

報告番号 乙第 4299号

# 主論文の要旨

題名 DNA立体構造の柔軟性とその生理的意義

氏名 加藤幹男

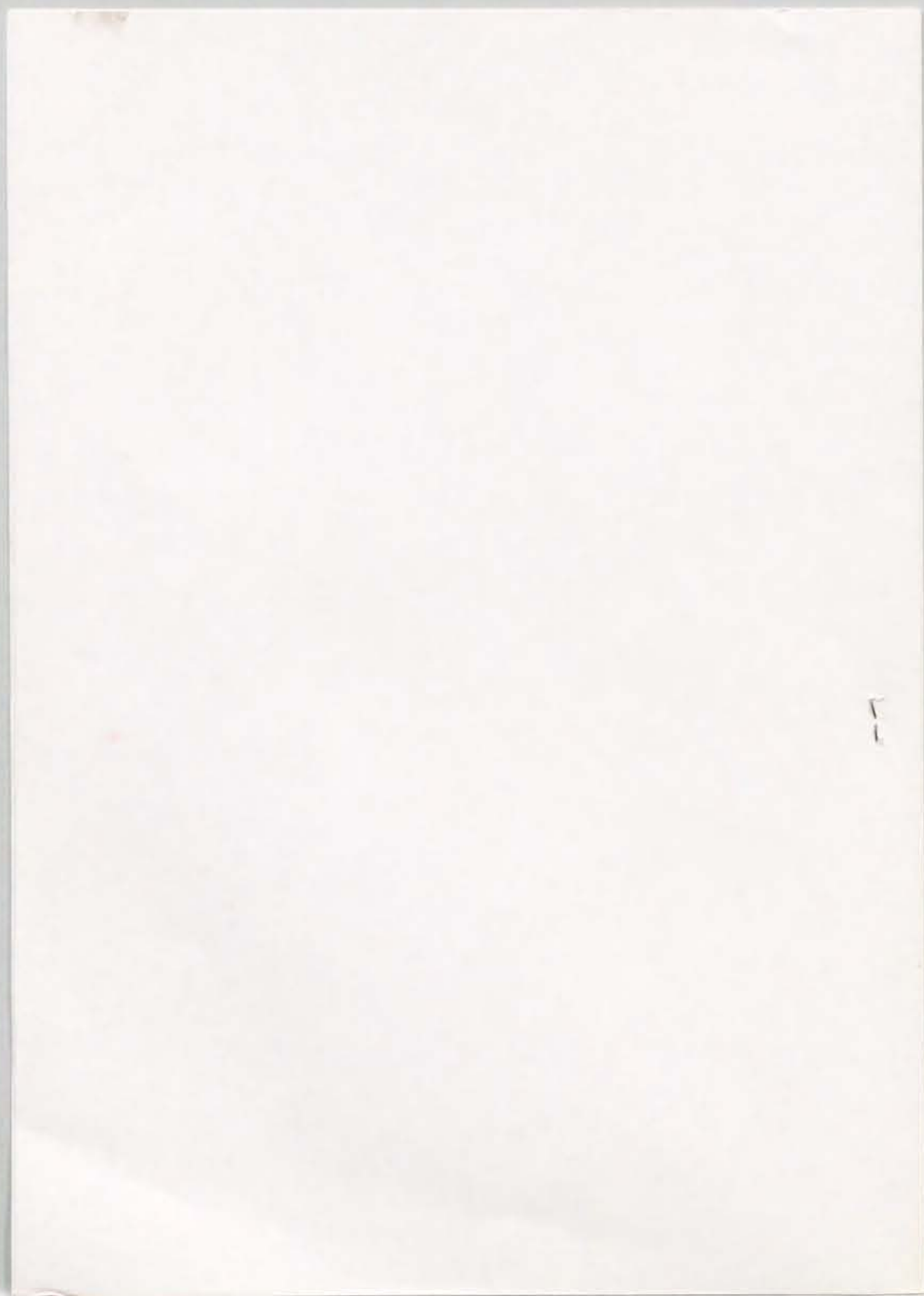


## 主論文の要旨

報告番号	※乙第	号	氏名	加藤幹男
<p>ヒト上皮増殖因子 (EGF) 受容体遺伝子の転写開始領域上流には、一方の鎖にピリミジン、もう一方にプリンヌクレオチドが偏った配列 (P y r · P u r 配列) が存在する。この領域は、負の超らせん化により、一本鎖特異的核酸分解酵素S1ヌクレアーゼによって特異的切断を受ける特殊な高次構造を形成する。この高次構造の詳細を知るために、塩基特異的修飾試薬とS1ヌクレアーゼを用いて、このP y r · P u r 配列を含む超らせん化プラスミドp7ERSにおけるそれらの反応部位を塩基配列レベルで解析した。</p> <p>酸性条件で、ジエチルピロカーボネートによって修飾されるアデニン塩基の領域が P y r · P u r 配列の3'側半分に存在し、その修飾効率が中性条件において顕著に減少することから、この領域に形成される特殊高次構造は分子内三本鎖構造 (H-DNA構造) であると予想された。超らせんプラスミドDNAのS1ヌクレアーゼ感受性は、ジメチル硫酸処理によって消失した。ジメチル硫酸は、グアニン塩基の7位の窒素をメチル化するが、そのメチル化によって三本鎖構造の形成に必要な Hoogsteen 対合が不可能になる。この結果は、先の予想を裏付けるものである。また、S1ヌクレアーゼによるニッキングはP y r · P u r 配列の間に起こった。このことは、繰り返し配列による slippage 構造ではなく、鏡対称配列によるH-DNA構造を支持する。</p> <p>このような特殊高次構造の形成は、周辺領域の超らせん度の減少をもたらすことが、試験管内実験によって知られている。この「超らせん度調節能」</p>				

が、実際の生体内環境で機能するかを知るため、Pyr・Pur配列の存在が、大腸菌細胞内で $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現に与える効果を解析した。Pyr・Pur配列をもつプラスミドp7ERSとその欠損変異体pSR51、および対照としてベクターのpUC19を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、そのプラスミド上にコードされた $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現を、PADAC (pyridinium-2-azo-p-dimethylaniline chromophore) の分解活性を調べることにより比較した。その結果、p7ERS保持菌は対照に比べ約2倍、pSR51保持菌は約1.4倍の $\beta$ -ラクタマーゼ活性を示した。 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現効率は鋳型DNAのトポロジーに影響されることが知られており、Pyr・Pur配列の存在がおそらくはその高次構造転移を通して、大腸菌細胞内で $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現に好ましい超らせん度を維持するのに役立つものと思われる。すなわち、このPyr・Pur配列は、生理的環境において高次構造転移を起こし、超らせん度の変動に対して緩衝装置として機能し得ることが示唆された。

Pyr・Pur配列は、真核生物のゲノム中には高頻度で存在し、その生理意義については諸説あるが、超らせん度の調節を通しての遺伝子発現や染色体構築の制御は、重要な役割のひとつであろう。



DNA立体構造の柔軟性とその生理的意義

加藤幹男



## 目次

主論文	1
緒言	2
材料と方法	5
結果	9
考察	15
要旨	18
謝辞	20
引用文献	21
図表	24
副論文・参考論文	巻末

---

### 略号表

DEPC : diethylpyrocarbonate

DMS : ジメチル硫酸

PADAC : pyridinium-2-azo-*p*-dimethylaniline chromophore

Py r · P u r 配列 : pyrimidine/purine biased sequence, 一方の鎖にピリミジン、もう一方の鎖にプリンが偏って存在する配列





## 1. 緒言

遺伝情報の保持・伝達において中心的役割を担っているDNAは、いわゆるWatson-Crickの相補対合による二次構造を形成するのみではなく、その立体構造を多様に变化させ得ることが近年明らかになってきた。そして、DNA立体構造の動的変換（特殊高次構造の形成）は遺伝子発現の調節要因のひとつと考えられるようになった。それら特殊高次構造は、一本鎖特異的核酸分解酵素（S1ヌクレアーゼ等）や、塩基特異的化学修飾試薬に対する異常な反応性、あるいは電気泳動における異常な移動度からその存在が認められている。そしてその特殊高次構造の形成は、酸性条件下や負の超らせん度の増大により誘起される。

様々な遺伝子において、その調節領域と思われる近傍にS1ヌクレアーゼ感受性部位が報告され高次構造の変化が予想されているが（Wells, 1988の総説参照）、その存在がどのような生理的意義を持つのか、詳細は未だ明らかではない。特殊高次構造を形成する配列の多くは、ポリヌクレオチド鎖の一方にピリミジンが、そしてもう一方にプリンが偏って存在している。このような配列が、酸性条件や負の超らせん化によって形成する特殊高次構造については、合成DNA配列を用いた実験結果から少なくとも三種類の構造モデルが提案されている。Evans & Efstratiadis (1986) は、糖ーリン酸主鎖の立体配置が両鎖間で異なると考えた。Mirkinら (1987) は鏡対称配列を持つホモプリン・ホモピリミジン鎖は超らせん環境下で分子内三本鎖構造を取り得ることを示した。この構造は、鏡対称な配列の後半がほどけて、ピリミジン鎖が前半の二重らせんとともにHoogsteen塩基対

合を介して三本鎖となるものである(図1)。Pulleyblankら(1985)は、 $(dG-dA)_n \cdot (dT-dC)_n$ 配列を含む環状DNAをジメチル硫酸(DMS: dimethyl sulphate)により限定処理した場合、高次構造転移が起きている条件ではグアニンの7位のNが修飾されないことから、その特殊高次構造はHoogsteen対合のG·C<sup>+</sup>対とWatson-Crick型のA·T対が交互に配置されていると考えた。これらホモプリン・ホモピリミジン鎖が形成する特殊高次構造の他にも、逆位繰り返し配列が形成する十字型構造(cruciform)、順方向繰り返し配列において繰り返し単位的位置がずれた構造(DNA slippage)などの非B-DNA構造の存在が示唆されている(Wells, 1988)。

ヒト上皮増殖因子(EGF)受容体遺伝子の転写調節領域には、一方の鎖がピリミジン、もう一方の鎖がプリンに偏った配列(pyrimidine·purine biased sequence: 以下Pyr·Pur配列と表記)が存在し、その配列は負の超らせんの環境下でS1ヌクレアーゼによって切断を受ける構造を形成する(Johnson et al., 1988a)。その領域には、順方向繰り返し配列とも鏡対称とも見なせるPyr·Pur配列が存在している(図2)。順方向繰り返し配列のS1ヌクレアーゼ感受性は、slippageモデルによって説明され(McKeon et al., 1984)、鏡対称配列におけるS1ヌクレアーゼ感受性は先に述べた分子内三本鎖構造(H-DNA構造)をとることによって説明される。本研究において、超らせん化DNAを化学修飾試薬およびS1ヌクレアーゼで処理してその作用部位を塩基配列レベルで解析することにより、このEGF受容体遺伝子の転写調節領域が超らせん環境下で形成するS1ヌクレアーゼ感受性構造を明らかにした。次に、このようなDNA立体構造の柔軟性がどのような生理的意義を持つかについて、この三本鎖形成



## 2. 材料と方法

### (1) DNA、酵素および試薬

プラスミドpERCAT1 (Johnson et al., 1988b) は、Ira Pastan 博士

(National Cancer Institute) より提供された。このプラスミドのEGF受容体遺伝子転写調節領域を含む1.1 kbp *Hind*III断片から制限酵素*Sac*IIによって切り出した0.25 kbp断片をT4 DNAポリメラーゼ処理によって平滑末端化した後に、pUC19の*Sma*I部位にサブクローン化した。こうして得た組換えプラスミドをp7ERSと名付けた。超らせん化DNAは、大腸菌

JM105株の形質転換体から臭化エチジウム/塩化セシウム平衡密度勾配遠心分離法によって得た。プライマー伸長解析には東洋紡のM13/pUCシーケンシングプライマーを用いた。放射性ヌクレオチドはAmershamから購入した。Klenow断片とT4 DNAポリメラーゼは東洋紡から、S1ヌクレアーゼはPharmaciaから入手した。ジエチルピロカーボネート

(DEPC: diethyl pyrocarbonate)、ジメチル硫酸(DMS: dimethyl sulfate)はそれぞれAldrich、和光純薬のものを用いた。プラスミドpSR51は、p7ERSをS1ヌクレアーゼによって切断し、さらにエキソヌクレアーゼIII(東洋紡)を用いて末端を処理後自己閉環することによって得た。

pSR51の欠失部位については図8に示す。

### (2) S1ヌクレアーゼ処理

超らせん化DNAのS1ヌクレアーゼ処理は、以下に示す反応系で行った。

反応液320  $\mu$ lに対し、プラスミドDNA16  $\mu$ g、S1ヌクレアーゼ100 unitsを用いた。反応液の組成は30 mM 酢酸ナトリウム(pH4.6) /

220 mM 塩化ナトリウム / 1 mM 硫酸亜鉛とし、37°Cで5分間反応を行った。反応は、0.5 M EDTAを2  $\mu$  l 添加することによって停止させた。

### (3) DNAの化学修飾

超らせん化DNAのDEPCによる修飾は、優先修飾部位のpH依存性を比較するため、二種類の緩衝液を用いて行った。酸性緩衝液は、60 mM 酢酸ナトリウム / 50 mM 塩化ナトリウム / 1 mM EDTA (pH 4.5) を用い、中性緩衝液には50 mM カコジル酸ナトリウム / 50 mM 塩化ナトリウム / 1 mM EDTA (pH 7.0) を用いた。反応は200  $\mu$  l 中にDNAを3  $\mu$  g 含み、3  $\mu$  l のDEPCを加え23°Cで10分間行った。反応終了後、エタノールを添加してDNAを沈澱し回収した。DMSによる修飾は、100 mM カコジル酸ナトリウム / 100 mM 酢酸ナトリウム / 5 mM EDTA (pH 7.3) からなる200  $\mu$  l の反応系に12  $\mu$  g のDNAを用いた。反応はDMSの20%エタノール溶液 (v/v) を5  $\mu$  l 加え、25°Cで60分間行った。その後、6  $\mu$  l のメルカプトエタノール、50  $\mu$  l の3 M 酢酸ナトリウムおよび750  $\mu$  l の冷エタノールを加えることによって反応を停止した。

### (4) プライマー伸長法によるDEPCおよびS1ヌクレアーゼ標的部位の解析

プライマーは東洋紡のシーケンシングプライマー (順方向および逆方向) を用いた。プライマー-DNAの5' 末端を<sup>32</sup>Pで標識し、アルカリ変性を施したDEPCあるいはS1ヌクレアーゼ処理済DNAに相補対合させ、基質のdNTP存在下でKlenow断片により相補鎖合成を行わせた。反応産物

は8%塩基配列解析用ポリアクリルアミドゲルで分離した。

#### (5) 供試菌株、抗生物質

$\beta$ -ラクタマーゼ活性測定のための大腸菌JM109株は、日比野 威博士(大阪府立大学農学部)から供与いただいた。 $\beta$ -ラクタマーゼの基質であるPADAC(pyridinium-2-azo-p-dimethylaniline chromophore)はヘキスト社から購入した。組み換えプラスミドp7ERS、pSR51と対照としてベクターのpUC19を用いて大腸菌の形質転換を行った。

#### (6) $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定

大腸菌形質転換体の産する $\beta$ -ラクタマーゼの活性の測定は、紫色(吸収波長571nm)のPADACが加水分解によって黄色になることを利用した(Kuriki, 1987)。日立U-3210型分光光度計のガラスセル内で、1.4mlの50mMリン酸ナトリウム緩衝液/5 $\mu$ M PADACに、後述のように調製した粗酵素抽出液(蛋白質2 $\mu$ gを含む)を加え、室温で反応を行い、波長571nmの吸光度の減少を記録した。

#### (7) 粗酵素抽出液の調製

大腸菌形質転換体の新鮮な終夜培養液30 $\mu$ lを1.5mlのLB培地(1%ホリプトン/0.5%イーストエキス/0.5% NaCl)に植菌し、37 $^{\circ}$ Cで5時間振盪培養を行った。その後、遠心により集菌し、菌体を氷冷した50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)で二回洗浄し、400 $\mu$ lの40mMリン酸ナトリウム/20%グリセロールに懸濁した。懸濁液を海上電機4280型ソニケータを用いて処理し、細胞壁の破壊を行った。引き続き、トミーMC-15A型卓上遠心分離器を用い4 $^{\circ}$ Cで10分間、15000rpmで遠心し、その上清を粗酵素抽出液とした。蛋白質含量は、ウシ血清アル

ブミンを標準蛋白質として用い、Bio-Rad社のプロテインアッセイキットを用いて定量した。この操作によって、蛋白質含量 350~400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の粗酵素抽出液が得られた。

#### (8) 形質転換体の保持するプラスミドDNAコピー数の比較

上述のように培養した菌体を 0.1  $\text{mg}/\text{ml}$  リゾチームを含む 400  $\mu\text{l}$  の緩衝液 (50  $\text{mM}$  Tris-塩酸 / 150  $\text{mM}$  NaCl / 10  $\text{mM}$  EDTA, pH 7.6) に懸濁し、37°Cで1時間保温後、プロテイナーゼ K と SDS をそれぞれ終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1% となるように加え、50°Cでさらに12時間保温した。その後、フェノール抽出とエタノール沈殿によってDNAを回収した。制限酵素処理をしたDNAを 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の臭化エチジウムを含むアガロースゲル電気泳動によって分別し、紫外線照射下においてポラロイド写真を撮影するとともに、ゲル中のDNAバンドが与える蛍光強度を蛍光イメージアナライザー FMBIO-100 (宝酒造/日立) によって比較した。

### 3. 結果

#### 1. ヒト上皮増殖因子受容体遺伝子の転写調節領域に存在するピリミジン・プリンに偏った配列の形成する高次構造

##### (1) S1ヌクレアーゼ感受性領域の同定

ヒトEGF受容体遺伝子のPyr・Pur領域をふくむ1.1 kbp断片を持つプラスミドpERCAT1 (Johnson et al., 1988b) を用いてS1ヌクレアーゼ感受性領域の確認を行った。大腸菌形質転換体から抽出した超らせんプラスミドDNAをS1ヌクレアーゼによって処理し、引き続いて制限酵素処理を行い感受性部位を同定した(図3)。その結果、S1ヌクレアーゼ感受性部位はSacII切断部位にはさまれた約0.25 kbpの領域内に存在した。ここでは示さないが、このS1ヌクレアーゼ感受性は弛緩したDNA(直鎖状DNA)では見られなかった。この感受性部位を詳しく解析するため、0.25 kbpのSacII断片の末端を平滑化した後、pUC19のSmaI部位へサブクローン化した。このp7ERSと名付けられた組換えプラスミドを大腸菌JM105株内で増幅し、菌体から超らせんDNAを抽出した。こうして得たDNAはpERCAT1で見られたようにS1ヌクレアーゼに対して感受性を示した。このp7ERSを用いて後のプライマー伸長実験を行った。

##### (2) S1ヌクレアーゼおよび化学修飾剤標的部位の位置付け

S1ヌクレアーゼ処理されたDNAを鋳型としてプライマー伸長実験を行い、S1ヌクレアーゼによって切断される部位を塩基配列レベルで解析し



た。すなわち、DNAポリメラーゼが run-off 停止する位置をS1ヌクレアーゼによる切断部位として同定した。同様に、主にプリン塩基の7位のNを攻撃するジエチルピロカーボネート (DEPC: diethylpyrocarbonate) で p7ERSを処理し、その反応部位をプライマー伸長法により解析した。

DEPCはスタックしていないアデニン塩基を優先的に攻撃し、その部位での塩基対形成を不能にしてポリメラーゼ反応の停止をもたらす

(Ehressmann et al., 1987)。プライマー伸長法の概要は図4に示す。核酸の立体構造に影響を与える因子として、pHは最も重要な因子のひとつである。そこで、中性 (pH 7) および弱酸性 (pH 4.5) の条件下においてDEPC修飾を行い、その反応性を比較した (図5)。その結果、S1ヌクレアーゼによるDNA鎖へのニッキング効率は、ピリミジン、プリン両相補鎖間で違いが見られ、そして複数の部位がS1ヌクレアーゼによって切断されていることが確認された。また、DEPCによる修飾のパターンは、反応系のpHによって明確に異なった。すなわち、-348から-343領域にかけてのプリン塩基は酸性条件下においてのみ修飾を受けた。図6に反応部位と塩基配列との対応を示す。これらの結果から、ヒトEGF受容体遺伝子のPy r · Pu r 配列が酸性条件下で形成する立体構造はH-DNA構造であると推定された。この構造モデルをより確かにするため、以下に示すジメチル硫酸 (DMS: dimethyl sulphate) による修飾実験を行った。

### (3) DMS処理DNAにおけるS1ヌクレアーゼ感受性の消失

DMSは、主にグアニン塩基の7位をメチル化する (Lawley & Brookes, 1963)。この7位のNはHoogsteen対合を形成するのに必須であり、メチル化により対合形成は不可能になる (図1)。そこで、S1ヌクレアーゼ処理

に先立ち、DNAを中性条件下でDMSで処理してそのS1ヌクレアーゼに対する感受性を調べた。その結果、DMS処理はS1ヌクレアーゼ感受性構造の形成を阻害することがわかった(図7)。先のDEPC修飾実験の結果から、中性条件ではDNAは通常の二重らせん構造を取っていると考えられるため、グアニンの7位のNがDMSによってメチル化され易い状態にあり、その結果 Hoogsteen対合を介した特殊高次構造の形成が妨げられたと思われる。さらに、高次構造転移が起きている酸性条件でDMS処理を行った場合にも、S1ヌクレアーゼ感受性構造の形成は妨げられた(データは示さず)。この事実は、S1ヌクレアーゼ感受性構造は溶液中で恒常的に形成されているわけではなく、特殊高次構造とB-DNA構造の二つの状態間で高次構造転移が動的に行われていることを示している。もし特殊高次構造が酸性溶液中で安定に形成されていれば、酸性条件下でのDMS処理はS1ヌクレアーゼ感受性に影響しないはずである。

#### (4) P y r · P u r 配列の形成する二次構造モデル

DMSによるメチル化によりS1ヌクレアーゼ感受性構造の形成が阻害されるという結果は、この構造が Hoogsteen 対合を介して起こることを示唆した。HoogsteenのC<sup>+</sup>·G対合は酸性時により効率的に形成される(Voloshin et al.,1988)。これらの事実と、DEPCによる修飾がpHに依存して鏡対称の後半部(3'側)のアデニン塩基に起こることと合わせて、S1ヌクレアーゼ感受性構造は図6に示すようなH-DNA構造であると考えられる。S1ヌクレアーゼによるニッキングがP y r · P u r 配列の間で起こるという結果もこのモデルを支持する。DNA slippage 構造ならば、P y r · P u r 配列中に切断が起こりやすいと思われる。

## 2. *Py r · P u r* 配列の存在が大腸菌の $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子発現に及ぼす効果

H-DNA等の特殊高次構造の形成は負の超らせん化によってより容易となる (Wells, 1988)。また、それら特殊高次構造の形成により、周辺領域の負の超らせん度は減少することが示されている (Pulleyblank et al., 1985; Htun & Dahlberg, 1989)。このような「DNAトポロジーの柔軟性」をもたらす *Py r · P u r* 配列の存在が、実際の生体内環境で遺伝子発現にどのような効果を与えるかについて、大腸菌の $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現を指標に検討した。 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の転写効率は、試験管内実験で鋳型DNAの超らせん度によって影響されることが Brahm s et al., (1985) によって報告されている。通常、大腸菌細胞内のDNA超らせん度は-0.050程度とされている (今本, 1985) が、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子は超らせん度が-0.025の鋳型を用いた時に最も効率的に転写される。また、我々は、大腸菌トポイソメラーゼ変異株とプラスミドpUC19を用いた実験で、野生株より緩んだプラスミドを保持する変異株は、野生株に比べより高い $\beta$ -ラクタマーゼ活性を発現することを明らかにした (加藤・古野, 1992)。そこで、H-DNA形成領域を持つプラスミドp7ERSおよびその欠失変異体pSR51 (図8参照) にコードされた $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現と、ベクターのpUC19からの $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現を大腸菌形質転換体を用いて比較し、H-DNA形成領域の存在が $\beta$ -ラクタマーゼの発現に及ぼす効果を調べた。

保持するプラスミドDNAの違いによる、大腸菌形質転換体の $\beta$ -ラクタ

マーゼ発現の差異については、PADACを含む寒天培地上の大腸菌コロニー周辺の黄変部の大きさから、p7ERS保持菌がより高い分泌 $\beta$ -ラクタマーゼ活性を示すことを予備的に報告している(Kato et al., 1991)。すなわち、PADACを含む寒天培地に菌懸濁液を等量滴下し、37°Cに保温後形成されたコロニー周辺の黄変部の直径を比較したところ、p7ERS保持菌はおよそ20%大きな黄変領域を形成した(図9)。今回、より定量的な比較を行うために、菌体内 $\beta$ -ラクタマーゼ活性を水溶液中の基質に対して測定した。1.4 mlの反応系に2  $\mu$ gの蛋白質を含む粗酵素抽出液を加え、室温で反応を行った場合のタイムコースを図10に示す。p7ERS保持菌は、対照のpUC19保持菌に比べ約二倍のPADAC分解効率を示した。それぞれの形質転換体の産する $\beta$ -ラクタマーゼの比活性は表Iにまとめた。独立に培養した細胞を用いた二回の実験とも、同様の結果を得た。主要H-DNA領域を欠いたプラスミドpSR51を保持する菌は、p7ERS保持菌の70%の発現効率にとどまったが、なおpUC19保持菌よりは高い活性を有した。pSR51プラスミドは、p7ERSプラスミドに比べて低いものの、S1ヌクレアーゼ感受性を有する(図11)。これは、欠失により二つのCCTCC配列(-403から-399、-283から-279)が近接し、低効率ながらもH-DNA形成が起こることによると思われる。このことは、H-DNA形成効率と $\beta$ -ラクタマーゼ発現効率との関係を示唆する。大腸菌形質転換体でのプラスミドにコードされた遺伝子の発現効率は、プラスミドのコピー数にも影響されるが、各形質転換体におけるプラスミドDNA含量は、p7ERS、pUC19ともに同程度であった(図12)。mRNAの翻訳効率や、菌体内での蛋白質安定性は均等であると考えられるので、 $\beta$ -ラクタマーゼ発現効率の差は、



## 4. 考察

DNAの特殊高次構造形成の生体内における生理的意義については、未だ確定的回答は得られていない。特殊高次構造形成領域の遺伝子発現における重要性については様々な報告がある。EGF受容体遺伝子の発現に必要なDNA領域については各種欠損変異体を用いた実験により調べられている。この遺伝子のH-DNA形成領域は *in vivo*、*in vitro* ともに、転写活性に重要でない (Johnson et al., 1988b; Kageyama et al., 1988a) と報告されているのに対し、同じ研究グループから、この領域の存在が発現効率を3~5倍高めるとの報告もなされている (Johnson et al., 1988a)。この領域がヒト上皮増殖因子受容体遺伝子の発現にあたる効果については、異なった系での実験によって異なった解釈が提示されている。

特殊高次構造それ自体は、生体内で実際にその存在が観察されている。ヒトU1 RNA、U2 RNA遺伝子は、(GA·TC) 繰り返し配列からなるS1ヌクレアーゼ感受性部位を持つが、クロマチン中においてもその領域はS1ヌクレアーゼに感受性を示す (Htun et al., 1984; 1985)。ニワトリβ-グロビン遺伝子の転写制御領域のポリ (G·C) 周辺は、β-グロビンを発現している細胞内では一本鎖特異的の化学修飾試薬に反応する特殊な高次構造を形成し、発現しない細胞ではその反応性が無くなる (Kohwi-Shigematsu, 1983)。これらの報告は、活発に転写が起こっている遺伝子近傍には特殊な高次構造が形成されることを思わせる。これまでに、特殊高次構造を認識する制御蛋白質因子は発見されていないが、特殊高次構造の形成は遺伝子発現調節において何らかの働きをしていることが想像される。

Weintraub (1983) は、S1ヌクレアーゼ感受性構造を形成し得るDNA領域はヌクレオゾームとの親和性が低いことを発見した。また、S1ヌクレアーゼによる特異的切断には、DNA分子が十分に負の超らせん化されていることが必要である。DNAの超らせん化は転写反応の過程で起こることが知られている (Futcher, 1988; Tsao et al., 1989)。これらの事実から、特殊高次構造の機能モデルを提案する (図13)。クロマチン構造において、ヌクレオゾーム一分子の解離は二巻の負の超らせんを与える。この、負の超らせん化により特定の領域で特殊高次構造の形成が起こり、その高次構造転移によって負の超らせんの緩和が行われる。負に超らせん化したDNAはヌクレオゾームの再構成が起こりやすいが、高次構造転移によって超らせんの緩和されたDNAはヌクレオゾームとの親和性が低い。DNAの高次構造転移は、ヌクレオゾームの解離・再構成よりもずっと速いと予想されるので、特殊高次構造形成領域近傍は結果としてヌクレオゾームフリーの状態に保たれ易いと考えられる。そのような場合、様々な発現調節因子によってDNA塩基配列が認識されるのに都合が良いと思われる。本研究において解析したヒト上皮増殖因子受容体遺伝子のH-DNA形成領域は、同遺伝子特異的転写因子E T Fの認識部位 (Kageyama et al., 1988b) から約110塩基対上流の位置にあり、更に、周辺には転写活性化因子Sp1の認識部位が存在する。また、この遺伝子を活発に発現しているA431細胞株では、転写制御領域付近がDNase Iに感受性であり、クロマチンの折り畳みから開放された状態となっていることが知られている (Ishii et al., 1985)。

特殊高次構造形成による超らせん緩衝効果は、ヌクレオゾームとの親和性の制御だけでなく、超らせん度の調節を通して直接に遺伝子発現を制御

するという可能性も考えられる。DNAの超らせん度は様々な遺伝子の制御要因となっている (Hirose & Ohta, 1990)。転写反応の進行は鋳型DNAに負の超らせんを導入するが、転写に至適な超らせん度の維持のために高次構造転移に伴う負の超らせんの緩和が役に立つかもしれない。RNAポリメラーゼの進行した後ろ側に蓄積した負の超らせんにより、特定の領域で高次構造転移が起こり、素早くその超らせんの緊張を緩和する。それによってプロモーター領域の超らせん度が至適な値近くに保たれて、新たな転写開始が起こりやすくなると考えられる。但し、この緩和は一時的であり、本質的な超らせん度の調節は各種のトポイソメラーゼ群によって行われるのであろう。

本研究により、ヒト上皮増殖因子受容体遺伝子の転写開始領域上流に存在する、一方の鎖にピリミジン、もう一方にプリンヌクレオチドが偏った配列は、負の超らせん環境下で分子内三本鎖構造を形成することを明らかにした。そして、細胞内でこの高次構造転移が起こり、超らせん度の緩衝作用を発揮することを示唆する結果を得た。特殊高次構造を形成し得るDNA領域 (P y r · P u r 配列) は真核生物のゲノム中に高頻度に存在することが知られている (Birnboim, 1978)。しかし、特殊高次構造形成の生理的意義については、「高次構造そのものが制御蛋白質の標的部位となる」、「二本鎖が開裂することにより転写開始に関与する」、「特殊高次構造の形成により塩基配列特異的認識蛋白質の結合を阻害する」などの解釈があるがどれも決定的な証拠はない。超らせん度の調節を通しての遺伝子発現や染色体構築の制御は、特殊高次構造形成領域の重要な役割のひとつとして認識されるべきである。



## 5. 要旨

ヒト上皮増殖因子 (EGF) 受容体遺伝子の転写開始領域上流には、一方の鎖にピリミジン、もう一方にプリンヌクレオチドが偏った配列

(P y r · P u r 配列) が存在する。この領域は、負の超らせん化により、一本鎖特異的核酸分解酵素S1ヌクレアーゼによって特異的切断を受ける特殊な高次構造を形成する。この高次構造の詳細を知るために、塩基特異的化学修飾試薬とS1ヌクレアーゼを用いて、このP y r · P u r 配列を含む超らせん化プラスミド p7ERS におけるそれらの反応部位を塩基配列レベルで解析した。

酸性条件で、ジエチルピロカーボネートによって修飾されるアデニン塩基の領域が P y r · P u r 配列の3'側半分に存在し、その修飾効率が中性条件において顕著に減少することから、この領域に形成される特殊高次構造は分子内三本鎖構造 (H-DNA構造) であると予想された。超らせんプラスミドDNAのS1ヌクレアーゼ感受性は、ジメチル硫酸処理によって消失した。ジメチル硫酸は、グアニン塩基の7位の窒素をメチル化するが、そのメチル化によって三本鎖構造の形成に必要な Hoogsteen 対合が不可能になる。この結果は、先の予想を裏付けるものである。また、S1ヌクレアーゼによるニッキングはP y r · P u r 配列の間に起こった。このことは、繰り返し配列による slippage 構造ではなく、鏡対称配列によるH-DNA構造を支持する。

このような特殊高次構造の形成は、周辺領域の超らせん度の減少をもたらすことが、試験管内実験によって知られている。この「超らせん度調節

能」が、実際の生体内環境で機能するかを知るため、P y r・P u r 配列の存在が、大腸菌細胞内で $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現に与える効果を解析した。P y r・P u r 配列をもつプラスミドp7ERSとその欠損変異体pSR51、および対照としてベクターのpUC19を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、そのプラスミド上にコードされた $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現を、PADAC (pyridinium-2-azo-p-dimethylaniline chromophore) の分解活性を調べることにより比較した。その結果、p7ERS保持菌は対照に比べ約2倍、pSR51保持菌は約1.4倍の $\beta$ -ラクタマーゼ活性を示した。 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現効率は鋳型DNAのトポロジーに影響されることが知られており、P y r・P u r 配列の存在がおそらくはその高次構造転移を通して、大腸菌細胞内で $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現に好ましい超らせん度を維持するのに役立つものと思われる。すなわち、このP y r・P u r 配列は、生理的環境において高次構造転移を起こし、超らせん度の変動に対して緩衝装置として機能し得ることが示唆された。

P y r・P u r 配列は、真核生物のゲノム中には高頻度で存在し、その生理意義については諸説あるが、超らせん度の調節を通しての遺伝子発現や染色体構築の制御は、重要な役割のひとつであろう。

## 6. 謝辞

本研究の遂行に際しまして、終始御懇篤なる御指導をいただきました清水信義先生（慶応義塾大学）に深く感謝いたします。また、温かい激励と御協力を賜りました工藤 純博士、蓑島伸生博士、井口義夫博士（現帝京大学）をはじめとする慶応義塾大学医学部分子生物学教室の諸先生方に心より感謝いたします。また、西川一八博士（現東京工業大学）には、研究を始めるにあたって細やかな御指導をいただきました。大阪府立大学の卒業研究学生であった武田俊之君（現日製産業）、湯浅美穂子さん（現島根大学大学院学生）、古野亜弥さん（現静岡大学大学院学生）には実験に協力していただきました。記して感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださいました竹村彰祐先生（現名古屋大学名誉教授）、宮崎正澄先生、岡崎恒子先生（以上名古屋大学）、石神正浩先生（大阪府立大学）に感謝いたします。

## 7. 引用文献

- Birnboim, H.C. (1978) Spacing of polypyrimidine regions in mouse DNA as determined by poly(adenylate, guanylate) binding. *J.Mol.Biol.* 121, 541-559
- Brahms, J.G., Dargouge, O., Brahms, S., Ohara, Y. & Vagner, V. (1985) Activation and inhibition of transcription by supercoiling. *J.Mol.Biol.* 181, 455-465
- Ehressmann, C., Baudin, F., Mougel, M., Romby, P., Ebel, J.-P. & Ehressmann, B. (1987) Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.* 15, 9109-9128
- Evans, T. & Efstratiadis, A. (1986) Sequence-dependent S1 nuclease hypersensitivity of a heteronomous DNA duplex. *J.Biol.Chem.* 261, 14771-14780
- Futcher, B. (1988) Supercoiling and transcription, or *vice versa*? *Trends Genet.* 4, 271-272
- Hirose, S. & Ohta, T. (1990) DNA supercoiling and eukaryotic transcription -- Cause and effect. *Cell Struc.Func.* 15, 133-135
- Holms, D.S. & Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* 114, 193-197
- Htun, H., Lund, E. & Dahlberg, J.E. (1984) Human U1 RNA genes contain an unusually sensitive nuclease S1 cleavage site within the conserved 3' flanking region. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81, 7288-7292
- Ishii, S., Xu, Y.-H., Stratton, R.H., Roe, B.A., Merlino, G.T. & Pastan, I. (1985) Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82, 4920-4924

- Johnson, A.C., Jinno, Y., & Merlino, G.Y. (1988a) Modulation of epidermal growth factor receptor proto-oncogene transcription by promoter site sensitive to S1 nuclease. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4174-4184
- Johnson, A.C., Ishii, S., Jinno, Y., Pastan, I. & Merlino, G.T. (1988b) Epidermal growth factor receptor gene promoter. *J. Biol. Chem.* 263, 5693-5699
- Kageyama, R., Merlino, G.T. & Pastan, I. (1988a) Epidermal growth factor (EGF) receptor gene transcription. *J. Biol. Chem.* 263, 6329-6336
- Kageyama, R., Merlino, G.T. & Pastan, I. (1988b) A transcription factor active on the epidermal growth factor receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5016-5020
- Kohwi-Shigematsu, T., Gelin, R. & Weintraub, H. (1983) Detection of an altered DNA conformation at specific sites in chromatin and supercoiled DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4389-4393
- Kato, M., Furuno, A. & Shimizu, N. (1991) Characterization of S1 nuclease-sensitive structure of the pyrimidine/purine biased sequence in promoter region of the human EGF receptor gene. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 25, 35-36
- Kuriki, Y. (1987) Response to temperature shifts of expression of the *amp* gene on pBR322 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacter.* 169, 2294-2297
- Lawley, P.D. & Brookes, P. (1963) Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochem. J.* 89, 127-138
- McKeon, C., Schmidt, A. & Crombrugge, B. (1984) A sequence conserved in both the chicken and mouse  $\alpha 2(I)$  collagen promoter contains sites sensitive to S1 nuclease. *J. Biol. Chem.* 259, 6636-6640
- Mirkin, S.M., Lyamichev, V.I., Drushlyak, K.N., Dobrynin, V.N., Filippov, S.A. & Frank-Kamenetskii, M.D. (1987) DNA H-form requires a homopurine-homopyrimidine mirror repeat. *Nature* 330, 495-497
- Pulleyblank, D.E., Haniford, D.B. & Morgan, R. (1985) A structural basis for

S1 nuclease sensitivity of double-stranded DNA. *Cell* 42, 271-280

Tsao, Y.-P., Wu, H.-Y. & Liu, L.F. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: Direct biochemical evidence from in vitro studies. *Cell* 56, 111-118

Voloshin, O.N., Mirkin, S.M., Lyamichev, V.I., Belotserkovskii, B.P. & Frank-Kamenetskii, M.D. (1988) Chemical probing of homopurine-homopyrimidine mirror repeats in supercoiled DNA. *Nature* 333, 475-476

Weintraub, H. (1983) A dominant role for DNA secondary structure in forming hypersensitive structures in chromatin. *Cell* 32, 1191-1203

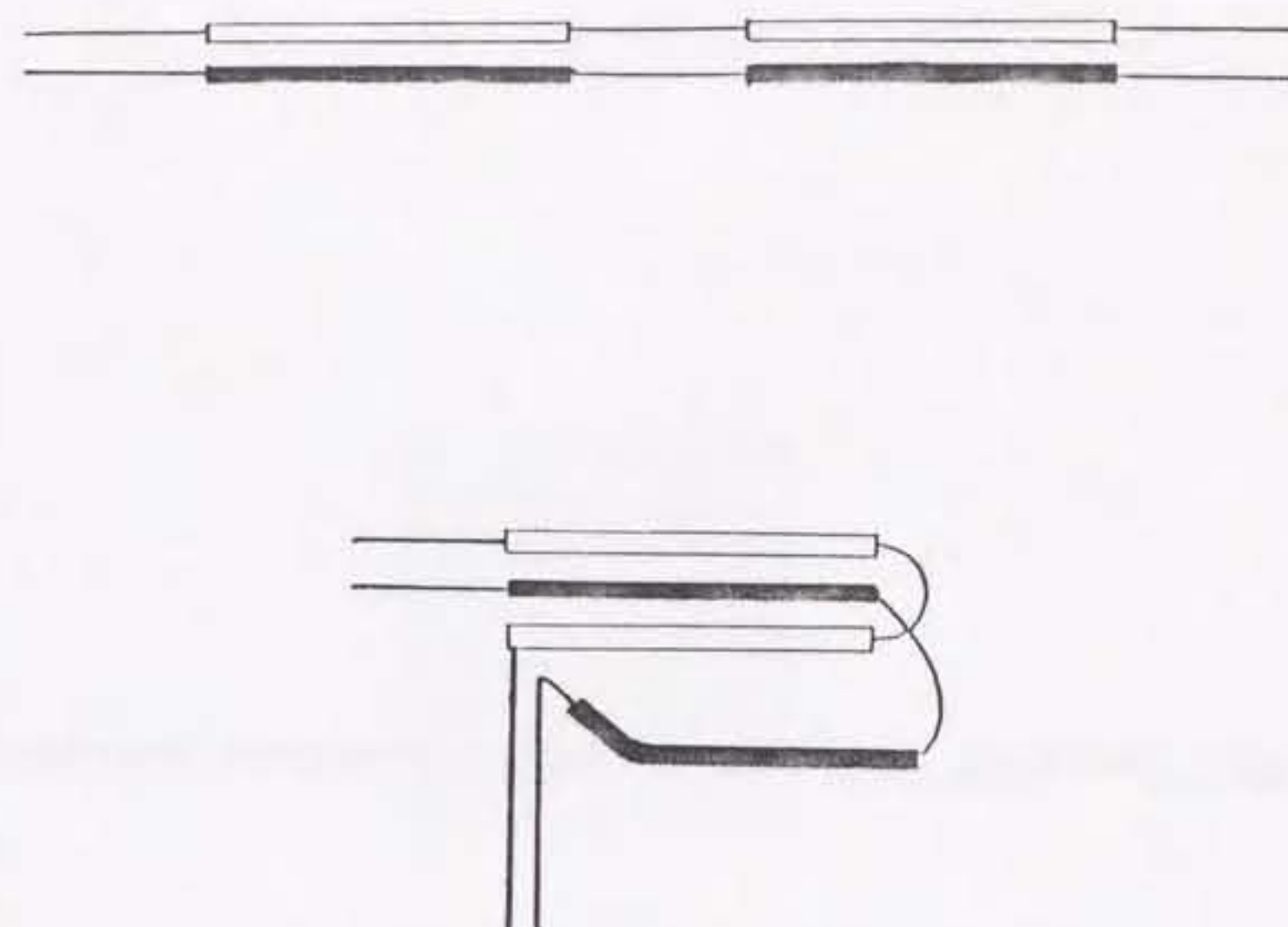
Wells, R.D. (1988) Unusual DNA structures. *J.Biol.Chem.* 263, 1095-1098

Zabarovsky, E.R. & Allikmets, R.L. (1986) An improved technique for the efficient construction of gene libraries by partial filling-in of cohesive ends. *Gene* 42, 119-123

今本文男 (1985) 「DNAの超らせん構造」 *化学総説* 46, 43-49

加藤幹男, 古野亜弥 (1992) 「大腸菌トポイソメラーゼ変異株における $\beta$ -ラクタマーゼの効率的発現」 *日本農芸化学会誌* 66, 137-141

A



B

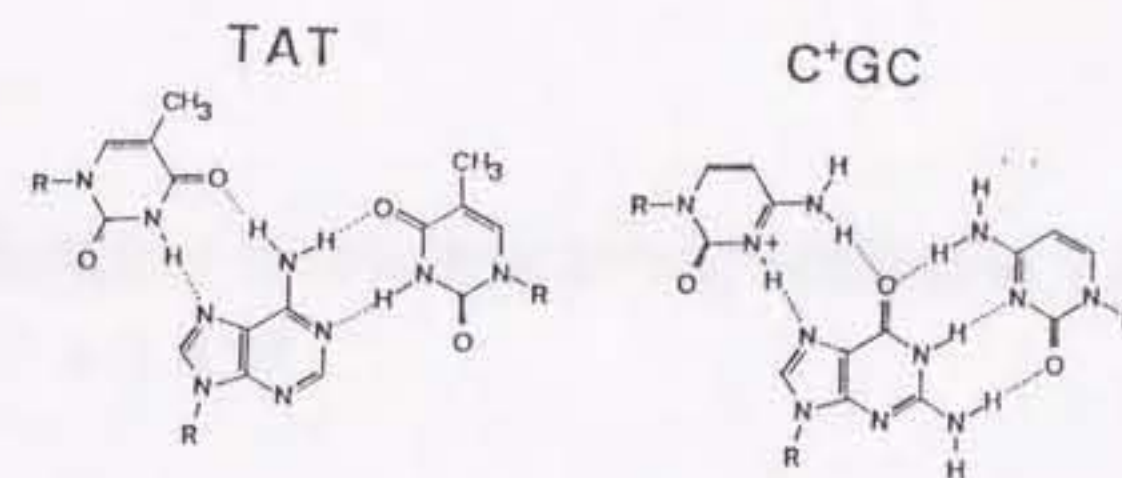


図1 鏡対称のPy r · Pur配列が形成する三本鎖構造

- A) 負の超らせん化により、後半部がほどけて折れ曲がり、Hoogsteen 対合を含む三本鎖構造を形成する。白ヌキ部分はピリミジン領域、黒太線部はプリン領域を示す。
- B) Watson-Crick 対合と、Hoogsteen 対合をふくむ三塩基対合

-380

CCCGCTGCTG GTTCTCCTCC CTCCTCCTCG CATTCTCCTC CTCCTCTGCT CCTCCGATC

-320

CCTCCTCCGC CGCCTGGTCC CTCCTCCTCC CGCCCTGCCT CCCGCGCCTC GGCCCGCGCG

図2 ヒト上皮増殖因子受容体遺伝子の転写開始領域上流に存在する  
P y r · P u r 配列

TCCの並び（下線部）が、順位繰り返しも鏡対称とも見なせるように存在している。ヌクレオチド番号は Johnson et al. (1988b) にしたがった。



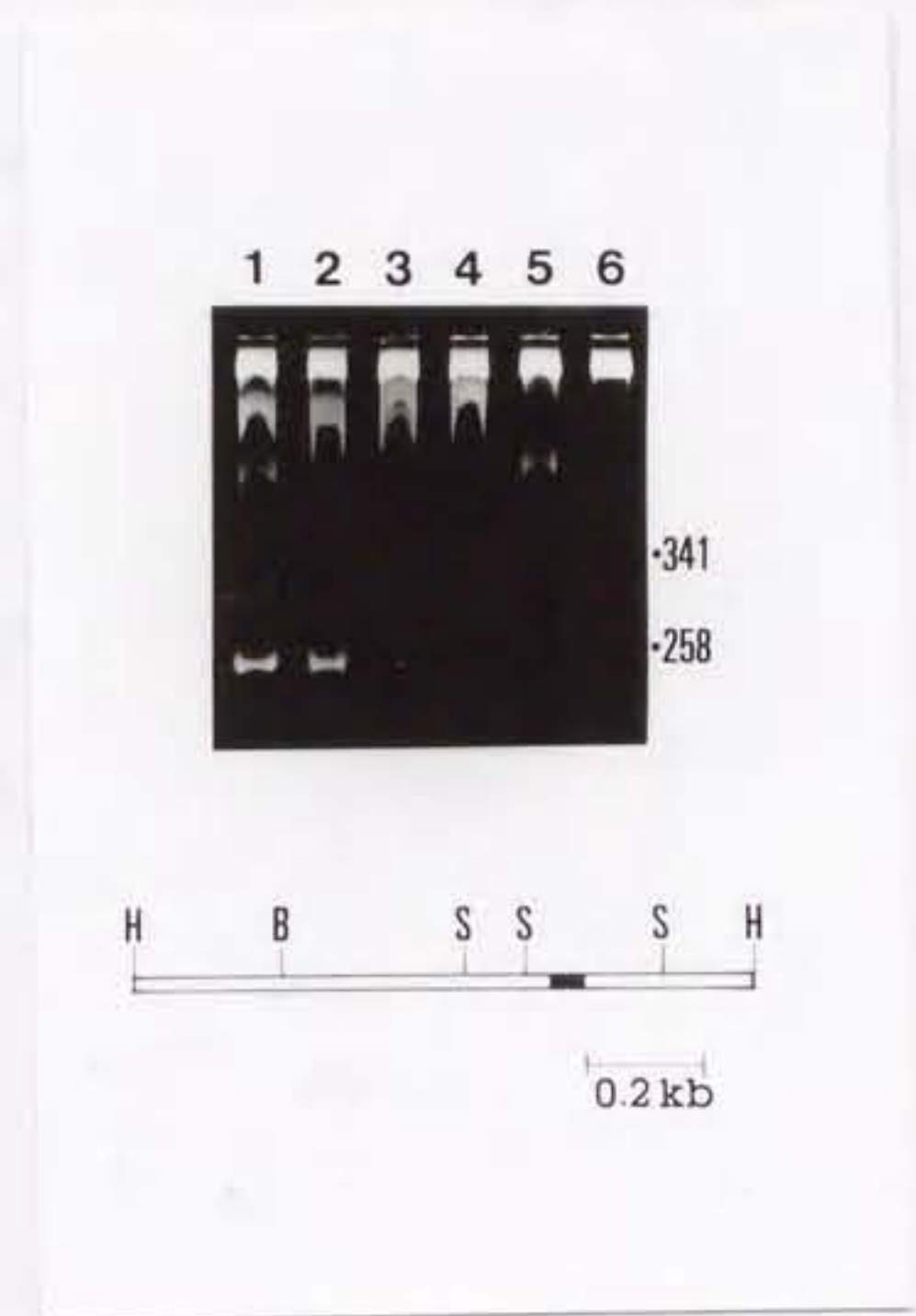


図3 超らせん化pERCAT1プラスミドのS1ヌクレアーゼ感受性

プラスミドをS1ヌクレアーゼ処理後、各種制限酵素によって切断し、ポリアクリルアミドゲルを用いて、S1感受性部位を解析した。奇数のレーン番号は制限酵素処理に先立ちS1ヌクレアーゼ処理を行った。偶数のレーン番号は制限酵素切断のみ行ったDNAを泳動した。レーン1,2は *Bgl*II, *Hind*III、レーン3,4は *Hind*III、レーン5,6は *Bgl*IIによって切断したpERCAT1 DNAを泳動した。右側の数字はマーカー断片長を示す。下図はpERCAT1プラスミドに含まれる1.1 kbのEGF受容体遺伝子プロモーター領域断片の物理地図である。H, B, S はそれぞれ *Hind*III, *Bgl*II, *Sac*I の制限酵素認識部位を示す。太線部がS1感受性領域を示す。S1感受性領域には数個の切断部位が観察される。

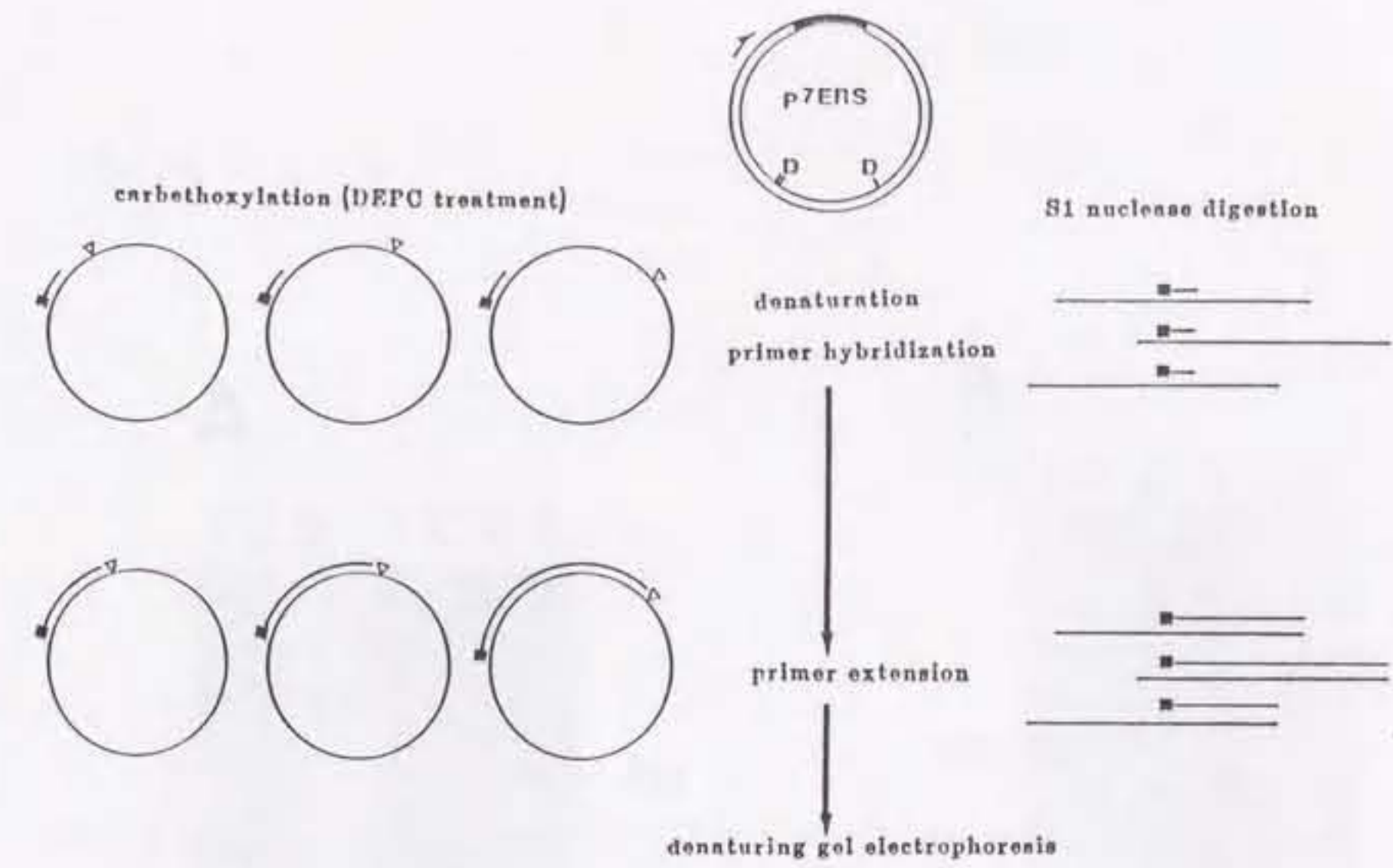


図4 プライマー伸長法概念図

超らせん化プラスミドp7ERSをDEPCあるいはS1ヌクレアーゼによって処理し、アルカリ変性後 $^{32}\text{P}$ 標識プライマーをハイブリダイズし、Klenow断片により相補鎖合成を行った。■は $^{32}\text{P}$ 標識プライマー、△はDEPC修飾部位を表す。S1に切断されたDNAではポリメラーゼのrun-offが起こり、DEPC修飾部位では相補鎖合成が停止する。中央上部のマップで、Dは制限酵素DraIの認識部位を示す。矢印はプリン鎖を鋳型とした時のDNA合成の方向を示す。S1切断部位の解析は両方の鎖について行った。

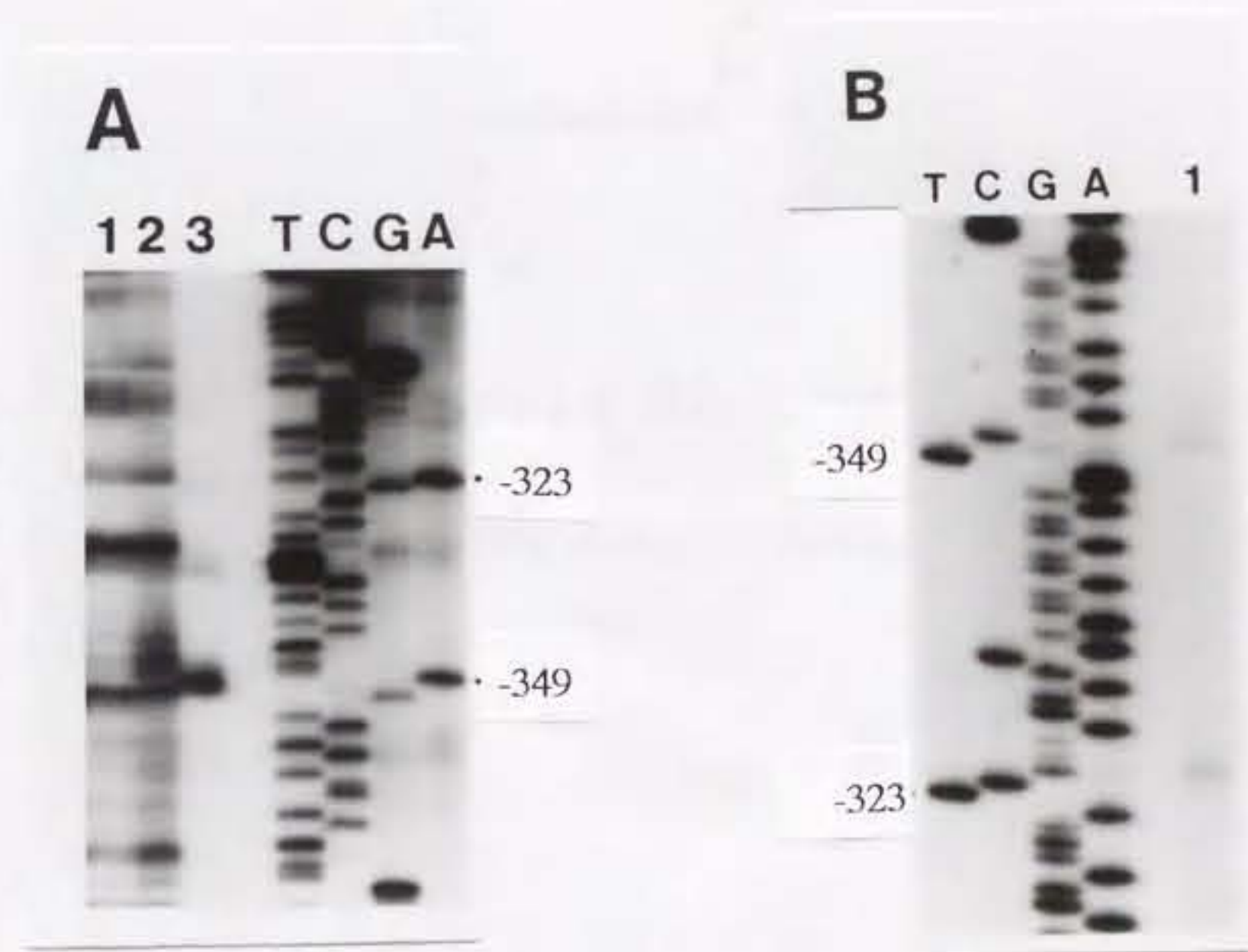
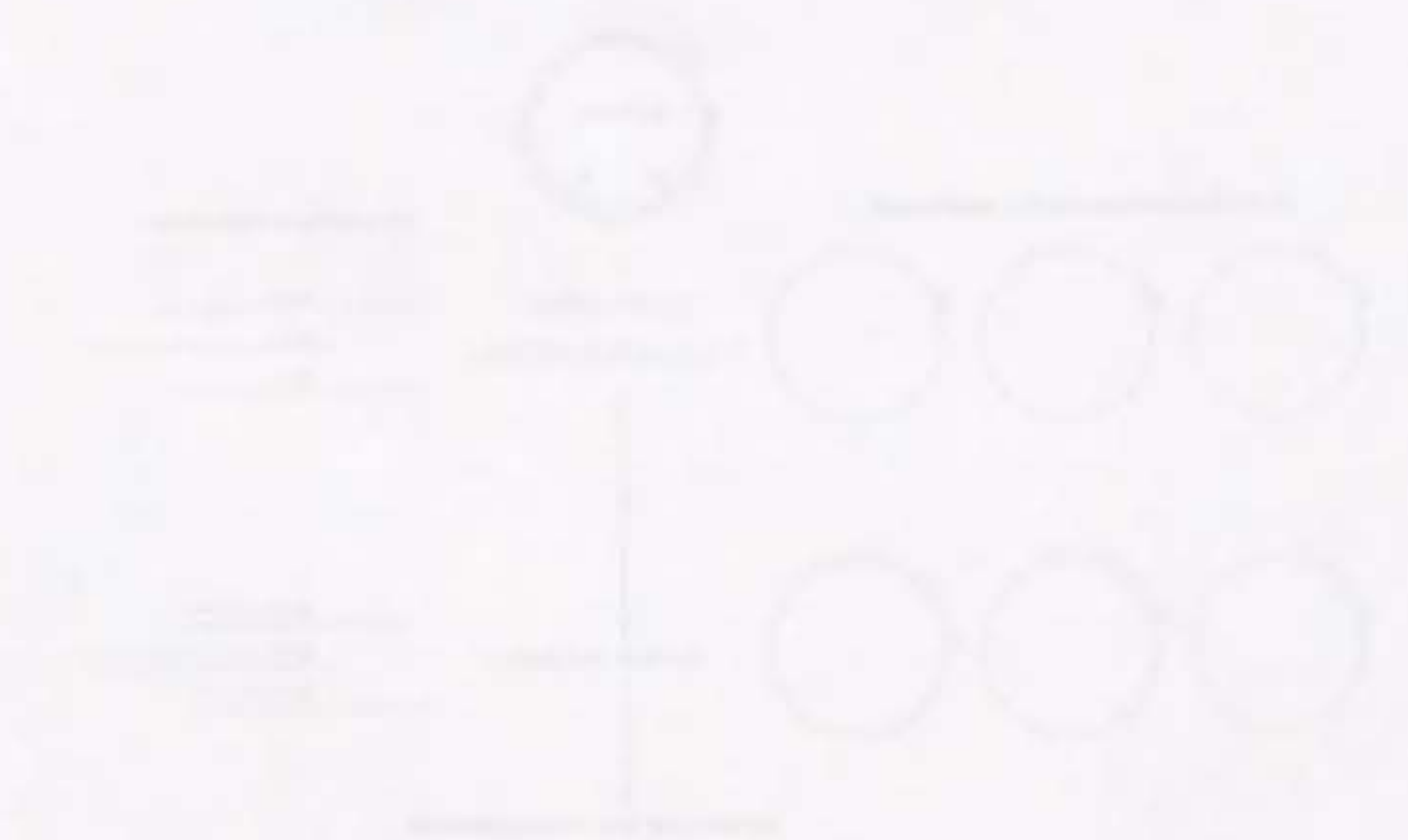


図5 p7ERSプラスミドにおけるS1ヌクレアーゼ、ジエチルピロカーボネートの反応部位

- A) DEPC, S1ヌクレアーゼによるプリン鎖の解析: レーン1, 中性条件下でのDEPC処理DNA; レーン2, 酸性条件下でのDEPC処理DNA; レーン3, S1ヌクレアーゼ処理DNA
- B) S1ヌクレアーゼによるピリミジン鎖の解析: レーン1, S1ヌクレアーゼ処理DNA

レーンTCGAはddNTPを用いたシーケンシングラダー  
塩基番号を横に示す

-380

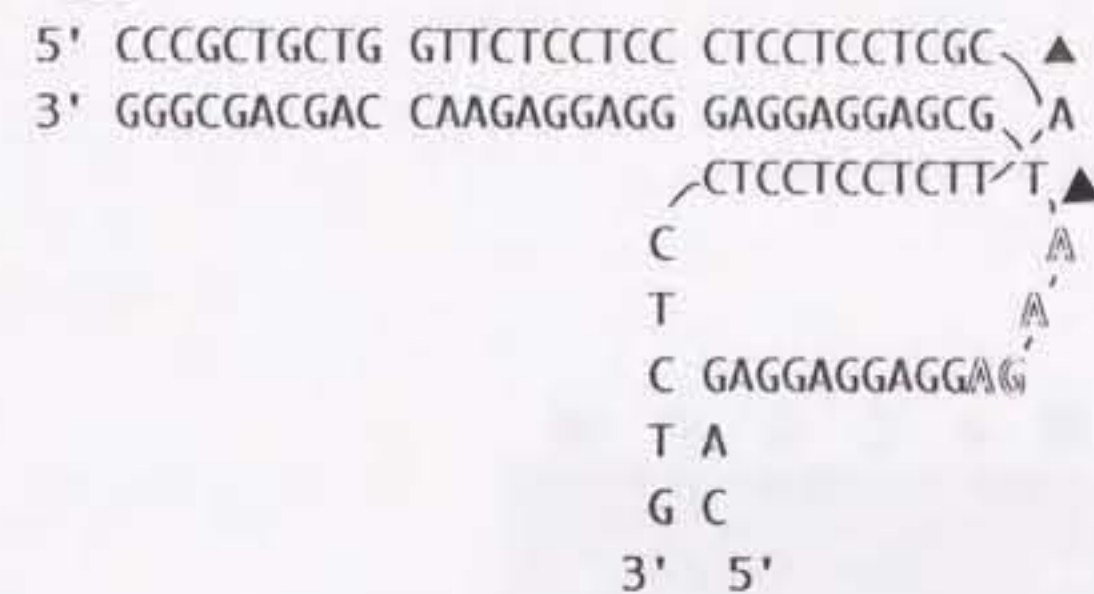


図6 DEPC 修飾部位、S1 ニッキング部位と P y r · P u r 配列の形成する二次構造モデル

AAGA部分が酸性条件下で優先的にDEPC 修飾を受ける部分。▲印はS1ヌクレアーゼによるニッキング部位を示す。



図7 ジメチル硫酸処理がS1ヌクレアーゼ感受性に及ぼす効果

S1ヌクレアーゼ処理に先立つジメチル硫酸処理がS1感受性に及ぼす効果を調べた。レーン1,2はジメチル硫酸によりメチル化を行ったp7ERS DNA。レーン3,4はジメチル硫酸処理を施していないp7ERS DNA。レーン1,3は制限酵素DraIによる切断；レーン2,4はS1処理後にDraI切断を行った。DraIによる切断は2本の主要な断片を生成するが(図4参照)、メチル化DNAはDraIが効きにくいため、約3 kb長の直鎖分子が残存している。メチル化によって、S1特異的断片(矢印)が出現しなくなる。レーンMはλ DNA-HindIII サイズマーカー。

-420  
 GCCACCGCTG TCCACCGCCT CCGGCCGCTG GCCTGGGGTC CCCGCTGCTG GTTCTCCTCC

-360  
CTCCTCCTCG CATTCTCTC CTCCTCTGCT CCTCCCGATC CTCCTCCGC CGCCTGGTCC

-300  
 CTCCTCCTCC CGCCCTGCCT CCCGCGCCTC GGCCCGCGCG AGCTAGACGT TCGGGCAGCC

図8 プラスミド pSR51 の欠失領域

pSR51はp7ERSをS1スクレアーゼによってH-DNA領域において切断した後、エキソヌクレアーゼIIIによってPyr・Pur配列を欠失することによって得た。斜体文字の部分

pSR51において欠失している部分である。下線部は主要H-DNA領域を示す。ヌクレオチド番号は図2に同じ。

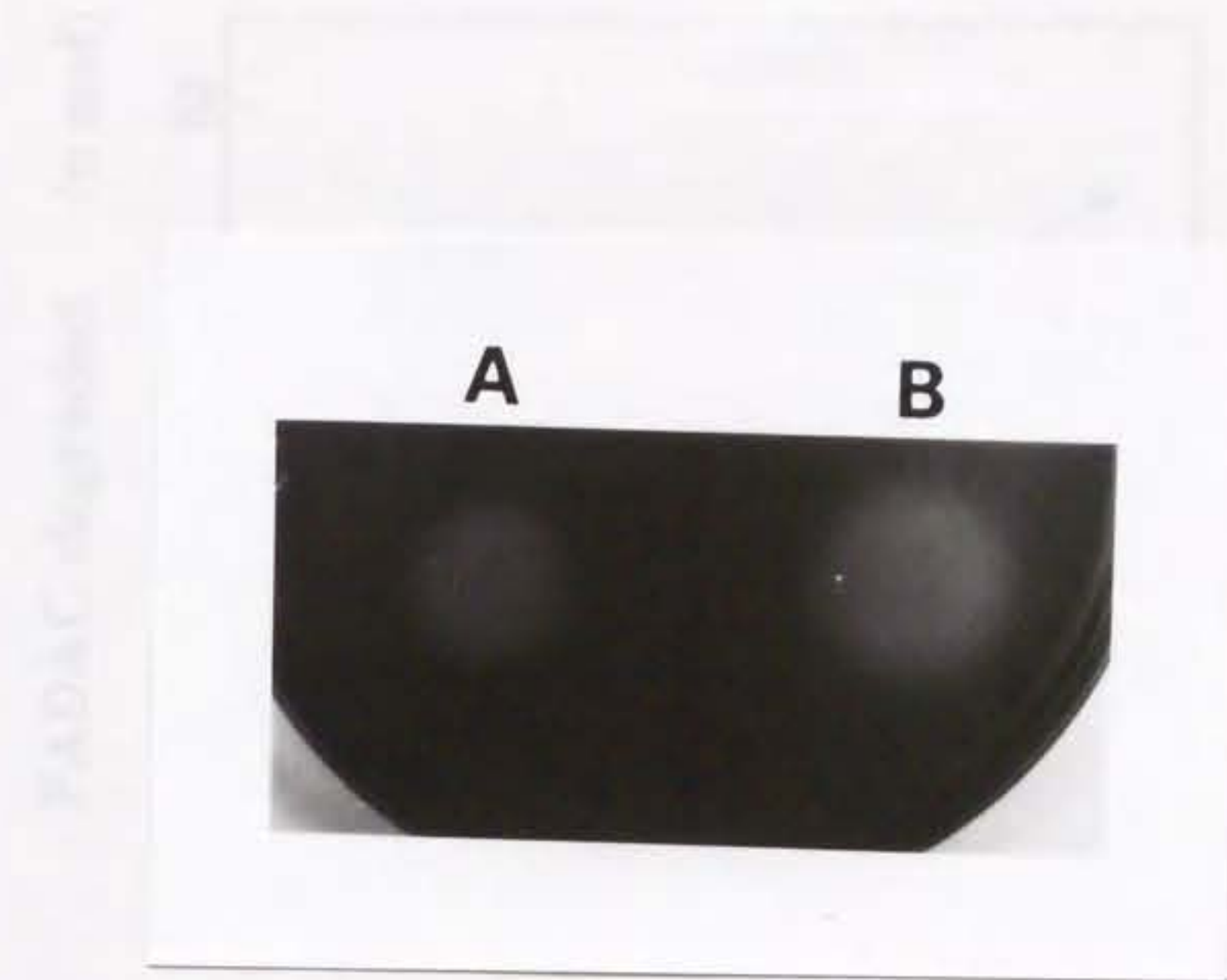


図9 大腸菌形質転換体の分泌するβ-ラクタマーゼ活性

吸光度0.5 A<sub>450</sub>の菌懸濁液5 μ lを50 μ MのPADACを含む寒天培地にスポットし、37°Cにて5時間培養後に黄変部を観察した。

スポットA: pUC19 形質転換体 ; スポットB: p7ERS 形質転換体

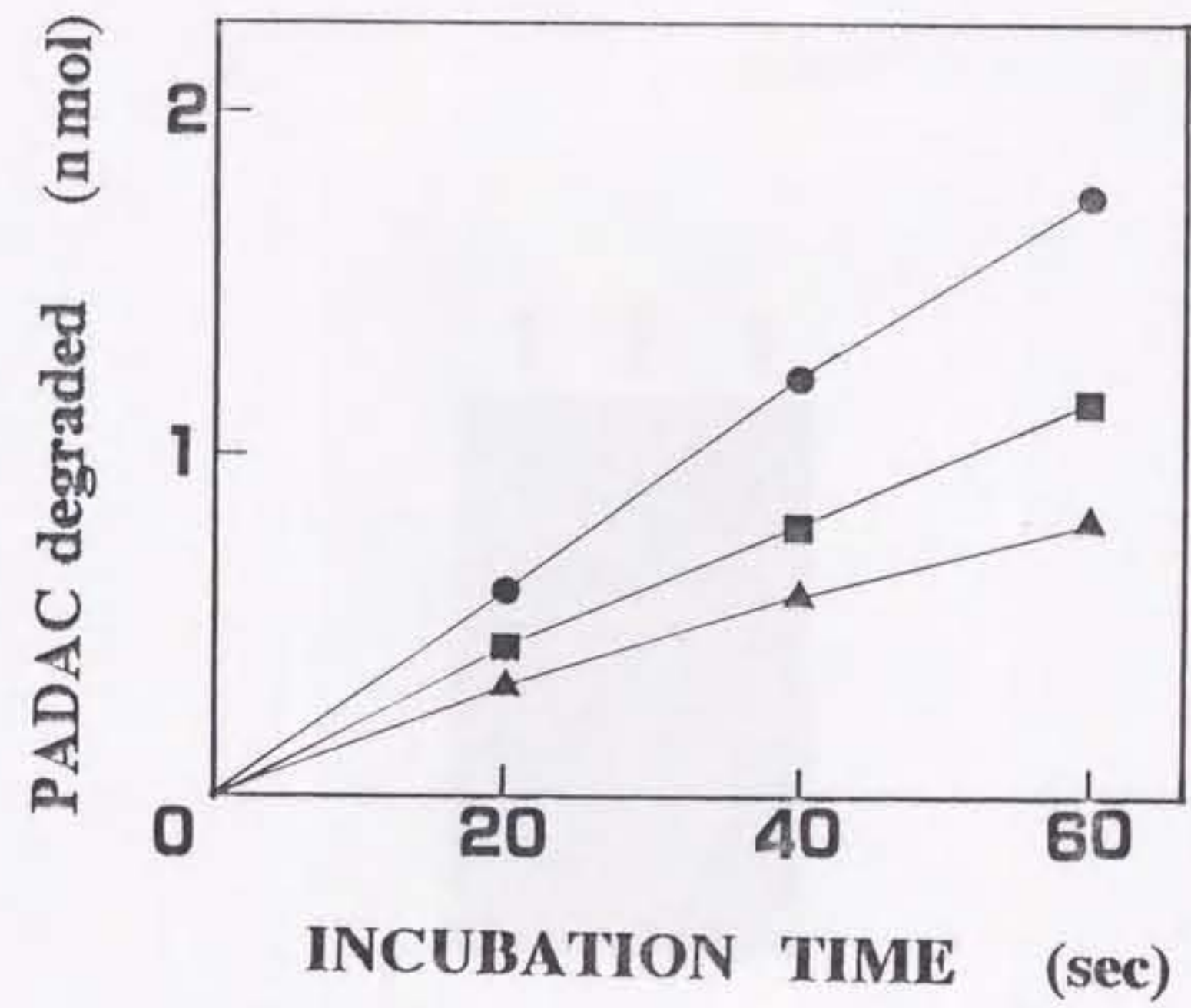


図10 ペリプラズミックβ-ラクタマーゼ活性の比較

粗酵素抽出液 (蛋白質含量  $2 \mu\text{g}$ ) によるPADACの分解を、波長571nmの吸収を追って調べた。●, ■, ▲はそれぞれ p7ERS-, pSR51-, pUC19-形質転換体を示す。



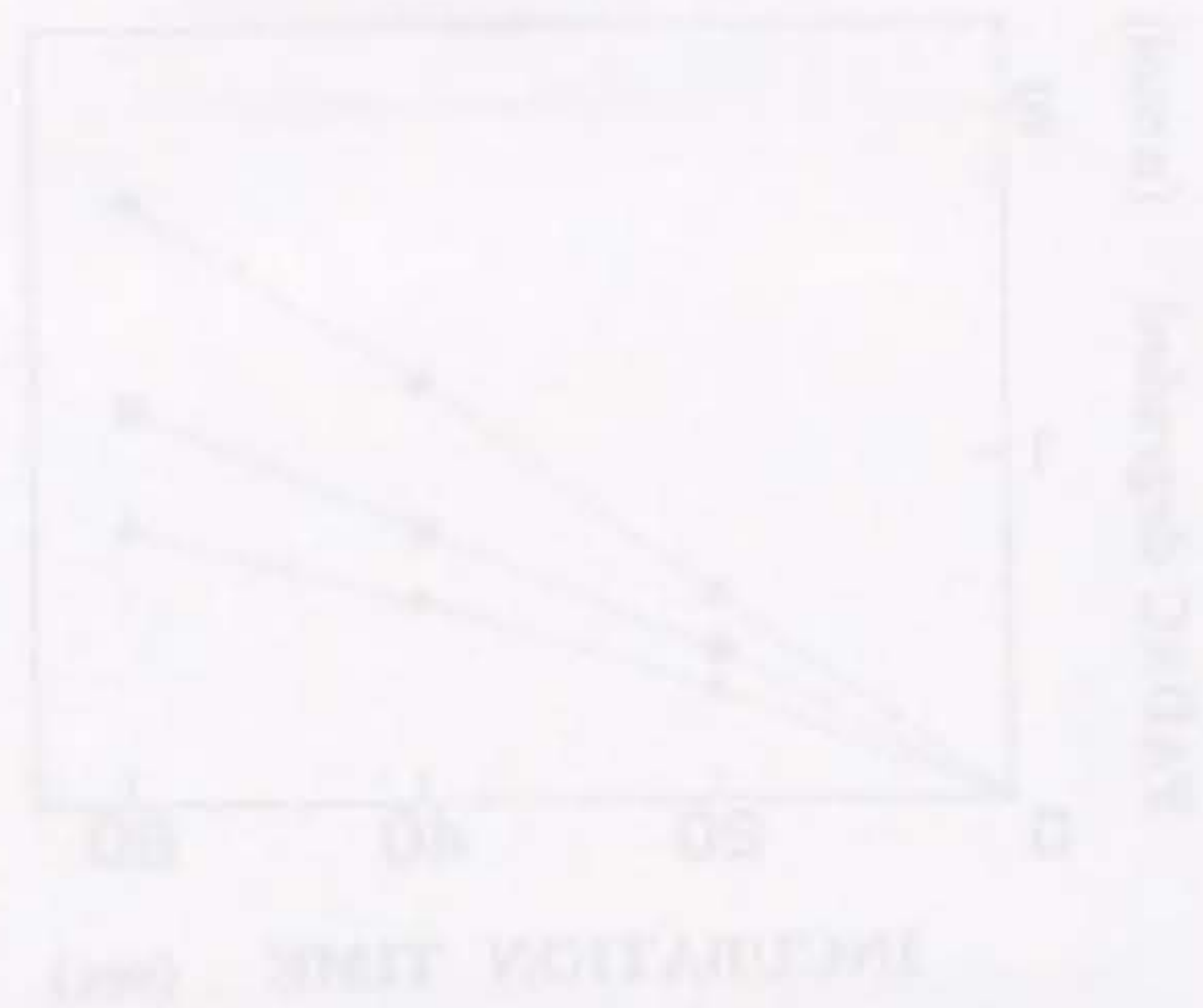


図11 pSR51プラスミドのS1ヌクレアーゼ感受性

S1による切断は、図3で用いた条件にて行った。

レーン1, DraI処理したp7ERS; レーン2, S1/DraI処理したp7ERS; レーン3, S1/DraI処理したpSR51

pSR51は、挿入断片内でのS1特異的切断効率が減少している。

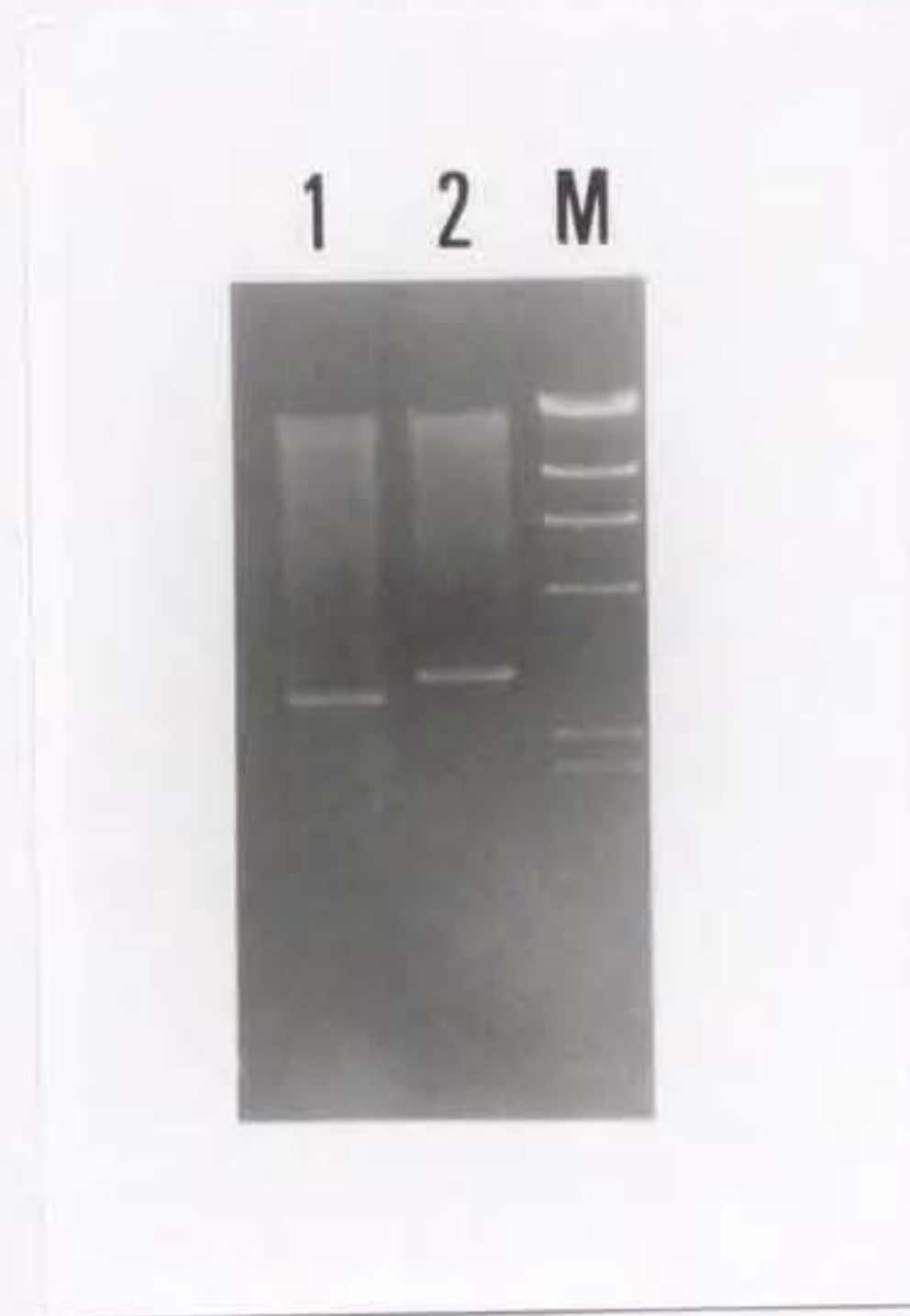


図12 形質転換体におけるプラスミドDNAコピー数の比較

菌株から全DNAを抽出し、制限酵素処理後エチジウムブロマイドを含むアガロースゲルで電気泳動を行った。

レーン1、pUC19-形質転換体;レーン2、p7ERS-形質転換体;レーンM、 $\lambda$  DNA-HindIII サイズマーカー

泳動後のゲル中のDNAの蛍光強度をFMBIO-100 (宝酒造) を用いて定量したところ、宿主DNAとプラスミドDNAの量比は両方の菌株において同じであった(データは示さず)。

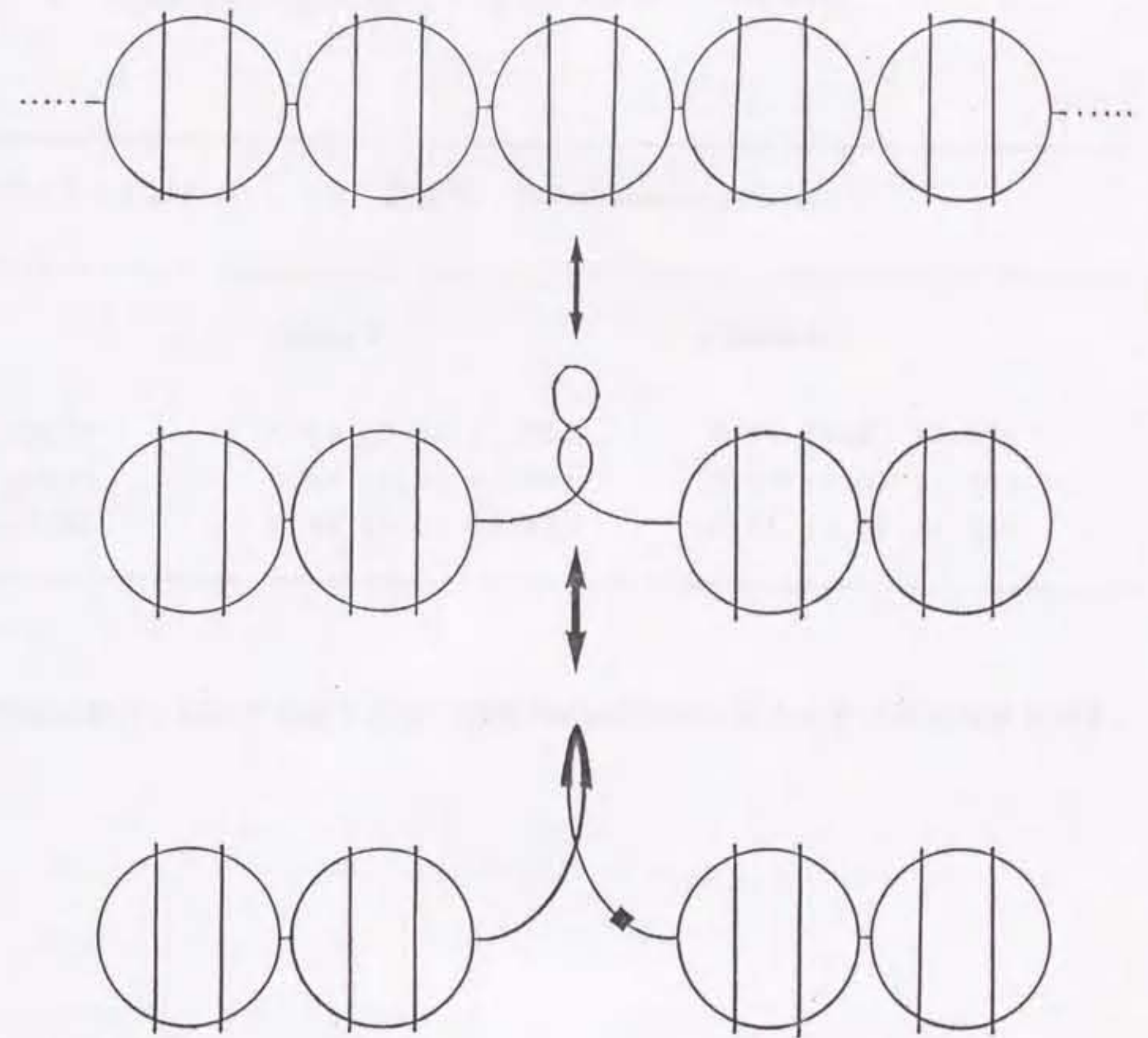


図13 特殊高次構造形成の機能モデル

ヌクレオゾーム構造を形成している状態（上段）から、一つのヌクレオゾームが解離すると二巻の負の超らせんが放出される（中段）。この超らせん化により特殊高次構造の形成が誘導されて超らせんの緩和が起こる（下段）。ヌクレオゾームの解離・再構成よりもB-DNA・H-DNAの構造転移は速い反応と考えられるので、この領域はDNAがヌクレオゾーム構造から露出した状態が保たれ易くなる。

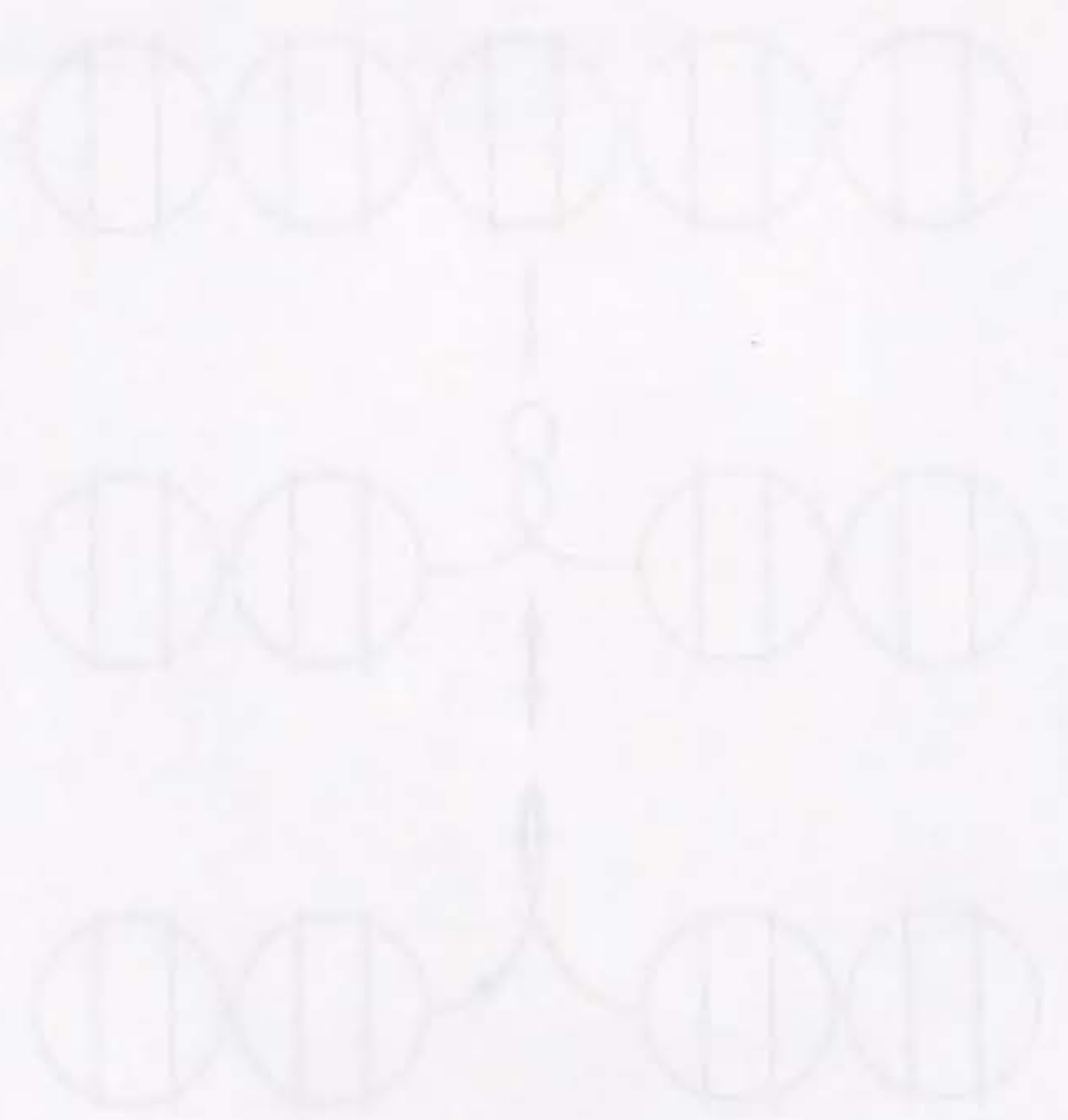


表 I 粗酵素抽出液に存在するβ-ラクタマーゼ活性

プラスミドDNA	比活性 (n mol/ min•mg protein)	
	Culture I	Culture II
pUC19	0.40 ±0.02 (1.00)	0.40 ±0.01 (1.00)
pSR51	0.58 ±0.02 (1.45)	0.56 ±0.02 (1.40)
p7ERS	0.90 ±0.02 (2.25)	0.81 ±0.02 (2.03)

各測定値は5回の平均値である。括弧内にpUC19を1.00とした時の相対値を示す。

副論文 (2編)

- (1) The pyrimidine/purine biased region of the epidermal growth factor receptor gene is sensitive to S1 nuclease and may form an intramolecular triplex.  
Mikio Kato, Jun Kudoh & Nobuyoshi Shimizu  
*Biochemical Journal* 268, 175-180(1990)
- (2) Effect of pyrimidine/purine biased stretch on the expression of bacterial  $\beta$ -lactamase in the superhelical recombinant plasmids.  
Mikio Kato & Nobuyoshi Shimizu  
*Journal of Biochemistry* 112, 492-494(1992)

参考論文 (5編)

- (1) Codon discrimination due to presence of abundant non-cognate competitive tRNA.  
Mikio Kato  
*Journal of Theoretical Biology* 142, 35-39(1990)
- (2) The difference in the type of codon-anticodon base-pairing at the ribosomal P-site is one of the determinants of the translational rate.  
Mikio Kato, Kazuya Nishikawa, Masahiro Uritani, Masazumi Miyazaki & Shousuke Takemura  
*Journal of Biochemistry* 107, 242-247(1990)
- (3) 大腸菌トポイソメラーゼ変異株における $\beta$ -ラクタマーゼの効率的発現  
加藤幹男、古野亜弥  
*日本農芸化学会誌* 66, 137-141(1992)
- (4) Growth-dependent topological alteration of plasmid DNA in *Escherichia coli* topoisomerase mutants.  
Mikio Kato & Aya Furuno  
*Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56, 1130-1131(1992)
- (5) Unusual structure of plasmid DNA formed in transformants of *Escherichia coli*.  
Mikio Kato & Aya Furuno  
*Research in Microbiology* 143, 自刷中 (1992)

