

染色体分離に必須なII型DNAトポイソメラーゼの機能の解析

Study on the functions of type II topoisomerases essential for chromosome segregation

代表研究者 東京大学医科学研究所 生物物理化学研究部 助手 加藤 潤一

Research associate, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Jun-ichi Kato

To explore the functions of *Escherichia coli* topoisomerase IV, which is essential for chromosome segregation, dominant negative mutants of topoisomerase IV and their suppressor mutants have been isolated and characterized. Novel new type mutants, which introduce breaks in chromosomal DNA and cause cell death, have been found. One of them had a missense mutation of tyrosine at the putative active-site of topoisomerase IV. It has been also found that the mutations of DNA polymerase III suppress the topoisomerase IV mutations, suggesting a close relation of chromosome segregation with chromosome replication. The involvement of topoisomerase II in chromosomal aberration was investigated using a yeast model system. The frequency of illegitimate recombination was enhanced by a topoisomerase II inhibitor and a mutation of the topoisomerase II associated factor. The results suggest the participation of topoisomerase II in the chromosome rearrangement.

はじめに

細胞増殖における、遺伝情報を担う染色体の複製、分離、そして娘細胞への分配は欠くことのできない生育に必須な過程である。この染色体の複製や分離、分配、特に分離の過程において非常に重要な働きをしているものの一つがII型DNAトポイソメラーゼである。II型DNAトポイソメラーゼは生物の生育に必須な酵素であり、DNAの超らせん構造の形成とその調節やからまりあったDNAをほどくなどの活性を持ち(図1)、染色体の複製、分離、分配をはじめDNAが関与するほとんどの過程において重要な働きをしている。これまでにバクテリアからヒトに至るまで多くの生物で同定されているが、全てのII型DNAトポイソメラーゼの一次構造に相同性が見られ、進化の過程で構造が保存されてきたことからその機能の重要性がわかる。

一方生物にとってII型DNAトポイソメラーゼの機

能が生育に重要であることから、その機能を阻害するキノロン系抗生物質、クマリン系抗生物質、またエトポシド(VP16)などは抗菌剤や抗ガン剤として広く使用されており、臨床面でもII型DNAトポイソメラーゼは重要な研究対象になっている。

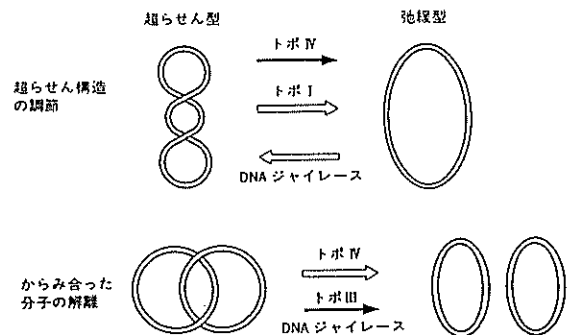


図1 大腸菌のトポイソメラーゼの機能

1 研究目的

本研究ではII型DNAトポイソメラーゼの機能を明らかにする事を目的に研究を進めた。これまでの研究の中で我々は*parC*の新しいII型DNAトポイソメラーゼ、トポイソメラーゼIVを発見した。大腸菌のII型DNAトポイソメラーゼとしてはDNAジャイレースがよく知られているが、もう一種のII型DNAトポイソメラーゼが存在するという我々の発見はDNAトポイソメラーゼの分野に大きな衝撃を与え、それまでDNAジャイレースの働きにより説明されてきた染色体分離の過程が、DNAジャイレースだけではなくDNAジャイレースとトポイソメラーゼIVの両方の機能によりはじめて正常に起こる事が明らかになった。本研究ではまずトポイソメラーゼIVの機能を明らかにするために新しいタイプの突然変異株を単離し、得られた突然変異株の解析を行った。

また真核生物のII型DNAトポイソメラーゼについて、がんや遺伝病の原因となることの多い染色体異常の面から出芽酵母を材料に用いて研究を行った。

2 研究経過

(1) 大腸菌トポイソメラーゼIVの解析

大腸菌トポイソメラーゼIVは生育に必須なため、はっきりとした性質を示す変異株としては、特別な条件にした時のみ突然変異の影響が現れる条件致死突然変異株として単離しなくてはならない。これまでは高温で培養した時に突然変異の影響が現れる高温感受性変異株としてトポイソメラーゼIVの変異株は単離されてきた。我々は高温感受性変異株ではなかなか得られない変異株も単離したいと考え、別のタイプの条件致死突然変異株の単離を行った。トポイソメラーゼIVはParC, ParEの二つのサブユニットから成ることが明らかになっているが、その一つのParC蛋白質をコードする*parC*遺伝子の変異株を単離した方法を図2に示した。野生型のトポイソメラーゼIVを持つ株を用いて、プラスミド上の変異型*parC*遺伝子の産物を生産させた時にのみ生育しなくなる一種の優性変異株を単離し解析を行った。

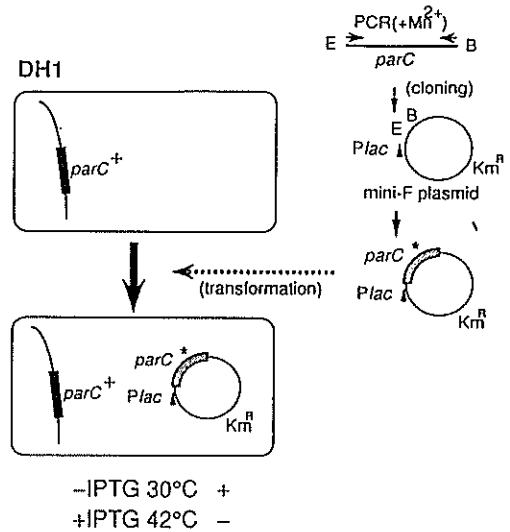


図2 *parC*遺伝子の優性突然変異株の単離法

PCRにより調製した変異型*parC*遺伝子を持つプラスミドを大腸菌DH1株に導入し、IPTGを加え変異型*parC*遺伝子が発現させた時に生育しなくなるものを単離する。

(2) 出芽酵母トポイソメラーゼIIの解析

染色体異常の原因の大きな部分を占める、相同性のほとんどない染色体領域間で起こる組換え、非相同的組換えは、一般に非常に頻度が低く検出が困難である。我々はこの頻度の低い組換えを検出するための実験系を出芽酵母を材料にして作製した。

図3に示したように*CAN1*、*CYH2*遺伝子は野生型(感受性)の遺伝子が優性である事を利用して、プラスミド上のこれらの遺伝子領域に起きた欠失変異を検出する。このプラスミドの系をさらに発展させて染色体上での欠失変異を調べる系も作製した。

3 研究成果

(1) 大腸菌トポイソメラーゼIVの解析

A 染色体切断を引き起こす変異株

得られた変異株について*parC*遺伝子または*parE*遺伝子を持つプラスミドを用い相補性試験を行ったところ、二つのグループに分けられることが分かった。その一つのグループの変異株について詳細に調べたところ、DNAが傷つけられた時に起こるSOS応答が

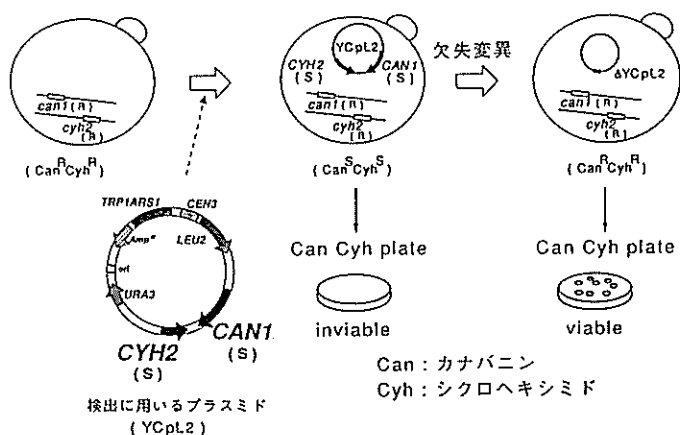


図3 出芽酵母における非相等的組換えを検出するための実験系 YCpプラスミドを持つ株を培養し、カナバニンとシクロヘキシミドを含む寒天培地上で生育するコロニーの数を数える。

誘導されるものが二株ある事がわかった。その二株の変異型遺伝子産物を精製して活性を調べたところ、II型DNAトポイソメラーゼの反応中間体で、切断されたDNAの末端に酵素が結合したものが蓄積することがわかった。この結果から変異によりDNAを切断することはできるものの、切断されたDNAの末端を再結合する活性が弱く、その結果生体内では染色体を切断し菌を殺してしまう、興味深いタイプの変異株である事が明らかになった。また同じグループの変異株のうち一株はII型トポイソメラーゼでよく保存されている活性中心のチロシン残基の変異株であることがわかった。この株から同様に変異型遺伝子産物を精製してその活性を調べたところ、DNAに一本鎖切断を入れる興味深い活性を持つ事も明らかになった。

B 抑圧変異の解析

遺伝学では機能的に関連のある因子を探す場合、ある変異株から変異を持つ遺伝子とは別の遺伝子の変異により初めの変異の影響が変化したものを単離し、後者の変異、抑圧変異、を解析する方法がよくとられる。今回得られた優性突然変異株を用いて抑圧変異株を単離して調べたところ、一つ

の *parE* 変異株から得られた抑圧変異が、*dnaQ* 遺伝子に挿入配列の一つ、IS1、が挿入し、この遺伝子の機能がほとんど失われている変異である事が分かった。*dnaQ* 遺伝子はDNA複製に働くDNA polymerase IIIの一つのサブユニットをコードする遺伝子である。

dnaQ 遺伝子の機能がほとんど失われた場合、DNA複製がスムーズに起こらなくなる事がすでに報告されており、今回得られた結果はDNA複製の速度が遅

くなった場合には、トポイソメラーゼIVの活性が低下しても染色体分離が部分的に起こる事を示唆している。DNA複製の速度が遅くなった場合には複製後にできる染色体のからみが少なくなることを考えるモデルが提出されているが、今回の結果は生体内でもこのモデルが正しい事を示唆している。

(2) 出芽酵母トポイソメラーゼIIの解析

A トポイソメラーゼII阻害剤エトボシドの効果

現在染色体異常について問題となっていることの一つは、真核生物のII型DNAトポイソメラーゼであるDNAトポイソメラーゼIIの阻害剤エトボシド(VP16)を抗がん剤として実際に臨床で使用した場合、染色体異常が高頻度で起こりそれにより二次的な白血病が引き起こされる問題である。II型DNAトポイソメラーゼにより非相等的組換えが引き起こされることが既に証明されているので、おそらくエトボシド(VP16)によりII型DNAトポイソメラーゼによる非相等的組換えが誘導されているのではないかと考えられる。この問題について定量的に、またどのような性質の非相等的組換えがどのような経路で起こっているのかなど組換えのメカニズムを明らかにする事を目的に、出芽酵母で作製した系を用いてまずエトボシドの効果について調べた。その結果プラスミドの系でも染色体の系でもエトボシドを加えると加えた量に応じて頻度が上昇する事がわかり、どちらの系で検出される非相等的組換えについてもエトボシド

により頻度が上昇することが明らかになった。

B 染色体異常に関与する因子の解析

またトポイソメラーゼIIの機能に関連する因子について調べたところ、*SGS1*遺伝子の変異により非相同的組換え頻度が上昇する事がわかった。*SGS1*遺伝子産物はトポイソメラーゼIIと相互作用する事が明らかになっている。さらに他の染色体異常に関与する因子を同定する事を目的に種々の変異株について調べたところ、*HDF1*遺伝子の変異により非相同的組換え頻度が低下する事も明らかになった。

近年分子生物学的解析がヒトなど高等生物についても広く行われ、ヒトの遺伝病を引き起こす原因遺伝子の解析も急速に進められている。昨年染色体異常が高頻度で起きると考えられる遺伝病、Ataxia telangiectasia, Werner, Bloom症候群の原因遺伝子が相次いで報告され、出芽酵母の*SGS1*遺伝子産物は Werner, Bloom症候群の原因遺伝子と相同性がある事が明らかになった。またHdf1蛋白質は哺乳動物におけるDNA修復(X線感受性)や、抗体産生など免疫系での組換えに関与するKu-抗原蛋白質と相同性のある蛋白質である事が分かっており、Ku-抗原蛋白質はDNA依存性キナーゼのサブユニットであって、Ataxia telangiectasiaの原因遺伝子、ATM遺伝子産物がDNA依存性キナーゼの触媒サブユニットであることを考えると関連がある可能性がある。本研究で得られた結果を発展させる事によりこれらの遺伝病の原因について手がかりが得られるかもしれない。

4 今後の課題と発展

本研究では大腸菌の染色体分離におけるトポイソメラーゼIVの機能とDNA複製との関連についての知見が得られた他、トポイソメラーゼIVの反応機構の解明につながる変異株が得られ解析が進んだ。また出芽酵母のトポイソメラーゼIIについては、トポイソメラーゼIIやトポイソメラーゼIIと相互作用するSgs1蛋白質が非相同的組換えに関与する事が明らかになってきた。さらにトポイソメラーゼIIに関連するも

の以外についても、関与する因子が少しずつわかってきた。II型DNAトポイソメラーゼの機能が染色体分離に必須である事はよく知られているが、染色体分離や分配の過程についてはまだまだ分からないことが多い。今後本研究で得られた結果を発展させて、II型トポイソメラーゼの機能、さらには染色体分離分配の機構及び染色体異常が起こる機構について明らかにしていきたい。

5 発表論文リスト

- Tsukamoto, Y., Kato, J., and Ikeda, H. (1996). Effects of mutations of *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, and related genes on illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142: 383-391.
- Kumagai, Y., Kato, J., Hoshino, K., Akasaka, T., Sato, K., and Ikeda, H. (1996). Quinolone resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 710-714.
- Kato, J. and Ikeda, H. (1996). Construction of mini-F plasmid vectors for plasmid shuffling in *Escherichia coli*. *Gene* 170: 141-142.
- Yokochi, T., Kato, J., and Ikeda, H. (1996). Construction of β -lactamase-encoding Ap^R gene cassettes for rapid identification of cloned genes. *Gene* 170: 143-144.
- Tsukamoto, Y., Kato, J., and Ikeda, H. (1996). Hdf1, yeast Ku-protein homologue is involved in illegitimate recombination, but not in homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 24: 2067-2072.