

ショウジョウバエ超らせん化因子
の機能ドメイン

小林正友

博士(理学)

総合研究大学院大学
生命科学研究科
遺伝学専攻

平成7年度 (1995)

目次

1 要旨	3
2 序論	8
3 実験材料と方法	
3-1 ショウジョウバエ超らせん化因子組換えタンパク質の調製	13
3-2 超らせん化活性の測定	14
3-3 超らせん化活性の定量法	15
3-4 超らせん化因子のNative gel電気泳動	16
3-5 超らせん化因子のCa ²⁺ 結合実験	16
3-6 超らせん化因子の欠失変異体の調製	16
3-7 超らせん化因子のアミノ酸置換変異体の調製	17
3-8 超らせん化因子とtopoisomeraseIIとの相互作用	
3-8-1 イオン交換ビーズを用いた結合実験	
3-8-1-1 ³² P標識超らせん化因子の調製	18
3-8-1-2 超らせん化因子とtopoisomeraseIIの相互作用	19
3-8-2 far-Western 法を用いた結合実験	
3-8-2-1 ³² P標識topoisomeraseIIの調製方法	20
3-8-2-2 far-Western	20

4 結果

4-1 ショウジョウバエ組換え超らせん化因子の活性 22

4-2 超らせん化活性に対する Ca^{2+} の影響

4-2-1 超らせん化因子は Ca^{2+} と結合する 23

4-2-2 Ca^{2+} 存在及び非存在下における超らせん化因子の
Native gel電気泳動 24

4-2-3 超らせん化活性は Ca^{2+} を必要とする 24

4-3 変異体超らせん化因子の活性と Ca^{2+} 結合能 25

4-4 超らせん化因子とtopoisomeraseIIとの相互作用 27

5 考察 29

6 謝辞 38

7 引用文献 39

8 図表 44

1. 要旨

DNAの超らせん構造は複製や転写などに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(Ohta and Hirose 1990)。そして、そのcDNAがカイコ(Ohta et al. 1995)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 hand domainが存在し、実際に Ca^{2+} を結合する。また、DNA gyraseのAサブユニットとホモロジーのある領域やC末端側にはカイコとショウジョウバエで共通する4アミノ酸H D E F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ったため、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の様にタンパク質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様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質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。Ethylenedioxybis(ethyiamine)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (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 $10\mu\text{M}$ 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質の超らせん導入活性を調べた。その結果、5つのEFhand domainのうち1つまたは2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らの提唱するEF handのconsensus (Kretsinger 1987)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。gyraseA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認められなかった。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SCFとtopoisomerase II（ホモダイマー）は 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topoisomerase IIとの結合が見られたが、C末端HDEF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SCFの活性にはEF hand domainが Ca^{2+} 結合を介して、HDEF配列が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/HDEL/Fがタンパク質-タンパク質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。

DNA supercoiling appears to play an important role in genetic processes including replication, transcription, and recombination. In prokaryotes, the superhelical torsion of DNA is regulated by the opposing activities of DNA supercoiling enzyme DNA gyrase and relaxing enzyme topoisomerase I. In contrast, the eukaryotic counterpart of gyrase, DNA topoisomerase II catalyzes only the relaxation of supercoiled DNA but not the reverse reaction. Although the bulk of DNA in eukaryotic nuclei is not under superhelical tension, unconstrained supercoils may be present in local regions of the chromatin DNA.

DNA supercoiling factor (SCF) is a protein that generates negative supercoils in a relaxed DNA in conjunction with eukaryotic DNA topoisomerase II. SCF has been purified from the silk worm *Bombyx mori* and cDNA clones have been isolated from *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster*. SCF has five EF hands, a gyrase A subunit homology domain and C-terminal four amino acid sequence (HDEF) conserved between *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster*. In my thesis, I analyzed functional domains of SCF by examining supercoiling activities as well as Ca^{2+} - and DNA topoisomerase II- binding abilities of several deletion and point mutants.

First, I began to detect the supercoiling activity of *Drosophila melanogaster* SCF expressed from its cDNA. As a result, I was able to reconstitute the supercoiling activity from recombinant *Drosophila* SCF and human or *Drosophila* topoisomerase II. Supercoils thus generated are not constrained in protein-DNA interactions because they were readily relaxed by further incubation with DNA topoisomerase I. Next, I examined whether recombinant SCF actually binds Ca^{2+} using a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - blotting assay. Calmodulin added as a

positive control and SCF gave radioactive bands. Upon polyacrylamide gel electrophoresis, native SCF showed a higher mobility in the presence of Ca^{2+} than its absence, suggesting a Ca^{2+} -dependent conformation change of SCF. Having established that SCF binds Ca^{2+} , I next tested whether the supercoiling reaction could be regulated by Ca^{2+} . Indeed the reaction was significantly activated by Ca^{2+} . Thus, the supercoiling activity became detectable at $10\ \mu\text{M}$ Ca^{2+} , reached a maximum level at $100\ \mu\text{M}$ Ca^{2+} , and was inhibited with $100\ \mu\text{M}$ EGTA. These results indicate that Ca^{2+} can affect the superhelical state of DNA.

To analyze functional domains of the factor, several deletion and point mutants were prepared. The supercoiling activity was almost abolished in the mutants lacking C-terminal HDEF or three functional EF hand domains. The mutant lacking the gyraseA homology region showed a significant activity, suggesting that the region is not essential for the supercoiling activity.

Although wild-type SCF binds to topoisomerase II in a molar ratio of approximately 1:1, the mutant without C-terminal HDEF lacks this ability.

These results demonstrate that Ca^{2+} binding by EF hands and interaction with topoisomerase II through C-terminal HDEF play important roles in the activity of supercoiling factor. The present study raises the possibility that C-terminal K/HDEL/F sequence is a motif of protein-protein interaction.

2.序論

真核生物のクロマチン構造は数万塩基対おきに核マトリックスとよばれる構造体と結合しており、一つの結合点から次の点まではループ状となり、クロマチンのドメインを形成している(Paulson and Laemmli 1977)。このような構造は環状DNAと同様に、超らせん構造をとりうるということが明らかとなっている(Benyajati and Worcel 1976) (Cook and Brazell 1976)。原核生物には弛緩型 DNA から負の超らせん型DNAに変換する酵素、DNA gyraseが存在し、超らせん密度はこの活性と逆の反応を触媒する酵素topoisomerase Iとの均衡の上に維持されている(Gellert 1981)。

原核生物では、超らせん化構造が複製、転写および組換えに重要な働きを果たす数多くの報告がある(Gellert 1981)。in vivoで超らせんの歪みが存在することは Sindenらが行ったtrimethylpsoralenの光化学法によるDNAへの架橋実験によって示されている。彼らの測定によれば大腸菌の細胞内DNAの超らせんの密度は-0.05と計算された(Sinden et al. 1980)。

複製に関して、超らせん構造は次の3つのことに主に貢献していると考えられている。1.複製開始に当たってDNA超らせん構造は必要な因子の結合を手助けし、その構造の捻出にはDNA gyraseが関わっている。2.複製の伸長に伴う非複製部分に蓄積する正の超らせんを解消するため (swivel) にDNA gyraseが働き、DNAの負の超らせん構造は複製フォークの巻き戻しを促進する。3.複製の最後のステップで、DNA gyraseがDNA二本鎖の切断により連環したDNAをひき離す。

複製に関し、gyraseが関わっている証拠はgyraseの変異体やgyraseの阻害剤によって多くの研究が報告されている。たとえば、gyraseの阻害剤であるnovobiocin(Smith and Davis 1967)やcoumermycin(Ryan 1976) (Drlica and Snyder 1977)によって大腸菌の複製が停止し、coumermycin耐性 (*gyrB*) の変異体ではこの複製停止が見られないとの報告がある。Cell free systemでもCol E1DNAの複製がnovobiocinでブロックされる(Gellert et al. 1976) (Staudenbauer 1976b)が、novobiocin耐性のDNA gyraseをこの系に加えることで複製が回復される。これらの報告は、原核生物においてin vivo およびin vitroのいずれにおいても直接DNA gyraseの働きを阻害することで複製が抑えられることを示す。また大腸菌の染色体複製についても *gyrB* locusの温度感受性致死変異体を用いて研究されている(Orr et al 1979)。この変異体は制限温度下では複製開始が阻害されるが、複製伸長の速さは本質的に変化しない。また、novobiocinやcoumermycinは大腸菌でいくつかのプラスミドを欠失させる(Taylor and Levine 1979)ことが知られている。これはプラスミドの複製がhost genomeの複製よりもDNA ジャイレースの阻害効果に関して感受性が高いためと考えられる。以上環状DNAの複製におけるtopologyの効果について述べてきたが、coumermycinによってlinearなT7DNAの複製も阻害される(Itoh and Tomizawa 1977) (Wyngaert and Hinkle 1979)ことも報告されている。linear DNAでさえも長鎖DNAではaxial rotationは細胞内で制限を受けるため、ねじれの歪みは機能的な意味をもっていると考えられる。

転写に超らせん構造が寄与している証拠は、精製された大腸菌RNA polymerase

の系で負の超らせんDNAの転写が弛緩型閉環状、開環状および線状DNAに比べて増加する(Wang 1974)(Hayashi and Hayashi 1971)(Botchan 1973)(Botchan 1976)(Seeburg 1977)ことで確かめられている。また、bacteriophage PM2 DNA上での大腸菌RNA polymeraseの転写開始の研究では、酵素の結合部位の数や結合する速さまたpolymeraseとDNA複合体の安定性のどれをとっても、開環状および弛緩型閉環状DNAに比べて超らせん型のDNAが勝っていた(Richardson 1975)。in vivo(Ryan 1976)(Smith and Davis 1967)(Puga and Tessman 1973)およびin vitro(Staudenbauer 1976a)でDNA gyraseが阻害されると転写が抑制されることも知られている。

Sanzeyらはmaltoseおよびlactose operonからの転写はnalidixic acidによって5倍～10倍減少するが、threonine, tryptophanおよびtryptophanaseなどの遺伝子は影響を受けない(Sanzey 1979)ことを報告している。catabolite repressive promoterは特にgyrase阻害剤に対する感受性が高いのではないかと推測されている。

DNA組換えに関しても超らせん構造が関わっていることを示す報告がある。DNA gyraseはin vitroでphage λ のintegrationを促進する(Gellert et al. 1976)。DNA超らせんが必要なことはsupercoil DNAを添加することでその反応を再現出来ることによって示されている(Mizuuchi and Gellert 1978)。

一方、真核生物ではDNA gyraseのcounterpartであるtopoisomerase IIには超らせん型DNAから弛緩型DNAに変換する反応を触媒する活性は存在するが、gyrase様の活性は見出されてはいなかった。しかしながら、真核生物の核のDNA全体として

は大腸菌で示された様な超らせんの歪みは明らかにされていないが、近年クロマチンDNAの一部の領域には束縛されていない超らせんの歪みが存在していることがHsp70(Jupe et al. 1993)やdihydrofolate reductase(DHFR)(Ljungman 1992)の遺伝子で示されている。

そこで私は原核生物でも見られたように、真核生物においてもDNA超らせん構造が遺伝子発現等に与える可能性に興味をいだき、現在唯一、真核生物でgyrase様の超らせん導入活性を捻出できる系に注目し、その主要成分である、超らせん化因子(Supercoiling factor; SCF)の機能ドメインを解析することにした。超らせん化因子は太田らによりカイコ後部絹糸腺中から精製された蛋白質(Ohta and Hirose 1990)で、そのcDNAもカイコ(Ohta et al. 1995)およびショウジョウバエでクローニングされている。このタンパク質は、分子量約35KDaの酸性タンパク質で、トロポニンCやカルモジュリン等のCa²⁺結合タンパク質に共通して存在するEF hand domainを有している。また、gyraseA subunitとホモロジーのある領域も存在している。さらにC末端にはカイコとショウジョウバエで共通する4アミノ酸配列HDEFが存在する。

本研究ではこの様なSCFの特徴的な構造が、超らせん導入活性にどのような役割を果たしているのか明らかにすることを目的とした。カイコのcDNAは大腸菌で発現できないため、ショウジョウバエのcDNAを用いて実験を行った。すなわち野生型および変異型SCFをT7発現系を用いて大腸菌で大量発現し、その超らせん導入活

性、 Ca^{2+} 結合能とDNA topoisomerase IIとの相互作用を調べることで機能ドメインの解析を行った。

3.実験材料と方法

3-1 ショウジョウバエSCF組換えタンパク質の調製

ショウジョウバエ野生型SCFの組換え蛋白質は、大腸菌のT7発現系を用いて調製した。PCR法を用いてSCFのアミノ酸翻訳領域（ORF）のN末端側に*NdeI*サイトを、C末端側にストップコドンを変更する形で*BamHI*サイトをそれぞれ付加し、330アミノ酸をコードするDNA断片（*NdeI-BamHI*断片）をpET23bベクター（Novagen）の*NdeI-BamHI*サイトに挿入し、C末端にヒスチジンタグ6つを付加したプラスミドを調製した（pET23b-SCF）。同様にN末端にヒスチジンタグ6個を付加できる6His-pET11d（Roeder,R.G.より供与）ベクターにも*NdeI-BamHI*サイトで挿入した（6His-pET-11d-SCF）。³²PでSCFを標識できる形とするためprotein kinase Aの基質となる6アミノ酸RRASVAを大腸菌で一般的に用いられるコドンでコードするDNA配列をDNA合成機（Applied Bio Systems）で作製し、相補鎖をアニーリングした後上記のプラスミドに挿入した（6His-pET-11d-SCF-PKA）。

これらのプラスミドを大腸菌BL21 DE3に形質転換し、以下の方法に従って蛋白質を精製した。

プラスミドを保持する大腸菌を200 μ g/mlのampicillinを含む2xYT培地（1.6% bacto-trypton, 1% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl）で培養し（37℃）、濁度

(OD₆₀₀)0.6の時点でIPTG (最終濃度1mM) を加えて、さらに37℃、2 時間培養した。この大腸菌を遠心分離 (5000rpm,5分、4℃) で集菌し、この沈殿をBinding Buffer (5mM imidazole,0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.9) に溶解し、超音波破碎した後、遠心分離 (15000rpm,4 ℃,15分間) し、組換え蛋白質を含む上清を得た。組換え蛋白質をNi-affinity resin (Novagen) columnにかけ、Binding Bufferで洗浄し、さらに20mM imidazole, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.9緩衝液で洗浄後、60mM imidazole, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.9で溶出した。得られた蛋白質に最終濃度50mM EDTAを加えて溶液内に混入してくるNiをキレートし、その後1mM EDTA, 1mM DTT, 100mM KCl, 20% glycerol, 20mM Hepes-KOH pH7.9緩衝液、次いで10 μ M CaCl₂, 1mM DTT, 100mM KCl, 20% glycerol, 20mM Hepes-KOH pH7.9緩衝液で透析したものを、以下の実験に用いた。精製した蛋白質はsodium dodesyl sulfate を含むpolyacrylamide gelで電気泳動(SDS-PAGE)を行い、Coomassie brilliant blue (CBB)R-250 で染色して純度を確認した。

3-2 超らせん化活性の測定

Ohtaら(Ohta et al. 1995)の方法に従った。反応に用いたプラスミドは、ショウジョウバエのhistone 遺伝子クラスターにあるscaffold-associated region (SAR) を含む1.3kbp *Hind*III-*Eco*RI断片をプラスミドpBluescript II SK(+)に挿入したものを用的(pHSAR) 。 このpHSARをEcoRIで切断し5' 末端を bacterial alkaline phosphatase(Takara)処理したのち、 [γ -³²P] ATP(7000Ci/mmol ICN 35020)とT4

ポリヌクレオチドキナーゼ(Takara)を用いて ^{32}P で同末端を標識し再びライゲーションを行い、topoisomerase I処理後 $0.5\mu\text{g/ml}$ のethidium bromide(EtBr)存在下にアガロース電気泳動して弛緩型閉環状DNAのバンドを切り出し、精製して用いた。

$12.5\mu\text{l}$ の反応系で 12.5mM Hepes-KOH (pH7.9), 7.5mM MgCl_2 , 0.1mM CaCl_2 , 70mM KCl, 1mM ATP, 1mM DTT, 10% glycerol, 2% polyvinyl alcohol (Sigma, 平均分子量 10^4), $40\mu\text{g/ml}$ DNAase-free bovine serum albumin (BSA), 0.7 fmol DNA topoisomerase II (2量体、ヒトHeLa細胞由来、TopoGEN社 またはショウジョウバエ胚由来、Amersham), 1.4 fmol SCF, 0.13 fmol ^{32}P 標識pHSARの混合溶液を 30°C 、10分間インキュベートした。その後、 $12.5\mu\text{l}$ の 0.3M Sodium acetate(NaOAc), 1% SDS溶液で反応を止めProteinase K処理しphenol、chloroform抽出後、2次元アガロース電気泳動を行った。電気泳動は1次元目はTBE (Tris-borate electrophoresis buffer)で行い(70 V, 11.5時間)、 5ng/ml EtBr中に2時間浸した後、同液で2次元目の泳動を行った。泳動パターンはFuji BAS 2000を用いて各トポアイソマーを定量した。 Ca^{2+} に対する超らせん化反応の影響をみるためには、 $10\sim 100\mu\text{M}$ 濃度の Ca^{2+} と $100\mu\text{M}$ のEGTA存在下に、超らせん化活性を測定した。

3-3 超らせん化活性の定量方法

Fig .1 に従っておこなった。2次元電気泳動の各トポイソマーを Fuji BAS2000で定量し、その重量平均を平均リンキング数とした。この値をSCF,topoisomeraseI両者を入れた系とtopoisomeraseIIのみを入れた系でそれぞれ計算し、その差を平均リン

キング数差とした。

平均リンキング数差を野生型SCFと変異体SCFとでそれぞれ計算し、野生型SCFに対する変異体SCFの比を計算し、相対超らせん化活性とした。

3-4 超らせん化因子のNative gel 電気泳動

野生型SCFをCaCl₂ 200 μ M, または、MgCl₂ 200 μ M, または EGTA 200 μ M存在下に、10%polyacrylamide gelで電気泳動し、CBB-R250で染色した。

3-5 SCFのCa²⁺結合実験

Maruyamaら(Maruyama et al. 1984)の方法に従って行った。SCFをSDS-PAGEにより泳動後、Nitrocellulose膜に転写し膜を蒸留水、次いで 60mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM Tris HCl pH6.8 (TMK) 緩衝液で洗浄した。TMK緩衝液40mlに⁴⁵CaCl₂を最終濃度4 μ Ci/mlと成るよう添加し室温で30分間インキュベートした。その後、蒸留水で2回洗浄し膜を乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。野生型SCFと変異体SCFそれぞれのタンパク量は、All-Pro (Promega) により染色しFluoroImager SI (Molecular Dynamics社) で定量した。単位タンパク質当たりの⁴⁵Caの放射活性を野生型と変異体でそれぞれ計算してその相対比として比較した。

3-6 超らせん化因子の欠失変異体の調製

EF hand domain に注目し、欠失変異体SCF Δ 1-5を調製した (Fig. 8-1)。
SCF Δ 1は、3-1で記載したプラスミド6-His-pET 11d SCF-PKAからNdeI-XhoI小断片 (EF hand を含まないN末端1-36アミノ酸をコードする領域) を切り出し、残った

NdeI-*XhoI*大断片の末端を平滑化した後、セルフライゲーションした (Fig.8-2-1) 。以下同様にSCF Δ 2～SCF Δ 5は、*KpnI*-*BglII* (EF hand domain IIとIIIをコードする領域)、*NruI*-*StuI* (EF hand domain IVとVををコードする領域)、*NruI*-*HincII* (EF hand domain IVとVをコードする領域)、*XhoI*-*AccI* (EF hand domain Iをコードする領域) 小断片を切りだし、残った大断片をセルフライゲーションした (Fig.8-2-2～Fig.8-2-5) 。SCF Δ 3とSCF Δ 4は両者ともEF hand domain IVとVを欠失した変異体であるが、SCF Δ 3はC末端のフレームがシフトしC末端4アミノ酸配列H D E Fを欠損した変異体となったため、EF hand domain IVとVを欠損するが、C末端は正常な変異体SCF Δ 4を作製した。大腸菌での発現は、37℃で発現させると、封入体に発現させた蛋白質が蓄積するため25℃で誘導した。また、精製後のタンパク質の透析条件も、SCF Δ 3、4、5に関しては、タンパク質の凝集を防ぐため塩濃度500 mM NaClを含む緩衝液を用いた。

3-7 超らせん化因子のアミノ酸置換変異体の調製

EF hand domainはHelix-loop-Helix構造をとるがCa²⁺を結合するloop構造の維持には中央のグリシンが重要である(Kretsinger 1989.)といわれている。SCFにおける5つのEF handはdomain 1,3,4を除くと、そのグリシンは保存されておらずCa²⁺結合能は低いと考えられた。そこでSCF Δ 2 (EF hand domain IIとIIIを欠失させた変異体) をベースにEF hand domain I及びIVををそれぞれ改変したアミノ酸置換変異体を作製した (Fig.8-1) 。EF handを有する他のCa²⁺結合蛋白質としてcalmodulinが知られて

いるが、その変異体の研究によると、 Ca^{2+} 結合loopを構成する12残基のなかでも1,3,5,7,9,12番目の残基が Ca^{2+} と配位している(Kretsinger 1989)が、その12番目のグルタミン酸 (E) をグルタミン (Q) に改変すると、 Ca^{2+} 結合能がなくなることが知られている (Maune et al. 1992) (Haiech et al. 1991)。そこで SCF Δ 6はSCF Δ 2のプラスミドを *Nru*Iと *Hinc*IIで切断したものに、*Nru*I-*Hinc*IIに相当する領域を268番目のEをQにアミノ酸置換した形のプライマーでPCR法で合成し挿入した (Fig.8-2-6)。すなわちSCF Δ 6はEF hand domain の2、3および4を破壊した変異体となる。同様にEF hand domain 1~4を破壊した変異体SCF Δ 7を得るため、*Xho*Iと *Acc*Iで切断したSCF Δ 6のプラスミドに、100番目のEをQにアミノ酸置換した断片をPCRで合成し挿入した (Fig.8-2-7)。

C末端4アミノ酸配列HDEFを欠失した変異体、SCF Δ HDEFをFig 8-2-8の方法で作製した。プラスミド6His-pET 11d SCF PKAから *Stu*I-*Bam*HI小断片を切り出し、残った大断片へoligo1およびその相補鎖であるoligo2をアニールしたものを挿入した (Fig.8-2-8)。

3-8 超らせん化因子とtopoisomeraseIIとの相互作用

3-8-1 イオン交換ビーズを用いた結合実験

3-8-1-1 ^{32}P 標識 SCF の調製

反応液20 μ lでprotein kinase Aの基質となる6アミノ酸を導入したSCF 4pmol, [γ

- ^{32}P]ATP 20 pmol, 20 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 12 mM MgCl_2 , protein kinase A (bovine heart 由来、触媒サブユニット、Sigma) 30 U を 37℃、30 分間 インキュベートした。その後、20 mM Hepes-KOH (pH 7.9)、10% glycerol, 70 mM KCl から成る (Wash buffer) 30 μl をいれ、あらかじめ Wash buffer (glycerol を除く) で平衡化しておいた Spin column Sephadex G-50 (bed volume 0.8 ml, ベーリン ガーマンハイム) で精製した。

3-8-1-2 SCF と topoisomerase II の相互作用

12.5 μl の反応系で以下の溶液中で行った。12.5 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 1 mM DTT, 10% glycerol, 2% poly-vinyl alcohol, KCl 70 mM, 100 μM CaCl_2 , 40 $\mu\text{g/ml}$ DNAase-free BSA, ^{32}P -SCF 5~10 fmol, topoisomerase II 1 fmol の混合液を 30℃、10 分間 インキュベートした。その後、wash buffer で平衡化した Bio-Rex 70 (陽イオン交換樹脂) Resin 懸濁液 10 μl を添加し 4℃、30 分間、回転しながら インキュベートした。wash buffer 500 μl で 2 回洗浄後、20 mM Hepes-KOH, pH 7.9 / 0.8 M NaCl 10 μl で溶出し、10% SDS-PAGE で電気泳動し、 ^{32}P -SCF の band を Fuji BAS 2000 で定量した (Fig. 12-1)。

3-8-2 far-Western法を用いた結合実験

3-8-2-1 ^{32}P 標識 topoisomerase II の調製方法

topoisomeraseIIにはcasein kinaseのリン酸化部位が存在する(Ackerman 1988)ので次の方法で行った。用いたtopoisomerase IIはショウジョウバエの胚から精製したもので、この時期のtopoisomeraseIIは内在性のリン酸化topoisomeraseIIも含まれていると考えられたので、まず、脱リン酸化処理を行った。20 μl の反応系で、100mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM MgCl_2 , 50mM KCl, 0.1mM ZnCl_2 , topoisomeraseII 100U, alkaline phosphatase結合 agarose (Sigma) ビーズ31Uを37℃,1時間反応させた。

その後ビーズを遠心分離 (10000rpm,1分間) で落とし、上清を ^{32}P 標識に用いた。

^{32}P 標識は50 μl の反応系で20mM Pipes-NaOH(pH6.9), 10mM MgCl_2 , 5mM DTT, topoisomeraseII 0.13 pmol, [γ - ^{32}P]ATP10pmol, casein kinase(ペーリンガー) 0.2mUを37℃、30分間インキュベートした。あらかじめ、500 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 0.7M NaCl, 20mM Hepes-KOH(pH7.9)で平衡化しておいたSpin column Sephadex G-50で標識タンパク質を精製した。

3-8-2-2 far-Western

野生型および変異体S C F 1 μg をそれぞれ10%SDS-PAGEにかけ、Nitrocellulose膜に転写した。転写した膜は、TBST buffer (0.05% Tween 20, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0)) で洗浄した。以下4℃でグアニジン処理にて

タンパク質を変性した(Macgregor et al. 1990)。6M グアニジンを加えたHBB buffer(20mM Hepes-KOH(pH7.5), 5mM $MgCl_2$, 1mM KCl, 5mM DTT)10mlに浸して、10分間緩やかに振盪した。再度同bufferに交換し、さらに10分間振盪した。次に3M グアニジンを加えたHBB buffer中で5分間振盪する。半量のbufferをHBB bufferに置換し、5分間振盪した(終濃度1.5Mグアニジン)。再度半量のbufferをHBB bufferに置換し、5分間振盪した(終濃度0.75Mグアニジン)。もう一度半量のbufferをHBB bufferに交換し5分間振盪した(終濃度0.375M グアニジン)。5%スキムミルクHBB buffer10mlで1時間以上インキュベートし、1%スキムミルクHBB bufferで30分間インキュベートした。同buffer10mlに ^{32}P 標識topoisomeraseIIを添加し一晩インキュベートした(1.3×10^4 cpm/10ml)。その後、膜をPBST buffer (70mM KCl, 0.2% Triton X-100, 10mM sodium phosphate(pH7.4)) にて2回洗浄し、Fuji BAS2000でbandを検出した。

4. 結果

4-1 ショウジョウバエ超らせん化因子の活性

本研究で用いたショウジョウバエSCF cDNAクローンは、カイコのSCF cDNAをプローブにしてクロスハイブリダイゼーションにより得られたもので、精製したカイコのSCFと同様な超らせん導入活性を有するか確認されていなかった。そこでまず大腸菌にてこのクローンを発現し超らせん化活性を調べることから、研究を始めた。大腸菌で発現させる翻訳領域としては、cDNA中で最初のメチオニンコドンからを想定して行った。発現させるタンパク質の形としてはタグを融合した形が精製しやすいため、Niカラムを用いた簡便な精製法が可能なヒスチジントグを採用した。このタグは、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）等と比較してタグ部分の長さがヒスチジン6個と短く、目的タンパク質の活性に対し影響が少ないことやタグの位置をN末およびC末のいずれかを選択でき、活性を調べる上で有利と考えられた。

大腸菌で発現したSCFのうちC末端にヒスチジントグを施したものは、超らせん化活性が見られなかった（データ示さず）。これに対し、N末端にタグをつけたものは活性が見られた。

この反応に用いたtopoisomeraseIIは、ヒトHeLa細胞から精製された酵素であるがショウジョウバエの胚から精製されたものでも同様の活性が見られた（Fig.2）。カイコから精製されたSCFでも、ヒト、分裂酵母、カイコ由来のtopoisomeraseIIで

超らせん化活性がみられている(Ohta and Hirose 1990) が、組換えSCFタンパク質でも同種のtopoisomeraseIIでなくても活性が見られることが確認された。従来の超らせん化活性測定条件(Ohta and Hirose 1990)では、基質DNAに対し、大過剰のSCFおよび topoisomerase II が必要であったが、組換えSCFを用いて、条件を検討し直した(Ohta et al.1995)結果、反応系にtopoisomerase IIが選択的に結合するSARの入ったDNAを基質に用い、反応系に2%のpolyvinyl alcoholをさらに添加することで、基質DNAに対してモル比でSCFは10倍、topoisomeraseIIは5倍で超らせん化活性を測定できるようになった (Fig.2)。

次に、導入された超らせんの歪みがヌクレオソーム中のDNAのように蛋白との相互作用によって潜在化しているのか、それともgyrase反応産物のように束縛されていないかについて、topoisomerase I 処理により確認した。もしヌクレオソームタイプのものでは超らせん化反応後、topoisomeraseI処理してから除タンパクすると超らせんDNAを生じるのに対し、gyrase型であればtopoisomerase I 処理によって弛緩されることが想定される (Fig. 3)。組換えSCFタンパク質でも、精製したSCFと同様に、その反応産物は束縛されていない超らせんの歪みをもつことが判明した (Fig. 4)。

4-2 超らせん化活性に対する Ca^{2+} の影響

4-2-1 組換え超らせん化因子は Ca^{2+} と結合する

組換えSCFタンパク質が Ca^{2+} 結合能をもつかどうかについて Ca^{2+} プロット実験を行って調べた。その結果、EF handを持たないマーカータンパク質には $^{45}\text{Ca}^{2+}$

は結合しなかったが、組換えSCFタンパク質には結合を示すbandが確認できた (Fig.5)。Nitrocellulose膜に転写された蛋白質に対しグアニジン処理による変性と再生操作を行っても Ca^{2+} 結合能はさらに上昇することはなかった (データ示さず)。従って、用いた条件下でSCFタンパク質の Ca^{2+} 結合能は充分回復しているものと推定される。

4-2-2 Ca^{2+} 存在及び非存在下における超らせん化因子の Native gel電気泳動

EF hand を有する Ca^{2+} 結合蛋白質では Ca^{2+} 存在および非存在下でNative gel 電気泳動の移動度に差が生じる例が知られている。troponin Cは Ca^{2+} 存在下では非存在下に比べて早く泳動することが知られている。また、calmodulinではその逆で非 Ca^{2+} 存在下では存在下に比べて早く泳動する。これは Ca^{2+} 結合時にその立体構造が大きく変化するためと考えられている (Strynadka and James 1989)。SCFでも Ca^{2+} 存在下、非存在下でNative gel 電気泳動を行った。200 μM の CaCl_2 を添加した系では、200 μM MgCl_2 またはEGTAを添加した系に比べて移動度が早くなった (Fig.6)。この結果はSCFに Ca^{2+} が結合することでその立体構造が変化することを示唆している。

4-2-3 超らせん化活性は Ca^{2+} を必要とする

このように組換えSCFも Ca^{2+} 結合能があり、 Ca^{2+} の結合に伴って立体構造が変化することが示唆されたので、超らせん導入活性に対する Ca^{2+} の影響について調べた。活性測定の反応液にEGTAを100 μM 加えて Ca^{2+} をキレートした場合、超ら

せん化活性は全く失われた。 Ca^{2+} 濃度に対する超らせん化反応の影響としては最低 $10\mu\text{M}$ の濃度で活性が見られ、 $100\mu\text{M}$ Ca^{2+} で超らせん化活性は最大となった (Fig.7)。以上のことから、超らせん導入活性に Ca^{2+} が必要であることが明らかとなった。

4-3 変異体超らせん化因子の活性と Ca^{2+} 結合能

これまでの実験結果から、組換えSCFは超らせん化活性を有しており、その活性には Ca^{2+} を必要とすることが示されたので、まず、EF hand domain に注目して全体にわたる欠失変異体を作製してその超らせん化活性を測定した (Fig.8-1、Fig.8-2-1~8-2-5)。用いた各変異体タンパク質はニッケルカラムを用いて精製した (Fig.9)。N末端の30アミノ酸を欠失したSCF Δ 1, EF hand domain IIおよびIIIを含む50アミノ酸を欠失したSCF Δ 2, EF hand domain IVおよびVを欠失したSCF Δ 4, EF hand domain Iを含む115アミノ酸を欠失したSCF Δ 5では、野生型SCFの活性を100% とした場合、約80%の活性をなお有していた (Fig.10)。これらの結果は、EF hand domainを一つまたは二つ欠いても、超らせん化の活性にそれほど大きな影響がないことを示している。

SCFの活性に関して、EF hand domainが寄与するか否かを調べるためにさらに複数のEF hand domainを削った変異体を調製することにした。EF hand domainは、29アミノ酸のhelix-loop-helix モチーフを有するdomainで12アミノ酸からなるloop部分の酸素原子を持つ残基が Ca^{2+} 結合に関与していると考えられている(Kretsinger

1987)。さらにloopの中央にはグリシン残基が保存されており、loopが折れ曲がって Ca^{2+} を抱き込むために必要と考えられている(Kretsinger1987)。SCFのEF handのloop部分を見ると、EF hand domain 1,3,4がそのconsensus配列にマッチしており、 Ca^{2+} 結合に貢献していると予想された (Fig. 11)。そこで、EF hand domain IIおよびIIIを欠失させたSCF $\Delta 2$ をベースにEF hand domain 1,4にアミノ酸置換をもつ変異体を作製した (Fig.8-2-6、Fig.8-2-7)。EF hand domain II,IIIおよびIVを破壊したSCF $\Delta 6$ とEF hand domain I,II,III,IVを削ったSCF $\Delta 7$ の超らせん導入活性を測定すると、 $\Delta 6$ で10%程度、 $\Delta 7$ で10%以下まで活性が低下した (Fig.10)。これらの結果は、 Ca^{2+} がEF hand domainを介して超らせん導入活性に影響を与える可能性を示唆する。

一方、EF hand domain IV,Vとgyrase A homology domainを含む67アミノ酸を欠失したSCF $\Delta 3$ では超らせん化の活性が見られなくなった (Fig.10)。SCF $\Delta 3$ はC末端付近にstop codonが挿入されC末端の4アミノ酸配列H D E Fを欠いているため (Fig.8-1)、EF hand domain IV, V およびgyrase A homology domainとC末端H D E Fのどちらが重要であるのか確かめるため、SCF $\Delta 4$ 変異体を作製し (Fig.8-2-4) その超らせん化活性を調べた。SCF $\Delta 4$ は、EF hand domain IV, V およびgyrase A homology domainのみを欠失した変異体であるが、超らせん化活性は約70%保持していた (Fig.10)。従って、gyrase A homology domainは活性には必須ではないことが判った。SCF $\Delta 3$ とSCF $\Delta 4$ の変異体の活性の差は、C末端H D E F配列の有無による可能性が考えられたので、C末端H D E F配列だけを欠失したSCF Δ H D E F変異

体を作製した (Fig.8-2-8)。この変異体の活性はSCF Δ 3と同様全く見られず (Fig.10)、C末端HDEF配列が超らせん化活性に重要であることが示された。C末端にヒスチジンタグをつけたSCFが超らせん化活性をもたない(データ示さず)こともこの結論を支持している。

4-4 超らせん化因子とtopoisomeraseIIとの相互作用

全てのEF hand domainをもち、Ca²⁺結合能もあるSCF Δ HDEFが超らせん化活性を全く示さない原因を調べるために、次にSCFとtopoisomeraseIIの相互作用について検討した (Fig.12-1)。BioRex70ビーズを用いたSCFとtopoisomeraseIIとの相互作用の解析からtopoisomeraseII(homo dimer)0.25fmol~1fmolに対して 野生型SCFはおよそ1:1のモル比で結合することが判った (Fig.12-2)。このビーズは陽イオン交換樹脂で酸性タンパク質であるSCFとは結合せず、topoisomeraseIIとのみ結合する。したがって、陰性コントロールとして塩基性タンパク質であるチトクロームC (bovine heart) をtopoisomeraseIIの代わりに加えて同様の操作を行ったが、³²P 標識SCFはほとんどビーズから検出されなかった (データ示さず)。SCFとtopoisomerase IIの相互作用はCa²⁺非存在下に起き、Ca²⁺を加えてもSCFとtopoisomerase IIとの結合には効果がなかった。超らせん化活性がほとんどみられなくなったSCF Δ HDEFは、topoisomeraseIIに対してほとんど結合が見られなかった (Fig.12-2)。この結果をさらに確認するために、³²P 標識topoisomerase IIを用いてfar Western法によりSCFとの結合をみた。野生型SCFはtopoisomeraseIIに結合す

るのに対し、超らせん化活性が著しく低下した変異体のうち、EF hand domain I, II, III, IVを破壊したSCF $\Delta 7$ ではtopoisomeraseIIとの結合がみられたが、C末端4 アミノ酸配列H D E Fを欠失したSCF Δ H D E Fと $\Delta 3$ の変異体では全く結合が見られなかった (Fig.13)。これらの結果からSCFのC末端HDEF配列はtopoisomeraseIIとの相互作用に必須で、この配列を欠くか、さらにC末端側にアミノ酸配列を付加するとtopoisomerase IIと結合できなくなるために超らせん化活性が完全になると考えられる。

5. 考察

本研究から超らせん化因子SCFはtopoisomeraseIIと相互作用し、 Ca^{2+} がEF hand domainを介して超らせん導入活性に影響を与えていることが明らかとなった。また、SCFとtopoisomeraseIIの相互作用にはC末端HDEF配列が必要であることも判明した。以上のことより、SCFはC末端H D E F 配列を介してtopoisomeraseIIと相互作用し、 Ca^{2+} を結合したSCFがその高次構造の変化を引き起こしtopoisomeraseIIに対しても、何らかの影響を与えて超らせん化活性を誘起している可能性が示唆された。

5-1 超らせん化反応に対する Ca^{2+} の影響

in vitroの超らせん化反応では、 Ca^{2+} をキレートすると活性がなくなり、活性の見られる最低の Ca^{2+} 濃度は $10\ \mu\text{M}$ で、 $100\ \mu\text{M}$ で活性は最大となった。情報伝達に関わる細胞内の Ca^{2+} 濃度は $0.1\ \mu\text{M}$ 以下 $\sim 10\ \mu\text{M}$ で変化する。SCFの Ca^{2+} 要求性はこの生理的濃度の範囲に入っているが、最大活性を与えるにはさらにcalmodulinのような補助因子を必要とするのかもしれない。精製したカイコのSCFによる従来の超らせん化反応条件(Ohta and Hirose 1990)では、最大活性を与えるのにmMオーダーの Ca^{2+} 濃度が必要であったが、基質DNAにtopoisomeraseIIが選択的に結合しやすいScaffold-associated region (SAR)を導入したことや、反応系にpolyvinyl alcohol (PVA)を入れ、基質DNAに対するtopoisomerase IIの割合を高めた等、反応系の改良(Ohta et al. 1995)を加えたことで、現在の Ca^{2+} 濃度でカイコのSCFでもショウジョウバエのSCFでも活性が見られるようになった。真核生物の超らせん化活性が

Ca^{2+} を必要とする理由として次のようなことが考えられる。原核生物ではどの細胞もゲノムを複製可能な状態に保つため超らせん化活性をいつも必要とする。反対に後生動物の多くの細胞は分化後にDNA複製を行わないため、超らせん化活性は厳密に制御されねばならず、そのため Ca^{2+} シグナルによってコントロールされているのかもしれない。

5-2 Ca^{2+} 結合蛋白質としてのSCFの役割

SCFはEF hand モチーフを有する典型的な Ca^{2+} 結合蛋白質である。EF hand domainを有する他のタンパク質と比較すると、 Ca^{2+} 存在時にNative gel 電気泳動の移動度は非存在下に比べ早くなり、troponin Cと同じ特性を示す。これはSCFが Ca^{2+} 結合loopに Ca^{2+} を捕捉するとその構造がよりコンパクトになり、Native gel 電気泳動に差が生じたと考えられる。

また、逆に Ca^{2+} 結合によりその構造が開き泳動度が遅延するタイプとして calmodulinなどが存在する(Strynadka and James 1989)。calmodulinは、 Ca^{2+} と結合することで標的酵素との結合が増しその酵素を活性化しうることが知られている (Olwin and Storm 1985) (Yazawa et al. 1987) (Yazawa et al. 1991)。X線結晶解析法とNMRで標的酵素とcalmodulin複合体の高次構造(Ikura et al. 1992) (Meador et al. 1992)も明らかとなっており、その活性化機構—活性化過程について推論されている。一方、SCFとtopoisomeraseIIとの相互作用に関しては Ca^{2+} が必要ではないことが、野生型SCFをEGTAで Ca^{2+} をキレートした状態やEF hand domainを破壊した変異体

SCFでもtopoisomeraseIIと相互作用できることから明らかとなった。すなわち、 Ca^{2+} 結合calmodulinが標的酵素を認識し活性化へ導くのと違い、超らせん化反応ではSCFがtopoisomeraseIIと結合する過程までは Ca^{2+} 非依存的で、その後の活性化に対して Ca^{2+} 依存性がみられることが大きく異なっている。calmodulinのEF hand domainに変異を導入した結果は、EF hand domainを1つでも破壊すると標的酵素の活性化能に大きな影響を与える(Gao et al. 1993) (Matsuura et al. 1993)ことが知られている。SCFの超らせん化活性は、実際に Ca^{2+} 結合に関わると考えられる3つのEF hand domainを破壊したときに有意に活性の減少がみられ、他のEF handに関する変異体でも Ca^{2+} 結合能と超らせん化活性で相関がみられた。すなわち Ca^{2+} が結合するに従ってSCFの構造に微妙な高次構造変化が起き、そのため活性に影響が出ると推察される(Fig.14)。

5-3 SCFのC末端HDEF配列

ショウジョウバエとカイコSCFのC末端は共通する4アミノ酸配列HDEFを有している。現在判明している機能ペプチドで、この配列に類似したものとしては小胞体(ER)残留シグナルKDELやHDELがある(Pelham 1990)。このシグナルをC末端に有する蛋白は合成されてERからゴルジ体へ移行しても、分泌されずに再びERへとリサイクルされる。K/HDEL配列を欠失した変異体はERからゴルジ体へ移行し、さらに細胞外に分泌されてしまう。ERにはこのシグナルに対するレセプターが存在し(Semenza et al.1990) (Lewis et al. 1990)、ER残留に関わっている。SCFは翻訳領域

全体を通して相同性を調べてみると、マウスのreticulocalbin(Ozawa and Muramatsu 1993)と呼ばれるEF hand 型 Ca^{2+} 結合蛋白に類似している。このreticulocalbinはN末端に、シグナル配列を有し、分子内に6個のEF hand domainを含み、C末端にはHDEL小胞体残留シグナルを持ち、細胞内での主な局在はERである(Ozawa and Muramatsu 1993)。ショウジョウバエのSCFは、N末端にシグナル様の配列とC末端H D E F配列、5つのEF hand domainを有している。S C Fの細胞内での局在に関しては現在解析中だが、ショウジョウバエの胚(8~22時間)を細胞質と核に分画しWestern blot法を行った結果、細胞質と核で異なる大きさのバンドが検出された(データ示さず)。前者がショウジョウバエのreticulocalbinホモログに相当し、後者がSCFとして働いている可能性が考えられる。H D E F配列を欠失させるとtopoisomerase IIとの結合も消失し、超らせん化活性が全く見られなくなることから、SCFはこのH D E F配列を介してtopoisomeraseIIと結合していると考えられる。これらの結果はK/HDEL/F配列がER残留タンパク質とレセプターの結合だけでなく、より一般的なタンパク質-タンパク質相互作用のモチーフとして使われている可能性を示している。

5-4 topoisomerase IIとS C Fの相互関係から考えられる

超らせん化反応モデル

真核生物のtopoisomerase IIには、超らせん型DNAを弛緩型DNAに変換する活性をもつが、弛緩型DNAを負の超らせんDNAへと変換する活性は見出されていなかった。

本来topoisomerase IIという酵素にない新しい活性を捻出するタンパク因子として超らせん化因子SCFの機能を考えることは、興味深い。topoisomerase IIは二本鎖DNAを同時に切断し、その切れ目の間を二本鎖DNAが通過したのち切れ目をもとどおり結合する活性を有する。従って一段階の反応でリンキング数を2つずつ変化させる。topoisomerase IIが超らせん化活性を示さないことは、DNAを再結合するときのノード（交差点）が正、あるいは負の両方向にランダムに起きるためと考えられる（Gellert 1981）。SCFがtopoisomerase IIに結合することで、超らせん化活性を捻出するのはtopoisomerase IIのその最後の過程で負のノードに配向させる働きをするのかもしれない。

超らせん化反応におけるSCFとtopoisomerase IIのモデルを考えると Ca^{2+} 非依存的にSCFに対してtopoisomerase II（homodimer）が1：1に結合し、SCFに Ca^{2+} が結合することでtopoisomerase IIに対して超らせん化反応を誘起する形でtopoisomerase IIの高級構造に影響を与えているのかもしれない（Fig.14）。

5 - 5 真核生物における超らせん化活性の役割

原核生物では、負の超らせんを導入できるDNA gyraseをもっているため、細胞内でDNAが超らせん構造を有していることは理解しやすい。一方、gyraseに相当する活性の見られなかった真核生物でも、次のような理由で生体内で超らせん構造を有していると想像されていた。

a.ヌクレオソームは負の超らせんを潜在化している。

ヌクレオソーム構造、すなわちヒストン8量体に巻いたDNAは、DNA-タンパク質の相互作用の中に負の超らせん構造を内在し、2本鎖が部分的に巻き戻された状態となっている。従って、ヌクレオソーム状態のDNAを環状化させ、除タンパクさせると負の超らせんを生じる。ヌクレオソーム構造をとっているDNAはソレノイドコイル状で左巻きとなるのに対して、負の超らせんをもったねじれたドーナツ型のDNAは右巻きとなる。ソレノイドコイル状のものは、ヒストンのような支持体がなければねじれたドーナツ型となる。生体内での超らせん構造はこの様にヒストンが脱落することによって捻出されるのではないかという仮説が1番目の理由である。実際にヌクレオソーム構造を破壊する活性が報告されている(Tsukiyama et al. 1994)。

b. 複製時に蓄積する正の超らせんを解消するため、あらかじめ負の超らせんをもっている。

DNAが複製および転写されるときには、DNA 2重鎖が局部的に解離しなければならず、進行方向のDNAは二重らせんをほどくために回転する必要がある。しかし、DNAは環状化していたり核マトリックスに付着し、鎖の自由回転がさまたげられていると考えられる。そこでDNAに蓄積する正の超らせんはTopoisomeraseの働きで解消されるが、あらかじめ負の超らせんを作り出しておけば、より合理的で

あるというのが2番目の理由である。

c. Twin supercoiling model

WangとLiuは大腸菌で得られた次の実験から、生体内で超らせん構造が転写に依存して生成されるというモデルを提唱している(Liu and Wang 1987) (Wang and Lynch 1993)。1. ジャイレース阻害剤であるnoboviocinで大腸菌を処理すると、プラスミドDNAに正の超らせんが蓄積した。2. 逆に大腸菌のtopoisomerase I欠損株では転写に依存して負の超らせんが蓄積した。

ちなみに、大腸菌topoisomerase IIは負の超らせんを解消できるが、正の超らせんは解消出来ない。DNAが転写される時、生体内での構造上から考えるとRNAポリメラーゼが回転するよりDNAが回転するモデルが考えやすい。すなわち、転写の進行方向には正の超らせんが、後方には負の超らせんが蓄積すると考えられる。このモデルはジャイレースを阻害すれば正の超らせんがたまり、topoisomerase Iを欠くと負の超らせんが蓄積する実験結果と一致している。転写とカップリングし超らせん構造を作り出す良いモデルとなっている。酵母でもこのモデルを支持する実験結果が得られている (Giaever and Wang 1988) (Wang 1992)。

4. in vitro 転写系を用いた解析

in vitro転写系を用いた実験からMizutaniらは真核生物の色々な遺伝子の転写活性が

鋳型の超らせん構造により大きく影響をうける(Mizutani et al 1991)ことを示した。これらの結果から生体内でもDNA超らせん構造により、転写が制御されている可能性が考えられる。

真核生物の細胞で負の超らせんの歪みが存在している可能性を示す報告が、JupeらとLjungmanらによってなされている。Jupeらはショウジョウバエの培養細胞でHsp70遺伝子のcoding領域がpsoralenによるDNA架橋構造形成を受けやすい(Jupe 1993)ことを示した。DNA架橋剤psoralenは弛緩型より、超らせん型の方が架橋されやすい(Sinden et al. 1980)ことが知られているため、少なくともこのHsp70遺伝子のある領域には、負の超らせんの歪みが潜んでいる可能性を示している。また、Ljungmanらは、同じくpsoralenの光架橋実験でヒトのdihydrofolate reductase (DHFR) 遺伝子の5'側に負の超らせんの歪みが存在する(Ljungman 1992)可能性を示している。Hsp70遺伝子の場合、heat shock前にもpsoralen高感受性であり、これはtwin supercoiling modelでは説明できない。上記のすでに知られた遺伝子の超らせん導入に関し、SCFが貢献している可能性があるのか、またより一般的に多くの遺伝子の複製、および転写にSCFがかかわるのか、in vivoでの解析が今後に残された重要な課題である。私の行ったSCFの変異体の解析から、SCF $\Delta 7$ はtopoisomerase IIと相互作用できるが、超らせん化活性は著しく低下していることが判明した。この変異体を生体内で強制発現させれば、dominant negativeな効果を期待できる。その際

に複製や転写にどのような影響がでるのかを解析することによってS C Fの生体内の機能を調べることができると考えられる。

6.謝辞

本研究にあたり、懇切丁寧に御指導をいただきました広瀬進教授に心より感謝いたします。

基本テクニックなど親切に指導して下さった太田力博士、また、貴重なアドバイスを頂いた、林茂生助教授、上田均博士、および形質遺伝研究部門、無脊椎保存研究室のすべての方々に心から感謝いたします。ともに切磋琢磨し合った遺伝学研究所の学生の皆さん、とりわけ食堂会のメンバーに感謝します。なお、本研究にもちいたSCF発現のためのベクター6-His-pET-11dを提供いただきましたRobert G. Roeder博士、太田力博士に感謝いたします。

7. 参考文献

- Ackerman, P., Glover, C.V.C, and Osheroff, N. Phosphorylation of DNA topoisomerase II in vivo and in total homogenates of *Drosophila* Kc cells. *J. Biol. Chem.* 263 (1988): 12653-12660.
- Benyajati, C. and Worcel, A. Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 9 (1976): 393-407.
- Botchan, P. An electron microscopic comparison of transcription on linear and superhelical DNA. *J. Mol. Biol.* 105 (1976): 161-176.
- Botchan, P., Wang, J.C., and Echols, H. Effects of circularity and superhelicity on transcription from bacteriophage λ DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973): 3077-3081.
- Cook, P.R. and Brazell, I.A. Conformational constraints in nuclear DNA. *J. Cell Sci.* 22 (1976): 287-302.
- Drlica, K. and Snyder, M. Superhelical *Escherichia coli* DNA: replication by coumermycin. *J. Mol. Biol.* 120 (1978): 145-154.
- Gao, Z.H., Krebs, J., VanBerkum, M.F.A., Tang, W., Maune, J.F., Means, A.R., Stull, J.T., and Beckingham, K. Activation of four enzymes by two series of calmodulin mutants with point mutations in individual Ca^{2+} binding sites. *J. Biol. Chem.* 268 (1993): 20096-20104.
- Gellert, M. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981): 879-910.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'dea, M.H., and Nash, H.A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976a): 3872-3876.
- Gellert, M., O'dea, M.H., Itoh, T., and Tomizawa, J. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976b): 4474-4478.
- Giaever, G.N. and Wang, J.C. Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* 55 (1988): 849-856.
- Haiech, J., Kilhoffers, M., Lukas, T.J., Craig, T.A., Roberts, D.M., and Watterson, D.M. Restoration of the calcium binding activity of mutant calmodulins toward normal by the presence of a calmodulin binding structure. *J. Biol. Chem.* 266 (1991): 3427-3431.

- Hayashi, Y. and Hayashi, M. Template activities of the ϕ x-174 replicative allomorphic deoxyribonucleic acids. *Biochemistry* 10 (1971): 4212-4218.
- Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B., and Bax, A. Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* 256 (1992): 632-638.
- Itoh, T. and Tomizawa, J. Involvement of DNA gyrase in bacteriophage T7 DNA replication. *Nature* 270 (1977): 78-80.
- Jupe, E.R., Sinden, R.R., and Cartwright, I.L. Stably maintained microdomain of localized unrestrained supercoiling at a *Drosophila* heat shock gene locus. *EMBO J.* 12 (1993): 1067-1075.
- Kretsinger, R.H. Calcium coordination and the calmodulin fold : divergent versus convergent evolution. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52(1987):499-510.
- Lewis, M. J., Sweet, D. J., and Pelham, H. R. B. The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* 61 (1990): 1359-1363.
- Liu, L.F. and Wang, J.C. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987): 7024-7027.
- Ljungman, M. and Hanawalt, P.C. Localized torsional tension in the DNA of human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992): 6055-6059.
- Macgregor, P. F., Abate, C. , and Curran, T. Direct cloning of leucine zipper proteins: Jun binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1. *Oncogene* 5 (1990): 451-458.
- Maruyama, K., Mikawa, T., and Ebashi, S. Detection on calcium binding proteins by ^{45}Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J.Biochem.* 95 (1984): 511-519.
- Matsuura, I., Kimura, E., Tai, K. and Yazawa, M. Mutagenesis of the fourth calcium-binding domains of yeast calmodulin. *J.Biol.Chem.* 268 (1993):13267-13273.
- Maune, J. F., Klee, C. B., and Beckingham, K. Ca^{2+} Binding and conformational change in two series of point mutations to the individual Ca^{2+} -binding sites of calmodulin. *J.Biol.Cmem.* 267 (1992): 5286-5295.

Mizutani, M., Ura, K., and Hirose, S. DNA superhelicity affects the formation of transcription preinitiation complex on eukaryotic genes differently. *Nucl. Acids Res.* 19 (1991): 2907-2911.

Mizuuchi, K., Gellert, M., and Nash, H.A. Involvement of supertwisted DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 121 (1978): 375-392.

Ohta, T. and Hirose, S. Purification of a DNA supercoiling factor from the posterior silk gland of *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990): 5307-5311.

Ohta, T., Kobayashi, M., and Hirose, S. Cloning of a cDNA for DNA supercoiling factor reveals a distinctive Ca^{2+} -binding protein. *J. Biol. Chem.* 270 (1995): 15571-15575.

Olwin, B.B. and Storm, D.R. Calcium binding to complexes of calmodulin and calmodulin binding proteins. *Biochemistry* 24 (1985): 8081-8086.

Orr, E., Fairweather, N. F., Holland, I. B., and Pritchard, R. H. Isolation and characterisation of a strain carrying a conditional lethal mutation in the *cou* gene of *Escherichia coli* K12. *Molec. gen. Genet.* 177 (1979): 103-112.

Ozawa, M. and Muramatsu, T. Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca^{2+} binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl terminal HDEL sequence. *J. Biol. Chem.* 268 (1993): 699-705.

Paulson, J.R. and Laemmli, U.K. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12 (1977): 817-828.

Pelham, H. R. B. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic. *TIBS* (1990): 483-486.

Puga, A. and Tessman, I. Mechanism of transcription of bacteriophage S13
II. Inhibition of phage-specific transcription by nalidixic acid. *J. Mol. Biol.* 75 (1973): 99-108.

Richardson, J. P. Initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase from supercoiled and non-supercoiled bacteriophage PM2 DNA. *J. Mol. Biol.* 91 (1975): 477-487.

Ryan, M.J. Coumermycin A1: a preferential inhibitor of replicative DNA synthesis in *Escherichia coli*. I. in vivo characterization. *Biochemistry* 15 (1976): 3769-3777.

Seeburg, P.H., Nusslein, C., and Schaller, H. Interaction of RNA polymerase with promoters from bacteriophage fd. *Eur. J. Biochem.* 74 (1977): 107-113.

- Semenza, J. C., Hardwick, K. G., Dean, N., and Pelham, H. R. B. ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell*. 61 (1990): 1349-1357.
- Sinden, R. R., Carlson, J. O., and Pettijohn, D. E. Torsional tension in the DNA double helix measured with trimethylpsoralen in living *E. coli* cells: analogous measurements in insect and human cells. *Cell* 21 (1980): 773-783.
- Smith, D.H. and Davis, B.D. Mode of action of novobiocin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 93 (1967): 71-79.
- Staudenbauer, W.L. Replication of *Escherichia coli* DNA in vitro: inhibition by oxolinic acid. *Eur. J. Biochem.* 62 (1976a): 491-497.
- Staudenbauer, W.L. Replication of small plasmids in extracts of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 145 (1976b): 273-280.
- Strynadka, N.C.J. and James, M.N.G. Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989): 951-998.
- Taylor, D.E. and Levine, J.G. Characterization of a plasmid mutation affecting maintenance, transfer and elimination by novobiocin. *Mol. Gen. Genet.* 174 (1979): 127-133.
- Tsukiyama, T., Becker, P.B., and Wu, C. ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* 367 (1994): 525-531.
- Wang, J.C. Interactions between twisted DNA and enzymes: the effects of superhelical turns. *J. Mol. Biol.* 87 (1974): 797-816.
- Wang, J.C. "Template topology and transcription." in *Transcriptional Regulation* (McKnight, S., and Yamamoto, K., eds) (1992): 1253-1269
- Wang, J. C. and Lynch, A. S. Transcription and DNA supercoiling. *Current Biology* 3 (1993): 764-768.
- Wyngaert, M.A.D. and Hinkle, D.C. Involvement of DNA gyrase in replication and transcription of bacteriophage T7 DNA. *J. Virol.* 29 (1979): 529-535.
- Yazawa, M., Ikura, M., Hikichi, K., Ying, L., and Yagi, K. Communication between two globular domains of calmodulin in the presence of mastoparan or caldesmon fragment. *J. Biol. Chem.* 262 (1987): 10951-10954.

Yazawa, M., Vorherr, T., James, P., Carafoli, E., and Yagi, K. Binding of calcium by calmodulin: influence of the calmodulin binding domain of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry* 31 (1992): 3171-3176.

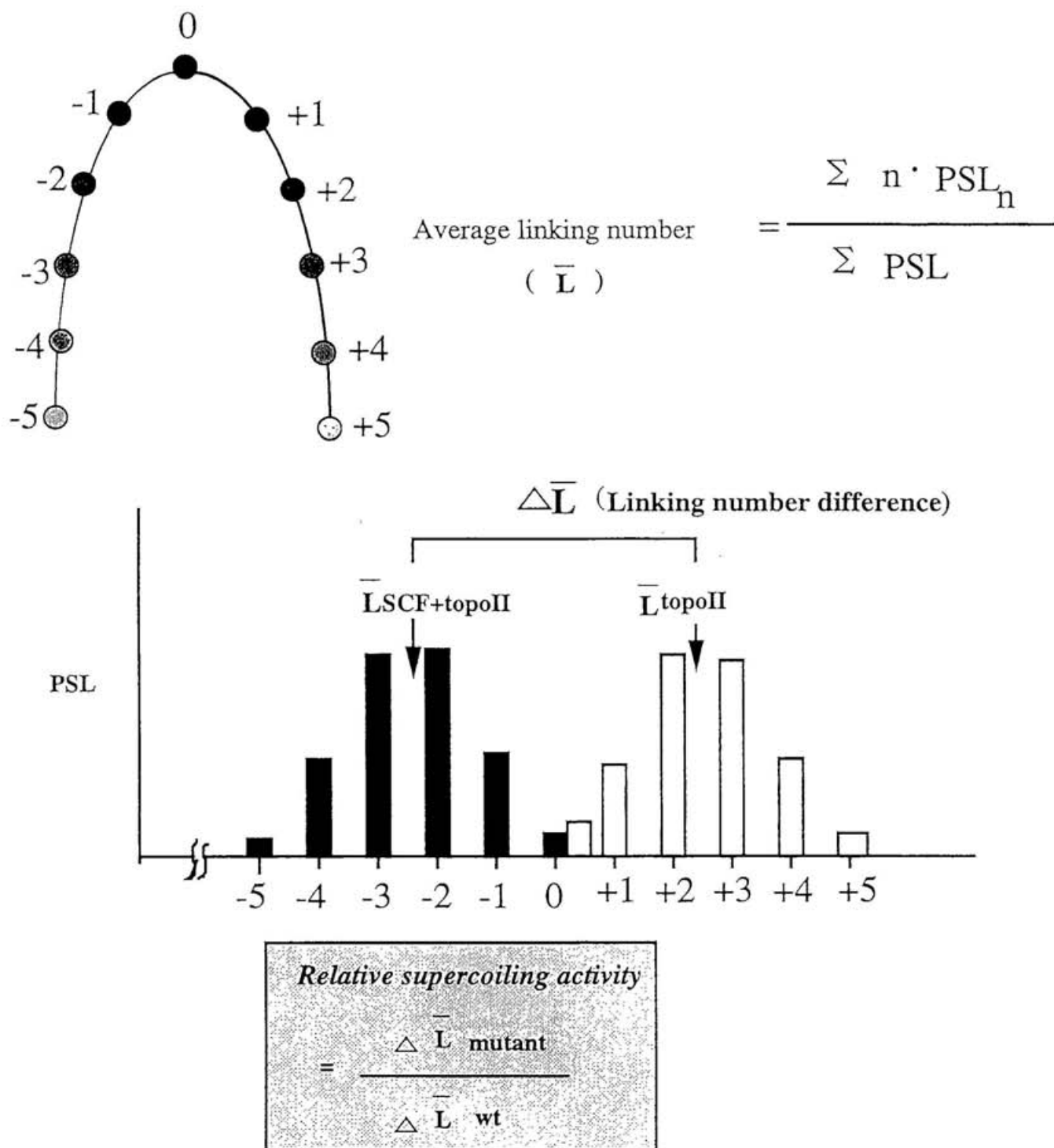


Fig.1 超らせん化活性の定量方法

2次元電気泳動における各トポアイソマーのパターンの重量平均を average linking number とする。この average linking number を SCF と topoisomerase II を入れた反応系と topoisomerase II のみの反応系でそれぞれ計算してその差を linking number difference とし、この値を野生型 SCF と変異体 SCF でそれぞれ計算してその相対比で比較した。

PSL 値：BAS2000 で定量した値

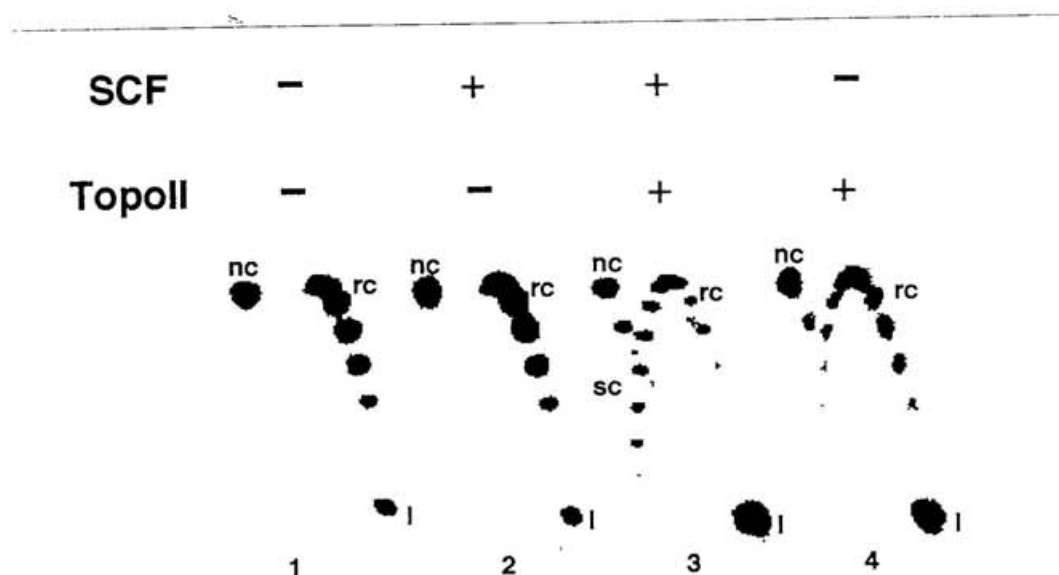


Fig.2 組換えショウジョウバエ SCF の超らせん化活性

大腸菌で発現させたショウジョウバエ SCF (N末端ヒスチジンタグ) の超らせん化活性をtopoisomerase II(HeLa細胞由来) を用いて測定した。図は2次元電気泳動のパターンを示したもので、1次元目はgel topからbottomにかけて泳動し、2次元目は左から右へ泳動した。
 rc ; relaxed closed circular DNA nc ; nicked circular DNA
 sc ; negatively supercoiled circular DNA

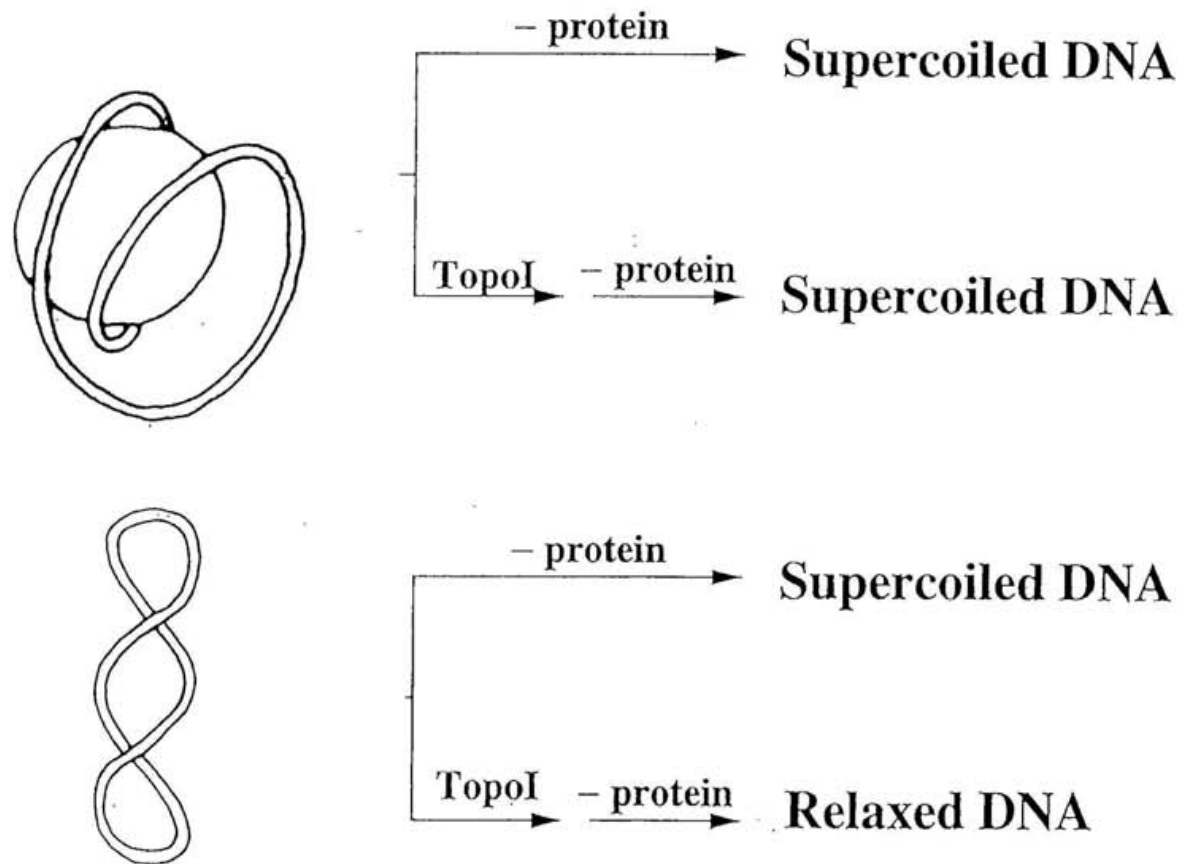
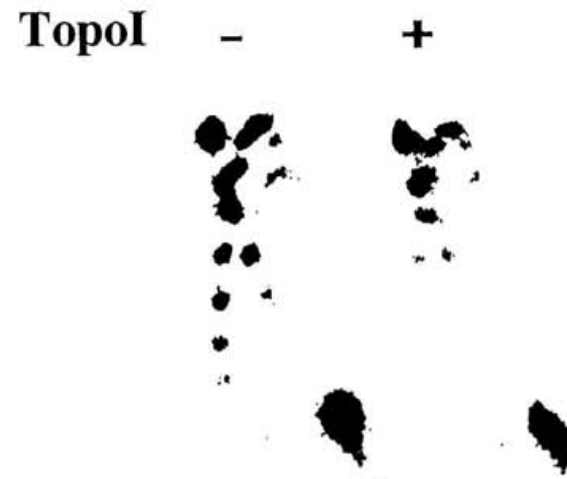


Fig.3 超らせん化反応後のTopoisomerase I 処理

SCFとtopoisomeraseIIによって導入された超らせんの歪みがnucleosome中のDNAの様にタンパクとの相互作用によって潜在化しているのか、gyrase反応産物の様に束縛されていないのか判定するために行った実験のスキーム。gyrase型であればtopoisomerase I処理後にrelaxed DNAとなる。(Fig. 最下段)。



47

Fig.4 超らせん化反応後の topoisomerase I処理

超らせん化反応後、さらにtopoisomerase I処理を行ったところ relaxed DNAとなった。超らせんの歪みが束縛されていないgyrase 型であることが判明した。

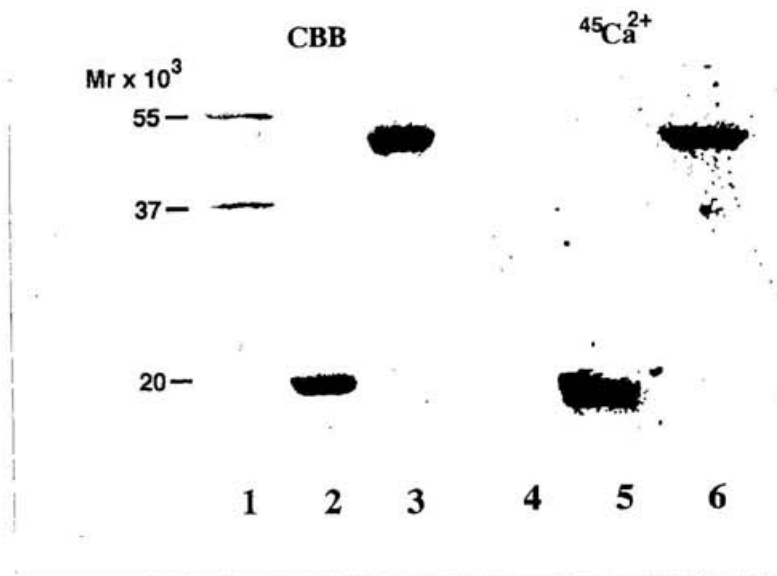


Fig.5 SCF のCa²⁺-blotting

SCF, calmodulinをSDS-PAGEにかけ、ニトロセルロース膜にblotting後、⁴⁵Ca²⁺でインキュベーションした。

lane1~3; SDS-PAGE, CBBR-250染色 lane4~6; Ca²⁺ blotting

lane1, 4: marker protein(rat liver glutamate dehydrogenase(55KDa), rabbit muscle lactate dehydrogenase(37KDa)、Soybean trypsin inhibitor(20KDa))

lane 2, 5: calmodulin (bovine brain)

lane 3, 6: SCF

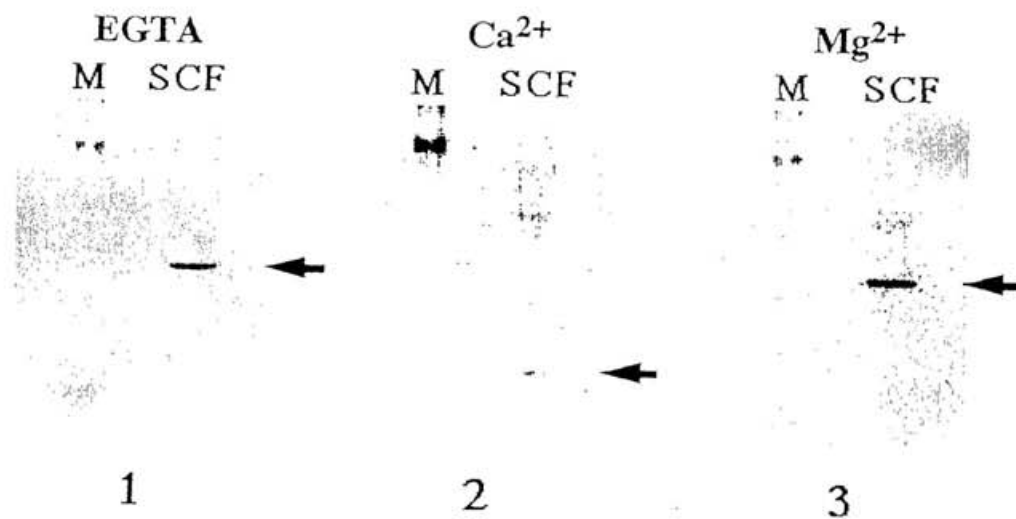


Fig.6 SCF のNative gel 電気泳動

矢印はSCFを示しCaCl₂ でインキュベーションした時はEGTAやMgCl₂ に比べて移動度が早くなった。

1: 200 μ M EGTA 2: 200 μ M CaCl₂ 3: 200 μ M MgCl₂

M (分子量Marker) : Fructose-6-phosphate kinase (rabbit muscle); 85KDa

Glutamate dehydrogenase (bovine liver); 55KDa

Aldolase (rabbit muscle); 39KDa

Triose phosphate isomerase (rabbit muscle); 26KDa

Trypsin-inhibitor (soybean); 20KDa

Lysozyme (hen egg white); 14KDa

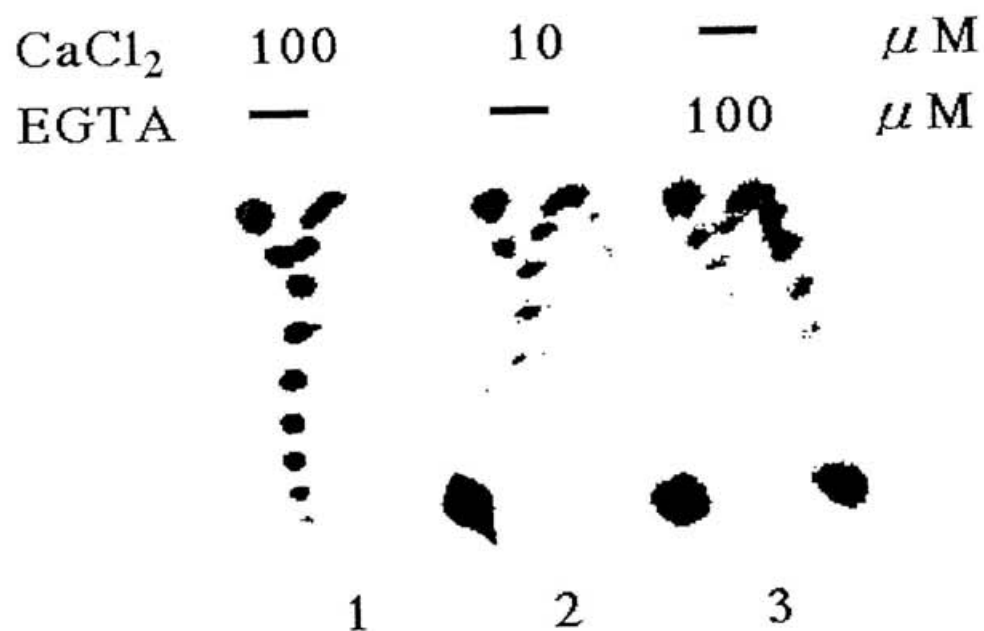


Fig.7 超らせん化活性は Ca^{2+} を必要とする。

超らせん化活性は Ca^{2+} をキレートすると見られなくなった。

$10\text{ }\mu\text{M}$ の Ca^{2+} 濃度まで活性が見られ、 $100\text{ }\mu\text{M}$ Ca^{2+} 濃度で最大活性となった。

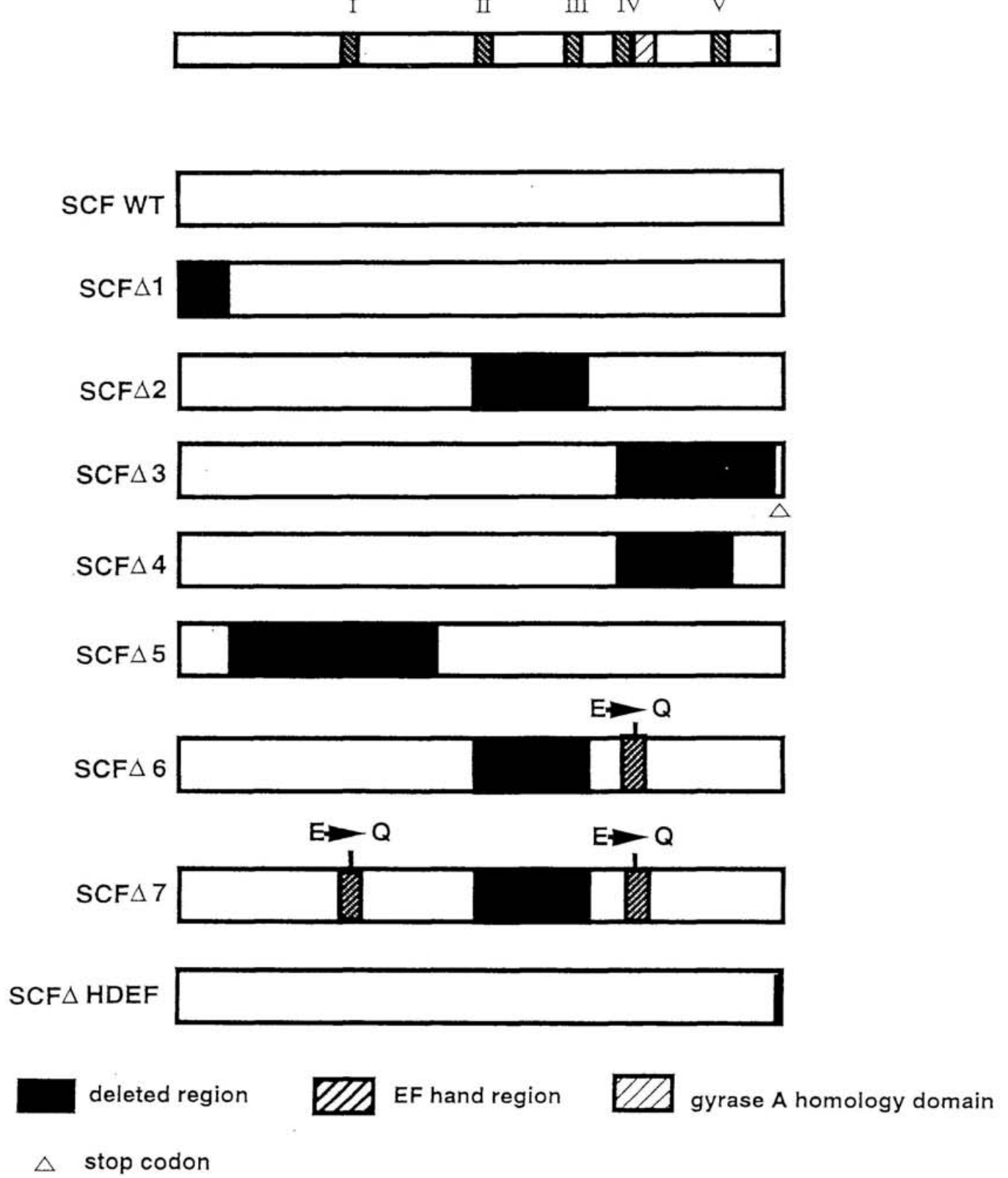


Fig.8-1 SCFの欠失変異体およびアミノ酸置換変異体

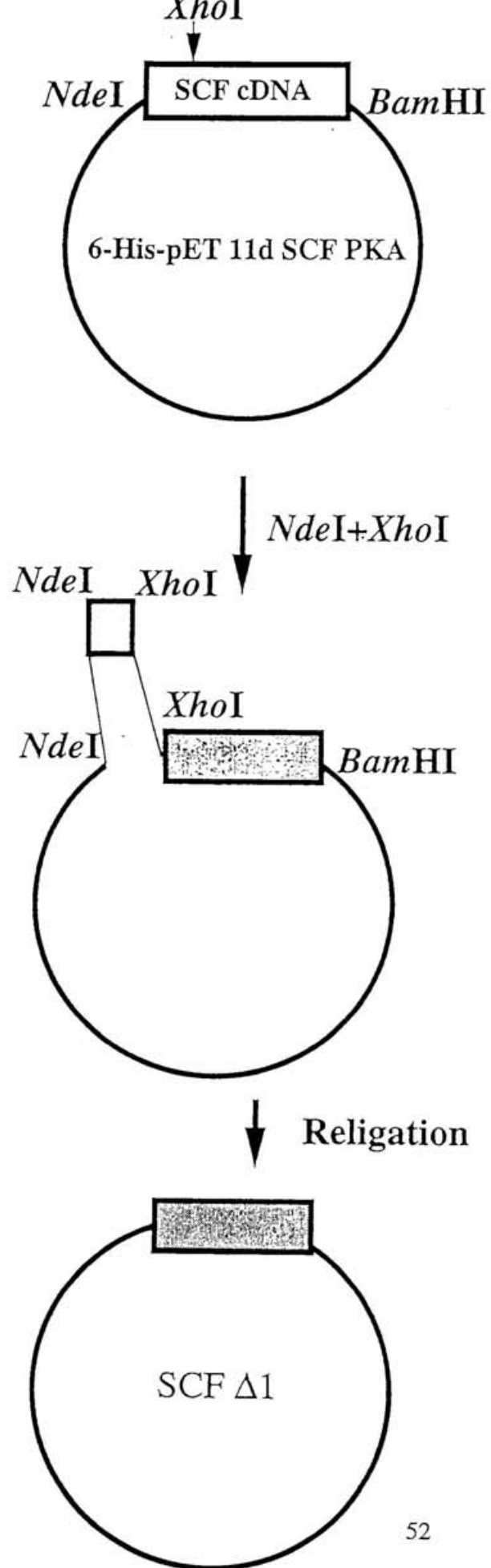


Fig.8-2-1

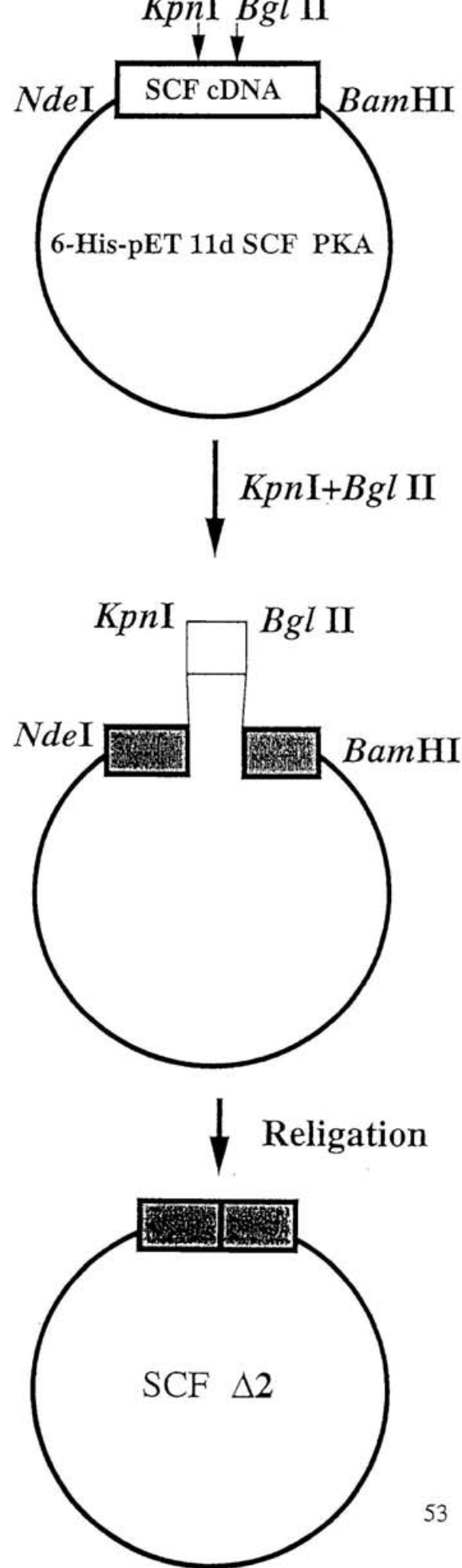


Fig.8-2-2

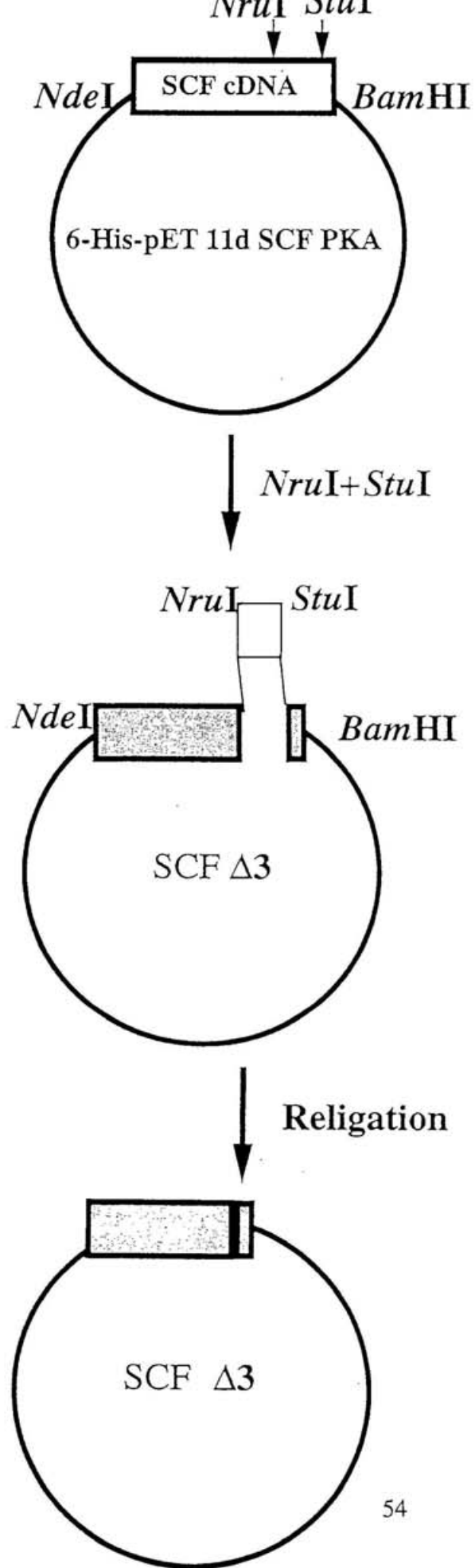


Fig.8-2-3

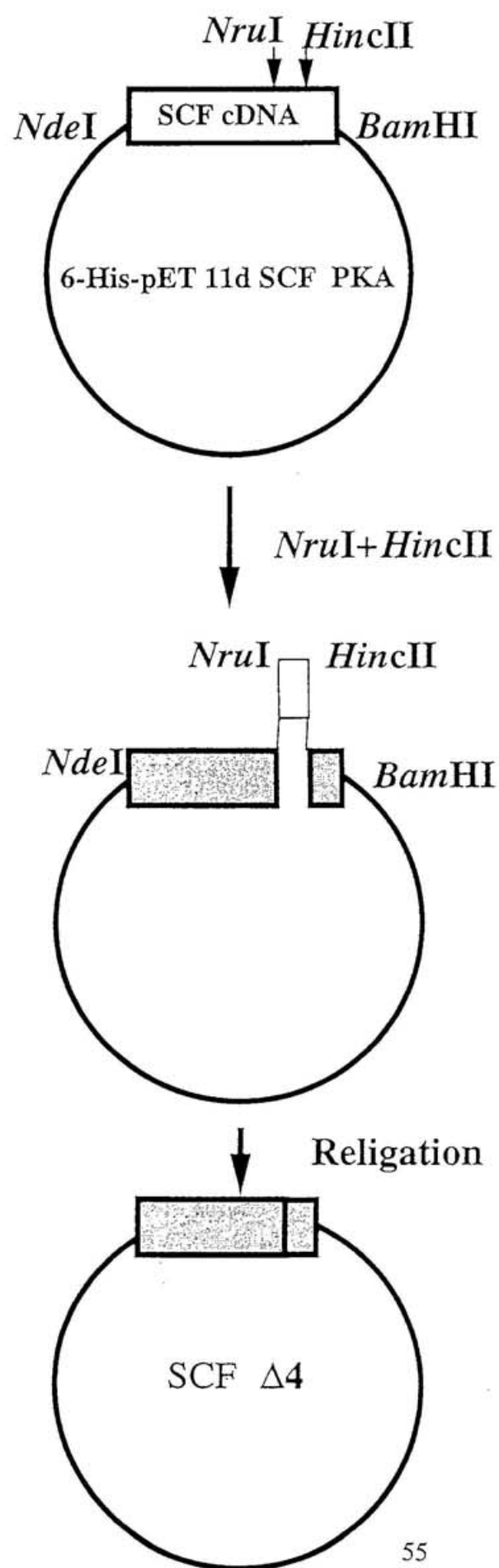


Fig.8-2-4

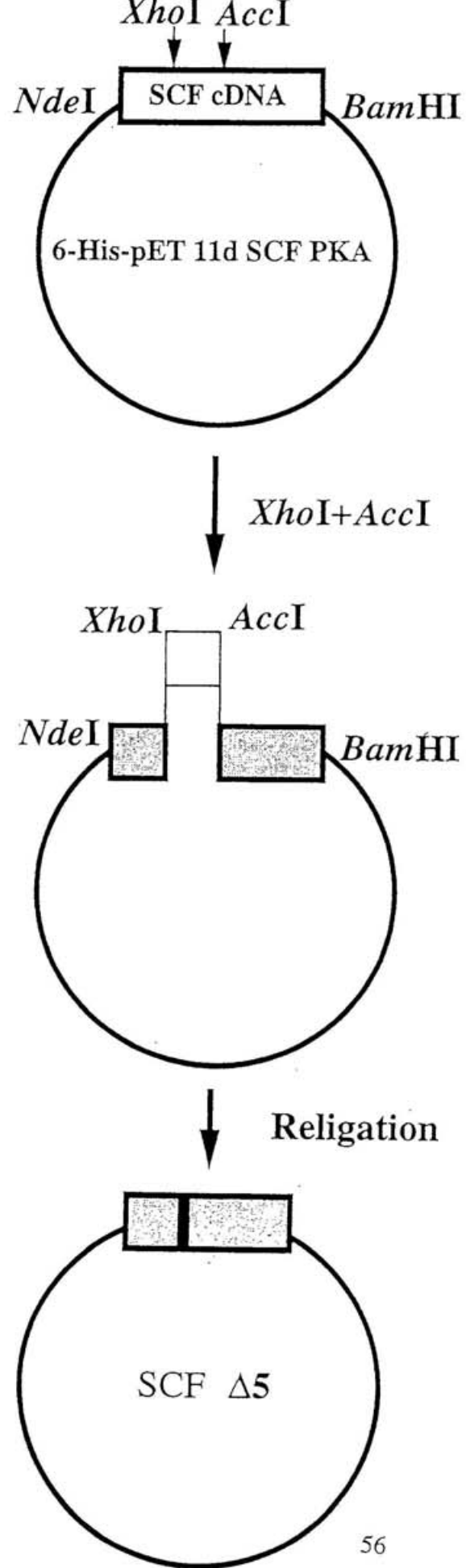


Fig.8-2-5

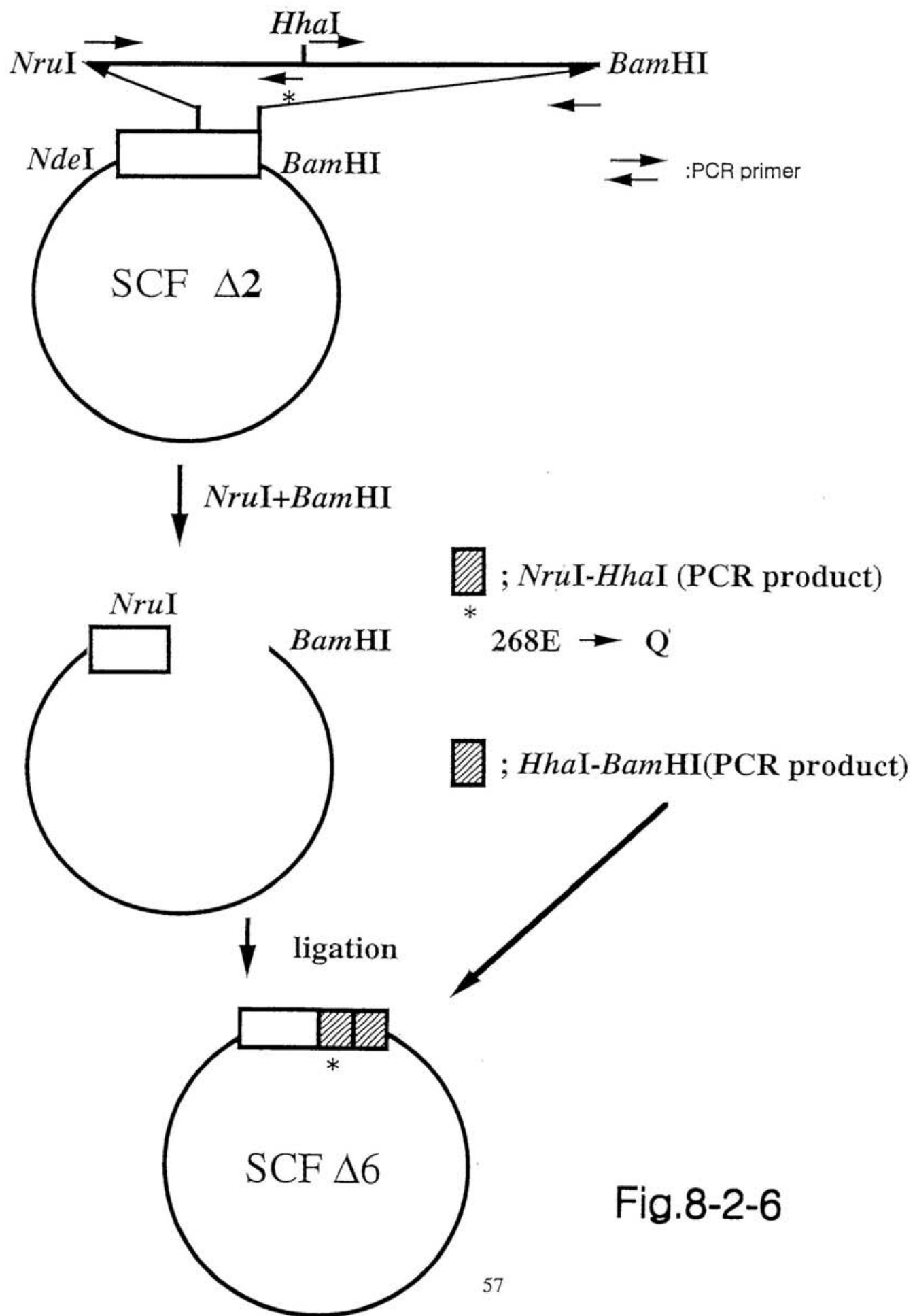


Fig.8-2-6

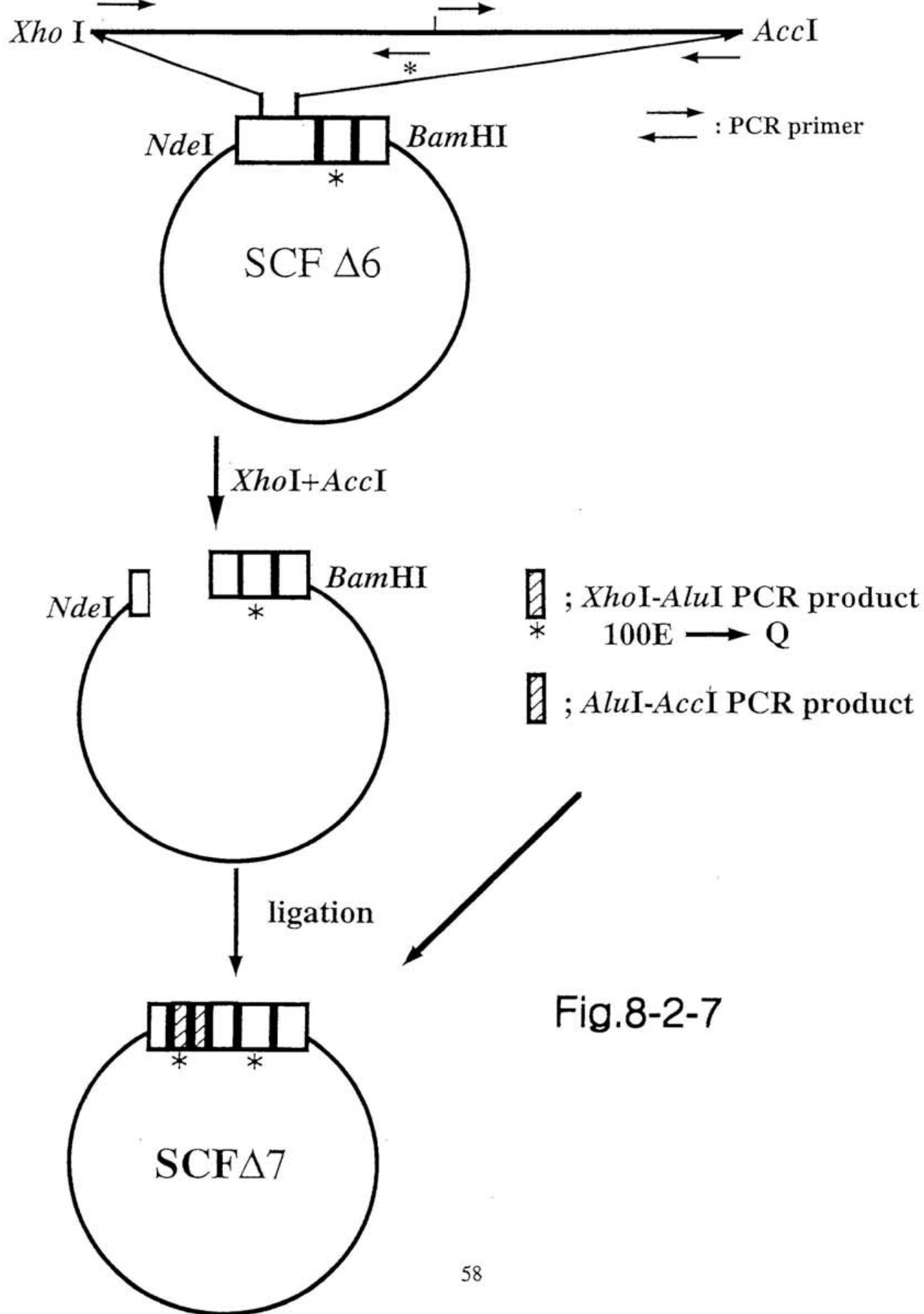
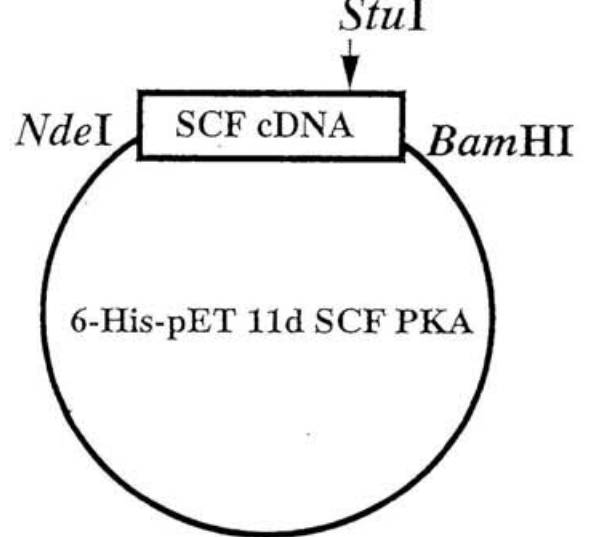
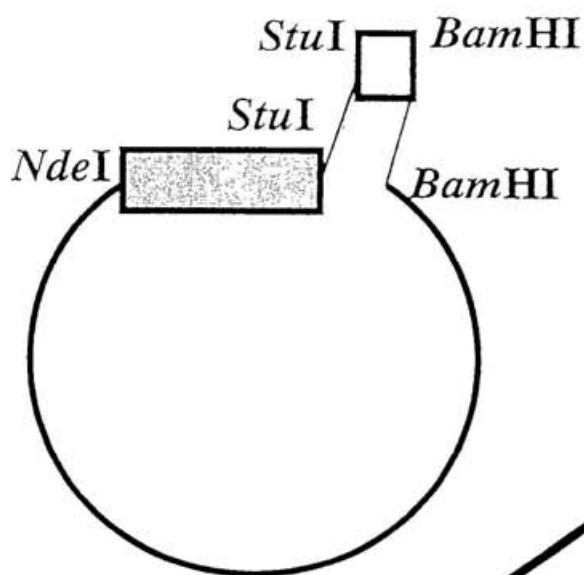


Fig.8-2-7



*Stu*I + *Bam*HI



*Stu*I SCF C末端

GGCCTTGGCCCGCCACGATGAGTTCTAG

A L A R H D E F stop codon

*Stu*I oligo DNA *Bam*HI

oligo 1 G CCTTGGCCCGCTAGCCATGG

oligo 2 C GGAACCGGGCGATCGGTACCCTAG

A L A R stop codon

ligation

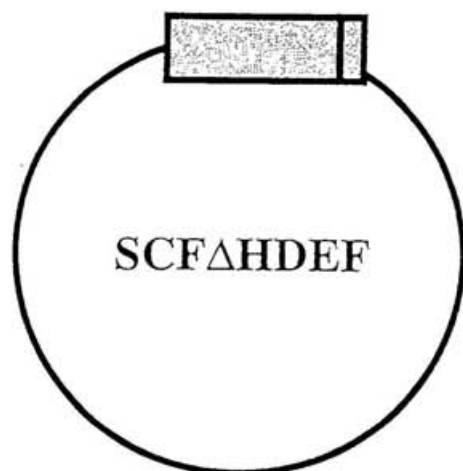


Fig.8-2-8

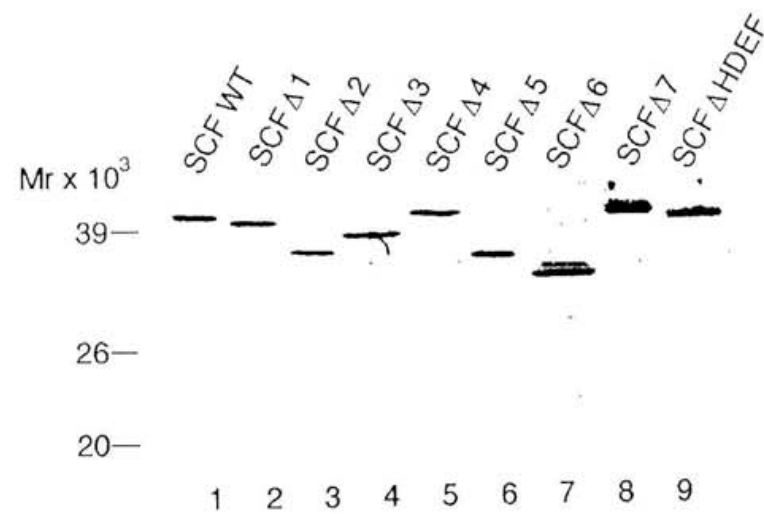


Fig.9 S C F 変異体の SDS-PAGE

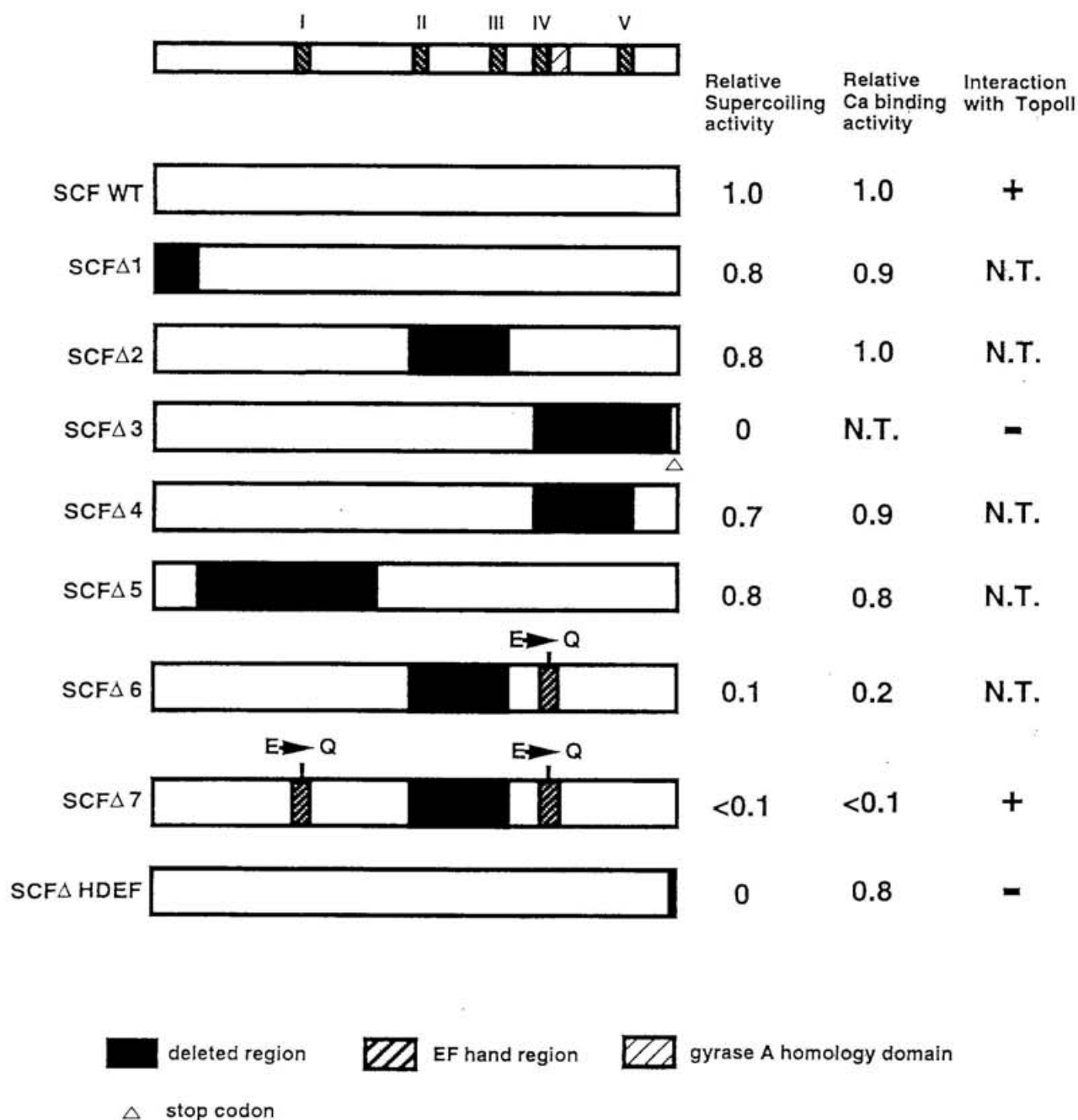


Fig.10 変異体 S C F の超らせん化活性と Ca^{2+} 、topoisomerase II 結合能

EF hand domain 1,3,4 を破壊した変異体および C 末端 HDEF 配列を欠失した変異体では超らせん化活性が著しく低下した。また、 Ca^{2+} 結合能が低下するにつれて超らせん化活性も同様に低下した。一方、S C F と topoisomerase II の結合は EF hand を破壊した変異体 (S C F Δ7) では見られたが、H D E F を欠いた変異体では見られなかった。N.T.; Not Tested

Position in		10	12	14	15	18	21	
EF-hand		X	Y	Z		-X	-Z	
EF-hand		D	D	DG		D	E	
consensus			N	N		N		
				S		E		
						Q		
						S		
						T		
Calmodulin	1	55	DADQNGTIDFPD					66
Calmodulin	2	93	DKEQNGFISAAE					104
Troponin	C	106	DKADGFIDIEE					117
Factor	sequence 1	89	DENKDGSVTLAE					100
Factor	sequence 2	177	DQDLDDNLTKDE					188
Factor	sequence 3	214	DKQHDCKISVD					225
Factor	sequence 4	257	DLKDCYLNEE					268
Factor	sequence 5	293	DADHDDKL DKE					304

Fig.11 SCF EF hand domain のalignment

5つのEF hand domainのうちsequence2とsequence5はCa²⁺結合能に重要な中央部のglycineが保存されておらず、その結合能は低いものと思われる。そのため、アミノ酸置換変異体としてsequence 1,3,4に注目して変異体を作製した。

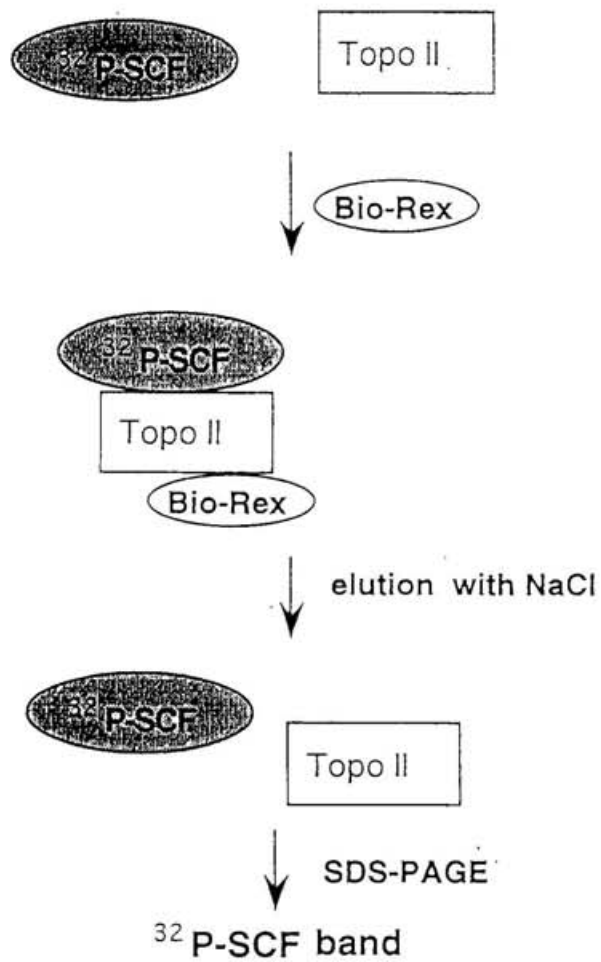


Fig.12-1 SCFとtopoisomerase II の相互作用
Beadsを用いた方法

topoisomerase IIのみと結合するBio-Rex 70 ResinをSCFとtopoisomerase II の反応系に加え、結合した ^{32}P SCFをSDS-PAGEで検出した。

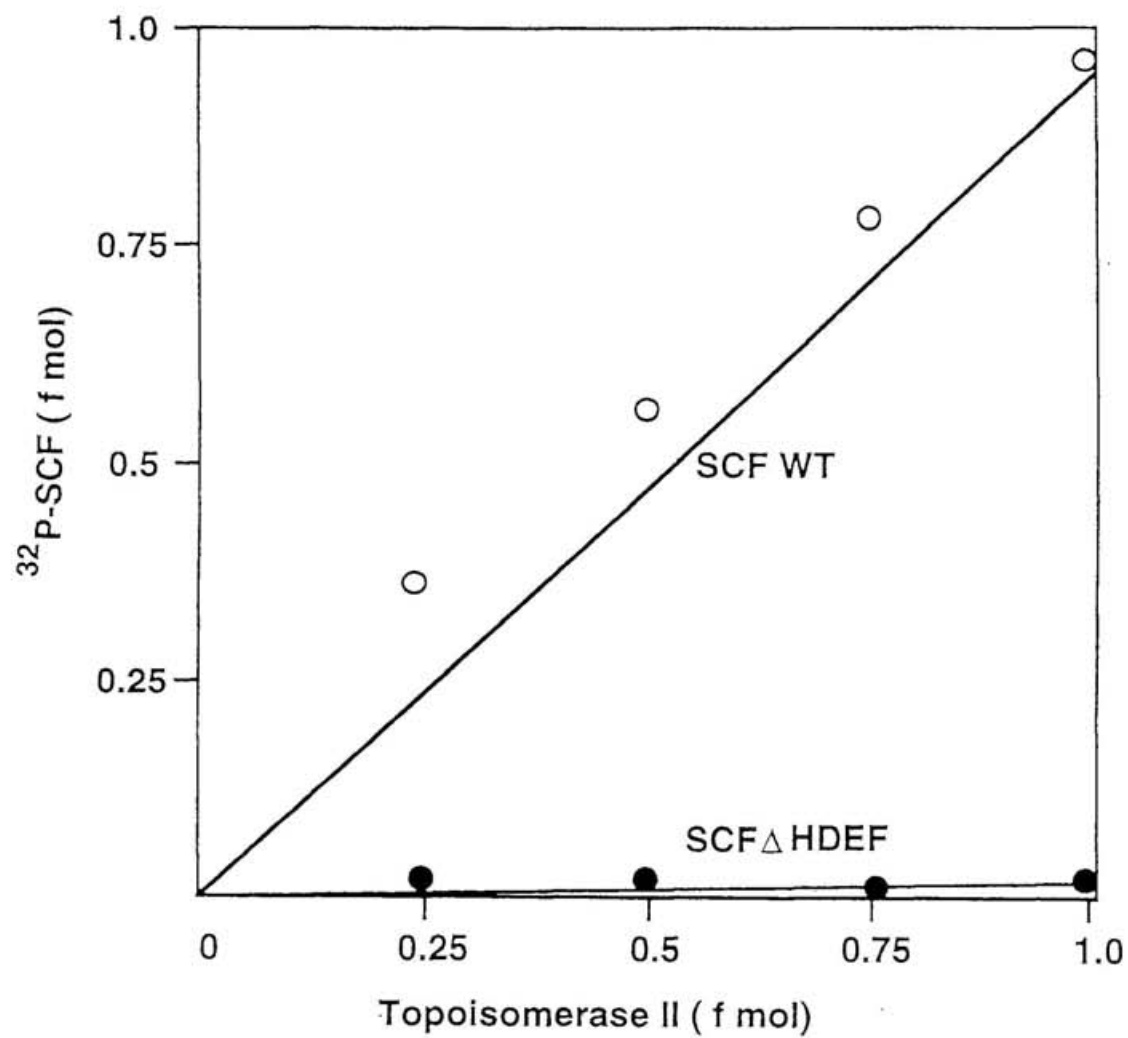


Fig.12-2 SCF とtopoisomerase IIとの相互作用
Beadsを用いた方法

野生型のSCFは、topoisomerase IIと1:1に結合したのに対して、C末端HDEF配列を欠失した変異体では全く結合が見られなかった。

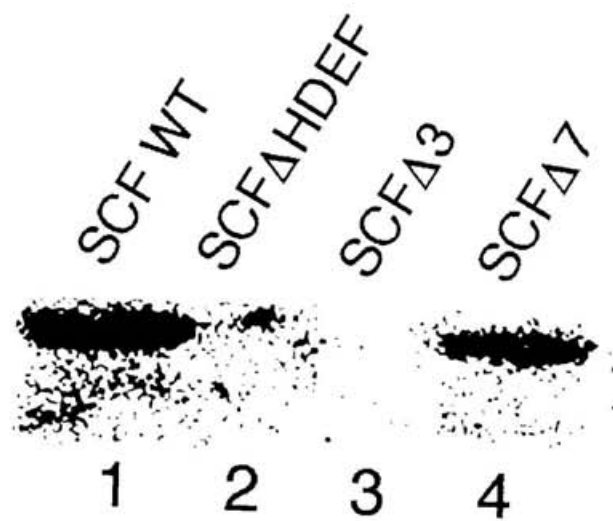


Fig.13 SCFと topoisomerase II の相互作用

³²P 標識 topoisomerase IIを用いてfar-Western 法で検出した。

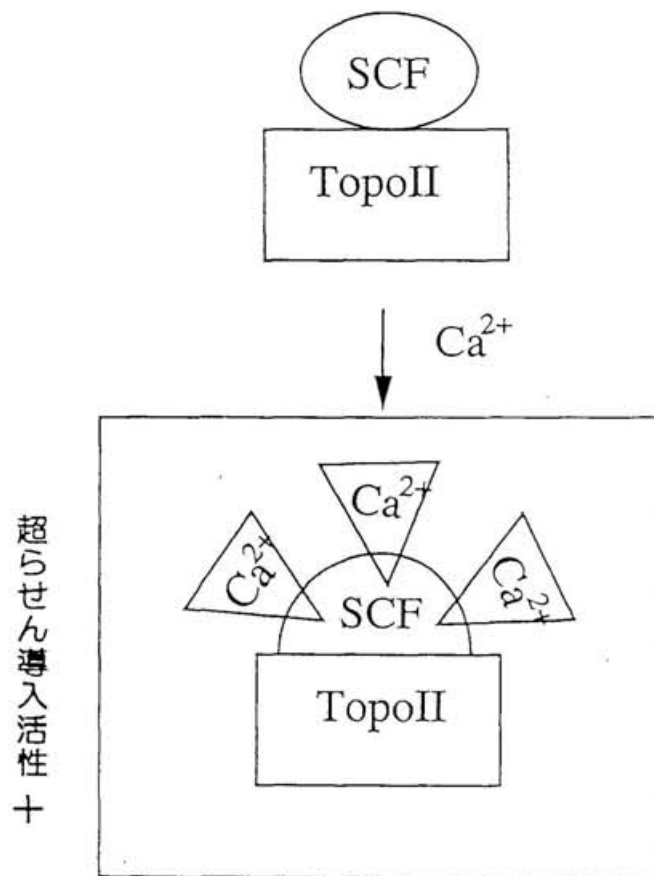


Fig.14 S C F とtopoisomerase IIによる超らせん導入活性のモデル

S C F とtopoisomerase IIは Ca^{2+} 非依存的に結合する。超らせん導入活性には Ca^{2+} の結合によるS C Fの高次構造変化が必要と考えられる。