

氏名 小林正友

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第207号

学位授与の日付 平成8年3月21日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 ショウジョウバエ超らせん化因子の機能ドメイン

論文審査委員 主査教授 瀬野 悍二

教授 堀内 賢介

助教授 藤澤 敏孝

助教授 林 茂生

教授 半田 宏（東京工業大学）

## 論文内容の要旨

DNAの超らせん構造は複製や転写などの重要な役割を果たすと考えられている。原核生物では弛緩型DNAから負の超らせんDNAに変換する酵素としてDNA gyraseが存在するが、それに対応する真核生物のDNA topoisomerase IIには負の超らせんを導入する活性は認められなかった。しかし、太田と広瀬はカイコ後部絹糸腺抽出液中にDNAに負の超らせんを導入する活性を見出し、精製することにより、その活性がDNA topoisomerase IIと超らせん化因子 (supercoiling factor; SCF) から成ることを明らかにした。そして、そのcDNAがカイコ及びショウジョウバエよりクローニングされた。この翻訳領域には5つのEFハンドドメインが存在し、実際に $Ca^{2+}$ を結合する。また、DNA gyrase Aサブユニットとホモロジーのある領域やC末端にはカイコとショウジョウバエで共通する4アミノ酸HDEFが存在する。このような特徴的な構造が超らせん化活性に果たす役割を明らかにするため、本研究ではショウジョウバエのcDNAから大腸菌で発現したタンパク質の超らせん化活性を測定することからはじめた。カイコのcDNA利用からはコドン利用頻度の違いから翻訳領域全長のタンパク質が発現できなかつたため、ショウジョウバエのcDNAを用いた。N末端およびC末端にヒスチジンのタグをつけた形で発現させ、ニッケルカラアムで精製した因子で調べた。N末端にタグをつけたものは、精製したカイコの因子と同様に超らせん化活性が認められたが、C末端にタグを施したものでは活性が認められなかった。

次にこうして導入された超らせんの歪みがヌクレオソーム中のDNAの様にタンパクとの相互作用によって束縛されているのか、またはジャイレース反応産物のように束縛されていないのか、トポイソメラーゼI処理により確認した。この処理で超らせん化反応後のDNAは弛緩型DNAとなり、超らせんの歪みがタンパクとの相互作用によって束縛されていないことが判明した。

このようにしてショウジョウバエのcDNAクローンがSCFをコードしていることが確かめられたので、次に超らせん化活性における $Ca^{2+}$ の影響について調べた。EGTAにて $Ca^{2+}$ をキレートした時、超らせん化活性は全く失われた。また、 $Ca^{2+}$ 濃度は $10\mu M$ まで減少させてもこの活性は保持され、超らせん化活性に $Ca^{2+}$ が必要であることが明らかとなった。

次に、SCFの各ドメインに注目して各種欠失およびアミノ酸置換変異体を作製し、大腸菌にて発現したタンパクの超らせん導入活性を調べた。その結果、5つのEF hand domainのうち1つを欠失させたものでも50–80%程度の残存活性が認められたが、Kretsingerらが提唱するEF handのconsensusと一致する3つの領域を破壊した変異体では $Ca^{2+}$ 結合能がほとんどなくなり、超らせん化活性も10%以下にまで低下した。以上のことからEGTAで $Ca^{2+}$ をキレートすると超らせん化活性が失われた結果と照らし合わせると、EF hand domainを介し $Ca^{2+}$ で超らせん化活性が制御される可能性が示唆された。DNA gyrase Aとホモロジーのある領域を欠いたものでは顕著な活性の低下は認められなかった。

一方、C末端の4アミノ酸HDEFを欠失させた変異体では全く超らせん化活性がみとめられなかつた。その原因を調べるため、DNA topoisomerase IIとの相互作用につ

いて検討した。野生型 S C F と DNA topoisomerase II (ホモダイマー) は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でも非存在下でもおよそ 1 : 1 のモル比で結合した。超らせん化活性が失われた変異体のうち、EF hand domain を破壊したものでは DNA topoisomerase II との結合が見られたが、C 末端 H D E F を欠いた変異体では結合が見られなかった。以上の結果から S C F の活性には EF hand domain が  $\text{Ca}^{2+}$  結合を介して、H D E F 配列が DNA topoisomerase II との相互作用を介して、それぞれ重要な役割を果たすと考えられた。また、本研究から C 末端 4 アミノ酸配列 K / H D E L / F がタンパク・タンパク相互作用のより一般的なモチーフとなる可能性が考えられた。

## 論文の審査結果の要旨

真核生物のトポイソメラーゼ IIは原核生物のgyraseとは異なりDNA 2重鎖に負の超らせんを導入することはできない。広瀬らがカイコ絹糸腺から分離同定した蛋白質因子SCF (Supercoiling factor) がトポイソメラーゼ IIと協調的に働いて負の超らせんを作ることがin vitroで示されて以来、SCFは広く多細胞真核生物に普遍的であることが示されている。小林正友君は広瀬進教授の指導のもとにショウジョウバエSCFのcDNAを大腸菌に導入して作らせたSCFを用い、そのアミノ酸一次配列から推定されるいくつかの機能領域、すなわち、カルモジュリン蛋白質について知られているCa<sup>2+</sup>特異結合領域EF hand (両端を $\alpha$  helixで挟まれた12アミノ酸残基からなるloop)、gyrase様領域およびC末端アミノ酸配列HDEFについて、部分欠損やアミノ酸置換体を用いて解析を進めた。その結果、SCFはトポイソメラーゼ IIと結合すること、結合にはCa<sup>2+</sup>は要らないが、C末端HDEF配列が必要なこと、SCFにはCa<sup>2+</sup>が結合して高次構造の変化を起こすこと、負の超らせん導入活性にはトポイソメラーゼ IIとの結合に加えてCa<sup>2+</sup>が必要であることを示した。SCFが持つ5個のEF handの欠失に関しては欠失の個数に応じて負の超らせん導入活性は低下したが、特定のEF handと負の超らせん導入活性との顕著な関係はなかった。ちなみに、ERで作られたペプチドの中このHDEFに似たK/HDEL配列をC末端にもつものがあるが、それらは分泌されずにER上に受容体を介して留まることが知られている。したがって、SCFのHDEFも蛋白質相互の特異認識配列の一つと思われ、本成果によってSCFの生物学的役割の論議により広い間口が与えられた。gyrase様領域についてはSCF活性には直接必要ではない結果を得た。

小林君は地道な努力によるin vitro実験系の改良を含めて着実に研究をすすめて、SCFの機能領域を各々アミノ酸配列特異性との関係で明らかにすることに成功した。この成果は、多細胞真核生物の遺伝子特異的転写における鑄型DNAの高次構造の関わりを明らかにしようとする研究に新しい知識と手がかりを与えるものであり、審査委員全員一致で博士論文として十分な内容をもつと結論した。