

# 遺伝子発現統御第一部門

堀 内 嵩

平成2年12月にこちらに着任し、翌年3月までは研究室のセットアップに専念、平成3年4月から本格的に研究を開始した。このとき丁度、前任地の九州大学で行っていた大腸菌の複製終決システムに関する解析を終え、ほぼその全容を明らかにし終えたところであった。複製終結点 (terminus; Ter) とは、大腸菌の環状ゲノム上にある単一の複製開始点 (oriC) のちょうど真向かい側にあつて、複製フォークの進行を阻止する部位のことである。研究を開始した時点では、その存在と極性、つまり特定の方向から来るフォークは阻害するが、逆方向のそれは全く阻害しない性質、は知られていたものの、その構造や阻害の機構などほとんど不明のままであつた。我々はフォーク阻害活性を測定する簡単なアッセイ法を考案し、それを駆使することで複製終結点の塩基配列構造、そこに特異的結合する蛋白質 (Ter 結合蛋白質) の構造遺伝子の同定と構造解析、Ter 結合蛋白質の精製とその性質の解析、さらに Stanford 大の Kornberg 研究室との共同研究による精製 Ter 結合蛋白質を用いた試験管内でのフォーク阻害反応再現の成功などによって、大腸菌の複製終結システムの全容をほぼ解明することができた。なお興味ある問題として、複製終結の生理機能と終結点を示す極性の分子的メカニズムの解明が残された。

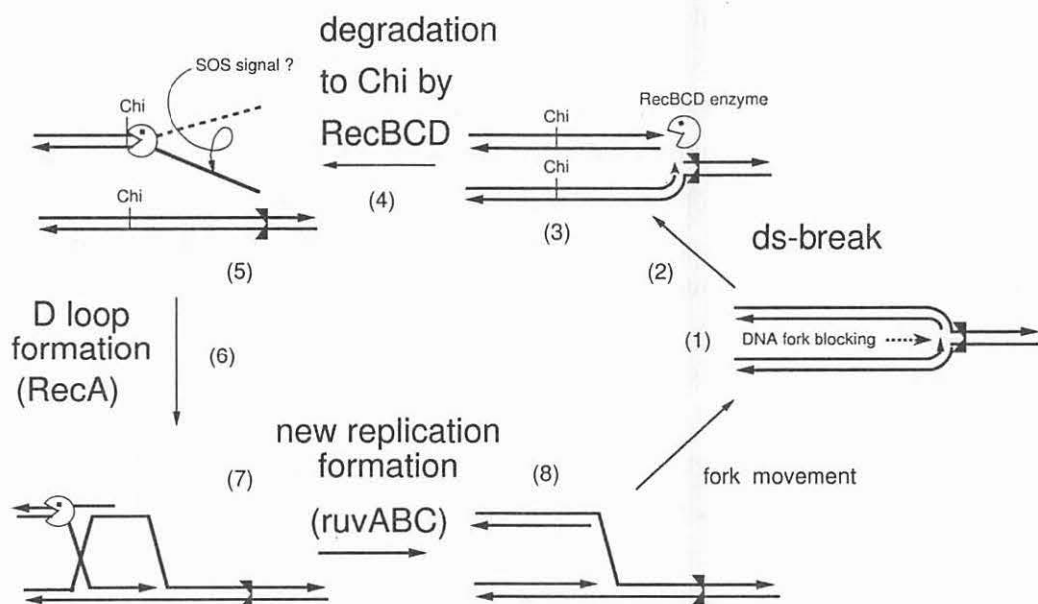
さて基生研での仕事としては、我々が以前より見い出していた複製終結点領域に存在する組み換えのホットスポットの解析を選んだ。我々の系は次のようなものである。宿主大腸菌として、DNA:RNA 雑種分子の RNA 部分のみを特異的に分解する酵素 RNaseH の欠損した (*rnh<sup>-</sup>*) 株を用いる。その株に大腸菌の染色体由来の *EcoRI* DNA 断片を  $Km^r$  遺伝子と結合させたものを導入し、 $Km^r$  株を選択、それを  $Km$  存在下で培養し、通常のアルカリ法によってプラスミド様 DNA を抽出してくると、導入した DNA は自立複製不能であるにもかかわらず、特定の DNA 断片では、多量の環状 DNA として回収される。宿主に導入された環状の DNA は、ゲノム上の相同領域に組み換えによって一旦挿入されるが、増殖中に相同組み換えによって再び切り出されてくるであろう。もしその断片上にホットスポットを有する場合、高頻度で切り出しが起こればその結果環状 DNA が蓄積すると考えられる。そこでそのような DNA をホットスポット (Hot) DNA と呼んだ。

計8ヶの HotDNA を分離し、染色体上の位置を決定したところ、興味深いことにそのうちの7ヶが複製終結領域に集中することが判明した。特に複製終結点に近い HotA について詳細に調べたところ、HotA のホットスポット活性には、終結点で阻害された複製フォークの蓄積が必須であることが判明した。それに加え、すでに知られている大腸菌のホットスポット配列である、Chi の存在もその活性には必須であつた。これらのことを総合的に考えることで、HotA の組み換え活性化の分子機構

モデルを提出した。モデルでは進行を阻止されたフォークの2本の姉妹染色体の一方に2本鎖切断が生じ、それを修復するための組み換えが、HotDNAを切り出す結果を招くというものである。この現象に対するRNaseH欠損株の役割とは、本来単一レプリコンである大腸菌ゲノムを多重レプリコンへと変換することにあると考えてよい。特に *mh<sup>-</sup>* 株において新しい複製開始点が、複製終結領域に複数出現することから、これらの開始点からスタートしたフォークはその周りにある終結点でその進行を直ちに阻害されるため、阻害フォークが蓄積されると予想され、事実野生株に比べ著しく蓄積されていた。このモデルの検証のため、野生株の染色体に合成した複製終結点配列を挿入し、常時そこでフォークが蓄積するような株を新に作成したところ、それまでコールドスポットであったDNA部分をホットスポットに変換させることに成功し、モデルの正しさを証明できた。

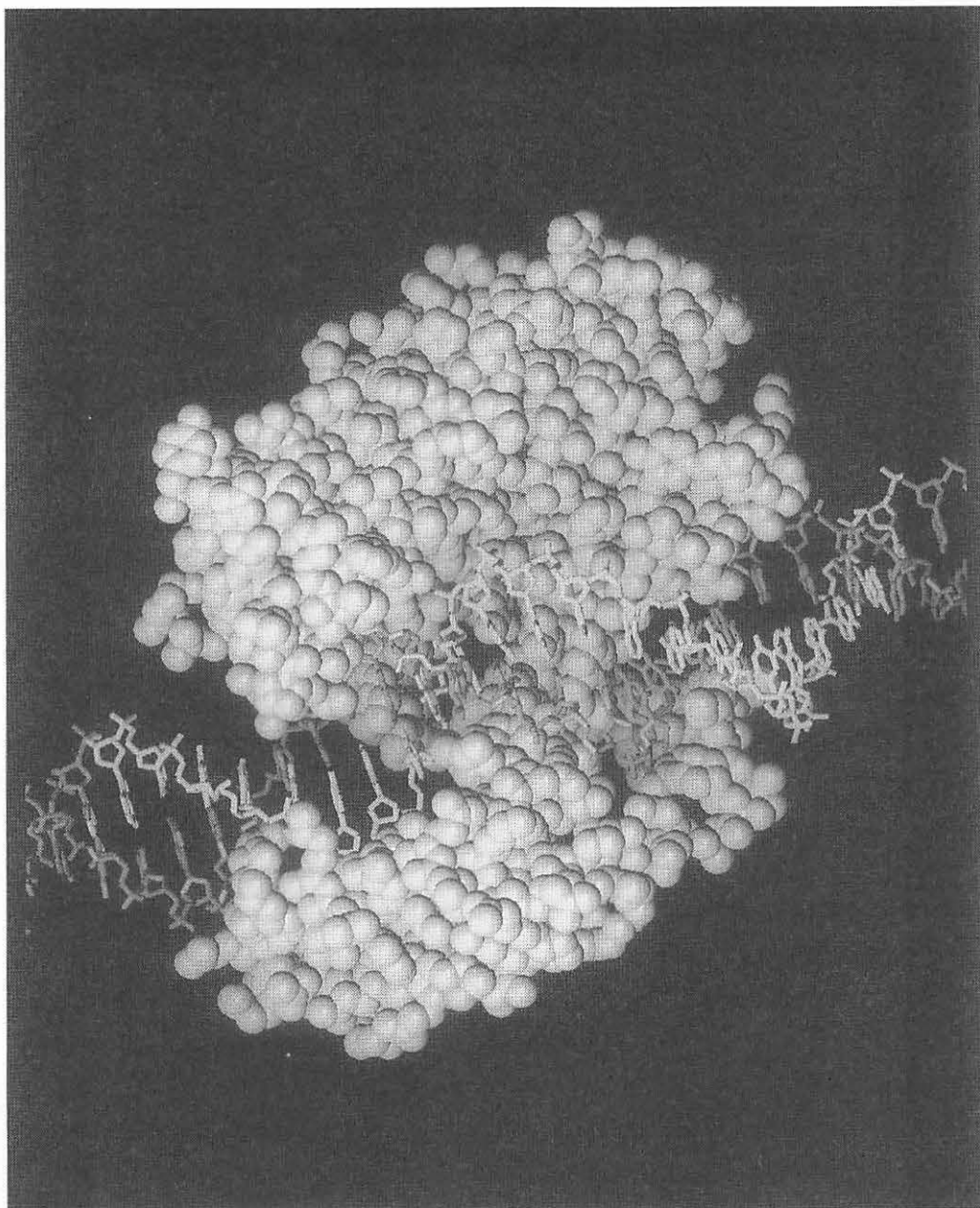
このモデルをさらに発展させ図に示したモデルに到達した。本モデルは次のことを述べている。複製フォークが何らかの原因で進めなくなった時、それを一度分解し新たな複製フォークを再構築するのが相同組み換えの一つの機能ではないかとの考えである。我々はその組み換えの開始がDNAの2本鎖切断にあると考えている。DNA分子の末端は、組み換えに対し活性が高いことは以前から知られていることであるし、細菌のゲノム、ミトコンドリアや葉緑体のDNAも環状で末端をもたない。末端をもつ真核生物のゲノムもテロメアという特殊な構造を有している。これらも全て末端があれば素早くそこから複製フォークを効率良く再生しようとする組み換え反応から逃れるためと考えることもできる。このフォーク再生の組み換え反応は、最も原始的な組み換え機構である可能性が高く、それがこれまで営々として複製フォークの進行を保証してきたと考えられる。

では、実際真核生物においても同様のことが起こっているのだろうか？ 我々は酵母の組み換えのホットスポット (HOT1) に着目し解析したところ、HOT1 部位には、複製フォーク阻害 (RFB) 部位が



進行阻害を受けた複製フォークの組換えによる再生モデル

含まれること、しかも大腸菌と同様にそのホットスポット活性にはフォーク阻害活性が必要であることを明らかにした。しかし酵母の HOT1 は rRNA 遺伝子の転写制御部位からなり、フォーク阻害活性に加え、その転写活性もホットスポット活性に必須であることを他の研究者が明らかにしていることから、大腸菌とは異なる面をも有する。



DNA と複合体を形成した大腸菌複製終結タンパク質の構造（口絵10参照）

残された問題、複製終結点が示す極性の謎に答えるには、終結点(Ter)結合タンパクの3次元構造を知ることが先決であろう。基生研に来る前より、Ter結合タンパク質の結晶化とその構造解析のため、生物分子工学研の森川耿右博士のグループと共同研究をスタートしていた。長年の苦労の後、森川グループの総研大学生の鎌田勝彦氏を中心に、Ter配列DNAとTer結合タンパク質の複合体による共結晶化に成功、最終的に2.7Åの解像度で、このDNA-タンパク質複合体の3次元構造を明らかにすることが出来た。その結果、Terタンパク質のDNAに対する極めて高い結合能、新しい結合様式、さらに特徴的な極性を説明可能とする魅力的なモデルを提示することが出来た。

以上の研究とは別に、堀内が代表者を務める日本の大腸菌ゲノム解析について簡単に触れたい。大腸菌は言うまでもなく、現在の生物学の流れを作った分子生物学形成に最も寄与した生物であり、そのため遺伝学的、生化学的に最も良く解析されてきた。この様な大腸菌のゲノム解析は、他の生物のゲノム解析に対する辞書的役割をになう重要で必須なものであるにも関わらず、これまで効率良く運ばれてこなかった。そこで平成7年度より日本国内の大学、研究所に所属の12グループが新チームを作り、統一したプロトコルの元に徹底した分業化を図ることで、高効率で正確な塩基配列決定を行ってきた。その結果、これまでの2年弱の間に、大腸菌ゲノムのほぼ50%に当たる約2.3Mbの領域の塩基配列を決定し、以前の日本のゲノム解析の成果と合わせ連続した60%の領域を決めることが出来た。その結果これまで米国ウイスコンシン大の大腸菌ゲノムグループの公表している40%の領域と合わせ、全ゲノムの塩基配列が決ったことになる。この成果はチーム内の各グループの献身的な協力に負うところが大きい。それに加えて日進月歩の新しい技術と装置もそれを後押しした結果である。今後この成果をもとに、大腸菌の研究が新しい展開を見せるであろうし、他生物のゲノム解析に大きな寄与をするに違いないであろう。

## 主な発表論文

1. Hidaka, M., Kobayashi, T., Iahimi, Y., Seki, M., Enomoto, T., Abdel-monem, M. and Horiuchi, T. (1992) Termination complex in *E. coli* inhibits SV40 DNA replication *in vitro* by impeding the action of T antigen helicase. *J. Biol. Chem.* 267, 5361-5365.
2. Horiuchi, T., Fujimura, Y., Nishitani, T., Kobayashi, T. and Hidaka, M., (1994) The DNA replication fork blocked at the Ter site may be an entrance for the RecBCD enzyme into duplex DNA. *J. Bacteriol.* 176, 4656-4663.
3. Horiuchi, T. and Fujimura, Y. (1995) Recombinational rescue of the stalled DNA replication fork; a model based on analysis of an *E. coli* strain with a chromosomal region difficult to replicate. *J. Bacteriol.* 177, 783-791.
4. Kobayashi, T. and Horiuchi, T. (1996) A yeast gene product, FobI protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes to Cells* 1, 465-474.
5. Oshima, T., Aiba, H., et al. (1996) A 718-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 12.7-28.0 min region on the linkage map. *DNA Research* 3, 1-19.

6. Kamada, K., Horiuchi, T., Ohsumi, K., Shimamoto, N. and Morikawa, K. (1996) Structure of a replication-terminator protein complexed with DNA. *Nature* 383, 598-603.

