総 説
REVIEW

大腸菌染色体複製開始点の活性化要因¹⁾

浅 井 常 章²⁾

京都大学・ウイルス研究所

(1990年12月28日受理)

は じ め に

大腸菌細胞の染色体 DNA 含量は、その生育条件に応じて変動する。しかし、培地の違いにより細胞の増殖速度が変化しても、温度が一定であれば DNA 鎖の伸長速度は一定である。したがって、細胞増殖と密接に共役した染色体の合成速度は、その開始段階において調節されていると考えられる。大腸菌染色体の複製開始点 (*oriC*) は、(1)対数増殖期において高い遺伝子頻度 (gene dosage) を示し、(2)同調培養において複製再開直後に複製される領域に存在するであろう。これらの条件を満足する部位として、*oriC* は染色体上に一箇所、*ilv* 遺伝子の近傍にマップされた (約84.3分, 図 1A)。しかし、染色体全体を用いた解析には限界があるため、*oriC* を複製開始点とするプラスミド (*oriC* プラスミド) の分離が種々の方法により試みられ成功を収めた。これにより遺伝子工学的手法を用いた研究が可能となり、複製開始に最小限必要な DNA 領域 (最小必須領域, minimal *oriC*) の決定をはじめ、DNA の一次構造と複製開始能との関係の詳細な解析が行われた。(例えば, McMacken et al., 1987の総説参照.)

一方、複製開始に関与するタンパク性因子に関しては、DNA 合成の条件致死変異株の分離という遺伝学的解析により多くの知見が得られた。なかでも、すでに始まっている複製は完了するが新たな開始は起きないという表現型を示す条件致死変異株は、複製開始に特異的に関与する遺伝子の同定に役立った。また、*oriC* プラスミドが分離されたことにより、このプラスミドを *in vitro* で複製させる試みが Kornberg の研究室で始められた。当初は細胞の粗抽出液を用いるものであったが、その後、分画・再構成が進められ、現在では精製されたタンパク質のみで *oriC* プラスミドの複製が可能になり、その系を用いて複製開始に働くタンパク質の機能が明らかにされつつある (Kornberg et al., 1988)。

大腸菌染色体の複製開始には、タンパク性因子に加えて RNA ポリメラーゼによる RNA 合成が必須である。このことは、複製開始反応において、タンパク質合成の阻害剤クロラムフェニコールでは複製開始に影響が見られなくなった段階においても、RNA 合成の阻害剤リファンピシンで開始が抑制されることより示された (Lark, 1972)。転写の複製開始におけ

1) Factors for activation of the replication origin of the *E. coli* chromosome.

2) Tsuneaki Asai, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606, Japan.

る役割としては、(1)プライマー RNA の合成、あるいは(2)複製開始点の活性化 (transcriptional activation) という大別して2つの可能性が考えられてきた。最近 *in vitro* 複製系において、*oriC* 近傍で合成された RNA は鋳型 DNA とハイブリッド (R-loop) を形成することにより、*oriC* における DNA 二本鎖の開裂反応を促進することが示された (Baker and Kornberg, 1988)。これは、転写の複製開始における役割として後者の可能性を示唆するものである。

我々は、*oriC* プラスミドを用いて *in vivo* における複製開始反応の研究を行ってきた。最近、複製開始を活性化する新しい要因として、最小必須領域に隣接する AT-rich な配列 (“AT-cluster”) を同定した (Asai et al., 1990)。この配列は、*oriC* における二本鎖開裂反応を容易にすることにより複製開始を活性化していると考えられる。さらに、転写がこの配列と同様の効果を示し得ることを見だし、*in vivo* における転写の複製開始における役割も開始点の活性化である可能性を示した (Asai et al., 投稿中)。しかし、その活性化機構は *in vitro* の場合とは異なっているようである。本稿では我々の実験により示唆される *in vivo* における転写の複製開始点活性化機構のモデルについて紹介したい。

1. *oriC* プラスミドの分離と *oriC* 構造の解析

Yasuda and Hirota (1977) は、抗生物質アンピシリンに耐性の遺伝子を持つがそれだけでは複製能のない DNA 断片と、大腸菌の染色体 DNA を制限酵素 *EcoRI* で切断したものとを DNA リガーゼで結合して環状にし、これを用いて大腸菌を形質転換した。これにより *oriC* を含む染色体断片のみが、自律増殖能を持ちアンピシリン耐性を与えるプラスミド (*oriC* プラスミド) として分離されてきた (pSY211, 図 1B)。このプラスミドは、約9,000塩基対におよぶ大腸菌染色体由来の DNA 断片を保有していた。

次いで、複製開始に必須な領域をさらに限定するために、Ori assay と呼ばれる方法が用いられた (Oka et al., 1980)。これは、pBR322 プラスミドはその DNA の複製開始に DNA ポリメラーゼ I を必要とするため、その変異株 (PolA⁻ 株) を宿主としては複製できないが、*oriC* を保有すると PolA⁻ 株においても PolA⁺ 株におけると同様に複製し得るという原理を利用している。図 2A に *oriC* 最小必須領域の左端を決定した方法を簡単に示した。まず、*oriC* 含む DNA 断片を pBR322 にクローニングする。次に、この断片の左側に存在する単一の制限酵素切断部位からエキソヌクレアーゼ (T4DNA ポリメラーゼの 3'→5' 方向の分解活性) と S1 ヌクレアーゼとを用いて様々な欠失を導入する。最後に、DNA リガーゼを用いて再び環状にし、PolA⁺ 株中でプラスミド DNA を増幅させたのち、それらを用いて PolA⁻ 株を形質転換し *oriC* の持つ複製開始能を検定する。同時に、欠失点領域の塩基配列の決定を行い、複製開始能と比較する。このように、pBR322 と *oriC* の複合プラスミドを用いると、欠失が *oriC* の複製開始能にとって必須な領域にまでおよんだものについてもその塩基配列の決定が行えるため、効率のよい解析が可能となった。その結果、最小必須領域の左端は、塩基番号23から35までの間に存在することが示された (塩基番号は Sugimoto et al., 1979による)。同様の方法で、最小必須領域の右端は塩基番号266または267であることが分かった。通常23位から267位までの245塩基対からなる領域を最小必須領域と呼んでいる。

図1. 大腸菌染色体の複製開始点領域。(A) 大腸菌遺伝子地図 (Bachmann, 1990より). *oriC* 近傍領域を拡大して示した。(B) *pSY211* の制限酵素地図. *Ap-fragment* (約6,800塩基対) 中にアンピシリン耐性を与える遺伝子が存在する。(C) *oriC* 近傍の遺伝子構造. 最小必須領域とその両側に存在する遺伝子, およびそれらのプロモーターの位置と転写方向を示した。

図2. (A) 最小必須領域の左端を決定した方法の概略。(B) 最小必須領域の左側に隣接したベクター DNA の塩基配列. AT-cluster に代わり機能したと思われる配列をドット (•) で示した。

(図1 C, 3).

この Ori assay は簡便かつ鋭敏であるため, その後, 最小必須領域内に様々な変異を導入し複製開始能への影響を調べる実験にも用いられた (Oka et al., 1984). その結果, *oriC* は「一塩基対の置換により複製開始能を失う領域」がクラスターを形成して存在し, それらの間の正確な距離を「塩基置換では複製開始能は失わないが, 欠失・挿入変異により失う領域」が保っているという構造を形成していると考えられた. Zyskind ら (1981, 1983) は, 先に大腸菌とその近縁の細菌を用いて, 複製開始点領域の塩基配列を比較, 検討していたが, その結果よく保存されていた領域 (図3) が「塩基置換により複製開始能を失う領域」と良い一致を示した. さらに, それらの中には次に述べる DnaA タンパク質の認識部位をは

-100

 CGGATAAACATGGTGATTCCTCGCATAACGCGGTATGAAATGGATTGAAGCCCGGCGCTGATTCTATCAACTTTGTGCGCTTGAGAAAGACCTG
 -10 *gid* promoter -35

図3. 最小必須領域と *gid* プロモーターの塩基配列。枠で囲まれた配列が最小必須領域である。DnaA タンパク質の認識部位 (R1, R2, R3 および R4) と 13-mer 配列 (L, M および R) が示されている。5 種の腸内細菌 (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Erwinia carotovora*) において保存されていた塩基の上には星印を付けた (Zyskind et al., 1981 による)。

じめ、複製開始に関与するタンパク質の認識部位であることが *in vitro* における実験により示されたものもあり、*oriC* 構造に関する先の考えは妥当なものであると思われる。

2. 複製開始反応のモデル

精製されたタンパク質のみを用いた *oriC* プラスミドの *in vitro* 複製系の開発により、複製開始反応の素過程が明らかにされつつある。それらに基いた、染色体複製開始のモデルを簡単に紹介すると次のようになる (Baker et al., 1988)。

- 1) DnaA タンパク質が、*oriC* 最小必須領域内に 4 箇所存在する 9 塩基対からなる認識部位 (DnaA box, 図3) に協同的に結合し、複合体を形成する (Initial complex の形成)。
- 2) 複合体の形成により、最小必須領域の左末端に存在する 3 個の 13-mer 配列 (図3) からなる AT-rich な領域の二本鎖の開裂が引き起こされる (Open complex の形成)。この過程は、低レベルの HU タンパク質の存在で活性化される。
- 3) DnaC タンパク質の存在下、DnaB ヘリカーゼが開裂した 13-mer 領域に入る (Prepriming complex の形成)。
- 4) 一本鎖 DNA 結合タンパク質の存在下、DnaB ヘリカーゼが二本鎖を両方向に巻き戻し、DnaG プライマーゼによるプライマー RNA の合成が起こる。
- 5) DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素により、プライマー末端からの DNA 鎖の伸長が行われる。

複製開始反応におけるこれら素過程の中で、律速段階となり開始反応調節にとって重要となるのは、DnaA タンパク質の関与している段階であると思われる。これは、大腸菌細胞内において、DnaA タンパク質を過剰生産させると *oriC* における複製開始の頻度も上昇するという事より示唆される (Atlung et al., 1987; Pierucci et al., 1987)。また、DnaA タンパク質はその生産量をフィードバック的に自己制御している (Braun et al., 1985)。このことも、DnaA タンパク質が開始反応調節因子 (イニシエータータンパク質, Jacob et al., 1963) であることの条件に適合するものであろう。

3. *oriC* 左端領域の機能の解析

i) “AT-cluster” 配列による複製開始点の活性化

我々は、in vivo において染色体複製の開始機構を解析するにあたり、まず塩基番号23か

図4. *oriC* 左端領域の機能の解析. (A) 図の上部には、*oriC* 領域が制限酵素部位 (Ba, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; Acc, *Acc*I) と共に模式的に示されてある。斜線部分は AT-cluster 配列を、矢印は 13-mer 配列を表し、DnaA box は影を付けて示されてある。下部には、解析に用いられた *oriC* 断片が示されてある。これらの右端には *Xho*I リンカーが、左端には *Sal*I リンカーが結合している。#20F と #18F 断片のみ左端に *Hind*III リンカーが結合している。これらにおいて、横線が付けられた部分はミニ F プラスミドに由来する。(B) *oriC* 断片が挿入されたクローニングベクター。pUC118Xho は pUC118 の multiple cloning site (MCS) 中に存在する *Sac*I 部位が *Xho*I 部位に換えられたものである。pMS4343 は pMS4341 と *Hind*III 部位を持つ点のみが異なっている。プラスミド上に存在する主なプロモーターの相対的な位置と転写の方向が矢印で示されている。また、これらは何れも ColE1 型の複製開始点 (*ori*) を持つ。

の左側に AT-cluster だけを持つものである (図 5)。これを, 先ほどと同様 pUC118Xho および pMS4341 に挿入し, pUC #20AT および pMS #20AT を得た。これらを用いて PolA^- 株を形質転換したところ, どちらも PolA^+ 株と同数の形質転換体をあたえ (表 1), AT-cluster 配列が複製開始能の活性化に重要な働きをしていることを示した。以下の実験においても, *oriC* 断片はこの 2 種のベクタープラスミドに挿入され, 複製開始能が調べられた。しかし, ベクターによる複製開始能の差は認められなかったため, これ以降は pMS4341 を用いた場合の結果のみを挙げることにする。

表1. *oriC* 左端領域の塩基配列と複製開始能との関係

プラスミド	形質転換の効率 ^{a)} ($\text{PolA}^-/\text{PolA}^+$)	生育速度 ^{b)}	コピー数 ^{c)}
pUC #20	$<10^{-4}$	—	—
pUC #10	1.0	ND ^{d)}	ND
pMS #20	$<10^{-4}$	—	—
pMS #10	1.0	1.3	1.8
pUC #20AT	1.0	ND	ND
pMS #20AT	1.0	1.3	1.9
pMS #20AT-C	1.0	1.3	ND
pMS #20F	1.0	1.3	1.7
pMS #18F	1.0	1.3	1.1
pMSDEL1	1.0	1.1	1.1
pMSDEL2	0.5	0.8	0.2
pMSDEL2*	0.5	0.8	0.2
pMSDEL3	$<10^{-4}$	—	—
pMSDEL3*	$<10^{-4}$	—	—
pMS4341	$<10^{-4}$	—	—
pMF1	1	1.5	ND

a) PolA^- 株 と PolA^+ 株とにおける形質転換能の違いを補正するために, ミニ F プラスミドの複製開始点 (*ori-2*) を持つプラスミド pMF1 における効率を 1 に設定した。

b) 1時間あたりの分裂回数。

c) 染色体 DNA あたりの値。サザンプロット法により決定した。

d) 決定せず。

#20AT 断片の持つ複製開始能をさらに明確に示すために, pMS #20AT で形質転換された PolA^- 細胞の生育速度 (表 1), およびこのプラスミドの PolA^- 細胞中でのコピー数 (表 1) と安定性 (図 6A) を測定した。その結果, 何れにおいてもこの断片の複製開始能は #10 断片のものと違いは認められなかった。図 3 に示すように, AT-cluster 配列は大腸菌近縁の細菌において比較的良く保存されている領域に相当する。このことも, AT-cluster が染色体複製開始にとって重要であることを示唆しており, AT-cluster は複製開始点の一部と

図6. *oriC* 内に変異を持つプラスミドの安定性. (A) ●, pMS #10; ○, pMS #18F; △, pMS #20GP1. pMS #20AT, #20AT-C および #20F におけるプラスミドの保持率は, pMS #10の場合とほとんど同じであった. (B) ●, pMSDEL1; ○, pMSDEL2.

して考えられるべきものであろう.

次に, AT-cluster が複製開始に果たしている役割を調べるために #20AT-C と #20F の両断片を構築した. #20AT-C 断片は #20AT 断片と同じ長さで, AT-cluster 領域の DNA 配列のみがそれぞれ相補鎖の配列に換えられたものである (図 5). #20F 断片は, AT-cluster 領域が, ミニ F プラスミドに由来する *oriC* とは無関係な AT-rich 配列で置き換えられたものである (図 4A, 5). これら両断片を pMS4341, あるいはそれ由来の pMS4343 (図 4B) にそれぞれ挿入して得られたプラスミド pMS #20AT-C と pMS #20F はどちらも pMS #10 と同様の効率で PolA^- 株を形質転換し (表 1), それら形質転換体の生育速度 (表 1) や, プラスミドの安定性 (図 6A) にも差は見られなかった. また, pMS #20F においてはコピー数にも pMS #10 と有意差は認められなかった (表 1). これらの結果は, 複製開始能にとって, AT-cluster 領域の特異的な塩基配列は重要ではなく, AT-rich であることのみが重要であることをつよく示唆していると考えられる.

この結果は, *oriC* の最小必須領域を決定した先の実験結果と矛盾するように見えるがそうではない. 最小必須領域の左端は, その左側領域から欠失を導入することにより決定されたが, この時欠失は *oriC* 断片側ばかりではなく, ベクター DNA 側にも導入される (図 2A). したがって, 最小必須領域の左側に隣接する塩基配列は, はじめに *oriC* 断片を挿入した部位の配列とは異なることになる. その結果, AT-rich な配列が *oriC* に隣接することになり (図 2B; 岡, 私信), それが本来の AT-cluster に代わり機能したと考えられる. 実際は, AT-cluster 領域にまで欠失がおよび複製開始能を失ったものの中に, 偶然ベクターの AT-rich な配列が隣接したものがあり, それが複製開始能を回復したために PolA^- 株を形質

転換するという selection がなかったと考えるべきであろう。

AT-cluster の複製開始における役割は、他の AT-rich な配列でも代行できるということから、DNA 二本鎖を局部的に不安定化させることではないかと思われる。先に述べたように、複製開始反応は DnaA タンパク質が AT-cluster に隣接する 13-mer 領域の二本鎖を巻き戻すことにより開始されると考えられている。AT-cluster 領域に存在する AT-rich な配列は、この過程に必要なエネルギーを低下させることにより複製開始を活性化するのであろう。このことは、後に示すように二本鎖巻き戻しを促進すると考えられるプロモーター断片が AT-cluster と同様の効果を示し得ることからも支持される。

ii) 13-mer 配列の重要性

最小必須領域左端に存在する AT-rich な 13-mer 配列は、高度に保存されている (図 3)。しかし、上述の AT-cluster 領域における解析結果より推察すると、この 13-mer 配列の持つ機能も他の AT-rich な配列で代行できる可能性がある。そこで、13-mer 配列をミニ F プラスミド由来の AT-rich な配列で置換し、複製開始能の解析を行なった。表 1 に示すように左端 (L) 13-mer が置換された #18F 断片 (図 4A) を持つプラスミド pMS#18F (図 7) は、pMS#10 と同じ効率で *PolA*⁻ 株を形質転換し、その形質転換体の生育速度も pMS#10 の場合と同じであった。塩基置換が、中央 (M) 13-mer にまでおよんだ pMSDEL1 および pMSDEL2 (図 7) においても、効率は pMSDEL2 において低下するが、依然 *PolA*⁻ 株を形質転換することが可能であった (表 1)。これらのことは、L および M 13-mer の特異的塩基配列は複製開始にとって必須ではないことを示している。しかし、これら 3 種のプラスミドすべてにおいて、そのコピー数 (表 1)、安定性 (図 6A, B) が pMS#10 より低下しており、pMSDEL1 および pMSDEL2 においては、形質転換体の生育速度 (表 1) も pMS#10 に比べて低下している。このような複製開始能の低下が、*oriC* 左端領域における AT 含量の低下によるものであるのかどうかを調べるために、ミニ F プラスミド由来の断片を 2 つ持つ pMSDEL2* (図 7) を構築した。しかし、このプラスミドにおいても複製開始能の低下は回復せず (表 1)、特異的塩基配列の必要性が示唆された。L および M 13-mer 配列は AT-cluster 配列とは異なり、効率のよい複製開始のためには重要であると考えられる。

図 7. 13-mer 領域における塩基置換。枠で囲まれた配列がミニ F プラスミド由来の部分である。括弧内の配列は、野生型の R 13-mer 配列である。

これに対し、右端 (R) 13-mer においては、GC 塩基対が一つ挿入されただけで複製開始能が、完全に失われてしまった (pMSDEL3, 図 7; 表 1)。これも、AT 含量の減少の影響ではないと考えられる (pMSDEL3*, 図 7; 表 1)。すなわち、複製開始にとって R 13-mer 配列は必須であることを示している。3 個存在する 13-mer の内、R 13-mer の塩基配列が最も高度に保存されており (図 3)、そのことよりこの配列の重要性が指摘されていたが (Kowalski and Eddy, 1989)、今回得られた結果はそれに実験的裏付けを与えるものである。

iii) *oriC* 左端領域の機能

oriC 左端領域に要求される塩基配列の解析から、複製開始の成否に限って言えば、AT-cluster および L と M の 13mer 配列よりなる領域に特異的塩基配列は必要ではなく、AT-rich であることのみが重要であることが明らかになった。このような領域は、大腸菌染色体のように開始反応に二本鎖開裂過程を含む機構で複製をするレプリコンにとっては最小限必要なものであろう。しかし、効率のよい複製開始が行なわれるためには AT-rich であることだけでは不十分で、13-mer 配列という特異的塩基配列が要求され、特に R 13-mer 配列は必須であった。このことは、13-mer 配列を認識し結合するタンパク質が存在することを予想させる。すでに、DnaA タンパク質にその活性があることが示唆されており、13-mer 領域の二本鎖開裂過程において作用すると考えられている (Yung and Kornberg, 1989)。それとは逆に、13-mer 領域に結合しその領域の DnaA タンパク質による開裂を阻害するタンパク質が最近見つけられ精製された (Hwang and Kornberg, 1990)。このタンパク質は、複製開始反応の調節に重要な役割を果たしている可能性が高く、今後の解析が待たれる。

Bramhill and Kornberg (1988) は、多くの原核性レプリコンの複製開始点において、大腸菌 *oriC* における 13-mer 領域のように、そのレプリコン固有の繰り返し配列を持つ AT-rich な領域が存在していることを指摘した。我々は、大腸菌以外の場合においてもその領域が AT-rich であることが基本にあり、レプリコン固有の配列は、それぞれに特有の開始反応調節機構のために進化の過程で獲得されたものであろうと考えている。

4. 転写による複製開始点活性化のモデル (in vitro)

—R-loop 形成による活性化—

染色体複製開始は、DnaA タンパク質による 13-mer 領域の二本鎖開裂に始まると考えられるが、in vitro におけるこの反応は、(1)温度が 27℃ 以下であったり、(2)鋳型に用いた *oriC* プラスミドの負のスーパーコイルのレベルが低いなど、二本鎖を安定化させる条件下においては進まないことが知られている (Baker and Kornberg, 1988)。また、この反応には低レベル (5 分子/*oriC*) の HU タンパク質が必要であるが、このタンパク質が (3)高レベル (136 分子/*oriC*) に存在する場合にも反応は進まなくなる (Baker and Kornberg, 1988)。この条件下においては、DNA が HU タンパク質のまわりに巻きついた結果、トポイソメラーゼによる処理を軽く行なった程度ではプラスミドは十分に弛緩型に移行しないことが示された (Skarstad et al., 1990)。このことより、HU タンパク質が高レベルに存在する場合は、プラ

スミドの持つフリー（トポイソメラーゼ処理により解消され得る）の負のスーパーコイルのレベルが低下してしまったために(2)と同様に反応が進まなくなったのであろうと考えられている。さらに(4) HU タンパク質が全く存在しない場合にも反応は進まない (Skarstad et al., 1990). この低レベルの HU タンパク質による活性化は、同様の効果が DNA を湾曲 (bend) させる機能を持つ integration host factor (IHF) でも見られることから, *oriC* 領域 DNA を bend させ、開始反応に都合の良いコンフォメーションを取らせることであろうと考えられている (Skarstad et al., 1990).

以上のような, DnaA タンパク質だけでは二本鎖の開裂が行えない条件下においては, RNA ポリメラーゼによる転写がその反応を活性化することが示された (Baker and Kornberg, 1988; Skarstad et al., 1990). この活性化のためには、合成された RNA が鋳型 DNA とハイブリッド (R-loop) を形成することが重要であり、それを合成するためのポリメラーゼあるいはプロモーターには特異性はなく、大腸菌のものばかりではなく T7 あるいは T3 ファージのポリメラーゼであっても同様の効果を示す。また、R-loop の位置は必ずしも *oriC* 内である必要はなく、その左右どちら側でもよい。さらに、その合成方向も *oriC* に向かうものであっても、*oriC* から遠ざかるものであってもよい。活性化の程度は、R-loop の位置が *oriC* から遠ざかるに従って低下するが、*oriC* より 1,400 塩基対離れた所にあるものでも、257 塩基対しか離れていないものの 50% 程度の活性化は示す。ただ、R-loop と *oriC* との間に GC-rich な配列が存在すると活性化は見られなくなる。

この R-loop 形成による二本鎖開裂反応活性化の機構を理解するうえで参考になる現象が、反復塩基配列 (inverted repeat) における十字型構造形成反応 (cruciform extrusion) において観察されている (Sullivan et al., 1988; Furlong et al., 1989). それは、スーパーコイルを形成したプラスミド上に高度に AT-rich であり熱力学的に不安定な塩基配列 inducing sequence が存在すれば、それが inverted repeat より 100 塩基対以上離れた所であっても cruciform extrusion を活性化するというものである。さらに、その inducing sequence と inverted repeat との間に存在する配列 transmitting sequence は中程度に AT-rich である必要があり、その中に GC-rich な配列が存在すると活性化が見られなくなるという点もよく似ている。この活性化は、inducing sequence における二本鎖の開裂が、transmitting sequence (それ自身では inducing sequence になり得ないが、inducing sequence における二本鎖開裂現象は伝播し得る sequence) を伝えることにより引き起こされるものと考えられている。このようにある領域の DNA 構造の変化が、その近傍ばかりではなく、かなり離れた所に存在する DNA の構造変化をもひきおこすという現象 (telestability effect; Burd et al., 1975) が、複製開始反応における R-loop による二本鎖開裂反応の活性化においても想定されているようである。

5. 転写による複製開始点活性化のモデル (in vivo)

—スーパーコイル形成による活性化—

i) Twin supercoiled domain model

転写と複製開始との関係の問題に入る前に、その背景となる twin supercoiled domain model について簡単に紹介しておく。これは、Liu and Wang (1987) により提唱され、in vivo お

よび *in vitro* において実証されている (Wu et al., 1988; Giaever and Wang, 1988; Tsao et al., 1989; Ostrander et al., 1990) モデルで, RNA ポリメラーゼが二本鎖 DNA に沿って移動し RNA を合成してゆく時, その前方の DNA には正のスーパーコイルが導入され, 後方の DNA には負のスーパーコイルが導入されるというものである. これは, 二本の紐を振り DNA の二重らせん相当のものを作り, その二本鎖の間にペンを差し込み RNA ポリメラーゼと見立て実際に試してみると簡単に理解できる (Frank-Kamenetskii, 1989). 紐の両端を固定しておき, ペンをまっすぐ立てたまま移動させると, ペンの前方の捩れは大きくなり (正のスーパーコイル), 二重らせんのピッチを締める方向に力がかかるであろう. 逆にペンの後方の捩れは小さくなり (負のスーパーコイル), 二本鎖を巻き戻す方向の力がかかるであろう. これらのひずみはペン (RNA ポリメラーゼ) を回転させるか, あるいは紐 (DNA 鎖) の両端の固定を取り外し, らせん軸に対して回転させるかしないかぎり解消されない. しかし, 非常に長い DNA 分子や, 非常に大きな転写装置 (原核細胞中においては, RNA ポリメラーゼには合成された RNA 分子ばかりではなく, 多くの場合それを翻訳する装置まで繋がっていると考えられる) が簡単に回転するとは考えにくい. したがって, DNA 分子には転写によりスーパーコイルが導入されることになる. 細胞中には, DNA のスーパーコイル構造を変化させるトポイソメラーゼの存在が知られており, この酵素の働きによりスー

図 8. 転写が複製開始能に及ぼす影響を調べるために構築されたプラスミド. (A) *gid* プロモーターを含む断片 (B に示されたもの) が黒の矢印で表されており, 矢印の向きは転写の方向を示す. プロモーターの-10領域に欠失を持つ断片は, 白抜きの矢印で表されている. これらは, *oriC* の左側においては 13-mer 領域 (斜線部分) に直結されたが, 右側においてはベクター上の *XhoI* 部位に挿入された (*oriC* 断片右端とは22塩基対離れることとなる). Hae は *HaeIII* 部位を示す. (B) *gid* プロモーター断片の塩基配列.

パーコイルのレベルが適当な状態に保たれていると考えられている。

ii) 負のスーパーコイル形成による複製開始点の活性化

我々は、AT-cluster は 13-mer 領域の DNA 二本鎖を局所的に不安定化し、DnaA タンパク質によるその領域の開裂を容易にすることにより、複製開始を活性化するのであろうと考えた。このことは、AT-rich な配列以外ののものであっても、同様の効果を示し得るものであれば AT-cluster に代わり複製開始を活性化できるという可能性を示唆した。Twin supercoiled domain model によると、転写は RNA ポリメラーゼの後方に負のスーパーコイルを導入する。したがって、13-mer 領域から離れる方向に進む転写が存在すると、その転写は 13-mer 領域に負のスーパーコイルを導入するであろう。これは、その領域の二本鎖の巻き戻しを容易にし、複製開始の活性化を導くものと考えられる。

染色体上 *oriC* の左側領域には、*gid* 遺伝子が存在する (図 1C, 8A)。その遺伝子産物の機能はまだ良く分かっていないが、染色体複製開始に必須なものではない (von Meyenburg and Hansen, 1980)。*gid* 転写は 13-mer 領域から離れる向きに進行するので、上で述べた考えに従うと、その転写は *oriC* からの複製開始を活性化する機能を持つと思われる。このことを調べるために、pMS #20GP1 (図 8A) を構築した。これは、*gid* 遺伝子のプロモーターを含む DNA 断片 (図 8 B) を、AT-cluster の代わりに #20 断片の左側に挿入したものである。この時、転写は 13-mer 領域から離れる方向に進むように挿入された。このプラスミドの持つ複製能を先と同様の方法で調べた結果、*gid* プロモーター断片の挿入により #20

表2. 複製開始能に及ぼす転写の影響

プラスミド	形質転換の効率 ^{a)} (PolA ⁻ /PolA ⁺)	生育速度 ^{b)}	コピー数 ^{c)}
pMS #20	<10 ⁻⁴	—	—
pMS #20AT	1.0	1.3	1.9
pMS #20GP1	0.5	1.1	0.3
pMS #20GP2	<10 ⁻⁴	—	—
pMS #20GP3	<10 ⁻⁴	—	—
pMS #20GP4	<10 ⁻⁴	—	—
pMS #20GP5	<10 ⁻⁴	—	—
pMS #20GP14	1.0	ND ^{d)}	2.5
pMS #20GP15	0.5	ND	0.3
pMS #20GP16	0.5 ^{e)}	—	—
pMS #20GP17	0.5	ND	ND
pMS4341	<10 ⁻⁴	—	—
pMF1	1	1.5	ND

a, b, c, d) 表 1 と同様。

e) ここで現われたものは、非常に小さなコロニーである。

断片の複製開始能がある程度回復していることが分かった (表 2, 図 6A). この効果が実際転写によるものであることは, *gid* プロモーターの-10領域に 5 塩基対の欠失を導入し, プロモーター活性を全く失った断片 (図 8B) を先ほどと同じ位置に, 同じ方向で挿入して得られたプラスミド pMS #20GP2 (図 8A) が pMS #20 同様 PolA⁻ 株を形質転換できなかったことにより証明される (表 2). これにより, 13-mer 領域から離れる方向の転写には複製開始能を活性化する働きがあることが確認された.

In vitro においては, 転写は *oriC* に対する位置や方向に関係なく, その複製開始能を活性化した (Baker and Kornberg, 1988). そこで, *gid* プロモーター断片が, #20 断片の左側に転写が断片内へ流入する向きに挿入されたプラスミド (pMS #20GP3), あるいは #20 断片の右側に挿入されたプラスミド (pMS #20GP4 と pMS #20GP5) を構築し (図 8 A), それらの複製能を調べた. 表 2 に示すように, これらのプラスミドにおいては転写による複製開始の活性化は観察されなかった. この結果は, in vivo における活性化の機構は R-loop の形成ではなく, はじめに予想したような 13-mer 領域における局所的な負のスーパーコイルの形成によるものであることを示唆している. pMS #20GP4 においては, 転写の方向は 13-mer 領域から離れるものであるため, その領域に負のスーパーコイルを導入し複製開始を活性化することも考えられる. しかし, 転写により導入されるスーパーコイルのレベルは, RNA ポリメラーゼの近傍ほど高く, 離れるにしたがい低くなるため, このように 13-mer 領域から 250 塩基対ほど離れた所から転写が開始する場合においては, 13-mer 領域に十分なスーパーコイルが導入され得ないのであろう. この点においても, 1,400 塩基対離れたところで転写が開始しても活性化の効果を持つ in vitro の場合と対照的である.

Twin supercoiled domain model によると, プラスミドのように比較的小さな環状 DNA 分子に単一の転写装置でスーパーコイルが導入されてもそれは一時的なものであり, DNA 分子全体がその軸に対して回転することにより正と負のスーパーコイルがお互いに消去しあってしまうと考えられる. しかし, もし同じプラスミド上にプロモーターが 2 つ反対向きに存在した場合は, 転写によりそれらの後方には少なくともどちらかの転写装置が回転しなかり解消されないような安定な負のスーパーコイルの導入が予想される. いま観察された, 転写による #20 断片の複製開始能の活性化が一時的に導入された負のスーパーコイルによるものであるならば, より安定な負のスーパーコイルが形成されると, より効率の良い複製開始が起こると考えられる. そこで, *gid* プロモーター断片が #20 断片の両側に転写がどちらもその断片から離れる向きに挿入されたプラスミド pMS #20GP14 (図 8A) を構築しその複製能を調べた (表 2). その結果, 予想どおりこのプラスミドは単一の *gid* プロモーターしか持たない pMS #20GP1 に比べて複製能が上昇していることが分かった. この効果が転写によるものであることは, 先と同様に-10領域に欠失を持つプロモーター断片を用いて確認された (pMS #20GP15, 図 8A; 表 2).

一方, twin supercoiled domain model は, 13-mer 領域に向かう転写はその領域に正のスーパーコイルを導入するか, あるいはそこで形成されている負のスーパーコイルを消去してしまうことを示唆する. これは, 13-mer 領域の二本鎖開裂を阻害し, 複製開始能を低下させると考えられる. このことは, *gid* プロモーター断片をその転写が 13-mer 方向へ進む向きに挿入したプラスミド pMS #20GP16 (図 8A) において確認された. すなわち, このプラス

ミドにおいては、*PolA⁻* 株を形質転換する効率は pMS#20GP1 と変わりはないが (表 2), そこで現われた形質転換体は非常に小さく, また, それらを液体培地に植えても増殖しなかった. この現象もやはり転写によるものであることは確認されている (pMS#20GP17, 図 8A; 表 2).

以上のように, *oriC* 近傍の様々な位置や方向の転写がその複製開始能へ与える影響は, 転写が 13-mer 領域 DNA のスーパーコイル構造を変化させることによると仮定して得られる予想と良く一致する. このことは, 転写による複製開始点活性化の機構の一つとして, 負のスーパーコイルの導入ということが考えられることを示唆している.

iii) 遺伝学的背景

複製開始反応において DNA が負にスーパーコイルしていることの重要性は, 以下に示すような遺伝学的な研究によっても示唆されている.

- 1) *dnaA46* 変異株における温度感受性は, トポイソメラーゼ I 遺伝子 (*topA*) の欠失により抑制される (Louarn et al., 1984).
- 2) DNA ジャイレースの温度感受性変異株 (*gyrB41*) は, 非許容温度に移されると, 染色体の複製をその開始段階において停止する (Filutowicz and Jonczyk, 1981). しかし, いくつかの *rpoB* 変異は, この変異株の非許容温度における複製開始能を回復させる (Filutowicz and Jonczyk, 1983).
- 3) *rpoB202* 変異は, *dnaA46* 変異株の温度感受性を抑制すると同時に, その変異株の DNA ジャイレースの阻害剤に対する高感受性をも抑制する (Filutowicz and Jonczyk, 1981).
- 4) DNA ジャイレース変異株においては, *oriC* プラスミドの形質転換の効率や, 細胞内における安定性がプラスミド上に存在する転写の *oriC* に対する方向性に依存して変化する (Leonard et al., 1985).

2) と 3) は, RNA ポリメラーゼが複製開始反応において, DNA の負のスーパーコイルのレベルを上昇させるという役割を担っていることを示唆する結果であり, 4) は, その負のスーパーコイルの導入が転写をとおして行なわれ得る可能性を示唆していると考えられる.

iv) *mioC* 転写による複製開始点活性化のモデル

染色体上 *oriC* の右側領域には, *mioC* 遺伝子が存在する (図 1C). この遺伝子産物の機能は不明であるが, 複製開始に必須のものではない (von Meyenburg and Hansen, 1980). しかし, *mioC* 遺伝子領域まで持つ *oriC* プラスミドは, 持たないものに比べてコピー数が増加することが示され, その効果はこの遺伝子の転写によるものであることが分かった (Stuitje et al., 1986; Løbner-Olesen et al., 1987). *mioC* 転写は, *oriC* 内へ流れ込み, 一部は通過するが, 残りは *oriC* 内の様々な位置で終結する. その終結点が, *in vivo* において検出されたプライマー RNA から新生 DNA 鎖への切り換え点とよく一致することから, この転写の複製開始における役割はプライマー RNA の合成にあるという指摘がなされている (Rokeach and Zyskind, 1986). 他にも, この転写が緊縮調節 (stringent control) を受けることや (Rokeach and Zyskind, 1986), DNA のメチル化により活性化されること (Schauzu et al.,

1987) などが調べられ、様々な点から複製開始点活性化の機構を探る試みがなされている。

しかし、*mioC* 転写による活性化にとって最も重要なことは、DnaA タンパク質が *mioC* プロモーターのすぐ上流に存在する DnaA box に結合し、転写を抑制する (Schauzu et al., 1987; Nozaki et al., 1988) という点であると思われる。このことは、この DnaA box に欠失変異が導入され、DnaA タンパク質による抑制を受けなくなった *mioC* プロモーターからの転写は、*oriC* における複製開始を逆に阻害する (Stuitje et al., 1986) ことから考えられることである。これは、*lac* や *gid* 転写が *oriC* 内に流入した場合に、複製開始を阻害するという事実とも一致する。我々は、先に流入転写による阻害の機構は、13-mer 領域に正のスーパーコイルを導入することであると考えた。DnaA タンパク質が *oriC* に結合し 13-mer 領域の二本鎖開裂を行うときに、その領域に正のスーパーコイルを導入し開裂反応を阻害する *mioC* 転写が同じ DnaA タンパク質により抑制されるということは、結果として効率のよい複製開始につながるのであろう。このように考えると、複製開始反応を促進させる転写がイニシエータータンパク質により抑制されるという現象が、矛盾なく説明される。このモデルは、DnaA タンパク質が *oriC* 内の DnaA box ばかりではなく *mioC* プロモーターの DnaA box にも協同的に結合することを仮定している。*oriC* 領域の右側に DNA を bend させる部位が見つかっているが (Kimura et al., 1989)、このような協同的結合を促進させるために役立つかもしれない。このモデルを検証するためには、*mioC* 転写が細胞周期において染色体の複製開始に関連した時期に抑制されているのかどうかということを調べるのが重要であると思われる。

6. *oriC* 内における転写活性

大腸菌染色体の複製開始には、転写が必須である (Lark, 1972)。そして、*oriC* 近傍の転写は、その方向に応じて複製開始能を正にも負にも調節可能であることが人工的にプロモーターを配した実験により明らかになった。しかし、現在までに知られている *oriC* 近傍の転写はすべて複製開始に必須ではない (von Meyenburg and Hansen, 1980)。そこで、我々は *oriC* 内に複製開始にとって必須な転写が存在するのであらうと考え、S1 マッピング法を用いてその検出を試みた。RNA は、大腸菌株 HI1187 を種々の *oriC* 断片が挿入された pMS4341 プラスミドを用いて形質転換したものより調製した。このとき、pMS4341 に挿入された *oriC* 断片由来の転写産物のみを検出し、宿主染色体上に存在する *oriC* 由来の転写産物による影響をなくすために、HI1187 においては von Meyenburg and Hansen (1980) により分離された *oriC* 欠失変異を用いて染色体上の *oriC* 領域を欠失させてある。そのために、この菌株においては染色体の複製は約75分の位置に挿入された R100-1 プラスミドからの複製 (integrative suppression) に依存している。

i) *oriC* 内左行転写

まず、図9に示すプローブ L を用いて、#10断片内より左方向に進む転写の検出を試みた。その結果 (図10, パネル L), 最小必須領域内に転写産物 II (L-II) と III (L-III), その右外側に転写産物 I (L-I) を検出した (lane 1)。これらの *oriC* 内における位置を、その正確な

図9. S1 マッピングに用いられたプローブと検出された転写の開始点。星印がプローブのラベル位置を示す。#10断片内において検出された転写の位置と方向が矢印で表されている。括弧内の数字は転写開始点の塩基番号である。Hind は *Hind*III 部位を示す。

図10. *oriC* 内転写の検出。図9に示す Probe L あるいは Probe R を用いて得られた結果がそれぞれパネル L (左行転写) と R (右行転写) であり、検出された転写産物はローマ数字で示された。S1 ヌクレアーゼで消化されずに残ったプローブによるバンドも最上部に見える。RNA の調製には、HI1187 [*araD* Δ (*ara-leu*) Δ *lac galU galK strA trpA thy recA zhf-85::R100-1* Δ *oriC*] および HI1188 [HI1187 *dnaA17* (Am)] 株が用いられ、それぞれ各レーンの上に+あるいは-で示されている。RNA 標品中の *bla* 遺伝子の転写産物も S1 マッピングにより検出され、*oriC* 内転写の補正に用いられた。左行転写の場合は II の、右行転写の場合は I の補正值がそれぞれ *DnaA*⁺ 株の場合を 1 として各レーンの下に示されている。

5' 末端の塩基番号と共に図 9 に示した。これらのうち L-II は、先に in vivo で検出され (Schauzu et al., 1987), in vitro 転写系においても確認されている (Nozaki et al., 1988) 転写産物 *ori*-L に相当する。それらにおいても示されているように、L-II の量は非常に少なく、複製開始能に対して活性化あるいは阻害効果を示し得る *gid* プロモーターからの転写量に比べると二桁程少ない。L-I と L-III に関しては、多くの場合 L-II よりもさらに少量で検出に再現性がないため、これ以降の解析は進められなかった。このことは、他のグループにおいてこれらが検出されていないことの原因であろう。

ii) *oriC* 内右行転写

次に図 9 に示すプローブ R を用いて、#10断片内より右方向へ向かう転写の検出を試みた。その結果 (図10, パネル R), *oriC* 内に多数の転写産物が検出されたが (lane 3), 再現性を持って検出されたものは図に示してある 4 種の転写産物 (R-I, R-II, R-III および R-IV) であり、他の転写産物はこれらの分解産物であると思われる。右行転写量は、左行転写量よりはるかに多く、それらの中でも最も多い R-I は、*gid* 転写産物とほぼ同量である。

これら 4 種の転写産物の正確な 5' 末端を決定し (図 9), それに基づいてプロモーター配列が予想された。そして、それらプロモーター配列にそれぞれ活性を失わせるよう変異を導入することにより、得られた転写産物の 5' 末端が転写開始点であるかどうかを調べた。その結果、R-I, R-III および R-IV はそれぞれの末端から合成が開始されたものであるが、R-II は R-I の分解産物であることが分かった。この部位で多くの R-I が process されることの意味は現在のところ不明である。

iii) DnaA タンパク質による *oriC* 内転写の調節

DnaA タンパク質は、それ自身の発現を転写レベルで制御したり (Braun et al., 1985), 複製開始反応活性化に働く *mioC* 転写を調節したりする (Schauzu et al., 1987; Nozaki et al., 1988) など、染色体複製開始に転写調節因子という側面からも関与している。このことは、*oriC* 内転写の調節にも DnaA タンパク質が関与している可能性を示唆するものである。そこで、HI1187 と同じ遺伝子型を持つが、*dnaA* 遺伝子だけにアンバー変異を持つ菌株 HI1188 を構築した。Integrative suppression に用いた R100-1 プラスミドの複製は、この変異によっては影響を受けないことはすでに確かめられている (Nagata et al., 1988)。この HI1188 株より先の HI1187 株と同様に RNA を調製し、S1 マッピングを行なった。このとき、プラスミドのコピー数や RNA の回収率の違いは、同じプラスミドに由来する *bla* 遺伝子の転写量を用いて補正を行なった。その結果、L-II の量は *dnaA* 変異株中において増加することが分かった (図10, lane 2)。このことは、DnaA タンパク質がこの転写を負に制御していることを示唆している。一方、4 種の右行転写の量は、DnaA タンパク質が存在しない場合は減少した (図10, lane 4)。このことは、野生株中においては複製開始反応の初期過程において DnaA タンパク質が *oriC* に結合した際、これら右行転写を活性化することを示唆している。

DnaA タンパク質は、in vivo においては *oriC* 内に 4 箇所存在する DnaA box のうち、R1, R2 および R4 に結合することが知られている (Samitt et al., 1989)。そこで、それら

DnaA box 内に塩基置換を持った *oriC* 断片を構築することにより DnaA タンパク質による *oriC* 内転写の調節機構を解析した。その結果, (1) DnaA box が DnaA タンパク質による転写調節のための認識部位であることが確認され, (2) R1, R2 および R4 のすべての DnaA box が完全であり, かつ, それらの間の距離も正確に保たれていることがこれら両方向の転写の調節のためには必要であることが明らかになった。以上のようなことから *oriC* 内転写の DnaA タンパク質による調節機構を考えると, プロモーターと DnaA box の位置および方向性の関係は様々であるので, DnaA タンパク質が右行転写と左行転写をそれぞれ活性化あるいは抑制しているとは考えにくい。我々は, DnaA タンパク質が *oriC* 内の DnaA box に結合することによって形成されるある特定の *oriC* DNA 構造が, 右行転写にとっては促進的であり, 左行転写にとっては抑制的に働くのではないかと考えている。

7. 大腸菌染色体複製開始における転写の役割

現在までに得られた結果をまとめ, 大腸菌染色体複製開始における転写の役割について我々が考えていることを述べると以下ようになる (図11参照)。

- 1) 染色体複製開始の初期段階に, DnaA タンパク質が *oriC* 内の DnaA box を認識し結合することにより, *oriC* DNA 構造を変化させ, *oriC* 内右行転写を活性化する。この時, 右行転写 I が *gid* 転写と同程度にまで活性化されることが重要であり, その転写と *gid* 転写とにより *oriC* 左端に存在する AT-rich 領域に安定な負のスーパーコイルが導入される。このことが *in vivo* においては, DnaA タンパク質によるこの領域の二本鎖開裂反応を容易にし, 複製開始を活性化する。
- 2) DnaA タンパク質による *oriC* DNA の構造変化により, AT-rich 領域に正のスーパーコイルを導入しその領域の二本鎖開裂を阻害する *oriC* 内左行転写 II が抑制される。こ

図 11. 大腸菌染色体複製開始における転写の役割

の時、やはり阻害効果を持つ *mioC* 転写も DnaA タンパク質により同時に抑制される。

2) に述べた複製開始にあたり抑制されるべき転写の存在は、それらが通常は AT-rich 領域の二本鎖開裂を阻害し複製開始を抑制することで、開始反応調節に一つの役割を果たしていることを示唆する。

このように、*oriC* 内およびその近傍の転写は複製開始能の調節を *oriC* 領域のスーパーコイル構造を変化させることによって行なっていると考えれば、これまで *in vivo* で得られた実験事実を統一的に解釈することが可能になる。

他方、*in vivo* と *in vitro* における転写による複製開始能活性化機構の違いは、複製開始点の可塑性を示唆するものであり興味深い。DnaA タンパク質による二本鎖開裂過程に必要なエネルギーはある特定の 방법으로供給されるばかりではなく、*oriC* がおかれた環境の下で可能な様々な方法を用いることができるのであろう。

お わ り に

大腸菌染色体の複製は細胞周期に厳密に共役している必要があるが、その調節は開始段階で行われている。そして、その開始反応は多くのタンパク質や細胞(膜)構造が関与する複雑な反応であり、その調節も多くの要因に基くものと想像できる。数年前までの *in vitro* における研究は、その複雑な反応から複製開始能に必須なもののみを抽出し、単純化することを目標として進んできた。しかし、*in vivo* においては必須であるが *in vitro* においては必ずしも必要ではない転写の役割の解析が進められたり、開始反応調節に関係するであろう 13-mer 領域の二本鎖開裂阻害タンパク質が発見されるなど、近年は開始反応の調節機構の解析へも乗り出したように思われる。一方、*in vivo* においても染色体複製開始の研究は、*oriC* プラスミドの分離から最小必須領域の決定へと、その方法論の単純化が進められてきた。我々もこの流れに沿ってさらに解析を進めた結果、複製開始能だけに着目すれば、*oriC* 左端領域に特異的塩基配列は必要ではなく、AT-rich であることのみがその領域の二本鎖開裂の成否にとって重要であることを見いだした。このことは、新しい活性化要因としての *gid* 転写の意義づけに発展し、さらに *oriC* 内転写の発見へと繋がった。ここにおいて、以前より指摘されていた *mioC* 転写の効果と相俟って、複製開始の調節にかかわる転写システムが、*oriC* ならびに周辺領域にわたる統一された特異的機能構造体として存在するという認識に到達した。今後は、再び染色体レベルに戻り、これまで *oriC* プラスミドを用いて蓄積されてきた知見をもとにした研究を統合的に進めることが必要になってくるであろう。

謝 辞

この研究を通じて御指導を戴きました、今井六雄、高浪 満、永田俊夫の諸先生に深甚の謝意を表します。また、研究の一部は陳 吉平博士の協力で行なわれたものであり、ここに深謝いたします。

REFERENCES

- ASAI, T., TAKANAMI, M. and IMAI, M. (1990) The AT richness and *gid* transcription determine the left border of the replication origin of the *E. coli* chromosome. *EMBO J.* 9, 4065–4072.
- ATLUNG, T., LØBNER-OLESEN, A. and HANSEN, F. G. (1987) Overproduction of DnaA protein stimulates initiation of chromosome and minichromosome replication in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 206, 51–59.
- BACHMANN, B. J. (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. *Microbiol. Rev.* 54, 130–197.
- BAKER, T. A., BERTSCH, L. L., BRAMHILL, D., SEKIMIZU, K., WAHLE, E., YUNG, B. and KORNBERG, A. (1988) Enzymatic mechanism of initiation of replication from the origin of the *Escherichia coli* chromosome. In: *Cancer Cells 6. Eukaryotic DNA Replication*, pp. 19–24. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- BAKER, T. A. and KORNBERG, A. (1988) Transcriptional activation of initiation of replication from the *E. coli* chromosomal origin: An RNA-DNA hybrid near *oriC*. *Cell* 55, 113–123.
- BRAMHILL, D. and KORNBERG, A. (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54, 915–918.
- BRAUN, R. E., O'DAY, K. and WRIGHT, A. (1985) Autoregulation of the DNA replication gene *dnaA* in *E. coli* K-12. *Cell* 40, 159–169.
- BURD, J. F., WARTELL, R. M., DODGSON, J. B. and WELLS, R. D. (1975) Transmission of stability (telestability) in deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 250, 5109–5113.
- FILUTOWICZ, M. and JONCZYK, P. (1981) Essential role of the *gyrB* gene product in the transcriptional event coupled to *dnaA*-dependent initiation of *Escherichia coli* chromosome replication. *Mol. Gen. Genet.* 183, 134–138.
- FILUTOWICZ, M. and JONCZYK, P. (1983) The *gyrB* gene product functions in both initiation and chain polymerization of *Escherichia coli* chromosome replication: Suppression of the initiation deficiency in *gyrB*-ts mutants by a class of *rpoB* mutations. *Mol. Gen. Genet.* 191, 282–287.
- FRANK-KAMENETSKII, M. (1989) Waves of DNA supercoiling. *Nature* 337, 206.
- FURLONG, J. C., SULLIVAN, K. M., MURCHIE, A. I. H., GOUGH, G. W. and LILLEY, D. M. J. (1989) Localized chemical hyperreactivity in supercoiled DNA: Evidence for base unpairing in sequences that induce low-salt cruciform extrusion. *Biochemistry* 28, 2009–2017.
- GIAEVER, G. N. and WANG, J. C. (1988) Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* 55, 849–856.
- HIRANO, M., SHIGESADA, K. and IMAI, M. (1987) Construction and characterization of plasmid and lambda phage vector systems for study of transcriptional control in *Escherichia coli*. *Gene* 57, 89–99.
- HWANG, D. S. and KORNBERG, A. (1990) A novel protein binds a key origin sequence to block replication of an *E. coli* minichromosome. *Cell* 63, 325–331.
- JACOB, F., BRENNER, S. and CUZIN, F. (1963) On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 329–348.
- KIMURA, T., ASAI, T., IMAI, M. and TAKANAMI, M. (1989) Methylation strongly enhances DNA bending in the replication origin region of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 219, 69–74.
- KORNBERG, A., BAKER, T. A., BERTSCH, L. L., BRAMHILL, D., SEKIMIZU, K., WAHLE, E. and YUNG, B. (1988) Purified protein system for initiation of replication from the origin of the *Escherichia coli* chromosome. In: *DNA Replication and Mutagenesis*, (ed.: R. E. Moses and W. C. Summers), pp. 6–13. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- KOWALSKI, D. and EDDY, M. J. (1989) The DNA unwinding element: a novel, *cis*-acting component that facilitates opening of the *Escherichia coli* replication origin. *EMBO J.* 8, 4335–4344.
- LARK, K. G. (1972) Evidence for the direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in *Escherichia coli* 15T⁻. *J. Mol. Biol.* 64, 47–60.

- LEONARD, A. C., WHITFORD, W. G. and HELMSTETTER, C. E. (1985) Involvement of DNA superhelicity in minichromosome maintenance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**, 687–695.
- LIU, L. F. and WANG, J. C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7024–7027.
- LØBNER-OLESEN, A., ATLUNG, T. and RASMUSSEN, K. V. (1987) Stability and replication control of *Escherichia coli* minichromosomes. *J. Bacteriol.* **169**, 2835–2842.
- LOUARN, J., BOUCHÉ, J.-P., PATTE, J. and LOUARN, J.-M. (1984) Genetic inactivation of topoisomerase I suppresses a defect in initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **195**, 170–174.
- McMACKEN, R., SILVER, L. and GEORGOPOULOS, C. (1987) DNA replication. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, (ed.: F. C. Neidhardt et al.), pp. 564–612. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- NAGATA, T., MURAKAMI, Y. and IMAI, M. (1988) Requirement of the *Escherichia coli dnaA* gene function for integrative suppression of *dnaA* mutations by plasmid R100-1. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 163–165.
- NOZAKI, N., OKAZAKI, T. and OGAWA, T. (1988) In vitro transcription of the origin region of replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **263**, 14176–14183.
- OKA, A., SASAKI, H., SUGIMOTO, K. and TAKANAMI, M. (1984) Sequence organization of replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Mol. Biol.* **176**, 443–458.
- OKA, A., SUGIMOTO, K. and TAKANAMI, M. (1980) Replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome: The size and structure of the minimal DNA segment carrying the information for autonomous replication. *Mol. Gen. Genet.* **178**, 9–20.
- OSTRANDER, E. A., BENEDETTI, P. and WANG, J. C. (1990) Template supercoiling by a chimera of yeast *GAL4* protein and phage T7 RNA polymerase. *Science* **249**, 1261–1265.
- PIERUCCI, O., HELMSTETTER, C. E., RICHARD, M., WEINBERGER, M. and LEONARD, A. C. (1987) Overexpression of the *dnaA* gene in *Escherichia coli* B/r: Chromosome and minichromosome replication in the presence of rifampin. *J. Bacteriol.* **169**, 1871–1877.
- ROKEACH, L. A. and ZYSKIND, J. W. (1986) RNA terminating within the *E. coli* origin of replication: Stringent regulation and control by DnaA protein. *Cell* **46**, 763–771.
- SAMITT, C. E., HANSEN, F. G., MILLER, J. F. and SCHAECHTER, M. (1989) In vivo studies of DnaA binding to the origin of replication of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**, 989–993.
- SCHAUZU, M.-A., KÜCHERER, C., KÖLLING, R., MESSER, W. and LOTHER, H. (1987) Transcripts within the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* **15**, 2479–2497.
- SKARSTAD, K., BAKER, T. A. and KORNBERG, A. (1990) Strand separation required for initiation of replication at the chromosomal origin of *E. coli* is facilitated by a distant RNA-DNA hybrid. *EMBO J.* **9**, 2341–2348.
- STUITJE, A. R., DE WIND, N., VAN DER SPEK, J. C., PORS, T. H. and MEIJER, M. (1986) Dissection of promoter sequences involved in transcriptional activation of the *Escherichia coli* replication origin. *Nucl. Acids Res.* **14**, 2333–2344.
- SUGIMOTO, K., OKA, A., SUGISAKI, H., TAKANAMI, M., NISHIMURA, A., YASUDA, S. and HIROTA, Y. (1979) Nucleotide sequence of *Escherichia coli* K-12 replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 575–579.
- SULLIVAN, K. M., MURCHIE, A. I. H. and LILLEY, D. M. J. (1988) Long range structural communication between sequences in supercoiled DNA. *J. Biol. Chem.* **263**, 13074–13082.
- TANAKA, M. and HIRAGA, S. (1985) Negative control of *oriC* plasmid replication by transcription of the *oriC* region. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 21–26.
- TSO, Y.-P., WU, H.-Y. and LIU, L. F. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: Direct biochemical evidence from in vitro studies. *Cell* **56**, 111–118.
- VON MEYENBURG, K. and HANSEN, F. G. (1980) The origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* chromosome: Genes near *oriC* and construction of *oriC* deletion mutations. *UCLA Symp. Mol. Cell*

- Biol.* **19**, 137–159.
- WU, H.-Y., SHYY, S., WANG, J. C. and LIU, L. F. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* **53**, 433–440.
- YASUDA, S. and HIROTA, Y. (1977) Cloning and mapping of the replication origin of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5458–5462.
- YUNG, B. Y. and KORNBERG, A. (1989) The *dnaA* initiator protein binds separate domains in the replication origin of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 6146–6150.
- ZYSKIND, J. W., CLEARY, J. M., BRUSLOW, W. S. A., HARDING, N. E. and SMITH, D. W. (1983) Chromosomal replication origin from the marine bacterium *Vibrio harveyi* functions in *Escherichia coli*: *oriC* consensus sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1164–1168.
- ZYSKIND, J. W., HARDING, N. E., TAKEDA, Y., CLEARY, J. M. and SMITH, D. W. (1981) The DNA replication origin region of the Enterobacteriaceae. In: *The Initiation of DNA Replication, ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Vol. 22*, (ed.: D. S. Ray), pp. 13–25. Academic Press, New York.