

遺伝子の構造と機能解析

近畿大学教授・京都大学名誉教授 駒野 徹

I. はじめに

今日遺伝子 (DNA) に関する研究は基礎及び応用研究を問わず大きく発展している。また、対象となる生物も微生物から動物、植物に至るまで非常な広がりを見せている。それは遺伝子が生物にとって生命維持に不可欠な情報をもっており、その情報を解明することが生命科学の基礎と応用に繋がるからである。

DNAには三つの機能がある。それらは遺伝子の複製、遺伝子の転写、遺伝情報の貯蔵などである。遺伝子を利用する立場からすると、貯蔵されている遺伝子を単離・解析し、応用の場に供すればよいわけであるが、生体内においては個々の遺伝子は厳しく発現が調節されており、それによって細胞や体のバランスが保たれている。遺伝子の量を調節しているシスの因子はDNA分子上複製に関与する部位に存在し、遺伝子産物 (タンパク質) の量を調節しているシス因子はDNA分子上転写に関わる部位に存在している。両者共にそれぞれ特徴的な構造を有しており、これらの部位を認識して機能を発揮するタンパク質と共に遺伝子の機能発現に関わっている。従って、DNAの有する構造が極めて重要な役割を果たしている。

この度はDNAの機能発現においてその構造の果たす役割について話題を提供したい。

II. 1本鎖DNAの複製装置

複製や転写における反応の基本はWatsonとCrickが示した塩基対形成の原理、すなわち $A = T$ 、 $G \equiv C$ 塩基に従っている。DNAの *in vitro* における生合成反応はKornbergによって最初に示された。すなわち、鋳型DNAの存在下で2'-デオキシリボヌクレオシド5'-三リン酸 (dNTP) を基質としてDNAポリメラーゼIにより合成される。生成したDNAは鋳型DNAと相補的な塩基組成を有していたる (この反応は今日における組換えDNA技術の一つの基本となっている)。

1959年Sinsheimerは小さな分子量 (1.7×10^6) で1本鎖環状DNAを有する大腸菌ファージ $\phi X174$ が存在することを明らかにした。自然界においては当時見いだされた限りにおいてDNAは2本鎖 (二重鎖) であった。それなのに1本鎖を遺伝子とする生物が存在すること自体非常に驚きであった。遺伝学的解析法によれば、大腸菌のDNAも当時すでに環状をしていることが分かっていたが、実際に電子顕微鏡により $\phi X174$ DNAが環状をしていることが示されると一層驚きの輪が広がった。

$\phi X174$ ファージで最も重要な発見は、DNAがファージ粒子中では1本鎖環状であるが、ファージが大腸菌に感染し1本鎖環状DNAが菌体内に注入されると、直ちに2本鎖環状DNAに変わるということであった。2本鎖になれば他の総ての生物と共通のDNAの構造を有することになる。ただ2本鎖環状DNAには二種類あり、一つは

2本鎖共に共有結合をして閉環している場合と、他は2本鎖のうちどちらか一方が閉環しており、他方は開環している場合である。前者をRFI、後者をRFIIとよぶ。最近、遺伝子工学の実験でもベクター（プラスミド）DNAの分離・精製でこのような構造をした分子を取り扱う。RFIをcovalently closed circular DNA(cccDNA)とよび、RFIIをopen circular DNA(ocDNA)とよんでいる。

III. ウイルス鎖DNA（+鎖）、相補鎖DNA（-鎖）、1本鎖DNA、2本鎖DNA等の分離・精製

DNAは塩基組成の差により、溶液中では僅かではあるが異なる密度を与える。これを利用すれば ϕ X174 DNA（+鎖）とそれに相補性の塩基配列を有する相補鎖（-鎖）の分離は可能なはずである。事実それらは塩化セシウムの平衡沈降遠心法で分離することができる。また、塩化セシウムまたはショ糖濃度勾配遠心法でRFI（cccDNA）とRFII（ocDNA）は分離可能である（今日ではcccDNAとocDNAの分離は電気泳動的に容易に分離できる；VI参照）。

分析方法が確立すれば目下複製中のRFII分子の+鎖と-鎖のどちらが開環しており、どちらが閉環しているかを調べることができる。解析の結果+鎖と-鎖とが同数存在しており、それらの分子の開環と閉環の状態を調べて見ると、これらも同数存在することが明らかとなった。これらの結果は2本鎖環状DNAが半保存的複製を行っていることを示している（図1）。

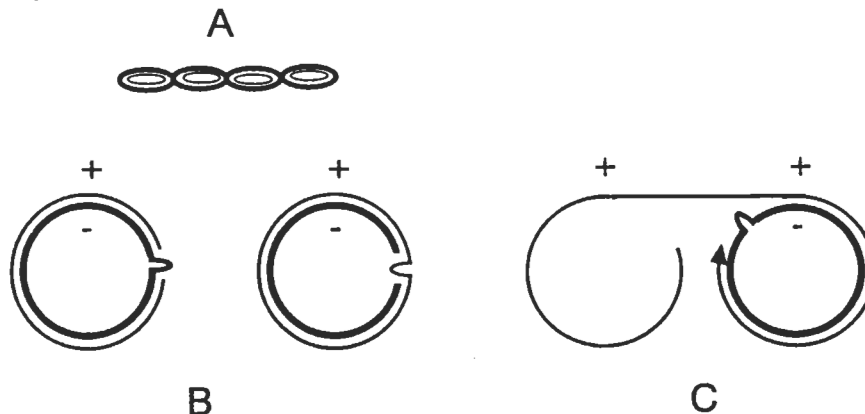


図1. ϕ X174 DNAの分子種 A；RFI，B；RFII，C；ローリングサークル型複製モデル

一方、子供の ϕ X174 DNA（+鎖）のみが複製されている時期のRFII分子を解析すると、閉環している分子が-鎖であり、開環している分子が+鎖であり、不均一な複製が行われていることが明らかとなった。つまり+鎖のみを合成するために-鎖は環状でずっと鋳型になっていることを示している。後にこの方式で複製される機構をローリングサークル複製とよぶようになった。ファージ粒子中の+鎖は環状であるから、ある時点で閉環されるはずであるが、今日に至るまでどのような機構により閉環されるのかは明らかでない。

生物界で1本鎖DNAを遺伝子とする生物も、その機構を解明して見れば、特に変わった複製機構があるわけではなく、むしろDNA複製に生物の種類によって全く異なる機構などないということが明らかになり、 ϕ X174 DNAの複製機構が種々の生物

DNA複製のモデルになり得ることが明らかとなった。この結果は他の1本鎖DNAを有するファージにおいても同様な機構でDNA複製が進行していることを明らかにするきっかけとなるとともに、1本鎖を遺伝子としてもつRNAウイルスにおいても類似の機構で複製が行われていることが解明されるきっかけとなった。

IV. *in vitro* DNA合成

前節で述べたように ϕ X174 DNAの各分子種を分離し、解析することが可能であることが分かると、この方法を*in vitro*での ϕ X174 DNA合成に適用し、はたして生物活性を有する ϕ X174 DNAが得られるかどうかを試みられた。それまでは*in vitro*で合成されたDNAは塩基組成においては鋳型DNAと相補性を示したが、生物活性は示さなかった。Kornberg等は、DNA合成酵素I (Pol I)を用いるDNA合成系にDNAリガーゼを加え、 ϕ X174 DNA (+鎖)を鋳型として合成反応を行い、生成物から、RFIをまず単離した。そのRFIから環状の-鎖を分離し、これを鋳型として再度*in vitro* DNA合成を行い、生成した環状+鎖を分離し、それが生物活性(ファージ生成能力)を示すかどうかを調べた。その結果、*in vivo*で生成したファージDNAと全く同じ効率で子供のファージを生産することを見出した。このような実験を可能にしたのも ϕ X174 DNAの分子種の分離・分析法が確立されていたからに他ならない。またこの実験手法は組換えDNAにおけるcDNAの合成等に応用されている。

しかしその後の研究から、*in vivo*のDNA複製はPol Iが用いられるのではなく、Pol III (DNA合成酵素III)が用いられていることが明らかとなり、 ϕ X174 DNAの複製もまたこれに依存してり、*in vitro*の研究結果がそのまま*in vivo*を反映していないこともまた明らかとなった(Pol IIはDNAの修復に用いられている)。*in vitro*と*in vivo*のDNA合成研究が同じレベルで論じられるようになるのは1980年代に入ってからである。

V. 広宿主域プラスミドRSF1010のDNA複製開始機構

遺伝子の複製は、生物にとって最も基本的で重要な事象の一つである。遺伝子すなわちDNAの複製は主にその開始段階で特異的制御を受ける。生物は種によって異なるDNA複製システムを持つが、その特異性はほとんど複製開始装置の違いによって決まるといっても過言ではない。

大腸菌をはじめとするほとんどのグラム陰性菌を宿主として増殖できる広宿主域プラスミドRSF1010はそのDNA複製開始過程の宿主機能への依存性が著しく低いために広宿主域性が可能となっている。RSF1010はDNA複製の開始過程において重要な役割を果たす三種類の蛋白質RepA (ヘリカーゼ)、RepB' (プライマーゼ)及びRepC (イニシエータ)を自己のゲノム上にコードしている。一方RSF1010 DNA上にはDNA複製開始部位(*oriV*)があり、DNA複製開始過程はRepA、RepB'、RepC及び*oriV*に依存して起こる。まずRepCイニシエータは*oriV*内の20-merを単位とする3.5回の繰り返し配列(iteron)に特異的に結合してDNAの構造変化を引き起こし、iteronの近傍にあるAT-richな部位を部分的に巻き戻し、一本鎖DNAとする。ここに

RepAヘリカーゼが導入され、二本鎖DNAの巻き戻しがさらに進行する。その結果、iteron から約200 bp 離れた位置にある二つのプライミング部位 $ssiA$ 及び $ssiB$ が一本鎖に変換されて活性化される。これら二つの部位をRepB'プライマーゼが認識してプライミングを行いDNA鎖の伸長が開始される。このように $oriV$ 内にはそれぞれ異なる機能を持つ要素が含まれているが、 $oriV$ は大きく二つの領域に分けることができ、その両者は機能的に独立している。一つはiteron からAT-rich部位までを含む領域で、ここはRepCの結合からRepAの導入による二本鎖DNAの巻き戻しまでを行う。もう一つは二つのプライミング部位 $ssiA$ 及び $ssiB$ を含む領域であり、プライミングとそれに続くDNA鎖の伸長開始を行う(図 2)。

一本鎖上DNA合成開始部位(ssi シグナル) ; 宿主域プラスミドRSF1010の $oriV$ 内に存在するプライミング部位(一本鎖上DNA合成開始部位= ssi シグナル)である $ssiA$ 及び $ssiB$ に類似した機能を持つDNA上の部位すなわち ssi シグナルは他の生物のDNA上にも存在する。

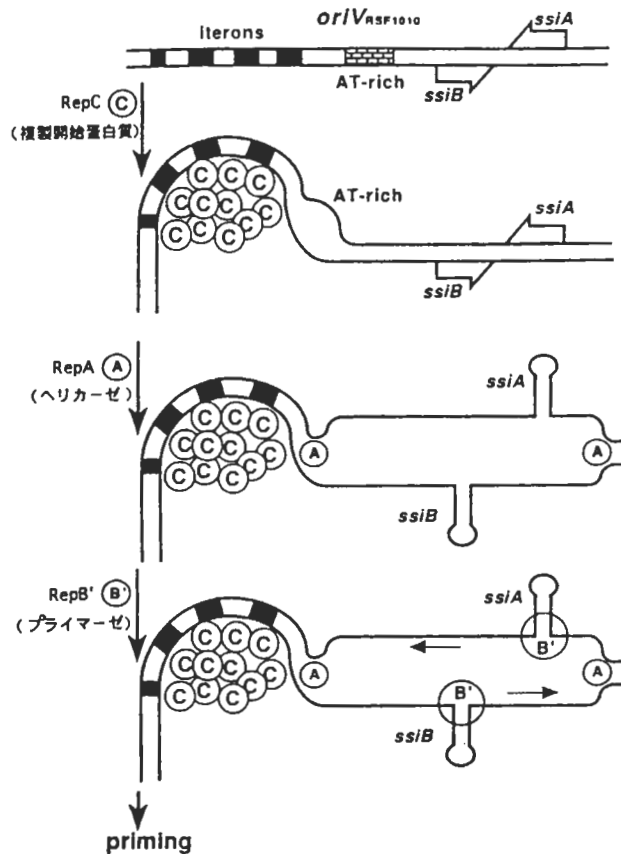


図 2. プラスミドRSF1010のDNA複製開始機構

1. 複製開始タンパク質RepCがiteronに結合する
2. iteron周辺の $oriV$ の高次構造が変化しAT-rich領域の2本鎖が部分的に解離する
3. 1本鎖に解離した領域にRepAヘリカーゼが導入される
4. RepAのヘリカーゼ活性により1本鎖領域が拡大し、 ssi シグナル部分が1本鎖になるとRepB'プライマーゼが2つの ssi シグナルを認識し、両方向にプライミングが開始される
5. DNAポリメラーゼIIIホロ酵素によりDNA合成が行われる

大腸菌の染色体上のDNA複製終結領域 $terC$ には少なくとも二つの ssi シグナル $sitA$ 及び $sitB$ が存在する。その機能的意義は明確ではないが、DNA複製の過程で複製終結領域付近におけるDNA鎖の伸長に関係があると考えられる。

バクテリアのプラスミドにも ssi シグナルを持つものがある。プラスミドpACYC184は ssi (pACYC184)を有する。プラスミドpSY343 (プラスミドR1から誘導されたrunawayプラスミド)には $ssiA$ (pSY343)及び $ssiB$ (pSY343)が見つかった。またプラスミドCollb-P9は ssi (Collb-P9)を有する。これらのプラスミドでは ssi シグナルを除去するとコピー数が低下するがプラスミドは増殖可能である。すなわ

ちこれらの *ssi* シグナルはプラスミドの増殖に必須ではない。これはプラスミド DNA 上に *ssi* シグナルを機能的に代替する他のシス要素が存在するためと考えられる。この他、F、R6Kなどいくつかのプラスミドに *ssi* シグナルが存在することが明らかにされている。バクテリオファージ G4 の DNA 上には *ssi* (G4) が存在する。これはファージ DNA 複製時の相捕鎖 DNA 合成の開始部位として機能し、したがって DNA 複製に必須の要素である。この他 ϕ K、 ϕ X174 などいくつかのバクテリオファージが *ssi* シグナルを持つことも明らかにされている。

RSF1010 の *ssiA* 及び *ssiB* をそれぞれ G4、 ϕ X174、pACYC184 など異なる生物起源の *ssi* シグナルと交換しても、*ssi* シグナルの存在する DNA 鎖上の位置及び方向が適切であれば機能することが明らかになった (図 3)。

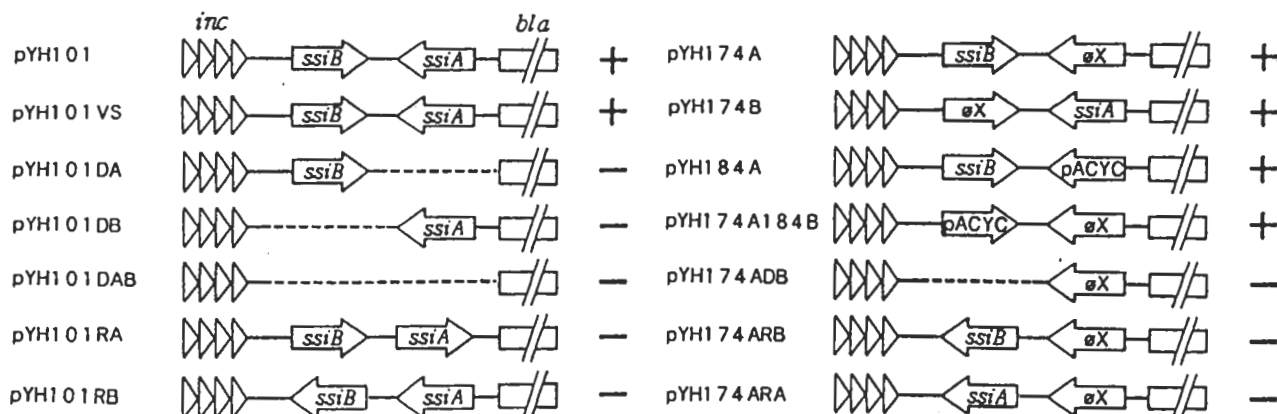


図 3. RSF1010 の *oriW* に存在する *ssi* シグナルを他の生物起源の *ssi* シグナルと交換したときの複製開始能力

pYH101VS は *oriW* の構造を有する組換えプラスミド、矢印の方向は異なる方向を有する *ssi* シグナル、4 個の三角形 (*inc*) はイテロンを示す、+、- は複製の有無を示す。活性測定のため宿主菌には *repA*, *repB*, *repC* 遺伝子を有するヘルパープラスミドを導入してある。

ssi シグナルにはいくつかの種類があり、それぞれにトランスに作用するプライミングシステムは異なる。したがって各種類の *ssi* シグナルは異なった機構で DNA 鎖伸長開始反応を行う。*ssiA* (RSF1010) 及び *ssiB* (RSF1010) は RepB' を含む RSF1010 特異的プライミングシステムによって作動する。また *ssi* (pACYC184) は PAS (プライモソームアセンブリーサイト) として作動する。*ssiA* (pSY343)、*ssi* (ColIb-P9) 及び *ssi* (G4) は宿主バクテリアのプライマーゼによって認識され、プライミング部位として機能する。

VI. RFI (cccDNA) と RFII (ocDNA) の分離と DNA 損傷

遺伝子 (DNA) が紫外線や化学薬剤で損傷を受けると、生物は突然変異を起こすことは以前から知られていた。突然変異が誘起される原因にはいろいろあるが、DNA の塩基の変化と、それに基づく塩基配列の変化、及び DNA 鎖切断がその主な原因である。DNA 鎖に切断が入るのを直接測定するには RFI に切断が導入されると RFII に変換されることを利用し、その原因が何であるかを解析するののも一つの方法である。RFI と RFII の分離はアガロースの電気泳動で容易に行うことができる。この方法によりある

種の発がん剤、ある種の抗がん剤、食品関連物質等、かなりの物質がDNAに損傷を与えることが明らかになった。興味あることにそれらの化合物は Fe^{2+} や Cu^{2+} と錯化合物を形成する能力を有することである。錯化合物がDNA分子の特定の塩基または塩基配列を認識して結合し、生じる活性酸素が酸化的にDNA鎖を切断する。

一連の反応の解析の結果、ある種の抗がん剤（マイトマイシン及びプレオマイシン）はDNAの塩基配列、なかんずくDNAの立体構造を認識し、塩基及び塩基配列特異的にDNA鎖を切断することが判明した。DNAの立体構造特異的に切断が入ることを示す一つの例として、バクテリオファージG4のDNA複製開始領域（G4 ori）のプレオマイシンによる切断機構について示す。プレオマイシはDNAの2本鎖領域のGGT（またはGGC）の塩基配列を特異的に認識し、Tの部分に切断が導入される。2本鎖領域G4 oriには複雑なステム・ループ構造が存在し、プレオマイシンを用いて塩基配列や立体構造特異的にDNA鎖に切断を導入し、生成するDNA断片を詳細に解析したところ、これまで報告されているステム・ループ構造の他に、別の構造をとりうるということが明らかとなった。

RFIにはそれぞれのDNA鎖が単に共有結合している状態の分子と、分子がよじれて緊張している状態の分子とが存在している。よじれている状態は分子の一部分である場合と分子全体に及んでいる場合とがある。このような分子の状態はトポイソメラーゼによって出現する。またそれぞれのDNA分子種は電気泳動により解析可能である。DNAの緊張の度合いが高い分子はアガロースゲルの中での泳動度が大きく、緊張の度合いが低い分子は泳動度が小さい。このように同じ分子量を有するDNA分子でも立体構造の相違により電気泳動度に差がある。

このような現象が最初に見いだされたのは ϕ X174 DNAのRFIやプラスミドのcccDNAなどにつてであり、初期の頃は小型DNAについてのみに見られる現象であると考えられていたが、その後大腸菌や動物細胞の染色体においてもそれらの複製にはトポイソメラーゼが必須であることが明らかになった。動物細胞のトポイソメラーゼに対する阻害物質も発見され、抗がん剤の一種として知られるに至った。

RFIDNA（cccDNA）の立体構造がどのようなであれ、一度どちらかの鎖に損傷が与えられて開環すると、分子の緊張は瞬時に解け、ocDNA（relaxed form）となる。種々の立体構造をもったcccDNAは電気泳動的には一番緊張度の高い分子種とocDNAとの泳動距離の間に、ちょうど塩基配列の解析の際のラダーのような泳動像を与える。大腸菌や動物細胞の染色体のような巨大分子がどのような立体構造を取っているかは未だ十分な解明はなされていないが、DNAには、高度な立体構造が必要であることは想像するに難しくない。

VII. プロモーター領域の解析と転写調節機構

遺伝子の複製が修了すると、細胞は次の世代のために必要な遺伝情報を次々と発現し、生命の維持を円滑にし、次の世代のための準備をしている。遺伝情報の発現の最初の段階は情報RNA（mRNA）の合成に始まるが、細胞の分化に伴って発現する遺伝子には順番がある。つまり発現は調節されている。遺伝子の発現はRNA合成酵素が結

合する部位、すなはちプロモーター領域に大きく依存している。プロモーター領域とはRNA合成酵素が結合する場所を規定している特徴的な構造部位（塩基配列）のことである。この塩基配列を認識するのが σ 因子である。 σ 因子にはいろいろな種類があり、それぞれ異なる塩基配列を有するプロモーターを認識する。しかし σ 因子は結合可能な塩基配列があればいつでも結合できるわけではない。その塩基配列を含む領域の2本鎖が1本鎖に開裂して始めて結合可能になる。プロモーターの上流域にcAMP-CRPタンパク質複合体が結合する部位（塩基配列）が存在し、cAMP-CRP複合体が結合することにより、2本鎖の開裂が起こる。そこで出現する1本鎖部分のプロモーター領域に σ 因子が結合し、mRNA合成が開始される。このように多くの遺伝子は発現の段階で調節を受けている。

大腸菌では菌体内cAMP濃度が高くなると細胞が伸長する現象があることが知られていた。通常の細胞サイクルではその濃度が適切であるように調節を受けているものと考えられている。cAMPのような細胞内情報伝達物質はアデニル酸シクラーゼ（Cya）によりATPから合成される。この酵素をコードする遺伝子cyaのプロモーター領域は、それと重複してcAMP-CRP複合体結合部位が存在している。細胞内cAMP濃度が高くなると、AMP-CRP複合体はこの部位に結合するのでcya遺伝子の発現ができなくなる。その結果細胞内cAMP濃度は低下する。細胞内にcAMPが高濃度に存在すれば細胞にとってはむしろ有害であるから、細胞は伸長する。一方、細胞内cAMP濃度が低下するとcAMP-CRP濃度が低下し細胞は正常に分裂するようになる。

遺伝子の発現は細胞の成長の段階、なかんずく形態形成に深く関わっている。枯草菌、*Bacillus subtilis*では対数増殖期、孢子形成期などの諸段階で異なるプロモーターが使用されている。つまり、細胞のステージは、ある種のプロモーターの支配下にあるタンパク質が生命維持に大きく関わっている。同じ*Bacillus*属細菌の一種の*B. thuringiensis* (Bt) は、昆虫にのみ作用する殺虫性タンパク質を生産する。このタンパク質を δ 内毒素とよぶ。 δ -内毒素をコードする遺伝子は、少数の例外を除き、プラスミド上に存在している。このタンパク質発現もまた特徴的なプロモーターの支配下であり、Btの発現調節機構に依存している。Bt subsp. *israelensis* (Bti) の有するプラスミドの δ -内毒素遺伝子は二種類あり、それらはcryIVA及びcryIVBである。cryIVA及びcryIVB遺伝子はそれぞれ約130-kDaのタンパク質CrylVA及びCrylVBを産生する。cryIVA及びcryIVB遺伝子の転写は孢子形成期に作動する σ^{35} と転写因子SpolIIDに依存していた。このSpolIIDは枯草菌において母細胞特異的に機能する転写因子であるが、Btiの染色体からもクローン化に成功した。cryIVBの発現は σ^E のみに依存していたが、cryIVAの発現は σ^E のみならず σ^H にも部分的に依存することを見出した。

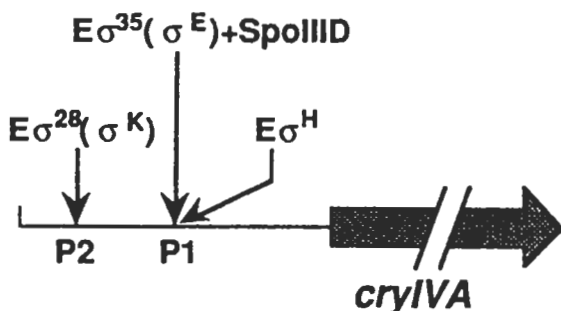


図 4. *Bti*のcryIVA遺伝子のプロモーター領域 P1, P2はそれぞれプロモーター1, 2を示す。