

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 10 年度博士課程 進学

氏名 志賀 康幸

指導教官名 大坪 栄一

論文題目 挿入因子 IS1 の転移中間体としての環状 IS1 分子と宿主因子 H-NS の役割

挿入因子 IS は、原核生物の染色体あるいはそのプラスミド上に存在し、挿入、逆位、欠失などの様々な DNA 組み換え反応を引き起こし、ゲノムの変異や再編成の主要な原因となる因子の一つと考えられている。腸内細菌のゲノム上に存在している代表的な挿入因子である IS1 (768 bp) は、両端に逆向き反復配列 (IR) を、内部に out-of-frame の 2 つのオープンリーディングフレーム (*insA*, B'-*insB*) を持つ。IS1 は転移産物として、標的に単純に挿入した分子 (単純挿入体) と IS1 を運ぶレプリコンと標的レプリコンとの融合体を与える。IS1 の転移を司るトランスポゼースは、*insA* 内部のアデニンクラスターにおいて *insA* の翻訳が -1 方向にフレームシフトすることにより InsA-B'-InsB 融合タンパク質の形で産生される。翻訳フレームシフトがおこらなかった場合は InsA タンパク質が産生され、これは IS1 の転移を抑制することが分かっている。アデニンクラスター内にアデニンを 1 塩基挿入することにより 2 つのフレームのずれを解消し、フレームシフトを介さずにトランスポゼースを産生するようになった変異体 IS1 を運ぶプラスミドからは、IS1 の分子内転移反応による欠失を有するミニプラスミドと共に、両 IR の間に 5-9 bp の介在配列を挟み込んだ形で IS1 が環状に切り出された分子 (環状 IS1 分子) が生じることが明らかにされている。これまでにいくつかの転移性遺伝因子においてその転移に様々な宿主因子が関わっていることが報告されているが、IS1 の転移反応に関与する宿主因子は明らかにされていなかった。本研究は、IS1 の転移反応における環状 IS1 分子の役割を明らかにすること、IS1 の転移に必要な宿主因子を検索し、その結果、必須

因子として同定された H-NS の IS1 の転移における役割を明らかにすることを目的に行ったものであり、その結果は以下のように要約できる。

## 1. IS1の転移における環状IS1分子の役割

### (1) 環状 IS1 分子の転移

環状 IS1 分子の転移能を調べるために、環状 IS1 分子の分子間転移頻度を定量的に測定できる次のような系を構築した。1) アラビノースによって発現誘導可能なトランスポゼース遺伝子を運ぶプラスミドと内部にクロラムフェニコール耐性遺伝子をもつ環状 IS1 分子をクローニングしたプラスミドを作成し、これらと IS1 の転移の標的となるプラスミドを大腸菌内に共存させる。2) この大腸菌の培養液からプラスミド DNA を調製し、これらをテスター大腸菌に導入しクロラムフェニコールで選択することにより、環状 IS1 分子を受け取った標的プラスミドの生成頻度を測定する。この系を用いた結果、環状 IS1 分子は非常に高い頻度で転移し、生じた転移産物は全て環状 IS1 分子が標的プラスミドに単純挿入したものであることが分かった。一方、環状 IS1 分子中で 2 つの IR に挟まれる介在配列が通常の 5-9 bp とは異なり 31 または 39 bp と長いものではそれが 9 bp 以下の環状 IS1 分子に比べて著しく転移頻度が低いことが分かった。この結果は、環状 IS1 分子がトランスポゼースによる切断を受けやすい構造であり、切断後に効率よく転移することを示唆する。実際、大腸菌の SOS 応答誘導活性を指標に IS1 のトランスポゼースの IR における DNA 鎖切断活性を調べたところ、環状 IS1 分子を運ぶプラスミドの保持菌の方が通常の IS1 を運ぶプラスミドの保持菌よりも SOS 誘導の程度が高かったことから、上記の示唆は支持される。

### (2) 環状 IS1 分子の生成における IR 末端配列の役目

一般に転移性遺伝因子において IR の配列はその末端でのトランスポゼースによる DNA の切断に重要であることが知られている。そこで環状 IS1 分子の生成における IR 末端配列の重要性を知るために、IS1 を運ぶプラスミドの IRL (左側の IR) 末端、IRR (の右側の IR) 末端、或いは両末端の 2 塩基対に変異を導入したものを作製した。これらのプラスミドからの環状 IS1 分子の生成量を調べた。その結果、どちらか一方の IR に変異を導入した場合に環状 IS1 分子の生成量が顕著に減少することが分かった。この結果は、環状 IS1 分子の形成に IR の末端配列が重要であることを示す。

以上の結果より、環状 IS1 分子は IS1 が単純挿入体を与える転移経路において転移中間体として機能することが示された (図参照)。また、環状 IS1 分子の形成にトランスポゼースによる両 IR 末端での DNA の切断が必要であることが示唆された。

## 2. IS1の転移における宿主因子 H-NS の役割

### (1) H-NS 欠損株中での IS1 の転移

IS1の転移反応に必要な宿主因子を明らかにすることを目的として、種々のヒストン様蛋白質の欠損株にIS1を運ぶプラスミドを導入し、分子内転移の産物であるミニプラスミドが生じるかどうかを調べたところ、HU、IHF、StpAの欠損株ではミニプラスミドは生じたが、H-NS欠損株ではミニプラスミドが生成しなことが分かった。この結果はIS1の分子内転移にH-NSが必須であることを示す。これまでにHUとIHFがIS1とは異なるIS10の転移に影響を与えることは知られていたが、H-NSがISの転移に必要とされる例は知られていない。その点でこの結果は大変興味深い。

H-NS欠損株は変異を蓄積しやすいことが報告されている。H-NS欠損株でIS1の転移しないのは、H-NSが欠損しているがゆえに二次的に起こった他の遺伝子の変異に起因するという可能性が考えられた。そこでhns遺伝子を運ぶプラスミドを作製し、IS1を運ぶプラスミドを保持するH-NS欠損株に共存させたところ、ミニプラスミドが生じるようになった。この結果はプラスミド上のhns遺伝子が染色体上の変異hns遺伝子を相補したことを示し、他の遺伝子の変異がIS1が転移しない原因ではないことを示す。

次にIS1の分子間転移におけるH-NSの役割を前述の分子間転移頻度測定系を用いて調べたところ、H-NS欠損株中では転移産物は得られないことが分かった（野生株中での転移頻度の1/100以下）。この結果は、H-NSはIS1の分子間の転移にも必須であることを示す。しかし、興味あることに、この分子間転移頻度測定系において転移の基質として環状IS1分子を用いた場合には、転移産物が得られた（野生株中の転移頻度の1/5ほど）。このことは、通常のIS1の分子間転移にはH-NSを必要とするのに対して、環状IS1分子の分子間転移にはH-NSを必要としないことを示す。また、H-NS欠損株中でのIS1トランスポゼースによるSOS応答誘導を調べたところ、通常のIS1を保持する大腸菌ではSOS応答は誘導されなかったが、環状IS1分子を保持する大腸菌ではSOS応答が誘導された。この結果はトランスポゼースによる環状IS1分子のIR末端でのDNA切断にH-NSは必要ないが、通常のIS1での切断にはH-NSが必要であることを示す。

### (2) H-NS とトランスポゼースとの相互作用

H-NSはDNA結合活性を有していることから、DNA結合活性がIS1の転移に重要であると考え、ゲルシフトアッセイによりIS1を運ぶプラスミドのH-NSが結合しやすい領域を調べたところ、IS1内にはH-NSが結合しやすい領域は無かったが、IS1のIRRの近傍に結合しやすい領域があった。しかし、このIRRの近傍領域を欠失させた場

合もミニプラスミドは生じることから、IS1の転移にはIRの近傍にH-NSが結合することは重要ではないことが示された。

IS1内にはH-NSが結合しやすい領域は無かったので、H-NSはIS1のトランスポゼースと協調してIRに結合する可能性が考えられる。そこで、精製したIS1のトランスポゼースとH-NSを用いてIR DNA断片への結合をゲルシフトアッセイにより調べた。その結果、H-NSとIS1のトランスポゼースの両方を加えた場合に、それらをそれぞれ単独で加えた場合には観察されない泳動度の遅れたバンドが生じることが分かった。この結果はH-NSがトランスポゼースと何らかの形で相互作用していることを示唆する。

### (3) IS1の転移に必要なH-NSの機能ドメインの解析

H-NSは種々の遺伝子の転写抑制に働くN末部分、ダイマー／マルチマー形成に働く中央部分、DNA結合に働くC末部分の3つの機能ドメインから成ることが知られている。IS1の転移にどの機能ドメインが必要であるかを調べるために、N末、中央、C末それぞれに変異を持つH-NSを産生する大腸菌内でIS1を運ぶプラスミドからのミニプラスミドの生成を調べたところ、N末、C末変異の場合はミニプラスミドは生じるが、中央部に変異をもつ場合は生じないことが分かった。この結果は、IS1の転移には、H-NSのDNA結合活性は必要でなく、ダイマー／マルチマー形成能が必要であることを示す。

以上の結果より、IS1の転移反応の過程において、IRRとIRLに結合したトランスポゼース同士が会合することによって両IRが空間的に近接した構造をとることが必要であると考えられるが、H-NSはタンパク質-タンパク質相互作用を介してIR-トランスポゼース複合体を形成するのに必須の因子として機能しているということが予想される。環状IS1分子は元々両IRが近接した構造となっているためH-NSの助けなしで、活性のあるIR-トランスポゼース複合体を形成できるためH-NS欠損株中でも転移できると考えられる(図参照)。

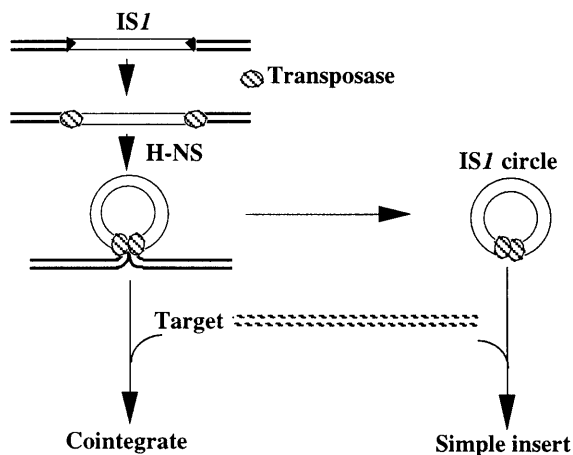


図 IS1 の転移