

接合伝達の分子機構：TraI helicase-endonuclease の役割

福田 博 政

①

博士論文

接合伝達の分子機構：TraI helicase-endonuclease の役割

(Molecular Mechanism of DNA Transfer promoted by Sex Factor
plasmid R100: Roles of the TraI endonuclease/helicase)

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻

平成4年度博士課程進学

氏名 福田博政

指導教官名 大坪栄一

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成4年度博士課程進学

氏名 福田博政

指導教官名 大坪栄一

論文題目 接合伝達の分子機構: TraI helicase-endonucleaseの役割

(Molecular Mechanism of DNA Transfer promoted by Sex Factor plasmid R100:
Roles of the TraI endonuclease/helicase)

序

細菌における有性生殖に相当する接合伝達は、いわゆるF型プラスミドと呼ばれる一連の性決定因子の一つであるFやR100などのDNAが、これを持つ雄の細菌から持たない雌の細菌へと移動する現象であり、このときDNA複製を伴い、最終的には供与菌、受容菌双方ともこのプラスミドを保持することになる。これらのプラスミドは、ある頻度で染色体に組み込まれ、その際、染色体DNAが伝達されることになり、結果として受容菌内で遺伝子の組換え体が生じる。この接合伝達による組換えは、1946年に Lederberg と Tatum によって初めて大腸菌において報告されて以来細菌の遺伝学的解析に用いられ、そこからオペロン説、レプリコンモデルなどが生まれるなど、今日の分子遺伝学の発展のきっかけを作った。

R100は、Fとともにそのtra遺伝子の解析が最も進んでいる伝達性プラスミドであり、R100上には20以上のtra遺伝子が約34キロ塩基対に及ぶ領域に遺伝子群をなして存在することが明らかにされている。tra遺伝子はその機能によって、性纖毛の形成、接合対の安定化、表面排斥、tra遺伝子の発現制御、DNAの移動、の5つに分類することができる。このうちDNAの移動に関わるものとしてはtraM、traY、traD、traIがあり、また、シスエレメントとしてDNA伝達開始点(oriT)及びその周辺領域(oriT領域)がDNAの移動に必須である。DNAの移動はプラスミド特異的なエンドヌクレアーゼがoriTにDNA鎖及び部位特異的にニックを導入することにより開始されると考えられているが、これまでに遺伝学的研究から traI と traY の二つの遺伝子産物がこのニックング反応に必須なことが示

され、エンドヌクレアーゼを構成することが示唆されてきた。最近、我々の研究室の稲本らは、精製した TraY タンパク質と TraI タンパク質を過剰生産した菌体の細胞破砕液を用いた cell-free system により、oriT 領域を運ぶプラスミドに DNA 鎖及び部位特異的にニッキングが起こることを示した。

本研究は、プラスミド R100 の TraI タンパク質を精製し、purified system でのニッキング反応の詳細な解析を行うことを最初の目的とし、それを足がかりに DNA 伝達の分子機構を解明することを最終目標として行ったものである。

結果と考察

1. TraI タンパク質の精製と、purified system でのニッキング反応の解析

R100 の TraI タンパク質を SDS- ポリアクリルアミドゲル上でのバンドを指標に三種のカラム・クロマトグラフィーにより 99% の純度にまで精製した。traI 遺伝子の塩基配列から予想される TraI タンパク質のアミノ酸配列中には DNA ヘリカーゼのモチーフ配列が存在することから TraI がヘリカーゼであることが予想されていたが、実際にこの精製標品は ATP および Mg^{2+} 依存性 DNA ヘリカーゼ活性を有することが示された。さらに Mg^{2+} 存在下で、TraI タンパク質は単独で oriT を運ぶプラスミドにニックを導入するような DNA 鎖及び部位特異的エンドヌクレアーゼ活性を持ち、ニッキング反応の産物として、ニックの 5' 末端と TraI タンパク質が共有結合した複合体が形成されることを示した。また、TraI タンパク質によるニッキング反応が、TraY タンパク質及び宿主タンパク質 integration host factor (IHF) により促進されることを明らかにした。TraY タンパク質及び IHF は oriT 領域内に特異的に結合することがすでに我々の研究室で明らかにされているので、実際の *in vivo* 反応では、これらの三種のタンパク質が oriT 付近に結合して複合体を形成することにより、効率よくニックを入れているのではないかと想像された。

2. TraI エンドヌクレアーゼ・ヘリカーゼの大量精製とその物理化学的及び生化学的性質の解析

TraI タンパク質をそのエンドヌクレアーゼ活性を指標に新たに 4 種のカラム・クロマトグラフィーにより精製し、完全に homogeneous な標品を大量に得た。精製した標品の N 末の数アミノ酸残基を決定したところ、塩基配列から予想された traI 遺伝子の ORF の開始コドンからのアミノ酸配列と一致したことから、TraI の N 末は化学修飾もプロセッシングも受けていないことがわかった。精製した TraI はゲルろ過によりストークス半径が 63 Å、沈降係数が 6.7 S と決定され、これらの値から、分子量が 186,000 のロッド状の分子であることが分かった。ところが、低塩濃度下では沈降係数が 8.9 S にシフトすることから TraI の二量体化が示唆された。そこで、ケミカルクロソリンキングによる解析を行うことによって、TraI が実際に一量体と二量体との間で平衡状態で存在すること、塩濃度が低いほど二量体化が進むことが示された。ニッキング及び二本鎖解離反応は低塩濃度下で効率よく起こったことから、TraI ニッケース・ヘリカーゼの活性型は二量体であると考えられた。また化学量論的解析からも TraI ヘリカーゼの活性型は二

量体であることが支持された。基質として、超らせん DNA の代わりに制限酵素で切断した線状 DNA、または Topoisomerase I 処理した relaxed circular DNA を用いた場合、全くニックングが起きないか、その効率が著しく低下したことなどから、TraI のニックングには DNA の超らせん構造が必要なが示された。欠失変異を導入した基質を用いた実験から、TraI によるニックングに必要な領域がニック部位を含む 54 bp に限定された。

3. TraI タンパク質の一本鎖 DNA 特異的エンドヌクレアーゼ活性及び再結合活性と DNA 伝達の終結

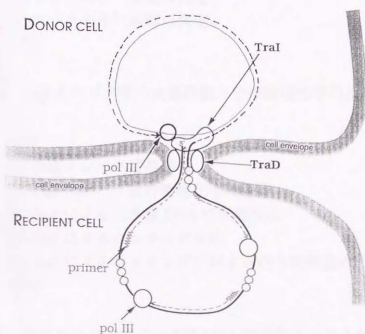
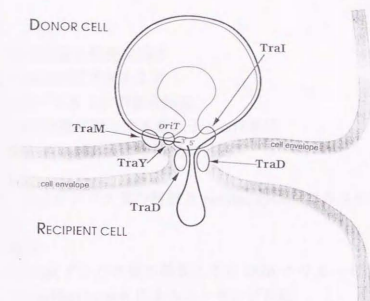
TraI タンパク質の新たな活性として、一本鎖 DNA を二本鎖 DNA のニックングの場合と同一の位置で切断する一本鎖 DNA 特異的エンドヌクレアーゼ活性及びその切断位置で再結合させる活性を見いだした。一本鎖切断で生じた産物は、二本鎖の場合と同様、切断部位の 5' 端に TraI タンパク質が共有結合したものであり、再結合反応により取り除かれた。一本鎖切断に必要な TraI の認識領域を、切断部位を含む領域に置換変異を導入したものを基質として用いた実験によって、切断部位を含む約 14 nt の配列であることを明らかにしたが、この領域は、置換変異を導入した超らせんプラスミド DNA を基質とした実験で得られた二本鎖 DNA のニックングに必要な部分とほぼ一致することが分かった。また、DNase I footprinting の実験から TraI タンパク質は一本鎖 DNA 上のこの部分に特異的に結合することが示された。一方、超らせん二本鎖 DNA を用いた KMnO₄ フットプリンティングの解析から、TraI が切断部位周辺を局所的に解離させること、また TraI の認識領域を部分的に一本鎖にしたものを基質とした場合、効率良く切断したことから、TraI によるニックングが、二本鎖 DNA を局所的に解離し、生じた一本鎖 DNA を本質的に認識し、切断すると考えられた。本研究で見いだした TraI の一本鎖 DNA の切断と再結合活性は、DNA 伝達の開始反応に与っているばかりではなく、供与菌体内でプラスミドのローリングサークル型複製が一周したところで再び生じる一本鎖 DNA 上の *oriT* を切断し、生じた 3' 端と既に切断されていた元の DNA の 5' 端とを TraI がつなぎ換えることによってプラスミド一単位を正確に作り出す活性であり、DNA 伝達の終結に関与していると考えられた。

DNA 伝達モデル

F 型プラスミドの DNA 伝達に関して本研究における結果及びこれまでに得られている知見から、我々は、現在次のようなモデル（図参照）を考えている。(1) DNA 伝達は TraI のエンドヌクレアーゼ活性により *oriT* にニックが入ることにより開始する。このニックング反応は TraY タンパク質と IHF により促進される。(2) TraI の DNA ヘリカーゼ活性によりニックの位置から二本鎖 DNA は巻き戻されて一本鎖 DNA が生じる。(3) 接合の際、一本鎖の 5' 側から受容菌へ伝達されることが示されているが、ニックングで生じた 5' 末端は TraI タンパク質と共有結合していること、F 型プラスミドの伝達では DNA 以外にタンパク質の受容菌への移動はないことから、TraI タンパク質は供与菌内に残り、従っておそらく 5' 端に近い一本鎖 DNA がループ状で受容菌へ移行するのではないかと想像される。(4) 一本鎖伝達と同時に供与菌側ではニックの 3' 末端を

プライマーとしたローリングサークル型の複製が始まり、受容菌側では伝達されたプラスミド上に存在する *ssi* 部位におけるプライミングが起こり、ラギング鎖型の複製が行なわれる。(5) ローリングサークルが一周したところで、TraI は transfer strand 中の再び現われる *oriT* のところで切断し、生じる 3' 端とすでにTraIと結合した状態で存在する 5' 末端とつなぎ換えが起こり、正確な一単位のプラスミドDNAが作り出され、DNAの伝達が終結する。

DNA伝達に関して、DNAヘリカーゼ以外にDNA移動の駆動力となる“モータータンパク質”の候補がないことから、これがDNA移動の駆動力となって一本鎖DNAを受容菌に押し込むと想像されているが、これに関しては全くわかっていない。現在、DNA伝達に必要な遺伝子 *traD* の産物である TraD タンパク質の精製を進めているが、TraD タンパク質は TraI カラムにトラップされることから、TraD タンパク質と TraI タンパク質は会合して複合体を形成することが示唆される。また、TraD は ATPase 活性を有することが示され、このTraDタンパク質がDNA移動の駆動力となる可能性もある。さらに、TraD は膜タンパク質であり、一本鎖DNAと親和性があることが示唆されていることから、TraD はDNA伝達の通り孔を形成すると考えられる。伝達される一本鎖DNAの 5' 端に結合しているTraI はTraDと会合することによって膜に固定されて一本鎖DNAを受容菌へと押し込んでいるのではないかと想像される。



目次

第一章 序論	1
1. 接合伝達と性決定因子	1
2. R100とF型プラスミド	2
3. F型プラスミドの接合伝達	3
4. DNA伝達に関与する遺伝子と <i>oriT</i> 領域	6
5. TraI タンパク質と本研究の目的	8
第二章 TraI タンパク質の精製と purified system でのニッキング反応の解析	10
1. 序	11
2. 結果	12
(1) TraI タンパク質の精製とその DNA ヘリカーゼ活性	12
(2) purified system によるニッキング反応	13
(3) ニックの 3' 末端の同定	14
(4) ニックの 5' 末端の同定	16
3. 考察	17
第三章 TraI タンパク質の大量精製とその物理化学的及び生化学的性質の解析	19
1. 序	20
2. 結果	20
(1) TraI タンパク質の精製	20
(2) TraI タンパク質の物理化学的性質	22
(3) TraI による二本鎖 DNA の解離反応	23
(4) TraI によるニッキング反応	24
(5) TraI によるニッキングに対する超らせん構造の必要性和認識部位	25
3. 考察	26
第四章 TraI タンパク質の一本鎖 DNA 特異的エンドヌクレアーゼ活性及び再結合活性と DNA 伝達の終結	29
1. 序	31
2. 結果	32
(1) TraI による一本鎖 DNA の切断	32
(2) 一本鎖切断に必要な領域	35
(3) 超らせん DNA 上のニッキングに必要な領域と TraI による局所的解離	38
(4) 一本鎖 DNA の再結合	40
3. 考察	42
(1) TraI による二本鎖 DNA のニッキングと単鎖 DNA 切断反応	42
(2) 再結合反応と DNA 伝達	44

第五章 総括	46
1. Tral タンパク質によるニッキングの反応機作	46
2. DNA 伝達の分子機構	47
第六章 材料と方法	50
参考文献	61
謝辞	64

第一章 序論

1. 接合伝達と性決定因子

接合伝達の一つの細菌細胞から他の細菌細胞へと DNA が移動する現象であり、1946年に Lederberg と Tatum (1946 a,b) によって発見された。この現象には性決定因子もしくは伝達性プラスミドと呼ばれる大型のプラスミドが関与しており、DNA の移動は常に性決定因子を持つ供与菌から持たない受容菌への一方向に限られる。このとき DNA 複製を伴い、最終的には供与菌、受容菌双方ともこのプラスミドを保持することになる。これらのプラスミドは、ある頻度で染色体に組み込まれ、その際、染色体 DNA が伝達されることになり、結果として受容菌内で遺伝子の組換え体が生じる。この接合伝達による組換えは、1946年に Lederberg と Tatum によって初めて大腸菌において報告されて以来細菌の遺伝学的解析に用いられ、そこからオペロン説、レプリコンモデルなどが生まれるなど、今日の分子遺伝学の発展のきっかけを作った。

性決定因子は接合伝達に必要な遺伝子のほとんどをその上に保持している。接合伝達において DNA は一本鎖の形で供与菌から受容菌へと移動し、双方の細胞内で DNA の相補鎖が合成されるために、接合伝達後は供与菌、受容菌ともに性決定因子を持つことになり、その結果 DNA を受け取った受容菌は今度は供与菌としての機能を持つこととなる。DNA の移動は常に性決定因子上の決まった点、伝達開始点 (origin of transfer: *oriT*) から始まり、二本鎖 DNA の特定の鎖が受容菌へと移動する。接合伝達に際しては細胞同士が直接に接触し、接合対を作ることが必要だが、それは細胞質の融合を伴わず、例外的なものを除き供与

菌、受容菌相互間のタンパク質の移動は無い。また、多くの場合接合伝達に先立って性纖毛と呼ばれる特殊な細胞外器官が形成されることが必要である（総説：Willetts and Wilkins, 1984; Ippen-Ihler and Minkley, 1986; Willetts and Skurray, 1987; Ippen-Ihler and Skurray, 1993; Frost et al., 1994）。

1946年にLederbergとTatumによって最初に発見された性決定因子はF因子(fertility factor)と呼ばれ、その後しばらくはF因子が唯一の伝達性プラスミドであると考えられていた。しかし、その後腸内細菌の薬剤耐性を伝搬するR100、R1、R6といった伝達性プラスミドが発見され(Nakaya et al., 1960; Meynell and datta, 1966; Lebek, 1963)、またCol Bなどのコリシンプラスミドも伝達性プラスミドであることが明らかにされた(Ozeki and Howarth, 1961)。現在までに数多くの伝達性プラスミドが発見されており(Appendix B in Bukhari et al., 1977)、接合伝達は細菌に広くみられる現象であると考えられている。これらの性決定因子はIncF, IncI, IncN, IncPなどのいくつかの不和合性グループ(incompatibility group: Inc)に分類され、それぞれ同じグループ内のもの同士は類似した接合伝達の機構を持つことが知られている（総説：Willetts and Skurray, 1980; Frost et al., 1994）。

2. R100 と F 型プラスミド

1960年に日本において腸内細菌の薬剤耐性が細菌間で伝搬されることが発見され(Akiba et al., 1960)、そのすぐ後にこれが接合伝達によることが示された(Mitsuhashi et al., 1960; Watanabe et al., 1960, 1961)。この薬剤耐性を伝達するプラスミドとして *Shigella flexneri* から初めて分離されたのが R100 である(Nakaya et al., 1966)。図 1-1 に示したように R100 は水銀イオン、スルホンア

ミド、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンのそれぞれに対する耐性遺伝子と接合伝達に関する遺伝子群(*tra* 遺伝子群)、プラスミドの安定保持に関与する遺伝子などを持つ 89.3kb の性決定因子である (Sugino and Hirota, 1962)。R100は、F 因子とともに遺伝的解析が最も進んでいる性決定因子で、R1、R6やColB などとともに、その接合伝達の機構がF 因子とよく似たいわゆるF 型プラスミドと呼ばれるプラスミドの一つである。F 型プラスミドの特徴としては、(1) F 因子の性繊毛と構造的にも機能的にもよく似た性繊毛を形成する、(2) F 因子の *tra* 遺伝子と高い相同性を示す *tra* 遺伝子をもつ (Sharp et al., 1973)、(3) F 因子の多くの *tra* 遺伝子を相補できる (Ohtsubo et al., 1970; Ohtsubo, 1970; Achtman et al., 1978) などが挙げられる。

3. F 型プラスミドの接合伝達

様々な伝達性プラスミドの中でもF型プラスミドは接合伝達の機構や接合伝達に関与する遺伝子群 (*tra* 遺伝子群) の解析が特に進んでおり、F に関してはその *tra* 領域の塩基配列が1990年までに全て決定されている。R100 の接合伝達遺伝子群 (*tra* 遺伝子群) は R100 自身の 40% にも及ぶ約 34 塩基対 (kb) にわたり 20 を越える *tra* 遺伝子を含んでおり、2 つの独立の遺伝子 *traM*、*traJ* と *traY-I* と名付けられた 1 つの巨大オペロンからなると考えられている (図 1-1)

(総説: Willetts and Wilkins, 1984)。各 *tra* 遺伝子の機能は (1) 性繊毛の形成、(2) 接合対の安定化、(3) 表面排斥、(4) *tra* 遺伝子の発現制御、(5) DNA 移動の 5 つに大きく分類できる (図 1-1 / 総説: Ippen-Ihler and Minkley, 1986)。

性繊毛 (sex pili) は接合伝達において供与菌の表面に形成され受容菌を認識する役割を持つ細胞外器官であり、その形成には *traY-I* オペロンの大半の遺伝

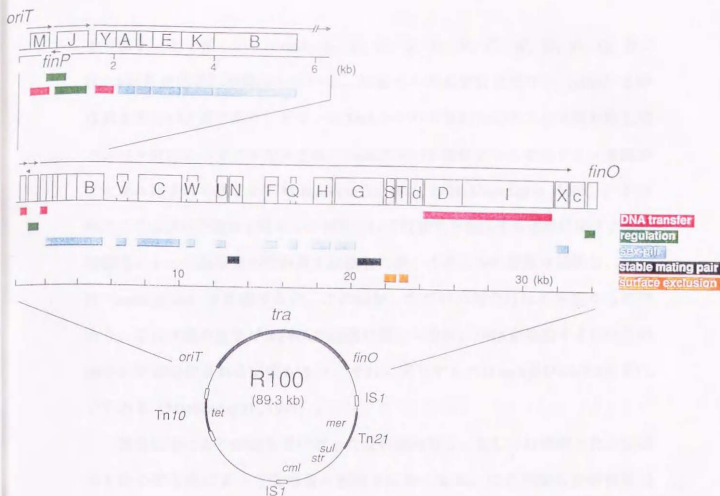


図1-1. R100 及び *tra* 遺伝子群の構造と遺伝子地図

図の下部に環状のR100の構造が示してある (Taylor et al., 1977; Dempsey and McIntire, 1983)。白抜きの四角は挿入配列 *IS1* 及び *IS10* を表す。*oriV*、*oriT* はそれぞれ複製開始点及び DNA 伝達開始点である。*finO* は接合伝達の抑制遺伝子である。*mer*、*sfr*、*str*、*cml*、*tet* はそれぞれ水銀イオン、スルホンアミド、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンに対する薬剤耐性遺伝子を示す。

R100 の外側に示した *tra* 遺伝子領域 (*tra*) を図の上部に拡大して示してある。水平な矢印は転写単位を、数字はキロ塩基対 (kbp) 単位の座標を表す。E、S とあるのはそれぞれ制限酵素 *EcoRI* 及び *SalI* による認識部位である。矢印の下に各 *tra* 遺伝子を示してある。*oriT* は DNA の伝達開始点、*finP*、*finO* はともに接合伝達の抑制遺伝子である。*finP* の左の白抜きの三角印は *finP* の位置及び転写方向を表している。M、J、Y、A、L 等の大文字のアルファベットはそれぞれ *traM*、*traJ*、*traY*、*traA*、*traL* 等の *tra* 遺伝子を表している。d、c、X はそれぞれ機能不明のオープンリーディングフレーム *orfD*、*orfC*、*traX* を表す (Yoshioka et al., 1990)。四角で囲んだ *tra* 遺伝子は R100 で存在が確認されているものである。R100 と相同性の高い *tra* 遺伝子群を持つ F 因子に存在することから R100 にも存在すると推定される *tra* 遺伝子は上下の線ではさんで表した (総説: Willetts and Wilkins, 1984; Yoshioka, 1989, Ph. D. thesis; Yoshioka, Fujita and Ohtsubo, unpublished data)。各 *tra* 遺伝子の機能は色分けして示してある。青は性纖毛の形成、茶色は DNA の伝達、橙色は *tra* 遺伝子の発現調節、緑は表面排斥、そして赤が接合対の安定化に関わる遺伝子である。*traG* 遺伝子産物は N 末端が性纖毛の形成に、C 末端が接合対の安定化に働く (Willetts and Skurray, 1980)。

子（図1-1で青く示した *traA*、*L*、*E*、*K*、*B*、*P*、*V*、*C*、*W*、*U*、*F*、*Q*、*H*、*G*、*X*の各遺伝子）が関与している。性纖毛の構成要素はピリン（pilin）と呼ばれるタンパク質であり、ピリンはTraAタンパク質がTraQタンパク質や宿主のタンパク質によってプロセスされ、TraXタンパク質によってそのアミノ末端がアセチル化されて生じる（Maneewannakul et al., 1993; Moore et al., 1993）。その他のここに挙げた遺伝子はピリンが重合して性纖毛を形成する過程に関与する。性纖毛によって供与菌が受容菌を認識した後、その二つの細胞は接触し、接合対（mating pair）を形成するが、この接触しただけの接合対は不安定なものであり、この状態のままではDNAの伝達が起こらない。DNAが移動するにはこの接合対が安定化される必要があり、それに関与するのは *traN* 及び *traG* の各遺伝子である（Manning et al., 1981）。

接合伝達によりDNAを受け取った受容菌は同じ、もしくは類縁の性決定因子を持つ供与菌によって受容菌と認識されなくなる。この現象は表面排斥（surface exclusion）と呼ばれ、*traS* 遺伝子及び *traT* 遺伝子に関与している（Jalajakumari et al., 1987）。*traT* はまた細菌が血清に対して示す抵抗性に関与しており、FやR100を保持する細菌は血清に対して抵抗性を示す（Pramoonjago et al., 1992）。TraTタンパク質は大腸菌外膜の外部に突出部を持つリポタンパク質であり、その突出部に目的のエピトープを構成するアミノ酸配列を挿入して、大腸菌の菌体表面に発現させる手段としても用いられる（Sukupolvi and O'Connor, 1990）。

発現制御に関する遺伝子としては *traJ*、*finO*、*finP* が知られている。TraJタンパク質は *traY-I* オペロンの転写を正に制御する働きを持つ（Willets and Skurray, 1987; Inamoto et al., 1988; Ippen-Ihler and Skurray, 1993; Taki, Abo and Ohtubo, unpublished result）。*finO* 及び *finP* は協同して *traJ* の発現を抑制することで *traY-I* オペロンの転写を抑える（Finnegan and Willets, 1973; Yoshioka et al., 1987）。*finP* は *traJ* mRNA にハイブリダイズするアンチセンスRNAであり、TraJ

の翻訳を抑制する (Koraimann et al., 1991; van Biesen et al., 1993)。FinOタンパク質は*finPRNA*の安定化、*finPRNA*と*traJRNA*のハイブリダイゼーションに関与する (Lee et al, 1992)。 *traY-I* オペロンの転写の調節にはTraJの他にもArcやCpxといった宿主側のタンパク質も関与していることが知られている (Silverman, 1985)。特にArcは環境中の酸素分圧を感知して呼吸系遺伝子の状況に応じた発現を引き起こすいわゆる二成分伝達系 (two component system) を構成しており (Iuchi and Lin, 1992)、接合伝達が好氣的条件下でのみ行なわれることとの関連が指摘されている。

traM、*traY*、*traD*、*traI*の各遺伝子はDNAの移動に直接関与すると考えられている。これらについては後述する。

R100などのF型プラスミドの接合伝達の過程は以下のように進行すると考えられている (図1-2/総説: Willetts and Skurray, 1980)。まず、性決定因子を持つ供与菌の表面に性繊毛が形成される。この性繊毛が受容菌を認識し (図1-2、I)、接合対を形成 (図1-2、II)、接合対は*traN*及び*traG*の働きで安定化される (図1-2、III)。あらかじめ*traY*、*traI*両遺伝子産物の働きでDNA伝達開始点 (*origin of transfer: oriT*) の特定のDNA鎖に入っていたニックより、ニックの5'側を先頭にして、*tra*遺伝子群が最後に受容菌に移る方向で一本鎖DNAが受容菌へと移動する (図1-2、IV) (Ohki and Tomizawa, 1968; Vapnek and Rupp, 1970, 1971)。移動するのは常に決まった一方のDNA鎖であり、その相補鎖は供与菌内にとどまる。DNA鎖の移動が開始すると同時に供与菌、受容菌双方において宿主菌のDNA複製系を用いて一本鎖DNAの相補鎖の合成が行われ、全DNAが移動した後に受容菌内においてDNA鎖が再環状化され、DNAの移動が完了する (図1-2、IV~V)。その後供与菌と受容菌が解離して接合伝達は完了する (図1-2、V)。性決定因子を受け取り、その*tra*遺伝子が発現すると受容菌は接合伝達能を獲得して供与菌としての性質を持つよう

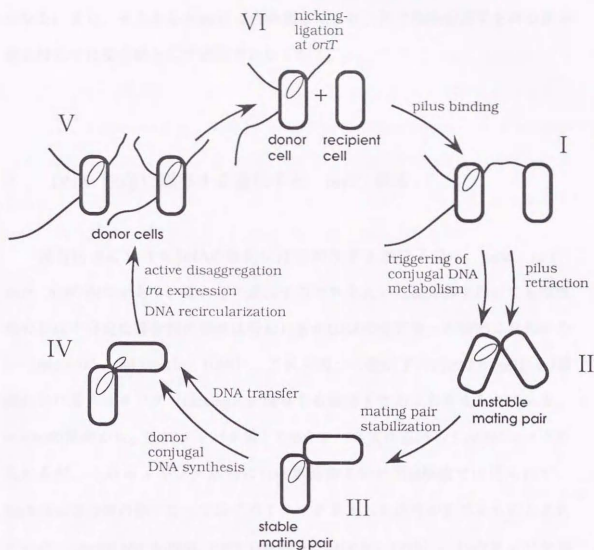


図1-2. 接合伝達過程の模式図

供与菌の細胞表面には性纖毛が形成され、これによって受容菌が認識される。*oriT*部位には受容菌が認識される以前からニックが入ったり再結合されたりしている（I及びVI）。性纖毛によって受容菌が認識されると受容菌が供与菌に引き寄せられ、接合対が形成される（II）。接合対は *traN*、*traG* 両遺伝子の働きで安定化され（III）、一本鎖 DNA が受容菌へと移動する（IV）。DNA の移動が開始すると同時に供与菌内、受容菌内双方で相補鎖 DNA の複製が始まり、DNA の移動が完了すると DNA 鎖が環状化する（IV～V）。接合対の解離によって接合伝達は完了し、受容菌内で *tra* 遺伝子が発現して供与菌となる（V）（総説：Willems and Skurray, 1980 より転載）。

になる。また、そうなると *traS*、*traT* の働きにより、同じ性決定因子を持つ供与菌に対しては受容菌として認識されなくなる。

4. DNA 伝達に関与する遺伝子と *oriT* 領域

接合伝達におけるDNAの移動に直接関与する遺伝子には、*traM*、*traY*、*traD*、*traI* の四つがあり、これらの遺伝子のどれを欠いた変異体を用いても性繊維の形成や安定な接合対の形成は行われるがDNAの受容菌への移動は行われない (Ippen-Ihler and Minkley, 1986)。これら四つの遺伝子の内 *traY* と *traI* は *oriT* 領域におけるニッキング (nicking) に関与する遺伝子であると考えられている。*in vivo* の解析から、TraYタンパク質とTraIタンパク質は協同して *oriT* にニックを入れるが、このニッキング活性はTraY単独あるいはTraI単独では見られず、TraY-TraI複合体の形になってはじめてニックを入れる活性が生じるものとされていた (Everett and Willetts, 1980; Traxler and Minkley, 1988)。TraYタンパク質は *oriT* 領域に特異的に結合し、その結合部位 *sbyA* は図1-3に示すようにプラスミド特異的な領域に存在する (Inamoto and Ohtsubo, 1990; Nelson et al., 1993)。これは *traY* 遺伝子がプラスミド特異的であることとよく一致している。TraYは自身のプロモーターに隣接する部位 *sbyB*、*C* にも結合し (Inamoto and Ohtsubo, 1990; Nelson et al., 1993)、*traY-I* オペロンの転写を抑制している (Taki, Abo and Ohtsubo, unpublished result)。

図1-3に示すように *oriT* 部位とTraYの結合部位 *sbyA* の間には大腸菌の宿主タンパク質である IHF (Integration Host Factor) の結合部位 *ihfA* が存在する (Inamoto et al., 1991)。IHF 欠損株では R100 や F の接合伝達の効率が低下することから (Dempsey, 1987; Gamaz et al., 1987)、IHF は TraI タンパク質と TraY

タンパク質によるニッキング反応に関与していることが示唆される。

traM、*traY*、*traI*各遺伝子がプラスミド特異性を示すのに対し、*traD*遺伝子はプラスミド特異性が低く、類縁の性決定因子の*traD*遺伝子の変異を相補することが出来る (Ohtsubo et al., 1970; Willetts, 1971; Alfaro and Willetts, 1972; Yoshioka et al., 1990)。TraDタンパク質は内膜に存在し、DNAに対して非特異的に結合することが報告されており (Panicker and Minkley, 1992)、加えて*traD*が欠いてもDNAの受容菌への移動以外の全ての接合伝達の過程が行われることなどからTraDタンパク質は一本鎖DNAが供与菌から受容菌へと移る際に通り抜ける伝達口を形成するのではないかと考えられている (総説: Ippen-Ihler and Minkley, 1986)。

*traM*遺伝子産物はDNA移動の開始に働いていると考えられており、その機能はプラスミド特異性を示すことが判明している。また、その機能については、安定な接合対の形成が刺激となってTraMタンパク質になんらかの変化が生じ、そのことがDNA伝達のひきがねを引く (triggering) という説 (Everett and Willetts, 1980) や、この領域の転写産物が*finP*転写産物や*tra*転写産物と共に*finO*-*finP*調節系に関与するのではないかという説 (Dempsey, 1989) などが出されているがどれも確証はない。しかし、TraMタンパク質は内膜に存在し (Achtman et al., 1979)、*oriT* 領域に特異的に結合する (Abo et al., 1991; 図 1-3 参照) ことから、*oriT* 領域を膜近傍に保持する役割をするという考えが有力と思われる。

図 1-3 に示すように、*oriT* 領域には TraI タンパク質の認識部位 (本論文第 3 章、第 4 章) 及び IHF、TraY、TraM タンパク質の各結合部位が並んで存在する。これらの結合部位に欠失及び塩基置換変異を導入した*oriT* 領域を持つプラスミドの伝達効率を、*tra* 遺伝子のトランス供給下、測定したところ、高い効率で伝達が起るためには各部位が必要であることが示された (Abo, 1994. Ph.D. thesis; Gao et al., 1994)。したがって、TraI、IHF、TraY、TraM の各

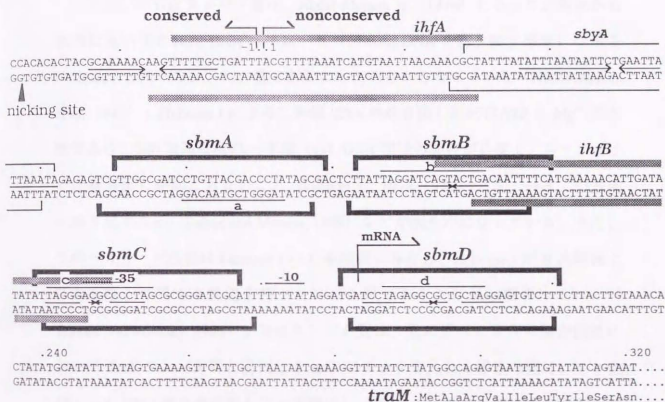


図1-3. R100のoriT領域

左図はR100のoriT付近の塩基配列を示したものである。ニックの入る位置は上向きの矢印で示した。conservedと示した領域はF型プラスミド間でよく保存されている領域を、nonconservedと示した領域はそうでない領域を示している。traMはtraM遺伝子のコーディングフレームの開始点を表す。また、sbmA, sbmB, sbmC, sbmDはTraMタンパク質の、sbyAはTraYタンパク質の、ihfA, ihfBは宿主タンパク質IHFの特異的結合部位をそれぞれ示す。

タンパク質が $oriT$ 領域内の結合部位に結合し協同的に機能することにより、DNAの伝達が起こると考えられる。

5. TraI タンパク質と本研究の目的

F 因子の TraI タンパク質は、Abdel-Monem ら (1976) によって大腸菌から最初に見出された DNA ヘリカーゼ (二本鎖 DNA を巻き戻す酵素) である Helicase I と同一のタンパク質であることが明らかとなっている (Abdel-Monem et al., 1983)。Helicase I による二本鎖 DNA の巻き戻し反応は ATP と Mg^{++} 要求性であり、200 塩基程度の一本鎖 (ss) DNA 部分の存在が必要で、ニックだけでは巻き戻しが起こらないこと (kuhn et al., 1978, 1979)、 $5' \rightarrow 3'$ の方向に巻き戻すこと (Lahue and Matson, 1988) などが明らかになっている。また、このヘリカーゼ活性は Helicase I の C 末端側に存在し、Helicase I が N 末端側と C 末端側とで異なる機能を持つタンパク質であることが示唆されている (Traxler and Minkley, 1988)。TraI タンパク質は、先に述べたように接合伝達において TraY タンパク質と協同して $oriT$ にニックを入れる働きの他に、ニックが入った DNA 鎖を巻き戻して一本鎖にし、DNA の移動を可能にする働きを持つものと考えられる。

DNA 塩基配列の解析から、R100 の TraI タンパク質は分子量約 192 kDa で、C 末端側に ATP 要求性 DNA ヘリカーゼの共通アミノ酸配列が存在することが示されており、また実際に *traI* 遺伝子産物は SDS-PAGE では見かけの分子量 180 kDa のタンパク質であることが同定されている (Yoshioka et al., 1990)。

最近当研究室において、精製した TraY タンパク質と TraI タンパク質を過剰生産した菌体の細胞破砕液を用いた cell-free system により、 $oriT$ 領域を運ぶ

プラスミドに DNA 鎖及び部位特異的にニッキングが起こることが示された (Inamoto et al., 1991)。

本研究は、プラスミド R100 の TraI タンパク質を精製し、purified system でのニッキング反応の詳細な解析を行うことを最初の目的とし、それを足がかりに DNA 伝達の分子機構を解明することを最終目標として行ったものである。

第二章 TraI タンパク質の精製と purified system で のニッキング反応の解析

要約

R100 の TraI タンパク質を SDS- ポリアクリルアミドゲル上でのバンドを指標に三種のカラム・クロマトグラフィーにより 99% の純度までに精製した。*traI* 遺伝子の塩基配列から予想される TraI タンパク質のアミノ酸配列中には DNA ヘリカーゼのモチーフ配列が存在することから TraI がヘリカーゼであることが予想されていたが、実際にこの精製標品は ATP および Mg^{2+} 依存性 DNA ヘリカーゼ活性を有することが示された。さらに Mg^{2+} 存在下で、TraI タンパク質は単独で *oriT* を運ぶプラスミドにニックを導入するような DNA 鎖及び部位特異的エンドヌクレアーゼ活性を持ち、ニッキング反応の産物として、ニックの 5' 末端と TraI タンパク質が共有結合した複合体が形成されることを示した。また、TraI タンパク質によるニッキング反応が、TraY タンパク質及び宿主タンパク質 integration host factor (IHF) により促進されることを明らかにした。TraY タンパク質及び IHF は *oriT* 領域内に特異的に結合することがすでに我々の研究室で明らかにされているので、実際の *in vivo* 反応では、これらの三種のタンパク質が *oriT* 付近に結合して複合体を形成することにより、効率よくニックを入れているのではないかと想像された。

1. 序

FやR100などの性決定因子とよばれるプラスミドにより起こる細菌の接合伝達時のDNAの移動は、プラスミド特異的なエンドヌクレアーゼにより、そのプラスミド上のDNA伝達開始点 (*oriT*) にDNA鎖及び部位特異的にニックが導入されることにより始まると考えられている。これまでの遺伝学的研究から、このニックング反応には *traY* *traI* の二つの遺伝子産物が必須であり、エンドヌクレアーゼを構成することが示唆されていた (Everett and Willets, 1980; Traxler and Minkley, 1988)。最近我々の研究室において、R100の*oriT*にDNA鎖及び部位特異的にニックを導入する無細胞系が構築された (Inamoto *et al.*, 1991)。この再構成系では、精製したTraYタンパク質とTraIタンパク質を増量生産した菌体の細胞破砕液に依存してニックング反応が起こった。この結果は上述の遺伝学的研究から得られていた示唆を支持するものであった。この無細胞系における反応産物はニックの5'末端にタンパク質が共有結合した複合体分子であった。ニックは、接合伝達の際に受容菌へ移動すると考えられていた方のDNA鎖上において、TraYタンパク質の結合部位 (*sbyA*) の59 bp上流の位置に生じていた。また、このニックング反応は Mg^{2+} 要求性であったが、dNTPs、NTPsやアミノ酸などの他の低分子物質は必要ではなかった。

IHF (integration host factor) 欠損株においては、R100やFの伝達頻度が低下することが知られていた (Dempsey, 1987; Gamaz *et al.*, 1987)。R100の*oriT*領域内に同定されているIHFの二つの結合部位のうちの一つは、ニック部位とTraYタンパク質の結合部位 (*sbyA*) の間に位置する (Inamoto *et al.*, 1990; Dempsey and Fee, 1990)。以上の事実から、IHFがDNAに結合することにより引き起こされるDNAの湾曲が、TraYとTraIにより構成されるエンドヌクレアーゼによるニックング反応に必要であることが示唆されていた (Inamoto *et al.*, 1991)。実際、IHF欠損株から調製したTraIタンパク質を含む菌体

破碎液を用いた無細胞系においては、ニッキング反応はほとんど起こらなかった (Inamoto and Ohsubo, 未発表データ)。

この章では、*oriT* 特異的エンドヌクレアーゼ分子の性質を調べるために、精製した TraI、TraY、IHF の各タンパク質を用いた purified system により、効率よく R100 の *oriT* にニックが導入されることを示す。この purified system でも、cell-free system で示されていたのと同様にニックの 5' 末端にタンパク質が結合した反応産物が生じた。最近、F プラスミドの TraI タンパク質についても同様の結果が報告されているが (Reygers et al., 1991; Mason and Morton, 1991)、本章においては、さらに踏み込んで、このニッキング反応は TraY と IHF 両タンパク質の存在により促進されることを示す。

2. 結果

(1) TraI タンパク質の精製とその DNA ヘリカーゼ活性

R100 の TraI タンパク質は SDS-PAGE で約 180 kDa と大腸菌全タンパク質中でとりわけ大きい分子量を示すことが Yoshioka ら (1990) 及び予備実験から確かめられているので、SDS-PAGE 上のバンドを指標にして TraI タンパク質の精製を進めた。traI 遺伝子を多コピープラスミド pUC18 にクローニングしたプラスミド pYY35-1 (Inamoto et al, 1991) を保持する大腸菌 CSR603 株を培養し、その菌体破碎抽出液を硫酸分画後、ホスホセルロースカラム P11、DNA-セルロース・カラム、ゲル濾過カラム Sephacryl S-200 を通すことにより、最終的に 98% 以上の純度の TraI タンパク質を得た (図 2-1)。この方法により湿重量 11.1g の菌体から 1.2 mg の TraI タンパク質を得ることができた。

R100 の traI 遺伝子の塩基配列から導かれるアミノ酸配列中には、F の traI 同様、DNA ヘリカーゼのコンセンサス配列が存在することから (Yoshioka et

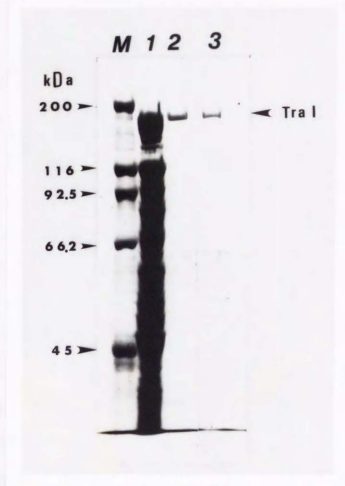


図2-1. Tra I タンパク質の電気泳動
 分子量マーカー（レーンM）、菌体の全タンパク質（レーン1）、phosphocellulose カラムでの分画後（レーン2）、Sphacryl S-200 カラムでの分画後の Tra I 標品（レーン3）を SDS-PAGE 後、クマシーブリリアントブルーにより染色した。図左に分子量マーカーの分子量を、図右に Tra I タンパク質のバンドを示す。

al., 1990; Bradshaw et al., 1990)、一本鎖環状 DNA (pUC119; 3162base) に ^{32}P で標識された一本鎖 DNA (28 nt) がアニールした部分的二重鎖 DNA 基質を作成し (図 2-2 A)、精製した R100 の TraI タンパク質標品が実際にヘリカーゼ活性を有するかどうかを調べた。基質を TraI タンパク質とともにインキュベート後、6% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動して標識された一本鎖 DNA の解離を調べたところ、TraI タンパク質、ATP、 Mg^{2+} の存在下でのみ元の一本鎖 DNA が生ずることがわかった (図 2-2 B)。この結果は、R100 の TraI タンパク質が ATP 及び Mg^{2+} 要求性ヘリカーゼ活性を有することを示している。

(2) purified system によるニッキング反応

我々の研究室で以前に構築されたニッキング反応の無細胞系をもとに、精製した TraI、TraY、IHF の 3 種のタンパク質から成る purified system でのニッキング反応の再構成系を構築した。TraY タンパク質は以前に我々の研究室で精製されたものを (Inamoto et al., 1988)、IHF については金沢大・山口博士から分与された精製標品を用いた。R100 の *oriT* 領域を含む covalently closed circular (ccc) プラスミド pSI87-XE1 を TraI、TraY、IHF の 3 種のタンパク質と共に、 Mg^{2+} 共存下でインキュベートし、反応産物を SDS 処理後、アガロース・ゲル電気泳動した。その結果、図 2-3 のレーン 2 に示すように、open circular DNA (oc) よりやや遅い泳動度を示す DNA 分子 (図中で complex と示した) が生成した。このやや遅い泳動度を示す DNA 分子のバンドの位置は、反応後プロテアーゼ K 処理することにより、oc のバンドの位置にシフトした (図 2-3 A、レーン 3)。この複合体 DNA 分子は、フェノール/クロロホルム抽出することにより消失したが、あらかじめプロテイナーゼ K 処理を行った場合は oc に相当するバンドとして現れた (図 2-3 A、レーン 4、5)。以上より、このやや

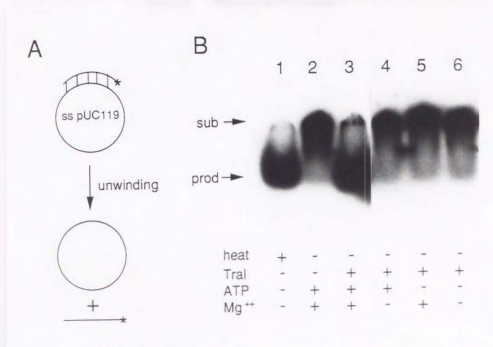


図2-2. Tral タンパク質のヘリカーゼ活性

(A) は反応に用いた部分的二重鎖 DNA 基質とその巻き戻し反応によって生じる産物を表す。*印は 26 nt のオリゴヌクレオチドの 3' 側の部分が ³²P で取り込みラベルされていることを表す。ヘリカーゼ活性は ³²P で標識された一本鎖オリゴヌクレオチドの解離によりモニターできる。(B) Tral のヘリカーゼ活性を示す 6 % ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動。反応は ATP (1.8 mM) と MgCl₂ (4m M) の存在下あるいは非存在下で行った。基質 (sub) と一本鎖オリゴヌクレオチド産物 (prod) の位置を図左に示した。

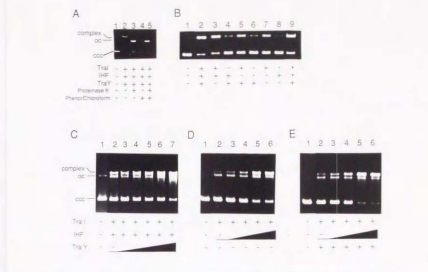


図2-3. ニッキング反応産物の0.7%アガロース・ゲル電気泳動

(A) TraI, TraY, IHF 存在下での反応産物。標準的条件の下、in vitro で反応させた DNA サンプルを 1 μ l の蒸留水 (レーン 1、2、4) あるいは 1 μ l のプロテアーゼ K (25 mg/ml) (レーン 3、5) とインキュベートした。レーン 4 とレーン 5 のサンプルはさらにフェノール/クロロホルム抽出を行った。(B) 各タンパク質の様々な組み合わせ存在下での反応産物。30 分間インキュベート後、RNase A 処理し、SDS を加えプロテアーゼ K 処理したものである。レーン 1 は未反応の pS187-XE1 DNA (68 ng)。他のレーンで電気泳動した DNA 量は 62 ng である。TraY、TraI、IHF 各タンパク質の濃度はそれぞれ 40、14、2.0 μ g/ml である。レーン 9 は TraY タンパク質 (40 μ g/ml) と TraI タンパク質を過剰生産させた IHF を含む lysate (80 μ g/ml protein) を用いて cell-free system で反応させた。(C) 様々な量の TraY タンパク質存在下で反応させた産物。反応は TraI タンパク質 (14 μ g/ml) と IHF (1.1 μ g/ml) 存在下で行い、プロテアーゼ K 処理は行っていない。使用した TraY タンパク質はそれぞれ 4.9 μ g/ml (レーン 3)、10 μ g/ml (レーン 4)、20 μ g/ml (レーン 5)、40 μ g/ml (レーン 6)、79 μ g/ml (レーン 7) である。(D, E) 様々な量の IHF 存在下で反応させた産物。反応産物はプロテアーゼ K 処理を行っていない。使用した TraI タンパク質は 14 μ g/ml、TraY タンパク質は D では 0 μ g/ml、E では 20 μ g/ml である。IHF の濃度は 0.54 μ g/ml (レーン 3)、1.1 μ g/ml (レーン 4)、2.2 μ g/ml (レーン 5)、4.3 μ g/ml (レーン 6) である。covalently closed circular (ccc)、open circular (oc)、及び複合体 DNA 分子の位置を図左に示した。

泳動度の遅い DNA 分子は DNA にタンパク質が、共有結合した複合体であることが示された。

この複合体は dNTP、sNTPs 及びアミノ酸非存在下でも生成し、また ATP を加えてもこの複合体の形成が促進されることはなかった (data not shown)。この結果は複合体分子の形成には、DNA、RNA 及びタンパク質合成や高エネルギー供与体が不要であることを示す。

複合体分子をプロテイナーゼ K 処理して得られる open circular 分子は TraI タンパク質単独でも生じたが、TraY、IHF の両タンパク質共存下で最も効率よく生成した (図 2-3 B)。この結果はニッキング反応には TraI タンパク質が第一義的に関与し、他の 2 つのタンパク質は反応を促進する働きを示唆する。

この示唆を裏付けるために、まず、複合体形成に及ぼす TraY タンパク質量の効果を、TraI タンパク質と IHF を加えた反応液中で調べた。図 2-3 C に示すように、複合体分子は加えた TraY タンパク質の量に依存して形成された。次に、複合体分子形成に及ぼす IHF 量の効果を TraI、TraY 両タンパク質を加えた反応液中または TraI タンパク質のみを加えた反応液中で調べた。複合体 DNA 分子は加えた IHF 量に依存して形成され、TraI だけでなく TraY も同時に加えた場合の方がより効率よく形成された (図 2-3 D、E)。

(3) ニックの 3' 末端の同定

cell-free system においては、ニッキングは下側の DNA 鎖の -33 番目と -34 番目の塩基の間でおこなうことが示されている (DNA 鎖及び塩基番号については図 2-4 参照) (Inamoto *et al.*, 1991)。purified system においても、同じ位置にニックが導入されていることを確認するため、ニックの 3' 末端を以下のようにして決定した。purified system での反応産物をプロテイナーゼ K で消化後、

制限酵素 *Nsi*I で切断した。*Nsi*I の切断部位は cell-free 系で以前に観察されたニックの位置から 273 nt 離れている (図 2-4、2-5 A 参照)。線状化したプラスミド DNA の 5' 末端を 32 P で標識後、制限酵素 *Eco*RV で切断した。*Eco*RV の切断部位は cell-free 系で以前に観察されたニックの位置から 210 nt、*Nsi*I の切断部位からは 483 nt 離れている (図 2-5 A 参照)。最終反応産物を熱変性後、シーケンシング用 4% ポリアクリルアミド・変性ゲルで泳動し、一本鎖 DNA 断片を同定すると同時に、6% または 8% シーケンシングゲルを用いての電気泳動により、生成した一本鎖 DNA 断片の正確な長さを決定した。cell-free 系においては、ニックの 5' 末端は 32 P で標識されないことから複合体分子中のタンパク質あるいはそのタンパク質がプロテイナーゼ K により消化されてできたペプチドによりマスクされていることがわかっていた (図 2-5 A)。したがって、上記の操作により複合体 DNA 分子からは 32 P で標識された一本鎖 DNA としては 273 nt の長さの断片が生じ、210 nt の断片は生成しないことが予想される。一方、反応液中でニックの入っていない DNA 分子からは 483 nt の断片が生じる。図 2-5 B (レーン 1) は、4% ポリアクリルアミド・変性ゲルで泳動したものであるが、*Tra*I、*Tra*Y、*IHF* の存在下で、273 nt と 483 nt の断片が生じていた。これらの断片の正確な長さは 6% または 8% シーケンシングゲルで電気泳動することにより確認した (data not shown)。また、この二つの DNA 断片は、cell-free 系で生じる DNA 断片とまったく同じものであった (図 2-5 B レーン 9)。*Tra*I タンパク質単独で、あるいは *Tra*Y または *IHF* との共存下で反応させたサンプルからも同様に 273 nt と 483 nt の断片が生じた (図 2-5 B レーン 2、4、6)。これらすべてのサンプルにおいて 210 nt の断片は生成されなかったことから、ニックの 5' 末端は DNA と結合したタンパク質由来のペプチドによりマスクされているという考えが支持される。一方、*Tra*I タンパク質を加えていないサンプルからは 483 nt の断片のみ生じ、273 nt の断片は生じなかった (図 2-5 B)。これらの結果から、*Tra*I タンパク質のみで正確にニックが導入され、

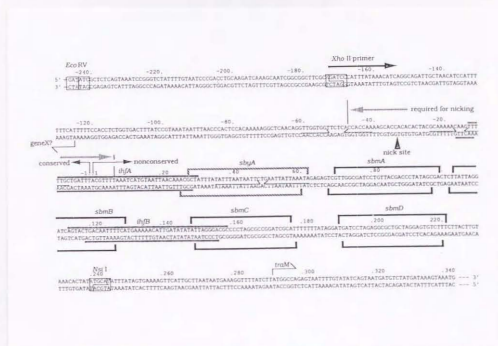


図2-4. R100の $oriT$ 領域

左図はR100の $oriT$ 付近の塩基配列を示したものである。ニックの入る位置は上向きの矢印で示した。conservedと示した領域はF型プラスミド間でよく保存されている領域を、nonconservedと示した領域はそうでない領域を示している。*traM*は*traM*遺伝子のコーディングフレームの開始点を表す。また、*sbmA*, *sbmB*, *sbmC*, *sbmD*はTraMタンパク質の、*shyA*はTraYタンパク質の、*ihfA*, *ihfB*は宿主タンパク質IHFの特異的結合部位をそれぞれ示す。破線の矢印でrequired for nickingと示された範囲は第三章で明らかとなったTraIタンパク質によるニッキングに必要な領域である。

そのニックの 3' 末端は cell-free 系で報告されたのと同じの下ストランドの -33 番目に位置していた (図 2-4 参照) (Inamoto et al., 1991)。

NsiI 末端が標識された 273 nt と 483 nt の断片はそれぞれニックの入った DNA 分子、入っていない DNA 分子を反映しているので、二つのバンドの強度を測定し、その比をとることにより、ニックング反応の効率を計算して図 2-5 B に示した。TraI タンパク質 単独の場合 (レーン 6) と比較して、TraY タンパク質があると 1.5 倍 (レーン 4)、IHF があると 4.8 倍 (レーン 2)、両者があると 5.3 倍 (レーン 1) に効率が上がったことがわかる。

以上より、以前考えられていたように TraY タンパク質と TraI タンパク質の複合体 (TraY-TraI endonuclease) が *oriT* にニックを入れる (Everett and Willetts, 1980; Traxler and Minkley, 1988; Inamoto et al., 1991) のではなく、TraI タンパク質のみで正確にニックが入ること、即ちエンドヌクレアーゼ活性は TraI タンパク質にあること、また IHF と TraY タンパク質はこのニックング反応を促進することが明らかになった。

(4) ニックの 5' 末端の同定

ニックの 5' 末端の正確な位置を決定するために、purified system において様々な条件で反応させ、プロテアーゼ K 処理した DNA サンプルを鋳型に用い、プラスミド DNA の下ストランドにハイブリダイズするような合成プライマー (XhoII primer) (図 2-4 参照) を使ってプライマー伸長反応を行った。実験の概略を図 2-6 A に示した。TraI、TraY、IHF の存在下で反応させたサンプルでは、プライマーの伸長産物の 3' 末端に対応する一本鎖 DNA のバンドが -34 の位置に現れた (図 2-6 B、レーン 1)。cell-free 系においても、これと同じ位置にバンドが現れた (図 2-6 B、レーン 8)。TraI タンパク質のみ、あるいは TraY タンパク質または IHF との共存下で反応させたサンプルからも同じバン

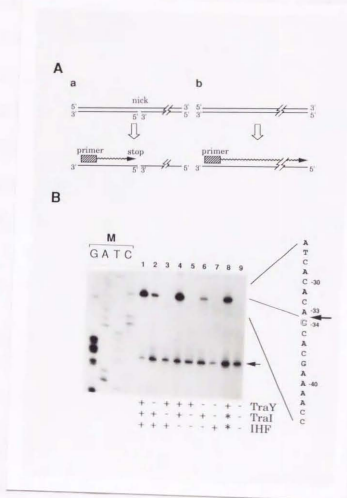


図2-6. ニックの5'末端の同定

(A) XhoII プライマーを用いたプライマー伸長反応の概略。太線は DNA を示し、斜線入り四角は 5' 末端を ^{32}P 標識したプライマーで図中の下ストランドとハイブリダイズする。太い波線は合成された DNA とその方向を示す。a はニックの入った鋳型 DNA、b はニックの入っていない鋳型 DNA を示す。

(B) プライマー伸長反応の産物を熱変性し、変性 6% ポリアクリルアミド・ゲルで電気泳動したもの。各反応に用いた DNA 量及びタンパク質量は図2-5Bと同じである。M と示したレーンはサイズ・マーカーとして用いたシーケンス・ラダーで、左から、それぞれ、G、A、T、C を表す。プライマー伸長反応産物の 3' 末端のシトシンを白抜き文字で示した。二つの矢印はそれぞれニックあるいは DNA の高次構造により DNA 合成が停止した産物を示す。

ドが現れたが、TraIを加えていないサンプルではこのバンドは現れていなかった(図2-6B)。この結果より、複合体DNA分子中のニックの5'末端は、cell-free systemと同様、下ストランドの-34の位置であることが確かめられた(図2-4参照)。

全てのサンプルに共通して115 ntの長さのバンドが出現した(図2-6B)。このバンドは、DNAポリメラーゼI[Klenow fragment]によるプライマー伸長反応が、パリンドローム配列を含む領域(図2-4中の-41~-60の位置)で一部停止することにより生じたものと考えられる。もしこの停止反応が各サンプル中で同じ割合で起こると仮定するならば、二つのバンドの強度からニックング反応のおおよその効率が算出できるはずであるが、実際に算出した結果からも、TraI、TraY、IHFの三つのタンパク質が全て存在する時に最も高い反応効率を示した。

3. 考察

この章において、精製した三種のタンパク質TraI、TraY、IHFを用いて、*oriT*にDNA鎖および部位特異的にニックを導入するようなpurified systemを構築した。TraIタンパク質単独で特異的なニックを入れるエンドヌクレアーゼ活性をもつことを示したが、それと同時にこのTraIによるニックング反応は、TraYタンパク質とIHFにより促進されることを示した。*oriT*特異的なニックの導入には、TraIタンパク質が第一義的に関与することが示唆されていたが(Inamoto et al., 1991)、ここでそれがはっきりと証明されたことになる。また、最近FプラスミドのTraIタンパク質についても、単独で*oriT*特異的にニックを導入する活性があることが報告された(Reygers et al., 1991; Matson and Morton,

1991)。

結果中で述べたように、cell-free systemと同様、purified systemでもニックの5'末端にタンパク質が共有結合した複合体分子が生成した。cell-free systemの段階でこのDNAと共有結合するタンパク質はTraYではなくTraIであることが想像されていたが、この章で示した結果から、TraIタンパク質がニックの5'末端と共有結合し複合体を形成することが明確に示された。

R100のTraYタンパク質はニック部位の近傍の*sbyA*と名付けた部位(図2-4中の+26~+62)に特異的に結合する(Inamoto and Ohtsubo, 1990)。また、図2-4にはR100上の-47~+7の領域がTraIによるニックングに必要なことが示されている(Fukuda and Ohtsubo, unpublished results)。TraIタンパク質はニック部位を含むこの領域を認識していると考えられ、様々な条件下で線状化したDNA断片を用い、ゲル・シフト法あるいはDNaseI フットプリンティング法によりDNA結合活性の検討を行ったが、TraIタンパク質の*oriT*領域への特異的結合は観察されなかった。

IHFは*in vivo*でDNA伝達に必要なことが示唆されていたが、ニックング反応に関与していることがここで示された。*oriT*領域内には二つのIHF結合部位が存在する(Inamoto et al., 1990; Dempsey and Fee, 1990)、そのうちの一つ(*ihfA*)はニック部位と*sbyA*の間に存在する。もう一つ(*ihfB*)は*traM*遺伝子のプロモーターの上流に存在する(図2-4参照)、ニックング反応には必要なかった(data not shown)。それゆえ、*oriT-ihfA-sbyA*領域にTraI、IHF、TraYが結合し、IHFの結合部分でDNAが湾曲したような(*oriT*-someとでも呼ぶべき)複合体の形成が効率のよいニックング反応には重要なのではないかと考えられる。

第三章 TraI タンパク質の大量精製とその物理化学的及び生化学的性質の解析

要約

TraI タンパク質をそのエンドヌクレアーゼ 活性を指標に新たに 4 種のカラム・クロマトグラフィーにより精製し、完全に homogeneous な標品を大量に得た。精製した標品の N 末の数アミノ酸残基を決定したところ、塩基配列から予想された *traI* 遺伝子の ORF の開始コドンからのアミノ酸配列と一致したことから、TraI の N 末は化学修飾もプロセッシングも受けていないことがわかった。精製した TraI はゲルろ過によりストークス半径が 63 Å、沈降係数が 6.7 S と決定され、これらの値から、分子量が 186,000 のロッド状の分子であることが分かった。ところが、低塩濃度下では沈降係数が 8.9 S にシフトすることから TraI の二量体化が示唆された。そこで、ケミカルクロスリンキングによる解析を行うことによって、TraI が実際に一量体と二量体との間で平衡状態で存在すること、塩濃度が低いほど二量体化が進むことが示された。ニッキング及び二本鎖解離反応は低塩濃度下で効率よく起こったことから、TraI ニッケース・ヘリカーゼの活性型は二量体であると考えられた。また化学量論的解析からも TraI ヘリカーゼの活性型は二量体であることが支持された。基質として、超らせん DNA の代わりに制限酵素で切断した線状 DNA、または Topoisomerase I 処理した relaxed circular DNA を用いた場合、全くニッキングが起きないか、その効率が著しく低下したことなどから、TraI の ニッキングには DNA の超らせん構造が必要なが示された。欠失変異を導入した基質を用いた実験から、TraI によるニッキングに必要な領域がニック部位を含む 5 4 bp に限定された。

1. 序論

接合伝達は性決定因子と呼ばれるF型プラスミド、R100やFなど、がこれを持つ細菌から持たない別の細菌へと移動する現象である（総説 Frost et al., 1994 参照）。接合伝達は、プラスミド DNA 上の伝達開始点（*oriT*）に、プラスミドがコードするニッケースである TraI タンパク質が DNA 鎖及び部位特異的にニックを導入することにより開始されると考えられる。これまでに、in vitro 及び in vivo で、F型プラスミド上の接合伝達に必須の二つの遺伝子 *traI* と *traY* の産物である TraI と TraY タンパク質の内、TraI タンパク質が *oriT* に特異的にニックを入れ、その結果ニックの 5' 末端と共有結合した複合体を形成すること、TraY と宿主タンパク質 IHF がこのニッキング反応を促進することが示された（第二章）。TraI は分子サイズ 192 kDa のタンパク質（Yoshioka et al., 1990）で、DNA ヘリカーゼ活性を有するタンパク質（Inamoto et al., 1994; Abdel-Monem, 1983）でもあり、ニックの入った方の DNA 鎖（transfer strand）を巻き戻し、受容菌に伝達されるべき一本鎖 DNA を作り出す役目も担っていると考えられている。

これまでに TraI タンパク質は、ATPase 活性を、あるいはその分子の大きさを指標に精製されたが、ここでは、プラスミド R100 がコードする TraI タンパク質をエンドヌクレアーゼ活性を指標に精製し、TraI によるニッキング反応及び二本鎖解離反応を生化学的に解析した。その結果、TraI エンドヌクレアーゼ・ヘリカーゼの活性型が二量体であること、ニッキング反応には超らせん構造をとる特定の 54 bp の領域を持つ DNA 分子が要求されることが明らかになった。

2. 結果

（1）TraI タンパク質の精製

TraI タンパク質を得るため、TraI タンパク質の過剰生産菌から TraI タンパク質を、その DNA 鎖及び部位特異的活性を指標に精製した。エンドヌクレアーゼ活性は、*oriT* を運ぶ超らせんプラスミド DNA を基質としてと TraI と反応させた後、*Bam*HI で消化し、 32 P で 5' 末端標識後、6% シークエンスゲルで泳動し、ニックングにより生じる 3' 端を持つ短い断片 (146 nt) とニックングがおこらなかった元の長い断片 (232 nt) の放射活性より算出した (図 3-1)。得られた Cell lysate では、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動から予想される TraI タンパク質が全量の 20% 以上であるにもかかわらずニックング活性は低かったが、この Cell Lysate を Phosphocellulose カラムを通して得られたサンプル (80% 以上の TraI タンパク質を含む) は、はっきりしたニックング活性を示した (表 3-1)。この結果は、Cell lysate においては何らかの物質によりニックング活性が阻害されているか、または非特異的ヌクレアーゼのコンタミによりニックング活性を正確に定量することが出来なかったことを示唆する。さらに Mono Q FPLC カラム、Superdex 200pg カラム、HiTrap Heparin カラムを通すことにより、より高い比活性 (約 6.2 倍) を持つサンプルが得られた。Phosphocellulose 画分に對し Mono Q 画分の比活性が 4.6 倍になっている、一方 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でモニターすると TraI タンパク質の相対量は 1.1 倍になっているにすぎないので、Phosphocellulose 画分にも何らかの阻害物質が存在していることが示唆される (表 3-1)。Superdex 200pg カラムの各フラクションのタンパク量とニックング活性のピークは完全に一致した (図 3-2 A)。他の Phosphocellulose カラム、Mono Q カラムのフラクションでも Superdex 200pg カラムの各フラクションで得られたと同様の結果が得られ、さらに各カラムの各フラクションのヘリカーゼ活性についても同様の結果が得られた (data not shown)。これらの結果は、得られた標品が homogeneous な TraI タンパク質であることを示す。HiTrap Heparin カラムクロマトグラフィー

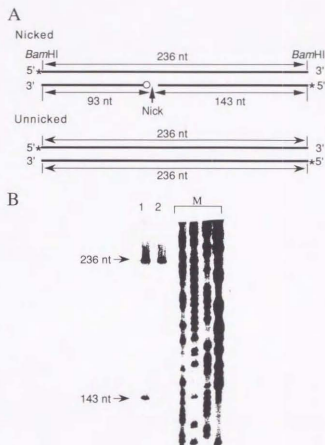


図3-1. TraI タンパク質による特異的ニッキング反応

(A) ニックの入った、あるいは入っていない pHF11 DNA の *Bam*HI 断片の模式図。*印は 32 P 標識した DNA (太線) の 5' 末端を示す。pHF11 DNA を "材料と方法" (第六章) 中に述べた通りに TraI タンパク質と反応させ、*Bam*HI で切り出した断片を示す。ニックの 5' 末端には TraI タンパク質 (白丸) が結合していて 32 P 標識されない。(B) *Bam*HI 断片を熱変性後、6% ポリアクリルアミド・シークエンス・ゲルで電気泳動したもの。レーン 1 は TraI 存在下で、レーン 2 は TraI 非存在下での反応産物。M と示したレーンはサイズ・マーカーとして用いたシークエンス・ラダーである。レーン 1 では TraI による *oriT* へのニッキングにより生じた 143 nt の断片が現れている (A 参照)。

TABLE 1. *Purification of the TraI protein*

	Total protein	Total activity ^a	Specific activity	Purification ^b (-fold)		Yield ^c (%)	
	(mg)	(units)	(units/mg)	A	B	A	B
Cell lysate	250	—	—	1.0		100	
Phosphocellulose	33	5.9×10^5	1.8×10^4	1.0	3.5	100	46
Mono Q	25	2.1×10^6	8.3×10^4	4.6	3.8	35	38
Superdex 200pg	19	1.9×10^6	1.0×10^5	5.6	3.9	33	30
HiTrap Heparin	13	1.4×10^6	1.1×10^5	6.2	4.1	24	21

^a One unit was defined as the amount of the enzyme required to produce 1 fmol of the nicked molecules in 30 min.

^b A, relative values calculated from specific activities. B, relative values calculated from the amount of proteins which was determined by scanning SDS-polyacrylamide gels.

^c A, relative values based on the nicking activity. B, relative values calculated from the amount of TraI protein.

表 3-1 TraI タンパク質の精製

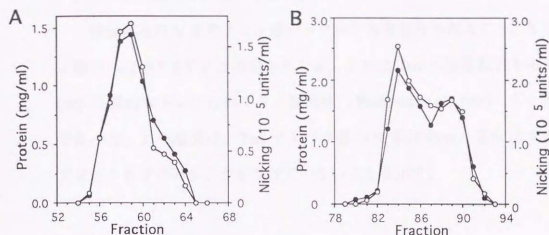


図3-2. TraI タンパク質のカラム・クロマトグラフィー

(A) Superdex 200pg カラム。(B) HiTrap Heparin カラム。各フラクションのニッキング活性(黒丸)とタンパク質量(白丸)は“材料と方法”(第六章)中に述べた通りに決定した。

ではその溶出がダブルピークを示したが、各フラクションのタンパク量とニッキング活性のピークは完全に一致した（図3-2 B）。この結果は HiTrap Heparin カラム上における TraI タンパク質の多量体化を示唆するのかもしれない。この点に関しては後に考察する。

精製標品の N 末のアミノ酸シーケンスを行なったところ、N 末の7アミノ酸が M L S F S V V と決定されたが、これは TraI の塩基配列から予想された ORF の開始コドンからのアミノ酸配列（Yoshioka *et al.*, 1990）と一致するものであった。この結果は、TraI タンパク質の N 末は formyl 基がはずれる以外にブロックもプロセッシングも受けていないことを示す。

（2）TraI タンパク質の物理化学的性質

R100のTraI タンパク質の分子サイズは塩基配列から 192 kDa、SDS-PAGE からは 180 kDa であることがわかっている（表3-2）が、実際には何量体で溶液中で存在するのかは知られていない。そこで精製した TraI タンパク質の分子量を決定するために、ゲルろ過を行うことにより TraI のストークス半径が 63.2 Å、蔗糖密度勾配沈降法により沈降係数が 6.7 S という値を得、この二つの値から Siegel と Monty（1966）の方法により TraI の分子量が 186,000、摩擦比 (f/f_0) が 2.1 と計算された（表3-2）。この結果は TraI がロッド状の単量体分子であることを強く示唆する。この実験において、蔗糖密度勾配沈降法はゲル濾過と同一のバッファー（200 mM NaCl を含む）を用いて行なったが、NaCl 濃度を 50 mM に下げると沈降係数が 8.9 S にシフトすることが分かった。この結果は、TraI が低イオン強度下では二量体として存在することを示唆する。この示唆を検証するために、chemical cross-linking を行ない SDS-PAGE で分子の大きさを調べたところ、TraI は NaCl 濃度が高いと単量体化、低いと二量体化することが確かめられた（図3-3 A, B）。

TABLE 2. *Physicochemical properties of the TraI protein*

Property	
Stokes radius	63 Å ^a
Sedimentation coefficient	6.7 S ^a (8.9 S ^b)
Molecular weight	186,000 ^c
Friction rate (f/f ₀)	2.1
Molecular size of protomer	
Gel electrophoresis	180 kDa ^d
DNA sequence	192 kDa ^e

^a Measured in buffer A containing 200 mM NaCl.

^b Measured in buffer A containing 50 mM NaCl.

^c Calculated by the method of Siegel and Monty (1966).

^d Data from Inamoto *et al.* (1994).

^e Data from Yoshioka *et al.* (1990).

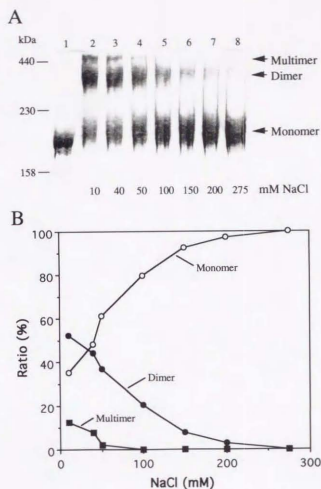


図3-3. Tral タンパク質のケミカル・クロス・リンキング

(A) Tral タンパク質を様々な NaCl 濃度下でケミカル・クロス・リンクさせ、SDS-5% ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動し、クマシー・ブリーアント・ブルーで染色したもの。レーン 1 はクロス・リンクしていないサンプル、レーン 2~8 は図下に示した NaCl 濃度下でクロス・リンクさせたサンプルである。クロス・リンキング反応は「材料と方法」(第六章)中に述べた通りに行った。Tral タンパク質の単量体 (186 kDa)、二量体 (372 kDa) 及び多量体の位置をゲルの左側に示した。用いた泳動マーカーはフェリチン (440 kDa)、カタラーゼ (230 kDa)、アルドラーゼ (185 kDa)、および BSA (66.2 kDa) である。(B) Tral の単量体、二量体、及び多量体の様々な NaCl 濃度下での相対量。(A) で示したゲルを EPSON GT-6000 スキャナーと NIH image を用いて解析した。

(3) TraI による二本鎖 DNA 解離反応

R100 のTraIタンパク質は DNA ヘリカーゼ活性を持つ (第二章)。そこでまずTraI のヘリカーゼ活性を、単鎖 pUC119 DNAに5' 末端を³²P で標識した 51mer のオリゴ DNA をアニールさせたものを基質として用いて定量した (図 3-4)。TraI による解離反応は数分のうちに完全に進み (図 3-5 A, a)、ヘリカーゼ活性は、酵素量が基質量の約 2.2 倍以内では酵素量に比例して 80% まで増加した (図 3-5 A, b)。また、ヘリカーゼ活性は、NaCl 濃度が 20 mM で最高で、100 mM ではその約 1/100 に低下した (図 3-5 A, c)。これらの結果は、明らかにTraI ヘリカーゼの活性型が二量体であることを示す。また、Lineweaver-Wurk plotting (data not shown) から TraI ヘリカーゼの 30 °C における V_{max} が 0.47 nM/min、 K_m が 6.6 nM と求められた。またこの V_{max} の値は二本鎖 DNA の巻き戻しの速度に換算すると 290 bp/s という値になる。これらの結果は、TraI が基質と比較的結合しやすく、一旦、解離反応が始まると立ち所に解離が終了することを示す。さらにこの二つの値から k_{cat} (turnover) が 0.12/min、 k_{cat}/K_m が $1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ と算出され、TraI は巻き戻し終了後はターンオーバーし難いことを示している。以上の結果から、TraI ヘリカーゼは "high processivity" を持つことがわかる。

TraI ヘリカーゼの解離反応における各パラメーターの影響を調べた結果、表 3-3 に示すような至適条件が得られた。TraI ヘリカーゼは Mg^{++} 及び ATP を要求するが、 MgCl_2 濃度は 5 mM で最大活性を示し、ATP 濃度は 0.25 mM から 4 mM の範囲で調べた限りでは 4 mM で最大活性を示した。また単鎖結合タンパク質 SSB は 16 nM tetramer (基質の 3.2 倍) のとき活性を 5% ほど上昇させたが、120 nM (基質の 24 倍) 以上では逆に反応を阻害し、400 nM (基質の 80 倍) では 31%、1.6 μM (基質の 320 倍) では 47% の阻害を示す。この結果は、

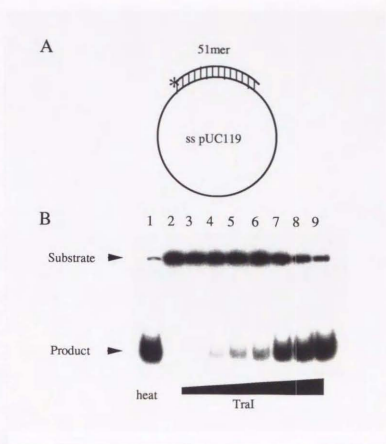


図3-4. Tral タンパク質のヘリカーゼ活性

(A) ヘリカーゼ活性の解析に用いた DNA 基質の模式図。*印は 51 nt のオリゴヌクレオチドの 5' 末端の ^{32}P 標識を示す。(B) Tral タンパク質の DNA ヘリカーゼ活性を示す、8 % ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動。活性は「材料と方法」(第六章)中に述べた通りに反応させ、 ^{32}P 標識したオリゴヌクレオチドの解離をモニターした。レーン 1 は DNA 基質を 95 °C で変性させたサンプル、レーン 2 ~ 9 は Tral タンパク質をそれぞれ 0、15、30、60、120、240、480、960 fmol 加えて反応させたサンプルである。

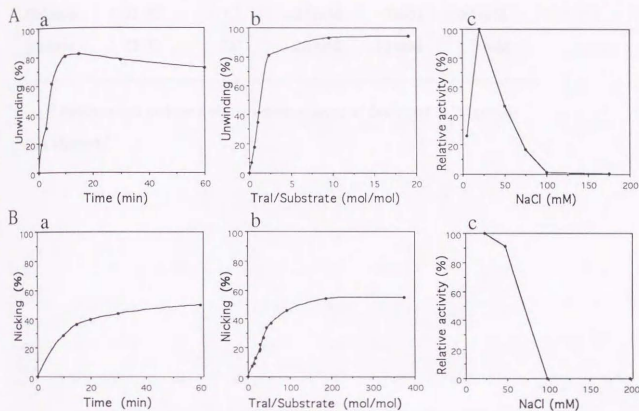


図3-5. Tralタンパク質の二本鎖DNA巻き戻し反応(A)とニッキング反応(B)
 (a)巻き戻し反応あるいはニッキング反応のタイム・コース。(b)巻き戻し反応あるいはニッキング反応のStoichiometry(化学量論的分析)。(c)巻き戻し反応あるいはニッキング反応に対するNaCl濃度の影響。
 ヘリカーゼ活性及びニッキング活性は"材料と方法"(第六章)中に述べた通りに測定した。

TABLE 3. Optimal conditions for the helicase and nickase activities

Activity ^a	Temperature	pH	NaCl	MgCl ₂	ATP
Helicase	37 °C	7.2	~20 mM	5 mM	≥4 mM
Nickase	37 °C	7.6	~20 mM	10 mM	0 mM

^a Helicase and nickase activities were assayed as described in "Materials and Methods".

表3-3 ニッキング活性とヘリカーゼ活性の至適条件

基質の一本鎖部分に SSB が結合して TraI の結合を妨げるがあまり強いものではないことを示唆する。

TraI ヘリカーゼによる解離反応の方向性を決定するために、18mer の 5' または 3' 突出を持つ 24 bp の部分的二本鎖 DNA 基質 α 、 β (図 3-6 A) の TraI による解離を調べた。5' 突出を持つ基質 α は TraI 濃度に依存して解離されるのに対し、3' 突出を持つ基質 β は解離されなかった (図 3-6 B)。この結果は TraI ヘリカーゼの解離反応の方向性は 5' \rightarrow 3' であることを示す。これは F プラスミドの TraI (Helicase I) の方向性 (Lahue and Matson, 1988) と一致する。

(4) TraI によるニッキング反応

TraI によるニッキング反応は、比較的短時間のうちに進むが (図 3-5 B,a)、反応時間を長くしても TraI 濃度を上げて最大 55% の基質にしかニックは導入されなかった (図 3-5 B,b)。TraI によるニッキング活性は、NaCl 濃度が低い程高く、NaCl が 100 mM 以上ではその活性がほとんど検出できないレベルにまで低下した (図 3-5 B,c)。この結果は、TraI ニッケースの活性型も二量体であることを示す。

またニッキング反応における各パラメーターの影響を調べ、その至適条件を求めたところ、温度は 37°C、pH は 7.6、 $MgCl_2$ は 10 mM でそれぞれ活性がピークを示した (表 3-3)。ATP を加えることによりニッキング活性は低下した (表 3-3)。これは TraI の持つヘリカーゼ活性により TraI が DNA 上を動いてしまうのか、あるいは ATP がフリーの Mg^{2+} を奪ってしまうためとかがえられる。さらに単鎖結合タンパク質 SSB の存在下でニッキング反応を調べたところ、SSB なしの場合と比較して、SSB が 13 nM (基質の 5.4 倍) で 33%、210 nM (基質の 87 倍) で 7% にまで低下した。このことは SSB がニッキング反応を強く阻害することを示す。この結果に関しては後に考察する。

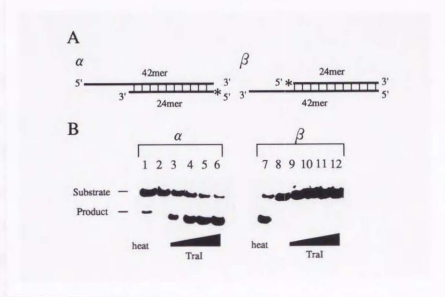


図3-6. TraI ヘリカーゼの DNA 巻き戻しの方向性

(A) 基質 α 、 β は TraI による DNA 巻き戻しの方向を決定するために用いた DNA 基質を表す。*印はオリゴヌクレオチドの 5' 末端の ^{32}P 標識を表す。(B) TraI タンパク質の二本鎖 DNA 巻き戻し活性を示す 10% ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動。"材料と方法" (第六章) 中に述べた通りに基質 α 、あるいは β を TraI と反応させ、解析した。基質 α は効率よく巻き戻されているのに対して、基質 β はほとんど巻き戻されていない。これは、TraI が一本鎖 DNA 部分を 5' から 3' の方向に動き、二本鎖 DNA を巻き戻していくことを示している。

(5) TraI によるニッキングに対する超らせん構造の必要性と認識部位

TraI により正確にニックが導入される以上、TraI はニッキング部位周辺のシーケンスを認識している筈である。しかし、*oriT* を運ぶプラスミドを種々の制限酵素で切断した断片を用いて様々な反応条件下でゲルシフトアッセイ及びフィルター-バインディングアッセイにより検討したが、TraI が *oriT* を含む断片に優先的に結合する活性は認められなかったことは第二章で述べた。また *oriT* 断片を用いた DNaseI foot-printing でも特異的結合はみられなかった (data not shown)。これらの結果は、ニッキングに超らせん構造が必要であるため線状 DNA に TraI が作用できない可能性を示唆する。このことを確かめるため、超らせん DNA を制限酵素で切断し線状にした DNA を基質として TraI と反応させたところ、予想通り全くニッキングはおこらなかった (図 3-7A)。また超らせん DNA を Topoisomerase I で処理した relaxed circular DNA を基質とした場合にニッキング効率は著しく低下したが、超らせん型 DNA ではニッキングは効率よく起こった (図 3-7A)。さらに超らせん DNA のニッキングを臭化エチジウムの存在下で調べたところ、その濃度が高くなり負の超らせんが減少するにしたがいニッキング効率は低下し、さらに濃度が高くなり正の超らせんが増加すると今度は逆に上昇し、非常に高い濃度のエチジウム・ブロマイドの存在下では、ニッキングが阻害された (図 3-7B)。これらの結果は、TraI ニッキングの基質として超らせん DNA が要求されることを示す。

TraI が認識する塩基配列は制限酵素で切断したプラスミド DNA を使用するゲルシフトアッセイ及びフィルター-バインディングアッセイでは決定できなかったため、TraI のニッキングに必要な領域を限定するため、*oriT* 領域を両側からけずった種々の長さの断片を運ぶミニ-*oriT* プラスミドを作成し (図 3-8)、これらの超らせん DNA 分子が TraI によるニッキングを受けるかどうか調べた。その結果、*oriT* を含む 54bp の領域の一部が欠ければニッキングが起こらないこと

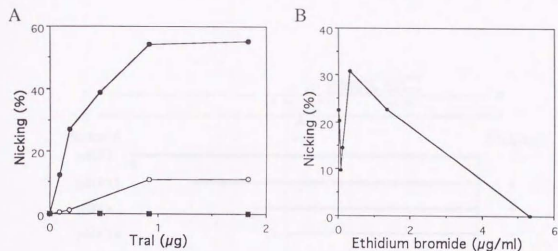


図3-7. ニッキング反応に必要な DNA 基質

(A) 超らせん型 DNA (黒丸)、relaxed closed circular DNA (白丸)、及び線状 DNA (黒四角) を用いた時の、Tral の *oriT* へのニッキング。ニッキング活性は“材料と方法” (第六章) 中に述べた通りに測定した。(B) 超らせん型 pHF11 DNA のエチヂウム・ブロマイド存在下でのニッキング反応。エチヂウム・ブロマイドを反応液に加え、12 分間インキュベートした後、2 μl の Tral タンパク質 (477 fmol/ μl) を加えて反応させた。

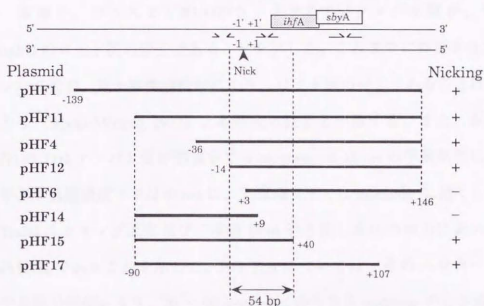


図3-8. TraIによるニッキングに必要な領域

oriT領域の模式図を図上に示してある。塩基番号はニックの3'末端を+1、5'末端を-1としている。逆向き反復配列は二本のDNA鎖の間に矢印で示した。IHFの結合部位 (*ihfA*) (Inamoto et al., 1990) 及び TraYの結合部位 (*sbiA*) (Inamoto and Ohtsubo, 1990) はそれぞれ斜線入り四角、白抜き四角で示した。各pHFプラスミドはoriT領域中、図中太線で示した部分のDNA断片を持つ。これらのDNA断片はその外側にBamHI切断部位を持つように設計したプライマーを用いてPCR法により合成し、BamHI消化後、pUC18のBamHI切断部位にクローニングした。TraIによるニッキング反応の結果を図右に示した。

が分かった(図3-8)。この結果は、この54 bp領域がニッキングに必要な TraI の作用部位を含むことを示す。

3. 考察

本章で、プラスミド R100 がコードする TraI タンパク質が、分子量が 186,000 のロッド状の分子であることを示した。これまでに精製された F の TraI タンパク質が、電子顕微鏡観察により、ロッド状の分子であることは示唆されており (Abdel-Monem, 1977)、本研究の結果と一致する。また、本論文で、R100 の TraI タンパク質が溶液中では monomer と dimer の平衡状態にあり、その平衡は低塩濃度下では dimer に、高塩濃度下では monomer に傾くこと、さらに TraI はニッキング反応及び二本鎖 DNA 巻き戻し反応の両方において二量体が活性型であることを示した。F の TraI については、そのヘリカーゼ反応の化学量論的解析により、70 ~ 90 monomers からなる multimer のとき最大活性を示すという報告 (Kuhn et al., 1978; Benz and Muller, 1990)、および基質の 10 倍の TraI monomers で最大活性を示すが、基質の 1 倍量存在すれば十分な活性を示すという報告 (Lahue and Matson, 1988) があり、R100 の TraI タンパク質で得られた結果とは異なる。しかし、これまでに知られている DNA ヘリカーゼのなかでその高次構造が明らかにされているものは、いずれもひとつの例外を除いて二量体あるいは六量体の多量体構造をとることが知られている (Lohman, 1992)

Rep helicase あるいは Helicase II (UvrD) は、DNA との結合により二量体化が促進されることが報告されている (Wong et al., 1992; Runy et al., 1993)。R100 の TraI タンパク質の精製の際、HiTrap Heparin カラムクロマトグラフィーでその溶出パターンが他の担体によるカラムクロマトグラフィーのものとは異なりダ

ブルピークを示した(図3-2参照)が、この結果は、TraIがDNAのアナログであるヘパリンひいてはDNAに結合することによって、それとのco-operativeな作用により二量体あるいは多量体を形成することを示唆するのかもしれない。

本論文でTraIによるニッキング反応は、反応時間を長くしてもTraI濃度を上げて最大55%の基質にしかニックは導入されないことを示した。したがって、効率よいニッキング反応には、反応液に加えていない他の因子が必要とされる可能性が考えられる。そのような因子としてはまずTraYとIHFが考えられる。実際、TraYとIHFはoriT領域内のニック部位に隣接した結合部位(*sbyA*, *ihfA*)に結合することによりTraIによるニッキング反応を促進することが示されている(第二章参照)。あるいは、TraIにトポイソメラーゼ様活性があり、超らせん構造をとる基質の一部がニッキング反応に対して不活性なrelaxed circular構造をとる分子に変換されたためとも考えられる。しかし、クロロキン入りアガロースゲル電気泳動によりrelaxed circular moleculesの生成は観察されなかった(data not shown)ことから、この可能性は否定される。しかしながら、ニックが入ってTraIと共有結合しているDNA分子が超らせん構造を保ったままで存在し、逆反応によりすぐに元のTraIのはずれたcovalently closed circular DNA分子に変換されるような平衡状態が存在する可能性も否定できない。

最近、我々は精製したTraIタンパク質が、二本鎖のニッキングで生じるニックと同じ位置で一本鎖DNAを切断する活性と、また、その逆反応の再結合活性を持つことを明らかにした(第四章参照)。この一本鎖DNA切断反応はSSBによって阻害される。このような事実から、超らせんDNAにおいて、一本鎖切断反応に必要な領域がTraIの作用により局所的に解離し、生じた一本鎖DNAの一方が切断されるのではないかという仮定が導かれる。この仮定はTraIによる二本鎖のニッキング反応が単鎖DNA結合タンパク質SSBタンパク質の存在下で阻害されるという本章中の結果からも支持される。

本章で、ニッキング活性が NaCl 濃度が低い程高くなり、NaCl が 100 mM 以上ではほとんど検出できないレベルにまで低下することを示した。TraI による一本鎖切断反応はニッキング反応と同様低塩濃度下で最も高い活性を示したが、ニッキング反応とは異なり NaCl 濃度が 100 mM でも依然として高い活性を示した（第四章参照）。この結果は、ニッキング反応の基質である超らせん DNA が、高塩濃度中では局所的解離が起こり難く、TraI タンパク質が作用する一本鎖 DNA が露出されないためであるという可能性が考えられる。。あるいは、*oriT* 付近が局所的に解離したような切断に必要な DNA-タンパク質複合体が TraI 二量体により形成されるが、高塩濃度中で存在する単量体ではこのような複合体が形成されない可能性も考えられる。

第四章 TraI タンパク質の一本鎖 DNA 特異的

エンドヌクレアーゼ活性及び再結合活性と

DNA 伝達の終結

要約

伝達性プラスミド R100 がコードする TraI タンパク質は、DNA 伝達開始点 (*oriT*) に DNA 鎖及び部位特異的にニックを導入する dsDNA エンドヌクレアーゼ活性を持ち、DNA 伝達の開始反応に与っていると考えられている。ここでは、TraI の新たな活性として、一本鎖 DNA を二本鎖 DNA の場合と同一の位置で切断する ssDNA エンドヌクレアーゼ活性及びその切断位置で再結合させる DNA リガーゼ活性を見いだしたことを報告する。一本鎖切断で生じた産物は、二本鎖の場合と同様、切断部位の 5' 端に TraI タンパク質が共有結合したものであり、逆反応により取り除かれた。一本鎖切断に必要な TraI の認識領域を、切断部位を含む領域に変異を導入したものを基質として用いた実験、及び、DNase I footprinting の実験によって、切断部位を含む約 18 nt の配列であることが明らかにしたが、この領域は、二本鎖 DNA のニックングに必要な部分とは一致することが分かった。また、一本鎖の切断と二本鎖のニックング両反応の種々のパラメーターの至適条件に多くの類似点があったが、TraI による二本鎖のニックングには DNA の超らせん構造が必要であることが特徴であった。しかし、超らせん二本鎖 DNA を用いた KMnO_4 フットプリンティングの解析から、TraI が切断部位周辺を局所的に解離させること、また TraI の認識領域を部分的に一本鎖にしたものを基質とした場合、効率良く切断したことから、TraI

によるニッキングが、二本鎖 DNA を局所的に解離し、生じた一本鎖 DNA を本質的に認識し、切断すると考えられた。本研究で新たに見いだしたTraIの一本鎖 DNA の切断と再結合活性は、DNA 伝達の開始反応に与っているばかりではなく、供与菌体内でプラスミドのローリングサークル型複製が一周したところで再び生じる一本鎖 DNA 上のoriTを切断し、生じた3' 端と既に切断されていた元のDNAの5' 端とをTraIがつなぎ換えることによってプラスミド一単位を正確に作り出す活性であり、DNA 伝達の終結に関与していると考えられる。

1. 序論

接合伝達は、性決定因子と呼ばれるプラスミド DNA が、これを持つ雄の細菌から持たない雌の細菌へと移動する現象であり、このとき DNA 複製を伴い、最終的には供与菌、受容菌双方ともこのプラスミドを保持することになる。伝達性プラスミドは接合伝達に必須の遺伝子 (*tra* と呼ばれる) 群及び伝達開始点 (*oriT*) を自分自身の上に持っている (総説、Ippen-Ihler and Minkley, 1986; Willetts and Skurray, 1987; Clewell, 1993; Frost *et al.*, 1994)。F 因子の *traI* 遺伝子の産物である *TraI* タンパク質は DNA ヘリカーゼ I と同定されていた (Abdel-Monem *et al.*, 1983)。また R100 の *TraI* タンパク質も DNA ヘリカーゼ活性を持つことが示された (第二章)。この *TraI* タンパク質が *oriT* 領域内に DNA 鎖及び部位特異的にニックを入れ、生じた 5' 端に共有結合することが、R100 (第二章) 及び F (Matson and Morton, 1991; Reygers *et al.*, 1991) で示された。このニックング反応はこれらの F 型プラスミドの DNA 伝達の開始反応と考えられ、ニックの位置から二本鎖 DNA が *TraI* の DNA ヘリカーゼ活性により巻き戻されて、受容菌へ移行するべき一本鎖 DNA を作り出すと考えられている (総説: Ippen-Ihler *et al.*, 1986; Willetts and Skurray, 1987; Clewell, 1993; Frost *et al.*, 1994)。伝達される一本鎖 DNA は 5' 側から受容菌へ入っていくことが示されているが (Ohki and Tomizawa, 1968; Ihler and Ruppe, 1968; Cohen *et al.*, 1968)、F 型プラスミドの伝達では DNA 以外にタンパク質の受容菌への移動はないこと (Silver *et al.*, 1965; Rees and Wilkins, 1989; 1990) から、ニックの 5' 端に結合している *TraI* は供与菌内に残った形で、二本鎖 DNA は巻き戻され、生じた一本鎖 DNA が受容菌へ移るのではないかと考えられる。

最近、我々は R100 の *TraI* タンパク質を DNA 鎖及び部位特異的エンドヌ

クレアーゼ 活性を指標として精製し、物理的性質と同時に、ニッキング反応の詳細な生化学的解析を行なった(第二章)。TraI は、ゲルろ過、沈降係数及びケミカルクロスリンクによる解析から一量体と二量体との間の平衡状態で存在し、この平衡は塩濃度が低いほど二量体化が進むことが示された。ニッキング活性は低塩濃度下でのみ検出されることから、TraI ニッケースの活性型は二量体であると考えられた。そして、TraI によるニッキングおよび特異的 DNA 結合には DNA の超らせん構造が必要であることが示された。欠失変異を導入した基質を用いた実験から、TraI によるニッキングに必要な領域がニック部位を含む 54 bp に存在することを示した。

本章は、TraI が一本鎖 DNA 特異的エンドヌクレアーゼ活性及び再結合活性を持つこと、そして二本鎖 DNA のニッキング反応は、超らせん DNA の *oriT* を含む領域が局所的に解離し生じた一本鎖 DNA 上の塩基配列を認識し、切断するという本質的には TraI の一本鎖切断反応であることを示す。この TraI の一本鎖 DNA の切断・再結合の活性は、DNA 伝達の開始のみならず終結に必要なものであると考えられる。

2. 結果

(1) TraI による一本鎖 DNA の切断

TraI は二本鎖の特定の単鎖 DNA 上の特定の部位にニックを入れることから、一本鎖 DNA を部位特異的に切断する活性も持つ可能性がある。この可能性を調べるため、*oriT* 領域を運ぶ pUC119 由来のファージミドから一本鎖 DNA を調製し、TraI を加え反応させた後、サンプルをプロテアーゼ K で処理し、これを鋳型としてシークエンス反応を行なったところ、TraI が *oriT* 領域を

```

gaTCCACCTCTGGTGACTTTATCCGTAATAATTTAACCCACTCCACAAAAGGCTCAA
  GTGGAGACCACTGAAATAGGCATTTATTAATGGGTGAGGTGTTTTCCGAGTT
    -80'          -60'          -40'
=====
CAGGTTGGTGGTTCCTACCACCAAAGCACCACACACTACGCAAAAAACAAGTTTTTGCTG
GTCCAACCACCAAGAGTGGTGGTTTTCGTGGTGTGTGATCGCTTTTGTTCAAAACGAC
  -20'          -10'          -1' +1          +10          = +20=====
=====
ATTTACGTTTTAAATCATGTAATTAACAAACGCTATTTATATTTAATAATTCTGAATTAT
TAAATGCAAAATTTAGTACATTAATTGTTTGGGATAAAATATAAATTATTAAGACTTAATA
'===== +40===== '===== +80
TAAATAGAGAGTCGTTGGCGATCCTGTTACGACCCTATAGCGACTCTTATTAG
ATTATCTCTCAGCAACCGCTAGGACAATGCTGGGATATCGCTGAGAATAATCCTAG
  +100          +120

```

図4-1. プラスミド R100 の *oriT* 領域の塩基配列

ニッキング活性の測定に用いたプラスミド pHF11 の運ぶ *oriT* 断片 (*Bam*HI 断片)を示す。ニックは図中の下側のストランドに入る。ニックの 5' 末端を -1、3' 末端を +1 として塩基番号を付けた。-89、-90 位の小文字は *Bam*HI 切断部位を導入するために塩基置換を入れ、実際の R100 の塩基配列とは異なることを表す。二本の DNA 鎖の間の横線は逆向き反復配列を示す。また、二本鎖 DNA 配列の上下に示した二重線は *IHF* の結合部位 (*ihfA*) を、一本線は *TraY* の結合部位 (*sbyA*) をそれぞれ示す。

含む二本鎖DNAのニッキングが起こる方の一本鎖DNA上の特定の部位でシーケンス反応が停止することが分かった（図4-2A）。この結果は、dideoxy NTPを加えないプライマー伸長反応でも確認できた（data not shown）。これらの結果は、TraIが単鎖DNA上の特異的部位を切断する活性を持つことを示す。また、一本鎖ファージミドからこの切断部位を含む230 ntの一本鎖オリゴヌクレオチドを調製し、その5'末端を ^{32}P 標識したものを基質としTraIと反応させた場合、同じ部位での切断を示す173 ntの断片が生じた（図4-2B）ことから、TraIによる特異的切断が確認できた。この切断部位は二本鎖DNAのニッキングの部位oriTと同一であったことに注意してもらいたい。

二本鎖DNAのニッキングの場合、TraIはニックの5'末端と共有結合し、DNA-protein complexを形成することが示されている（第二章; Reygers *et al.*, 1991）。一本鎖DNAの切断の場合も切断部位の5'末端にTraIが結合しているかどうか検証するために、切断部位を含むオリゴヌクレオチド（ α , 図4-3A）を合成し基質としてTraIと反応させた。合成オリゴヌクレオチドの5'末端を ^{32}P で標識したものをを用いた場合、反応後のプロティナーゼK処理の有無にかかわらず、一本鎖DNA切断を示す36 ntの断片が生成した（図4-3Ba）。この36 ntの断片は、プロティナーゼK処理、非処理後に行ったフェノール処理にもかかわらず除かれなかったということは、切断部位の3'末端にはTraIタンパク質は結合していないことを強く示唆する。元のオリゴヌクレオチド（ α ）の3'末端標識したものを基質としてTraIと反応後に得られたサンプルをプロティナーゼKで処理しなかった場合、切断によって生じるはずの17 ntのバンドは現われなかった（図4-3Bb）。この結果は、17 nt断片にTraIタンパク質が5'端には結合しているため、フェノール処理により取り除かれたことを示唆する。実際、同じサンプルをプロテアーゼKで処理すると、プロティナーゼKによる完全または不完全消化によりアミノ酸残基がくっ付いたと考えられる断片が、17 ntのバンドの位置とすぐ上に階段状のバンドとして出現した（図4-3Bb）。

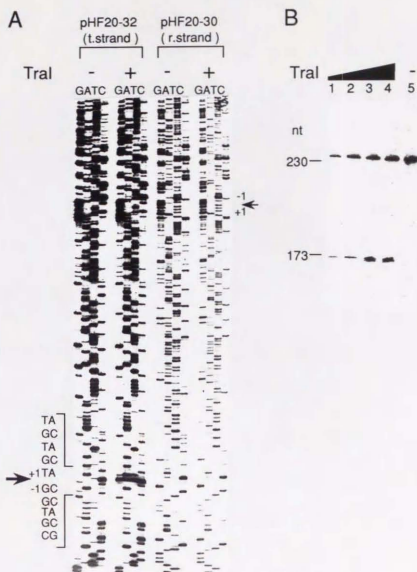


図4-2. Tral タンパク質の一本鎖 DNA 特異的エンドヌクレアーゼ活性

(A) Tral タンパク質の oriT への一本鎖 DNA 特異的エンドヌクレアーゼ活性を示すシーケンス・ラダー。ニックの入る方の DNA 鎖の配列を運ぶ一本鎖ファージミド pHF20-32、あるいはその相補配列を運ぶ一本鎖ファージミド pHF20-30 を、 Mg^{2+} を含む溶液中で、Tral の存在下 (図上に+で示した)、非存在下 (図上に+で示した) で反応させ、シーケンス反応を行った。図上のG、A、T、C はサンガー法で、ddGTP、ddATP、ddCTP、ddTTP を加えて反応させたレーンをそれぞれ示す。図左の太矢印は Tral に依存して4つのレーンで共通にプライマー伸長反応が停止している位置を示す。また、図左にその付近の塩基配列を示した。左側の列が鋳型 DNA の塩基配列を、右側の列が合成されたその相補鎖の塩基配列を示す。+1 番目の塩基と-1 番目の塩基の間、すなわち二本鎖 DNA のニック部位と同一の位置で切断が起こっていることを示す。一方、図右の細い矢印は、逆ストランド上でのニック部位の向かい側の位置を示す。この位置には切断を示すシグナルが出ていない。(B) 一本鎖 DNA 断片を基質とした時の Tral による特異的切断。一本鎖ファージミド pHF20-32 から「材料と方法」(第六章)中に述べた通りにして、230 nt の一本鎖 DNA 断片を調製し、その 5' 末端を ^{32}P 標識したものを基質として、Tral と反応させ、シーケンス用ゲルで電気泳動した。図左にシーケンス・ラダーをマーカーにして正確に計った一本鎖 DNA 断片の長さを示す。173 nt の断片は+1 番目の塩基と-1 番目の塩基の間での切断を示す。レーン1〜5のサンプルに加えた Tral の量は順に1.2、2.4、4.8、9.6、0 pmol である。

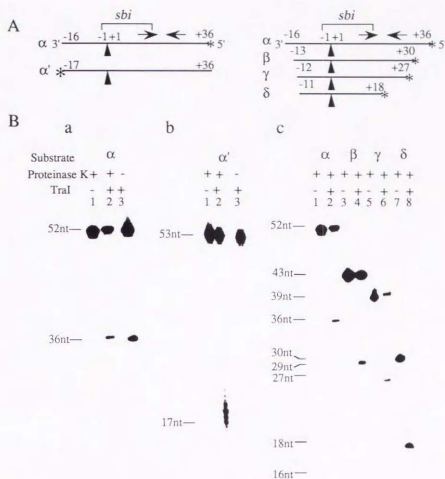


図4-3. Tralによる一本鎖オリゴヌクレオチド切断反応

(A) 用いたオリゴヌクレオチド基質。横線はR100の *oriT* 付近と同一の塩基配列を持つように合成したオリゴヌクレオチドを左側が3'末端になるように示している(図4-1参照)。横線の下は黒三角は切断の位置を、横線の上の数字は切断の5'末端、3'末端の塩基をそれぞれ-1、+1としたときの両端の塩基番号を示す。また、図上に *sbi* と示した領域は図4-8で示す二本鎖DNAのニックングに必要な領域を示す。*印はオリゴヌクレオチド末端の³²P標識を表す。基質 α' はその3'末端に(α -³²P) ddATPを付加することにより標識したので、3'末端に1塩基よけいに付加されている。(B) Tralによるオリゴヌクレオチド基質の特異的切断を示す11%ポリアクリルアミド変性ゲル電気泳動。図上に示した各基質をTral存在下(図上に+で示した)、非存在下(図上に-で示した)でインキュベート後、プロテアーゼK処理し(a、bのレーン3は未処理)、フェノール/クロロホルム抽出を行い、泳動した。図左に、シークエンシング用ラダーをマーカーにして測定した各断片の大きさを示す。

この結果は、上記の示唆を支持する。

29 nt のオリゴヌクレオチド δ (図 4-3 A 参照) を 5' 末端標識したものを基質として用い、反応停止後そのまま 10% シーケンシングゲルで泳動した場合、TraI の部位特異的切断による 18 nt のバンドが現れた (図 4-4 A lane 2-6)。一方、オリゴヌクレオチド δ を 3' 標識した基質を用いた場合、TraI とラベルされた 3' 末端を含むオリゴヌクレオチドとの複合体形成を示すバンドがゲルのトップに現れた (図 4-4 A lane 10-12)。また同じ反応産物を SDS-6% ポリアクリルアミドゲルで泳動した場合、3' 末端標識の基質を用いた時に限り、TraI とオリゴヌクレオチドとの複合体形成を示すバンドが、TraI タンパク質の位置とはほぼ同様の位置に現れた (図 4-4 B)。以上の結果から、一本鎖 DNA 切断後、TraI タンパク質は切断部位の 5' 末端と共有結合していることが示される。

上の実験で使用したオリゴヌクレオチド α よりさらに短いオリゴヌクレオチド (β , γ , δ) の 5' 末端標識したものを基質として用いた場合にも、TraI による部位特異的な切断がおこったが、基質 α , β , γ は基質 δ 程には効率よく切断されていないことが分かった (図 4-3 Bc)。この違いは基質 γ と δ を用いた反応速度論の解析の結果を比較すると歴然としている (図 4-5)。基質 α , β または γ を使用し、TraI の量を増やしても、反応時間を長くしても基質 γ の反応速度論的解析結果とほぼ同一であった (data not shown)。この結果は、基質 α , β , γ には 8 bp ステムからなるステム・ループ構造が形成されるが、基質 δ ではステムの外側の配列を欠くためにステム・ループ構造が形成されないという違いがあり、そのために前者が後者より切断され難くなったという可能性を示唆する。後に、内側のステム配列が TraI による切断に必要で、外側の配列が存在するとその配列がステム構造をとるために切断効率が低下することを示す。

この実験において注目すべきは、切断され易い基質 δ では切断部位の 3' 端を持つ 18 nt の断片のバンド以外に二塩基小さい 16 nt の断片のバンドがかすかに現われたことである (図 4-3 Bc)。酵素量あるいは反応時間を増加さ

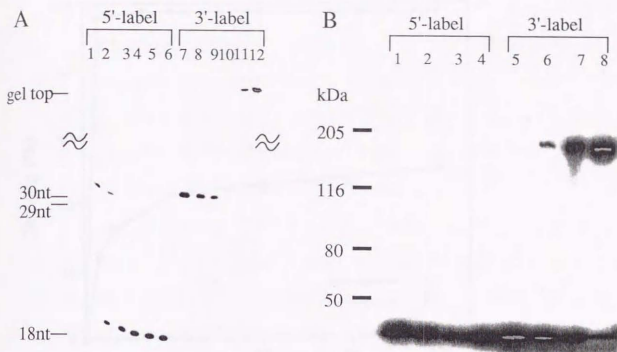


図4-4. 切断部位の5'末端とTraIが共有結合した複合体の形成

(A) 図4-3Aに示した5'末端を標識した基質8 (29 nt)、あるいは同じオリゴヌクレオチドの3'末端を標識した基質8 (30 nt) をTraIと反応後、そのまま電気泳動した11% ポリアクリルアミド変性ゲル。図中の波線はゲルの中央部分を省き、上部と下部のみを示したことを表す。図左に、シーケンス・ラダーをマーカーにして測定した各断片の大きさを示す。TraIを加え、0分(レーン1、7)、0.5分(レーン2、8)、1分(レーン3、9)、3分(レーン4、10)、10分(レーン5、11)、30分(レーン6、12)後にStop Solutionを加え、95°Cで3分間インキュベートすることにより反応を停止させ、泳動した。なお、レーン1及びレーン7はあらかじめStop Solutionを加えておいた反応液中にTraIを添加した。(B) 切断部位の5'末端とTraIが結合した複合体の形成を示すSDS-6%ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動。5'末端を標識した基質8(レーン1~4)あるいは3'末端を標識した基質8(レーン5~8)をTraIと10分間反応させ、lysis buffer (Laemmli, 1970)を加え、90°Cで2分間インキュベートすることにより反応を停止させた。加えたTraI量は、0 fmol(レーン1、5)、75 fmol(レーン2、6)、0.30 pmol(レーン3、7)、1.2 pmol(レーン4、8)、用いた基質量は各125 fmolである。図左にブレスティンD SDS-PAGEスタンダード(BioRad)の泳動位置を示す。

Cleavage of oligonucleotide

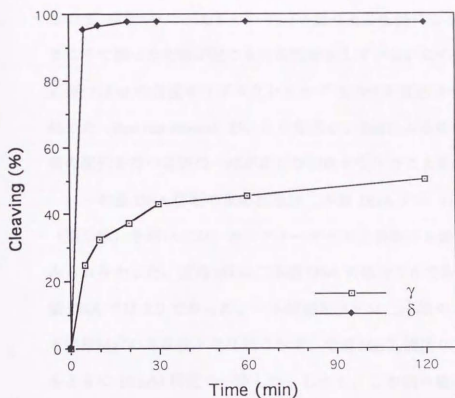


図4-5. 逆向き反復配列を持つ基質 γ と持たない基質 δ の反応性の違い
5末端を標識したオリゴヌクレオチド基質 γ (白四角形)または δ (黒ダイヤ形)(図4-3参照)を図中に示した時間Tralと反応させ、図4-4(A)と同様に電気泳動し、イメージ・アナライザーで各バンドの放射活性を測定することにより基質と産物の量を定量し、反応効率を算出した。反応液中の基質濃度、酵素濃度はそれぞれ、40 fmol/ μ l、1.5 pmol/ μ lである。

せると、この 16 nt の産物は増加した (data not shown)。この結果は、切断部位の 3' 端側が GTGTGT という GT の繰り返し配列になっていて、2 塩基ずれたところで誤った切断が起こる可能性を示している。この特異的な配列を 3' 側を持つ 18 nt の合成オリゴヌクレオチドと TraI を反応させると、16 nt の産物が生じた (data not shown) が、この結果は、TraI による切断によって生じた 3' 側の配列を持つ産物の一部が新たな切断を受けたことを示唆する。

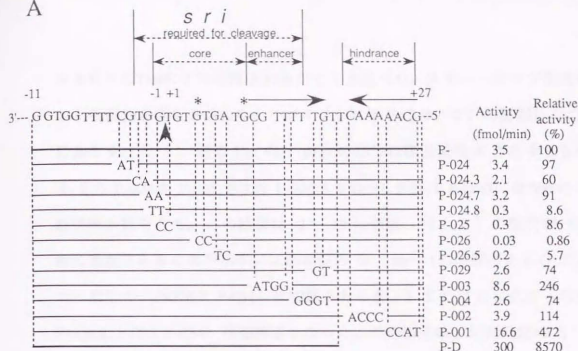
一本鎖 DNA 切断の反応溶液は二本鎖 DNA のニッキングと同じ反応溶液 (第二章) を用いたが、各パラメーターの至適条件を調べても若干の違いしかみられなかった。至適 pH は二本鎖 DNA の場合 7.6 であったのに対して、一本鎖 DNA では 8.0 であった。一本鎖切断反応は二本鎖のニッキング反応の場合と同様 Mg^{2+} の非存在下では起こらず、至適 $MgCl_2$ 濃度は二本鎖も一本鎖の場合もともに 10 mM 程度で一致した。しかし、二本鎖の場合 $MgCl_2$ 濃度 20 mM では活性が約半分も落ちるのに対し、一本鎖では活性が 1 割しか低下しないという違いがあった。

至適 NaCl 濃度はともに 20 mM 付近であった。しかし、二本鎖の場合 NaCl 100 mM で活性はほとんど検出できないレベルにまで低下したのに対して、一本鎖の場合 100 mM でも約 1 割程しか活性が低下しないという大きな違いがあった。この違いに関しては後に考察する。ATP はニッキングおよび一本鎖切断反応に必要ではなく、それが存在するとニッキング反応をむしろ阻害したが、一本鎖切断反応においては、切断部位の 3' 側のステム・ループ配列を持つ一本鎖オリゴヌクレオチドを基質とした場合には、逆に促進した。

(2) 一本鎖切断に必要な領域

TraI による一本鎖切断に必要な領域を決定するために、切断部位を含む領域に様々な塩基置換を持つオリゴヌクレオチド (図 4-6) を合成し、これら

A



B

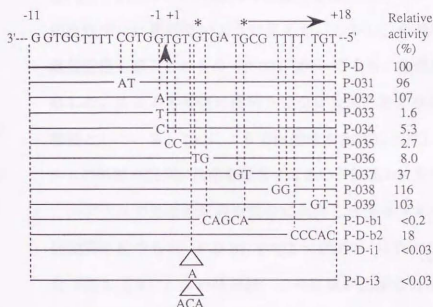


図 4-6. *Tral* による一本鎖オリゴヌクレオチド切断反応に必要な塩基配列

R100 の *oriT* 領域の下ストランド上の -11 位 ~ +27 位の配列 (A) と -11 位 ~ +18 位の配列 (B) を図上に示し、その配列に置換変異を入れたオリゴヌクレオチドをその下に示す (図 4-1 参照)。太線は wild type と同一の配列を持つことを示す。細線はその部分が wild type と同一の配列を持ち、線の中断している部分がそこに示した塩基に置換されていることを表す。また、白抜き三角は挿入変異を表す。縦向きの矢尻は切離部位を、横向きの矢印は逆向き反復配列を示す。図右に、各オリゴヌクレオチドの名前と、図 4-5 と同様の方法で測定した切断活性を示す。"Relative activity" は wild type (P-C または P-D) を 100 としている。(A) の配列の上に、この図中の結果から導かれた、*Tral* の一本鎖切断反応に必要な領域 (*sri* と命名した) を示した。"core" と示した領域はそのなかでも特に重要で正確な塩基配列が要求される領域を、また "enhance" と示した領域は若干の塩基置換では切断活性はさほど低下しないが、この部分が (ステム・ループ構造をとらない) 一本鎖状態で存在することにより切断活性が大きく上昇する部分を表す。また、"hindrance" と示した領域はステム・ループ構造をつくって、"enhance" 領域をマスクすることにより切断活性を大きく低下させる部分を表す。

を基質としTraIにより切断されるかどうか調べた。ステム・ループ構造を形成しうる配列を含む38 ntのオリゴヌクレオチドにおいて、切断部位の3'側にある9 ntと5'側の1 ntの計10 ntの部分に塩基置換が存在するもの(図4-6のP-024.8, P-025, P-026, P-026.5, P-D-b1, P-D-i1, P-D-i3)はTraIによる切断効率が低下した。この結果は-2~+9の領域(図4-6)の配列が一本鎖切断に重要であることを示す。切断部位の5'側の-1の位置にあるGがAに代わったもの(P-024.7, P-032)は切断されるが、TまたはCに代わったもの(P-024.8, P-033, P-034)は切断されなかった。この結果は、切断部位の5'側はプリンであることが重要であることを示唆する。ステム・ループ構造を取りうる内側の8 bpのステム配列内に変異を導入したもの(P-028, 029, 003, 004)は切断効率には影響ないように見えた。しかし、外側の8 bpのステム配列内に塩基置換を導入したもの(P-001, 002)のうち、後者はTraIによる切断効率が上昇した。ステムの外側の配列を完全に欠失したオリゴヌクレオチド(P-D)を基質としたとき、TraIによる切断効率が非常に上昇した。これらの結果は、ステムの外側の配列が反応を阻害するという前述の結果を確認するものとなった。

ステムの外側の配列を完全に欠失したオリゴヌクレオチド(P-D)内に置換変異を持つもの(P-D-b1, P-032~P-037)はTraIによる切断効率が悪くなった(図4-6B)。この結果は、この領域が必須であるという前述の示唆を支持する。切断部位との間に1 ntまたは3 ntの挿入を持つもの(P-D-i3, P-D-i1)では切断がみられなかった(図4-6B)。この結果は、この部分と切断部位との距離も重要であることを示す。内側のステム配列に相当する領域に塩基置換を入れたもの(P-D-b2)の切断効率は低下した(図4-6B)。またステムの内側の配列の半分まで削った場合、効率は落ちたが、このステム配列を完全にもつものよりは高い効率を示した(data not shown)。これらの結果は、内側のステム配列もTraIの切断に必要であることを示す。しかし、前述したように、ステム・ループ構造を形成しうる配列を全て含む28 ntのオリゴヌクレオチドにおい

てステムの外側の配列との相補性をこわすような塩基置換を持つものは、それほどの高効率では切断されなかった。この結果は、この領域が必須ではあるものの、この配列内に導入された塩基置換または欠失による切断効率の低下よりも、ステム・ループ構造がこわされたことによる切断効率の上昇の寄与の方が大きいことを示す。

TraI の一本鎖 DNA 切断の認識配列 (*sri* と命名) を知るために、合成オリゴヌクレオチド (図 4-3 A、基質 α) を Mg^{++} の非存在下で TraI による切断が起こらない条件で DNase I footprinting を行なった。TraI を加えない場合、ステムの 8 bp の配列に相当する部分が切断されることが分かった (図 4-7 A、レーン 1, 3)。この結果は、DNase I が一本鎖 DNA より二本鎖 DNA を優先的に切断することから、基質 α 内でステム・ループ構造が形成されているためステム部分が優先的に切断されたことを示す。TraI を加えた場合、+4 番から +19 番の塩基が切断され難くなり、-5 番から -16 番目の塩基で切断の促進がみられた (図 4-7 A、レーン 2, 4)。

図 4-7 D には、ここで得られた結果と、ニッキング、および一本鎖切断に必須の領域と認識領域に関してえられた結果を塩基配列上で示した。-4 から -15 の部分は外側のステム配列を含む +20 から +31 の部分と 12 nt 中 9 nt の相補的な塩基を有している (図 4-7 A)。よって TraI が内側のステム配列を含む部分に結合しステム・ループ構造を壊した結果、外側のステム配列を含む +20 から +31 の配列が、別の分子の -4 から -15 の部分と二分子間で相補対を形成し、結果として DNase I で切断されたものと考えられる (図 4-7 A 参照)。従って、前述の結果は +3 番目から +19 番目の部分が TraI の特異的認識部位であることを示唆する。そこで、8 bp のステムの外側の配列に塩基置換を導入してステム・ループ構造をとれないようにした合成オリゴヌクレオチドを用いて、同様の DNase I footprinting を行ったら、+3 番目から +19 番目の部分が TraI タンパク質に依存して、DNase I による切断から保護されており (図 4-7 B)、

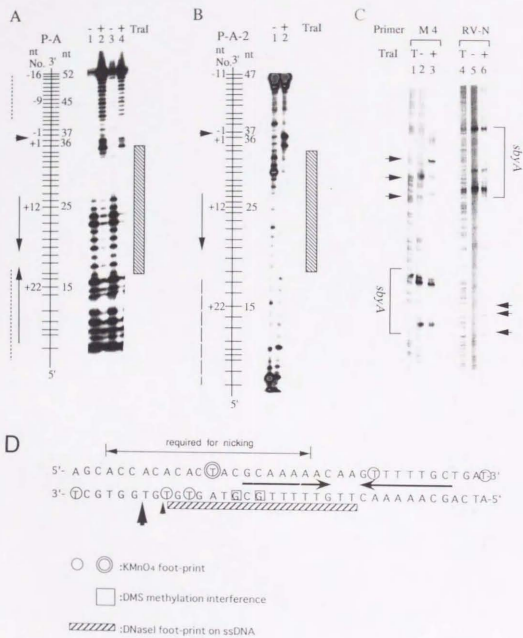


図4-7. TraI の特異的結合部位

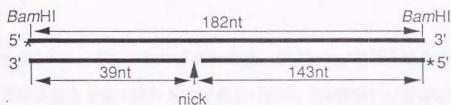
(A) R100 の *oriT* 領域の下ストランドの配列を持つオリゴヌクレオチド P-A (52 nt) の 5' 末端を ^{32}P 標識したものを基質とした、TraI の DNase I フットプリント。図左に DNase I による切断で生じた各バンドの位置を階段状に示し、その右側に各バンドの長さ (nt) を、左側にそのバンドがどの位置の塩基のところでの切断により生じたものであるかを示す (図 4-1 参照)。また、横向きの矢尻は TraI による切断部位を、縦向きの矢印は逆向き繰り返し配列の位置を示す。点線で示した 2 つの部分は 12 nt 中 9 nt が相補的であり、アニールして二次構造をつくることが可能である。基質オリゴヌクレオチド 0.2 pmol を TraI (14 pmol) の存在下 (レーン 2、4) 及び非存在下 (レーン 1、3) で 37 °C 15 分間インキュベートし、DNase I を 10 U (レーン 1、2) または 1 U (レーン 3、4) 加えて、さらに 1 分間インキュベートした。ゲルの右側に、TraI の結合部位を斜線入りの縦棒で示した。(B) 図の左に長い点線で示した部分にトランスバージョン変異を入れ、二次構造をとらないようにしたオリゴヌクレオチド P-A-2 (47 nt) の 5' 末端を ^{32}P 標識したものを基質とした、TraI の DNase I フットプリント。加えた DNase I が 0.1 U である点を除いては、反応条件及び図中の記号は (A) と同じである。(C) 超らせん型二本鎖プラスミド DNA pHF4 を基質とした TraI の KMnO_4 フットプリント。0.75 μg の pHF4 DNA を 19 pmol の TraI と共に 30 °C で 30 分間インキュベートした後、 KMnO_4 酸化、ビベリジン切断を行ったサンプルを二等分し、それぞれ 5' 末端標識したプライマー M4、RV-N を用いてプライマー伸長反応を行い、6 % ポリアクリルアミド・シークエンス用ゲルで電気泳動した (レーン 3、6)。レーン 2、5 は TraI を加えていないコントロールである。また、レーン 1、4 は、ビベリジン処理した pHF4 DNA をサンガー法で ddATP を加えて反応させたシークエンス・ラダーであり、鋳型 DNA 上のチミンの位置を示すマーカーとして用いた。図の左右に示した、矢印は TraI に依存して生じたシグナルを、sbyA は TraY の結合部位を示す。各バンドの長さはシークエンス・ラダーをマーカーとして泳動することにより同定した。(D) TraI の特異的結合部位及び結合に伴う構造変化部位。R100 の *oriT* 領域の塩基配列と各フットプリントの結果のまとめを表す。二本鎖 DNA のニッキングに必要な領域 (図 4-8) を配列の上に示し、逆向き反復配列の位置を配列の間に矢印で示す。A、B で示された一本鎖 DNA 上の TraI の結合部位を斜線入り横棒で示す。また、C 中矢印で示した TraI に依存して KMnO_4 酸化を受けるチミンを丸で示した。二重丸は特にシグナルが強く出たチミンを示す。さらに、超らせん型 DNA を基質に用いて、TraI による DMS-メチル化干渉実験の結果 (data not shown)、TraI に依存してメチル化が阻害される G の位置を四角で示した。

タンパク質がこの部分に特異的に結合することが明確に示された。+1 番目の塩基はDNase I に対し高感受性となっているように見える (図 4-7 A, レーン 2, 4)。DNase I 反応溶液中には Ca^{++} イオンを加えているが、TraI による一本鎖 DNA の切断は、 Mg^{++} イオンを Ca^{++} イオンに換えるとかかなり低下するが特異的に起こる (data not shown)。そのため+1番目の塩基は TraI により特異的に切断された部位であろう。+3 番目の塩基も DNase I に対し高感受性になっている (図 4-7 A, レーン 2, 4 ; B, レーン 2) が、これは TraI の結合部位に隣接しているためではないかと想像される。ここで、前述のTraIによる一本鎖切断に必要な領域内に、TraI の結合部位と切断部位が全て含まれることに注意してもらいたい (図 4-7 D 参照)。

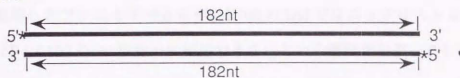
(3) 超らせん DNA 上のニッキングに必要な領域と TraI による局所的解離

第二章において、TraI によるニッキング反応には、基質として *oriT* 領域を運ぶ超らせんDNA分子が要求され、ニッキングに必要な領域が *oriT* を含む 54bp の領域内に存在することを示した。この領域内のニッキングに必要な領域をさらに特定するために、2 塩基おきに 2 塩基ずつのトランスバージョン変異を導入したプラスミドを作製し、それらの超らせんDNAを基質としたとき、ニッキングが起こるかどうか調べた。ニッキング効率は、超らせんDNAを TraI と反応させた後、*Bam*HI で消化し、5' 末端を ^{32}P で標識後、6% シークエンスゲルで泳動し、ニッキングにより生じる 3' 端を持つ短い断片 (143 nt) とニッキングがおこらなかった元の長い断片 (182 nt) の放射活性の比より算出した (図 4-8 A)。その結果、ニック部位の 5' 側 3 bp と 3' 側 15 bp を含む 18 bp の領域 (+3~-15) に変異が存在すればニッキング効率が低下することが分かった (図 4-8 B)。この結果は、ニッキングには、ニック部位を含む 18 bp の領域 (*sri*) が必須であることを示す。この結果は、又、前項で明らかにした、

A nicked



unnicked



B

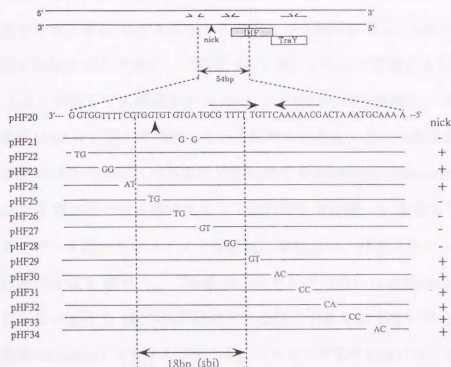


図4-8. 二本鎖 DNA のニッキングに必要な塩基配列

(A) ニッキング反応のアッセイ法を示す略図。ニックの入ったプラスミド DNA 及びニックの入っていないプラスミド DNA から切り出された *Bam*HI 断片を示す。この断片の 5' 末端で 32 P 標識 (*印で示す) して泳動すると、ニックの入った分子からは 182 nt と 143 nt の標識断片が、ニックの入っていない分子からは 182 nt の標識断片が生じる。(詳しくは第三章参照)。(B) *oriT* 領域にトランスバージョン変異をいれたプラスミド DNA 基質へのニックの導入の有無。R100 の *oriT* 領域の略図を上を示す。二本の DNA 鎖 (横線) の間の片矢印は逆向き反復配列を示し、縦向きの矢印はニック部位を示す。 *ihfA*、*shyA* はそれぞれ IHF、TraY の結合部位を示す。*oriT* 付近の塩基配列を下ストランドのみ取り出して書き並べた。pHF20 は wild type の *oriT* 領域を運ぶプラスミドである。その他のプラスミド (pHF21~34) は横線上に示した 2 塩基のみ pHF20 の配列と異なっている。各プラスミドを基質に用いて (A) で示したアッセイ法でニックの導入の有無を調べた結果を、図の右に + または - で示した。この図の結果から導かれた *Tral* のニッキングに必要な領域 (*sbi* と命名) を図下に示した。なお、pHF21 はこの領域の塩基配列を F プラスミドの *oriT* 領域の塩基配列と同じになるように塩基置換を入れたプラスミドである。

TraIによる一本鎖切断に必要な領域、およびTraIの結合部位と切断に高感受性になる部位を全て含むものである(図4-7D参照)。なお、pHF21はこの領域の塩基配列をFプラスミドの*oriT*領域の塩基配列と同じになるように塩基置換したプラスミドであるが、R100のTraIではニックは入らなかった。これはFとR100の*traI*は互いに相補できないという遺伝学的データと合致する。

TraIによる一本鎖切断反応とニックング反応において、それぞれの反応に必要な領域、至適条件など類似点が多いが、ニックング反応がなぜ超らせん構造をとる二本鎖DNAを要求するのかという疑問が残る。TraIタンパク質が一本鎖を切断することから、二本鎖DNAのニックングの場合も切断に必要な部位(*sri*)が超らせん構造をとるDNA上では局所的に解離し、本質的にTraIは一本鎖DNAを認識して切断している可能性がある。この可能性を調べるために、単鎖DNA上のチミン残基を特異的に酸化するKMnO₄ (Borowiec *et al.*, 1987)を*oriT*を運ぶ超らせん型プラスミドに作用させた後、5'末端を³²Pで標識したプライマーを用いてプライマー伸長反応を行ない、伸長反応を止めた酸化チミン残基の位置を調べた。二本鎖のニックング(或いは単鎖DNA切断反応)が起こらないようなMg²⁺の非存在下の条件でTraIを加えない場合、+30 ~ +50の領域にfootprintsシグナルが出たが、ニックング部位近傍にはシグナルは出なかった(図4-7C、レーン2、5)。+26 ~ +62の部分は、TraYタンパク質の特異的結合部位(*sbyA*)であり、長大なAT rich (91 % AT)な領域である(Inamoto and Ohtsubo, 1990)ので、おそらくtorsional stressがかかる超らせんDNAでは常に解離状態にあるためKMnO₄と反応したと考えられる。一方、TraIを加えた場合、加えなかった場合とは異なりニックング部位の近くの-6、-3、-2、-1位にシグナルが現われた(図4-7C、レーン3、6)。図4-7Dには前項の一本鎖上のTraIの特異的結合位置を示すと共に、酸化チミンの位置を示した。ニックングが起こらない方のDNA鎖の-27位のチミン残基に強いシグナルがみえ、-31、-29位に弱いシグナルが出た(図4-7C、D)。この結果は、*sri*

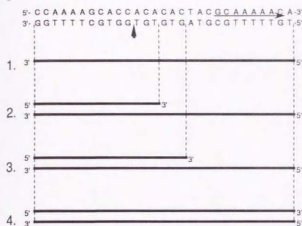
を含む領域が TraI の結合により解離することを示す。この二本鎖 DNA の局所的解離反応には ATP、その非加水分解性アナログである AMP-PNP、および ADP による影響は、2 mM の濃度の一点で比較した予備的実験の限りにおいてはみられなかった (data not shown)。

次に、合成オリゴヌクレオチドを用いて部分的二本鎖 DNA 基質を作製し (図 4-9 A)、TraI による切断効率を調べた (図 4-9 B)。予想どおり、完全な一本鎖 DNA (基質 1) を基質とした場合、非常に効率よく切断されたが、完全な二本鎖 DNA (基質 4) を基質とした場合、全く切断されなかった。しかし、切断部位から 3' 側に 4 番目の塩基から 3' 側が一本鎖になっている基質 (基質 2) では、完全な一本鎖 DNA 基質の場合と比べて若干反応速度が低下するもののほぼ完全に切断された。二本鎖の部分がさらに 3 bp だけ長くなった基質 (基質 3) では、1 割程度の基質しか切断されなかった。以上の結果は切断部位の 3' 側の部分が一本鎖状になっていることが TraI の切断に必要であることを示す。

(4) 一本鎖 DNA の再結合

TraI が一本鎖 DNA を切断後、逆反応である再結合する活性もあるかもしれないと考え、切断部位を持つオリゴヌクレオチドを 2 種合成し、その間での組み換え体が TraI の存在下で形成されるかどうかを調べた。実際の実験には、それぞれの 5' 側及び 3' 側に 15 nt の相補的リンカー配列を付加的に持つような同じ長さ 55 nt を持つ 2 種のオリゴヌクレオチドを合成し、これらをリンカー部分でアニールさせたもの (図 4-10 A (1)) を基質として使用した。二つの基質を別々に TraI と反応させると 55 nt のオリゴヌクレオチドから 44 nt と 11 nt の断片 (図 4-10 A (2)) が、他の 55 nt のオリゴヌクレオチドから 26 nt と 29 nt 断片 (図 4-10 A (2)) が生じる。このとき切断で生じた 26 nt と 11 nt の断

A



B

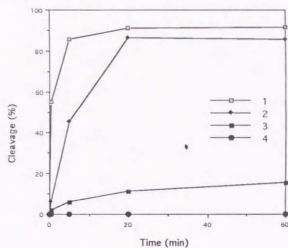
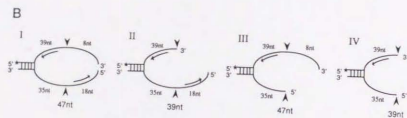
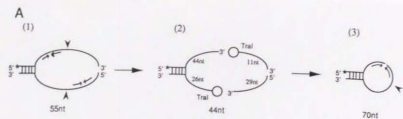


図4-9. 部分的二本鎖オリゴヌクレオチド基質のTraIによる切断

(A) 部分的二本鎖オリゴヌクレオチド基質。図上はR100の*oriT*付近の塩基配列であり、矢尻はニック部位を示す。基質1は図に示した下ストランドと同一の配列をもつオリゴヌクレオチドで、その5'末端を ^{32}P 標識してある。基質2~4は上ストランド中、線で示した部分の配列を持つように合成したオリゴヌクレオチド(未標識)を基質1とアニールさせたものである。(B) 各基質0.4 pmolをTraI 9.6 pmolと37℃で反応させ、30秒後、5分後、20分後、60分後にサンプリングして、切断活性を測定した結果を示すグラフ。(切断活性の測定法については図4-5参照)



C

Substrate	Top	Bottom	Label	Trail
I	0	0	0	0
II	0	0	0	0
III	+	+	+	+
IV	+	+	+	+
	1	2	3	4

D

Substrate	I	II	III	IV
Top	+	+	+	+
Bottom	+	+	+	+
Label	+	+	+	+
Trail	+	+	+	+
	1	2	3	4

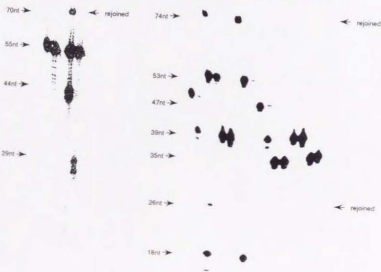


図4-10. TraIの一本鎖DNA再結合活性

(A) 一本鎖DNA再結合活性の検出系。(I) 一本鎖DNA再結合活性の検出に用いた基質。*oriT*配列の5'側あるいは3'側に相補的リンカー配列を付加した2つのオリゴヌクレオチド(55 nt)をリンカー部分でアニールさせたもの。楔形は切断部位を示し、矢印は逆向き反復配列を示す。*印はオリゴヌクレオチド末端の³²P標識を表す。上側(あるいは下側)のオリゴヌクレオチドの5'末端を³²P標識してある。(2) TraIにより切断された基質を表す。切断により生じる4つの断片の長さを書き込んであるが、標識されているのは44 ntの断片のみである。白丸は切断部位の5'末端と共有結合しているTraIタンパク質を示す。(3) (2)の44 ntの断片と26 ntの断片との間で再結合が起こると生じるはずの70 ntの産物。(B) 再結合反応に必要な部分を定めるための基質。切断により生じるはずの各断片の長さを書き込んだ。矢印は8 bpのステム・ループの内側のステム部分のみをもつことを表す。(I) 8 bpのステム・ループの外側のステム部分を除いた基質。(II) 上側のオリゴヌクレオチドの切断部位の5'側をはじめから欠く基質。(III) 下側のオリゴヌクレオチドの切断部位の3'側をはじめから欠く基質。(IV) 上側のオリゴヌクレオチドの切断部位の5'側と下側のオリゴヌクレオチドの切断部位の3'側の両方をはじめから欠く基質。(C) Aに示したアッセイ系を用いて検出されたTraIタンパク質の一本鎖DNA再結合活性。上側のオリゴヌクレオチドの5'末端を標識した基質(ゲルの上の"top"の所に*印で示した)または下側のオリゴヌクレオチドの5'末端を標識した基質(ゲルの上の"bottom"の所に*印で示した)0.4 pmolをTraIタンパク質9.6 pmolと共にMg²⁺存在下で37°Cで1時間インキュベートし、8%ポリアクリルアミド・シーケンズ用・ゲルで電気泳動した。ゲルの左にシーケンズ・ラダーをマーカーにして測定した各断片の大きさを示す。また、ゲルの右に再結合産物の位置を矢印で示した。(D) Bの各基質の再結合を調べたもの。反応時間が30分である以外はCと同様に解析した。各記号についてもCと同様である。なお、CとDにおいて切断産物のすぐ下に出ているバンドは、切断産物が切断部位から2塩基ずれたところでTraIにより誤って再び切断された産物である(本文参照)。また、レーン4において8 ntの断片と18 ntの断片(BのII参照)との間の再結合産物(26 nt)がわずかに生じている。

片の5'末端にはT_{ra}Iが結合しているはずである(図4-1 0 A(2))。もしT_{ra}Iに切断部位での再結合活性があるならば、リンカー部分で二本鎖になりつながっている44 ntと26 ntのオリゴヌクレオチドが再結合し70 ntの長いオリゴヌクレオチドが効率良く生じるはずである(図4-1 0 A(3))が、29 ntと11 ntが再結合したものは生じたとしても効率は悪いと考えられる。そこで、まず、2種のオリゴヌクレオチドの内、前者の55 nt(リンカー配列を5'端に持つ)の5'末端を³²Pで標識したものと、標識していない後者の55 ntのオリゴヌクレオチドを基質としてT_{ra}Iを作用させたところ、標識された44 ntの切断断片と同時に、70 ntの再結合された産物が検出された(図4-1 0 C、レーン3)。一方、後者の55 ntのオリゴヌクレオチド(3'端にリンカーを持つ)の5'末端を標識して同じ実験を行なうと、切断により生じた29 ntの断片の他に再結合により生じるはずの40 ntの断片は検出できなかった(図4-1 0 C、レーン4)が、この結果は予期した通りのものであった。ここで使用したオリゴヌクレオチドは、ステム・ループを取りうる配列を含むが、この外側のステム配列を欠いたオリゴヌクレオチドを、両方に持つような部分的二本鎖DNA基質(図4-1 0 B(I))で同じ実験を行なったところ、いずれの場合も同様に再結合産物が生じた(図4-1 0 D、レーン2)。この結果は、再結合には完全なステム・ループ構造は必要ではないことを示す。また、このときの再結合活性は、ステム・ループをとりうる配列を含む基質(図4-1 0 A(1))を用いた場合と比べかなり上昇した(図4-1 0 C、レーン3及びDレーン2)。これは、再結合に先立つ切断反応の効率が上昇したためと考えられる(図4-2(2)参照)。また、下ストランドの5'末端を標識した基質を用いた場合も、非常に少ないながら、26 ntの再結合産物が検出できた(図4-1 0 Dレーン4)。これは、前述のように、この再結合産物が一種の分子間反応で生じるのに対し、74 ntの再結合産物は一種の分子内反応により生じるために、反応効率が著しく違うためと考えられる(図4-1 0 A(2)参照)。

次に切断の3'側あるいは5'側をはじめて欠くような基質(図4-10B II, III, IV)を用いて再結合を調べたところ、5'側を欠く基質(図4-10B II)では再結合がみられたが(図4-10D、レーン6)、3'側を欠く基質(図4-10B III, IV)では再結合は起こらなかった(図4-10D、レーン10、14)。この結果は再結合にはそれに先だって切断により、切断部位の5'末端と TraI タンパク質との複合体が形成されることが必要であることを示す。

さらに、この再結合反応にどのような塩基配列が必要であるかを調べるために、図4-10B IIの基質の上側のストランドの3'側の部分に様々な塩基置換を導入した基質を用いて再結合活性を測定したところ、3'側から11個の塩基(+1~+11)が効率良い再結合に必要で、特に3'側から5個の塩基(+1~+5)が非常に重要なことが示された(data not shown)。

3. 考察

(1) TraI による二本鎖 DNA のニッキングと単鎖 DNA 切断反応

本論文において、TraI タンパク質が単鎖DNA切断活性を持つことを示した。一本鎖の切断は、二本鎖DNAのニッキングと同じ部位で起こり、切断された5'末端に二本鎖DNAニッキングの場合と同様TraIが共有結合する。塩基置換を導入した基質を用いた実験とDNase I footprintingの実験から、一本鎖DNAの切断に必要なTraIの認識領域が二本鎖DNAのニッキングに必要な領域とほぼ一致すること、又、両反応の種々のパラメーターの至適条件が、類似していることなど、一本鎖の切断と、二本鎖のニッキング反応に類似点は多かったが、TraIによる二本鎖へのニッキングにはDNAの超らせん構造が必要であることが特徴である。本論文において、超らせん二本鎖DNA上のニック部位周辺が、

TraI の結合によって局所的に解離し、この解離によって生じた一本鎖に作用することによって、本質的には一本鎖切断と同じ反応が起こることを示した。一本鎖 DNA 切断反応と二本鎖 DNA のニッキング反応において、両者とも至適 NaCl 濃度はともに 20 mM 付近であったが、二本鎖の場合 100 mM で活性はほとんど検出できないレベルにまで低下したのに対して、一本鎖の場合 100 mM でも約 1 割しか活性が低下しないという違いが見られた。この結果は、ニッキング反応の基質である超らせん DNA が、高塩濃度中では局所的解離が起こり難く、TraI タンパク質が作用する一本鎖 DNA が露出されないためであるという可能性が考えられる。あるいは、*oriT* 付近が局所的に解離したような切断に必要な DNA-タンパク質複合体が TraI 二量体により形成されるが、高塩濃度中で存在する単量体ではこのような複合体が形成されない可能性も考えられる。

超らせん DNA 上の、ニッキングに必要とされる領域が、どのようなメカニズムで局所的に解離するのか、今のところよく分からないが、この解離に ATP は必要とされない事実から、TraI のヘリカーゼ活性が関係する反応ではないと考えられる。ニッキングに必要な配列中には、一本鎖切断に必須のプリン・ピリミジン・コポリマー配列 GTGTGT が存在するが、これらが超らせん DNA 中での局所的解離に関与するのかも知れない。超らせん DNA の局所的解離部位の解析中に、TraI タンパク質の非存在下で TraY タンパク質の結合する長大な AT rich (91% AT) な領域 (*sbyA*: Inamoto and Ohtsubo, 1990) が、おそらく torsional stress がかかる超らせん DNA では常に解離状態にあることが偶然に明らかになった。*in vitro* において、TraY タンパク質が TraI のニッキング効率を促進するという結果(第二章)を考慮すると、TraY が *sbyA* に結合することによって、この領域の局所的解離が妨げられ、その結果、超らせん DNA 上の *sri* 領域に torsional stress が波及し解離しやすくなり、TraI タンパク質によるニッキング効率が上がるのではないかと考えられる。

塩基置換を導入した基質を用いた実験、及び DNase I footprinting による解

析の結果から、約19 nt の *sri* 配列を含む短い一本鎖 DNA を基質にした場合、TraIにより非常に良く切断されるが、この部分からさらに 5' 側にある 8 bp の *sri* 内部の配列とステムを形成し得るループ構造配列が存在するものを基質とした場合、反応は阻害されることが示された。このような合成オリゴヌクレオチドを基質として用いた場合でも、ATPにより切断反応が促進されたという結果は、ATP 存在下では TraI の DNA ヘリカーゼ活性によりステム・ループ構造が壊され TraI の *sri* への結合が可能になったためであることを示唆している。このステム・ループ構造は、TraIによる逆反応である再結合反応にも必要ではなく、この構造がどのような役割をするのかどうか現在のところ分らない。

DNA の超らせん構造を要求するニッケースはこれまでに gpII、MuA など幾つもの例が知られている (Higashitani et al., 1994; Surett et al., 1989; Surett and Chaconas, 1989)。これらのニッケースの詳しい反応機作についてはよくわかっていないが、共通の機構、おそらくは DNA の超らせん構造に依存した *tortional stress* によるニック部位の局所的解離を必要としているのではないかと想像される。

(2) 再結合反応と DNA 伝達

本論文において単鎖切断反応の逆反応がおこり、切断されたDNA鎖が再結合し元のDNA鎖が生じることが示された。この反応は、TraIによる切断で生じたTraIタンパク質が結合しているDNAの5' 端（おそらく高エネルギー状態にある）と、同じく切断で生じた3' 端とつなぎ換える反応である。

F型プラスミドとは若干異なった様式で伝達されるプラスミド RP4 (IncP)、pSF1010 (IncQ) はニッケースをコードするが、これも一本鎖 DNA の特異的部位を切断する活性およびその切断部位での再結合活性が示されている (Pansegrou et al., 1993; Bhattacharjee and Meyer, 1993)。線状ファージ ϕ X174、M13、fd、f1 などの+鎖複製にそれらがコードするニッケース (gpA、gpII な

ど)が、二本鎖 DNA (RF型) 上にローリングサークル型複製の開始に必要なニックを入れるが、このニックはローリングサークル型複製後に生ずる一本鎖 DNA 一単位ごとに切断し環状一本鎖 DNA を作り出すという終結反応にも関与すると考えられている (Kornberg and Baker, 1992)。F 型プラスミドの接合伝達の場合、生じたニックの位置からローリングサークル型複製が始まると考えられる。F 型プラスミドである R100 の TraI が一本鎖 DNA 切断活性及び再結合活性を持つことは、TraI ニッケースがローリングサークル型複製後、一周したところで現われる *oriT* を切断し、最初に生じた TraI が結合している 5' 末端とつなぎ換え、一単位を作り出すという、基本的には環状ファージの一本鎖環状 DNA を作り出す反応と類似した反応が起こるのかもしれない。

第五章 総括

1. TraI タンパク質によるニッキングの反応機作

TraI タンパク質によるニッキング反応の基質としては、ニック部位を含む *sbi* と命名した約 18 bp の塩基配列が必要であり (第四章)、かつ DNA の超らせん構造が要求される (第三章)。ニッキングは TraI 単独で正確に起こるが (第二章)、その効率はあまりよくない (第三章)。また、宿主タンパク質 IHF と TraI タンパク質はこの反応を促進させる (第二章)。さらに、TraI タンパク質は一本鎖 DNA を基質とした時も、二本鎖 DNA のニッキングと同一の位置で切断する活性があり、しかも必要十分な塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを基質とした場合、非常に高い反応効率を示すようになることから、二本鎖 DNA のニッキング反応も本質的には一本鎖 DNA の切断反応であることが示唆された (第四章)。実際、TraI タンパク質は、線状二本鎖 DNA 上の配列 (*sbi*) に対しては特異的に結合しないが (第三章参照)、一本鎖 DNA 上の配列 (*sn*) に特異的に結合することが示された (第四章)。また、部分的二本鎖 DNA 基質を用いた解析から、TraI による切断には *sn* 部分が一本鎖状になっていることが必要であることがわかった (第四章)。さらに、超らせん型二本鎖 DNA を用いた TraI タンパク質の KMnO_4 footprinting から、この領域が TraI に依存して局所的に解離することが示された (第四章)。

以上のような本研究の結果から、TraI タンパク質による *oriT* への特異的ニッキング反応は次のような機構で起こると考えられる。TraI タンパク質は超らせん二本鎖 DNA のニックの入る方の鎖上の配列 (*sn*) を認識し (図 5-1 a)、結合すると同時にこの領域を安定的に解離させ (図 5-1 b)、 Mg^{2+} の存在下で本質的には一本鎖 DNA の切断反応と同じ形で特異的な切断を入れ、その 5' 末端と共有結合をする (図 5-1 c)。

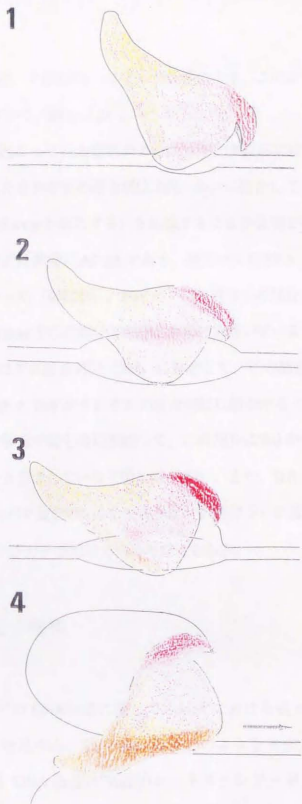


図5-1. Tralによるニッキングの反応機構モデル

二本の線は超らせん型二本鎖 DNA 上の *oriT* 近傍を示し、色付けした図形は Tral 二量体を表す。(1) Tral はニックの入る方の DNA 鎖上の配列 (*sri*) を認識する。(2) Tral は *sri* に結合すると同時にそのまわりの二本鎖 DNA を局所的に解離させる。(3) Tral は Mg^{2+} 存在下で本質的には一本鎖 DNA として特異的切断を入れ、その 5' 末端と共有結合をつくる。(4) Tral は Mg^{2+} 、ATP 存在下でそのヘリカーゼ活性によりニックの位置から二本鎖 DNA を巻き戻していく。

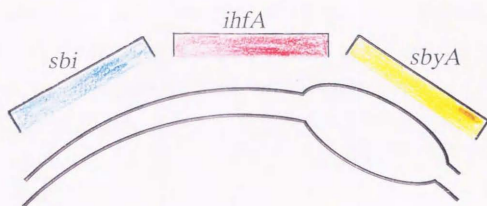
次に TraI タンパク質は、その DNA ヘリカーゼ活性により、このニックの位置から二本鎖 DNA を巻き戻していく (図 5-1 d)。

実際に *in vivo* で起こっている効率のよいニッキング反応には、IHF と TraY が TraI の作用部位に隣接したそれぞれの結合部位 *ihfA*、*shyA* に結合して、TraI と共に DNA-タンパク質複合体 (*oriT*-some と命名する) を形成することが必要と考えられる。TraY の結合部位 (*shyA*) 付近は非常に AT rich であり、超らせん型 DNA 上では局所的に解離していることがわかった (第四章)。TraY タンパク質はこの部分に結合して、超らせん構造による *torional stress* がこの部分で解放されるのを防いでいるのではないかと考えられる。また、IHF はその結合部位 (*ihfA*) に結合して、この部分で DNA を湾曲させると考えられる。IHF と TraY がそれぞれの結合部位に結合することにより、TraI の認識・結合部位 (*sn*) 付近が安定的に解離して、この部分に TraI が効率よくエンタリーされるのではないかと想像している (図 5-2 参照)。また、TraY タンパク質 (あるいは IHF) は、TraI タンパク質とのなんらかのタンパク質-タンパク質相互作用を通して、TraI タンパク質のエンタリーを助けている可能性もある。

2. DNA 伝達の分子機構

F 型プラスミドの DNA 伝達に関して本研究における我々の結果及びこれまでに得られている知見から、我々は、現在次のようなモデル (図 5-3 参照) を考えている。1) DNA 伝達は TraI のエンドヌクレアーゼ活性により *oriT* にニックが入ることにより開始する。このニッキング反応は TraY タンパク質と IHF により促進される。2) TraI の DNA ヘリカーゼ活性によりニックの位置から二本鎖 DNA は巻き戻されて一本鎖 DNA が生じる。この一本鎖の 5' 側から受容菌へ伝達されることが示されているが (Ohki and Tomizawa, 1968; Ihler and Ruppe, 1968; Choen, 1968)、ニッキングで生じた 5' 末端は TraI タンパク質

A



B

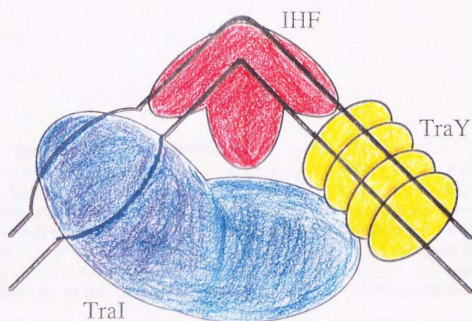


図5-2. TraI、IHF、TraYによるニッキングの反応機構モデル

(A) 超らせん型二本鎖 DNA 上の *oriT* 領域。 *sbi*、*ihfA*、*sbyA* はそれぞれ TraI、IHF、TraY の結合部位を示す。 *sbyA* 付近は非常に AT rich であり、torsional stress により局所的に二本鎖が解離している。(B) TraI-IHF-TraY-*oriT* 複合体 (*oriT*-some)。 IHF が *ihfA* に結合して DNA を湾曲させ、TraY が *sbyA* に結合し、この部分での torsional stress の解放を防ぐとともに新たな torsion を加える。 IHF、TraY の働きにより *sbi* 領域が安定的に解離し、TraI のエントリーが促進される。

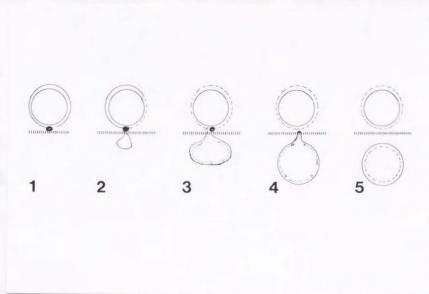


図5-3. DNA伝達の分子機構モデル(その1)

(1) DNAの伝達は *Tral* が *oriT* に特異的にニックを入れることにより開始する。ニックの5'末端は *Tral* (黒丸) 上に共有結合で固定される。(2) *Tral* のヘリカーゼ活性により、ニックのあった方のDNA鎖がループ状にはがされ受容菌へ送り込まれる。(3) 供与菌側ではニックの3'末端をプライマーとしたローリング・サークル型複製が、受容菌側ではラギング鎖型複製が始まる(点線は新たに合成されたDNA鎖を表す)。ローリング・サークルが一周したところで、*Tral* は新たに生じる *oriT* 配列を切断し、その3'末端を結合してニックの5'末端とつなぎ換え、(4) 再環状化することによりDNAの伝達は1単位で正確に終結される。(5) 最終的には供与菌、受容菌双方とも1コピーのプラスミドを持つことになる。

と共有結合していること（第二章）、F型プラスミドの伝達ではDNA以外にタンパク質の受容菌への移動はないこと（Silver et al., 1965; Rees and Wilkins, 1989, 1990）から、TraIタンパク質は供与菌内に残っており、従っておそらく5'端に近い一本鎖DNAがループ状で受容菌へ移行するのではないかと想像される。3）一本鎖伝達と同時に供与菌内でニッキングで生じた3'末端をプライマーとしたローリングサークル型の複製が始まり、受容菌内では伝達されたプラスミド上に存在するssi部位（Yoshioka; Nomura et al., 1991）におけるプライミングが起こり、ラギング鎖型の複製が行なわれる。4）ローリングサークルが一周したところで、TraIはtransfer strand中の再び現われるoriTのところでは切断し、生じる3'端とすでにTraIと結合した状態で存在する5'末端とつなぎ換え、環状化された正確な一単位のプラスミドDNAを作り出す。5）最終的に二本鎖のプラスミドのコピーが生じ伝達は終結する。

DNA伝達に関して、DNAヘリカーゼ以外にDNA移動の駆動力となる“モータータンパク質”の候補がないことから、これがDNA移動の駆動力となつて一本鎖DNAを受容菌に押し込むと想像されているが、これに関しては現在全くわかっていない。DNA伝達に必要なF因子の遺伝子*traD*の産物であるTraDタンパク質が精製され、その抗体を用いてTraDが内膜に存在することが示され、また、一本鎖DNAと親和性があることが示唆されている（Panicker and Minkley, 1992）。さらにTraDはATP結合部位のコンセンサス配列をもつことが示唆されており（Yoshioka et al., 1990）、このTraDタンパク質がDNA移動の駆動力となる可能性もある。しかし、TraDは膜タンパク質であり、一本鎖DNAと親和性があることが示唆されていることから（Paniker, 1985 Ph.D. thesis; Panicker and Minkley, 1992）、TraDはDNA伝達の通り孔を形成すると考えられる（総説：Ippen-Ihler and Minkley, 1986）。もしそうなら、伝達される一本鎖DNAの5'端に結合しているTraIはTraDと会合することによって固定されている可能性がある。以上の点から、TraDタンパク質の機能を明らかにす

ることが重要と考え、最近我々はTraDタンパク質を精製し、その精製標品がATPase活性を持つこと、さらにTraI-カラムに特異的にトラップされることから両タンパク質間の相互作用が示唆されることを示した (Fukuda, Kanegae and Ohtsubo, unpublished data)。したがって、TraDタンパク質の機能について、次のようなモデルを考えている (図5-4参照)。TraDタンパク質は内膜に存在しDNAの伝達孔を形成している。TraIタンパク質はTraDと会合することにより内膜上のDNAの伝達孔の附近に固定され、ニックの5'末端をつかんだままの形でtransfer strandを巻き戻しながらDNA伝達孔の中へ押し込む。TraDタンパク質はATPの加水分解のエネルギーを利用してTraIにより送り込まれてきたDNA鎖を受容菌へと輸送する。

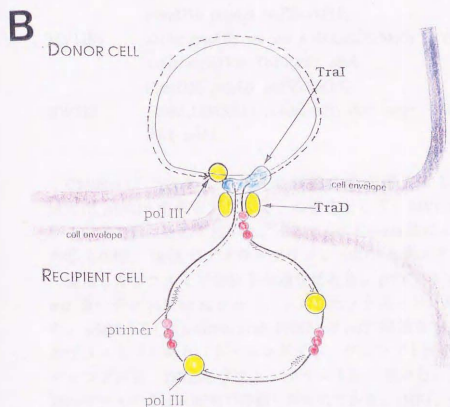
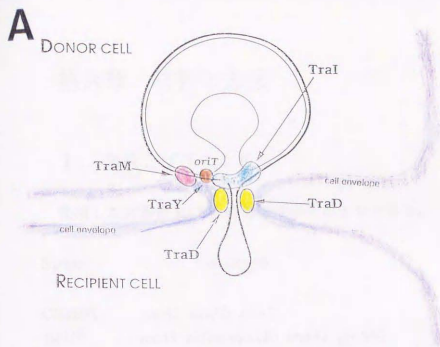


図5-4. DNA伝達の分子機構モデル(その2)

(A) TraD は内膜に存在し、DNA 伝達口を形成する。TraM は *oriT* 領域を膜に固定する。TraI は IHF、TraY の助けをかりて、*oriT* にニックを入れ、その 5' 末端と共有結合する。TraI は TraD と会合して DNA 伝達口近傍に固定され、ヘリカーゼ活性によりニックの入った方の DNA 鎖をはがしながら伝達口へ送り込んでいく。TraD はおそらくは ATP の加水分解のエネルギーを使って DNA 鎖を受容菌へと輸送する。(B) DNA の伝達と同時に、供与菌側ではニックの 3' 末端をプライマーとしたローリング・サークル型の複製が、受容菌側ではラギング鎖型の複製が行われる。このとき、宿主の複製酵素、DNA ポリメラーゼ III、SSB、*dnaG* プライマーゼが必要とされる。

第六章 材料と方法

1. 菌株とプラスミド

使用した大腸菌 K12 株の菌株は以下の 4 つである。

Strain	Genotype	reference
CSR603	<i>recA1 uvrA6 phr-1</i>	Sancar et al., 1979
JM109	<i>recA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 hsdR17 relA1 supE44</i> F[<i>traD36 proAB lacI'</i> Z Δ M15]	Yanisch-Perron et al., 1985
MV1184	Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>ara thi</i> ϕ 80 <i>LacZ</i> Δ M15) Δ (<i>srl-recA</i>)306::Tn10(<i>ter</i>) <i>strA</i> F[<i>traD36 proAB lacI'</i> Z Δ M15]	Vieira and Messing, 1987
BW313	HfrKL16PO/45 [<i>lysA</i> (61-62)] <i>dut1 ung1</i> <i>thi-1 relA1</i>	Kunkel, 1985

CSR603 は *TraI* タンパク質の精製の際の宿主として用いた。JM109 は pUC18, pUC19 由来のプラスミドの宿主として、MV1184 は pUC119 由来のプラスミドの宿主として用いた。BW313 は Kunkel 法による部位特異的塩基置換の導入の際、DNA にデオキシウリジン (dU) を導入するために用いた。

使用したプラスミドは以下の通りである。pYY35-1 (Inamoto et al., 1991) は *traI* 遺伝子を pUC18 にクローニングしたプラスミドであり、*TraI* の精製に用いた。pSI87-XE1 (Inamoto et al., 1991) は *oriT* 領域を pUC19 にクローニングしたプラスミドであり、ニックング反応、ゲルシフト反応、フィルター・バインディング反応、DNaseI フット・プリント法に用いた。pHF と名付けられた一連のプラスミドは本研究で作製したものである。pHF1、pHF4、pHF6、pHF11、pHF12、pHF14、pHF15、pHF17 は R100 の *oriT* 断片を pUC18 にクローニングしたものである (図 3-1、3-8、4-1 参照)。pHF20-30 と pHF20-32 は pHF4 と同じ *oriT* 断片を pUC119 に逆向きにクローニングしたものであり、一本鎖 DNA を調製した際には、それぞれ *oriT* 領域の上ストランド、下ストランド (図 4-1 参照) を持つことになる。pHF21~pHF32 は pHF20-30 に図 4-8 に示したような塩基置換を導入したプラスミドである。

一本鎖 pUC119 はヘリカーゼ活性測定用の基質をつくる際にも利用した。

2. 培地

使用した培地を以下にまとめる。

L-rich 培地	11 当たり	ペプトン (極東製薬工業) 25g, bacto yeast extract (DIFCO) 7.5g, NaCl 6g, 2N NaOH 3.3ml
2×YT 培地	11 当たり	ペプトン 16g, bacto yeast extract 10g, NaCl 5g, 2N NaOH 6.5ml
LB 培地	11 当たり	ペプトン 10g, bacto yeast extract 5g, NaCl 10g, 2N NaOH 4.5ml
φ 培地	11 当たり	ペプトン 20g, bacto yeast extract 5g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 10.2g, 1M KOH 10.5ml

これらの培地は全て調製後 120℃ 15 分間のオートクレーブで滅菌した後に使用した。L-rich 培地は JM109, MV1184, BW313, CSR603 の培養に用いた。2×YT 培地は DNA の大量調製 (Ohtsubo et al., 1978) の際の培養に用いた。これらの培地にはオートクレーブした 20% グルコースを 1/100 容量加えて使用した。φ 培地はルビジウム形質転換法 (Yoshioka et al., 1987) の際の本培養に用いた。LB 培地は 1.5 % の細菌用寒天 (栄研化学) を加えて平板培地として用いた。なお、平板培地には必要に応じてアンピシリン (Sigma)、グルコースを加えてコロニーの選択に使用した。その際アンピシリンは 50~150 μg/ml、グルコースは 0.2% になるように加えた。

3. 試薬

SDS と DTT はナカライから、グルタルアルデヒド 10 % 水溶液 (E.M. グレード) は和光純薬から、タンパク質電気泳動用のスタンダードは BioRad Laboratories または Pharmacia Biotech からそれぞれ購入した。その他の使用した試薬はそのつど述べた。特に示さない限り、和光純薬より購入したものを使用した。

4. 酵素

使用した制限酵素のうち *Rsa* I、*Hph* I、*Nar* I、*Nsi* I、*Bam*HI、*Hind*III は New England Biolabs より、*Ban* I は東洋紡より、*Xho* II は Boehringer Mannheim よりそれぞれ購入した。その他の制限酵素及び DNase I、T4 polynucleotide

kinase, DNA polymerase I Klenow fragment, Bacterial alkaline phosphatase (BAP)、T4 DNA ligase は宝酒造より購入した。Recombinant Taq DNA polymerase (AmpliTaqTM) は Perkin Elmer Cetus より購入した。SSB は Promega から購入した。RNase A、proteinase K は Sigma より購入した。これらの酵素は全て製造元の示す反応条件にて使用した。

5. プラスミド DNA の調製

pSI87-XE1 は 11 の培地より CsCl 濃度勾配を用いる Ohtsubo らの方法 (1987) に従って調製した。その他のプラスミドはアルカリ-SDS 法 (Maniatis et al., 1982) によって調製した。一度に多試料からプラスミド DNA を迅速に単離、同定するためには Machida ら (1982) による crude lysis 法を用いた。pUC119 由来のプラスミドの一本鎖 DNA を調製する際にはバクテリオファージ M13 KO7 をヘルパー・ファージとして用いた (Vicira and Messing, 1987)。

6. 形質転換

菌体の形質転換にはルビジウム法 (Yoshioka et al., 1987) を用いた。

7. DNA 塩基配列の決定

作製したプラスミドの塩基配列の確認にはジデオキシ法 (Sanger et al., 1977; Messing, 1983) を用いた。その際 7-DEAZA Sequencing Kit Ver.2 または BcaBESTTM Dideoxy Sequencing Kit (宝酒造) を用い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (15TBq/mmol: Amersham) の取り込みによって標識を行った。また、DNase I フット・プリント法、プライマー伸長法の電気泳動の位置マーカーは、5' 末端を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (166.5TBq/mmol: Amersham) によるリン酸化で標識したプライマーを用いて M13 Sequencing Kit (宝酒造) を用いジデオキシ法により作製した。いずれの場合も DNA 鎖の伸長には DNA polymerase I Klenow fragment または BcaBESTTM DNA polymerase を用いた。

8. オリゴヌクレオチドの合成

塩基配列決定や、プライマー伸長法、PCR 法、Kunkel 法及び反応基質に用いたオリゴヌクレオチドは、Applied Biosystem 社の DNA 合成装置 model 380B 又は model 392 を用いてホスホアミダイト法によって合成した。合成に要する試薬は Applied Biosystem 社及び Cruachem 社より購入した。反応基質に用いたオリゴヌクレオチドは 9% ポリアクリルアミド変性ゲルから切り出して精製した (Maniatis *et al.*, 1982)。

9. プラスミド DNA への部位特異的塩基置換変異の導入

プラスミド pHF20 に図 4-8 に示したような部位特異的塩基置換を導入する際には Kunkel 法 (Kunkel, 1985) を用い、Mutan-K Kit (宝酒造) を使用した。

10. PCR 法

図 3-8 に示すような DNA 断片を作製する際には、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用い、AmpliTaQ DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) を使用した。反応条件は Umeda らの方法 (1991) に従った。

11. TraI タンパク質の精製 (第二章)

TraI タンパク質の精製は、F 因子を保持する宿主からの Helicase I (TraI) の精製法 (Lahue and Matson, 1988) を改変し、以下のように精製した。

TraI タンパク質を過剰生産する多コピー・プラスミド pYY35-1 (Inamoto *et al.*, 1991) を保持する宿主菌 CSR603 を L-rich 培地中で一晩前培養の後、坂口フラスコ中の L-rich 培地 (0.04% のグルコースを含む) 250ml に 2.5ml 接種し、37℃にて振とう培養する。OD₅₅₀ が約 0.8 (4~5 時間後) になったところで、IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 溶液を 0.4 mM の濃度になるように加え、更に 37℃で約 18 時間振とう培養した。培養液を氷水中で冷却し、速心にて集菌した。以下の操作は特に示さない限り 0℃~4℃で行った。集めた菌体を冷却した 25 ml のバッファー S (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 10% Sucrose) で洗い、再び速心で集菌した。培地 3 l に相当する菌体 (湿重量 11.5 g) を 1 つにまとめ、22.2 ml のバッファー S に再び懸濁して、-80℃にて

保存した。

この菌体を氷中にて融解し、遠心管に移した後、NaClを終濃度 0.5 M、リンチームを 0.2 mg/ml になるように加え、45 分間水中に置いた。その後、この懸濁液をドライアイス/エタノール中で急速凍結させ、37℃の水浴中で再融解する。この操作を 4 回繰り返して菌体を破壊後、39000×g、1 時間の遠心で細胞残さを沈殿させて除いた。この上清を硫酸沈殿 (0.3 g/ml) 後、27000×g、15 分間の遠心で沈殿を集め、3 ml のバッファー A (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.1mM EDTA, 1mM 2-mercaptoethanol, 20% glycerol) に溶解し、バッファー A 中で透析後、沈殿を 27000×g の遠心で除いた。

こうして得たサンプルを phospho-cellulose カラム (Wattman P11) に通し、カラムの 2 倍容量のバッファー A で洗った後、0 M ~ 0.5 M の NaCl の濃度勾配を有するバッファー A で溶出した。溶出した各フラクションを SDS-PAGE で調べた結果、0.37 M ~ 0.42 M NaCl (ピーク 0.39 M) に相当するフラクションを選択した。

このサンプルを 50 mM NaCl を含むバッファー A で透析後、ssDNA-cellulose カラム (Pharmacia) に通し、洗った後、50 mM ~ 1 M NaCl の濃度勾配を有するバッファー A で溶出した。各フラクションを SDS-PAGE で調べた結果、0.24 M ~ 0.42 M NaCl (ピーク 0.29 M) に相当するフラクションを選択した。

このサンプルを 250 mM NaCl を含むバッファー A で平衡化した Sephacryl S-200 HR カラム (Pharmacia) にかけた。SDS-PAGE で確認後、void volume で溶出してきたフラクションを透析チューブに入れ、Sephadex G-100 樹脂 (Pharmacia) で濃縮し、バッファー A' (50% グリセロール、100 mM NaCl を含むバッファー A) 中で透析し、TraI タンパク質標品として -20℃ で保存した。

1 2 . TraI タンパク質の精製 (第三章)

前項では SDS-PAGE のバンドのみを指標に TraI タンパク質を精製したが、TraI タンパク質の特異的ニッキング活性を指標にして (20. ニッキング反応、参照)、大量精製を試みた。精製にはバッファー A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT and 20 % glycerol) を用いた。

前項と同様の方法で TraI タンパク質を過剰生産した大量の菌体 (88 g) から細胞破砕抽出液を調製し、バッファー A で平衡化した phosphocellulose P11 カラム (2.5 cm x 7.6 cm; Wattman) にのせ、同じバッファー A で 3 カラム分洗った後、0 M ~ 1.0 M の NaCl 濃度勾配をもつバッファー A 400 ml で溶出した。TraI エンドヌクレアーゼ活性をもつフラクション (0.19 ~ 0.31 M NaCl) をブールし、50 mM NaCl を含むバッファー A に透析した。このサンプルの 1/10 量を同じバッファーで平衡化した MonoQ (HR 5/5; Pharmacia) カラムにのせ、2 カ

ラム分洗った後、50 mM ~ 400 mM の NaCl 濃度勾配をもつバッファー A 20 ml で溶出した。TraI エンドヌクレアーゼ活性をもつフラクション (155~164 mM NaCl) をブールした。この操作を10 回繰り返した。このサンプルを 200 mM NaCl を含むバッファーで平衡化した Superdex 200pg (Hiroad 16/60; Pharmacia) カラムにかけ、TraI エンドヌクレアーゼ活性のピーク・フラクション (Kav of 0.172) をブールし、50 mM NaCl を含むバッファー A に透析した。この操作を 4 回繰り返した。このサンプルをを同じバッファーで平衡化した HiTrap Heparin (10 ml; Pharmacia) カラムにのせ、5 カラム分洗った後、50 mM ~ 1.0 M の NaCl 濃度勾配をもつバッファー A 50 ml で溶出した。TraI エンドヌクレアーゼ活性をもつフラクション (0.40~0.53 M NaCl) をブールした。これを 200 mM あるいは 50 mM NaCl を含むバッファー A に透析したサンプルを最終精製標品とし、-80 °C で保存した。

1 3 . TraY タンパク質、IHF タンパク質

TraY タンパク質は Inamoto ら (1990) により精製されたものを使用した。
IHF タンパク質は金沢大学・山口和男博士より分与された精製標品を使用した。

1 4 . タンパク質の定量

タンパク質の定量は Bradford の方法 (1976) に従い、bovine serum albumin (BSA: 生化学工業) をタンパク質量の標準としてクマシー・プリリアント・ブルー (Sigma) または Bio-Rad protein assay を用いて行った。

1 5 . ヘリカーゼ反応 (第二章)

ヘリカーゼ反応に用いた基質の作製については、Dong-Soo Im らの方法 (1990) に従った。反応は 40 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM ジチオスレイトール (DTT)、50 μ g/ml BSA、基質 DNA 9 ng を含む反応液中に TraI タンパク質溶液 1 μ l (280 μ g) を加え、37°C にて 30 分間インキュベートした。反応液中にはあらかじめ必要に応じ ATP (final 1.8 mM)、MgCl₂ (final 1.3 mM) を加えておいた。gel-loading buffer (0.03% BPB 10% glycerol) を加えて反応を停止させた後、6% ポリアクリルアミド・ゲルにて電気泳動し、オートラジオグラフィを行った。

16. ヘリカーゼ反応 (第三章)

図3-4に示した基質は次のようにつくった。TEバッファー (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) 中で、一本鎖 pUC119 とその2倍量の 5' 末端を ^{32}P で標識した 51-mer のオリゴヌクレオチド (P-mcs) を混ぜ、65 °C で5分間あったためた後、室温までゆっくりと温度を下げた (約 1 °C/min)、QIAGEN tip20 (QIAGEN Inc.) によりアニールしていないオリゴヌクレオチドを除き、TE バッファーに溶解した。

標準的ヘリカーゼ反応は次のように行った。TE バッファーに溶けた基質 0.5 μl (50 fmol) を 2 μl の 5 x N バッファー (150 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM MgCl_2 , 5 mM, 50 μg BSA/ml)、0.7 μl の 20 mM ATP、5.8 μl の milli-Q 水と混合し、30 °C で5分間ブレインキュベート後、200 mM NaCl、20 % glycerol 入りのバッファー A に入った TraI タンパク質 1 μl を加えて反応を開始させた。30 °C で5分間または10分間反応後、2 μl の反応停止液 (50 mM EDTA, 0.6 % SDS, 40 % glycerol, 0.12 % BPB) を加え、8 % ポリアクリルアミド・ゲルで電気泳動した。各バンドの放射活性をイメージ・アナライザーを用いて定量し、反応効率を算出した。

17. TraI ヘリカーゼの DNA 巻き戻しの方向性

5' 末端を ^{32}P で標識し 24-mer のオリゴヌクレオチド (P52) を 42-mer のオリゴヌクレオチド (P55) とアニールさせた基質、または 5' 末端を ^{32}P で標識し 42-mer のオリゴヌクレオチド (P53) を 24-mer のオリゴヌクレオチド (P54) とアニールさせた基質を用い、上記と同様のアッセイ法で TraI による巻き戻しを調べた。ただし、用いた基質は 1 μl (0.2 pmol) であり、泳動に用いたゲルの濃度は 10 % である。

18. ニッキング反応 (第二章)

反応液

	バッファー・L	バッファー・M
Tris-HCl[pH7.5]	25.5mM	42mM
MgCl_2	10 mM	5mM
EDTA	0.1 mM	0.024mM
DTT	5 mM	1mM
BSA	0.1mg/ml	0.05 mg/ml
2-ME	0.55mM	0.027mM
NaCl	17.5mM	24mM

KCl	45 mM	
CaCl ₂	0.5 mM	
glycerol	13.5%(v/v)	12%(v/v)

略号 EDTA: ethylenediamine tetrascetic acid

BSA : bovine serum albumine

2-ME : 2-mercaptoethanol

covalently closed circular (ccc) プラスミド pSI87-XE1 (0.15 μ g) を TraY タンパク質 (0 または 0.8 μ g)、IHF タンパク質 (0 または 0.04 μ g)、TraI タンパク質 (0 または 0.28 μ g) または TraI lysate (1.4 μ g タンパク質) と共にバッファー・L 20 μ l 中、28℃ で 30 分間インキュベートしてニッキング反応を行なわせた後、2% sodium dodecyl sulfate (SDS) 1 μ l を加えて反応を停止させた。8 mg/ml RNase A 0.5 μ l を加え、37℃ で 30 分間インキュベートした。更に、25 mg/ml proteinase K 0.5 μ l を加え、37℃ で 30 分間インキュベートしてタンパク質を消化した後、10 μ l を 0.7% アガロースゲルで電気泳動した。

TraI タンパク質単独でのニッキング反応は ccc プラスミド 0.1 μ g と TraI タンパク質 0.84 μ g をバッファー・M 12.5 μ l 中、35℃ で 30 分間インキュベート後、2% SDS 0.5 μ l を加え、さらに 25 mg/ml proteinase K 0.5 μ l を加え、35℃ で 30 分間インキュベートした後、0.7% アガロースゲルで電気泳動した。

19. ニックの 3' 末端の確認

前項 (18.) の反応生成物 (反応液 10 μ l) をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿 (以後、フェノール処理と略記する) 後、Nsi I で切断し再びフェノール処理し、5' 末端を ³²P で標識した (本章 22. 項参照)。エタノール沈殿後、EcoRV で切断し、再度エタノール沈殿し、95℃ で 2 分間熱変性した後、8M 尿素を含む 4% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。

20. ニックの 5' 末端の確認

18. 項の反応生成物をフェノール処理した後、アルカリ変性 (Messing, 1983) し、5' 末端を ³²P で標識したプライマー 0.5 pmole を含む反応液 (7mM Tris-HCl[pH7.5], 0.1mM EDTA, 20mM NaCl, 7mM MgCl₂) 中で 60℃ 10分間インキュベートし、引き続き 37℃ 10分間インキュベートしてアニールさせた後、dNTP 混合液 (各 2mM) 1 μ l、Klenow fragment (0.1u/ μ l) 1 μ l を加えて 37℃

で40分間インキュベートしてDNA鎖を合成させた。得られた試料は8M尿素を含む8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。

用いたプライマーは、5'-GATCCCATTTATAAACATCA-3' (*Xho* II primer)、5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3' (M4 primer: 宝酒造)、5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (RV primer: 宝酒造) である。このうち M4 primer, RV primer は、pHF プラスミドのベクター pUC18 由来の部分にハイブリダイズするプライマーである。

2 1 . DNA 断片の ^{32}P による 5' 末端標識

プラスミド DNA から調製した DNA 断片、及び合成 DNA の 5' 末端は MEGALABELTM kit (宝酒造) を用い、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (166.5TBq/m mol: Amersham) により標識した。

2 2 . DNA 断片の ^{32}P による 3' 末端標

プラスミド DNA から調製した DNA 断片、及び合成 DNA の 3' 末端は Ausubel らの方法 (1991) に従い、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (宝酒造) を用い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddATP}$ (166.5TBq/m mol: Amersham) により標識した。

2 3 . ニッキング反応 (第三、四章)

標準的ニッキング反応は以下のように行った。TEバッファーに溶けた covalently closed circular pHF11 DNA 2 μl (37 fmol) を 3 μl の 5 x N バッファー (150 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM MgCl_2 , 5 mM, 50 μg BSA/ml)、8 μl の milli-Q 水と混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間ブレインキュベート後、200 mM NaCl、20 % glycerol 入りのバッファー A に入った *Tra*I タンパク質 2 μl を加えて反応を開始させた。37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間反応後、5 μl の反応停止液 (33 mM EDTA, 2 % SDS) を加えて反応を止めた。1 μl の proteinase K (20 mg/ml) を添加して更に 30 分間インキュベートし、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。さらにサンプル DNA を *Bam*HI で切断後、DNA 断片の 5' 末端を交換法により ^{32}P で標識した (図 3-1 参照)。95 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間熱変性した後、7M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。各バンドの放射活性をイメージ・アナライザーを用いて定量し、ニックの入った分子 (143 nt のバンドの放射活

性)の全分子(143 nt と 236 nt のバンドの放射活性の和の半分)に対する比から反応効率を算出した(図 3-1 参照)。

2 4 . ストークス半径の決定

TraI タンパク質のストークス半径は、精製標品を上記と同様に Superdex 200pg カラムでゲルろ過することにより決定した。オボアルブミン、BSA、アルドラーゼ、カタラーゼ、フェリチン、チログロブリン (gel filtration calibration kit: Pharmacia) をスタンダードに用いた。

2 5 . スクロース密度勾配沈降

スクロース密度勾配 (5~20 % w/v) を Beckman SW 50.1 ローター用の超遠心管 (13 x 51 mm) 内のバッファー A 中に形成させ、TraI タンパク質をその上にのせた。スタンダードタンパク質 (カタラーゼ、アルドラーゼ、アルブミン) 溶液を別の遠心管にのせ、20℃で 50,000 rpm、10 時間遠心した。各遠心管の底から 5 滴ずつのフラクションを分取し、SDS-PSGE および上述のタンパク質濃度決定法によりモニターした。

2 6 . TraI タンパク質の化学架橋反応

化学架橋反応は Runyon らの方法 (1993) をもとに次のように行った。10~275 mM NaCl を含むバッファー A またはニッキング反応液中の TraI タンパク質 (2.4 μ M monomer) 24℃で 10 分間インキュベートした後、1 % glutaraldehyde を 1/10 容量加え、さらに 30 分間インキュベートした。100 mM lysine chloride を 1/10 容量加えて反応を終わらせ、SDS-5% PAGE により解析した。

2 7 . 一本鎖 DNA 切断反応

基本的には上述のニッキング反応と同様の反応を行った (23. 参照)。反応後、ニッキング反応の時と同様に proteinase K 処理、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行ったサンプル、あるいは反応液に直接シークエンス

反応停止用液 (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0.05 % Bromophenol Blue, 0.05 % Xylene Cyanol FF) を加えたサンプルを 95℃ で 2 分間インキュベートした後、6~11 % ポリアクリルアミド・シークエンス用ゲルで電気泳動した。

なお、図 4-2 B で用いた 230 nt の一本鎖 DNA 断片は、以下のようにして調製した。一本鎖 pHF20-32 DNA に過剰量の *Hind*III プライマーを加えアニールさせた部分的二本鎖 DNA を *Hind*III で切断後、QIAGEN tip20 (QIAGEN Inc.) を用いて過剰のプライマーを除き、5' 末端を交換法により³²P で標識した。エタノール沈殿後、過剰量の *Bam*HI プライマーを加えアニールさせた部分的二本鎖 DNA を *Bam*HI で切断後、限外ろ過カラム Superex 02 (宝酒造) を用いてプライマーを除いた。

2 8 . 一 本 鎖 オ リ ゴ ス ク レ オ チ ド を 用 い た D N a s e I footprinting

二本鎖 DNA 断片を用いた DNase I footprinting (Galas, 1978) と同様の方法で行い、11 % シークエンス用ゲルで電気泳動した。用いた基質量、酵素量、反応時間については図 4-7 legend 参照。

2 9 . K M n O ₄ footprinting

Borowiec らの方法 (1988) に従った。DNA 量、タンパク質量、反応温度、反応時間については図 4-7 legend 参照。ただし、DNA の変性は Maxam らの方法 (1980) に従ってピペリジンで処理し、プライマー伸長反応は *Bca*BEST DNA polymerase (1U) を用いて、65℃ で 5 分間反応させた。

3 0 . 一 本 鎖 D N A 再結合反応

TE バッファーに溶けた 2 種類のオリゴヌクレオチド (図 4-1 0 参照) 各 1 μl (0.4 pmol) を 1.6 μl の 5 x N バッファー (150 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM MgCl₂, 5 mM, 50 μg BSA/ml)、3.8 μl の milli-Q 水と混合し、65℃ で 5 分間プレインキュベート後、37℃ までゆっくりと温度を下げて (約 1℃/min) アニールさせ、200 mM NaCl、20 % glycerol 入りのバッファー A に入った Tral タンパク質 1 μl を加えて反応を開始させた。37℃ で 30 分間反応後、4.5 μl のシークエンス反応停止液 (本章 27. 参照) を加えて、92℃ で 3 分間インキュベートし、8 % ポリアクリルアミド・シークエンス用ゲルで電気泳動した。

参考文献

- Abdel-Monem, M. G. Taucher-Scholz, and M.-Q. Klinkert. 1983. Identification of *Escherichia coli* DNA helicase I as the *traI* gene product of the F sex factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4659-4663.
- Abdel-Monem, H.-F. Lauppe, J. Kartenbeck, H. Durwald, and H. Hoffmann-Berling. 1977. Enzymic unwinding of DNA III. Mode of action of *Escherichia coli* DNA unwinding enzyme. *J. Mol. Biol.* **110**:667-685.
- Abdel-Monem, H. Durwald, and H. Hoffmann-Berling. 1976. Enzymic unwinding of DNA. *Eur. J. Biochem.* **65**: 431-449.
- Abo, T., S. Inamoto, and E. Ohtsubo. 1991. Specific DNA binding of the TraM protein to the *oriT* region of plasmid R100. *J. Bacteriol.* **173**: 6347-6354.
- Achtman, M., B. Kusecek, and K. N. Timmis. 1978. *tra* cistrons and protein encoded by the *Escherichia coli* antibiotic resistance plasmid R6-5. *Mol. Gen. Genet.* **163**:169-179.
- Achtman, M., P. A. Manning, C. Edelbluth, and P. Herrlich. 1979. Export without proteolytic processing of inner and outer membrane proteins encoded by sex factor *tra* cistrons in *Escherichia coli* minicells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4837-4841.
- Akiba, T., K. Koyama, Y. Ishiki, S. Kimura, and T. Fukushima. 1960. On the Mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. *Japan J. Microbiol.* **4**: 219.
- Alfaro, G., and N. Willetts. 1972. The relationship between the transfer systems of some bacterial plasmids. *Genet. Res.* **20**: 279-289.
- Barbour, S. D. 1967. Effect of nalidixic acid on conjugational transfer and expression of F episomal *lac* genes in *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **124**:601-639.
- Benz, L., and Muller, H. 1990. *Escherichia coli* DNA helicase I. Characterization of the protein and of its DNA-binding properties. *Eur. J. Biochem.* **189**:267-276.
- Borowicz, J. A. and Hurwits, J. Localization melting and structural changes in the SV40 origin of replication induced by T-antigen. 1988. *EMBO J.* **10**:3149-3158.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bradshaw, Jr., H. D., Traxler, B. A., Minkley, Jr., E. G., Nester, E. W., & Gordon, M. P. 1990. Nucleotide sequence of the *traI* (Helicase I) gene from the sex factor F. *J. Bacteriol.* **172**:4127-4131.
- Bukhari, A. I., J. A. Shapiro, and S. L. Adhya. 1977. DNA insertion elements, plasmids, and episomes, p. 601-704. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Casadaban, M. J., and S. N. Cohen. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**:179-207.
- Clewell, D. B. (ed.) 1993. Bacterial Conjugation. Plenum Press, New York.
- Cohen, A., W. D. Fisher, R. Curtiss III, and H. I. Adler. 1968. The properties of DNA

- transferred to minicells during conjugation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**: 635-641.
- Dempsey, W. B., & Fee, B. E. 1990. Integration host factor affects expression of two genes at the conjugal transfer origin of plasmid R100. *Mol. Microbiol.* **4**: 1019-1028.
- Dempsey, W. B. 1989. Sense and antisense transcripts of *traM*, a conjugal transfer gene of the antibiotic resistance plasmid R100. *Mol. Microbiol.* **3**: 561-570.
- Dempsey, W. B. 1987. Integration host factor and conjugative transfer of the antibiotic resistance plasmid R100. *J. Bacteriol.* **169**: 4391-4392.
- Dempsey, W. B., and S. A. McIntire. 1983. The *finO* gene of antibiotic resistance plasmid R100. *Mol. Gen. Genet.* **190**: 444-451.
- Everett, R., and N. Willetts. 1980. Characterization of an *in vivo* system for nicking at the origin of conjugal DNA transfer of the sex factor F. *J. Mol. Biol.* **136**: 129-150.
- Fee, B. E., and W. B. Dempsey. 1986. Cloning, mapping, and sequencing of plasmid R100 *traM* and *finP* genes. *J. Bacteriol.* **167**: 336-345.
- Finlay B. B., L. S. Frost, and W. Paranchych. 1986. Origin of transfer of IncF plasmids and nucleotide sequences of the type II *oriT*, *traM*, and *traY* alleles from ColB4-K98 and the type IV *traY* allele from R100-1. *J. Bacteriol.* **168**: 132-139.
- Friedman, D. I. 1988. Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell.* **55**: 545-555.
- Frost, L. S., Ippen-Ihler, K., and Skurray, R. A. 1994. Analysis of Sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol. Rev.* **58**: 162-210.
- Galas, D. J., and A. Schmitz. 1978. DNase footprinting: A simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* **5**: 3157-3170.
- Gamas, S.P., L. Caro, D. Galas, and M. Chandler. 1987. Expression of F transfer functions depends on the *Escherichia coli* integration host factor. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 302-305.
- Germeno, J., and D. Bastia. 1984. Rapid purification of cloned gene product by genetic fusion and site-specific proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4692-4696.
- Harrison, B., & Zimmerman, S. B. 1986. T4 polynucleotide kinase: Macromolecular crowding increases the efficiency of reaction at DNA termini. *Anal. Biochem.* **158**: 307-315.
- Higashitani, A., Greenstein, D., Hirokawa, H., Asano, S. and Horiuchi, K. 1994. Multiple DNA conformational changes induced by an initiator protein precede the nicking reaction in a rolling circle replication origin. *J. Mol. Biol.* **237**: 338-400.
- Hussain, M., S. Ichihara, and S. Mizushima. 1980. Accumulation of glyceride-containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* treated with globomycin. *J. Biol. Chem.* **255**: 3707-3712.
- Ichikawa, H., K. Ikeda, W. L. Wishart, and E. Ohtsubo. 1987. Specific binding of transposase to terminal inverted repeats of transposable element Tn3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 8220-8224.
- Ihler, G., and W. D. Rupp. 1969. Strand-specific transfer of donor DNA during conjugation in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**: 138-143.
- Im, D. -D., N. Muzyczka. 1990. The AAV origin binding protein Rep68 is an

- ATP-Dependent site-specific Endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* **61**: 447-457.
- Inamoto, S., and E. Ohtsubo. 1990. Specific binding of the TraY protein to *oriT* and the promoter region for the *traY* gene of plasmid R100. *J. Biol. Chem.* **265**: 6461-6466.
- Inamoto, S., T. Abo, and E. Ohtsubo. 1990. Binding sites of integration host factor in *oriT* of plasmid R100. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36**: 287-293.
- Inamoto, S., Y. Yoshioka, and E. Ohtsubo. 1988. Identification and characterization of the products from the *traJ* and *traY* genes of plasmid R100. *J. Bacteriol.* **170**: 2749-2757.
- Inamoto, S., Y. Yoshioka, and E. Ohtsubo. 1991. *J. Biol. Chem.* in press
- Ippen-Ihler, K. A., and E. G. Minkley, Jr. 1986. The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 593-624.
- Kornberg, A. and Baker, T. 1992. DNA Replication. Freeman, N. Y.
- Kuhn, B., M. Abdel-Monem, H. Krell, and H. Hoffmann-Berling. 1979. Evidence for two mechanisms for DNA unwinding catalyzed DNA helicase. *J. Biol. Chem.* **254**: 11343-11350.
- Kuhn, B. 1978. DNA helicases. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 63-67.
- Kunkel, T. A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 488-492.
- Lahue, E. E., S. W. Matson. 1988. *Escherichia coli* DNA Helicase I catalyzes a unidirectional and highly processive unwinding reaction. *J. Biol. Chem.* **263**: 3208-3215.
- Lebek, G. 1963. Ueber die Entstehung mehrfachresistenter Salmonellen. Ein experimenteller Beitrag. *Zentr. Bakteriell. Parasitenk. Abt. I Orig.* **188**: 494-505.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lederberg, J., and E. L. Tatum. 1946a. Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **11**: 113-114.
- Lederberg, J., and E. L. Tatum. 1946b. Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* **158**: 558.
- Lohman, T. M. 1992. *Escherichia coli* DNA helicases: mechanisms of DNA unwinding. *Mol. Microbiol.* **6**: 5-14
- Machida, Y., C. Machida, and E. Ohtsubo. 1982. A novel type of transposon generated by insertion element IS102 present in a pSC101 derivative. *Cell* **30**: 29-36.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual, p. 90-91 and p. 171-172. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Matson, S. W., & Morton, B. S. 1991. *Escherichia coli* DNA helicase I catalyzes a site- and strand-specific nicking reaction at the F plasmid *oriT*. *J. Biol. Chem.* **266**: 16232-16237
- Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**: 499-560.
- McIntire, S. A., & Dempsey, W. B. 1987. *oriT* sequence of the antibiotic resistance plasmid R100. *J. Bacteriol.* **169**: 3829-3832
- Meyer, T. F., K. Geider. 1979. Bacteriophage fd gene II-protein. *J. Biol. Chem.* **254**:

12642-12646. specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**:499-560.

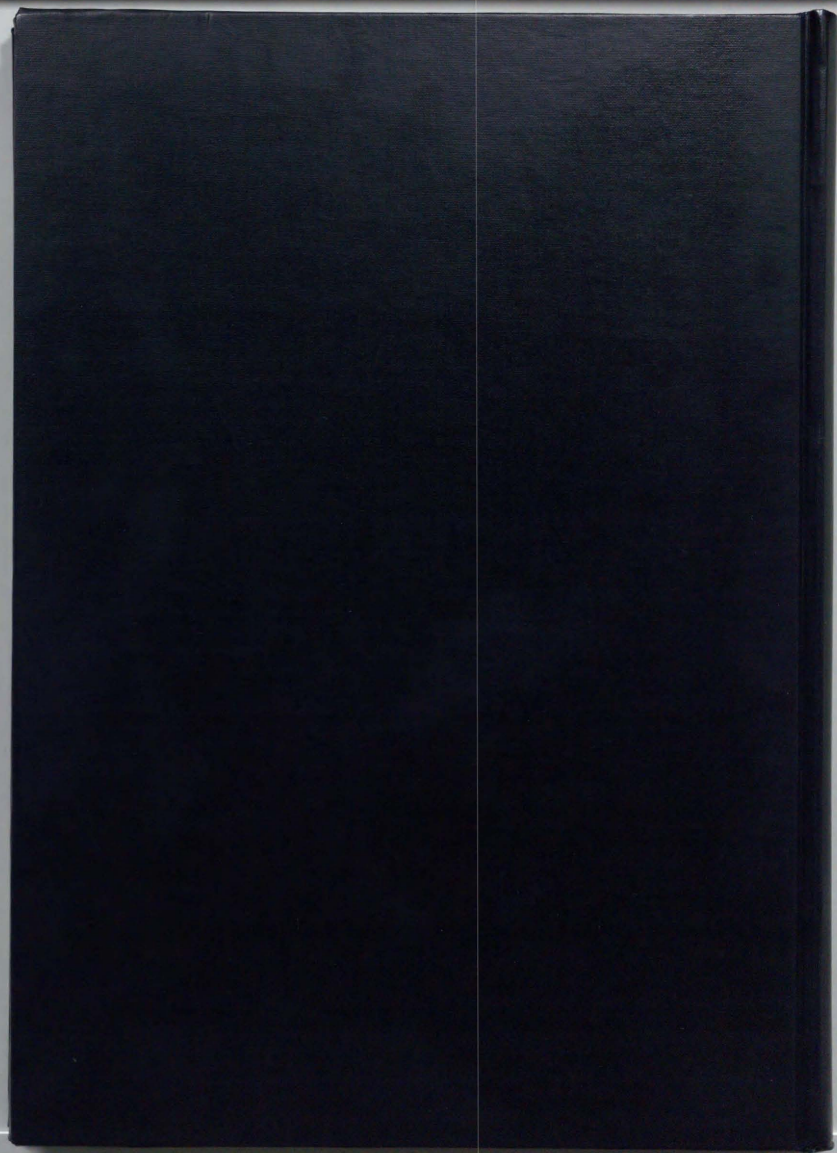
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**:20-78.
- Meynell, E., and N. Datta. 1966. The relation of resistance transfer factors to the F-factor (sex-factor) of *Escherichia coli* K12. *Genet. Res.* **7**: 134-140.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 433 and 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Mitsuhashi, S., K. Harada, and H. Hashimoto. 1960. Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug resistance to other strains by mixed cultivation. *Japan. J. Exp. Med.* **30**: 179.
- Nakaya, R., A. Nakamura, and Y. Murata. 1960. Resistance transfer agents in *Shigella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**: 654-659.
- Nash, H. A., Robertson, C. A., Flamm, E., Weisberg, R. A., & Miller, H. I. 1987. Overproduction of *Escherichia coli* integration host factor, a protein with nonidentical subunits. *J. Bacteriol.* **169**:4124-4127
- Nomura, N., Masai, H., Inuzuka, M., Miyazaki, C., Ohtsubo, E., Itoh, T., Sasamoto, S., Matsui, M., Ishizaki, R. and Arai, K. 1991. Identification of even single-strand initiation sequences (*ssi*) for priming of DNA replication in the F, R6K, R100 and ColE2 plasmids. *Gene* **108**:15-22
- Ohki, M., and J. Tomizawa. 1968. Asymmetric transfer of DNA strands in bacterial conjugation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**: 651-658.
- Ohtsubo, E. 1970. Transfer-defective mutants of sex factors in *Escherichia coli*. II. Deletion mutants of an F-prime and deletion mapping of cistrons involved in genetic transfer. *Genetics* **64**: 189-197.
- Ohtsubo, E., M. Rosenbloom, H. Schrempf, W. Goebel, and J. Rosen. 1978. Site specific recombination involved in the generation of small plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **159**: 131-141.
- Ohtsubo, E., Y. Nishimura, and Y. Hirota. 1970. Transfer-defective mutants of sex factors in *Escherichia coli*. I. Defective mutants and complementation analysis. *Genetics* **64**: 173-188.
- Ostermann, E., F. Kricek, and G. Hogenauer. 1984. Cloning the origin of transfer region of the resistance plasmid R1. *EMBO J.* **3**: 1731-1735.
- Ozeki, H., and S. Howarth. 1961. Colicine factors as fertility factors in bacteria: *Salmonella typhimurium* strain LT2. *Nature* **190**:986-988.
- Pansegrou, W., Schroder, W., and Lanka, E. 1993. Relaxase (TraI) of IncP α plasmid RP4 catalyzes a site-specific cleaving-joining reaction of single-stranded DNA.
- Rees, C. E. D. and B. M. Wilkins. 1990. Protein transfer into the recipient cell during bacterial conjugation: studies with F and RP4. *Mol. Microbiol.* **4**: 1199-1205.
- Reygers, U., Wessel, R., Müller, H., & Hoffman-Berling, H. 1991. Endonuclease activity of *Escherichia coli* DNA helicase I directed against the transfer origin of the F factor. *EMBO J.* **10**:2689-2694
- Runyon, G. T., Wong, I., and Lohman, T. M. 1993. Overexpression, purification, DNA binding, and dimerization of the *Escherichia coli* uvrD gene product (Helicase II).

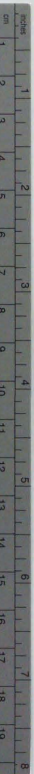
- Rupp, W. D., and G. Ihler. 1968. Strand selection during bacterial mating. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33: 647-650.
- Sancar, A.A., M. Hack, and W. D. Rupp. 1979. Simple method for identification of plasmid-coded proteins. *J. Bacteriol.* 137:692-693.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sharp, P. A., S. N. Cohen, and N. Davidson. 1973. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli* II. Structure of drug resistance (R) factors and F factors. *J. Mol. Biol.* 75: 235-255.
- Sugino, Y., and Y. Hirota. 1962. Conjugal fertility associated with resistance factor R in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 84: 902-910.
- Surett, M.G., Lavoie, B.D. and Chaconas, P.C. 1989. Action at a distance in Mu DNA transposition: an enhancer-like element is the site of supercoiling relief activity by integration host factor (IHF). *EMBO*. 8: 3483-3489.
- Surett, M.G. and Chaconas, G. 1989. A protein factor which reduces the negative supercoiling requirement in the Mu DNA strand transfer reaction is *Escherichia coli* integration host factor. *J. Biol. Chem.* 264: 3024-3034.
- Taylor, D. P., J. Greenberg, and R. H. Rownd. 1977. Generation of miniplasmids from copy number mutant of the R plasmid NR1. *J. Bacteriol.* 132: 986-995.
- Thompson, R., and L. Taylor. 1982. Promoter mapping and DNA sequencing of the F plasmid transfer genes *traM* and *traJ*. *Mol. Gen. Genet.* 188: 513-518.
- Thompson, R., L. Taylor, K. Kelly, R. Everett, and N. Willetts. 1984. The F plasmid origin of transfer: DNA sequence of wild-type and mutant origins and location of origin-specific nicks. *EMBO J.* 3: 1175-1180.
- Traxler, B. A., and E. G. Minkley, Jr. 1988. Evidence that DNA helicase I and *oriT* site-specific nicking are both functions of the F TraI protein. *J. Mol. Biol.* 204: 205-209.
- Tsai, M. -M., Y. -H. F. Fu, and R. C. Deonier. 1990. Intrinsic bends and integration host factor binding at F plasmid *oriT*. *J. Bacteriol.* 172: 4603-4609.
- Ullmann, A. 1984. One-step purification of hybrid proteins which have β -galactosidase activity. *Gene* 29: 27-31.
- Vapnek, D., and W. D. Rupp. 1970. Asymmetric segregation of the complementary sex-factor DNA strands during conjugation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 53: 287-303.
- Vapnek, D., and W. D. Rupp. 1971. Identification of individual sex-factor DNA strands and their replication during conjugation in thermosensitive DNA mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 60: 413-424.
- Vieira and Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153: 3-11.
- Watanabe, T., and T. Fukasawa. 1960. Resistance transfer factor, an episome in Enterobacteriaceae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3: 660.
- Watanabe, T., and T. Fukasawa. 1961. Episome-mediated transfer of drug resistance in

- Enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *J. Bacteriol.* **81**: 669-678.
- Willetts, N. 1971. Plasmid specificity of two proteins required for conjugation in *E. coli* K12. *Nature New Biology* **230**: 183-185.
- Willetts, N., and B. Wilkins. 1984. Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol. Rev.* **48**: 24-41.
- Willetts, N., and J. Maule. 1986. Specificities of IncF plasmid conjugation genes. *Genet. Res.* **47**: 1-11.
- Willetts, N., and R. Skurray. 1980. The conjugation system of F-like plasmids. *Annu. Rev. Genet.* **14**: 41-76.
- Willetts, N., and R. Skurray. 1987. Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation, p. 1110-1133. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Wong, I., Chao, K. L., Bujalowski, W., and Lohman, T. M. 1992. DNA-induced dimerization of the *Escherichia coli* Rep helicase. *J. Biol. Chem.* **267**: 7596-76105.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC18 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yoshioka, Y. 1989. *Ph. D. thesis*. Molecular analysis of the *tra* genes involved in transfer of sex factor R100 and in control of their expression. Tokyo University, Tokyo, Japan. (in Japanese)
- Yoshioka, Y., H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo. 1987. Repressor gene *finO* in plasmids R100 and F: Constitutive transfer of plasmid F is caused by insertion of IS3 into *FfinO*. *J. Bacteriol.* **169**: 619-623.
- Yoshioka, Y., Y. Fujita, and E. Ohtsubo. 1990. Nucleotide sequence of the promoter-distal region of the *tra* operon of plasmid R100, including *traI* (DNA helicase I) and *traD* genes. *J. Mol. Biol.* **214**: 39-53.

謝辞

本研究を行なうにあたって、懇切丁寧なご指導を賜った大坪栄一教授に心よりお礼申し上げます。実験操作のご指導及び有益なご助言を賜った稲本進博士、阿保達彦博士に感謝します。生化学的解析について有益な助言を頂いた真木寿治前助教授（現奈良先端大教授）に感謝します。また、平素より有益なご助言を頂いた、大坪久子助手、関根靖彦助手を初めとする、分子細胞生物学研究所生物物理研究部の皆様に感謝します。末筆ながら、IHF タンパク質を分与して下さいました金沢大学遺伝子実験施設の山口和男博士のご好意に感謝します。





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue

Cyan

Green

Yellow

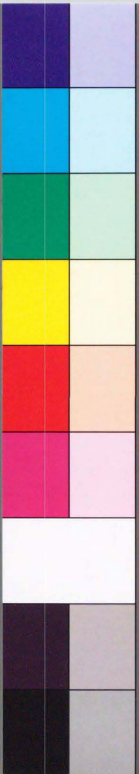
Red

Magenta

White

3/Color

Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A

1

2

3

4

5

6

M

8

9

10

11

12

13

14

15

B

17

18

19

