

氏 名 浅 野 敏

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第272号

学位授与の日付 平成9年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究所 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 大腸菌繊維状フェージ複製開始蛋白の作用機構

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 石濱 明
教 授 嶋本 伸雄
助 教 授 定家 義人
教 授 廣川 秀夫（上智大学）
教 授 大坪 榮一（東京大学）

論文内容の要旨

大腸菌繊維状ファージ f d のゲノムは、プラス鎖性の一本鎖DNAである。ゲノムは、感染後まず二本鎖となり、その後ローリングサークル型複製でプラス鎖が合成される。ゲノム複製で中心的な役割をするのはファージ自身がコードする410アミノ酸残基からなる複製開始蛋白gpIIである。複製は、gpIIがプラス鎖ゲノム上の複製開始点オリジンに一本鎖切断(nick)を導入することによって開始される。gpIIはこの切断を起こすエンドヌクレアーゼ活性の他に、塩基配列特異的DNA結合能やDNA鎖を連結するリガーゼ様活性などを持つ多機能蛋白質である。現在までに、gpIIがオリジンDNAに結合すると、DNAが湾曲し、切断部位近傍の二本鎖DNAの二重らせん構造の解消(melting)が起きること、melting反応には負の超螺旋を必要とすること、nicking反応にはMg²⁺を必要とすること等が明らかになっている。本研究は、gpIIのもつ機能の解析、中でも、ローリングサークル型の複製にとって最も重要な機能であるnicking反応の作用機構の解明を目的に実施された。

gpIIの作用機構を解析する目的でまず、一本鎖合成オリゴDNAを基質として用いて、エンドヌクレアーゼ活性が検索された。その結果、極めて微弱ながら一本鎖DNA特異的エンドヌクレアーゼ活性を持つことが明らかにされた。次にgpIIのオリジン部位DNA切断活性を検出する目的で、オリジンに似た構造のDNA、即ちnicking site周辺の領域が一本鎖で、尚且つgpIIが結合するのに必要な領域が二本鎖である基質DNAが作製された。この基質を用いたことによって、これまでの負の超らせんを持つ環状二本鎖DNAを基質とした系に較べ、比較的簡便に放射性標識が行え、その結果高い検出感度を得られ、短時間に終了してしまう反応についても、反応過程を解析できるようになった。この反応系を用いて、まず、gpIIとnick導入後のDNAの5'-P末端との間で、蛋白質-DNA共有結合複合体が形成されるか否かが検討された。このような複合体形成は、ローリングサークル型複製を行う、他の多くのファージ、プラスミドの複製開始蛋白において観察されるものであるが、これまで繊維状ファージの複製系においては検出されていなかった。解析の結果、gpIIが切断後の5'-P末端との間に、少量ではあるが共有結合中間体を形成することが確認された。この複合体は非常に不安定であり、反応開始直後には検出されるが、その後短時間のうちに検出されなくなることが明らかになった。中間体が少量しか検出できないのは、gpII自身のもつ蛋白質-DNA共有結合を解消する機能に依るものであると考えられる。

この結果を実証する目的で、DNAと共有結合を形成するアミノ酸残基の同定が行われた。切断部位DNAリン原子にのみ放射性同位元素(³²P)を持つ基質が作製され、それと反応させて形成された複合体を酸(6N HCl)によって加水分解し、分解産物がろ紙電気泳動で分析された結果、オリジンDNAとリン酸ジエステル結合を形成しているのは、蛋白質チロシン(Tyr)残基であることを確認された。次にこのTyr残基を特定する目的でTyr残基をフェニルアラニン(Phe)に置換した変異gpII蛋白が作成された。gpIIの一次配列上にはTyr残基が15ヶ所存在する。そのうち一ヶ所をPhe残基に置換した一連の変異gpII15種を作製され、変異体それぞれについて、gene II内にamber変異をもつ変異ファー

に比べて弱いものが3種、42°Cでの温度感受性を示すものが3種、そして全く相補しないものが1種が得られた。唯一の、全く相補しない変異体は、197番目のTyr残基をPhe残基に置換したgpII Y197Fであった。そこでgpII Y197F変異体を精製し、*in vitro*でのオリジンDNAへの結合能ならびにnicking活性を測定した処、オリジンDNAに特異的に結合してDNAを湾曲はするが、nicking活性は有しないことが明らかになった。

次にcovalent complexを形成するTyr残基の位置を直接決定するために、共有結合複合体をトリブシンで分解した後、DNAを結合したペプチドを、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分離し、ペプチドシーケンシングを行う方法で、その位置が同定された。その結果、オリジンDNAを結合しているのは、197番目のTyr残基であることが判明した。以上、*in vivo*と*in vitro*の実験全てにおいて、197番目のTyr残基がnicking反応の活性中心であると結論された。溶菌型ファージであるφX174ファージの複製開始蛋白(CisA)は安定なDNA結合中間体を形成する。それに対しfdファージのgpIIは、自身の作用により、gpIIとDNAの5'末端との間の共有結合を速やかに解消するが、この中間体不安定性が複製サイクルを減弱し、宿主菌の増殖との調和のとれたファージDNA複製を可能にするものと推論された。

論文の審査結果の要旨

大腸菌繊維状ファージ f d のゲノムは、プラス鎖性の一本鎖DNAである。感染後ゲノムDNAが二本鎖となる複製第一段階の反応で、中心的な役割をするのはファージ自身がコードする410アミノ酸残基からなる複製開始蛋白gpIIである。オリジン構造を含み、高放射能標識をした人工基質DNAが作製され、gpIIの反応機構を解析された。実験結果は、f d ファージgpIIも不安定ではあるが、蛋白質-核酸共有結合中間体を形成すること、gpIIが共有結合解消活性をもつこと、gpIIの197番目Tyr残基がDNA切断反応の活性中心であることを示し、論文記載の結論は妥当である。また、gpIIの反応機構の特性と、f d ファージ *in vivo* 複製サイクルの不連続性、宿主菌の増殖との調和など、表現型との相関に関する討論も妥当である。本大学院に相応しい、基礎的且つ先端的な研究課題を、工夫を凝らして解決した努力は評価してよい。拠って、本論文は、学位の授与をするに相応しいと判定された。

なお、学位論文審査委員会は、公聴会の直後、公聴会での講演と討論の内容、学位論文の内容などを素材とした討論形式で、申請者の学力試験を実施した。論文記載実験から抽出した結論は、妥当ではあるが、酵素反応機構の詳細についてはまだ不明の点もあり、それら問題点の把握も出来ていると判断された。また、*in vitro* DNA切断反応の特性と、f d ファージの *in vivo* 増殖の特性との相関も、妥当な推論をしている。真核生物を含めたより広い範囲での、蛋白質-核酸共有結合形成の類似現象との比較など、より広い背景についても、大学院生水準の討論をした。英語については、論文要旨の英文内容、準備中の投稿論文原稿の内容、論文記載参考文献の理解の程度から、学位授与水準の能力はありと判断された。