

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570003

研究課題名（和文）プライマーRNA合成活性をもつプラスミド複製開始蛋白質の機能と構造

研究課題名（英文）Function and structure of a unique plasmid DNA replication initiator protein with an activity of primer RNA synthesis

研究代表者

伊藤 建夫（ITOHI TATEO）

信州大学・理学部・特任教授

研究者番号：40051817

研究成果の概要（和文）：遺伝子DNAは全ての生物の解説書付き設計図のようなものであり、親から子へ正確なコピーが受け渡されねばならない。本研究は、このDNAのコピー作りが始まる仕組みの詳細を遺伝子クローニングにおいてDNAの運び屋として用いられるプラスミドDNAを材料として明らかにしようとするものである。コピー作りが始まる時にスイッチを入れる蛋白質とそのスイッチが働くプラスミドDNA上の場所の種々の働きを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：DNA containing a set of genes is a blue print with instructions for all the organisms and its precise copy must be transferred from a parent to an offspring. In this research we wanted to know how copying of DNA starts by using a plasmid which is often used as a DNA carrier in the gene cloning. The structure and function of a protein which serves as a switch to start copying and also those of a site on the plasmid where the switch works were studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：遺伝学、酵素、核酸、細菌、プラスミド、DNA複製、プライマーRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物にとって必須の現象であるDNA複製開始反応の初期段階は、基本的には全生物に共通である。すなわち、複製開始蛋白質の複製開始部位への結合、複製開始部位付近の二本鎖DNAの特定領域の開裂、その領域へのヘリカーゼの導入、ヘリカーゼによって拡大した一本鎖領域へのプライマーRNA合成酵素の導入、DNA合成開始のためのプライマーRNAの合成、そしてそのプライマーを利用した

DNA合成の開始である。この過程には、多くの因子（酵素など）から構成される蛋白質複合体が関与する。

(2) 複製開始蛋白質と複製開始部位DNAとの相互作用は、複製開始の最初の反応であり、複製開始頻度が調節されているステップであるにもかかわらず、完全長の複製開始蛋白質と複製開始部位DNAとの相互作用の仕組みが構造レベルで解明されたのは、原核生物へ真核生物を通じて、大腸菌の2種のプラスミ

ドの複製開始蛋白質のX線結晶構造のみであった。

(3) 我々は、本研究の材料である大腸菌の ColE2 群プラスミドの複製開始蛋白質 (Rep) が複製開始部位 (Ori) に特異的に結合するのみならず、他の系の複製開始蛋白質とは異なり、単独で DNA 二重鎖の開裂し、数残基のプライマーRNA (ColE2 プラスミドの場合には ppApGpA) を合成し、宿主の DNA 合成酵素 I (PolI) がこれを利用して DNA 合成を開始するというユニークな性質をもつことを明らかにした。

ColE2 Rep は分子量 35K と比較的小さい蛋白質であるが、上に述べたように複数の機能を示す。したがって、これらの機能に係る最小限の構造を知ることが出来ると期待された。既に、C 末端側 (約 130 アミノ酸) 領域が複製開始部位への特異的結合と DNA 二重鎖の開裂に関与することを遺伝学的、生化学的手法により明らかにした。

一方、ColE2 プラスミドの複製開始部位 (Ori) はこれまでに知られている全ての複製開始部位の中で最短 (35 bp) である。Ori には Rep の認識結合配列以外に、DNA 二重鎖の開裂に必要な配列、特異的プライマーRNA 合成に必要な配列、DNA 合成酵素 I による DNA 合成 (開始) に必要な配列が存在する。既に特異的な結合に重要な領域とその後の DNA 複製に重要な領域を明らかにした。

また、我々は、高度好熱菌を宿主とするプラスミド pTT8 について、複製に必要な領域を限定し、このプラスミドの複製開始機構が基本的に ColE2 プラスミド型であることを既に明らかにした。高度好熱菌の生産するタンパク質は熱安定性が高く、かつその水溶性がしばしば著しく高いことが知られているので、pTT8 Rep タンパク質が構造生物学的解析に適していることが期待された。

(4) さて、ColE2 Rep のプライマー RNA 合成に関与する領域は N 末端側 (約 170 アミノ酸) に存在すること以外にはほとんど何も判っていなかったが、ポリヌクレオチド合成酵素としては、格段にコンパクトであり、最小限の必須要素から構成された活性中心であると考えられた。

また、ColE2 Ori の中央付近の領域は、in vivo の測定により Rep の特異的な結合とその後の DNA 複製の両方に重要であることが明らかとなっていたが、in vitro の測定では、特異的結合に関しては確認できたものの、DNA 複製の開始反応は正常に起きるとの一見矛盾した結果が得られていた。

pTT8 Rep と ColE2 Rep のアミノ酸配列の同一性は 30% 程度であり、pTT8 Rep はその N 末端に ColE2 Rep にはない 62 アミノ酸の領域を含むため、ColE2 Rep のものに対応する機能ドメインを pTT8 Rep が保持していること

を確認する必要性があった。また、構造生物学的解析に用いるためには、pTT8 Rep の熱安定性、水溶性を評価する必要性があった。

2. 研究の目的

複製開始部位特異的結合という他の系の複製開始蛋白質と共通の活性のほかに、「複製開始部位特異的プライマーRNA 合成活性を合わせ持つ」という他の系にない特異的な性質をもつ ColE2 プラスミドの複製開始蛋白質 Rep の機能と構造を遺伝学的、生化学的に明らかにするとともに構造生物学的解析へ結び付けることが本研究の目的であった。

我々は、既に ColE2 Rep (35 K) と Ori (35 bp) の特異的認識、結合の仕組みを遺伝学的、生化学的に明らかにした。そこで、本研究ではこの系について、遺伝学的、生化学的研究を続行し、プライマーRNA 合成に関与する ColE2 Rep と Ori の構造的、機能的ドメインを明らかにすることとした。具体的には、

(1) ColE2 Rep の一アミノ酸置換変異体を作成し、それらの性質を調べる。まず、ColE2 Rep の活性中心を構成する領域、部位を推定するため、他の系のプライマーRNA 合成酵素をはじめとするポリヌクレオチド合成酵素の活性中心を構成することが知られているアミノ酸残基について一アミノ酸置換変異体を作成し、それらの性質を調べることにした。

(2) また、ColE2 Ori の一塩基置換変異体の複製効率を詳細に調べる。まず、in vivo と in vitro の複製活性の測定結果が一致しなかった Ori の中央付近の一塩基置換変異体について、測定の方法を改良して再度 in vivo の DNA 複製活性を調べることにした。

(3) 高度好熱菌を宿主とする pTT8 の Rep の構造生物学的解析の準備として、pTT8 の複製開始機構の詳細を調べる。まず、Ori についてその正確な同定、および DNA 合成開始位置とプライマーRNA の同定を行い、また pTT8 Rep について、機能ドメインの ColE2 Rep との対応性、熱安定性と水溶性の試験を行うことにした。

3. 研究の方法

(1) 種々のポリヌクレオチド合成酵素 (プライマーRNA 合成酵素を含む) は、その活性中心に基質ヌクレオチド三リン酸結合のため二価金属を保持するため DhD (2 残基のアスパラギン酸とそれらの間の疎水性アミノ酸) と hD (隣接する疎水性アミノ酸とアスパラギン酸) のモチーフをもち、多くのプライマーRNA 合成酵素は、これらに加えて sH (隣接する側鎖の比較的小さいアミノ酸とヒスチジンの並び) または hH のモチーフをもつ。

① そこで本研究では、ColE2 Rep にも同じようなモチーフが存在する可能性を検討した。立体構造が全く判っていないことを考慮し

て、全ての酸性アミノ酸残基（アスパラギン酸とグルタミン酸）に一アミノ酸置換を導入したものを取り揃えることとした。以前に作成されていなかった残基について、酸性アミノ酸相互に入れ替えたものとアラニンに置換したもの（9種）を新たに作成した。

② また、全てのヒスチジン残基についてもアラニンに置換した一アミノ酸変異を新たに導入した。

これらの変異の導入には、変異導入（化学合成）DNA断片と変異を導入する領域の両側に位置する制限酵素切断部位配列を含む配列に相当するDNA断片を用いる2段階のPCR（メガプライマー法）の産物をColE2 Rep発現供給プラスミド（ColE2 rep遺伝子をもつベクタープラスミド）の野生型のrep遺伝子の対応部分と入れ替えることにより作成した。得られた全ての一アミノ酸置換変異Repについて、変異Rep発現供給プラスミドがColE2 Oriをもちrep遺伝子をもたないプラスミドDNAを複製、維持できるかどうかを調べ、そのDNA複製活性を判定した。

(2) 通常の宿主大腸菌の培養温度（37℃）で活性を失った酸性アミノ酸残基の一アミノ酸置換Repについて、25℃、37℃および42℃の条件下でのDNA複製活性を測定し、低温条件、あるいは高温条件下での活性の有無を測定した。その結果から、その酸性アミノ酸残基が直接に二価金属の保持に関与するのか、あるいは蛋白質の機能的な構造の保持に関与するのかを判別する可能性を検討した。

(3) Oriの中央領域（12塩基対）の一塩基置換変異の内、18種がin vivoで複製活性を失っていたが、それらの内の9種ではin vitroのDNA複製開始反応が正常に起こることが判っていた。この矛盾する結果の原因としてin vivoの複製活性測定法に問題があった可能性を検討した。

元々の方法はRep発現供給プラスミドに各変異Oriを導入したものを作成し、このプラスミドのベクタープラスミド複製系からのDNA複製を阻害した時にこのプラスミドがColE2 RepとColE2変異Oriの働きにより複製されるか否かを調べ、変異Oriの複製活性の有無を判定していた。この方法ではColE2 rep遺伝子とOriの配置も元々の自立複製型ColE2プラスミドとは異なっていた。

そこで本研究では、問題の9種の変異Oriについて、元々の自立複製型プラスミドと同じ構造のプラスミド上に変異を持つものを作成することにした。変異Oriを自立複製型プラスミドが複製できない（宿主に保持されない）場合を考慮し、まずベクタープラスミド上にColE2 rep遺伝子とColE2変異Oriを自立複製型ColE2プラスミドと同じ配置になるように導入したものを作成した。次いでベクタープラスミドと変異Oriをもつ自立複製

型ColE2プラスミド切り離し、その後環状にし、形質転換により宿主大腸菌へ導入した。ベクタープラスミドは常に複製可能であるが、自立複製型ColE2プラスミドは変異Oriの複製活性の有無により複製の可否がきまることになる。

(4) pTT8プラスミドの複製開始機構の詳細な解析。

① いわゆるSELEX法で得られた結合配列を含む領域（真のOriと推定された）が、pTT8 Repと特異的結合することを確認するため精製したpTT8 Repを用いて、pTT8プラスミドの種々の領域のDNA配列の内、pTT8 Repと特異的結合するものを電気泳動移動度シフト検出により同定した。

② 精製したpTT8 Repと高度好熱菌のDNA合成酵素I(PolI)を用いてin vitroのpTT8 DNA複製（開始）系を再構成し、反応の基本的性質を調べた。この系を用いて、①で同定された配列のみがpTT8 Oriとして機能すること示すとともに、DNA合成の開始点塩基配列レベルで決め、さらにプライマーRNAの配列を決めた。

③ pTT8 RepがColE2 Repと同様の機能ドメインをもつことを確かめるために、N末端側、C末端側の種々のポリペプチドを産生する系を作り、精製したポリペプチドのOri結合活性の有無を測定した。

④ ColE2 Repと比べてpTT8 RepのN末端に余分にある約60アミノ酸からなる配列をもたないポリペプチドを産生する系を作り、精製したポリペプチドを用いてin vitroのpTT8 DNA複製を調べ、完全長のpTT8 Repを用いた場合の結果と比べ、この約60アミノ酸の配列の効果調べた。

⑤ pTT8 Repの高濃度標品の活性、種々の温度下での活性をin vitroのDNA複製系を利用して調べた。

(5) ColE2 RepおよびpTT8 Repの量産、精製および結晶化の試みと得られた結晶についてのX線結晶構造解析は、国立遺伝学研究所伊藤啓氏により実施された。

4. 研究成果

(1) ColE2 RepのプライマーRNA合成酵素活性中心を構成している可能性のある酸性アミノ酸残基とヒスチジン残基の同定。

ColE2 Repの全ての酸性アミノ酸残基とヒスチジンに一アミノ酸置換変異を導入したものを作成し、それらのDNA複製活性を調べた。

まず、D54（ColE2 Repの54番目のアミノ酸残基であるアスパラギン酸を示す、以下同様）、D56およびD122については、グルタミン酸、アラニンのいずれに置換しても活性が失われた。この結果は、これら3残基のアスパラギン酸がColE2 RepのDNA複製活性に必

須であることを示している。D54 と D56 の間のアミノ酸および D122 の直前のアミノ酸はいずれも疎水性アミノ酸であり、他のポリヌクレオチド合成酵素の活性中心にあるものと同じモチーフであることと矛盾しない。

次に、D63、D66、E112 および E152 については、アラニンに置換したものは活性を失ったが、他方の酸性アミノ酸に置換したものは活性を保持していた。この結果は、これらの4残基のアミノ酸の側鎖が酸性であることは ColE2 Rep の DNA 複製活性に重要であるが、側鎖の大きさの違いが許容されることを示している。これらの残基は、分子間あるいは分子内の他のアミノ酸残基の側鎖（塩基性アミノ酸？）などとの相互作用に関与するが、相互作用するアミノ酸の位置関係はあまり厳密である必要がないような構造形成に関与している可能性が考えられる。しかしながら、二価金属の保持に関与している可能性も完全には否定できない。

また、H83 と H85 については、アラニンに置換したものは活性が失った。この結果は、これらのヒスチジンが ColE2 Rep の DNA 複製活性に必須であることを示している。H83 と H85 直前のアミノ酸残基はそれぞれグリシンとアラニンであり、他のプライマーゼにあるモチーフと同じものであることと矛盾しない。

(2) 酸性アミノ酸残基の一アミノ酸置換変異により 37°C で DNA 複製活性を失った変異型 ColE2 Rep が温度感受性である（高温で活性を失った）可能性の検討。

変異型 ColE2 Rep の DNA 複製活性を 25°C、37°C および 42°C で再度測定した所、D63 と E152 をアラニンに置換したものでは、25°C で活性を保持しており、これらの変異が高温感受性の変異であることが判った。この結果は、これらの酸性アミノ酸残基が二価金属を保持するのに必要な酸性アミノ酸残基ではないことを示している。

他のポリヌクレオチド合成酵素に保存されているモチーフの存在の可能性が高いので、低分子量の蛋白質が活性中心の構造をどのようにして安定化しているのか興味深いところであり、構造生物学的解析が必要である。

(3) Ori の中央領域の一塩基置換変異について、*in vitro* の DNA 複製系で DNA 合成の開始が正常に起きるにもかかわらず、*in vivo* では DNA 複製が起こらない（プラスミドとして宿主大腸菌に保持されない）という性質を示したものの9種の内、8種のを自律複製型 ColE2 プラスミドに導入し、宿主大腸菌に保持されるか否かを調べた。その結果、8種全てについて、宿主に保持されなかった。残りの1種については未確認であるものの、*in vivo* の DNA 複製が出来ないことが確認された

ことになる。Ori の中央領域は、Rep の特異的な結合と DNA 複製開始に係る配列、残基の他にその後の DNA 鎖の伸長、複製の終了のいずれか（または両方）にも関与する配列、残基が存在する可能性が考えられる。DNA 複製開始開始から、伸長および終結の段階までが可能な *in vitro* DNA 複製系を用いて、これらの変異 Ori により一連の DNA 複製のどの段階が影響を受けているのかを調べる必要がある。わずか 35 bp の配列の中に多様な機能に係る配列情報が担われており、その機構がどのようなものであるのか興味もたれる。

(4) pTT8 プラスミド DNA 複製開始の詳細な解析。

① 精製した pTT8 Rep を用いて電気泳動移動度シフト法により、SELEX 法で得られた配列と相同性の高い配列 (oriV3 と命名) を含む pTT8 の DNA 断片が特異的に pTT8 Rep と結合し、過去の文献で Ori であろうと推定されていた二つの配列 (oriV1 と oriV2) のいずれも pTT8 Rep と結合しないことが示され、oriV3 が真の Ori 機能もつ配列である可能性が高まった。

② 精製 pTT8 Rep と高度好熱菌の DNA 合成酵素を用いて *in vitro* の DNA 複製開始系の再構成に成功した。この系では、oriV3 のみが複製開始部位として機能し、ColE2 Rep と同様に反応に ADP を要求するので、プライマーは ADP から始まると考えられる。反応の至適温度は高く 50°C 前後である。この系で最初に合成される DNA 断片の 5' 末端から pTT8 DNA 上の特定の制限酵素切断部位までの距離から oriV3 内の特定の位置から DNA 合成が始まることが示された。この最初に合成される DNA 断片を種々の RNA を分解、除去する方法で処理することにより、この系のプライマー RNA の配列が AGGG であることが示された。また、精製 pTT8 Rep は単独で ADP と GTP を基質として短い RNA を合成し、その配列が ppApGpGpG であることも示された。

③ pTT8 Rep の N 末端側ポリペプチド、C 末端側のポリペプチドの種々の長さのものを産生する系を作成し、これらを精製し、電気泳動移動度シフト法により pTT8 Ori への結合活性を調べたところ、C 末端側に Ori 結合能があり、特に C 末端近くに特異的認識結合に関与する領域があることが判った。アミノ酸配列の比較から推定されたように pTT8 Rep は ColE2 Rep と同じような機能ドメイン構造をもつことが示唆された。

④ ColE2 Rep と比べて pTT8 Rep の N 末端に余分にある約 60 アミノ酸からなる配列をもたないポリペプチドを産生する系を作り、精製したポリペプチドを用いて *in vitro* の pTT8 DNA 複製を調べ、完全長の pTT8 Rep を用いた場合の結果と比べたところ、完全長の Rep と同一の反応が起こることが判った。こ

の結果からも pTT8 Rep は ColE2 Rep と同じような機能ドメイン構造をもつことが支持された。

⑤ ColE2 Rep は高濃度になると不溶性の凝集体を形成し失活するため、構造生物学的解析に必要な結晶化が困難であると考えられる。そこで高濃度で保存された pTT8 Rep の活性を調べたところ、2.5 mg/ml で保存されたものと 0.5 mg/ml で保存されたものは同じ比活性を示した。したがって、pTT8 Rep は少なくとも 2.5 mg/ml では凝集体を形成して失活することはなく、その水溶性は ColE2 Rep より高いと結論された。RNA 合成反応を種々の温度で行ったところ、70°C 近くまでは温度上昇に伴い反応も上昇した。DNA 合成の至適温度が 50°C 前後であることと合わせて、pTT8 Rep の熱安定性も相当に高いと結論された。

ColE2 Rep に代えてこのグループの Rep の構造生物学的解析を pTT8 Rep を用いて行うことも十分に可能であると期待される。

以上、(1) から (4) までの成果については、一部のデータの再確認を行いつつ、論文発表を準備中である。

(5) 最近、国立遺伝学研究所の伊藤啓氏は ColE2 Rep の C 末端側ポリペプチドと ColE2 Ori の配列を含む短い DNA 断片との共結晶の X 線結晶構造解析に成功し、遺伝学的、生化学的解析から推定されていた Rep の Ori への特異的結合とプライマー-RNA 合成の鋳型配列の一本鎖化の仕組みが明らかにされた。論文発表準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 高橋誠弥、伊藤建夫、ColE2 プラスミド複製開始機構の解析、日本分子生物学会、2012 年 12 月 14 日、福岡
- ② 伊藤啓、伊藤建夫、他 2 名、ColE2 プラスミド複製開始因子の DNA 結合領域と複製開始点との複合体の結晶構造解析、日本分子生物学会、2012 年 12 月 13 日、福岡
- ③ Hiroshi Itou, Tateo Itoh, 他 2 名、Structure analysis of the DNA-binding domain of ColE2-Rep protein in complex with the replication origin、Meeting of the Asian Crystallographic Association, 2012 年 12 月 05 日、Adelaide, Australia
- ④ 高橋誠弥、伊藤建夫、ColE2 プラスミド複製開始機構の解析、日本遺伝学会、2012 年 09 月 26 日、福岡
- ⑤ Tateo Itoh, Structural and functional organization of the replication

initiation protein, Rep, of plasmid ColE2-P9, International Plasmid Biology Conference, 2012 年 9 月 12 日、Santander, Spain

- ⑥ 伊藤啓、伊藤建夫、他 2 名、複製開始因子 ColE2-Rep による ori 認識機構の構造生物学的研究、日本結晶学会年会、2011 年 11 月 24 日、札幌
- ⑦ 根岸武彦、伊藤建夫、ColE2 プラスミド複製開始タンパク質の機能ドメインの解析、日本分子生物学会、2010 年 12 月 8 日、神戸

[図書] (計 1 件)

- ① 伊藤建夫、他多数、岩波書店、岩波生物学辞典 (第 5 版)、2012、11,500 項目中 98 項目 (核酸関連) の校閲、改訂

[その他]

高橋 誠弥 (信州大学・理学部・生物科学科 4 年次学生、本研究の協力者)、ColE2 プラスミド複製開始機構の解析、第 2 回リサーチフェスタ (文部科学省委託事業「理数学生応援プロジェクト」採択大学交流企画)、2012 年 8 月 31 日、つくば国際会議場：本研究の概要についてポスターで紹介した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 建夫 (ITOH TATEO)
信州大学・理学部・特任教授
研究者番号：40051817

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

伊藤 啓 (ITOU HIROSHI)
国立遺伝学研究所・構造生物学センター・助教
研究者番号：10390626
矢倉 勝 (YAGURA MASARU)
国立遺伝学研究所・細菌遺伝学部門・研究員
研究者番号：00455205
根岸 武彦 (NEGISHI TAKEHIKO)
信州大学・工学系研究科・大学院学生
学生 (2010 年度)

研究者番号：なし
高橋 誠弥 (TAKAHASHI SEIYA)
信州大学・理学部・学部学生 (2010
年度→2012年度)
研究者番号：なし