枯草菌染色体の複製開始と制御の分子機構

吉川 寛¹⁾

金沢大学がん研究所, 〒920 金沢市宝町 13 番 1 号

Molecular Mechanism of Initiation of the Chromosomal Replication and Its Regulation in *Bacillus subtilis*

HIROSHI YOSHIKAWA¹⁾

Cancer Research Institute, Kanazawa University,
13-1, Takaramachi, Kanazawa, 920, Japan

Recent progress in our studies on mechanism and regulation of initiation of chromosomal replication in *Bacillus subtilis* is reviewed. The origin of the chromosomal replication, *OriC*, is supposed to be composed of deoxyribonucleic acid (DNA) signals for initiation of autonomous replication and its regulation. A 245 bp sequence essential for autonomous replication has been isolated from *OriC* of *E. coli*. In contrast, attempts to isolate a similar sequence from *B. subtilis* has not been successful, suggesting that *B. subtilis OriC* is more complicated in structure and function than that of *E. coli*.

To study structure and function of the *B. subtilis OriC* region, we first cloned some 50 kbp DNA in the origin region and determined the exact site of *OriC* *in vivo* within 1000 bp on each strand of the chromosome. The initiation site on each strand is located some 2 kb apart and replication proceeds inward to pass the other site, indicating the one strand be leading the other be lagging strand. Second, we have determined DNA sequence of 12 kbp around the *OriC*. Computer analysis of the sequence, determination of transcription *in vivo* by S-1 mapping and identification of gene products by the Maxi-cell method revealed 10 open reading frames (ORF=genes) which constitute 6 transcriptional units. The ORFs are identified by genetic evidence and comparison with known genes in *E. coli*. They are from left to right "RnpA"-"RpmH"-"DnaA"-"DnaN"-URF (unknown ORF) 71-RecF-URF52-GyrB-GyrA-RrnO. These genes are essential for cell growth involving in synthesis of DNA or ribonucleic acid, or in changes in DNA structure. Not only individual genes but also their organization is highly conserved between *B. subtilis* and *E. coli*.

Two regulatory regions are found flanking "*DnaA*" gene. We concluded that they are *B. subtilis OriC* because 1. they contain 9 and 4 repeating sequences whose consensus sequence TTAT(C/A)CACA is identical to DnaA protein binding site in *E. coli oriC*, 2. transcription from within these regions parallels initiation of chromosomal replication. In contrast to *E. coli OriC* these regions do not replicate autonomously, instead inhibit plasmid replication when they are inserted into it. Difference in organization of *OriC* in relation to the regulatory gene "*DnaA*" may be responsible for the difference in *OriC* function between the two bacteria.

Keywords—bacterial chromosome; replication initiation; replication origin; gene cloning; nucleotide sequence; amino acid sequence; gene organization; dot matrix analysis; S-1 mapping; regulatory sequence

1. はじめに

細菌の染色体は数百万塩基対の巨大な環状 deoxyribonucleic acid (DNA) 分子で、複製は分子の特定部位 (複製起点) から始まり、2 方向に進行し、特定部位 (複製終点) で完了する。この一連の反応を複製周期という。すなわち、1 つの複製周期は、開始、伸長、終結の 3 つの異なる素過程から成り立っている。開始は周期毎に新しい蛋白と ribonucleic acid (RNA) の合成を必要とする過程で、複製制御の中心的役割を担っている。一旦始めると、

本総説は昭和 60 年度日本薬学会年会特別講演者に薬誌編集委員会より執筆を依頼したものである。

Fig. 1. Model for Bidirectional Replication

A: Symmetrical model, initiation signal (—○—) is located on each strand. B: Asymmetrical model, the signal on one of the two strands. Synthesis of new strands (---) starts with RNA primer (---).

重合反応による鎖の伸長は細胞内の既存の酵素蛋白によって自動的に進行する。その速度は特定の温度では環境変化に伴う細菌の増殖速度の変化に無関係で一定である。複製の終結は2方向から伸びてきた鎖が衝突して、自動的に終るのか、あるいは、特異的な蛋白やRNAが関与する調節の過程であるのか不明である。

伸長の分子機構は複製点における新生鎖の解析によって、RNAプライマーによる不連続合成機構が明らかになり、²⁾ バクテリオファージDNAの*in vitro*合成の成功によって、プライメース、DNAポリメラーゼIII及びIをはじめとする複合酵素系による逐次的反応機構が解明されている。³⁾ 伸長の分子機構は細菌から哺乳類まで共通に普遍的である。

伸長の分子機構から演繹すると、複製開始は最初のプライマーRNAの合成開始と考えることができる(Fig. 1)。しかし複製中の開始反応と異なり、開始においてはプライマー合成に先立って、複製起点において2重鎖を開いてプライメース以下の複合酵素系が作動できる状態を準備しなければならない。大腸菌と枯草菌を用いた遺伝生化学的研究によって、複数の蛋白とRNAが関与する逐次的な反応が開始に先行することが明らかにされた。^{4,5)} このことは後にφX174等の小型のファージの*in vitro*合成の成功によって、複数の蛋白の逐次的作用によってプライメースが特定部位から複製を開始する機構が実証されている。⁶⁾ しかしながら細菌染色体のような大型のDNAについては*in vitro*で複製開始を再現することができないため分子機構の研究には組換えDNA技術の登場を待たねばならなかった。

遺伝子クローニングによって単離した薬剤耐性因子(例えばアンピシリン耐性遺伝子)と染色体の断片を結合して薬剤に感受性の細菌に導入する。もし染色体断片の中に自己複製能力をもつ配列が含まれていれば、薬剤耐性遺伝子と結びついて人工的プラスミドが形成され、細菌の中で自律的に複製し、菌を薬剤耐性にかえることが期待される。大腸菌の染色体からは期待通り自己複製能力をもつDNA断片を単離することに成功している。⁷⁾ 染色体由来のこのDNA断片をOriC、これを含むプラスミドをOriCプラスミド又はミニ染色体とよんでいる。OriCは大腸菌の複製開始部位の近傍に存在すること、OriCプラスミドの複製は複製開始遺伝子DnaAに依存することから、OriCは染色体の複製開始の制御配列であると考えられている。OriCの詳細な解析によって、開始に必須な245塩基対の配列が決定されている。⁸⁾ さらにOriCプラスミドの*in vitro*合成系が開発され、開始の分子機構が進められている。⁹⁾ 中でも開始に必須なDnaA蛋白と9ヌクレオチドより成る繰り返し配列との結合は開始の特異性を識別する機構として注目されている。¹⁰⁾

さて、我々は枯草菌を材料として染色体の複製開始と制御を研究している。グラム陰性の大腸菌に対し、枯草菌はグラム陽性を代表する細菌で、大腸菌と並んで分子遺伝学的研究が進んでいる。対数増殖期のいわゆる栄養

細胞は大腸菌と変りないが、環境条件の悪化に対応して、胞子を形成し、完全に不活性状態に分化する能力を備えている。逆に胞子は特定の栄養条件が与えられると、活性化され栄養細胞へ転換することができる。細胞のこのような環境に対する適応的分化を可能にするため、染色体の複製についても栄養細胞における細胞の分裂周期に調和する周期的調節に加えて、胞子形成期における複製開始の抑制と胞子発芽に伴う開始誘発の特殊な開始制御機構を備えていることが予想される。

枯草菌染色体は大腸菌とほぼ同じ大きさの環状 DNA で、複製起点から2方向へ逐次的に複製すること、複製開始毎に蛋白と RNA の合成が必要であることなど、複製機構と制御の基本は大腸菌によく似ている。¹¹⁻¹⁸⁾ 複製起点が細胞膜に強く結合していることが特徴で、膜結合又は蛋白複合体として複製開始領域を分離することができる。¹⁴⁾ また開始に必須な遺伝子の1つ *DnaB* は膜結合にも関与することが報告されている。¹⁶⁾ 大腸菌の *OriC* プラスミドの分離と並行して、我々をはじめ世界のいくつかのグループによって枯草菌の *OriC* を分離する試みが行われたが、いずれも成功していない。その研究の過程で、我々は開始領域の DNA が、その断片をプラスミドに挿入するとプラスミドの複製を強く抑制することを見出し、その機能を SAR (suppressor of autonomous replication: 自己複製抑制) と名付けた。¹⁹⁾ このことは枯草菌の複製開始領域は構造・機能共に大腸菌より複雑で、自己複製能力と複製抑制作用をもつ配列が近接、又は重複して存在し、自己複製能力のみを分離することができないことを示唆している。このような知見から我々は大腸菌のように *OriC* をランダムに分離することを断念し、まず、*in vivo* で複製開始点を正確に決定し、その周辺の DNA の配列を決定して、遺伝情報とその発現を明らかにする方向に研究を転換した。約3年間の研究によって、複製開始領域約 45 kb (1 kb は千ヌクレオチド対) をクローニングし、¹⁷⁾ その内約 15 kb の配列を決定した。¹⁸⁾ 配列の解析とこの領域の転写と遺伝子発現の測定によって、開始領域に連続した9個の遺伝子と、2個の特徴的な構造と機能を持つ制御配列を同定することに成功した。更に配列を大腸菌と比較したところ、開始領域の約 8 kb の遺伝子群とその配置が両細菌に完全に保存されていることを発見した。¹⁸⁾ 面白いことに、大腸菌 *OriC* の複製開始必須配列中の制御配列と相同の配列が枯草菌の開始領域にも存在する。しかし、制御配列とそれを識別する *DnaA* 遺伝子の相対的位置は全く異なり、枯草菌では制御配列が *DnaA* 遺伝子の両隣に位置するのに対し大腸菌では 40 kb 以上離れている。この違いが開始調節の違いを反映しているものと考えられる。

このように枯草菌染色体の複製開始領域の構造と機能の解析が進んで、大腸菌との相同性と相違点が明らかになり、染色体の複製開始とその調節機構の進化を分子レベルで研究することがはじめて可能になった。

この論文では枯草菌の複製開始領域の構造と機能に関する我々の研究結果を紹介し、大腸菌と比較して、複製開始とその制御機構について考察する。

2. 複製開始領域のクローニングと開始部位の決定

前述のように枯草菌から自己複製能力を持つ *OriC* を分離することができないので、複製開始部位を *in vivo* で直接決定する必要が生じた。我々は約 20 年前、遺伝子の複製順序を決定し、複製起点は最初に複製される遺伝子の近傍にあるものと推定した。¹⁹⁾ しかしそれは開始点を染色体の約 1% ($2-3 \times 10^4$ b) 内に限定できたに過ぎず、配列レベルの解析からみると極く大ざっぱなものであった。

制限酵素が発見されると、Worcel は大腸菌を用いて、複製開始直後に合成される DNA の制限酵素地図²⁰⁾を作成し、開始点を数 kb 以内に限定することに成功した。²¹⁾ 我々もこの方法を適応して枯草菌染色体の開始領域の制限酵素地図を作り、開始点を 5 kb 内に推定した。²²⁾ この方法には種々の問題があるが、中でも、Fig. 1 のように2本鎖の各々から開始する部位を決めるには全く無力である。

この課題を克服するため我々は開始領域の DNA をクローニング²³⁾し、各々の断片と開始直後に合成される新生 DNA 鎖とのハイブリッド DNA を作らせることによって合成部位を決定する方法を考えた。まず開始領域の制限酵素地図を頼りに開始点近傍の断片を1個クローニングし、これを指標に互いに重り合う断片を次々にクローニングする方法 (Walking 法という) で開始領域約 50 kb をクローニング、その制限酵素地図を完成した (Fig. 2)。次に枯草菌のチミン要求性の胞子をチミン欠乏状態で発芽させ、一定時間後高比活性の ³H-チミジンを追加することによって複製を同調的に開始、新生 DNA を放射能標識した。同調性を高め、新生鎖のみを選択的に標識するため、複製阻害剤を加えておくと、新生・標識 DNA は平均 1000 塩基の短い単鎖 DNA として容易に分別することができる。

Fig. 2. Cloning of *OriC* Region and Restriction Enzyme Map

Alphabets on linear DNA (solid line) indicate sites of cleavage by restriction enzymes, B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; P, *Pst*I; S, *Sal*I. Open bars below the map show fragments cloned in charon phages (chB series) or pBR plasmid vectors (pSM, pNO and pMS). Positions of fragments which transformed various markers are shown by [ ]. A ribosomal operon, *rrnO* was determined by DNA sequencing. *Ori* indicates position and direction of the first replicating DNA strands.

このように調製した新生 DNA をあらかじめクローニングし、断片毎にニトロセルロース紙に変性焼きつけた開始領域の DNA と混ぜ、適当な条件でハイブリッドを形成させる。もし複製が特定部位から起こっておれば、新生鎖は特定の DNA 断片とのみハイブリッドを作るはずである。予想通り 50 kb にわたる開始領域の中で 3.5 kb の特定の断片にハイブリッド形成が集中した。次にこの断片を相補鎖に分けてクローニングし、その各々についてハイブリッドを作り、それぞれの鎖上の合成開始部位と複製の方向を決定した。²⁴⁾

Fig. 3 は最終結果を示したもので、最初の DNA 鎖は約 2 kb 離れた部位から合成を始め、互いに交叉する方向に進行することを示している。この事実は 2 方向性の複製が Fig. 1B のような非対称的機構で開始していることを示唆している。すなわち 2 本の新生鎖の内的一方は **leading 鎖**²⁵⁾で、他方は **lagging 鎖**²⁵⁾である可能性が考えられる。非常に短時間の合成では Fig. 3 の左から右方向への鎖の量が反対の鎖より多いことは、この鎖が **leading 鎖**であることを示唆している。

3. 開始点近傍の DNA の塩基配列とその転写

In vivo の複製開始点を正確に決定できたので、開始点周辺からクローニングした DNA を材料に約 12 kb の塩基配列を決定した。¹⁸⁾ その領域には当然数個の遺伝子が含まれているのでコード配列に誤りがないよう両方の鎖を重複して解析するほど慎重に行った。

塩基配列を決定すると、最近の遺伝子構造に関する知見によって遺伝子とその発現のための制御配列をコンピューターを用いて同定することができる。そのようにして推定された遺伝子が本物であるかどうかは、クローンした遺伝子を用いて、細胞内での転写と翻訳を S-1 マッピング法²⁶⁾と Maxi-cell 法²⁷⁾によってそれぞれ測定し判断することができる。このようにして複製開始領域に 9 個の遺伝子と 2 個の制御配列を決定することに成功した。^{18, 28)}

3-1. 遺伝子とその構成 Fig. 4 は開始領域の遺伝子と転写単位の配置を示したものである。遺伝子が遺伝的に同定されていないものについては ORF (open reading frame) にアミノ酸の数を付して表している。開始領

Fig. 3. Determination of *OriC*

Eye form of double stranded DNA indicates replicating region near the origin. Alphabets are same as in Fig. 2. Arrows inside the eye represent newly synthesized strands. Thickness of the arrow reflects amount of hybridization semi-quantitatively.

Fig. 4. Arrangement of Genes and Transcriptional Units in the Origin Region

On the restriction map of the segment of the chromosome (alphabet are same as Fig. 2 except for H, *Hind*III), direction and size of open reading frame (ORF) (shaded arrows), start position and direction of transcription, TR, (black arrows) and first replicating DNA strands (open arrows) are indicated. A hairpin structures (H) downstream of ORF indicate termination signals.

域の 9 個の遺伝子を同定することができたが、その内遺伝子的に同定できているのは組換えに参与する遺伝子 *RecF* と DNA ジャイレースの 2 種類のサブユニットをコードする遺伝子 *GyrA* と *GyrB* の 3 種類である。*GyrA* 遺伝子の右側には 16S rRNA-tRNA^{Ile}, tRNA^{Ala}-23S rRNA-5S rRNA から成るリボソーム RNA オペロンの一種 *RrnO* が存在する。残りの未知の ORF について DNA 配列から予想されるアミノ酸配列をすでに報告されている大腸菌の各種遺伝子産物の配列と比較したところ ORF119 は *RnpA* (リボヌクレアーゼ P の遺伝子) に、ORF44 は *RpmH* (リボソーム蛋白 L34 の遺伝子) に、ORF446 は *DnaA* (複製開始蛋白の遺伝子) に、ORF378 は *DnaN* (DNA ポリメラーゼ III の β -サブユニットの遺伝子) に相同であることが判明した。更に *RecF* 及び *GyrB* はそれぞれ大腸菌の *RecF*, *GyrB* に相同である。中でも *RpmH*, *DnaA* 及び *GyrB* の相同性は高く、機能の保存が細胞にとって重要であることを示している。*GyrA* は大腸菌側の構造が未決定で比較できない。大腸菌の遺伝子と相同であるが、遺伝的実証のない枯草菌側の遺伝子はコオテエションマークを付けて “*DnaA*”, “*DnaN*” のように表すことにする。

RecF と *GyrB* は 1 つの転写単位を形成し、その中に未知の小型の ORF (ORF71 と ORF52) を 2 個含んでいる。この転写単位は比較的大きいことと第 2 の転写開始点が *RecF* 遺伝子の内部に存在することが特徴である。1 つの酵素のサブユニットを作る 2 種の遺伝子 *GyrA* と *GyrB* が独立の転写単位であることは興味深い。“*DnaA*” は “*DnaN*” と同一の転写単位を形成するが、“*DnaN*” には独自の転写開始点も存在する。“*RpmH*” 及び “*RnpA*” はそれぞれ独立に転写される。“*RpmH*” と “*DnaA*” の間には 626 b の非コード配列が存在するが、この領域を境に転写の方向が互いに逆向きになることに注目してほしい。以上述べたように開始領域の遺伝子群は左から、1) “*RnpA*”, 2) “*RpmH*”, 3) “*DnaA*”-“*DnaN*”, 4) ORF71-*RecF*-ORF52-*GyrB*, 5) *GyrA* 及び 6) *RrnO* の 6 種類の転写単位又はオペロンに分けられる。このことを裏付けるように、配列の上でも各々の単位には転写の上流に転写のプロモーターを、下流には転写終結シグナルを見出すことができる。²⁸⁾

大腸菌を用いた Maxi-cell 法によって “*DnaA*”, “*DnaN*”, *RecF*, *GyrB*, *GyrA* に相当する蛋白を同定することができたので、これらの転写プロモーターは大腸菌では実際に発現可能であることが証明されたといえる。²⁸⁾

このように枯草菌の複製開始領域には DNA と RNA の合成及びそれらの構造変化に重要な機能をもつ遺伝子群が存在し、それらが進化的によく保存されていることが明らかになった。ところが大腸菌遺伝子との比較を行っている過程で、驚くべきことに “*RnpA*” から *GyrB* までの遺伝子配置がそっくりそのまま大腸菌染色体に存在することが明らかになった。その位置は枯草菌とは異なり、*OriC* から約 40 kb 離れているが、遺伝子の配置は

Fig. 5. Comparison of *oriC* Region of the *B. subtilis* Chromosome with *DnaA* Region of the *E. coli* Chromosome

DnaA region of *E. coli* (above) and *oriC* region of *B. subtilis* (below) are shown. Open bars are open reading frames indicating homologous regions by shaded are. Solid lines connecting ORFs are non-coding area. Open arrows are repeating sequences TTAT(C/A)CACA. Black arrows are promoters for transcription. *E. coli oriC* region (black bar) is located some 40 kbp away from the *DnaA* region.

相同である (Fig. 5). 更に *RpmH* と *DnaA* の間に約 600 b の非コード領域が存在し、これを境に両側の遺伝子の転写が互いに逆に外側の方向を向いていることも又相同である。個々の転写単位をみると相違があり、一般に大腸菌では遺伝子間の非コード配列が短く、1 個の転写単位を作る遺伝子の数も多い。この領域の相同配置は右側は *GyrB* で終わっており、大腸菌では *GyrA* 遺伝子は全く別の複製終点近くに位置している。*RnpA* の左側には機能不明だが細胞増殖に必須の 50 kd 及び 60 kd の 2 種の蛋白を作る遺伝子が並んでいることが大腸菌では知られている。しかし枯草菌では相当する位置の配列が未決定であるので、相同配置の左端は不明である。

大腸菌と枯草菌の染色体全体を比較すると、いくつかの遺伝子群に類似の配置がみられる。それらはリボゾーム蛋白の遺伝子群やアミノ酸や糖代謝の遺伝子群などで、いずれも機能的にオペロンを構成してしかるべきものである。これに比べ、開始領域に見出される相同配置は規模が大きく、構成する遺伝子間には細胞増殖に必須であるという共通性以上に機能的結びつきを求めることは難しい。したがって、このような配置が 2 種類の細菌に独立に進化したとは到底考えられず、共通の祖先の染色体構造を保存していると考えるのが妥当である。5S rRNA の構造の比較から、大腸菌と枯草菌は約 12 億年前に枝分れて、独立に進化したと推定されている。このことはこの相同遺伝子配置が 12 億年前の原始細菌の染色体構造にはかならないことを示している。この領域は原始細菌でも染色体の複製開始領域であって、枯草菌ではより元に近い構造を保存していると考えてよいであろう。もしそれが正しいとすると、大腸菌の *OriC* は元の位置から約 40 kb 離れた位置に転位したものと考えられる。一般に大腸菌は遺伝子の増幅や転位によって遺伝子配置が複雑化しており、枯草菌の遺伝子配置の方が単純だと考えられている。相同性の高い開始領域をみてもその傾向が現れている。

3-2. 制御配列と *OriC* 開始領域 12 kb の配列をコンピューターにより解析すると、2ヶ所に制御領域と考えられる配列が存在する。第 1 は“*RpmH*”と“*DnaA*”の間にある 626 b の、第 2 は“*DnaA*”と“*DnaN*”の間にある 191 b 非コード配列である。どちらにも特定の塩基配列が繰り返され、この配列を使って分子内に安定な高次構造を作ることができる。我々は次のべる理由から、これらの領域のどちらか、又は両方が複製開始の制御配列であると考えている。

第一に、最初の leading 鎖が“*DnaA*”-“*DnaN*”領域に存在すること。すなわち、最初のプライマー RNA の合成開始部位、又は RNA から DNA への切換え点はこれら 2ヶ所の領域内にあると推定されることである。

第 2 に、両方の領域に共通で特徴的な繰り返し配列は TTAT(C/A)CACA を共通の構造とする 9ヌクレオチド対であるが、これと全く同じ配列が大腸菌 *OriC* の複製必須領域に 4 個存在し、これらは開始蛋白 *DnaA* 蛋白の結合部位であることが証明されている。¹⁰⁾ *DnaA* 蛋白の機能はまだ明らかではないが、これらの繰り返し配列に結合して、開始部位の特異性を決定すると推定されている。上の共通構造から 1 塩基対の変化を許容すると、

“*RpmH*”と“*DnaA*”の間には9個，“*DnaA*”と“*DnaN*”の間には4個繰り返し存在する。この2個の領域がはさんでいる“*DnaA*”遺伝子が大腸菌の *DnaA* 遺伝子と相同であることを考えると，*DnaA* 蛋白が関与した複製開始がいずれかの領域から起こっている可能性が高いと考えられる。

第3に，2個の制御配列には一方に“*DnaA*”-“*DnaN*”オペロンのプロモーター，他方に“*DnaN*”遺伝子の転写開始点が存在する。これらの転写活性を細胞の種々の生理状態で調べたところ，転写活性が複製開始に強く共役していることが明らかになった。すなわち，開始遺伝子の1つ *DnaB* の高温感受性変異株を用いて，各種温度で開始領域の遺伝子群の転写を測定したところ，非許容温度では上の制御配列からの2種類の転写のみが特異的に阻害を受け，高温から低温に戻して複製が再開すると転写もまた回復した。一方チミン要求株の胞子をチミン欠乏状態で発芽させ，複製開始のみを選択的に停止すると，やはりこの2種の転写のみが抑制され，チミンの添加による複製開始と同時に転写も誘発された。現在のところ転写と複製開始の因果関係は明らかでないが，このような緊密な結びつきはこの領域の転写が直接 RNA プライマーとして，又間接に開始部位の活性化に関与している可能性を示唆している。

このような3つの理由から“*RpmH*”と“*DnaA*”の非コード配列と“*DnaA*”と“*DnaN*”の間の非コード配列は複製開始制御配列であると判断し，それぞれ *OriC*-I, *OriC*-II と命名した。又大腸菌と枯草菌に共通でかつ *DnaA* 蛋白の結合配列である9ヌクレオチドの繰り返し配列 TTAT(C/A)CACA を“*DnaA*-Box”と名付けた。

4. *OriC* の機能と複製開始の制御

大腸菌の *OriC* は自己複製という機能を指標として分離されたものである。そのため *OriC* は自己複製配列を意味するかのような印象を与えているが，本来は染色体の複製開始点と定義すべきものである。その意味では大腸菌で分離された *OriC* は酵母や高等動物等の真核細胞の染色体から分離されている自己複製配列 (autonomous replicating sequence=ARS) と同等と考えるべきである。分離された大腸菌の *OriC* と Worcel によって決定された *in vivo* の複製開始点とは必ずしも一致していないが，その後我々が枯草菌で行ったような開始部位の厳密な決定は大腸菌では行われていない。すなわち厳密な意味で分離された *OriC* が大腸菌の開始点であるかどうかの証明はない。これに対し，枯草菌では本来の *OriC* を決定する方向から研究を進め，構造と，転写の制御様式から前述のように2個の制御配列としての *OriC* 候補を推定したのである。

4-1. 枯草菌 *OriC* の機能 枯草菌 *OriC*-I, II は構造からみて大腸菌 *OriC* のように自己複製能を示すことが期待される。そこで *OriC* I, II を別々に又は両方を含む種々の断片を適当なベクターに挿入して自己複製機能の有無を測定したが，*OriC* プラスミドの作成は全て失敗に終わった (Fig. 6)。期待とは逆に，これらの制御領域を枯草菌の中で増殖するプラスミドに挿入すると，そのプラスミドの複製を強く抑制することが明らかになった (Fig. 6)。このことから自己複製能力をもつ *OriC* プラスミドを分離することができないのは技術的な問題ではなく，プラスミド化するために制御領域に含まれる抑制作用が作動するためと考えられる。

この複製抑制作用の機構を知るため，制御領域の中の抑制に必須の配列を解析した。その結果，制御領域内のプロモーターは阻害作用には無関係で，領域内の“*DnaA*-Box”とその配列が作る高次構造が抑制に関与していることを明らかにした。このことは“*DnaA*”蛋白と“*DnaA*-Box”の相互作用が抑制作用の発現に重要な役割を果していることを示唆している。

枯草菌の *OriC*-I 及び II の制御配列のこのような複製抑制作用は，プラスミドに挿入された特殊な状況でのみ発現するのか，あるいは染色体上でも抑制的に複製開始の調節に働いているのか明らかにするため阻害の分子機構を追究する必要がある。“*DnaA*-Box”を多数含む配列が“*DnaA*”遺伝子をはさんで存在することは“*DnaA*”蛋白と“*DnaA*-Box”の相互作用による開始に対する正と負の作用が近接又は重複している可能性を強く示唆している。

4-2. *OriC* と複製開始の調節—考察にかえて はじめにのべたように，細菌の染色体は細胞の増殖，分裂周期に同調して厳密な調節を受けている。この調節は専ら複製開始の on-off とその頻度によって行われていることは遺伝的，生化学的な解析によって明らかになっている。このような知見を総合してモデルとして提唱されたのが Jacob らのレプリコン仮説である。²⁰⁾ モデルではレプリコン自身が複製開始を誘発する調節蛋白 (イニシエーター) を作る (すなわち遺伝的支配をしている) こと，イニシエーターが作用する特別の部位 (レプリケーター)

“*DnaA*” 蛋白が “*DnaA*” 遺伝子の転写を自己抑制するとすると、この領域では *DnaA* 蛋白による正と負の調節を行うことが可能である。

枯草菌 *OriC* のように複製開始遺伝子が、その蛋白が識別する配列によって囲まれている構造は、大腸菌の薬剤耐性プラスミドやF因子のレプリケーターに共通の構造であり、これらの場合には複製開始遺伝子そのものがイニシエーターの働きを行っている。プラスミドから類推すると、枯草菌の *OriC* I, II はレプリケーターの “*DnaA*” 蛋白はイニシエーターのそれぞれ資質を備えているようにみえる。大腸菌では *OriC* が *DnaA* 遺伝子から離れてしまったため *DnaA* 蛋白は調節的機能を失い、それに代る新しいレプリケーターとイニシエーターの組み合わせが発達したのであろう。

大腸菌と枯草菌の *oriC* 領域の構造と機能の類似点と相違点が明らかになったことによって、複製開始とその調節の研究は一層進展することが期待される。しかし現在は開始の調節について統一的なモデルを考える段階に達していないことも理解していただけたことと思う。そこでモデルに代えて今後の課題を列挙して本論を終ることとする。

1) “*DnaA*-Box”-“*DnaA*” 蛋白について

1. *DnaA*-Box は原核生物の *OriC* に普遍的か？ 2. *DnaA*-Box の機能の共通点と特異性は何か？ 3. *DnaA* 蛋白の機能、大腸菌と枯草菌の類似点と相違点は？

2) レプリケーターについて

1. 大腸菌、枯草菌において *OriC* (開始点), *ARS* (自己複製配列), レプリケーター (イニシエーター受容配列) の関係を明らかにする。2. レプリケーターを含むプラスミドは分離できるか？ どのような宿主細胞の条件を必要とするか？

3. イニシエーターについて

1. 正の制御因子か、負の制御因子か或いは両方を兼備しているのか？ 2. 細胞周期依存性の調節を受ける *Dna* 蛋白を同定できるか。3. レプリケーターに特異的に結合する調節蛋白を分離できるか？

4) 複製開始と染色体の高次構造について

1. *OriC* 領域の高次構造とその変化を *in vivo* で測定できるか？ 2. 高次構造の形成に関与する *Dna* 因子を同定できるか？

謝辞 本研究は金沢大学がん研究所において、小笠原直毅、守家成紀両君との共同研究である。又文部省科学研究費、一般研究B及び特定研究によって支えられたことを感謝する。

引用文献及び注

- 1) 現住所: 大阪大学医学部遺伝学教室, 〒530 大阪市北区中之島 4 丁目 3-57.
- 2) Y. Kurosawa, T. Ogawa, S. Hirose, T. Okazaki, R. Okazaki, *J. Mol. Biol.*, **96**, 653 (1975).
- 3) A. Kornberg, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **43**, 1 (1978).
- 4) J. W. Zyskind, L. T. Deen, D. W. Smith, *J. Bacteriol.*, **129**, 1466 (1977).
- 5) S. Murakami, N. Inuzuka, M. Yamaguchi, H. Yoshikawa, *J. Mol. Biol.*, **108**, 683 (1978).
- 6) R. McMacken, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3313 (1978).
- 7) S. Yasuda, Y. Hirota, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5458 (1977).
- 8) A. Oka, K. Sugimoto, M. Takanami, Y. Hirota, *Mol. Gen. Genet.*, **178**, 9 (1980).
- 9) R. S. Fuller, A. Kornberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 5817 (1983).
- 10) R. S. Fuller, B. E. Funnell, A. Kornberg, *Cell*, **38**, 889 (1984).
- 11) N. Sueoka, H. Yoshikawa, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **28**, 47 (1963).
- 12) H. Yoshikawa, M. Haas, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **33**, 843 (1968).
- 13) H. Yoshikawa, M. Yamaguchi, M. Seiki, N. Ogasawara, H. Toyoda, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **43**, 569 (1978).
- 14) K. Yamaguchi, H. Yoshikawa, *J. Mol. Biol.* **110**, 219 (1977).
- 15) S. Winston and N. Sueoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2834 (1980).
- 16) M. Seiki, N. Ogasawara, H. Yoshikawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 4285 (1982).

- 17) N. Ogasawara, S. Moriya, S. Mizumoto, H. Yoshikawa, *Nuc. Acids Res.*, **11**, 6301 (1983).
- 18) S. Moriya, N. Ogasawara, H. Yoshikawa, *Nuc. Acids Res.*, **13**, 2251 (1985).
- 19) H. Yoshikawa, N. Sueoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **49**, 806 (1963).
- 20) 制限酵素は DNA の特定の塩基配列を識別して切断する。したがって DNA 上の切断位置を数種の酵素について決定すると, DNA 毎にユニークな分布を示す。これによって DNA の一次構造を表すことができるので, 遺伝子地図に対応して制限酵素 (切断点) 地図という。
- 21) R. C. Marsh, A. Worcel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2720 (1977).
- 22) M. Seiki, N. Ogasawara, H. Yoshikawa, *Nature (London)*, **281**, 699 (1979).
- 23) 大腸菌の λ ファージや pBR 系のプラスミドをベクターとして数 kb—10 数 kb の制限酵素断片を分離, 純化して増幅すること。
- 24) N. Ogasawara, S. Mizumoto, H. Yoshikawa, *Gene*, **30**, 173 (1984).
- 25) 複製点の進行方向と重合による鎖の伸長方向が同一であり, 連続的合成が可能な鎖を **leading 鎖**, 反対側にあつて鎖の伸長方向が複製点の移動方向と逆向きであるため不連続に合成される鎖を **lagging 鎖** という。
- 26) *In vivo* の転写開始点を決定する方法で, 開始点が含まれると予想される DNA をクローニングし, 末端の磷酸を ^{32}P で標識してプローブとする。一方細胞から mRNA を抽出し, 単鎖のプローブとハイブリッドを形成させる。ハイブリッドとなって 2 重鎖を形成した部分と元の単鎖 DNA 部分がヌクレアーゼ S1 に対する感受性が異なることを利用して, ハイブリッドを作らない部分を分解する。その結果元のプローブの長さが短くなるので, その長さの差を電気泳動で測定し, mRNA の 5'-末端の位置を決定する。プローブは高比活性に標識することができるから, 細胞当たり数分子の mRNA でもこの方法で同定することができる。
- 27) クローンした遺伝子が大腸菌の中で実際に発現し, 蛋白を合成することを確認する方法。遺伝子をプラスミドに挿入, 紫外線感受性の大腸菌に導入する。増殖中の菌を紫外線で照射すると染色体を選択的に分解し, プラスミドはほとんど破壊されない状態を作ることができる。この状態で ^{35}S -メチオニンを加え, 合成される蛋白を標識すると, プラスミド中の遺伝子産物のみを選択的に標識し, 目的とする遺伝子からの蛋白合成の有無を調べることができる。
- 28) N. Ogasawara, S. Moriya, H. Yoshikawa, *Nuc. Acids Res.*, **13**, 2267 (1985).
- 29) F. Jacob, S. Brenner, F. Cuzin, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **28**, 320 (1963).