

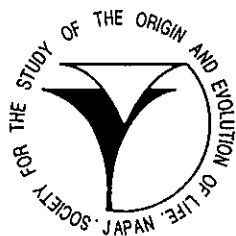
Viva Origino

VOL. 24 (No. 3)

October 1996

Special Issue:

“Protein Structure and DNA Conformation in Gene Regulation System”



The Society for the Study of the Origin
and Evolution of Life
JAPAN

生命の起原および進化学会 会則

地球上における生命の起原を科学的に解明することと、生物進化の攻究により、生命体の本質を明らかにしようとする。本学会は、関係諸分野の英知を集め、互の連繋によって新しい型の総合科学を確立・発展させることにより、上記の目的達成を期するものである。

第一条 本学会は、生命の起原および進化学会 (Society for the Study of the Origin and Evolution of Life-Japan, SSOEL-Japan) という。

第二条 本学会は、会員の生命の起原および進化の研究の発展と、日本における当該研究の開拓・推進をはかり、関連学(協)会および、多くの人々の当該研究に対する理解を深め、もって学術・文化の発展に寄与するものとする。

第三条 本学会は、前条の目的達成のため次の事業をおこなう。

1. 研究発表会・学術講演会の開催
2. 学会誌等の出版物の刊行
3. その他前条の目的達成のため必要な事業

第四条 本学会は前条の事業をおこなうため事務局をおく。

第五条 本学会の会員は、正会員と賛助会員とし、入会手続きは別途定める。

第五条の2 正会員は、第二条に示す研究に従事する個人で、学会が承認したものとする。

第五条の3 賛助会員は、本学会の目的に賛同し、その事業を援助する個人または個体で学会が承認したものとする。

第六条 会員は、別途定められた会費等の費用を前納しなければならない。定められた期間以上これらを滞納した場合は、会員の資格は消失するものとする。

第七条 会員は、本学会のおこなう事業に参加し、本学会発刊の学会誌 Viva Origino その他印刷物の配布をうけることができる。

第八条 本学会は、会長1名、副会長1～2名および学会運営委員(以下委員と略す)を若干名、会計監査2名をおくものとする。

第九条 委員および会計監査は、正会員の互選による。選出された委員は学会運営委員会(以下委員会と略す)を構成し、学会運営の任にあたる。

第十条 会長・副会長は委員会が正会員の中から選出する。

第十一条 会長・副会長・委員・会計監査の任期は2年とする。

第十二条 委員会は、学会運営および学会事業をおこなうため、委員長1名、常任委員若干名を選出し、学会運営常任委員会(以下常任委員会と略す)を構成し、その任にあたらせるものとする。

第十三条 会長は学会を代表し、学会運営は委員長が総括の任にあたる。

第十四条 常任委員会は、必要なとき委員会を招集し、本学会に関する諸事項を審議・決定する。

第十五条 常任委員会は、正会員の中から専門委員を委嘱し、本学会に関する諸事項を諮問することができる。

第十六条 委員会において、本学会員として不適当と決議されたものは、会員の資格を消失するものとする。

第十七条 会員の退会届け者および会員資格消失者については、常任委員会は退会手続きをとるものとする。

第十八条 本学会は、年1回定期総会を開き、必要なときは臨時総会を開くものとする。

第十九条 本学会会則の改正は、会員の3/4以上の出席の総会において3/4以上の同意を要する。

学会入会手続きに関する付則

1. 入会申し込み書に必要な事項を記入し、常任委員会へ提出のうえ会員資格の承認をうける。
2. 会員としての資格を承認されたものは、すみやかに所定の入会金、会費(1年分)、学会誌購読料(1年分)を事務局へ納入する。
3. 上記費用の納入されたものについて、常任委員会は入会手続きをとり、会員として登録する。
4. 本学会の入会は推薦によりおこない、委員会で承認する。

会費その他に関する付則

1. 入会金(正会員のみ) 1,000円
2. 会費
正会員 年額 5,000円
賛助会員 年額(1口) 10,000円
3. 学生のための入会金・会費
正会員で、大学または大学院あるいはこれに準じる学校に在学する学生は、在学証明書の添付により、次の特典を与えるものとする。
入会金 500円、会費(年額) 2,500円
4. 学会誌 Viva Origino 購読料 年額 5,000円
但し、会員には無料配布とする。
5. 会費その他の費用の納入の猶予期限は1年以内とする。
6. 会費払込振替口座
(加入者名) 生命の起原および進化学会
(口座番号) 大阪 8-3673

Viva Origino

VOL. 24 (No. 3)

October 1996

The Society for the Study of the Origin
and Evolution of Life
JAPAN

特集「遺伝子発現系における核酸・蛋白質の構造と機能：
その起原と進化」

目 次

- ◎ 「遺伝子発現系における核酸・蛋白質の構造と機能：
その起原と進化」によせて
加藤幹男……………(183)

論 文

- ◎ 真菌類に特有の翻訳伸長因子EF-3の役割、機能構造と分子進化
宮崎正澄、小川和子、ルフール・アビド……………(185)
- ◎ 転写調節におけるベントDNAの役割
大山 隆……………(199)
- ◎ 染色体セントロメアを構成する蛋白質とゲノムDNAとの接点
杉本憲治……………(211)
- ◎ *Stellaria aquatica* 葉に見出した新規リボソーム不活性化タンパク質
— その精製と酵素学的性質 —
吉成茂夫、田村 実、遠藤弥重太……………(225)

Protein Structure and DNA Conformation in Gene Regulation System:
Reports of Mini-Symposium in 21st Annual Meeting of SSOEL-Japan

特集「遺伝子発現系における核酸・蛋白質の構造と機能：
その起原と進化」によせて

本年（1996年）3月18日より20日の日程で、第21回学術講演会が、大阪府立大学学術交流会館他において、石神正浩氏（大阪府立大学総合科学部）を大会実行委員長として開催された。第3日には、表記のタイトルでミニシンポジウムが行われ、興味深い講演と、活発な質疑応答に盛り上がった。本特集のために、このシンポジウム講演者に依頼して、その講演内容を中心とした総説を書いていただいた。いずれの方も、それぞれの分野において第一級の評価を得ておられ、本特集が、生命の起原および進化研究をすすめる者にとって、示唆に富むものであると信じている。

宮崎正澄氏には、蛋白質合成延長因子（elongation factor）の構造と機能、および細胞内での存在様式について、酵母の例を中心に解説していただいた。蛋白質の生合成は生命活動の基本のひとつであり、ここに関与する分子の比較解析は、種分化および進化の研究に貢献するところ大である。

大山隆氏には、ベントDNA（bent DNA：折れ曲がりDNA）の生物学的機能について、曲がりの方向と遺伝子転写活性におよぼす効果を解析した結果を解説していただいた。DNAは、塩基配列にしたがって遺伝子（蛋白質の配列）情報を保持するのみでなく、その塩基配列は、DNAのらせん構造特性をも支配し、その立体構造の多様性によって機能発現の調節に関わっていることが明解に示された。始原生物あるいは前生物状態では、核酸は遺伝情報保持の役割と共に、その立体構造の柔軟性を利用して、現生の生物以上に積極的な機能を有していたのかもしれない。

杉本憲治氏には、高等動物染色体の動原体構成蛋白質（CENP）と、それらが相互作用するDNA領域について解説していただいた。染色体構造の成り立ちは、真核生物の確立と密接な関係があり、生物進化の研究に興味深い知見を提供している。

大山、杉本両氏は、生命の起原および進化学会の会員ではないが、本シンポジウムでの講演を快くお引受くださり、また、大山、杉本、宮崎三氏とも多忙にもかかわらず、素晴らしい総説をお寄せいただいたことに心より謝意を表す。

また、本特集を企画している間に、吉成茂夫氏らから、リボソーム不活化蛋白質の性状に関する研究報告を受け取った。その内容は、本特集の趣旨に合致したタイムリーなものであり、上記のシンポジウム講演とは別個の原著論文であるが、本特集に加えさせていただいた。

加藤幹男（大阪府立大学総合科学部）

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

The Role, Functional Structures and Molecular Evolution of Translation Elongation Factor 3(EF-3) Characteristic for Fungi

Masazumi MIYAZAKI, Kazuko OGAWA and Md. Ruhul ABID

Department of Molecular Biology, Graduate School of Science,
Nagoya University, Nagoya 464-01, JAPAN

(Received for publication October 1, 1996)

The translation elongation cycle on ribosomes from organisms of all kingdoms is well known to be driven by the two complementary soluble factors along with GTP hydrolysis. Eukaryotic elongation factor 1a (EF-1a equivalent to bacterial EF-Tu) is responsible for the codon-dependent selection of the cognate AA-tRNA at the ribosomal A-site and elongation factor 2(EF-2 equivalent to bacterial EF-G) for the translocation reaction. The discovery by Skogerson of a third elongation factor (EF-3) required for the yeast elongation cycle was therefore amazing.

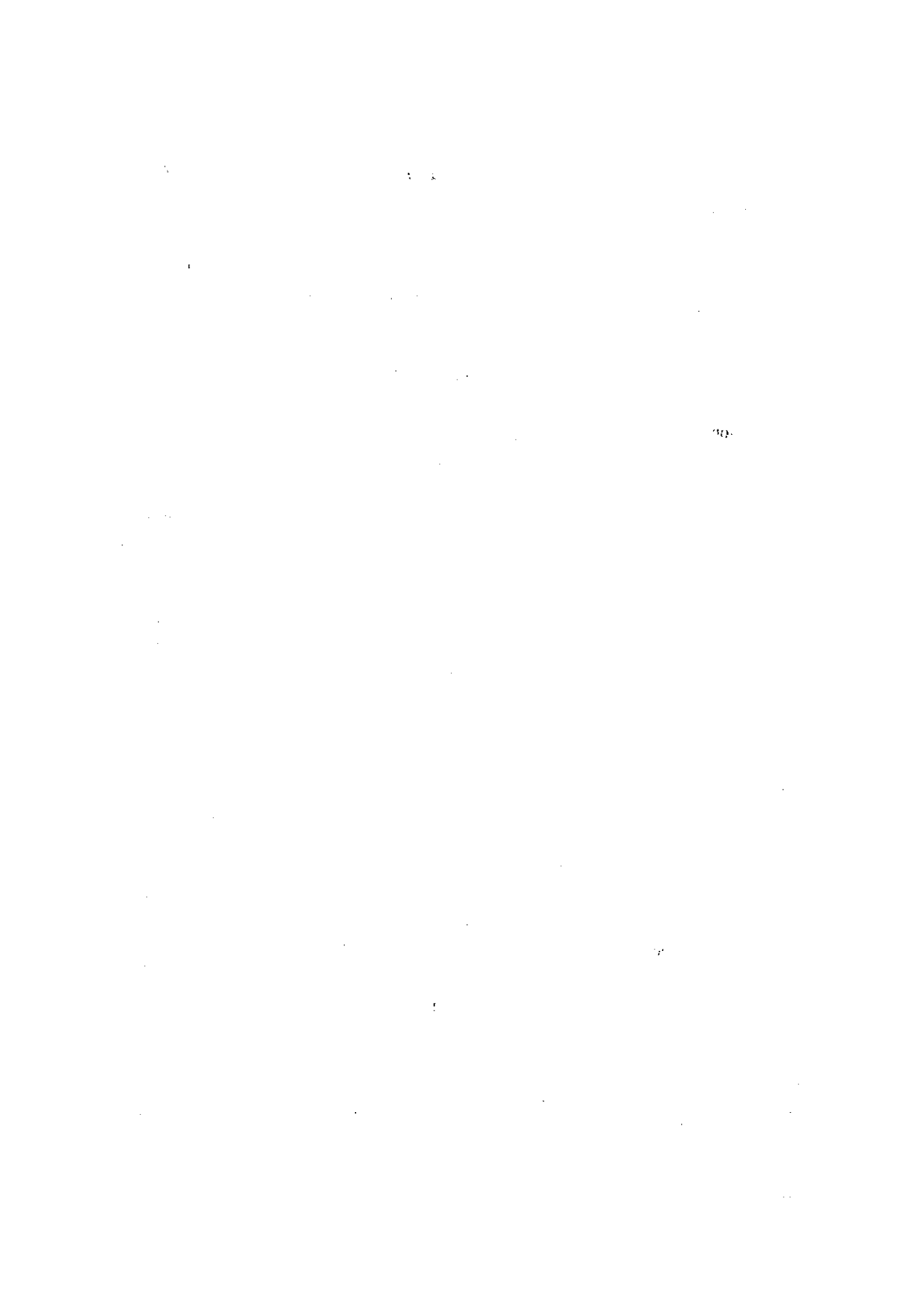
In order to define the exact function of EF-3 in the peptide elongation cycle, biochemical analyses were carried out on its role in the partial reactions comprising of the cycle. In the AA-tRNA binding reaction (codon-decoding reaction), the addition of EF-3 and ATP to the system containing EF-1a and GTP with well-washed yeast ribosomes strikingly stimulated the binding reaction of cognate AA-tRNA but neither near- nor non-cognate AA-tRNA. The binding reaction was indicated to be comprised of two steps promoted firstly by EF-1a alone and then by EF-3/ATP hydrolysis along with EF-1a. Similarly, EF-3 and ATP remarkably enhanced EF-2-dependent translocation reaction and selected cognate AA-tRNA in distinction from near-and non-cognate AA-tRNA. We have proposed a revised yeast elongation cycle model containing the two steps of each of the AA-tRNA binding and translocation reactions. In the elongation cycle, EF-3 along with ATP hydrolysis functions to achieve the high translational fidelity.

The two internal repeats of EF-3 sharing a bipartite nucleotide-binding domain were shown to be required for its function by analyses of deletion and point mutants of the ATP-binding motifs. The highly positively charged C-terminus was indicated to play a pivotal role in EF-3 binding to a specific region of ribosomes. EF-3 was identified in a wide range of fungal species but not in other eukaryotes and *E.coli*. In other eukaryotes, strong ribosomal ATPase/GTPase activities were found even after extensive washing. The ribosomal ATPase is assumed to be a counterpart of fungus EF-3.

Keywords: Translation elongation factor 3 (EF-3), ATP Hydrolysis, Translational Fidelity, Molecular Evolution, Yeast, Fungi, Eukaryotes.

Viva Origino 24(1996)185–198

© 1996 by SSOEL Japan



真菌類に特有の翻訳伸長因子EF-3の役割、機能構造と分子進化

宮崎正澄、小川和子、ルフル・アビド

名古屋大学大学院・理学研究科・生命理学専攻
〒464-01 名古屋市千種区不老町

はじめに

リボソーム上に配置されたmRNAの遺伝情報に従って、正しいアミノ酸配列をもつ機能タンパク質を合成する過程は翻訳機構と呼ばれ、開始反応、ペプチド鎖伸長反応、終結反応の3段階に大きく区分される。このうちペプチド鎖伸長反応は、必要な機能を持つタンパク質を構成する数百のアミノ酸配列をmRNA上から読取って、高い精度と調和のとれた速度で進行する重要な翻訳段階である。Fig.1. に示す如く伸長反応は3ステップからなると言われてきた(1,2)。先ず開始反応によってmRNA上の開始コドンAUGを読んでP-座位にMet-tRNA(原核生物の翻訳系ではfMet-tRNAが結合)を配置した開始複合体上で、A-座位に来るコドンに正確に対応するAA-tRNAを結合する：1) AA-tRNA結合反応(遺伝暗号読取り反応)に始まる。次いで、P-座位上のMet-tRNAはそのエステル結合のエネルギーを利用し、遊離のアミノ基を持つA-座位上のAA-tRNAのアミノ酸にMetを転位して最初のペプチド結合Met-AA-tRNAを形成する：2) ペプチド結合形成反応(Transpeptidation)。この反応はリボソーム大サブユニットのもつペプチジル・トランスフェラーゼによって行われ、耐熱菌を使った実験でrRNAが触媒することが示されている(3)。最後に、mRNA上のコドンとtRNAアンチコドンの正しい対合関係を保持しながらリボソーム上を正確に1コドン分移動して、Met-AA-tRNAをP-座位へ、アミノ酸(Met)を離脱した遊離のtRNAをリボソームから放出、新たにA-座位へは第3のコドンが配置される：3) 転座反応。こうして伸長反応サイクルが完了し、1サイクル毎にペプチド結合を1つずつ伸長して、最後に終止コドンがA-座位に来ると、終結反応によって完成ポリペプチドが放出される。

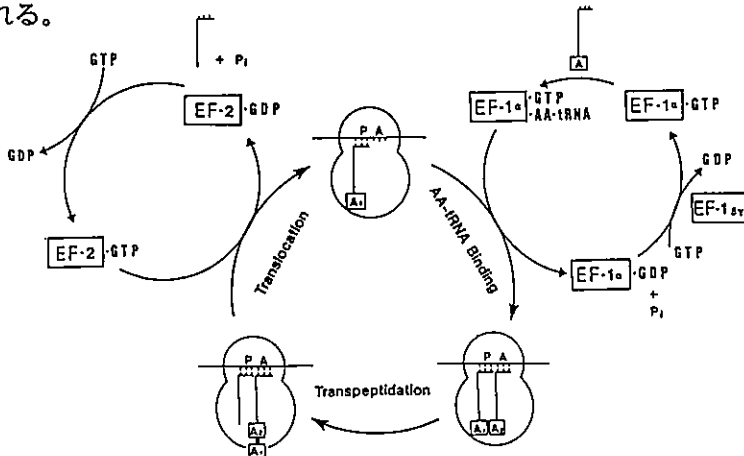


Fig. 1. Eukaryotic Peptide Elongation Cycle

このように(Fig.1)、従来翻訳伸長反応は、主として2つの相補的可溶性因子(原核生物ではEF-TuとEF-G, 真核生物ではそれぞれEF-1 α とEF-2 に対応)によって駆動され、EF-1 α (EF-Tu)によるAA-tRNA結合反応(遺伝暗号・コドン解読反応)と、ペプチド結合形成後EF-2(EF-G)によって推進される転座反応の2つのステップではGTP水解が必要と考えられてきた。GTPはアロステリック・エフェクタ-(4)としてEF-1 α やEF-2 のリボソーム(tRNA)結合型(GTP型)から放成型(GDP型)への変換によって伸長反応サイクルに方向性を与え、リボソームの構造変換にも影響しているものと考えられる。酵母は生化学的・遺伝学的に優れた材料であるにも拘わらず、高い生物活性をもつ *in vitro* 翻訳系の構築が進まず、他の高等動植物の系に比べ大幅に研究が遅れていた(1)。

1976年 Skogersonらによって、酵母リボソームを用いた *in vitro* 伸長反応系に必須の第3の可溶性因子が発見されEF-3と命名された(5)。Chakraburty ら(6)とわれわれのグループ(7)は、*Saccharomyces* 酵母よりこの因子を単一標品として精製・純化し125kDaの高分子量モノマー・タンパク質で、酵母リボソームに依存した強いATPase/GTPase 活性をもつことを示した。McLaughlin らとChakraburty らは*S. cerevisiae* よりEF-3 のts変異株を分離した(8,9) 他、EF-3遺伝子をクローニング、配列決定しこの因子が酵母の生育に必須であることを証明した(10,11)。われわれは酵母を材料に、充分洗浄したリボソームと単一バンドに精製した3種の伸長因子EF-1 α , EF-2, EF-3 からなる *in vitro* 伸長反応系を構築し、伸長反応サイクルにおけるEF-3 の機能を解析した(7,12,13)。Poly(U) 依存のPoly(Phe) 合成反応では、EF-3/ATP は必須の因子で、これまで考えられてきたような(Fig.1) EF-1 α とEF-2の夫々によるGTP水解反応に加えて、EF-3 のリボソーム依存のATPase 活性によるATP水解反応が不可欠であることが明らかとなった。このEF-3 のATPase 活性はATPを最も強く水解するほかGTPやピリミジンヌクレオチドにも作用する基質特の広いもので、Vanadateによって阻害される等、GTPに厳密な特異性を持つEF-1 α やEF-2と対比して際立った特性をもっている。このEF-3/ATP水解系は、高い翻訳精度を維持するために酵母をはじめとする真菌類では不可欠の働きをしていることが明らかとなってきた。本稿では、バクテリアには見られない真菌類に特有のEF-3/ATP水解系について機能上の役割、それを果たす構造特性およびその分子進化の側面について、われわれの研究を含め現状を総括する。

1. EF-3/ATP 水解系の伸長反応サイクルにおける役割

真核生物の翻訳系は、大腸菌の場合と異なって開始反応でGTPの他にATP水解反応を要求することが古くから知られている(14)。このATP水解が、mRNA上の開始コドンの認識に真核生物独自の機構として今日広く認められるKozakのスキャニング・モデルの基礎となった(15)。酵母伸長反応系において、ATPによる反応促進効果を最初に見出したのはSkogersonであった(16)。われわれ(7,12)とChakraburty ら(17)のグループは精製した伸長因子とリボソームによる再構成系を用いてこのことを追認した。*In vitro* 伸長反応系におけるEF-3/ATPの作用をより詳細に検討すると、反応系のGTP濃度によってEF-3のATPase活性の必要度に差が見られた。Fig. 2に示すように、GTPに対して強いAffinityをもつEF-1 α とEF-2が可成りの程度機能できるGTP濃度(10 μ M)を境界に、これ

以下の濃度ではPoly(U) 依存Poly(Phe) 合成反応にATP(0.3mM) 添加が不可欠であるのに、10 μ Mを超えて次第に高濃度になるにつれATP添加は伸長反応にとって必須要因ではなく促進効果として現われる。即ち、高いGTP濃度では塩基特異性の広いEF-3も機能しうるようになることを示している(7)。当然ATPがあってもEF-3が欠けたり、ATPの非水解アナログAMPPNPではATP効果は見られない (Fig. 2 参照)。EF-3はATP水解を伴って伸長反応サイクルを駆動させていることを示す。また、EF-3抗体による阻害実験(6,18,19)やEF-3のts変異株の解析(8)から、EF-3はPoly(U)および天然mRNAをメッセージとした伸長反応系に不可欠であることが示された。一方、in vivo実験でもゲノム当たり1コピーの遺伝子(10)から発現されるEF-3が酵母の生育に必須の因子であり、EF-3のATPモチフの変異体を用いた相補実験の結果 (Fig. 9参照)をみるとEF-3のATPase活性がその機能に不可欠であることがわかる(20)。酵母伸長反応系では、他の生物種の場合と違って、GTP水解に加えて新たな可溶性因子EF-3によるATP水解反応が必要であることが明らかとなった。このEF-3/ATP水解系は3つのステップからなる伸長反応サイクルの各素反応ではどのように機能しているのだろうか。

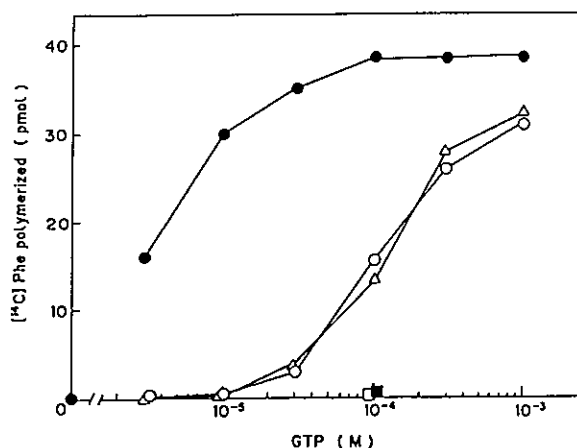


Fig. 2. Changes in the ATP effect on polyphenylalanine synthesis as a function of GTP concentration. Polyphenylalanine synthesis was measured in the absence (○) or in the presence (●) of 0.3 mM ATP as described in Method 2 under "MATERIALS AND METHODS" using 0.3 μ g of EF-3. The effect of the unhydrolyzable analogue AMPPNP (0.3 mM) was also measured (Δ). No activity was observed without EF-3 either in the presence (○) or in the absence (■) of 0.3 mM ATP.

a) AA-tRNA結合反応

遺伝暗号解読反応ともいえる最初のステップ：AA-tRNA結合反応では、制限量のGTP(10 μ M)存在下、EF-3/ATPの添加はPoly(Phe)合成反応の場合と違って必須要因として見られず促進効果として観察される (Fig. 3,4)。Fig.3はAA-tRNA結合反応がEF-1 α 量のみ依存した反応とEF-1 α /EF-3の両者に依存したEF-3による促進反応の2つの段階のあることを示している(12)。また、EF-3/ATPによる促進反応はPoly(U)に対してcognateなPhe-tRNAでは強く見られるのに反して、near-cognateのLeu-tRNA(コドンUUA/Gに対応)

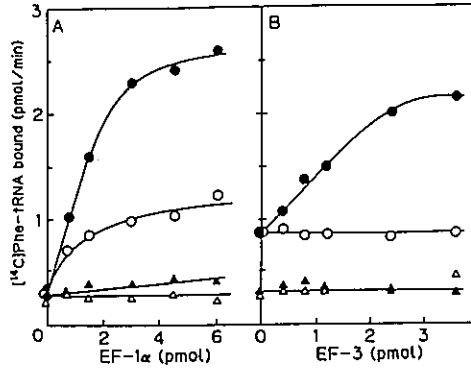


Fig. 3. Effect of increasing amounts of EF-1 α (A) and EF-3 (B) on the poly(U)-programmed Phe-tRNA binding rate on yeast ribosomes. (A) The binding reactions were carried out with increasing amounts of EF-1 α , as indicated, in the standard mixture (○), and with the following additions or omissions: (●) addition of 1.2 pmol of EF-3 and 0.3 mM ATP; (△) omission of poly(U); (▲) omission of GTP. (B) The binding reactions were performed with increasing amounts of EF-3, as indicated, in the standard mixture (○), and with the following additions and/or omissions: (●) addition of 0.3 mM ATP; (△) omission of EF-1 α and GTP; (▲) omission of EF-1 α and GTP, and addition of 0.3 mM ATP. Incubation was performed at 30°C for 1 min.

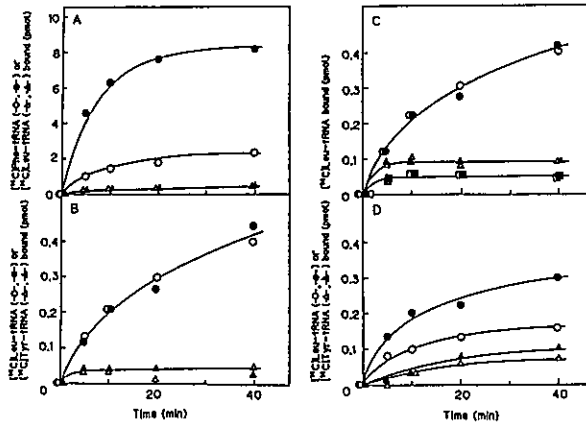


Fig. 4. Comparison of the binding stimulation by EF-3 and ATP between cognate and non-cognate AA-tRNA. A and B, poly(U)-dependent binding; C, poly(U)- (○, ●), poly(A)- (△, ▲) and poly(C)- (□, ■) dependent binding; D, endogenous mRNA-directed binding. Binding was measured with (●, ▲, ■) or without (○, △, □) EF-3 and ATP.

やnon-cognateのTyr-tRNAの結合反応ではこの促進効果が全くみられない (Fig. 4) (12)。AA-tRNA結合反応に用いられるATPはその非水解アナログAMPPNPでは代替できない。Poly(U)リボソームに結合したPhe-tRNAは、EF-1 α /GTPのみの時とEF-1 α /EF-3/ATP共存下で得られた複合体の安定性に相違があった(12)。これらの生化学的解析から、Phe-tRNAのPoly(U)リボソームへの結合はまず、EF-1 α /GTPによって”I-座位”(Fig. 6) (Introductory-Site)に結合、次いでより高い翻訳精度を得るためEF-3/ATP水解反応とEF-1 α の協同作用により正しいコドン・アンチコドンの対合関係にあるAA-tRNAを厳密に選択してA-座位へ転移させペプチド結合形成を可能にしているものと思われる。

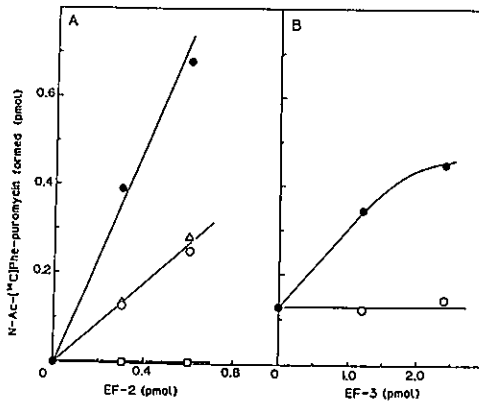


Fig. 5. Effect of increasing amounts of EF-2 (A) and EF-3 (B) on the poly(U)-programmed N-Ac[¹⁴C]Phe-Puromycin formation (EF-2-dependent) on yeast ribosomes. The translocation reaction was measured by the addition of ATP (0.3 mM) (●) or AMPPNP (0.3 mM) (△) to or the omission (□) of GTP from the reaction system (○) including 10 μ M GTP and EF-3 (A) or EF-2 (B). Uritani and Miyazaki, unpublished.

b) ペプチド結合形成反応と転座反応

ペプチド結合形成反応に対してはEF-3/ATPの影響は全く観察されなかった。

EF-2によって駆動される転座反応にもEF-3/ATPの添加促進効果が明確に現われる(21)。Fig. 5に示すように、AA-tRNA結合反応と同様、EF-2量のみ依存した転座反応と、EF-2/EF-3の両者に依存したEF-3による促進転座反応の2段階反応として観察され、この2つの段階で得られるAA-tRNAリボソーム複合体の安定性に差異がみられた(22)。ここでもcognate AA-tRNAをnon-cognate AA-tRNAから厳密に区別して正しいコドン・アンチコドンの関係を精度高く維持するためEF-3/ATP水解が必要とされていることを示している。

これらの生化学的解析を基にわれわれはFig. 6に示すような、新たな酵母伸長反応サイクルのモデルを提唱してきた。このモデルではAA-tRNA結合反応と転座反応がそれぞれ2段階反応として進行し、EF-3/ATPはそれらの第2のステップにはたらいてATPを

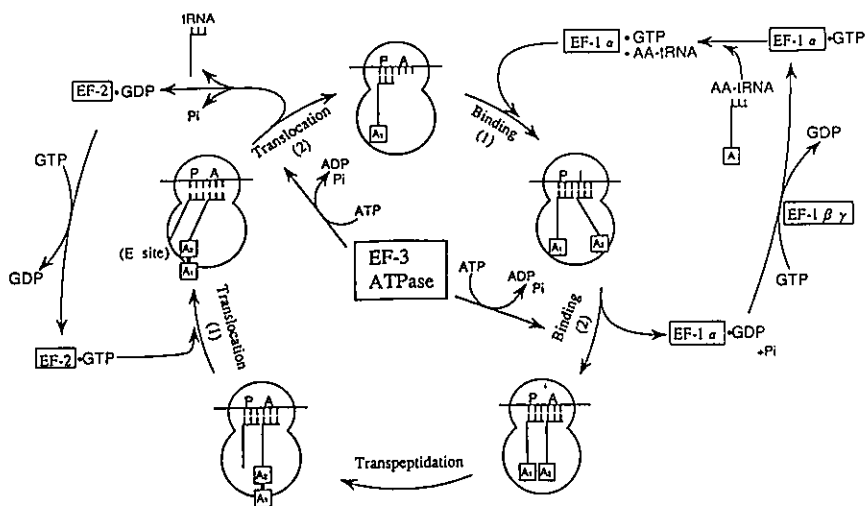


Fig. 6. A Proposed Yeast Peptide Elongation Cycle

水解しそのエネルギーを利用してより高い精度の翻訳機構を稼働させているものと考えられる(23)。

最近の報告では、EF-3/ATPがE-Site(Exit-Site) に働いて遊離のtRNAを放出し、AA-tRNAのA-Siteへの結合に重要な機能を果たしているという(24)。われわれの研究との整合性については今後の研究を待たねばならない。

2. EF-3の機能構造

Qinら(10)が最初に遺伝子のクローニングと配列決定から推定した*Saccharomyces cerevisiae* のEF-3のアミノ酸配列は1044残基からなり、その後*Candida albicans* 1049アミノ酸(25)、*Pneumocystis carinii* 1042アミノ酸(26)の配列が決定され、相互の高い相同性が明らかとなった。特に、ATP-Binding カセットを持つ一群のタンパクに共通したドメインに相同な2つの繰り返されたATP-結合/触媒領域A1,B1とA2,B2(Fig. 7)がみられること、約60残基からなるC-端領域には3つのリジン・クラスターを含む特徴的な荷電アミノ酸配列(Fig. 7)があってRNAとの特異的相互作用が期待されること等が目立つ。コンピュータ解析(27,28)からは、バクテリア・リボソムの"Accuracy Center": S4-S5-S12のリボソム・タンパクのうちS5とEF-3のN-端の102-368領域との類似性、tRNAとの相互作用部位と考えられるARSaseに特有のELVES配列とのHomologyがEF-3の820-875領域に見られること、運動タンパク・ミオシン(ATPase活性をもつ)との類似性等が指摘されている。

このうち、C-端60残基を除去した欠損変異体(EF-3ΔK)はEF-3のもつintrinsic ATPase活性には変化がないが、酵母tRNAとの特異的結合能を殆ど失うとともに、リボソムへの結合、リボソムによるATPase活性の増強が大きく損なわれ、Poly(Phe)合成活性の極度の低下をきたした(Fig. 8)。野生型EF-3はtRNAやE.coli rRNAには結合せず酵母tRNAと特

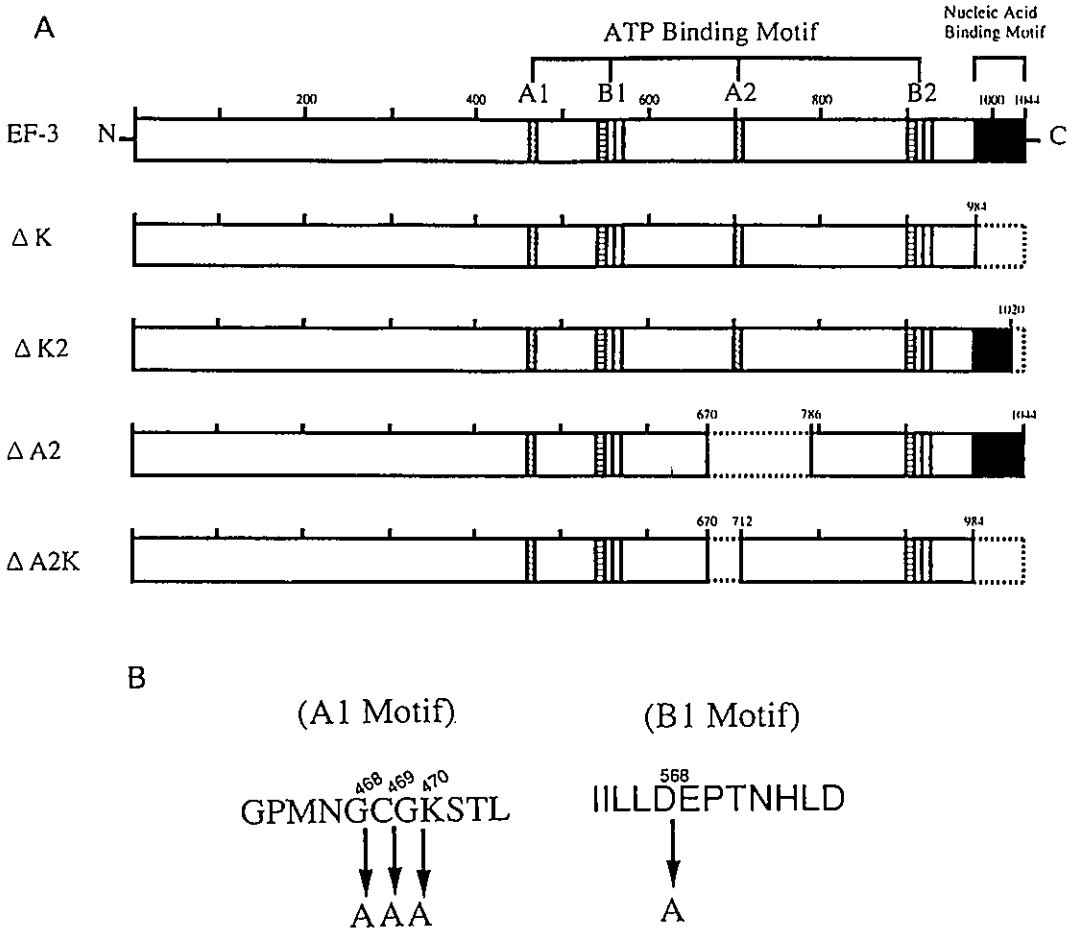


Fig. 7. The Location of Deletions(A) and Amino Acid Substitutions(B) in EF-3 Mutants.

異的な結合をするので、高度に荷電し3つのリジン・クラスターをもつ特徴的なEF-3のC-端配列は、EF-3をリボソーム上に適正に配置し、正しくATP水解機能を発揮させるのに重要な役割を果たしているものと考えられる。

他方、ATP-結合/触媒領域(Fig. 7参照)の欠損変異体($\Delta A2$, $\Delta A2K$)やA1,B1の点変異体(Fig. 8)ではATPase活性とPoly(Phe)合成活性が極度に低下あるいは消失し、Tetrad分析が示すように、EF-3破壊株を相補するin vivo機能も消失する(Fig. 9)。即ち、2つのタイプのATPモチ-フの繰り返し構造が必要でいずれか一方ではEF-3の機能を果たせないことがわかる。このATP-結合/触媒モチ-フの繰り返し構造がどのように協調作用して高い翻訳制度を保持しているか興味深い今後の課題である。

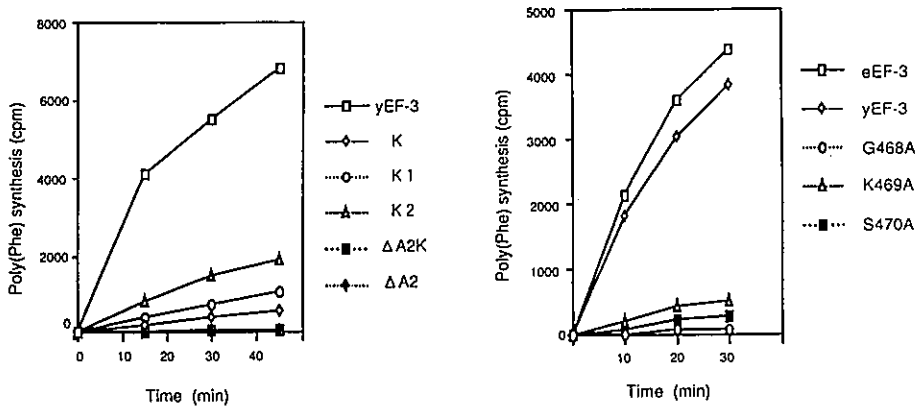


Fig. 8. Poly(Phe) Synthesis Activity of EF-3 Mutants shown in Fig. 7

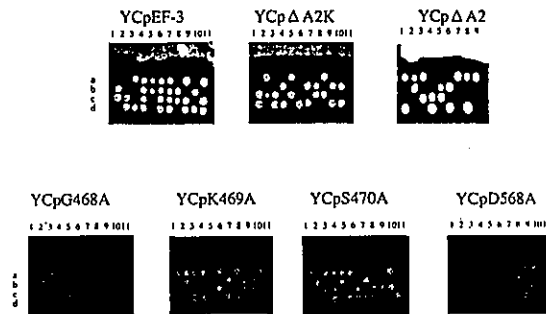


Fig. 9. Tetrad Analysis of Complementation by EF-3 and its Mutants (shown in Fig. 7) on Yeast Plasmid YCp

Table 1. The Occurrence of Soluble Factor EF-3 and Ribosomal ATPase in Different Eukaryotes

	EF-3	Ribosomal ATPase
I. Fungi :		
<u>A. Eumycota :</u>		
1. Ascomycotina :		
<i>S. cerevisiae</i>	+	-
<i>S. pombe</i>	+	-
<i>C. albicans</i>	+	-
<i>C. maltosa</i>	+	-
<i>Neurospora crassa</i>	+	-
2. Zygomycotina :		
<i>Mucor racemosus</i>	+	-
3. Fungi imperfecti :		
<i>Aspergillus nidulans</i>	+	-
<i>Pneumocystis carinii</i>	+	?
<u>B. Myxomycota</u>		
<i>Dictyostelium</i> (slime mold)	?	+
<i>Physarum</i>	?	+
II. Plants :		
Wheat Germ	-	?
<i>Chlamydomonas</i>	-	?
III. Animals :		
Rat Liver	-	+
<i>Artemia salina</i> (brine shrimp)	-	+
Protozoa :		
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	-	+

3. EF-3の分子進化

可溶性因子EF-3は*S. cerevisiae*(5,6), *S. carlsbergensis*(7), *Schiz. pombe*(7), *Hansenula wingei*, 各種の*Candida*(27)等の多くの酵母の他、*Neurospora*, *Aspergillus*, *Mucor* (Table 1) など広く真菌類にみられ、いずれもMW120-135kDaの高分子量モノ・タンパクである。酵母EF-3抗体との反応性をみると、上記各種の酵母EF-3とはよく交差反応するが、*Aspergillus*, 特に*Mucor* EF-3との反応性は極めて弱い。可溶性因子EF-3をもつ真菌類のリボソームは当然ながらそれらの伸長反応系にはEF-3を必要とし、充分洗浄したリボソーム自身にはATPase/GTPase活性は殆どない(Fig.10)。

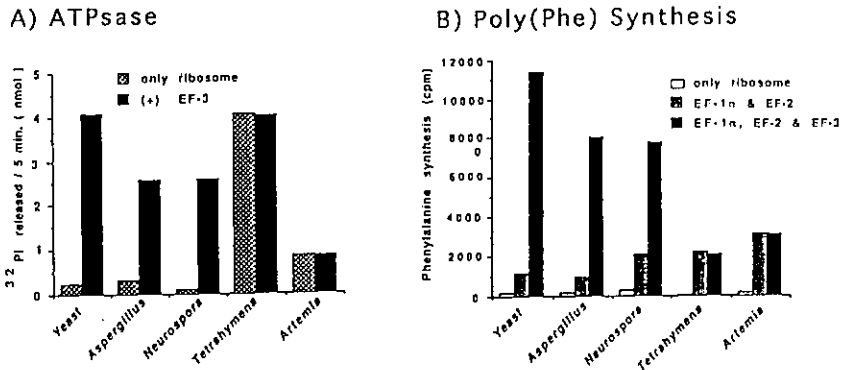


Fig. 10. The ATPase and Poly(Phe) Synthesis on Different Eukaryotic Ribosomes Using Yeast Factors

他方、EF-3を持たないラット肝臓(29)や*Tetrahymena*(13), *Chlamydomonas*, *Artemia*(Fig. 10)からのリボソームは酵母EF-1 α とEF-2のみで充分なPoly(Phe)合成能を示し、酵母EF-3の添加効果はなく、リボソーム自身に強いATPase/GTPase活性をもつ(Fig. 10)。またこれらのリボソームには酵母EF-3のATPase活性を強く増強する能力がない(Fig.10)。Artemiaや*Tetrahymena*からのリボソーム・タンパクでは酵母EF-3抗体と反応する2~4本のバンドを観察している(未発表)。以上のことから、真菌類以外のEukaryotesのリボソームATPaseはEF-3相当因子と考えられ、高分子量のEF-3が数個のタンパクに分裂してリボソームに取り込まれ相互に協同してATPase活性を表わしていると考えられる。従って、ATP水解反応は真核生物に共通した、高い翻訳精度を維持するための重要な反応と思われる。このように存在状態の異なったEF-3とリボソームATPaseの機能上、構造上の対応関係をより綿密に解析することは翻訳系の分子進化の側面からも興味あることと思われる。

参考文献

- 1) K. Moldave, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 1109-1149 (1985)
- 2) H. Trachsel(ed.), "Translation in Eukaryotes", CRC Press, Inc., Boca Raton (1991)
- 3) H. Noller, V. Hoffarth and L. Zimniak, *Science*, **256**, 1416-1419 (1992)
- 4) Y. Kaziro, *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 95-127 (1978)
- 5) L. Skogerson and E. Wakatama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 73-76 (1976)
- 6) B. Dasmahapatra and K. Chakraburty, *J. Biol.Chem.*, **256**, 9999-10004 (1981)
- 7) M. Uritani and M. Miyazaki, *J. Biochem.*, **103**, 522-530 (1988)
- 8) F. Herrera, J. Martinez, N. Moreno, I. Sadnik, C. McLaughlin, B. Feinberg and K. Moldave, *J. Biol. Chem.*, **259**, 14347-14349 (1984)
- 9) A. Kamath and K. Chakraburty, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12596-12598 (1986)
- 10) S. Qin, A. Xie, M. Bonato and C. McLaughlin, *J. Biol.Chem.*, **265**, 1903-1912 (1990)
- 11) M. Sandbaken, J. Lupisella, B. Didomenica and K. Chakraburty, *J. Biol. Chem.*, **265**, 15838-15844 (1990)
- 12) M. Uritani and M. Miyazaki, *J. Biochem.*, **104**, 118-126 (1988)
- 13) M. Miyazaki, M. Uritani and H. Kagiya, *J. Biochem.*, **104**, 445-450 (1988)
- 14) M. Giesen, R. Roman, S. Seal and A. Marcus, *J. Biol. Chem.*, **251**, 6075-608 (1976)
- 15) M. Kozak, *Ann. Rev. Cell Biol.*, **8**, 197-225 (1992)
- 16) L. Skogerson, *Methods in Enzymology*, **60**, 676-685 (1979)
- 17) A. Kamath and K. Chakraburty, *J. Biol. Chem.*, **264**, 15423-15428 (1989)
- 18) J. Hutchison, B. Feinberg, T. Rothwell and K. Moldave, *Biochemistry*, **23**, 3055-3063 (1984)
- 19) M. Miyazaki and H. Kagiya, *J. Biochem.*, **108**, 1001-1008 (1990)
- 20) 小川和子、宮崎正澄、第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会 3-p-0504 (1996), 札幌
- 21) M. Miyazaki, M. Uritani, Y. Kitaoka, K. Ogawa and H. Kagiya, "Post-Transcriptional Control of Gene Expression" (ed. J. McCarthy & M. Tuite), NATO ASI, Series **H49**, pp557-566 (1990)
- 22) H. Okamoto and M. Miyazaki, unpublished
- 23) 宮崎正澄、翻訳機構を操る可溶性因子、蛋白質・核酸・酵素 (増刊号)、「酵母に見る最近の真核生物像」**39**, 550-567 (1994)

- 24) F. Triana-Alonso, K. Chakraburty and K. Nierhaus, *J. Biol. Chem.*, **270**, 20473- 20478 (1995)
- 25) K. Myers, W. Fonzi and P. Sypherd, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1705-1710 (1992)
- 26) M. Ypma-Wong, W. Fonzi and P. Sypherd, *Infect. Immun.*, **60**, 4140-4145 (1992)
- 27) G. Belfield and M. Tuite, *Molec. Microbiology*, **9**, 411-418 (1993)
- 28) G. Belfield, N. Ross-Smith and M. Tuite, *J. Mol. Evol.*, **41**, 376-387 (1995)
- 29) L. Skogerson and D. Engelhardt, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1471-1475 (1977)

Possible mechanistic roles of bent DNA in transcriptional regulation

Takashi Ohyama

Department of Biology, Faculty of Science, Konan University
8-9-1 Okamoto, Higashinada-ku, Kobe 658, Japan

(Received for publication September 30, 1996)

ABSTRACT

Bent DNA structures are sometimes reported to reside within genetic regions that regulate prokaryotic and eukaryotic transcription. The location of bent DNA loci suggests that they play a role in transcription. Various studies have attempted to clarify the functional significance of bent DNA in transcription. Recently, it was demonstrated that the sense of superhelical writhe of a bent DNA modulated the activity of *Escherichia coli* core promoter by influencing formation of the open complex. In addition, a recent study provided the first direct evidence that the bent DNA in the human adenovirus type 2 E1A enhancer is involved in the enhancement of transcription. Surprisingly, it was also revealed in the study that an exogenous prokaryotic DNA curvature with the proper conformation could stimulate transcription of the E1A gene. Consequently, DNA conformation may play a general role in transcriptional stimulation. Possible mechanistic roles of bent DNA in transcriptional regulation are discussed.

Key words: bent DNA/ transcriptional regulation/ promoter/ enhancer/
open complex/ RNA polymerase

転写調節におけるベントDNAの役割

大山 隆

甲南大学・理学部・生物学科

〒658 神戸市東灘区岡本8-9-1

はじめに

二重らせんの軸が塩基配列そのものに依存してカーブした構造をとったDNAが存在する（図1）。このようなDNAはベントDNA (bent DNA) とよばれ (curved DNA および intrinsic DNA curvature は同意語)、タンパク質の結合により誘起されるらせん軸の曲がり (protein-induced DNA bend) とは区別される¹⁻³⁾。ベントDNAは、最初、住血べん毛虫類に属する寄生原虫 *Leishmania tarentolae* のキネトプラスチDNA (k-DNA) の中に発見された⁴⁾。1982年のことである。その後、この構造は生物の種を超えてDNA複製の起点領域や転写の制御領域、それに特異的組換え部位など、DNAの機能発現に重要な役割を果たす領域にしばしば存在することが明らかにされ、広く注目されるようになった。また、機能の解析も精力的に進められ、原核細胞プロモーターにおける機能については、おぼろげながらその輪郭が捉えられた。ここでは転写における機能に絞って、研究の歴史を概観し、併せて最新の知見を紹介する。

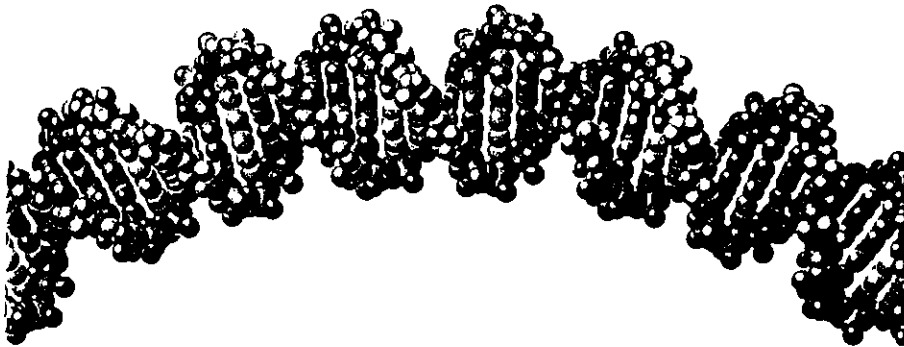


Fig. 1. Schematic drawing of bent DNA structure.

ベントDNAの幾何学

ベントDNAと転写の関係を話を進める前に、ベントDNAの形について概説する。*L. tarentolae*のk-DNA断片の中にはオリゴ(dA)またはオリゴ(dT)のトラクトがおおよそ10塩基対の周期で繰り返し存在している。Mariniらは規則正しい周期で出現するジヌクレオチドApAまたはTpTによりベントDNA構造が形成されるのではないかと考えた⁴⁾。その後さまざまな解析が行われ、現在では塩基配列中に(dA)_nまたは(dT)_n (nは3~6の場合が多い)のトラクトが複数個存在し、しかもそれらがおおよそ10塩基対の間隔で規則正しく分布しているような場合にベントDNA構造が形成されることがわかっている。図2に例を示す。なお、ポリ(dA)またはポリ(dT)ではベント構造をつくることは

▼▼▼▼▼ ▼▼▼▼▼ ▼▼▼▼▼ ▼▼▼▼▼ ▼▼▼▼▼
 TCCCAAAAATGTCAAAAAATTAGGCAAAAAATGCCCAAAATCCCAAAC
 AGGGTTTTTACAGTTTTTTTAATCCGTTTTTTTACGGGTTTTTAGGGTTTG

Fig. 2. Determinants of bent DNA structure. A bent DNA found in *L. tarentolae* k-DNA is shown. Oligo(dA) tracts are indicated by arrow heads.

できない。dAまたはdTの連続した配列が適当な間隔で分断されることが必要なのである。

ベントDNAにもいろいろな形がある。Calladineらは電気泳動におけるベントDNAの挙動を詳細に調べ、ベントDNAに特徴的な動き方（遅れて泳動されるだけでなく、塩基配列に依存して遅れ方が異なる）がゲルマトリックス中で生じるには、ベントDNAの形が三次元的でなければならないことに気がついた。そこで、個々のベントDNAの形状を彎曲率とねじれ（隣接塩基対間のロール角度とねじれ角度をもとにして計算される）に特定の値を持つ立体的な曲がり（スペースカーブ；space curve）としてとらえたモデルをつくり、それ以前に報告のあった泳動挙動に関する実験データをうまく説明した⁹⁾。少し難解であるので、理論の詳細は省いて結論だけ示そう。

DNAは水溶液中では約10.5塩基対で1回転のらせんを形成するが、オリゴ(dA)トラクトまたはオリゴ(dT)トラクトがこれと同じ周期で正確に反復する配列の場合は平面上でカーブした形のベントDNA構造（plane curve）が形成され、10.5よりも少ない塩基対数（たとえば、9または10塩基対）で反復する配列の場合には左巻きのスーパーコイルが形成され、それよりも多い塩基対数（11または12塩基対）での反復では右巻きスーパーコイル状のベントDNAが形成されるという（図3）。発表以来、この理論は多くの研究者に支持されている。天然のベントDNAはこれらの基本構造、またはそれらを組み合わせた構造をとっているものと思われる。

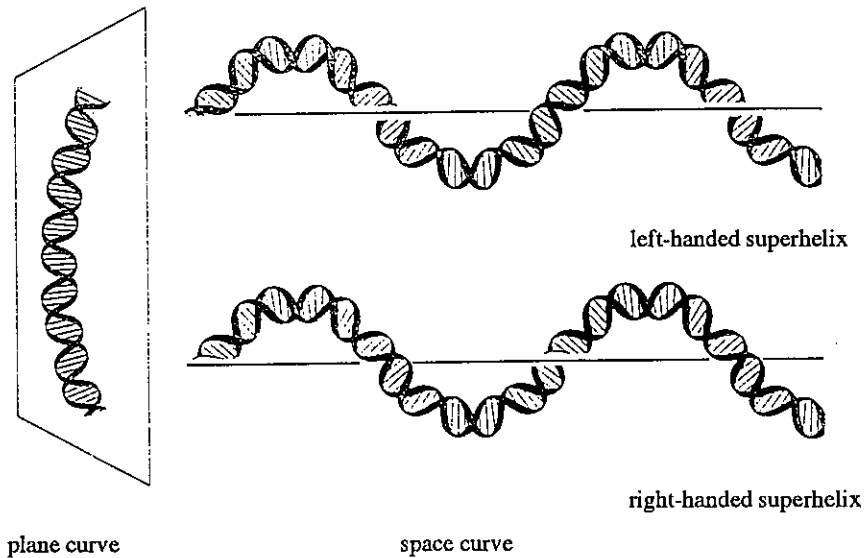


Fig. 3. Plane and space curves.

原核細胞プロモーターにおける機能

原核細胞では、プロモーター領域にベントDNAを持つ遺伝子が数多く報告されている⁶⁻¹⁴。これらの多くは、-35配列のすぐ上流にベントDNAを持っている。この事実は、転写においてベントDNAが何らかの機能を持っていることを暗示している。実際にいくつかのプロモーターでベントDNAが機能していることが実験的に示された。最初にこれらのうち代表的な三つの報告について紹介する。

BossiとSmithは、*Salmonella typhimurium*のtRNAオペロンのプロモーター領域に存在するベントDNA構造を“正常な”（つまり曲がっていない）構造に変えた変異体を作製し、プロモーターの活性を測定した⁹。その結果、活性は野生株の約40%のレベルにまで低下していることが明らかになった。この報告はベントDNAが意味のある構造であることを実験的に示した最初のものである。次に、McAllisterとAchbergerは枯草菌ファージSP82の*Alu156*プロモーターを用い、ベントDNAの曲がりの配向とプロモーター活性との関係を調べた^{10,15}。彼らは-35配列と上流のベントDNAとの間に短いDNA断片を挿入することで、プロモーターに対するベントDNAの回転配向が少しずつ異なる種々の変異体を作製した。CATアッセイを用いた実験でも、*in vitro*転写系を用いた実験でも、転写活性はベントDNAの空間的配置が野生型とほぼ同じになるような構造をとった変異体では高く、それ以外のものでは低いことが明らかになった。特に、プロモーターに対するベントDNAの回転配向が野生型での配向に比べて180°ずれるような挿入をした場合の活性は低かった。この報告は、プロモーターが効率的に働くためにはベントDNAが必須な構造であることを示したばかりでなく、ベントDNAのプロモーターに対する配向が重要であることを示した点で一步踏み込んだものといえる。

それではベントDNAの立体構造、つまり形についてはどうであろう。大腸菌プラスミドpUC19上でアンピシリン耐性遺伝子として働く β -ラクタマーゼ遺伝子のプロモーターの上流にもベントDNAが存在する。この遺伝子の場合、オリゴ(dA)のトラクトが-76の位置から-31の位置にかけて平均11.3塩基対（ $76-31=45\text{bp}$ 、 $45/4=11.3\text{bp}$ ）の周期で存在している。その値から、このベントDNAは右巻きスーパーコイルの一部分のような立体構造をとっているものと推察される（Calladine則）。筆者らはベント中心付近に短い合成オリゴヌクレオチドを挿入してベントDNAの形を変え、転写への影響を調べた¹¹。その結果、立体構造を大きく変化させるような変異（4塩基対および16塩基対の挿入）を導入すると、大腸菌内における β -ラクタマーゼプロモーターの活性は大きく低下するが、もとの形をあまり変化させないような変異（10塩基対の挿入）を導入した場合には、活性の低下は前者ほど顕著ではないことが明らかになった。これはベントDNAの形も転写に重要な役割りを果たしていることを示している。

以上の研究で、ベントDNAが転写において何らかの機能を持っていること、そしてその形およびプロモーターに対する配向が機能発現に重要な役割を果たしていることが明らかになった。それではその機能とは何であろうか。 β -ラクタマーゼプロモーターの例のように、プロモーターに存在するベントDNAの多くは右向きのsuperhelical writhe（二重らせんの軸が右方向にねじれた構造：右巻きスーパーコイルの一部分に相当する）を持っている。また、RNAポリメラーゼがプロモーターに結合する際、DNAはポリメラーゼの上を左巻きに巻きつくという報告がある¹⁶。Traversは

これらの点を考え合わせて、ベントDNAはプロモーター領域に歪みを誘起するようにあらかじめ準備された構造として存在しているのではないかと考えた¹⁷⁾。つまり、開鎖構造はねじれの向きが強制的に変化させられる過程で生じる歪みを利用して形成される、と考えたのである。確かにこのように考えればベントDNAの存在意義が理解できる。上述の筆者らの実験結果もこの仮説に矛盾しない。そこで筆者らは次にこの仮説を検証するための実験を行った。

解析には上述のβ-ラクタマーゼプロモーターを用いた。まず、Calladine則に従い、約50塩基対の右向きsuperhelical writheを持つ（以下、右巻きスーパーコイル状とよぶ）ベントDNA、平面カーブ状ベントDNA、または左向きsuperhelical writheを持つ（以下、左巻きスーパーコイル状とよぶ）ベントDNA断片をデザインし、化学合成した。次にこれらを用いて-35配列の上流に存在するベントDNA領域を置換し（図4）、得られたプロモーターの細胞内での活性を調べた¹⁸⁾。結果は、上流に右巻きスーパーコイル状のDNAを持つpRSH系プラスミドのプロモーターの活性は、ベントDNA構造を持たないpST4のプロモーター活性よりも確かに高いことを示した（表1）。-35配列に接して右向きねじれを持つpRP系プロモーターの活性も高かった。一方、左巻きスーパーコイル状の断片を持つpLSH4のプロモーターは最も低い活性を示した。

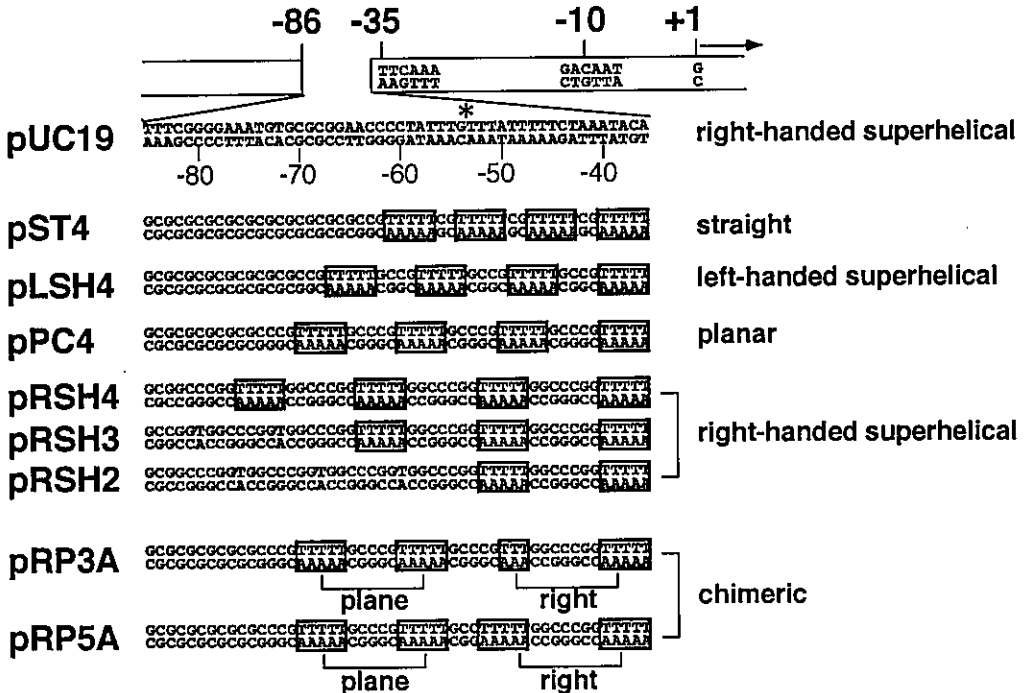


Fig. 4. Sequence and shape of the modified regions upstream of the β-lactamase promoter¹⁸⁾. T-tracts are indicated using boxes. The center of the wild-type curvature is marked with an asterisk. In the sequences of pRP3A and pRP5A, "plane" refers to a small portion of a plane curve while "right" refers to a small portion of a molecule having a right-handed superhelical configuration.

Table 1. Strength of the mutant β -lactamase promoters *in vivo*¹⁸⁾

plasmid	shape of the curvature	mRNA per β -lactamase gene
pST4	none (straight)	0.11 \pm 0.00
pLSH4	left-handed superhelical	0.04 \pm 0.00
pPC4	planar	0.10 \pm 0.01
pRSH4	right-handed superhelical	0.15 \pm 0.01
pRSH3	right-handed superhelical	0.22 \pm 0.02
pRSH2	right-handed superhelical	0.16 \pm 0.01
pRP3A	chimeric (right+plane)	0.14 \pm 0.01
pRP5A	chimeric (right+plane)	0.19 \pm 0.01

The number of mRNA molecules transcribed from a single gene was calculated as the ratio of signal intensities (mRNA over plasmid DNA). Values represent means \pm SD of triplicate determinations.

さらに、KMnO₄フットプリント法による解析で、pRSH3ではRNAポリメラーゼの結合後にプロモーターの融解が促進され、逆にpLSH4では抑制されることが証明された(図5)。以上、筆者らの解析によりTraversの仮説は実験的に証明された。しかしながら、原核細胞のプロモーター領域には、左巻きスーパーコイル状のベントDNAや平面カーブ状のベントDNAも存在するし、ベントDNAが存在しない場合もある。筆者らはこの事実と上述の実験結果から、ベントDNA構造はコアプロモーターの活性を調節する“モジュレーター”として機能していると考えている。

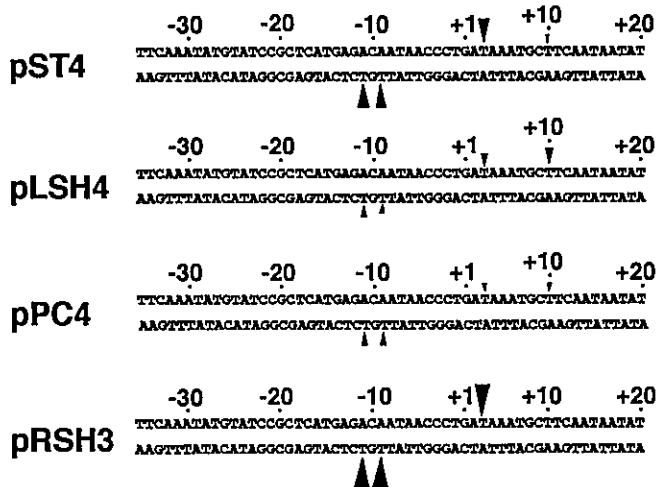


Fig. 5. Extent of promoter DNA melting induced by RNA polymerase binding¹⁸⁾. The arrow heads represent residues that became hyperreactive to KMnO₄ in the complex with RNA polymerase when compared with the pattern observed at each promoter in the absence of the protein. The extent of the hyperreactivity, which reflects the extent of DNA melting, is indicated by the size of the arrowhead (bigger arrowhead indicates higher reactivity).

真核細胞プロモーターにおける機能

真核細胞系の遺伝子で転写の開始領域や調節領域にベントDNAを持つものもいくつか知られている¹⁹⁻²²⁾。例えば、ヒトβ-アクチン遺伝子はCCAATボックス近傍に²¹⁾、酵母*Saccharomyces cerevisiae*の*MFα 1*遺伝子はUAS (upstream activation site) に¹⁹⁾、また、ヒトアデノウイルス2型 (Ad2) のE1A遺伝子はエンハンサー内にベントDNAを持っている (図6)²⁰⁾。これらはベントDNA領域内にいずれも転写調節配列を持っており、ベントDNA構造の重要性が議論されている。しかし、後述するAd2エンハンサー内のベントDNAを除いて、転写にベントDNAが関与していることを示す実験的証拠は得られていない。このことは真核細胞での解析が極めて難しいことを物語っている。高次構造と機能の相関を解析する場合、塩基配列を改変することで高次構造を改変し、その機能への影響を調べるとするのが一般的な方法である。しかし、系の比較的単純な原核細胞の場合にはこの手法により一定の結論を導くことも可能であるが、真核細胞の場合はほとんど不可能である。複雑な系ではパラメーターが多いため、この方法で得られる結果が塩基配列の変化によるものか、高次構造の変化によるものか、または両者の複合的效果によるものかを区別しにくいからである。

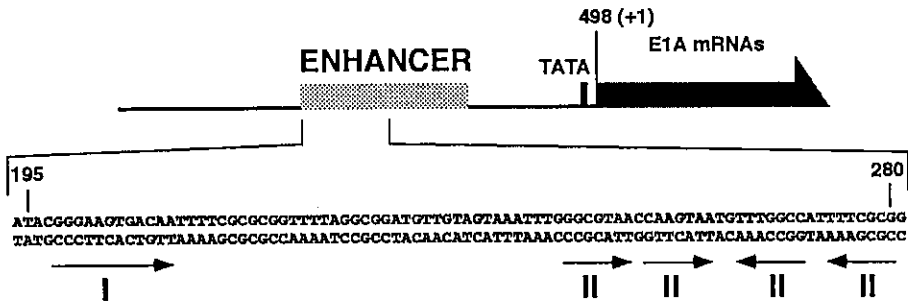


Fig. 6. Curved DNA region in the Ad2 enhancer²⁰⁾. The repeated sequence elements required for enhancer function are indicated by I and II.

最近、Ad2エンハンサー内のベントDNAの重要性が証明された²³⁾。ベントDNAは温度の変化に依存してその立体構造を変化させる。この性質に着目し、野生型のAd2エンハンサーを用いて種々の温度下でのエンハンサーの活性が調べられた。その結果、エンハンサーのベントDNAコンホメーションが転写促進能に重要な役割を果たしていることが初めて証明された。また、この研究では驚くことに、λファージの複製起点に存在するベントDNAでも特定のコンホメーションをとりさえすれば、Ad2エンハンサーの代わりにE1A遺伝子の転写を促進できることが明らかにされた。これはベントDNAの構造特性そのものが転写促進機構に関与していることを示唆するものである。原核細胞で見られたように、ベントDNA構造が二重らせん構造の融解 (melting) 過程に効果を及ぼすのかもしれない。

Kimらも、TATAボックスだけを持つ“minimal”プロモーターの上流に人工合成したベントDNAを組み込んだ系を用いてベントDNAにより転写が促進される現象を観察し、ベントDNAの構造特性の重要性を主張した²⁴⁾。以上のように、真核細胞遺伝子の転写においてもベントDNAが何ら

かの機能を発現していることがようやく実証されつつある。しかし、機能発現のメカニズムについては現在のところ全く何もわかっていない。この問題にアプローチするためには、プロモーターのタイプや強度とベントDNAの形や存在部位との関係に関する情報を増やすことが急務と考えられる。この視点に立って、筆者らはゲノムDNAの消化物からベントDNAのみを効率的に分画する方法²⁵⁾と、この中からプロモーター活性を持つものを選択的に捕集するための新しいシステム²⁶⁾を開発してきた。そしてこれらを用いて、これまでにベントDNAを持つプロモーターを数種類クローン化した。現在、プロモーター強度と高次構造の解析を進めるとともに、プロモーターの収集をさらに続けている。

おわりに

転写におけるベントDNAの機能について現在わかっていることを簡単に解説したつもりである。真核細胞における機能については今もって未解明であることがおわかりいただけたことと思う。ここではオリゴ(dA)またはオリゴ(dT)により形成される典型的なベントDNA構造とその機能に関して述べたが、これら以外の配列もベントDNA構造を形成する可能性があることを付け加えておく²⁷⁾。なお、筆者はベントDNAに課せられている役割は多様であると考えているが、一方で、存在領域が類似しているベントDNAは互いに同じような高次構造をとり、それぞれに求められている中心的な役割は互いに共通しているのではないかと考えている。誌面の都合もあり本稿では触れなかったが、現在、ベントDNA構造とヌクレオソームのポジショニングの関係、そしてこれらと転写調節の関係についても解析が精力的に進められている。転写におけるベントDNAの機能発現機構の全貌が明らかにされる日は、それほど遠くないものと思われる。

この総説の基礎となった筆者らの研究は、引用文献に挙げられた多くの共同研究者の方々の御協力の賜物であり深く感謝したい。また、文部省科学研究費、NEDO、(財)昭和報公会学術研究助成、甲南学園平生太郎科学研究基金よりの多大な研究助成にも深く感謝したい。

文献

- 1) 大山 隆 (1990). ベントDNAと転写制御. 蛋白質核酸酵素 **35**, 248-252.
- 2) 南雲正彦, 大山 隆 (1990). 転写因子が誘起するDNA二重らせんの曲がり. 実験医学 **8**, 364-367.
- 3) 大山 隆 (1993). ベントDNAの形と機能. *Mebio* **10**, 6-13.
- 4) Marini, J. C., Levene, S. D., Crothers, D. M., and Englund, P. T. (1982). Bent helical structure in kinetoplast DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**, 7664-7668.
- 5) Calladine, C. R., Drew, H. R., and McCall, M. J. (1988). The intrinsic curvature of DNA in solution. *J. Mol. Biol.* **201**, 127-137.
- 6) Bossi, L. and Smith, D. M. (1984). Conformational change in the DNA associated with an unusual promoter mutation in a tRNA operon of Salmonella. *Cell* **39**, 643-652.
- 7) Gourse, R. L., de Boer, H. A., and Nomura, M. (1986). DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*:

- growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell* **44**, 197-205.
- 8) Mizuno, T. (1987). Static bend of DNA helix at the activator recognition site of the *ompF* promoter in *Escherichia coli*. *Gene* **54**, 57-64.
 - 9) Plaskon, R. R. and Wartell, R. M. (1987). Sequence distributions associated with DNA curvature are found upstream of strong *E. coli* promoters. *Nucl. Acids Res.* **15**, 785-796.
 - 10) McAllister, C. F. and Achberger, E. C. (1988). Effect of polyadenine-containing curved DNA on promoter utilization in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **263**, 11743-11749.
 - 11) Ohyama, T., Nagumo, M., Hirota, Y., and Sakuma, S. (1992). Alteration of the curved helical structure located in the upstream region of the β -lactamase promoter of plasmid pUC19 and its effect on transcription. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1617-1622.
 - 12) Lavigne, M., Herbert, M., Kolb, A., and Buc, H. (1992). Upstream curved sequences influence the initiation of transcription at the *Escherichia coli* galactose operon. *J. Mol. Biol.* **224**, 293-306.
 - 13) Espinosa-Urgel, M. and Tormo, A. (1993). σ^s -dependent promoters in *Escherichia coli* are located in DNA regions with intrinsic curvature. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3667-3670.
 - 14) Highlander, S. K. and Weinstock, G. M. (1994). Static DNA bending and protein interactions within the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin promoter region; development of an activation model for leukotoxin transcriptional control. *DNA and cell biol.* **13**, 171-181.
 - 15) McAllister, C. F. and Achberger, E. C. (1989). Rotational orientation of upstream curved DNA affects promoter function in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **264**, 10451-10456.
 - 16) Amouyal, M. and Buc, H. (1987). Topological unwinding of strong and weak promoters by RNA polymerase: a comparison between the *lac* wild-type and the UV5 sites of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **195**, 795-808.
 - 17) Travers, A. A. (1990). Why bend DNA? *Cell* **60**, 177-180.
 - 18) Hirota, Y. and Ohyama, T. (1995). Adjacent upstream superhelical writhe influences an *Escherichia coli* promoter as measured by *in vivo* strength and *in vitro* open complex formation. *J. Mol. Biol.* **254**, 566-578.
 - 19) Inokuchi, K., Nakayama, A., and Hishinuma, F. (1988). Sequence-directed bends of DNA helix axis at the upstream activation sites of α -cell-specific genes in yeast. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6693-6711.
 - 20) Ohyama, T. and Hashimoto, S. (1989). Upstream half of adenovirus type 2 enhancer adopts a curved DNA conformation. *Nucl. Acids Res.* **17**, 3845-3853.
 - 21) Kawamoto, T., Makino, K., Orita, S., Nakata, A., and Kakunaga, T. (1989). DNA bending and binding factors of the human β -actin promoter. *Nucl. Acids Res.* **17**, 523-537.
 - 22) Schroth, G. P., Siino, J. S., Cooney, C. A., Th'ng, J. P. H., Ho, P. S., and Bradbury, E. M. (1992). Intrinsically bent DNA flanks both sides of an RNA polymerase I transcription start site: both regions display novel electrophoretic mobility. *J. Biol. Chem.* **267**, 9958-9964.
 - 23) Ohyama, T. (1996). Bent DNA in the human adenovirus type 2 E1A enhancer is an architectural

- element for transcription stimulation. *J. Biol. Chem.*, in press.
- 24) Kim, J., Klooster, S., and Shapiro, D. J. (1995). Intrinsically bent DNA in an eukaryotic transcription factor recognition sequence potentiates transcription activation. *J. Biol. Chem.* **270**, 1282-1288.
- 25) Ohyama, T. and Kusakabe, T. (1993). High-efficiency shotgun cloning of curved DNA segments from chromosomal DNA. *Anal. Biochem.* **212**, 287-289.
- 26) Kadokawa, Y., Kusakabe, T., Kamachi, Y., Isobe, K., Kondoh, H., and Ohyama, T. (1995). A murine *Thy-1.2* reporter vector containing a SV40 origin for rapid cloning and analysis of eukaryotic promoters. *Gene* **153**, 277-278.
- 27) Brukner, I., Diakic, M., Savic, A., Susic, S., Pongor, S., and Suck, D. (1993). Evidence for opposite groove-directed curvature of GGGCCC and AAAAA sequence elements. *Nucl. Acids Res.* **21**, 1025-1029.

DNA-Protein Interaction Involved in Centromere Heterochromatin Organization of Human Chromosome.

Kenji Sugimoto

Laboratory of Applied Molecular Biology, Department of Applied
Biochemistry, Osaka Prefecture University,
1-1 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 593, Japan.
Tel: 0722-52-1161 ext. 3640; Fax: 0722-52-0341

(Received for publication October 2, 1996)

ABSTRACT

Centromere/kinetochore is defined as the microtubule attachment site at the primary construction of chromosomes. Electron microscopy studies have revealed that mammalian kinetochore, lying directly on the surface of centromere heterochromatin, has the trilaminar structure composed of an electron-dense inner plate, a translucent middle zone and an electron-dense outer plate. However, the molecular basis of centromere/kinetochore structure has not been characterized extensively. It seems to be assembled, more or less, from the underlying centromere heterochromatin during the cell division cycle. Although it can not be visible in interphase nuclei by conventional electron microscopy, a distinct number of sites could be stained even after telophase by anticentromere autoantibodies. This antigenic structure, which persists as discrete spots in interphase, is called "presumptive kinetochore". Thus far, three major centromere autoantigens (CENTromere Proteins; CENP-A, CENP-B and CENP-C) together with HP1, human homolog of *Drosophila* heterochromatin-associated protein 1, are shown to be localized to centromere throughout the cell cycle. We have previously reported that they are structural components of centromere/kinetochore heterochromatin which possess DNA-binding activity in vitro. In this review, the domain structures of these proteins are described and compared with those of other mammalian homolog or yeast centromere proteins.

染色体セントロメアを構成する蛋白質とゲノムDNAとの接点

大阪府立大学 農学部 応用生物化学、及び、

先端科学研究所 ハイブリッド生物科学 杉本憲治

1. 染色体の分配

細胞分裂における染色体の安定分配は、その種固有の遺伝物質（DNA）を子孫に正確に伝えていくための重要な過程である。例えば、高等生物の場合では、DNAは静止期には核内で長く伸びたヌクレオソーム構造をしているが、分裂期が近づくにつれ次第に折りたたまれてゆき、やがて核膜は崩壊し、分裂中期には、いわゆる「染色体」として光学顕微鏡で観察できるまでに凝縮する（図1）。

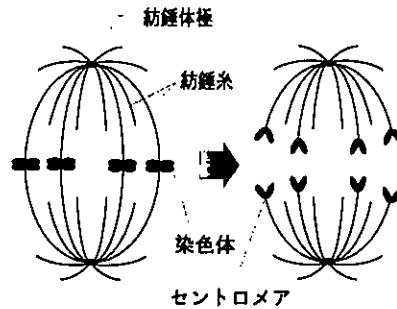


図1. 染色体の分配とセントロメア

この後、染色体は紡錘系に捕らえられ両極に移動・分配されていくが、この紡錘系の付着する染色体上の領域—多くの場合、染色体のくびれ（一次狭窄）の部分に相当する—はセントロメアと呼ばれている。セントロメアは、単に染色体に付着した構造物ではなく、その分配のために特殊化した染色体の一部であり、他の染色体の部分と同様、DNAと蛋白質から構成されていると考えられる。

この分裂期の染色体分配の機構は、下等真核生物である酵母から高等真核生物であるヒトに至るまで、いくらかの違いはあるものの基本的な仕組みは普遍であると考えられている。この高等生物の精巧な有糸分裂の過程は、原核生物の分裂機構から徐々に進化したと考えられる。原核生物では複製した染色体（厳密には核様体）は細胞膜の特別な領域に付着しており膜の成長と共に分配されてゆく。例えば、原始的な真核生物では有糸分裂には膜付着機構が残っており、染色体は微小管には直接結合せず、核膜の内側に結合したまま移動分配される。また、超べん毛類、一部の原生動物では、姉妹動原体はそのまま核膜に組み込まれているようで、核膜の成長と共に分離し、極に近付くと、核膜を隔てて、核外より動原体微小管と結合し、両極に移動する（文献1の図参照）。

2. セントロメアと動原体

「セントロメア」と「動原体」という用語は、微小管が付着する染色体上の部位にあたる同義語としてよく用いられている。形態学的には、「セントロメア」とは、ひろく、顕微鏡レベルで観察される染色体の一次狭窄部分をさし、「動原体」とは、セントロメア領域のうち、特に、微小管が挿入されている部分の染色体表面上の特殊な微細構造をさす。従って、動原体は、哺乳動物の染色体においては、電子顕微鏡下で観察される染色体のくびれの部分に存在するdisc様の構造をいう(2)。しかし、「セン

トロメア」はまた、遺伝学的に求められた遺伝子連鎖地図上の組換えを起こさないとされる座位 (genetic locus)、或るいは、染色体の安定分配にかかわる DNA 配列に対しても用いられており、例えば酵母のように、染色体自体があまりにも小さく形態学的に同定が困難であるが、逆に、セントロメア DNA が単離同定されている場合には、遺伝学的な座位としての「セントロメア」と形態学的な意味での「動原体」とを同義語として用いているようである (3)。ここでは、セントロメアを、広義に、動原体構造を含む、哺乳動物の染色体一次狭窄部位全体にあたるような機能構造体全体をさすことにする。

以下、その分子構造がもっともよく解析されている出芽酵母のセントロメアの構造を概要した後、現在、比較的解析が進んできたヒトのセントロメア蛋白質について述べ、最後にこれらの構成成分を相互に比較してみたい。

3. 酵母のセントロメア

酵母においては染色体の分配は核膜が存在したままの状態で行われる。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の染色体は非常に小さく、225kb から 1.9Mb の大きさであり、最も大きな染色体でも、原核生物である大腸菌のゲノム (5Mb) よりも小さい。既に、有糸分裂、並びに、減数分裂を通して遺伝子の安定分配に必須な DNA 配列と

表 1. 出芽酵母のセントロメア構成蛋白質

A. CHROMATIN STRUCTURAL PROTEINS

1. DNA-binding complexes

CP1 (CBF1/CPF1/CEP1)	58kDa	HLH-like DNA-binding	CDEI(8bp)
MIF2	65kDa	A-T DNA-binding motif	CDEII(85bp)
		CENP-C-like?	
CBF3 240kDa complex			CDEIII(25bp)
CBF3A (CBF2/NDC10/CTF14/CEP2)	110kDa	GTP-binding	
CBF3B (CBF3/CEP3)	64kDa	DNA-binding/Zn-finger/acidic region	
CBF3C (CTF13)	58kDa	acidic serine-rich region	
CBF3D (SKP1)	29kDa	cell cycle progression	

2. CBF3-associated proteins

TOP2	160kDa	topoisomeraseII
CBF5	<64kDa	microtubule-binding
KAR3	80kDa	minus-end-directed motor

3. Putative kinetochore proteins?

CSE1	109kDa	chromosome segregation
CSE2	17kDa	chromosome segregation
CSE4	27kDa	histone H3-like, CENP-A-like

B. MODIFYING ENZYMES

MCK1	protein kinase (CBF3A&CBF5 suppressor)
CDC34 (LBC3)	ubiquitin-conjugating (CBF3A suppressor)

注) 通常の蛋白質の表記法とは異なり、ここでは全て大文字で示した。

して、僅か125塩基対の「セントロメアDNA」の配列が単離・同定され、その一次構造も明らかにされている。この配列は、CDEI、CDEII、CDEIIIと呼ばれる三つの要素からなる(3)。近縁の*Kluyveromyces lactis*のセントロメアDNAも同様な構造をしていることが示されているが、出芽酵母では機能しないし、逆の場合も同様である(4)。形態学的には、この領域に1本の微小管が結合しているようである。

もう一つのセントロメア構成成分である「セントロメア蛋白質」については、二つのアプローチにより解析が行われてきた。一つは生化学的なアプローチであり、先のセントロメアDNAのそれぞれの要素に結合する蛋白質CP1や蛋白質複合体CBF3の構成ポリペプチドが同定されている。今一つは遺伝学的なアプローチであり、染色体の安定分配を損なう突然変異体を単離し、その遺伝子産物として同定されている。表1にまとめたように、研究者によって様々な名前がつけられており、例えば、CEP(セントロメア蛋白質)(centromere protein)のような簡単に類推できるものから、CSE(染色体分離)(chromosome segregation)、MIF(有糸分裂忠実度)(mitotic fidelity)、CTF(染色体伝達忠実度)(chromosome transmission fidelity)といったちょっとみ

ただけでは何なのか分かりにくいものまである。現在では、部分精製されたセントロメアDNA・蛋白質複合体を用いて試験管内でのATP依存的な運動も観察されており(5)、出芽酵母ではセントロメアの*in vitro*再構成系の確立も時間の問題となっている。図2に、現在考えられている出芽酵母のセントロメアの分子構造体の模式図を載せた。

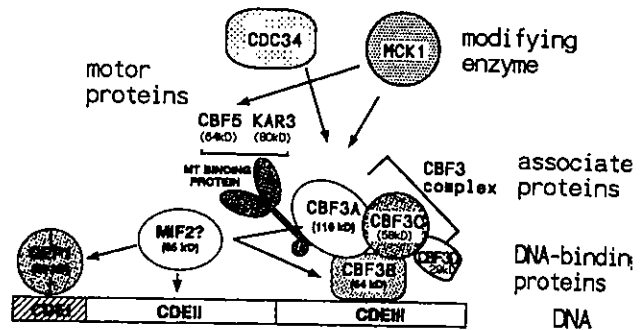


図2. 出芽酵母のセントロメアの分子構造モデル

Meluh & Koshland (1995) Mol. Biol. Cell 6:793-807. の図をもとに作成した。

一方、分裂酵母では、機能するセントロメアDNAとして80-100kbのDNA配列が決定されている(6)。しかしながら、その大きさのためか、蛋白質成分の解析の方はそれほど進んではいない。同じ酵母とはいえ、出芽酵母とは進化的にはかなり隔っており、むしろ、構造的には高等生物に近いのかもしれない。

4. ヒト染色体のセントロメア

ヒトを含め多くの高等真核生物においては、染色体の分配に先立って核膜の崩壊が起こる。これら生物の染色体は非常に大きく、ヒトで40Mbから260Mbの大きさで(7)、最も小さい染色体でも大腸菌のゲノムの10倍程もある。したがって、哺乳動物のセントロメアは先の酵母に比べ桁違いに大きいのは勿論のこと、電子顕微鏡による観察によると、形態学的にもさらに複雑な構造をしていることが明らかにされている。一

つのセントロメア（動原体）あたり30-40本の微小管が結合しているとされる。それぞれの領域に特異的な抗体を用いた免疫電顕により、セントロメアはさらに、姉妹染色体が対合する部分である「対合領域」、微小管が直接結合する部分である「動原体領域」、これらの中に存在する「中央領域」の三つに分けることができる(8)(図3)。

酵母の場合と異なり、「染色体の安定分配に機能する」という意味でのセントロメアDNAの単離・同定には成功していない。ただし、Y染色体においては、幾つかのヘテロなY染色体を用いた解析から、有糸分裂において必要な領域が推定されている(9)。また最近、テロメア配列を挿入するといった染色体操作により、安定なミニ染色体を構築する試みもなされている(10)。

現在のところ、セントロメアを構成するDNAの候補として、*in situ*ハイブリダイゼーション法により光学顕微鏡レベルで「セントロメア領域に局在する」幾つかの繰り返し配列（サテライトDNA）が単離・同定されている(11)。これらが、染色体分配においてどのように機能しているのかは、今後の解析を待たねばならない。

一方、ある種の自己免疫疾患患者、特に強皮症患者の作り出す自己抗体（抗セントロメア抗体）や、染色体骨格（Scaffold）を直接抗原として免疫することにより得られた抗セントロメアモノクローナル抗体を利用して、いわゆる「動原体」を含めて、セントロメア領域を構成している幾つかの蛋白質が同定され、その遺伝子もクローン

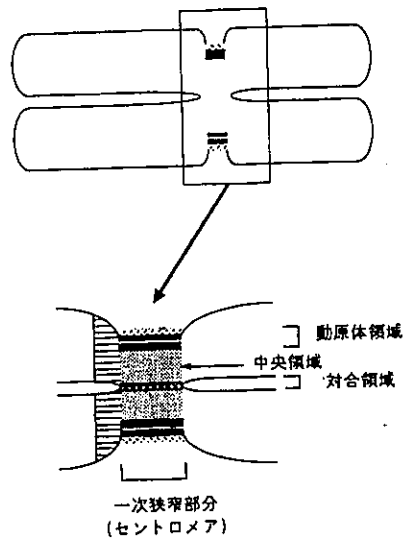


図3. ヒト染色体セントロメアの機能領域

表2. ヒトセントロメアを構成する主な蛋白質

A. Centromere DNA-binding proteins

CENP-A	17kDa	140a.a.	histone H3-like	DNA binding ?
CENP-B	80kDa	599a.a.	central domain	alphoid DNA binding
CENP-C	140kDa	943a.a.	kinetochre inner plate	binding to kinetochore DNA?
HP1	26kDa	191a.a.	secondary constriction	binding to classical satellite DNA?

B. Centromere associated proteins

CENP-E	310kDa	2663a.a.	outer kinetochore	kinesin-like motor
CENP-F	400kDa	3210a.a.	outer kinetochore	?
INCENPs	155kDa	877a.a.	pairing domain	(chicken homolog)
	135kDa	839a.a.		

化されている(表2)。現在までに少なくとも三つのセントロメア抗原蛋白質にDNA結合活性が見いだされており(12-14)、しかも、その内の一つはある種のサテライトDNAと直接相互作用することが示されている(12,15,16)。また、これらとは別に染色体の移動のためのモーター活性を担っていると考えられる蛋白質も明らかにされた(17)。ここでは、これらのうちDNA結合能を持ち、直接セントロメアDNAと相互作用し、セントロメア特異的クロマチン構造を形成していると考えられるものについて触れていく。

5. DNA結合能を持つヒトセントロメア蛋白質

5-1. セントロメア蛋白質B (CENP-B)

CENP-Bは、最初にその遺伝子が単離されたセントロメア蛋白質であり、最もその解析が進んでいる。免疫電子顕微鏡による観察から、セントロメアの中央領域に局在することが示されている(18)。核から精製された蛋白質(15)、並びに、大腸菌に発現させた組換え体蛋白質を用いた解析により(12)、セントロメア領域に存在するサテライト反復配列のうち、アルホイドDNAのある繰り返しに見られる約17bpに特異的に結合することが示されている。

著者らは、CENP-Bは599アミノ酸残基からなり、そのDNA結合に必要な領域はN末端の134アミノ酸残基に存在することを示した(12)。Garnierらの二次構造予測に従うと、この領域は4つのヘリックス構造を持つと考えられている(図4)。CENP-B

のホモログは少なくとも哺乳動物に存在するようで、既に、マウス(19)、チャイニーズハムスター(20)、ウシ等(21)からはその遺伝子が単離されている。いずれもDNA結合領域に相当するアミノ酸配列はよく保存されており、結合配列もヒトと同一か、それに近いことが予想される。著者らの行った実験によると、少なくとも、組換え体ヒトCENP-Bに結合する配列がマウスをはじめ、他の哺乳動物のゲノムに存在する事を示すデータが得られている(22)。最近、別のグループによりアジアマウス(*Mus caroli*)についてヒトCENP-Bが結合するサテライト配列が報告された(23)。これらの配列が、実際、それぞれの種固有のCENP-Bホモログと相互作用しているかどうかについては、今後解析がなされていくであろう。

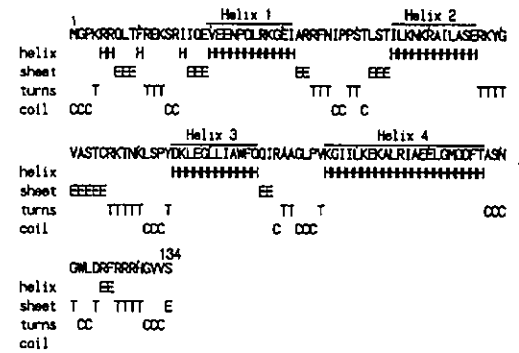
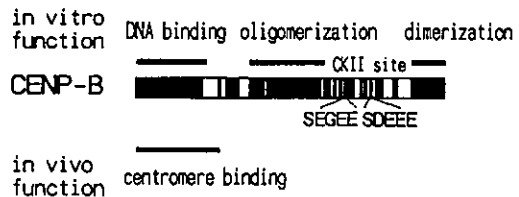


図4. CENP-Bの機能ドメイン構造とDNA結合領域の二次構造予測
上図の縦線はマウスCENP-Bと相同性の高い部分。in vivoの機能領域(Plutaら(1992) J. Cell Biol. 116:1081-93.)も示した。下段はDNA結合領域の二次構造予測。

5-2. セントロメア蛋白質C (CENP-C)

電子顕微鏡による観察から、哺乳動物の中期染色体の動原体は、その電子密度の違いから、暗明暗の三層からなるdisc様の構造をしている事が示されている(2)。CENP-Cは943アミノ酸残基からなり、動原体内層を構成している事が明らかにされた(24)。最も染色体側に位置する一実際は、染色体本体に埋め込まれているように見える一内層に、DNA成分が存在することは既にいくつかのグループにより報告されている(25)。著者らは、動原体も他の染色体の領域と同じくDNAと蛋白質との複合体で構成されていると考え、クローン化した遺伝子より発現させた組換え体CENP-Cの活性を調べたところ、やはりDNA結合能を持つことを見いだした(13)。さらに、このDNA結合に関わる領域を限定したところ、中央の397-499残基の配列が結合に必須であり(13)、DNAとの強い結合にはその両脇を含めた316-551の領域が必要である事を示している(26)。マウスにもCENP-C遺伝子のホモログが単離されているが(27)、C末端以外はアミノ酸配列の相同性は低い(図5)。最近、アフリカツメガエル(*Xenopus*)にもCENP-Cのホモログが存在することを予測させる報告がなされた(28)。現在、著者らはCENP-Cの標的となる「動原体DNA」にあたるゲノムの配列の解析を進めている。CENP-Bの場合と異なり、DNA結合領域部分のアミノ酸配列はそれほど保存されていないようで、結合配列は動物間で多様なのかもしれない。

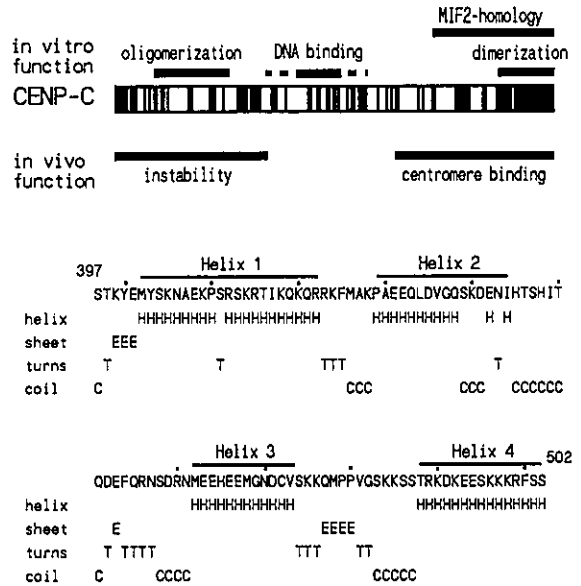


図5. CENP-Cの機能ドメイン構造とDNA結合最小領域の二次構造予測

上図の縦線はマウスCENP-Cと相同性の高い部分。in vivoの機能領域も示した(28)。下はDNA結合に必要な最小領域(上図の実線部分)の二次構造予測(13)。

5-3. ヘテロクロマチン蛋白質 (HP1^{Hsα})

HP1^{Hsα}は、もともとショウジョウバエで明らかにされた非ヒストン型のヘテロクロマチン蛋白質である(29)。唾液腺(静止期の細胞)にみられる多糸染色体では染色中心(これは、中期染色体のセントロメア領域近傍に相当する)を構成する蛋白質として同定された。遺伝学的解析から、位置効果(position-effect variegation)に関与することが示され、近接するDNA配列のヘテロクロマチン化や、染色体の分配に働くとされる(30)。幾つかの植物、動物でその遺伝子のホモログが単離されており、これら生物間で広く保存されているようだ。少なくとも、マウスのホモログ(M

31)に対する抗体は中期染色体のセントロメアの広い領域を認識することより(31)、HP1もセントロメア領域を構成する蛋白質の一つである可能性がある。著者らは、大腸菌に発現させた組換え体HP1^{HS-a}蛋白質を解析したところ、この蛋白質にも*in vitro*ではあるが、DNA結合能を持つことが判明した(14)。先と同様に、DNA結合に関わる領域を限定したところ、中央の43-106アミノ酸残基の領域が必須であった(図6)。面白いことに、このDNA結合領域のC末端部分は、先に限定したCENP-CのDNA結合領域のC末端部分と40%の相同性を示した。HP1についても、現在、結合する配列の解析を進めているところである。

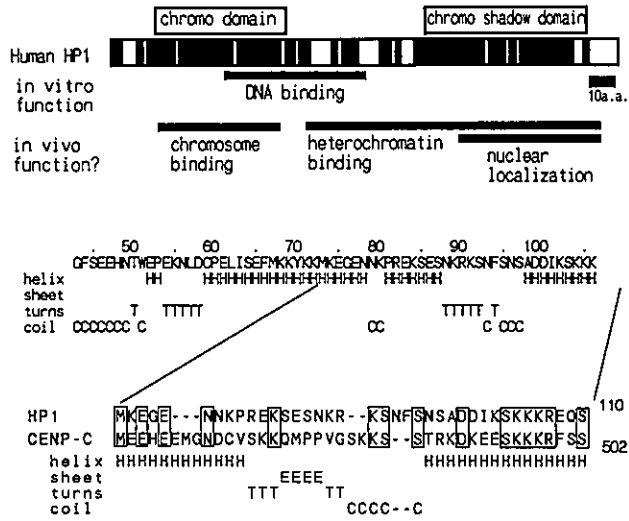


図6. HP1の機能ドメイン構造とDNA結合領域の二次構造予測

上図の縦線はショウジョウバエHP1と相同性の高い部分。in vivoで予想される機能領域は、ショウジョウバエのHP1で推定されたもの。下段はDNA結合領域の二次構造予測と、ヒトCENP-CのDNA結合領域との類似性を示す部分(14)。

5-4. セントロメア蛋白質A (CENP-A)

CENP-Aは、ヒストンから成るヌクレオソームと同様な生化学的挙動を示すことから、早くからヒストン様蛋白質であることが予想されていた。最近、その遺伝子

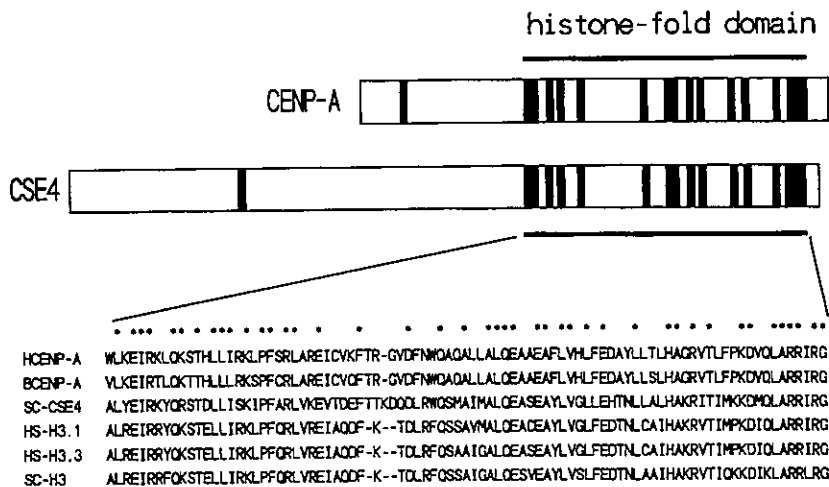


図7. ヒトCENP-Aと出芽酵母CSE4に保存されている領域 CENP-Aについてはヒト(HCENP-A)、ウシ(BCENP-A)、ヒストンH3についてはヒト(HS-H3.1及びHS-H3.3)、出芽酵母(SC-H3)の配列を用いた。

の構造が明らかにされ、140アミノ酸残基からなり、そのC末端領域にヒストンH3のC末端領域とかなりの相同性をもつ「セントロメア特異的ヒストン」の一つである事が確認された(32)。興味あることに出芽酵母の染色体分離に関わる遺伝子の一つであるCSE4のC末端領域とも相同性がある(33)(図7)。しかしながら、今のところ、CENP-Aはセントロメアのどの領域を構成しているのか、また、前述してきたセントロメア蛋白質同様、CENP-AにもDNA結合能があるかどうかは、現在解析を行っているところである。

6. 細胞周期に依存したセントロメア構造体の形成

セントロメアは、以上述べてきたようなDNA結合活性を持つセントロメア蛋白質とゲノム上の「セントロメアDNA」とのDNA-蛋白質複合体がコアとなり、これに、さらに多くのセントロメア蛋白質が加わって形成される一つの巨大な機能構造体と考えられる。通常、セントロメアといえば分裂中期に見られる染色体のくびれの部分、即ち、静的なセントロメアを思い浮かべるかもしれない。しかし、これに相当する部分は、染色体が脱凝縮している(従って、染色体は勿論、動原体の三層構造も見られない)静止期においても存在しているはずである。実際、先のセントロメア蛋白質に対する抗体を用いると、この「セントロメア前駆体」に相当する構造が、細胞周期を通じて確かに存在している事が示されている(34)。しかも、この構造は細胞分裂の間に徐々にその形態を変化させる動的なものであり、最終的には、分裂中期にみられるような、いわゆる「動原体」をもつ高次なセントロメアへと分化する(2)。この過程には、既にDNAに結合しているセントロメア蛋白質間の相互作用、並びに、核膜崩壊にともない細胞質側から移行してきた幾つかの蛋白質との相互作用が複雑にかかわり合っているはずである。最近、少なくとも、前者の過程の一部については、上で述べてきたセントロメア蛋白質の自己相互作用によりある程度は説明できそうな実験結果が得られている(26,35)。図8にそのひとつの考えられるモデルを示した。

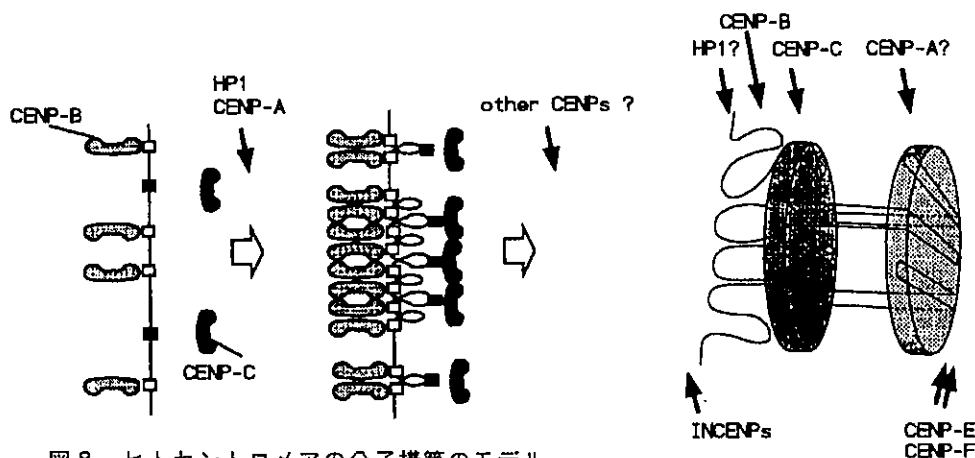


図8. ヒトセントロメアの分子構築のモデル

動原体の構造は Rattner, J.B. (1986) Chromosoma 93:515-170.の図に基づいた。

ヒトHP1とCENP-Aの正確なセントロメアでの局在は明らかではない。

これらを含めたセントロメア蛋白質間の相互作用の詳細については、今後の解析を待つしかない。

7. セントロメア蛋白質の保存性について

以上、出芽酵母とヒトのセントロメア蛋白質について、著者らの解析結果を紹介しながら述べてきた。セントロメア蛋白質は、「染色体の分配に関わる」という共通の機能ゆえに、酵母からヒトに至るまで、少なくとも幾つかの蛋白質において、ある程度の相同性を示してもよさそうである。実際、酵母とヒトの幾つかの細胞周期に関わる蛋白質 (house keeping酵素) を比べたとき、機能領域においてアミノ酸配列が保存されていることが知られており、逆に、機能的に酵母の特定の変異を抑制する遺伝子として積極的にヒトのホモログが単離されている例がある。

少なくとも、哺乳類の間ではセントロメア蛋白質の幾つかはよく保存されている事は明らかである(19, 27, 32)。しかしながら、ヒトと酵母のセントロメア蛋白質間においては、未だ、対応関係は明らかではない。一つには、まだ両者において全てのセントロメア蛋白質が出揃っているわけではないこと、もう一つには、種間で独自の多様性を獲得してきた可能性があることが考えられる。さらに、これらの考えは、セントロメアDNAの比較においても支持される。例えば、出芽酵母と分裂酵母(もっとも、進化的にはかなり隔たっているが)において機能するセントロメアDNAが単離されているが、その大きさ、塩基配列において全く異なる様相を示している。また、セントロメア蛋白質が保存されている哺乳動物の、セントロメア領域に存在するサテライト配列についても同様であり、明確な相同性は報告されていなかった。しかしながら、幾つかの例で機能部位での相同性が報告されつつあるようである(22, 23)。

例えば、先に述べたヒトCENP-Aと出芽酵母のCSE4のhistone-fold domain(33) (図7)、ヒトCENP-Cと出芽酵母MIF2との2量体形成領域

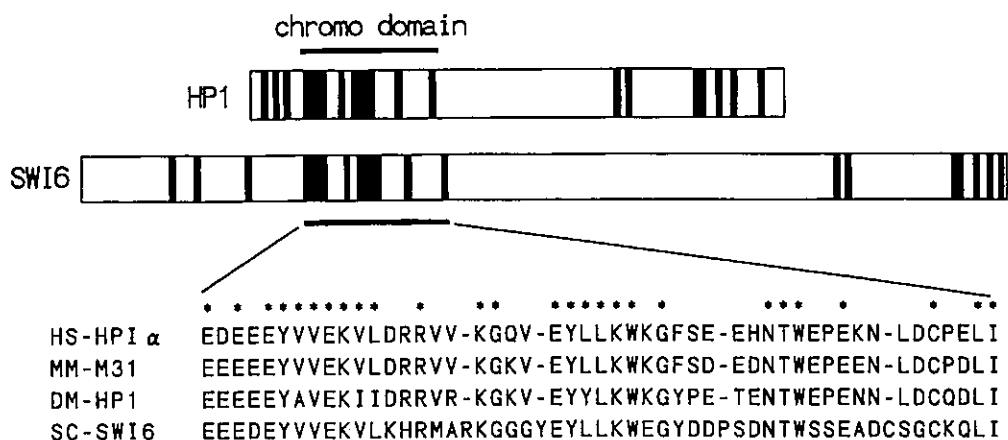


図9。ヒトHP1と分裂酵母SWI6に保存されているクロモドメイン

HP1及びそのホモログについてはヒト(HS-HP1 α)、マウス(MM-M31)、ショウジョウバエ(DM-HP1)の配列を用い、分裂酵母のセントロメア蛋白質(SC-SWI6)と比較した。

(26,36) (図5)、そしてヒトHP1と分裂酵母のSWI6のchromo domainの相同性(37) (図9) などである。最近になって、広く真核生物に存在する細胞周期に関わるSKP1が出芽酵母のCBF3のサブユニットの一つ(CBF3D)であることが報告された(38) (表1)。今後、さらに解析が進めば、酵母とヒトのセントロメア蛋白質間の対応関係がある程度明らかになるものと思われる。今後のさらなる解析を期待したい。

引用文献

1. Alberts B. *et al.* (1991) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed. p941-43.
2. Rieder, C.L. (1982) *Int. Rev. Cytol.* 79:1-58.
3. Hyman, A.A. (1995) *Annu. Rev. Cell Biol.*, 11:471-95.
4. Heus, J.J. *et al.* (1994) *Mol. Gen. Genet.* 243:325-33.
5. Hyman, A.A. *et al.* (1992) *Nature* 359:533-36.
6. Clarke, L. (1990) *Trends Genet.* 6:150-54.
7. Dib, C. *et al.* (1995) *Nature* 380:152-154.
8. Pluta, A. *et al.* (1990) *Trends Biol. Sci.* 15:181-85.
9. Tyler-Smith, C. *et al.* (1993) *Nature genet.* 5:368-75.
10. Heller, R. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7125-30.
11. 杉本憲治 (1993) *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 67:1555-62.
12. Sugimoto, K. *et al.* (1992) *J. Biochem.* 111:478-83.
13. Sugimoto, K. *et al.* (1994) *J. Biochem.* 116:877-81.
14. Sugimoto, K. *et al.* (1996) *J. Biochem.* 120:153-9.
15. Masumoto, H. *et al.* (1989) *J. Cell Biol.* 109:1963-73.
16. Sugimoto, K. *et al.* (1994) *Chromosome Res.* 2:453-59.
17. Yen, T. *et al.* (1992) *Nature* 359:536-39.
18. Cooke, C.A. *et al.* (1990) *J. Cell Biol.* 110:1475-88.
19. Sullivan, K.F. & Glass, C.A. (1991) *Chromosoma* 100:360-70.
20. Bejarano (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1307:21-25.
21. Sugimoto, K. unpublished results.
22. 杉本憲治 (1994) *生化学* 66:882.
23. Kipling, D. *et al.* (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15:4009-20.
24. Saito, H. *et al.* (1992) *Cell* 70:115-25.
25. Ris, H. & Witt, P.L. (1981) *Chromosoma* 82:153-70.
26. Sugimoto, K. *et al.* (1996) *Chromosome Res.* submitted.
27. MaKay, S. *et al.* (1994) *Genomics* 22:36-40.
28. Lanini, L. & McKeon, F. (1995) *Mol. Biol. Cell* 6:1049-59.
29. James, T.C. & Elgin, S.C.R. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:3862-72.
30. Reuter, G. & Spiere, P. (1992) *BioEssays* 14:605-612.
31. Wreggett, K.A. *et al.* (1994) *Cytogenet. Cell Genet.* 66:99-103.
32. Sullivan, K.F. *et al.* (1994) *J. Cell Biol.* 127:581-92.
33. Stoler, S. *et al.* (1995) *Genes Dev.* 9:573-586.

34. Brenner, S. *et al.* (1981) *J. Cell Biol.* 91:95-102.
35. Sugimoto, K. *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:24271-76.
36. Meluh, P.D. & Koshland, D. (1995) *Mol. Biol. Cell* 6:793-807.
37. Lorentz, A. *et al.* (1994) *Gene* 143:139-143.
38. Stemmann, O. & Lechner, J. (1996) *EMBO, J.* 15:3611-20.

Stellaria aquatica 葉に見出した新規リボソーム不活性化タンパク質
—その精製と酵素学的性質—

吉成 茂夫、田村 実、遠藤 弥重太
愛媛大学工学部応用化学科
〒790 松山市文京町3番

(Received June 10, 1996; revised and accepted September 18, 1996)

ハコベ(*Stellaria aquatica*)葉に新規リボソーム不活性化タンパク質(RIP)を見出し、Stellarinと命名した。本酵素は、硫酸分画、イオン交換および吸着カラムクロマトグラフィによって精製され、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、分子量27500の単純タンパク質であった。N-末端20個のアミノ酸配列について他のRIPと比較したところ、高い保存性が見られた。精製標品は家兎網状赤血球無細胞タンパク質合成を強く阻害する。Stellarinによるこの阻害機構はリシンA鎖と同様で、28SリボソームRNAの5'末端から4234番目のアデニントリボース間の結合を加水分解し、リボソームを不活性化することを明らかにした。リシンA鎖が動物リボソームにのみ基質特異性を示すのに対し、Stellarinはコムギ胚芽や大腸菌のリボソームをも脱アデニン化作用を示すので、rRNAの機能構造や進化を解析する探査針として有効であろう。

A NEW TYPE 1 RIBOSOME-INACTIVATING PROTEIN FROM THE LEAVES OF *STELLARIA AQUATICA*, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

Shigeo Yoshinari, Minoru Tamura, and Yaeta Endo

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering,
Ehime University, Matsuyama, 790 Japan

The leaves of *Stellaria aquatica* contain a new type 1 ribosome-inactivating protein that we named stellarin. Stellarin was purified to apparent homogeneity by ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography, and adsorption chromatography. The molecular mass of stellarin was estimated by SDS-PAGE to be approximately 27,500 Da. The protein inhibits protein synthesis in a rabbit reticulocyte lysate with an IC_{50} of 0.04 nM, and depurinates 28S rRNA in the ribosomes of the lysate in a manner apparently identical to that of ricin A-chain and other RIPs. The enzyme is also active on ribosomes from wheat germ and *Escherichia coli*. The sequence of the N-terminal 20 amino acids of the protein reveals a close relationship to other ribosome-inactivating proteins.

Key words: inhibitor of protein synthesis, purification, Ribosome-inactivating protein, RNA *N*-glycosidase, *Stellaria aquatica*.

INTRODUCTION

Ribosome-inactivating proteins (RIPs, see ref.1 for a review) are a group of plant enzymes of unknown biological role that inhibit polypeptide chain elongation by inactivating the ribosomes of most animals. The molecular basis of the inhibition (see ref. 2 for a review) is the hydrolysis of the *N*-glycosidic bond between the base and the ribose at position A₄₃₂₄ in 28S rRNA of rat. The cleavage site is embedded in a purine-rich single-stranded segment of 14 nucleotides that is near universal. RIPs are classified into two groups: type 1, single-chain polypeptides; and type 2, two-chain proteins consisting of an A chain with an enzymatic activity equivalent to the type 1 RIPs and a B chain with lectin properties. In spite of their apparently identical enzymatic activity, RIPs from different plants seem to have different potencies in their activities on animal, plant or bacterial ribosomes³). This fact suggests that RIPs are useful probes to study structure/function relationships in

ribosomes. Furthermore, interest in RIPs is currently growing because of their possible utilization in agriculture and in human therapy as antibody-RIP conjugates¹). For these reasons it is important to investigate new RIPs to increase our knowledge of the properties of these proteins.

We report here the purification and characterization of a new RIP, stellarin, from the leaves of *Stellaria aquatica*.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Leaves of *Stellaria aquatica* were collected in the garden of Ehime University. L-[U-¹⁴C]Leucine (11 GBq/mmol) was from Amersham International, Bucks., UK. Materials for the ion-exchange column chromatographies and for adsorption chromatography were from Tosoh Co. Ltd. (Tokyo) and Nakarai Tesque, Inc. (Kyoto), respectively. Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was from Millipore (Bradford, MA).

Methods

General. The following procedures were either described or cited previously⁴⁻⁶): determination of protein and ribosome concentration, preparation of rabbit reticulocyte lysate and the incubation conditions for the protein synthesis assay, preparation of ribosomes, extraction of rRNA with phenol and dodecylsulfate, aniline-induced chain scission at the modified site in rRNA, analysis of the nucleic acids by PAGE, and visualization of RNA bands with ethidium bromide.

Stellaria RIP assay. RIP activity was measured either as inhibition of endogenous mRNA-directed protein synthesis in a rabbit reticulocyte lysate (an indirect assay)⁵), or as cleavage of the *N*-glycosidic bond in 23S/28S ribosomal RNA that is the site of action (a direct assay)⁴). The former assay was carried out as follows: One μ l of various dilutions of RIP sample was added to 29 μ l of the rabbit reticulocyte cell-free translation mixture. Incubation was carried out at 30°C for 30 min, and the effect of RIP addition on endogenous protein synthesis was measured. One unit of stellarin is defined as the amount of the sample which inhibits translation in the standard 30 μ l reaction mixture by 50%. For the direct measurement of RNA *N*-glycosidase activity, RNA was extracted from reaction mixtures as described above and treated with aniline under acidic conditions to effect chain scission at the modified site. Fragment formation was analyzed by PAGE and staining of the RNA bands with ethidium bromide. To determine the substrate specificity of stellarin, ribosome fractions prepared from rabbit reticulocytes, wheat germ, or *E. coli* were purified by ultracentrifugation in 1M sucrose in solution A (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM KCl, and 5 mM MgCl₂)⁴). The concentrations of ribosomes were adjusted to 20 A₂₆₀ units/ml in solution A, and reactions of 50 μ l were incubated with the purified *Stellaria*

RIP at 30°C for 30 min. Cleavage of the *N*-glycosidic bond in the rRNA was monitored as above. The RNA *N*-glycosidase activity was quantitated by measuring the ratio of produced fragment to 5S rRNA on the gel. For this the ethidium bromide stained gel was photographed and the intensity of the bands on a negative film was measured with a densitometer (Shimadzu dual-wavelength flying-spot scanner, CS-9000). The number of moles of *N*-glycosidic bond cleaved was directly obtained by comparing the percentage of cleavage to a calibration curve; for the calibration curve known amounts of rRNA prepared by mixing the RNA from untreated and ricin A-chain-treated ribosomes had been analyzed in the same way. The principle for the determination was described in detail before⁴).

Purification of stellarin. All steps in the purification were carried out at 4°C. (i) Preparation of S-100 Fraction. Fresh leaves of *Stellaria* (200 g) were ground to a fine powder in liquid nitrogen. This powder was then extracted with an equal volume of ice-cold extraction buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA) for 30 min on a magnetic stirrer. The extract was adjusted to pH 7.6 with NaOH and centrifuged at 30,000 x g for 30 min. The clear supernatant, constituting a crude extract, was centrifuged at 103,000 x g for 4 h to remove ribosomes, thus yielding the S-100 fraction. (ii) Ammonium sulfate precipitation. Solid (NH₄)₂SO₄ was added under stirring to the S-100 fraction. The precipitate which had formed at 35% saturation was removed by centrifugation and additional (NH₄)₂SO₄ was added to 70% saturation. The precipitate formed contained the RNA *N*-glycosidase activity, and was dissolved in 50 ml of 25 mM Tris-HCl (pH 7.6) and dialyzed three times against 1 liter of the same buffer (fraction 1). (iii) Anion-exchange column chromatography. Fraction 1 was briefly centrifuged and clear supernatant was loaded onto a DEAE-Toyopearl column (25 x 4.5 cm) equilibrated with the dialysis buffer used above. Virtually all of the enzyme activity appeared in the flow-through volume. This fraction was collected and dialyzed against 25 mM sodium-phosphate buffer (pH 6.5). After centrifugation a clear supernatant was obtained (fraction 2). (iv) Cation-exchange column chromatography. Fraction 2 was loaded onto a 50 ml CM-Toyopearl column (1.5 x 28 cm) that had been washed and equilibrated with 25 mM sodium-phosphate buffer (pH 6.5). After sample application the column was washed with 100 ml of loading buffer, resulting in elution of most of the protein contained in the sample while retaining the translation-inhibiting activity. The activity was then eluted by washing the column with a linear gradient of 10 to 300 mM NaCl in the above buffer. Fractions containing the inhibitor activity were combined and dialyzed against 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) (fraction 3). (v) Hydroxylapatite column chromatography. Fraction 3 was loaded onto a hydroxylapatite column of the dimensions 0.7 x 2.5 cm. After washing the column with dialysis buffer, the chromatography was performed with a linear gradient of 25 to 400 mM potassium phosphate (pH 7.0). Fractions containing peak RIP activity were combined and dialyzed against fraction 3 buffer, and aliquots were stored at -80°C for use in the subsequent experiments.

Amino acid sequencing. Purified protein was electrophoresed in a 1 mm thick SDS-polyacrylamide gel and electroblotted from the gel to a polyvinylidene difluoride membrane according to the method of

Matsudaira⁷). The N-terminal sequence was determined by automated Edman degradation on a gas-phase sequencer (Shimadzu protein sequencer PSQ-2) connected on-line to an HPLC apparatus for PTH-amino acid identification. For the detection of potential sugar linkages in stellarin, the protein was (1) separated by SDS-PAGE and stained with periodic acid-Schiff stain⁸, and (2) treated with *N*-glycanase (Genzyme Corporation, Boston, MA) and subsequently analyzed by SDS-PAGE⁹).

RESULTS

Purification of stellarin.

As summarized in Table 1, a protein, designated stellarin, which inhibits translation in rabbit reticulocyte lysate was extracted and purified from the leaves of *Stellaria aquatica*. Approximately 300 μ g of the purified protein was obtained from 200 g of starting material. A large increase in activity was observed during purification at the ammonium sulfate precipitation step; this might be due to the removal of inhibitor(s) present in the material. The gradient elution patterns from the CM-Toyopearl and hydroxylapatite column chromatographies are shown in Fig. 1. Fractions containing RNA *N*-glycosidase activity, as determined by measuring inhibitory activity, started to elute from the CM-Toyopearl column at NaCl concentrations of about 75 mM (indicated by the bar in A). During hydroxylapatite column chromatography the active moiety eluted at potassium phosphate buffer concentrations from 75 to 95 mM (indicated by the bar in B). Purified *Stellaria* RIP is pure as estimated by reverse phase and gel filtration chromatography (results not shown) although on SDS-PAGE the protein shows two bands, one main band and an additional minor band (Fig. 2).

Table 1. Purification of the ribosome-inactivating protein from *Stellaria aquatica*

Fraction	Total protein (μ g)	Total Activity ($\times 10^5$ Units)	Specific Activity (Units / μ g protein)
(i) S-100	350,000	6.36	1.8
(ii) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	120,000	15.00	12.5
(iii) DEAE-cellulose	5,470	3.65	66.7
(iv) CM-Toyopearl	290	3.63	1,251.7
(v) Hydroxylapatite	270	3.58	1,325.9

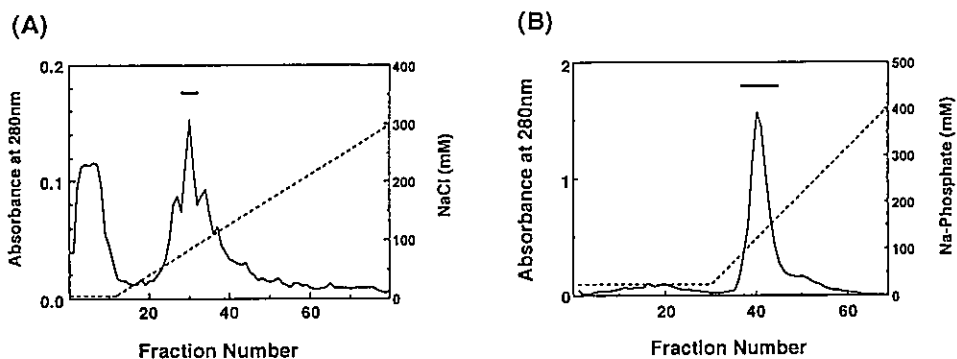


Figure 1. Column chromatographies of ribosome-inactivating protein from leaves of *Stellaria aquatica*. The elution profiles from CM-Toyopearl (A) and from hydroxylapatite (B). Experimental conditions are described in Materials and Methods. Fractions with inhibitory activity in a rabbit reticulocyte cell-free protein synthesizing system were pooled as indicated by the horizontal bars.

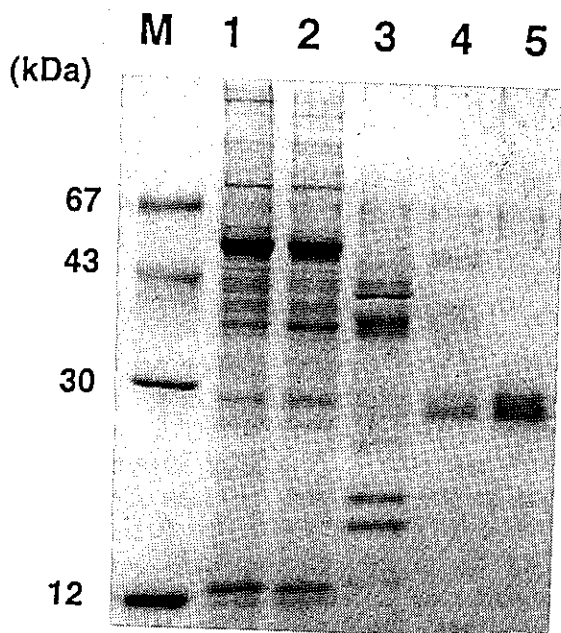


Figure 2. SDS-PAGE of the purified inhibitor fractions. Lanes 1-5 correspond to fractions 1-5 of Table 1. Lane M contains MW standards.

Similar electrophoretic behaviour was observed with other RIPs, such as saporin-S6 and RIP from *Vaccaria pyramidata* and ricin A chain, and was interpreted as an artifact due to the lower net negative charge of the protein-SDS complex¹⁰). The apparent molecular weight of the purified protein (the major band on the gel) was estimated to be 27.5 kDa when compared to the electrophoretic mobility of molecular weight markers. The purified protein is stable for at least 3 months when stored at -20°C and retained activity upon

Table 2. Amino terminal sequence of ribosome-inactivating proteins from *Stellaria aquatica*

STR	I A - - - - - L D L A - - - N - P T A A K Y T A F L T S I
DA3	A T A Y T * N * * . . . * . * S * S Q * S S * * D Q *
MAP	A P T L E T I A S * * * N . . . * . * * T . . * L S * I * N *
SA6	V T S I T * * * V . . . * . . * * G Q * S S * V D K *
PAP·S	* N T . . . I T F D A G N A * I N * * A T * M E * L
RCA	* F P K Q Y P I . . . I N F T T A G A * V Q S * * N * I R A V
TRC	- D . . . V S F R L S G A * S . S * G V * I S N L

freeze-thawing. The N-terminal amino acid sequence of stellarin, determined up to residue 20, was compared using the CLUSTAL V multiple sequence alignment program¹¹⁾ to the sequences of several other RIPs¹⁾ (Table 2). The sequence is very similar to that of dianthin 30 (DA3, from the leaves of *Dianthus caryophyllus*; there is 50% amino acid identity)¹²⁾ and *Mirabilis* antiviral protein (MAP, from the roots of *Mirabilis jalapa* L.; 50% amino acid identity)¹³⁾ but is much less similar to the sequence of trichosanthin (TRC, from the roots of *Trichosanthes kirilowii*; 15% amino acid identity)¹⁴⁾. The percentages of identical residues in comparisons with saporin-S6 (SA6, from the seeds of *Saponaria officinalis*)¹⁵⁾, pokeweed antiviral protein (PAP-S, from the seeds of *Phytolacca americana*)¹⁶⁾, and ricin A-chain (RCA, from the seeds of *Ricinus communis*)¹⁷⁾ fall between the values of the above proteins. There was no indication of carbohydrate attachment in stellarin as determined by staining of SDS-PAGE gels with a periodic acid-Schiff stain as well as by treating the protein with *N*-glycanase followed by gel mobility analysis.

RNA N-glycosidase activity of purified stellarin.

The inhibitory effect of purified stellarin on *in vitro* protein synthesis was assessed in a rabbit reticulocyte lysate system. After a brief lag period, stellarin inhibits endogenous protein synthesis (Fig. 3A); this is a typical behavior observed with other RIPs as well¹⁸⁾. The IC₅₀, concentration causing 50% inhibition of protein synthesis in the cell-free system was estimated to be 1.2 ng/ml (0.04 nM), a value similar to the IC₅₀ values of other type 1 RIPs such as maize RIP¹⁹⁾. In order to confirm that the purified protein is indeed a RNA *N*-glycosidase, we isolated the rRNA from portions of the protein synthesis reaction mixtures and analyzed the RNA by PAGE. Fig. 3B shows the formation of a new band (indicated by an arrow) after treatment with aniline; this band has the same mobility as a control ricin A-chain/aniline fragment. From these results we conclude that stellarin is a RNA *N*-glycosidase inactivating animal ribosomes by cleaving a single *N*-glycosidic bond, presumably at the ricin A site of action in the α -sarcin/ricin domain of 28S rRNA (A4324 in rat 28S rRNA).

It has been known for some time that single chain RIPs or the A-chains of cytotoxic lectins vary markedly in their specificity for ribosomes of different organisms. Research predominantly utilizing ricin A-chain has shown that in

general mammalian ribosomes are particularly sensitive, plant ribosomes less so, and *E. coli* ribosomes are insensitive¹). Some of the single chain RIPs such as MAP (*Mirabilis* antiviral protein) do inactivate *E. coli*

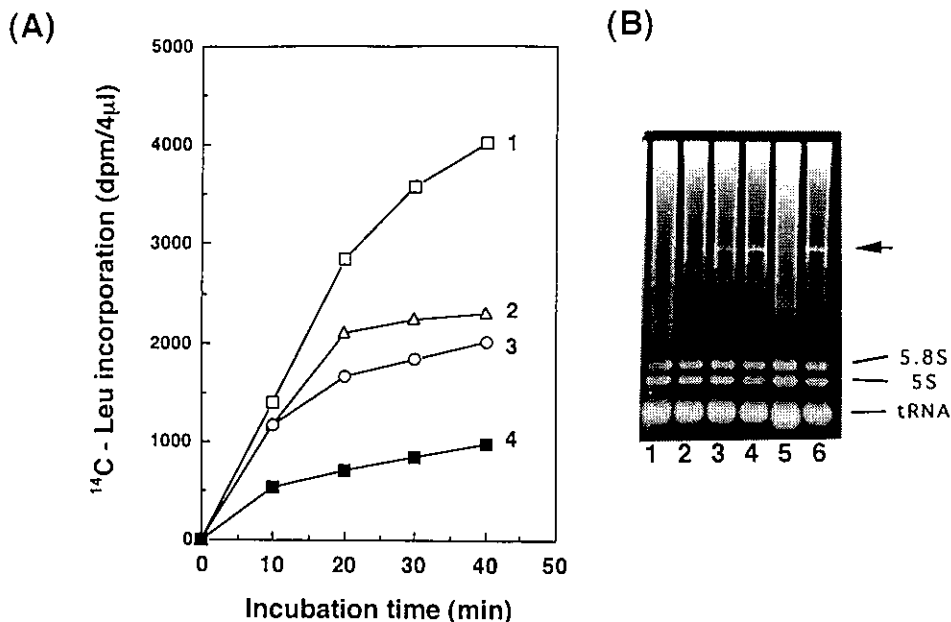


Figure 3. RNA *N*-glycosidase activity of stellarin. (A), inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysate by stellarin. Each reaction mixture (50 µl) was incubated without (lane 1) or with 0.08 ng (2), 0.16 ng (3), or 0.5 ng (4) of the purified protein. (B), aniline-induced fragment formation. After 30 min incubation, an aliquote was taken from each reaction mixture in (A) and used to isolate rRNA. Samples were treated with acid aniline and separated by 4.2% PAGE. The lane numbers correspond to the curve numbers in (A). Lane 5, RNA from sample (4) is analysed without aniline-treatment. Lane 6, acid-aniline-treated RNA from ricin A-chain-treated lysate was used to generate the fragment marker (indicated by an arrow).

ribosomes as well as plant ribosomes by cleaving the *N*-glycosidic bond at the corresponding site in 23S/28S rRNA²⁰). We examined the substrate specificity of stellarin. The insets of Fig. 4 show that stellarin does act on ribosomes isolated from wheat germ and *E. coli* as evidenced by the formation of a specific, aniline dependent fragment derived from the large rRNAs. However, the protein appears to be less active on the ribosomes of these organisms when compared to rabbit reticulocyte ribosomes. A dose response curve for stellarin with ribosomes from each of the organisms was established with the help of densitometric gel scanning as described in Materials and Methods. Estimated EC₅₀ values, signifying 50% cleavage at the *N*-glycosidic bond, are 9.3 ng/ml (0.34 nM), 148 ng/ml (5.4 nM) and 4.1 µg/ml (150 nM) with ribosomes from rabbit reticulocytes, wheat germ and *E. coli*, respectively (Fig. 4).

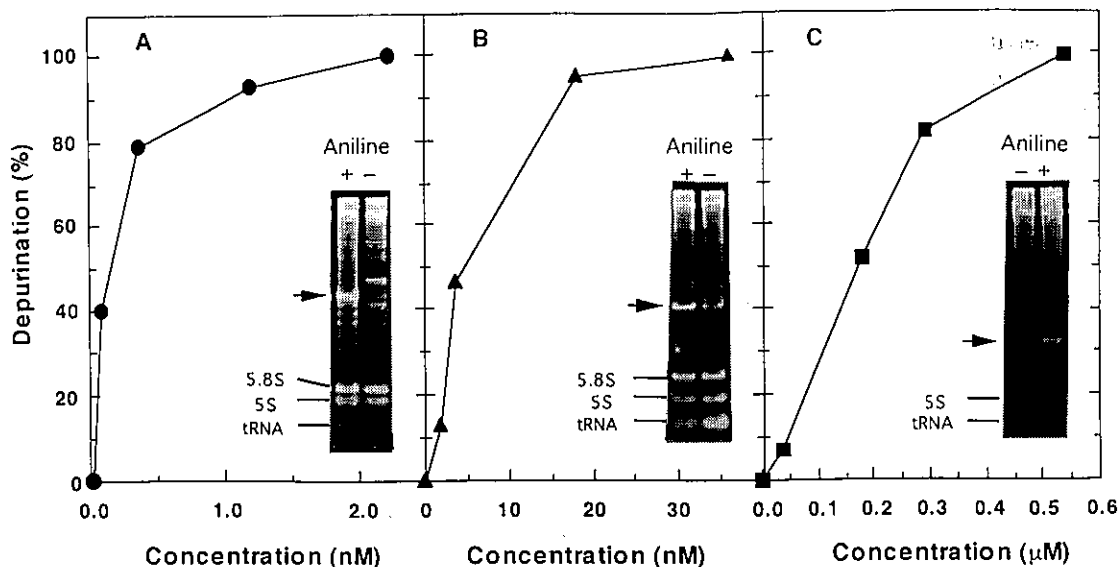


Figure 4. Substrate specificity of stellarin. Ribosomes prepared from rabbit reticulocytes (A), wheat germ (B), and *E. coli* (C) were incubated with increasing amounts of stellarin. Insets show aniline-induced fragment formation; the concentrations of RIP in these experiments were 2.2 nM (A), 36.0 nM (B), and 0.545 mM (C). Details concerning the quantitation of RNA *N*-glycosidase activity are described in Materials and Methods.

DISCUSSION

We purified the protein stellarin from the leaves of *Stellaria aquatica*. Stellarin is a type 1 RIP since (i) it inhibits protein synthesis by cleaving a single *N*-glycosidic bond (presumably at the ricin site, A4324 in 28S rRNA), (ii) it is a single-chain protein of a molecular mass similar to that of other type 1 RIPs. Our preliminary examination showed that the inhibitory activity is found in almost all tissues of *Stellaria aquatica* with the exception of the petal (data not shown).

The IC_{50} of stellarin in the rabbit reticulocyte cell-free system is 1.2 ng/ml (0.04 nM), which is within the range of values from other RIPs. When the RNA *N*-glycosidase activity was determined using ribosomes from rabbit reticulocytes as a substrate with the aniline-induced chain scission method, we obtained an EC_{50} of 9.3 ng/ml (0.34 nM). There is a quite big difference in activity depending on the method - the direct assay gave us a more than 8 times higher value compared to the indirect assay. We consider this difference is a reflection of an efficiency of the translation reaction in the cell-free system, since it has been known that not all ribosomes in the lysate system are engaged in translation²¹). Furthermore during protein synthesis inactivation of any one ribosome among the actively translating ribosomes on a mRNA would result in a freezing of the respective polysome since the depurinated ribosome remains arrested on the mRNA template²).

Ribosomes from the broad range of species examined so far vary considerably in their susceptibility to RIPs¹). Among plant ribosomes sensitivity to RIPs varies as well. Ribosomes from wheat germ are, with an EC_{50} of 5.4 nM, quite sensitive to stellarin and we are currently using

stellarin as a probe to study the relationship between structure and function in wheat germ ribosomes. All type 1 RIPs reported to date inactivate *E. coli* ribosomes, although at a much higher RIP concentration (sometimes more than 10,000-fold) than what suffices to inhibit translation in a rabbit reticulocyte lysate¹). We determined an EC₅₀ of stellarin with *E. coli* ribosomes of 150 nM. Although no other comparable data have been reported yet, the activity of stellarin on *E. coli* ribosomes is in the same order of magnitude as that of MAP; MAP is one of the most active RIPs and completely cleaves the susceptible *N*-glycosidic bond at concentrations as low as 100 nM²⁰).

This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

REFERENCES

- 1) L. Barbieri, M. G. Battelli and F. Stirpe, *Biochim. Biophys. Acta*, 1154, 237-282 (1993).
- 2) I. G. Wool, A. Gluck and Y. Endo, *TIBS.*, 17, 266-269 (1992).
- 3) F. Stirpe, L. Barbieri, M. G. Battelli, M. Soria and D. A. Lappi, *Bio/Technology*, 10, 405-412 (1992).
- 4) Y. Endo, P. W. Huber and I. G. Wool, *J. Biol. Chem.*, 258, 2662-2667 (1983).
- 5) Y. Endo, K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara and K. Igarashi, *Eur. J. Biochem.*, 171, 45-50 (1988).
- 6) Y. Endo, K. Mitsui, M. Motizuki and K. Tsurugi, *J. Biol. Chem.*, 262, 5908-5912 (1987).
- 7) P. Matsudaira, *J. Biol. Chem.*, 262, 10035-10038 (1987).
- 8) G. Fairbanks, T. L. Steck and D. L. H. Wallach, *Biochemistry*, 10, 2606-2617 (1971).
- 9) S. Hirani, R. J. Bernasconi and J. Rasmussen, *Analytical Biochem.*, 162, 485-492 (1987).
- 10) D. A. Lappi, F. S. Esch, L. Barbieri, F. Stirpe and M. Soria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 129, 934-942 (1985).
- 11) D. G. Higgins, A. J. Bleasby and R. fuchs, *Comput. Applic. Biosci.*, 8, 189-191 (1992).
- 12) G. Legname, P. Bellosta, G. Gromo, D. Modena, J. N. Keen, L. M. Roberts and J. M. Lord, *Biochim. Biophys. Acta*, 1090, 119-122 (1991).
- 13) N. Habuka, Y. Murakami, M. Noma, T. Kudo and K. Horikoshi, *J. Biol. Chem.*, 264, 6629-6637 (1989).
- 14) E. J. Collins, J. D. Robertus, M. LoPresti, K. L. Stone, K. P. Williams, P. Wu, K. Hwang and M. Piatak, *J. Biol. Chem.*, 265, 8665-8669 (1990).
- 15) L. Benatti, M. D. Saccardo, M. Dani, G. Nittig, M. Sasano, R. Lorezetti, D. A. Lappi and M. Soria, *Eur. J. Biochem.*, 183, 465-470 (1989).
- 16) S. S. Kung, M. Kimura and G. Funatsu, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 3301-3318 (1990).
- 17) G. Funatsu, S. Yoshitake and M. Funatsu, *Agric. Biol. Chem.*, 42, 501-503 (1978).

- 18) F. Stirpe, A. C-Campani, L. Barbieri, E. Lorenzoni, L. Montanaro, S. Sperti and E. Bonetti, *FEBS Lett.*, 85, 65-67 (1978).
- 19) T. A. Walsh, A. E. Morgan and T. D. Hey, *J. Biol. Chem.*, 266, 23422-23427 (1991).
- 20) N. Habuka, M. Miyano, J. Kataoka and M. Noma, *J. Mol. Biol.*, 221, 737-743 (1991).
- 21) J. R. Warner, A. Rich and C. A. Hall, *Science*, 138, 1399-1403 (1962).

☆ 学会誌 Viva Origino 投稿規定

I. 論文の種類

投稿は、以下の区分1～3のいずれかに分類する（Ⅲ-4参照）。

1. Review：解説または総説。
2. Article：オリジナルな研究結果の報告。
3. News and Views：
 - a) 研究報告，解説，総説に対するコメント。
 - b) 研究に対するプリンプル，アイデア，意見。
 - c) 国内外の関係学会報告。
 - d) 教育・研究体制に関する意見。
 - e) その他。

II. 論文の体裁

1. 使用言語は日本語または英語とする。
2. Review および Article については、本文が英文の場合は和文要旨を、また本文が和文の場合は英文の要旨を添える。
3. 著者名の下に所属機関の名称・所在地・郵便番号を付記する。
4. 引用文献は、引用順に肩つきの通し番号で表示し、本文末尾に引用文献表を付してまとめる。雑誌の省略表示は、Chemical Abstract 等に採用されている標準表示の様式に従う。
5. 図表および写真は下記の基準によって準備する。
 - a) 図および写真には Fig. 1, Fig. 2 等、また表には Table 1, Table 2 等の通し番号をつける。
 - b) 原図は黒インクで明確に墨入れし、そのまま写真製版できる仕上がりとする。写真はプリントした陽画とする。
6. 単位と記号は、国際的に慣用されているものを用いる。単位は CGS (MKS) 系または SI 系を原則とし、両者を混用しない。
7. 術語および略語は、IUPAC-IUB の勧告を基準とする。化合物名等で英語表記がよいと判断されるものは、英語表示とする。その他は一般に関係学会誌等で使用されているものにならう。
8. 和・英文とも原稿作成にあたっては、それぞれの手引きを参照のこと。

III. 論文の提出と受理

1. 原稿原本のほかにコピー1部を添えて Viva Origino 編集委員会事務局（以下、事務局という）に提出する。
2. 投稿受理日は、原稿が事務局に到着した日とする。ただしレフェリーの指摘による訂正などで、再提出

がいちじるしく遅れる場合には、再提出日を受理日とすることがある。

3. 採否は、事務局が依頼したレフェリーの審査を経て決定する。
4. 投稿区分はレフェリーの意見を参照の上、事務局が承諾を得て決定する。

IV. 投稿の資格

1. 著者は、生命の起原および進化学会の会員であるか、あるいは会員の紹介を経ることが望ましい。
2. 会員以外の著者に原稿を依頼することができる。

V. 校正

校正は、事務局が形式の統一等に関して校正した後、著者の責任において行う。校正段階での新たな変更等は、技術的な理由から原則として認めない。

VI. 掲載経費の負担

製版・トレース等、別途の費用が必要な場合の実費は、著者が負担する。

VII. 別刷

著者は、校正に同封した申込用紙により別刷を有料で申込むことができる。

☆ 写真製版英文原稿作成の手引き

英文原稿は原寸大の写真製版（和文要旨を除く）とするので、以下の規定による。

1. タイプの文字は elite 12ピッチ、シングル・スペースとし、鮮明に印字する。
2. 厚手のタイプ用紙を用い、横14cm×縦21cmの枠内に収める。
3. 第1ページに表題、著者名、所属機関等を、この順序に記す。
 - ア) 表題は大文字とし、9行目から始める。
 - イ) 表題のあと、4行あけて著者名を記す。
 - ウ) 著者名のあと、1行あけて著者の所属と所在地（郵便番号付記）を英文で記す。
 - エ) 所在地のあと、4行あけて ABSTRACT を記す。
 - オ) 1行あけて KEY WORDS (10語以内) を記す。
4. 原寸大の図表は所定の位置に貼る。縮尺を要する図表は別紙に記し、本文には相当する空白を設け、空白中央に図表番号を鉛筆で指示する。
5. 見出しは、区切りの大きいものから順に下記7)〜8)の通りとする。各見出しのゴチ指定、改行等については、既刊の実例にならう。
 - ア) ORIGIN OF LIFE・・・のごとく、全部大文字

とし、左端から記す。見出しの上を2行あけ、下を1行あける。

イ) Origin of life・・・のごとく、最初の1文字のみ大文字とする。見出しの上を1行あけ、下を1行あける。

ウ) 文節の最初に記し、文頭を下げない(インデントなし)。Origin of life.のごとくアンダーラインを引き、ピリオドを打ち、行を変えずに文章を続ける。

6. 各ページとも、タイプ枠外の右上隅に第一著者名とページを鉛筆で記す。この記入は整理のためであり、印刷されない。
7. 別に和文要旨を添える。要旨冒頭に和文表題、著者名、所属機関、その所在地(郵便番号を付記)を、この順序に記す。要旨本文の長さはなるべく400字以内とする。

☆ 写真製版和文原稿作成の手引き

和文原稿も英文原稿同様直接写真製版が可能な原稿をワープロを用いて作成することが望ましい。

1. 文字は24ドット以上の明朝体とする。
2. 厚手の用紙を用い、横17cm×縦25cmの枠内に1行40文字、40行を印字する。すべての文字および、図、表、写真は80%に縮小されて印刷される。
3. 第1ページに、表題、著者名、所属機関とその所在地(郵便番号付記)をこの順に記す。

ア) 表題は4倍角文字とし、4行目から始める。文字の大きさが変えられない場合はそのまま(全角)の文字を使う。

イ) 表題のあと、4行あけて、著者名を記す。

ウ) 著者名のあと1行あけて、著者名の、所属とその所在地(郵便番号付記)を記す。

エ) 所在地のあと、4行あけて、本文を記す。
4. 見出しは、区切りの大きいものから順に下記ア)～ウ)の通りとする。

ア) 1, 2, 3, ……

イ) 1-1, 1-2, …… , 2-1, 2-2, ……

ウ) a), b), c), ……

各見出しのゴチ指定、改行等は既刊の実例にならう。
5. 図、表、写真は所定の位置に貼る。図、表、写真の番号、表題、説明は和文原稿の場合にも英文で記すことが望ましく、そのまま写真製版出来るよう図、写真の下、表の上および下に記す。

6. 和文原稿の場合には英文要旨をつける。

英文要旨冒頭には、表題、著者名、所属機関、その所在地(郵便番号付記)をこの順で記す。続いて、4行あけた後、ABSTRACT, KEY WORDS (10語以内)を記す。

7. 英文要旨は英文原稿作成の手引きを参考にして記す。
8. 英文要旨は表題からKEY WORDSまで含めて1頁以内に納める。

☆ 和文原稿作成の手引き

1. 原稿は400字詰め原稿用紙に横書きで記す。ワープロを使用の場合は、25字×16行とする。
2. 第1ページに和文表題、著者名、所属機関、その所在地(郵便番号を付記)を、この順序に記す。第2ページには英文要旨を記す。第3ページ以下に本文を記す。
3. 見出しは、区切りの大きいものから順に下記ア)～ウ)の通りとする。各見出しのゴチ指定、改行等は、既刊の実例にならう。

ア) 1, 2, 3, ……

イ) 1-1, 1-2, …… , 2-1, 2-2, ……

ウ) a), b), c), ……
4. 図、写真および表は別紙とし、原稿中にはそれぞれの挿入箇所を指定する。
5. 和文原稿の場合にも、図、写真および表の表題および説明文は英文で記すことが望ましい。
6. 英文要旨冒頭には、表題、著者名、所属機関、その所在地(郵便番号を付記)を、この順序で記す。
7. 英文要旨の後にKEY WORDS (10語以内)を記す。(日本語でのキーワードは不必要。)

生命の起原および進化学会

<1996、1997年度役員>

名 譽 会 長 野田 春彦
会 長 原田 肇
副 会 長 長野 敬、中村 運、大島 泰郎

〔運営委員会〕

委 員 長：湯浅 精二 会計責任者：松野孝一郎 編集責任者：赤星 光彦
委 員：秋山雅彦、石神正浩、大西耕二、小林憲正、佐藤七郎、島田 秋彦
清水幹夫、下山 晃、長谷川政美、藤井紀子、伏見 譲、松野孝一郎、
胸組 虎胤、柳川弘志、山中健正

会 計 監 査 佐藤七郎、 山中 健生

学会本部事務局 〒560 豊中市待兼山町1-16
大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻内
Tel: 06-850-5823(call-in), Fax: 06-850-5817
E-mail: syuasa@bio.sci.osaka-u.ac.jp
責任者 湯浅 精二

経理部事務局 〒940-21 長岡市上富岡町
長岡技術科学大学生物系
Tel: 0258-46-6000(Ex.4518), Fax: 0258-46-8163
E-mail: kmatsuno@voscc.nagaokaut.ac.jp
責任者 松野孝一郎

編 集 事 務 局 〒590-04 大阪府泉南郡熊取町野田1010
京都大学原子炉実験所
Tel: 0724-51-2630, Fax: 0724-52-7364
E-mail: akaboshi@rri.kyoto-u.ac.jp
責任者 赤星 光彦

編 集 顧 問 秋山 雅彦 石神 正浩 大島 泰郎 下山 晃
長野 敬 柳川 弘志 山中 健生 湯浅 精二

編 集 委 員 居原 秀 大西 耕二 川本 圭造 後藤 公彦
小林 憲正 島田 秋彦 長田 洋子 長谷川典巳
藤井 紀子 本多 元 三田 肇 胸組 虎胤

Special Reporter Rafael Navarro-Gonzalez (National University of Mexico)

Viva Origino 24巻3号

1996年10月15日 印 刷

1996年10月21日 発 行

編集者	〒590	大阪府泉南郡熊取町野田1010	京都大学原子炉実験所内 生命の起原および進化学会編集部
印刷者	〒594	大阪府和泉市池上町460-33	和泉出版印刷株式会社 TEL 0725-45-2360 FAX 0725-45-6398
発行者 及び 出版者	〒560	豊中市待兼山町1-16	大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻内 生命の起原および進化学会事務局 責任者 湯浅 精二



Contents

- ◎ Protein structure and DNA conformation in gene regulation system
M. Kato(183)

ARTICLES

- ◎ The role, functional structures and molecular evolution of translation elongation factor 3(EF-3) characteristic for fungi
M. Miyazaki, K. Ogawa and Md. Ruhul Abid(185)
- ◎ Possible mechanistic roles of bent DNA in transcriptional regulation
T. Ohyama(199)
- ◎ DNA-protein interaction involved in centromere heterochromatin organization of human chromosome
K. Sugimoto(211)
- ◎ A new type 1 ribosome-inactivating protein from the leaves of *Stellaria acutata*, purification and characterization
S. Yoshinari, M. Tamura and Y. Endo(225)