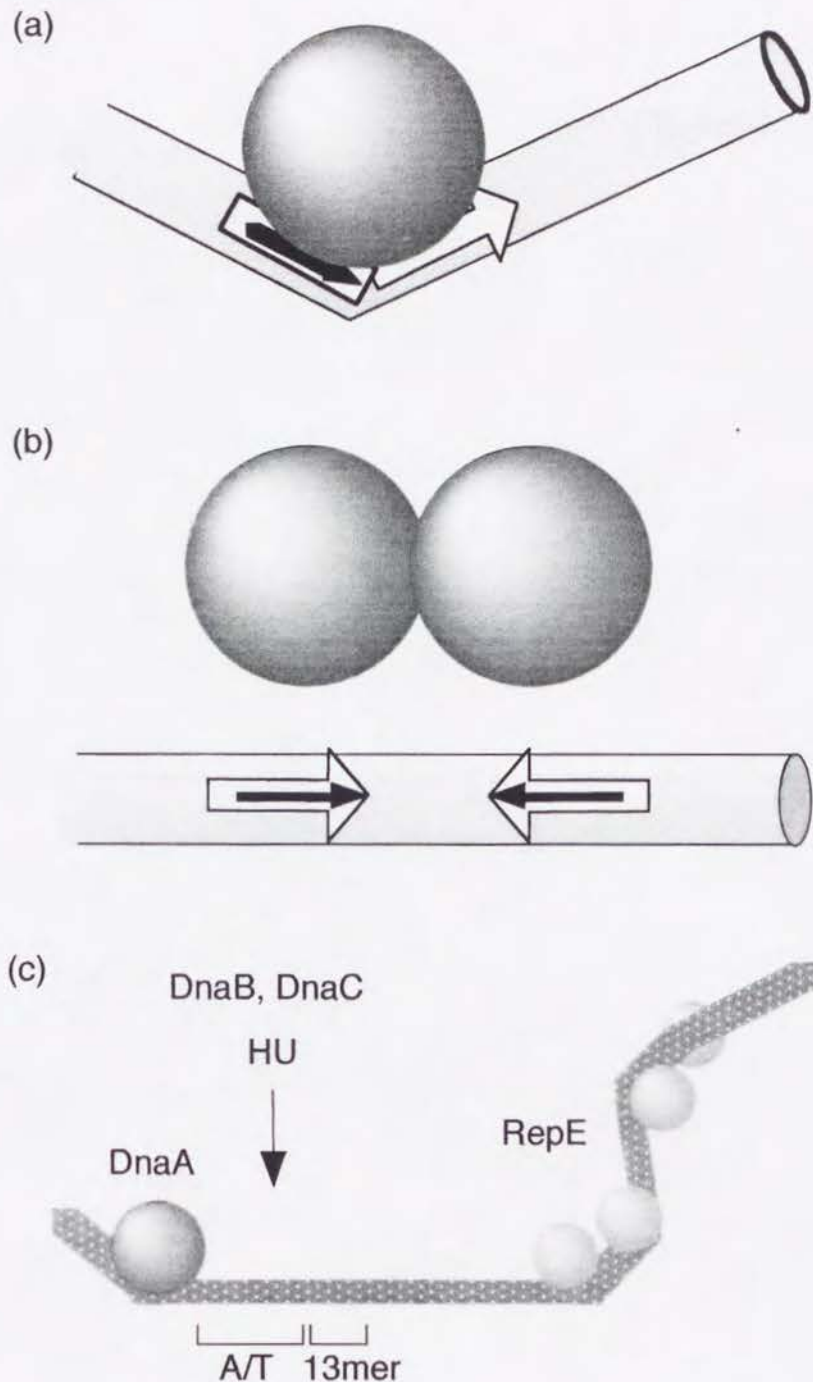


Fig. 17 構造面から見た mini-F プラスミド複製開始調節のモデル図。(a) イテロン DNA と RepE モノマーの複合体。RepE の結合によってイテロンは約50度ベンディングする。(b) RepE ダイマーとオペレーター (IR)。複製オリジン (*ori2*) の隣にある *repE* 遺伝子の転写は RepE ダイマーの IR への結合によって抑制される (Fig. 2 参照)。(c) 複製開始初期段階における *ori2* の高次構造モデル。実際は、さらに蛋白質間の相互作用、DNA の超らせんを考慮する必要があると考えられる。4つのイテロンへの RepE の結合、DnaA box への DnaA 蛋白質の結合、そして HU 蛋白質の結合が *ori2* 領域にベンディングを伴う高次構造をとらせ、13mer と A/T に富む領域 (A/T) の開裂が起こると考えられる。二重鎖開裂部位には DnaA あるいは RepE 蛋白質との相互作用によって DnaB ヘリカーゼとその調節蛋白質である DnaC の誘導が起こると予想される。(a) と (b) において、太い白抜き矢印はそれぞれイテロン及び IR を、細い黒矢印はイテロンと IR に共通する 8 bp 配列を示す。DNA の直径は 20 Å、1ピッチの長さは 34 Å、また RepE の直径は 50 Å として描画した (本文参照)。

1992)、ここで RepE を球状蛋白質であると仮定する。球体の表面積 ($4\pi r^2$) および体積 ($4/3\pi r^3$) から RepE の直径を試算するとそれぞれ58 Å および41 Å となる。これらの中間値50 Å を RepE の直径として RepE-DNA 複合体を描画したのが Fig. 17 である。

オリジンのイテロンには RepE モノマーが結合するが、その際約50度のベンディングの起こることが明らかになった。オリジン領域の DNA と RepE を用いた DNaseI フットプリント実験において 19 bp イテロンは、中心の1-5塩基がハイパー・センシティブになる以外はプロテクトされた (Masson & Ray, 1986)。このことは、RepE の結合によってイテロンの中心部分がベンディングすることを示唆している (Fig. 17a)。また、*repE* 遺伝子のオペレーターである IR には RepE ダイマーが結合する。IR の単位配列は間に 9 bp のスペーサーを挟んでいる (Fig. 2 参照)。

ここで、前述のように RepE を直径50 Å の球状蛋白質と仮定すると、RepE が認識していると予想される IR の 8 bp 配列と RepE プロトマー間との距離はおおむね妥当な関係を示す (Fig. 17b)。しかし、IR はリプレッサー結合配列と違い、単純な対称構造ではない。実際にどの様な形で結合が起こっているのか興味を持たれる。DnaA 1分子の結合によって1つの DnaA box (9 bp) は約40度ベンディングする (Schaper & Messer, 1995)。mini-F の *ori2* に RepE および DnaA 蛋白質がもたらすベンディングを加味した図が Fig. 17c である。*ori2* の2つの DnaA box は端の 1 bp が重なるほど近接している事、2つのうち1つは欠失可能な事からこの図では DnaA は1分子が結合すると仮定した。また、DNA の超らせんは考慮していない。RepE, DnaA およびヒストン様蛋白質 HU が *ori2* にもたらす高次構造変化は 13mer から A/T に富む領域の二重鎖を開裂させ、DnaB ヘリカーゼなどを誘導すると予想される。オリジンの高次構造形成・ヘリカーゼ誘導の過程で蛋白質間の相互作用は極めて重要な働きをしていると考えられるが mini-F プラスミドでは未だ明らかになっていない。これ

に関与する蛋白質ドメインの同定を含め、今後の課題である。

謝辞

和田千恵子先生、由良隆先生には大学院に入学以来親身になって研究の指導をして頂きました。また、実験準備や事務手続きをはじめ、研究生活は三原真理子さんの助力無しには成立し得ませんでした。そして永田俊夫先生、大森治夫先生には数々の有益な助言を頂きました。遺伝における五年間は生涯忘れ得ぬ思い出となるに違いありません。最後に、これまでの人生の支えとなって下さった両親と友に、心より感謝いたします。

1997年1月8日 松永藤彦

参考文献

- Armstrong, K. A., Acosta, R., Ledner, E., Machida, Y., Pancotto, M., McCormick, M., Ohtsubo, H. & Ohtsubo, E. (1984). A 37×10^3 molecular weight plasmid-encoded protein is required for replication and copy number control in the plasmid pSC101 and its temperature-sensitive derivative pHS1. *J. Mol. Biol.* 175, 331-347.
- Beckwith, J. (1963). Restoration of operon activity by suppressors. *Biochim. Biophys. Acta* 76, 162-164.
- Bex, F., Piérard, P., Desmyter, A., Drèze, P., Colet, M. & Couturier, M. (1986). Mini-F E protein: the carboxy-terminal end is essential for E gene repression and mini-F copy number control. *J. Mol. Biol.* 189, 293-303.
- Bowie, J. U., Clarke, N. D., Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1990). Identification of protein folds: matching hydrophobicity patterns of sequence sets with solvent accessibility patterns of known structures. *Proteins* 7, 257-264.
- Bramhill, D. & Kornberg, A. (1988). A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54, 915-918.
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104, 541-556.

- Cothia, C. (1984). Principles that determine the structure of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 83, 537-572.
- Da Silva-Tatley, F. M. & Steyn, L. M. (1993). Characterization of a replicon of the moderately promiscuous plasmid, pGSH500, with features of both the mini-replicon of pCU1 and the *ori-2* of F. *Mol. Microbiol.* 7, 805-823.
- DePamphilis, M. (Ed) (1996). DNA replication in eukaryotic cells. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Degnen, G. E. & Cox, C. (1974). Conditional mutator gene in *Escherichia coli*: isolation, mapping, and effector studies. *J. Bacteriol.* 117, 477-487.
- Diffley, J. F. X. (1996). Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes & Dev.* 10, 2819-2830.
- Dodd, I. B. & Egan, J. B. (1990). Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 18, 5019-5026.
- Drlica, K. & Rouviere-Yaniv, J. (1987) Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.* 51, 301-319.
- Engel, A. (1991). Biological applications of scanning probe microscopes. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20, 79-108.
- Ezaki, B., Ogura, T., Mori, H., Niki, H. & Hiraga, S. (1989). Involvement of DnaK protein in mini-F plasmid replication: temperature-sensitive *seg* mutations are located in the *dnaK* gene. *Mol. Gen. Genet.* 218, 183-189.
- Fanning, E. & Knippers, R. (1992). Structure and function of Simian Virus 40 large tumor antigen. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 55-85.
- Freifelder, D. (1982). Physical Biochemistry, 3rd ed., Freeman, San Francisco.
- García de Viedma, D., Giraldo, R., Rivas, G., Fernández-Tresguerres, M.-E. & Díaz, R. (1996). A leucine zipper motif determines different functions in DNA replication protein. *EMBO J.* 15, 925-934.
- Germino, J., & Bastia, D. (1982). Primary structure of the replication initiation protein of plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5475-5479.
- Germino, J., & Bastia, D. (1983). Interaction of the plasmid R6K-encoded replication initiator protein with its binding sites on DNA. *Cell* 34, 125-134.
- Germino, J., & Bastia, D. (1984). Rapid purification of a cloned gene product by genetic fusion and site-specific proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4692-4696.
- Gilbride, K. A., & Brunton, J. L. (1990). Identification and characterization of a new replication region in the *Neisseria gonorrhoeae* β -lactamase plasmid pFA3. *J. Bacteriol.* 172, 2439-2446.
- Giraldo, R., Nieto, C., Fernández-Tresguerres, M.-E. & Díaz, R. (1989). Bacterial zipper. *Nature (London)* 342, 866.
- Greener, A., Filutowicz, M. S., McEachern, M. J. & Helinski, D. R. (1990). N-terminal truncated forms of the bifunctional π initiation protein express negative activity on plasmid R6K replication. *Mol. Gen. Genet.* 224, 24-32.
- Hansen, E. B. & Yarmolinsky, M. B. (1986). Host participation in plasmid maintenance: dependence upon *dnaA* of replicons derived from P1 and F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4423-4427.
- Hirano, M., Shigesada, K. & Imai, M. (1987). Construction and characterization of plasmid and lambda phage vector systems for study of transcriptional control in *Escherichia coli*. *Gene* 57, 89-99.
- Ishiai, M., Wada, C., Kawasaki, Y. & Yura, T. (1992). Mini-F plasmid mutants able to replicate in *Escherichia coli* deficient in the DnaJ heat shock protein. *J. Bacteriol.* 174, 5597-5603.
- Ishiai, M., Wada, C., Kawasaki, Y. & Yura, T. (1994). Replication initiator protein RepE of mini-F plasmid: functional differentiation between monomers (initiator) and dimers (autogenous repressor). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3839-3843.
- Jacob, F., Brenner, S. & Cuzin, F. (1963). On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 329-348.
- Jones, S. & Thornton, J. M. (1995). Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 63, 31-65.
- Kawasaki, Y., Wada, C. & Yura, T. (1990). Roles of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE in mini-F plasmid replication. *Mol. Gen. Genet.* 220, 277-282.
- Kawasaki, Y., Wada, C. & Yura, T. (1991). Mini-F plasmid mutants able to replicate in the absence of σ^{32} : mutations in the *repE* coding region producing

- hyperactive initiator protein. *J. Bacteriol.* 173, 1064-1072.
- Kawasaki, Y., Wada, C. & Yura, T. (1992). Binding of RepE initiator protein to mini-F DNA origin (*ori2*): enhancing effects of *repE* mutations and DnaJ heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 267, 11520-11524.
- Kawasaki, Y. (1992). Ph.D thesis. Kyoto University, Japan.
- Kawasaki, Y., Matsunaga, F., Kano, Y., Yura, T. & Wada, C. (1992). The localized melting of mini-F initiator protein (RepE), HU and DnaA of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 253, 42-49.
- Kim, J., Zwieb, C., Wu, C & Adhya, S. (1989). Bending of DNA by gene-regulatory proteins: construction and use of a DNA bending vector. *Gene* 85, 15-23.
- Kline, B. C. (1985). A review of mini-F plasmid maintenance. *Plasmid* 14, 1-16.
- Kline, B. C., Kogoma, T., Tam, J. E. & Shields, M. S. (1986). Requirement of the *Escherichia coli* *dnaA* gene product for plasmid F maintenance. *J. Bacteriol.* 168, 440-443.
- Kline, B. C., Sandhu, G. S., Eckloff, B. W. & Aleff, R. A. (1992). Site-specific proteolysis of mini-F plasmid replication protein RepE destroys initiator function and generates an incompatibility substance. *J. Bacteriol.* 174, 3004-3010.
- Koepsel, R. R. & Khan, S. A. (1986). Static and initiator protein-enhanced bending of DNA at a replication origin. *Science* 233, 1316-1318.
- Kornberg, A. & Baker, T. (1992). DNA replication, 2nd ed. W. H. Freeman and Company, New York.
- Krishnan, B. R., Fobert, P. R., Seitzer, U. & Iyer, V. N. (1990). Mutations within the replicon of the IncN plasmid pCU1 that affect its *Escherichia coli* *polA*-independence but not its autonomous replication ability. *Gene* 91, 1-7.
- Leung, D. W., Chen, E. & Goeddel, D. V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1, 11-15.
- Levchenko, I., York, D. & Filutowicz, M. (1994). The dimerization domain of R6K plasmid replication initiator protein p revealed by analysis of a truncated protein. *Gene* 145, 65-68.
- Mallory, J. B., Alfano, C. & McMacken, R. (1990). Host virus interactions in the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. Recruitment of *Escherichia coli* DnaB helicase by lambda P replication protein. *J. Biol. Chem.* 265, 13297-13307.
- Manen, D., Upegui-Gonzalez, L.-C. & Caro, L. (1992). Monomers and dimers of the RepA protein in plasmid pSC101 replication: domains in RepA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8923-8927.
- Marszalek, J. & Kaguni, J. M. (1994). DnaA protein directs the binding of DnaB protein in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269, 4883-4890.
- Masson, L., & Ray, D. S. (1986). Mechanism of autonomous control of the *Escherichia coli* F plasmid: different complexes of the initiator / repressor protein are bound to its operator and to an F plasmid replication origin. *Nucleic Acids Res.* 14, 5693-5711.
- Masson, L. & Ray, D. S. (1988). Mechanism of autonomous control of the *Escherichia coli* F plasmid: purification and characterization of the *repE* gene product. *Nucleic Acids Res.* 16, 413-424.
- McEachern, M. J., Filutowicz, M. & Helinski, D. R. (1985). Mutations in direct repeat sequences and in a conserved sequence adjacent to the repeats result in a defective replication origin in plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1480-1484.
- Miron, A., Mukherjee, S. & Bastia, D. (1992). Activation of distant replication origins *in vivo* by DNA looping as revealed by a novel mutant form of an initiator protein defective in cooperativity at a distance. *EMBO J.* 11, 1205-1216.
- Mukherjee, S., Patel, I. & Bastia, D. (1985). Conformational change in a replication origin induced by an initiator protein. *Cell* 43, 189-197.
- Mukhopadhyay, G., Carr, K. M., Kaguni, J. M. & Chatteraj D. K. (1993). Open complex formation by the host initiator, DnaA, at the origin of P1 plasmid replication. *EMBO J.* 12, 4547-4554.
- Muraiso, K., Tokino, T., Murotsu, T. & Matsubara, K. (1987). Replication of mini-F plasmid *in vitro* promoted by purified E protein. *Mol. Gen. Genet.* 206, 519-521.
- Murakami, Y., Ohmori, H., Yura, T. & Nagata, T. (1987). Requirement of the *Escherichia coli* *dnaA* gene function for *ori-2*-dependent mini-F plasmid replication. *J. Bacteriol.*

- 169, 1724-1730.
- Murotsu, T., Matsubara, K., Sugisaki, H. & Takanami, M. (1981). Nine unique repeating sequences in a region essential for replication and incompatibility of the mini-F plasmid. *Gene* 15, 257-271.
- Nieto, C., Giraldo, R., Fernández-Tresguerres, E. & Díaz, R. (1992). Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific for *Pseudomonas* isolated from *Pseudomonas syringae* patovar *savastanoi*. *J. Mol. Biol.* 223, 415-426.
- Ogura, T., Niki, H., Kano, Y., Imamoto, F. & Hiraga, S. (1990). Maintenance of plasmids in HU and IHF mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 220, 197-203.
- Ratnakar, P. V. A. L., Mohanty, B. K., Lobert, M. & Bastia, D. (1996). The replication initiator protein π of the plasmid R6K specifically interacts with the host-encoded helicase DnaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5522-5526.
- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M. H. Jr., Bork, P. & Sander, C. (1993). Exopolyphosphate phosphatase and guanosine pentaphosphate phosphatase belong to the sugar kinase/actin/hsp 70 superfamily. *TIBS* 18, 247-248.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schaper, S. & Messer, W. (1995). Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 17622-17626.
- Schulz, G. E., Barry, C. D., Friedman, J., Chou, P. Y., Fasman, G. D., Finkelstein, A. V., Lim, V.I., Pititsyn, O.B., Kabat, E. A., Wu, T. T., Levitt, M., Robson, B. & Nagano, K. (1974). Comparison of predicted and experimentally determined secondary structure of adenyl kinase. *Nature (London)* 250, 140-142.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89.
- Suzuki, M., Suckow, J., Kisters-Woike, B., Aramaki, H. & Makino, K. (1996). Multi-helical DNA-binding domains: their structures and modes of DNA-binding. *Adv. Biophys.* 32, 31-52.
- Thompson, J. F. & Landy, A. (1988). Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to λ site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Res.* 16, 9687-9705.
- Tokino, T., Murotsu, T. & Matsubara, K. (1986). Purification and properties of the mini-F plasmid-encoded E protein needed for autonomous replication control of the plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4109-4113.
- Vogel, H. J. & Bonner, D. M. (1956). Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218, 97-106.
- Wada, C., Akiyama, Y., Ito, K. & Yura, T. (1986). Inhibition of F plasmid replication in *htpR* mutants of *Escherichia coli* deficient in sigma 32 protein. *Mol. Gen. Genet.* 203, 208-213.
- Wada, C., Imai, M. & Yura, T. (1987). Host control of plasmid replication: requirement for the σ factor σ^{32} in transcription of mini-F replication initiator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8849-8853.
- Wada, M., Kohno, K., Imamoto, F. & Kano, Y. (1988). Participation of *hup* gene product in *ori2*-dependent replication of fertility plasmid F. *Gene* 70, 393-397.
- York, D. & Filtowicz, M. (1993). Autoregulation-deficient mutant of the plasmid R6K-encoded p protein distinguishes between palindromic and nonpalindromic binding sites. *J. Biol. Chem.* 268, 21854-21861.
- Zahn, K. & Blattner, F. R. (1985). Binding and bending of the λ replication origin by the phage O protein. *EMBO J.* 4, 3605-3616.
- Zerbib, D., Jakowec, M., Prentki, P., Galas, D. J. & Chandler, M. (1987). Expression of proteins essential for IS 1 transposition: specific binding of InsA to the ends of IS1. *EMBO J.* 6, 3163-3169.