RNA の構造変化による ColE1 DNA 複製開始の調節

名古屋大学理学部分子生物学教室 升 方 久 夫

Initiation of ColE1 plasmid replication requires hybridization of the primer transcript (RNA II) to the template DNA at the replication origin. The hybridization is inhibited by binding of another RNA, RNA I, to RNA II. This binding, which occurs in the nonessential region proximal to the 5'-end of RNA II, alters the secondary structure of RNA II even in the region far downstream of the segment where RNA I binds. Similar functional and structural alterations of RNA II are caused by a single-base change within the nonessential region. By forming an alternative structure, the dispensable region affects folding of a downstream region, and thus participates in the regulation of DNA replication.

DNA replication / transcription / primer / RNA / DNA hybrid / antisense RNA / RNA structure

I. はじめに

細胞の増殖、分裂制御のためには、遺伝子本体である DNA が、ある秩序のもとに複製することが必要である。また、複製の制御は、複製開始の段階でなされるのが最も効率が良いと考えられる。そのためには、複製をゲノム上の特定の領域から開始させる機構が存在するはずであり、また逆に、特異的にその反応を抑える機構も存在すると考えられる。多くの場合、それらの特異性は、DNA 上の特異的な塩基配列とそれを認識する特異的な蛋白質の機能によっている。しかしながら、複製開始とその調節の特異性が蛋白質によってではなく、RNA によって決定される場合もある。大腸菌のコリシン E1 プラスミド (ColE1) の複製開始には、複製開始領域から転写される RNA が重要な役割を果たしている。この場合、RNA の塩基配列のみならず、ある特定の三次構造が必要である。蛋白質であれ RNA であれ、ある機能を持つためには、特異的な構造を保たねばならないのは当然のことであろう。ColE1 の場合、さらにその RNA の三次構造が、調節因子 (これも RNA である) の作用する標的であり、複製開始は、RNA の構造変化を通して制御されている。

II. 複製開始の機構

ColE1 は大腸菌を宿主とする環状二重鎖 DNA で、野生型大腸菌中での ColE1 の複製は、DNA 上のある特定の場所から開始する^{1,2)}。この点を複製起点 (replication origin) と呼ぶ。ColE1 の *in vitro* での複製開始には、大腸菌の 3 つの酵素 (RNA ポリメラーゼ, RNaseH, DNA ポリメラーゼ I) で充分であることが示されている³⁾。RNA ポリメラーゼは鋳型 DNA に相補的な RNA を合成する酵素、RNaseH は DNA と対合した RNA のみを分解するエンドヌクレアーゼ、DNA ポリメラーゼ I は鋳型 DNA に対合したプライマー (DNA や RNA) の 3' 末端から DNA を伸長する酵素である。反応産物の解析から導かれた、これら 3 つの酵素による複製開始のモデルを図 1 に示す。

複製起点の 555 塩基対 (bp) 上流から、RNA ポリメラーゼがプライマー前駆体 RNA (RNA II) の転写を開始する (ステップ 1)。合成されつつある RNA の 5' 側部分が、順次、鋳型から離れて独自の三次構造をとって転写が進む (ステップ 2)。転写が複製起点付近を通過する時、RNA II が鋳型 DNA と対合したままで転写が進み、RNA/DNA 対合 (hybrid) を形成する (ステップ 3)。通常の *in vitro* の条件下では、約 70% の RNA II 分子が DNA と対合し、残りの分子は、対合せずにそのまま転写が進む (ステップ 3 のカッコ内)。DNA と対合した RNA II は、RNaseH により複製起点およびその下流で切断され、555 ヌクレオチドのプライマーとなる (ステップ 4)。最後に、プライマー RNA の 3' 末端から、DNA ポリメラーゼ I によ

Control of Initiation of ColE1 Plasmid Replication by Alteration of RNA Conformation
Hisao MASUKATA

Department of Molecular Biology, School of Science,
Nagoya University

図 1. ColE1 複製開始とその調節の過程。

左側ステップ 3 では、RNA II の大部分が DNA との対合体を形成するが、少数の分子は対合しない（カッコ内）。影のはいった丸印は RNA ポリメラーゼを示す。▲印は複製起点を、マイナスのついた数字は、複製起点の上流の位置を bp で示す。

図 2. プライマー形成に異常のある点突然変異 (*pri*) 及びその抑制変異 (*spr*) の位置とそれらの影響をうけるプライマー形成のステップ⁴⁾⁶⁾。

下向きの矢印は *pri* 変異の、上向きの矢印は *spr* 変異の位置を示す。 *spr* 変異の名前の最初の数字は、特異的に抑制する *pri* 変異を示す (例, *pri*7-*spr*71)。Ter は RNA II の転写終結点を示す。

る DNA 合成が開始する (ステップ 5)。ここでひとつ注意を喚起しておきたいのは、プライマー形成は転写が起こった DNA 上でしか検出されないことである。つまり精製した RNA II を DNA に加えても、特異的な対合や DNA 合成は起こらない。

さて、上記のステップを経て複製が開始することは、複製できない ColE1 変異株を単離し、何故それらが複製できないかを解析することによって証明された⁴⁾。大腸菌中で複製に異常を示す点突然変異体は、いずれ

も上記のステップのどこかに異常のあるものであった。

(*pri* mutation, 図 2)。たとえば、RNA II が DNA と対合できないもの、対合した RNA が RNaseH の切断後に DNA から離れてしまうもの、あるいは DNA ポリメラーゼ I によって低効率でしかプライマーとして使われないものなどである。この結果は、*pri* 変異の得られた場所が、各々の反応ステップに参与していることを示している。さらに、*pri* 変異の場所がどのように働いているかを知るために、抑制変異 (*spr*) を

分離した。多くの場合 *spr* 変異は、特異的に *pri* 変異を抑制し、しかも、*pri* 変異のある領域と相補性のある領域に見出された (図2)。この結果は、それぞれ2つの領域が塩基対をつくること、対応する機能にとって必要であることを示している。おそらく、これらの領域が関与する RNA II の高次構造が重要なのであろう。

III. RNA I による複製開始の制御

ところで、ColE1 プラスミドの細胞内分子数は、負の制御機構によって一定に保たれている。この機構には、RNA II の5'末端付近に対応する逆鎖 DNA から転写される108ヌクレオチドの RNA I が関与している⁵⁾。RNA II は蛋白質をコードしないが、機能を持つという意味で sense RNA であるから、RNA I はアンチセンス (antisense) RNA と呼ぶことができる。RNA I が、RNA II の相補領域に結合すると、複製起点での RNA II と DNA との対合が阻害されるので、複製は起こらない (図1、右側)⁵¹⁾。

さて、RNA I の結合は、400ヌクレオチド以上も離れた複製起点での反応を、どのような機構で阻害するのであろうか。第一の可能性は、RNA I の結合する RNA II 領域が DNA と対合する反応に必須であり、そこへの RNA I の結合が直接的阻害となる場合である。第二には、RNA I の結合する領域は必須ではなく、RNA I の結合は他の必須な領域の機能を間接的に阻害する可能性である。この場合は、RNA II の分子内で、構造変化を通しての情報の伝達があるであろう。この2つの可能性を区別するために、RNA II の5'末端から、下流の各位置までを欠失した変異株をつくり、複製起点での RNA II と DNA の対合活性を調べた (図3)。詳しい解釈は後で述べることにして、結論

は、RNA I の結合領域を含む約200ヌクレオチドは、複製開始に必須ではないということである。

IV. RNA の構造変化

次に、RNA I の結合が、RNA II の構造にどのような影響を及ぼすかを調べる必要がある。転写後に RNA II を精製してしまうと、高次構造を歪めてしまう恐れがあるので、転写途中、あるいは転写直後の RNA をそのまま調べられる方法でなければならない。そこで、高次構造をとる RNA II 内の一本鎖部分と二本鎖部分を、RNase の選択的分解によって識別する方法を用いた。

RNA 分解酵素のうち、RNase T1 や RNase A は、一本鎖部分の特異的塩基を効率よく分解する。また、RNase V1 は二本鎖領域を切断する。転写開始時に5'末端付近を³²Pで標識した RNA II を各々の RNase で部分分解し、その産物をゲル電気泳動で解析する。図4に、野性型 RNA II、RNA I 存在下でつくられた野性型 RNA II、さらに DNA と対合しない *pri* 7 RNA II の部分分解の例を示す。RNA I 存在下でつくられた RNA II の切断箇所は、RNA I 非存在下でつくられた野性型のものと、広い領域にわたって、異なる。また *pri* 7 RNA II は、RNA I 存在下の野性型とほとんど同じ箇所切断される。*pri* 7 変異は、複製起点の469bp 上流であるから、変異から遙かに離れた領域の構造も変化していることがわかる。これらの結果は、RNA II と DNA との対合を阻害する2つの異なる要因が、RNA II に類似の構造変化をもたらしたことを示している。

仮りに、RNA II の構造変化が DNA との対合活性を失わせているのであれば、*pri* 7 RNA II の活性を回復させる *spr* 変異は、RNA II の構造を元にもどすので

図3. 欠失変異のプライマー形成に対する影響⁶⁾。

欠失変異は ColE1 と R プラスミドの複合プラスミドから Bal31ヌクレアーゼの分解により作製した。白抜き部分が欠失領域を示す。図左側の十ーは大腸菌野性株での ColE1 としての複製能を示す。また、*in vitro* での RNaseH による切断効率を、野性型 RNA II を100%として示した。 α および β はパンドローム配列を示す。

図4. RNA IIのRNaseによる部分分解⁶⁾.

5'末端付近を³²Pで標識したRNA IIを、転写反応液中で直ちにRNaseT1およびRNaseAで、部分分解し、産物をゲル電気泳動で解析した。図中、Wは野生型、7はpri7RNA IIを示す。Refは長さのマーカを示す。主要な切断箇所を左側に示した。◁印はpri7変異の位置を示す。

あろうか。pri7変異を抑制する6種類のspr変異について、DNAとの対合効率とDNA IIの構造に対する影響とを調べたところ、確かに活性の回復の程度に応じてRNA IIの構造が野生型に似た形に回復していた⁶⁾。このことから、RNAの構造変化が機能消失の原因であると結論した。すなわち、複製起点でのDNAとの対合体形成には、RNA IIがある高次構造をとることが必要であり、pri7変異やDNA Iの結合は、RNA IIに異なる構造をつくらせてしまうことによってRNA IIを不活化するのである。

V. RNAの高次構造

それでは、実際にRNA IIはどのような高次構造をとっているのだろうか。コンピューターを用いて、塩基配列から最も低い自由エネルギー(ΔG)を持つ二次構造を予測することができる(現在のところ三次構造は予測できない)⁷⁾。しかしながら、塩基配列のみから予測した野生型RNA IIの構造は、生化学的結

図5. 野生型とpri7RNA IIの構造⁶⁾.

コンピューターを用いて得られた、各々のRNA II(-555から複製起点まで)の ΔG 最小の構造を示す。▼印、▽印およびY印は、RNaseT1、RNaseH AおよびRNaseV1の選択的切断部位を示す。野生型およびpri7RNA IIの構造形成の ΔG は、それぞれ-250, 1Kcal/mol, -252, 1Kcal/molである。構造VIIとVII'の違いはpri7RNA IIの場合にpri6-spr61の塩基対を満たすという制約を加えなかったため生じたものであり、RNaseの部分分解結果は、どちらも同じである。

果や遺伝学的結果をかならずしも満たすものではなかった。たとえば、RNaseT1とRNaseAの選択切断部位が一本鎖領域内にあらわれなかったり、また、pri変異とその特異的なspr変異の存在する相補的領域間で塩基対が形成されない場合があった。これらの条件

を満たすように制約を加えて、 ΔG 最小の構造を求めた (図 5 A)。

次に、活性のない *pri* 7 RNA II の構造を RNase の選択切断部位を満たす条件をつけて (今度は遺伝的結果は用いられない)、コンピューターで予測すると図 5 B のようになる。野性型 RNA II との違いは、*pri* 7 と *spr*71 の部位を含む構造 IV がつくられず、構造 III と V ができていることである。同様にして、RNA I の結合した野性型の構造を、結合領域を除いた部分の構造として予測すると、*pri* 7 RNA II での相当する領域の構造と同じものが得られた。

ところで、野性型 RNA II のうち約 30% の分子は、RNA I を加えなくとも DNA との対合体を形成できない。そこで、構造上の違いをみるために、対合しなかった RNA II を分離し、RNase による部分分解を行った結果、対合しているものでは切断されない部位が、切断されていた。さらに二次構造を予測すると、図 6 A で示した野性型 RNA II の構造と全く同じものが得られた。ただし、DNA と対合している RNA II では、構造 VI, VII, IX の上部が RNase T1 や RNase A で切断されないのに対し、DNA と対合していない RNA II では、これらの部位が切断されることが違う。

以上の結果を図 6 に模式的にまとめた。この図を見て解ることは、上流半分の構造は様々であるのに、下流は互いに似ていることである。ただし、DNA と対合している RNA II に限って、一本鎖であると予測された領域のうち、RNase によって切断されないところがあるという奇妙な違いが見られる。

この違いの意味を考察する前に、図 3 で示した欠失変異の結果を、野性型 RNA II の構造上で考えると、構造 IV およびその上流領域をちょうど欠失した変異株は、RNA II と DNA との対合効率が野性型程に高いが、構造 IV の一部を残したものや、さらに下流まで欠失したものは対合効率が低いことが解る。第一に結論できることは、RNA II と DNA との対合には構造 I, II, IV は必要ないということである。第二に、必須でない上流領域の存在が RNA II の機能を阻害しうることである。その後の解析から、図 3 で示したものよりさらに下流まで欠失した変異株はどれも対合活性を持たないことから、構造 IV のすこし下流が必須な構造に含まれるのであろうと思われる。以上のことから、構造 IV の上流領域は調節機能のためにのみ存在しており、そこに生じた RNA I の結合や *pri* 7 変異は、構造 IV から構造 V への変換を通して下流の必須な構造をつくらせない故に阻害を引き起こすと結論できる。

図 6. 各種 RNA II の構造の模式図。

▼印は、一本鎖を選択的に切断する RNase の切断部位を示す。

それでは、構造 IV より下流の重要な構造とは何であろうか。対合活性のない RNA II では、予測された二次構造が RNase 部分分解の結果とよく合うのに対し、DNA と対合した野性型 RNA II では、一本鎖領域であると予測されている構造 VI, VII, IX の部分が RNase の切断を受けない。このことは、これらの領域が RNA II 上の他の領域および DNA と三次元的に塩基対をつくっているか、あるいは、三次元的構造上保護されている可能性を示唆している。たとえば *pri* 8 (構造 IX 内) と *spr*81 (構造 VII 内) の領域は、二次構造上で対合させると、構造全体としては著しく ΔG の損失をもたらすので、三次元的に塩基対をつくっていると考えた方がよい。このように、DNA と対合した RNA II にのみ、二次構造では説明できない特異的な三次構造が存在すると思われる。この三次構造上の違いが活性の違いを生じているのか、あるいは逆に DNA との対合の有無の結果として生じた違いであるのかは、今のところ区別できない。しかしながら、この違いが「結果」ではなく「原因」であろうと考える理由のひとつは、問題の領域に、DNA との対合を阻害する *pri* 変異が集中して得られていることである (図 5 A)。機能をもつ RNA II では、これらの変異の起こる部位が重要な役割をもっているはずである。これらの領域の関与する相互作用が特異的な三次構造をもたらす、その消失が機能の消失を引き起こしているであろう。この三次構造の実態と、さらにそれが

RNA II と DNA との対合機構で果たす役割は、今後の課題である。

VI. まとめ

ColE1 プラスミドの複製開始には、RNA II が鋳型 DNA と複製起点で対合することが必要である。このために、RNA II は特異的な高次構造をとらねばならない。アンチセンス RNA の結合や点突然変異による塩基置換は、RNA II の高次構造を変化させることによって、DNA との対合体形成を阻害することを示した。

最近、RNaseH と DNA ポリメラーゼ I の活性のない大腸菌変異株中では、ColE1 は RNA II をプライマーとして使わない様式で複製することが示された^{8),9)}。この場合の複製開始は、RNA II が対合した DNA の逆鎖が一本鎖となることを必要とするので、やはり RNA I による制御を受ける。

ColE1 は他の多くのレプリコンと異なり、特異性を決定するイニシエーター蛋白質を持たない。そのかわり、高次構造にもとづく機能を持った RNA II が主要な役割を果たしている。RNA II はプライマーとなるのみならず、プライマーとなり得ない時も複製開始を特異的に活性化する機能を持つのであるから、イニシエーター RNA と呼んでもよいのではなかろうか。ColE1 の系では、複製開始調節も RNA によって行な

われている点で、RNA の持つ能力を最大限に活用していると言える。

この研究は、米国 NIH の富沢純一博士のもとで行なったものである。最後に、執筆の機会を与えて下さった、大阪大学の伊藤建夫博士に感謝する。

文 献

- 1) Bolivar, F., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Shine, J., Rodriguez, R. L. and Boyer, H. W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5265-5269.
- 2) Tomizawa, J., Ohmori, H. and Bird, R. E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1865-1869.
- 3) Itoh, T. and Tomizawa, J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2450-2454.
- 4) Masukata, H. and Tomizawa, J. (1984) *Cell*, **36**, 513-522.
- 5) Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G. and Som, T. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1421-1425.
- 6) Masukata, H. and Tomizawa, J. (1986) *Cell*, **44**, 125-136.
- 7) Zuker, M. and Stiegler, P. (1981) *Nucl. Acids Res.*, **9**, 133-148.
- 8) Dasgupta, S., Masukata, H. and Tomizawa, J. (1987) *Cell*, **51**, 1113-1122.
- 9) Masukata, H., Dasgupta, S. and Tomizawa, J. (1987) *Cell*, **51**, 1123-1130.

ますかた ひさお

1952年富山県生まれ、1975年大阪大学理学部卒業（生物、小川研）、1980年同理学博士、1980年から1987年まで米国 NIH（富沢研）を経て、昨年9月より名古屋大学理学部分子生物学科、岡崎研の助手。現在は材料をヒト（培養細胞）にかえて、染色体の複製と分配の研究を始めたところ。米国滞在中は少年サンデー、マガジンを愛読していましたが、今は絶っています。

☎052-781-5111 内線6687