

学位論文

大腸菌DNA ジャイレースにおける *acrB*
変異に関する分子生物学的研究

1998年

船附賢三

①

学位論文

大腸菌DNA ジャイレースにおける *acrB*
変異に関する分子生物学的研究

1998年

船附賢三

目次

「要旨」	6
「緒言」	9

「第1章」

*acrB*変異遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素学的性質 に関する研究

要約	18
第1節 <i>acrB</i> 変異遺伝子のクローニングとその塩基配列の解析	19
・ 実験材料および方法	
— 使用大腸菌株およびプラスミド	20
— 使用培地、試薬および酵素	20
— <i>gyrB(acrB)</i> 遺伝子のクローニングとその塩基配列の解析	20
— 野生型 <i>gyrB(wild)</i> および変異型 <i>gyrB(acrB)</i> 遺伝子を含む大腸菌形質 転換株のアクリフラビンに対する感受性試験	21
・ 結果	
— <i>gyrB</i> 遺伝子における <i>acrB</i> 変異の同定	22
— 各種形質転換株のアクリフラビン感受性	22

第2節 GyrB、GyrB^{acrB}、GyrAの各サブユニットの精製とこれらを用いた再構成Gyraseの生化学的性質について 27

・実験材料および方法

—使用大腸菌株およびプラスミド	27
—使用培地、試薬および酵素	27
—各種サブユニットの精製	28
—Gyraseの再構成	30
—スーパーコイリングアッセイ	30
—ATPase活性	31
—野生型および変異型GyrBサブユニットの四量体構成能	31

・結果

—各種Gyraseサブユニットの精製	31
—各種再構成Gyraseのアクリフラビン存在下におけるスーパーコイリング活性能	32
—各種再構成GyraseのATPase活性	32
—各種Gyrase四量体の再構成能	32

第3節 *acrB*変異領域のDNA結合能について 43

・実験材料および方法

—試薬および酵素	43
—ゲルシフトアッセイ	43

・ 結果	
—各種再構成GyraseのDNA結合能	44

考察	48
----	----

「第2章」

DNA gyraseの反応機構における *acrB*変異領域とキノロン薬耐性変異領域の役割に関する研究

要約	53
----	----

第1節 キノロン薬耐性変異を導入した各種GyrBサブユニットの精製 とそのスーパーコイル活性	54
---	----

・ 実験材料および方法	
—使用大腸菌株およびプラスミド	54
—使用培地、試薬および酵素	55
— <i>gyrB</i> 遺伝子へのキノロン薬耐性変異の導入	55
—各種GyrBサブユニットの精製	56
—スーパーコイルングアッセイ	56

・ 結果	
—キノロン薬耐性変異GyrBサブユニット	67
—アクリフラビンおよびオキシリン酸存在下におけるDNAスーパー コイルング活性	57

第2節	キノロン薬耐性変異を保持するGyrBサブユニットDNA結合能 について	65
・	実験材料および方法	
	—試薬および酵素	65
	—ゲルシフトアッセイ	65
・	結果	
	—アクリフラビンおよびオキソリン酸存在下におけるDNA結合能	66
第3節	キノロン薬耐性変異GyrA ^{Asn87} サブユニットの精製とこれを含む 再構成GyraseのDNA結合能について	72
・	実験材料および方法	
	—使用大腸菌株およびプラスミド	72
	—使用培地、試薬および酵素	73
	— <i>gyrA96</i> 遺伝子のクローニングとその塩基配列の解析	73
	—GyrA ^{Asn87} サブユニットの精製	73
	—スーパーコイリングアッセイ	74
・	結果	
	— <i>gyrA96</i> 変異の同定	75
	—アクリフラビンおよびオキソリン酸存在下におけるDNAスーパー コイリング活性	75

考察	81
「総合考察」	86
「引用文献」	88
「謝辞」	93
「公表論文および口頭発表」	
1. 公表論文リスト	94
2. 口頭発表リスト	95
「付録」	98
1. 副論文	
2. 参考論文	

「要旨」

中村らはこれまでに、大腸菌をアクリフラビン感受性にする一群の突然変異株を報告してきた。アクリフラビン感受性を支配する染色体上の変異を *acr* (*acri*flavine-sensitive) 変異と呼び、*acrA*, *acrB*, *acrC*, *acrD*, および *acrE* の5種が同定された。今回、著者は分子生物学的手法を使って、この *acrB* 変異の解析をおこなった。

acrB 変異がDNA gyrase (Gyrase) のBサブユニット(GyrB)をコードする *gyrB* 遺伝子と同一シストロン上に位置することがHansenらによってすでに報告されている。このことから第1章において、この *acrB* 変異の位置を知る目的で、最初に *acrB* 変異株より *gyrB* 遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、*acrB* 変異株の *gyrB* 遺伝子は、そのコードするGyrBタンパク質のC末端部分に、2つのアミノ酸置換($\text{Ser}^{759}\text{-Arg}^{760} \Rightarrow \text{Arg-Cys}$)の変異が存在することを明らかにした。次に、野生型 *gyrB* 遺伝子および *acrB* 変異型 *gyrB* 遺伝子を組み込んだプラスミドをそれぞれ作成し、大腸菌に形質転換した。そして、*gyrB* 遺伝子上の *acrB* 変異がアクリフラビン感受性に関与することを明らかにした。

そこで、*in vitro* において *acrB* 変異がGyraseの酵素活性におよぼす影響を明らかにするため、Gyraseの各サブユニットの精製系を新たに構築した。グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)タンパク質融合法により、Aサブユニット(GyrA)およびGyrBサブユニットをそれぞれ大腸菌で大量に発現させた後、アフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせて、各サブユニットを精製した。そこで、それぞれ精製したGyrAおよびGyrBサブユニットを会合させ、各種Gyrase四量体(A₂B₂)を再構成しその活性を検討した。

GyrBサブユニットに *acrB* 変異をもつGyrase [Gyrase(A+B^{*acrB*})^{注1} と略す] は

^{注1} GyrAサブユニットは野生型で、GyrBサブユニットは *acrB* 変異を含むGyraseを示す。

野生型〔Gyrase(A+B)^{注2}と略す〕に対して、スーパーコイルング反応の比活性が、80分の1に低下していた。しかし、各種Gyraseにおいて、アクリフラビンに特異的な感受性は観察されなかった。各種Gyraseの再構成の状態をゲル濾過カラムで解析したところ、Gyrase(A+B^{acrB})はGyrase(A+B)と同程度の四量体形成が観察された。また、内在するATPase活性には変化がみられなかった。しかし、Gyrase(A+B)と比較して、Gyrase(A+B^{acrB})はDNA存在下で特異的におこるATPaseの活性化がほとんど観察されなかった。そこで、Gyrase認識配列をもつDNA断片を基質として、ゲルシフトアッセイをおこない、Gyrase(A+B^{acrB})およびGyrase(A+B)のDNAとの結合の程度を調べたところ、Gyrase(A+B^{acrB})ではDNA結合能が低下していることが観察された。しかし、アクリフラビンに特異的な感受性は観察されなかった。

これらの結果から、*acrB*変異は大腸菌GyraseのDNA結合能を低下させる変異であること、DNA結合能の低下に由来するGyrase活性の減少が*in vivo*でのアクリフラビン感受性をきたしていることを明らかにした。また、*gyrB*遺伝子の*acrB*変異が存在する領域（C-TERM領域）はこれまで、GyrAサブユニットとの会合やGyraseのコンフォメーション変化に必要と考えられていたが、さらにGyraseのDNA結合にも関与していることが示唆された。

第2章において、Gyraseのキノロン薬耐性変異と*acrB*変異の関係を調べる実験をおこなった。キノロン薬耐性変異をGyrAサブユニットにもつ大腸菌JM109株より*gyrA96*遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果はナリジキシン酸耐性変異株由来の*gyrA*遺伝子で報告されていた変異（GyrA^{Asn87}）と一致した。さらに、GyrBサブユニットにキノロン薬耐性変異をもつ*gyrB*(Glu⁴⁴⁷)遺伝子を作成し、*acrB*変異も併せもつ二重変異遺伝子*gyrB*(*acrB*-Glu⁴⁴⁷)も作成した。これらの遺伝子産物（各サブユニット）をGSTタンパク質融合法により精製し、各サブユニットを再構成させた各種Gyraseを使用したキノロン薬耐性変異と*acrB*変異の関係について検討した。

^{注2} GyrAおよびGyrBサブユニットが野生型のGyraseを示す。

再構成した各Gyraseのスーパーコイル活性を調べたところ、キノロン薬耐性変異をもつGyrase(A^{Asn87}+B)^{注3} およびGyrase(A+B^{Glu447})^{注4} は既報どおり、キノロン薬（オキシリン酸）に低い感受性を示した。ところが、意外にもこれらのGyraseはすべてアクリフラビンに高い感受性を示した。

アクリフラビンはGyraseのDNA結合を阻害するため、キノロン薬耐性変異も同様にGyraseのDNA結合に関与することが予想された。そこでアクリフラビン存在下で、Gyrase(A+B^{Glu447})およびGyrase(A+B^{acrB-Glu447})^{注5} のDNA結合をゲルシフトアッセイで検討した。その結果、前者はGyrase(A+B)と同程度の結合を示し、後者はアクリフラビン高感受性を示した。また、キノロン薬存在下で、キノロン薬耐性のGyraseもGyrase(A+B)と同程度にDNAと強く結合することを明らかにした。

これらの結果は、キノロン薬変異は通常観察されるDNA結合とは別のタイプのDNA結合に関与しており、*acrB*変異によって通常のDNA結合が抑制されたときにのみ、ゲルシフトアッセイで検出されることが示唆される。また、Gyraseはキノロン薬と結合する際に、各GyrA,Bサブユニットのキノロン薬耐性変異領域同士が接近して‘キノロンポケット’と呼ばれる構造を作ることが予想される。以上の経緯は各サブユニットが協調して、DNA結合をおこなう際にできる構造であることを強く示唆した。

^{注3} GyrAサブユニットはAsn⁸⁷変異を含み、GyrBサブユニットは野生型のGyraseを示す。

^{注4} GyrAサブユニットは野生型で、GyrBサブユニットはGlu⁴⁴⁷変異を含むGyraseを示す。

^{注5} GyrAサブユニットは野生型で、GyrBサブユニットは*acrB*変異およびGlu⁴⁴⁷変異を含むGyraseを示す。

「緒言」

アクリジン色素はアクリジン核($C_{13}H_9N$, M.W=179.22)を基本骨格とする色素群で、一般に弱塩基性であり、強い蛍光を示す。アクリジンはコールタールの脱晶アントラセン油からの硫酸抽出により最初に分離されたものであり、図1に代表的なアクリジン系色素の構造を示す。

アクリジンの誘導体であるアクリジン色素は、低濃度で微生物の発育を阻止することから、発見当時は抗菌薬として脚光をあげたが、第二次世界大戦後は抗生物質の出現によってその使用頻度は減少した。アクリジン色素の作用機序については、分子生物学的な手法を取り入れることにより、解明されてきた。

アクリジン色素は、その他に抗生物活性を示し、マラリアの治療に対してアテブリン(その他の名前としてはキナクリン、メパクリン、アクリキンあるいはアタブリン)が使用され、抗トリパノゾーマ作用に対してはアクリフラビン(別名としてはトリパフラビン、ゴナクリン、アクリナミンあるいはイユフラビン)や殺菌剤リバノールとしてのアクリノールなどの使用が知られている。

アクリジン色素は核酸と高い親和性を示す。これはアクリジン色素が正の電荷を帯び、核酸のリン酸基グループが負の電荷を帯びていることに起因している。これらの結合が電荷的な結合であることは、BradleyとWolf(1)によって証明された。アクリジン色素とDNA複合体において、アクリジン色素のDNAへの結合様式は、DNA塩基対間への挿入(インターカレーション)(2)であり、さらにTubbs(3)らはDNAへのインターカレーションの位置が、グアニン(G)-シトシン(C)対よりもむしろ、アデニン(A)-チミン(T)対であることを示した。アクリジン色素がDNA分子にインターカレートすることにより、通常、DNA(B型)の塩基対間の距離は 3.36 \AA から約2倍の 6.8 \AA に広がる(2)。その結果、DNA自身の複製の際に塩基対が余分に付加あるいは欠損し、いわゆるフ

レームシフト突然変異を誘発する。アクリジン色素のこのような突然変異誘導作用により、微生物、特に酵母のチトクローム系に変異をおこさせ、呼吸欠損変異株を生ずる。また、大腸菌の接合に関与するF因子を除去する作用もあることが知られている。

これまで、アクリジン色素の中で主にアクリフラビンを対象にして、大腸菌に対する作用機序が調べられてきた。大腸菌の野生型の多くはアクリフラビンに高い耐性を示す。一方、Nakamuraら(4-7)は感受性を示す株をいくつか単離し、それぞれの関係する遺伝子をいくつか同定した。これらは*acrA*, *B*, *C*, *D*および*E*遺伝子と命名された。

*acrA*遺伝子は大腸菌染色体上約10.6分(図2)に位置し、この遺伝子はDNA鎖の伸長に関与している*dnaZ*遺伝子の近傍にあり、アクリフラビンに対しては高感受性を示す。また、*acrA*変異株はメチレンブルーのような色素剤(8)および、フェネチルアルコール(9)やSDS(8)のような界面活性剤に対しても感受性を示す。これらの阻害剤は細胞の細胞膜に特異的に結合し、DNA複製を阻害する共通な性質を示す。*acrA*遺伝子は*acrA*, *B*, *C*, *D*および*E*遺伝子の中でこれまで最も詳しく調べられた遺伝子であり、野生型(N90株)の主染色体から*acrA*⁺遺伝子がクローニングされこの遺伝子産物が細胞膜中において、約60KDaのタンパク質として存在していることが示された(10)。また、この遺伝子のコピー数を増幅させることにより、アクリフラビン耐性の度合が増加することが示された(11)。さらに、野生株と*acrA*変異株の細胞膜をフリーズフラクチャー法による電子顕微鏡観察をしたところ、*acrA*変異株の細胞膜におけるタンパク質粒子の大きさが、野生型のものよりも小さいことが示された。また、野生株細胞膜における大型粒子が、*acrA*変異株においては欠失していることが示された(11)。最近、MaおよびKleinらはこの遺伝子が薬剤耐性機構に関与していること、このAcrAタンパク質が細胞膜に存在することさらに、各種陽イオンの排出ポンプとして働くことを明らかにした(12, 13)。

*acrB*遺伝子は大腸菌染色体上約82.0分(図2)に位置している。*acrB*変異は

*acrA*変異よりアクリフラビンに対する感受性が低いが、*acrA*,*acrB*の二重変異は*acrA*あるいは*acrB*の単一変異よりも高い感受性を示す(5)。また、*acrB*遺伝子はDNA複製の際の開始過程に関与している*dnaA*遺伝子の近傍に位置している。ところで、この*acrB*遺伝子はHansenとMeyenburg(14)によって、DNAのスーパーコイル構造の導入に関与するDNA gyraseのBサブユニットをコードする*gyrB*遺伝子と同一シストロン内にあることが示された。そして、大腸菌染色体地図には、この*acrB*遺伝子の座位は先に見い出された*gyrB*遺伝子として位置づけられている(15)。

大腸菌のDNA gyraseはII型のTopoisomerase(Topo II)であり、リラックスした閉環状(closed-circular)DNA分子に負のスーパーコイル構造の導入を触媒する機能をもつ。つまり、Gyraseは二本鎖環状DNAに結合して、1分子のDNAにスーパーコイルを次々と導入するものである。1分子のGyraseは1分間に100のスーパーコイルを導入することができる。このスーパーコイルの形成はDNA複製過程において必須なものである。*in vivo*および*in vitro*において、GyraseはATPや金属イオンの存在下で二本鎖DNAに対して、スーパーコイルDNA-弛緩型環状DNAへの変換(supercoiling-relaxation)、閉環状DNAに結び目を作ったりそれを解く反応(knotting-unknottting)、そして二つの閉環状二本鎖DNAの連環状DNAへの転換と、その逆反応(catenation-decatenation)を触媒する(16-19)。このGyraseは二つのAサブユニット(MW≒97,000, 875 aa, GyrA)と二つのBサブユニット(MW≒90,000, 803 aa, GyrB)とで四量体(MW≒400,000)を形成する。GyrAサブユニットはN末端領域(64 kDa)とC末端領域(33 kDa)から構成される。N末端領域はDNA鎖切断に直接関与するチロシン(Tyr¹²²)部位を含み、切断されたDNA鎖の5'末端部と共有結合をして、DNA切断-再結合に関与する。一方、C末端領域はスーパーコイル能の決定などをおこなうと共にGyrBサブユニットが存在しなくてもそれ自身でホモダイマーを形成する(20)。GyrBサブユニットはN末端領域(43 kDa)とC末端領域(47 kDa)から構成される。N末端領域にはATPase領域が存在し、この領域は結晶構造解析されそ

の構造が明らかになった(21)。また、N末端領域のATPase領域を欠いたものはv (ニュー) タンパク質と呼ばれ、これだけでDNAリラッキング活性を示す。(22, 23)。したがって、この領域はGyrBサブユニットにおけるTopoisomerase活性を成り立たせるすべての機能的領域をもっていると考えられる。C末端領域にはGyrAサブユニットとの結合に関係する領域が存在するが、これまでのところこのタンパク質の正確な機能についての知見は多くない。

*acrC*遺伝子は大腸菌染色体上約4.0分(図2)に座位し、DNAポリメラーゼIIIの合成に関与している*dnaE*遺伝子の近傍にある。この変異株は温度感受性で、30°Cでアクリフラビン耐性を、43°Cではアクリフラビン高感受性となる。また43°Cでは、*acrC*変異株はアクリフラビンの非存在下において細胞は線状構造を示す(6)。

*acrD*遺伝子は大腸菌染色体上約98分の付近にある(まだ詳しくは決定されていない)。これも温度感受性株として分離されたもので、30°Cではアクリフラビン耐性を示すが、43°Cでは高感受性になる。また、この*acrD*変異株は*acrC*変異株とは異なり、43°Cでは細胞分裂がおこらず、細胞は連続した線状構造を示す(6)。

*acrE*遺伝子は大腸菌K-12の中で、普通一般に使用されている野生型のものと比較して、極端にアクリフラビン耐性の高い株から分離された。この遺伝子座の決定において、アクリフラビン耐性にいくつかの遺伝子の発現が関与していることが明らかになった。そこで、これら関係する遺伝子をまとめて*acrE*遺伝子と命名した。*acrE*遺伝子はアラビノース発酵の*ara*遺伝子(大腸菌染色体上約1分)とプロリン合成の*proB*遺伝子(大腸菌染色体上約6分)の間に座位し、*ara*から97%、*proB*から2.4%のところに位置する(7)(図2)。

本論文においては、これら大腸菌の*acr*変異の中から特に、*acrB*変異を取り上げ、その変異の意義の解明を試みた。これまで、*gyrB*遺伝子の報告については主に、Gyraseを標的とするキノロン薬と関連した報告が数多くあるが、

アクリフラビンと *acrB* 遺伝子との関係についての報告は少ない。キノロン薬はキノロン骨格(1,4-dihydroquinol-4-one)を基本骨格とし、その化学構造からナフチリジン(1,8-naphthyridine)系、ピリドピリミジン(pyrido[2,3-d]pyrimidine)系、キノリン(quinoline)系およびシンノリン(cinnoline)系の四種に大別される(図3)。1949年にJ. r. Priceによって、ミカン科植物の一種から単離されたアルカロイド(melicopine)の化学構造を解明中に、その分解生成物として1-メチル-6-ニトロ-1,4-ジヒドロ-4-オキソキノロン-3-カルボン酸(1-methyl-6-nitro-1,4-dihydro-4-oxoquinolone-3-carboxylic acid)が得られ。これが歴史上初めて合成されたキノロン化合物である(24)。*gyrA* 遺伝子において、キノロン薬耐性変異はアミノ酸67-106残基の領域内に変異を生じたもので、特に83番目のセリン(Ser)がロイシン(Leu)やトリプトファン(Trp)に代わると、著しくキノロン薬耐性(25)となる。これまで、*gyrB* 遺伝子においては2つのキノロン薬耐性変異が報告(26)され、それらは426と447番目のアミノ酸〔アスパラギン酸(Asp)およびリジン(Lys)]に変異が生じていた。これらの変異をもつGyraseは*in vivo*と同様に*in vitro*においても、キノロン薬耐性を示す(27)。キノロン薬は主に細菌のGyraseに作用し、その活性を阻害する抗菌薬である。しかし、キノロン薬耐性変異株を用い、その阻害機構について調べられているが、今だ不明な点が多くある。ところが、このキノロン薬の共通した作用点は、GyraseとDNAの結合付近である。

著者はアクリフラビンとキノロン薬がどちらも抗菌薬として使用され、その作用点はDNAが関与するという共通点から、このGyraseに関する2つの変異に注目した。そして、分子生物学的手法を用いた*gyrB(acrB)* 遺伝子の研究を遺伝学的あるいは酵素学的両面から、*acrB* 変異とキノロン薬耐性変異の関係を追求し、その機構について考察をおこなった。

第1章においては「*acrB* 変異遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素学的性質に関する研究」として、アクリフラビン感受性が高くなった株(N2879株)からその変異型*gyrB(acrB)* 遺伝子を単離した。そして、その塩基配

列の解析と各種サブユニットの精製をおこなった。得られた各種サブユニットを使用して、アクリフラビン感受性試験、再構成能、ATPase活性、DNA結合能のそれぞれを調べた。これらの結果はGyraseにおける *acrB* 変異がDNA結合能を低下させる変異であることを強く示唆した。第2章において「DNA gyraseの反応機構における *acrB* 変異領域とキノロン薬耐性変異領域の役割に関する研究」は、キノロン薬あるいはアクリフラビンの存在下での再構成したGyraseへのDNA結合能を検討した。これらの結果にもとづいて、*acrB* 変異領域とキノロン薬耐性変異領域の関係を、特にGyrase-DNA結合に注目して考察し、*acrB* 変異領域が、GyraseとDNAの結合機構に関与した領域であることを示唆した。このことは、キノロン薬の作用部位であると考えられているキノロンポケットに、各GyrA、Bサブユニットが協調してDNA結合の際にできる構造であることが考えられた。

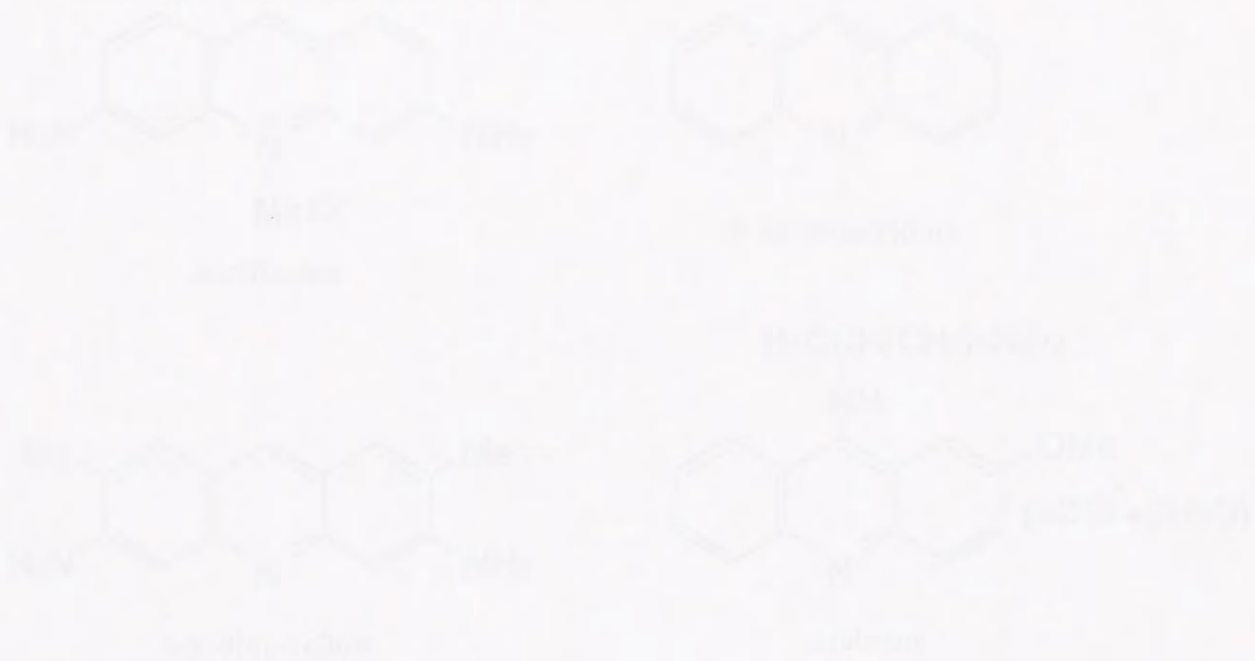
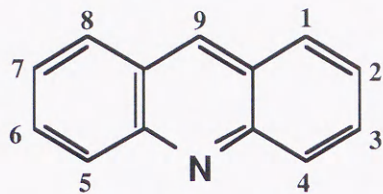
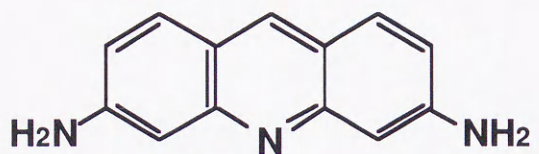


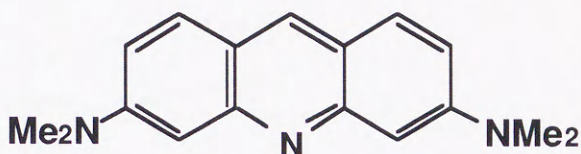
図1 代表的なアクリジン系薬の化学構造式



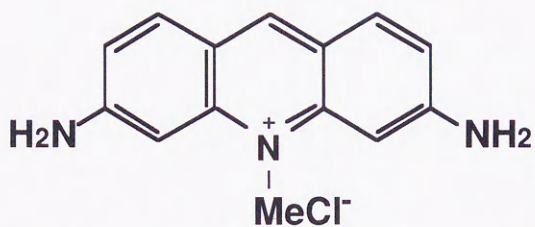
Acridine



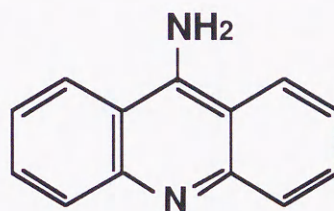
Proflavine



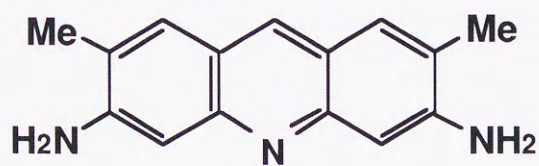
Acridine-orange



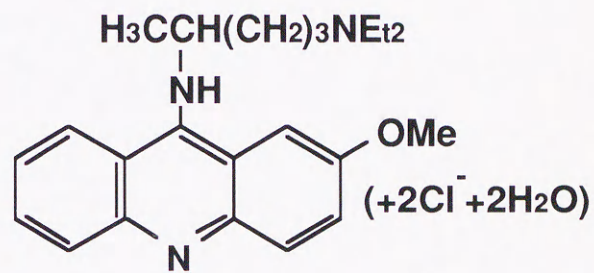
Acriflavine



9-Aminoacridine



Acridine-yellow



Atebrine

図1 代表的なアクリジン色素の化学構造式

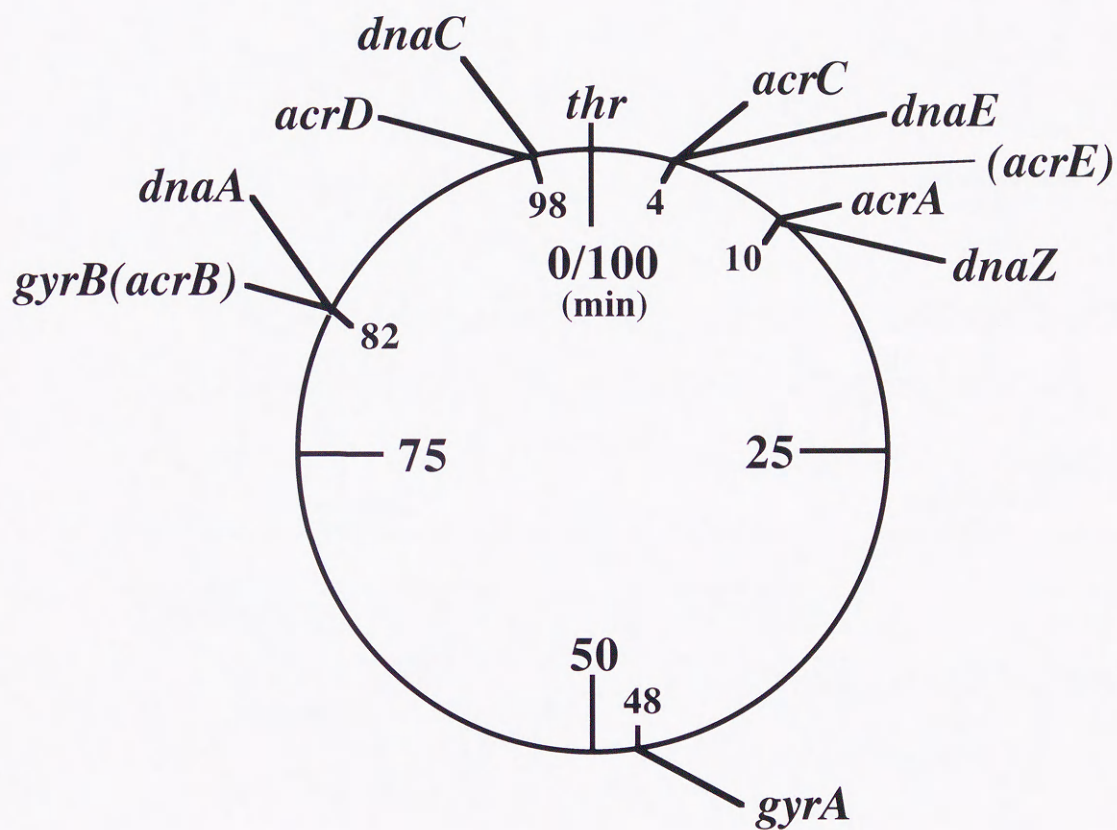
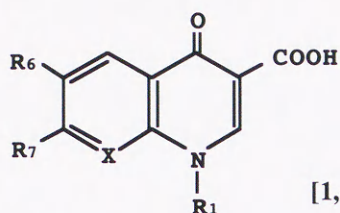
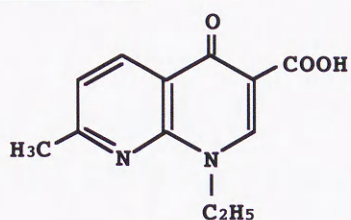


図2 大腸菌主染色体上における各遺伝子の座位



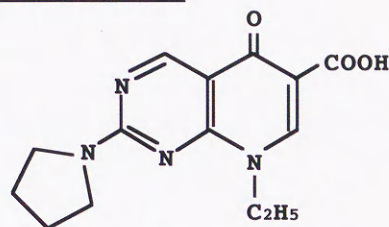
[1,4-dihydroquinol-4-one]

1,8-naphthyridine

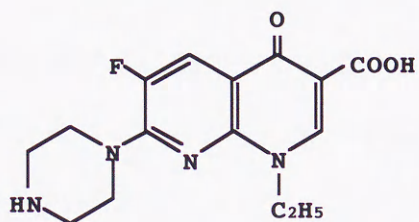


nalidixic acid
(NA)

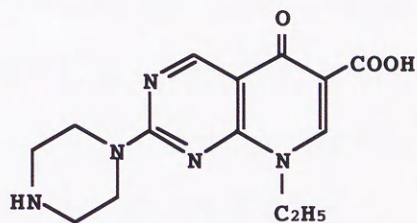
pyrido[2,3-d]pyrimidine



priomidic acid
(PA)



enoxacin
(ENX)



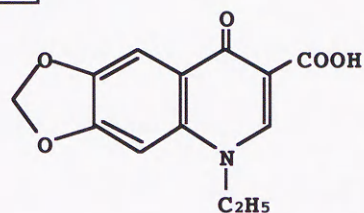
pipemidic acid
(PPA)

cinnoline

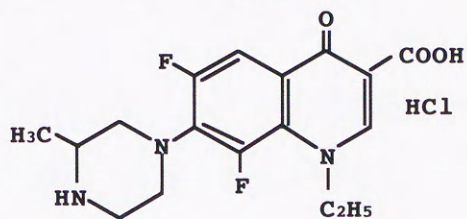


cinoxacin
(CINX)

quinoline



oxolinic acid
(OA)



lomefloxacin
(LFLX)

図3 代表的なキノロン薬の化学構造式

「第1章」

*acrB*変異遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素学的性質に関する研究

要約

本章では、*acrB*変異を持つ*gyrB*遺伝子のクローニングと変異の同定とその変異がもたらす影響の解析結果を報告する。

*acrB*変異はP1ファージを用いた手法から、大腸菌染色体上の*gyrB*遺伝子と同一シストロンに座位することが報告されている。このため、最初に*acrB*変異を同定する目的で、アクリフラビン感受性変異株であるN2879株の*gyrB*遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定した。その結果、*acrB*変異は野生型*gyrB*遺伝子に対し、2ヶ所の塩基置換をおこす二重点変異であることを明らかにした。すなわち、GyrBタンパク質のC末端の2ヶ所で、アミノ酸(Ser⁷⁵⁹-Arg⁷⁶⁰⇒Arg-Cys)の置換がおこっていることが明らかとなった。

次に、この変異が実際にアクリフラビン感受性に関与しているかどうかを調べる目的で、野生型*gyrB*遺伝子および*acrB*変異型*gyrB*遺伝子のそれぞれを挿入したプラスミドで大腸菌を形質転換した。アクリフラビン存在下において形質転換株の生育を調べたところ、*gyrB*遺伝子上の*acrB*変異が大腸菌の生育に影響をあたえることを確認した。

さらに*acrB*変異型*gyrB*遺伝子の産物(GyrB^{acrB}タンパク質)の特性を*in vitro*で解析するため、Gyraseタンパク質を大量に調製する系を新たに構築した。GSTタンパク質融合法を用いてGyraseの各サブユニットの発現プラスミドを作成し、大腸菌で大量発現させた。発現させた各サブユニットは、2種類のアフィニティーカラムおよびイオン交換カラムを用いて精製した。個別に精製したGyrAとGyrBのサブユニットを会合させ、Gyrase四量体を再構成するこ

とにより野生型および $acrB$ 変異型のGyraseを調製した。

各Gyraseのスーパーコイリング活性を調べたところ、 $acrB$ 変異型Gyrase〔Gyrase(A+B^{acrB})〕の比活性は野生型〔Gyrase(A+B)〕のものより約80分の1に低下していることが明らかとなった。同一unit数の下でアクリフラビン感受性、四量体の再構成能および内在するATPase活性に両者に顕著な差はみられなかった。しかし、DNA存在下において、ATPaseの活性化がGyrase(A+B^{acrB})ではほとんどみられなかった。したがって、 $acrB$ 変異とDNAとの結合についての関連が示唆された。両者のDNA結合について調べた結果、Gyrase(A+B^{acrB})ではDNA結合が著しく低下していること、また、アクリフラビンがGyraseのDNA結合を阻害することが明らかとなった。しかし、アクリフラビンによるGyrase(A+B^{acrB})の特異的な高感受性は確認されなかった。さらに、GyrAサブユニットの量を一定にして、GyrBサブユニット(GyrBとGyrB^{acrB})の量比を変えて、Gyraseの再構成をおこなったところ、GyrB^{acrB}の量に依存して再構成されたGyraseのDNA結合能が減少した。以上の結果から、 $acrB$ 変異はGyraseのDNA結合を著しく低下させるが、特異的なアクリフラビン感受性をもたないことが明らかとなった。変異株N2879株のアクリフラビン感受性は少なくとも*in vitro*においては、酵素活性の低下による原因であることが考えられた。さらにGyrBサブユニットのC末端領域はスーパーコイリング反応の基質となるDNAが、Gyraseへの結合を開始するのに必須な領域であることを見出した。

第1節 $acrB$ 変異遺伝子のクローニングとその塩基配列の解析

アクリフラビン感受性株(N2879株)から、 $gyrB(acrB)$ 遺伝子のクローニングを、野生型 $gyrB(wild)$ 遺伝子の制限酵素BglII切断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションによっておこなった。そして、得られた $gyrB(acrB)$ 遺伝

子の塩基配列の解析、*gyrB(acrB)*遺伝子を含むpSBIIプラスミドと*gyrB(wild)*を含むpJB11プラスミドをそれぞれ、変異型(N2879株)および野生型(W1895株)に形質転換し、これらの形質転換株のアクリフラビン存在下における生育曲線を解析した。

実験材料および方法

・使用大腸菌株およびプラスミド

菌株は野生型のW1895(*metB, gyrA⁺, gyrB⁺, acriflavine^r*)株と*acrB*変異株としてN2879(*acriflavine^s*, W1895由来の変異株)株を使用した(5)。

プラスミドpJB11(28)は3.4 kbDNA断片の*gyrB(wild)*遺伝子を含むもので、Dr. Hase(大阪市立環境科学研究所)から譲り受けた。pBluescriptII(KS⁺)プラスミドはStratagene社製のものを使用した。

・使用培地、試薬および酵素

PGY培地-conc [1% ポリペトン(Difco社製), 0.3% Yeast extract(Difco社製), 0.3% NaCl, 0.1% Glucose, pH7.4に調製] を菌株の生育培地として使用し、アクリフラビン感受性試験においてはPGY培地-dil [0.5% ポリペトン(Difco社製), 0.1% Yeast extract (Difco社製), 0.3% NaCl, 0.1% Glucose, pH8.0に調製] を使用した。アクリフラビンはナカライテスク社製のアクリフラビン塩酸塩を使用し、各種制限酵素、Ligation kitおよびアガロースは宝酒造製のものを、ECL kitはAmersham社製のものを使用した。

・ *gyrB*(*acrB*)遺伝子のクローニングとその塩基配列の解析

CosloyとOishi(29)らの方法に従い、最初にN2879株から主染色体ゲノムDNAを調製し、制限酵素*Hind*III処理をおこなった後、これを0.8%アガロースゲルにおいて、電気泳動(100V一定、Mupid I-コスモバイオ社製)をおこなった。泳動マーカー(BPB)が電極の+極側から約1cmの位置で泳動を停止し、これをハイブリダイゼーション用のナイロンメンブレンに一昼夜の転写をおこなった。このメンブレンを使い、ECL法による常法に従ったサザンハイブリダイゼーションをおこなった。プローブはプラスミドpJB11中に保持されている*gyrB*⁺遺伝子断片を、制限酵素*Bgl*IIIで消化した時に得られる約2.5kbのDNA断片を用いた。ハイブリダイゼーションの結果から、シグナルが得られたゲノムDNA断片の大きさを調べ、その付近の分子量のDNA断片を、別に泳動したゲルから分離精製し、pBluescriptII(KS⁺)プラスミドの*Hind*III切断部位に連結(Ligation)し、ライブラリーを作成した。このライブラリーのプラスミドの中から、*gyrB*⁺遺伝子DNA断片とハイブリダイズするものを選択し、各種制限酵素の切断パターン解析によりN2879株の*gyrB*遺伝子を含むクローンを同定した。

得られたクローンについて、その挿入DNA断片の全塩基配列の決定をSequenase Version 2.0 kit (U.S Biochemical Co.)を用いておこなった。

・ 野生型*gyrB*(wild)および変異型*gyrB*(*acrB*)遺伝子を含む大腸菌形質転換株の
アクリフラビンに対する感受性試験

各種プラスミドの形質転換はカルシウム法によりおこなった(30)。

各形質転換株を10mlのPGY-conc培地において、それらの単一コロニーを37℃で終夜振とう培養し、その後、遠心(HITACHI RPA20-2 roter, 4℃, 6000rpm 10min)によって集菌し、Saline溶液(0.8% NaCl)で菌体を3回洗浄した。そし

て、菌体が 10^5 cells/mlになるように懸濁した。アクリフラビンの最終濃度が $20\mu\text{g/ml}$ になるように調製したPGY-dil培地に菌体を加えて、 37°C で振とう培養をおこない、その後、2時間ごとに 1ml ずつとりSaline溶液で希釈して3枚のPGY寒天培地に 0.1ml ずつひろげ、 37°C で18時間保温し、その生菌数を調べた。

結果

・ *gyrB*遺伝子における*acrB*変異の同定

図4に*gyrB(acrB)*遺伝子の*acrB*変異部位を示す。解析の結果、*gyrB(acrB)*遺伝子の塩基配列において、2ヶ所の塩基置換が明らかになった。翻訳開始のアデニン(A)から2275番目のAはトランスバージョンによってシトシン(C)に換り、そして、2278番目のCがトランジッションによってチミン(T)に置き換っていた。GyrBサブユニットにおいて、これらの点変異は2個のアミノ酸の変化をもたらす。759番目のセリン(Ser)がアルギニン(Arg)にそして、760番目のArgがシステイン(Cys)にそれぞれ置換されるものである。また、これらの変異は今まで、その機能がよく解明されていないGyrBサブユニットのC末端領域に位置していた(図5)。その他の部分についての塩基配列は既知の*gyrB*遺伝子の配列と完全に一致した(31)。

・ 各種形質転換株のアクリフラビン感受性

図6に $20\mu\text{g/ml}$ のアクリフラビン存在下での各菌株の生育曲線を示す。

野生株であるW1895株はアクリフラビン処理後も連続した増殖を示した。*gyrB(wild)[pJB11]*あるいは*gyrB(acrB)[pSB1]*の多コピー数のプラスミド保持す

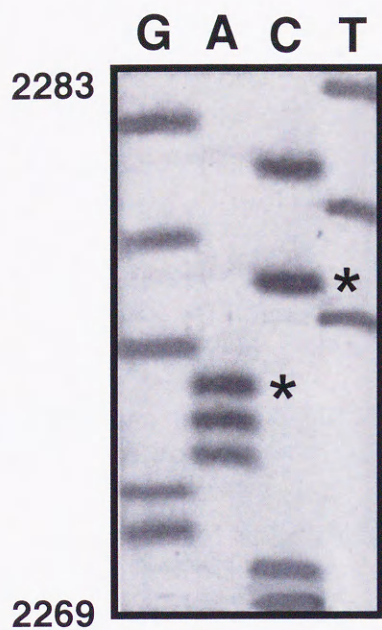
るW1895株もアクリフラビン耐性を示した。しかしながら、pJB11を保持する株はアクリフラビン存在下で、W1895株と同程度に速い増殖を示したのに対し、pSB1を保持する株はアクリフラビン処理2時間までは、生菌数の減少が観察され、その後にアクリフラビン耐性の生育を示す傾向が見られた。

変異株であるN2879株ではアクリフラビン感受性となり、生育が見られなかった。一方、pJB11を保持するN2879株は、培養開始後4時間までは生菌数の減少が観察されたが、その後はアクリフラビン耐性を示し、生育がみられた。



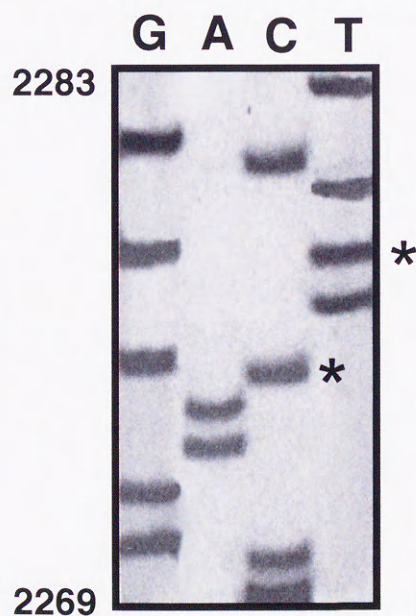
図4. *acrB* 変異株 (2275bp, 2283bp) の塩基配列の比較。(A)が野生型を(B)は *acrB* 変異型の配列を示す。

(A)



		2275	2278	
		↓	↓	
CCG	GAA	AGT	CGT	CGT
Pro	Glu	Ser	Arg	Arg
		759	760	

(B)



		2275	2278	
		↓	↓	
CCG	GAA	CGT	TGT	CGT
Pro	Glu	Arg	Cys	Arg
		759	760	

図4 *acrB*変異領域(2269bp-2283bp)の塩基配列の比較.
(A)が野生型を(B)は*acrB*変異型の配列を示す.

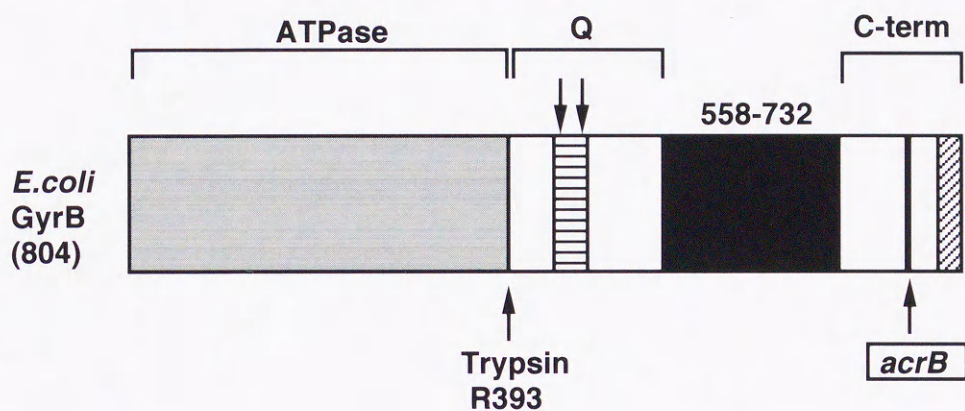


図5 大腸菌DNA gyrase Bサブユニットの構造模式図.

ATPase領域の境界線はトリプシン切断部位(Arg-393)によって分けられる(32).黒部分(558-732)は*B. subtilis* Gyraseや真核生物のTopoisomeraseにおいては見いだされないアミノ酸配列が挿入されている領域である(33).Qの領域はキノロン薬耐性変異(矢印↓で示している部分はAsp⁴²⁶とLys⁴⁴⁷である)の領域を示している.またこの領域は高度なアミノ酸保存配列領域であり、それはEGDSA(424-428), PL(R/K)GK(I/L/M)LN(445-452), IM(T/A)D(JQ/A)D(495-500)の配列である.C末端領域とその付近はC-TERMとして示しており、この中に*acrB*変異が位置(Ser⁷⁵⁹とArg⁷⁶⁰)している.なお、この*acrB*変異の配列はGenBank/DDBJにaccession No.D87842で登録している.また、この領域のC末端にはGyrAサブユニットとの結合領域(▨)が存在している.

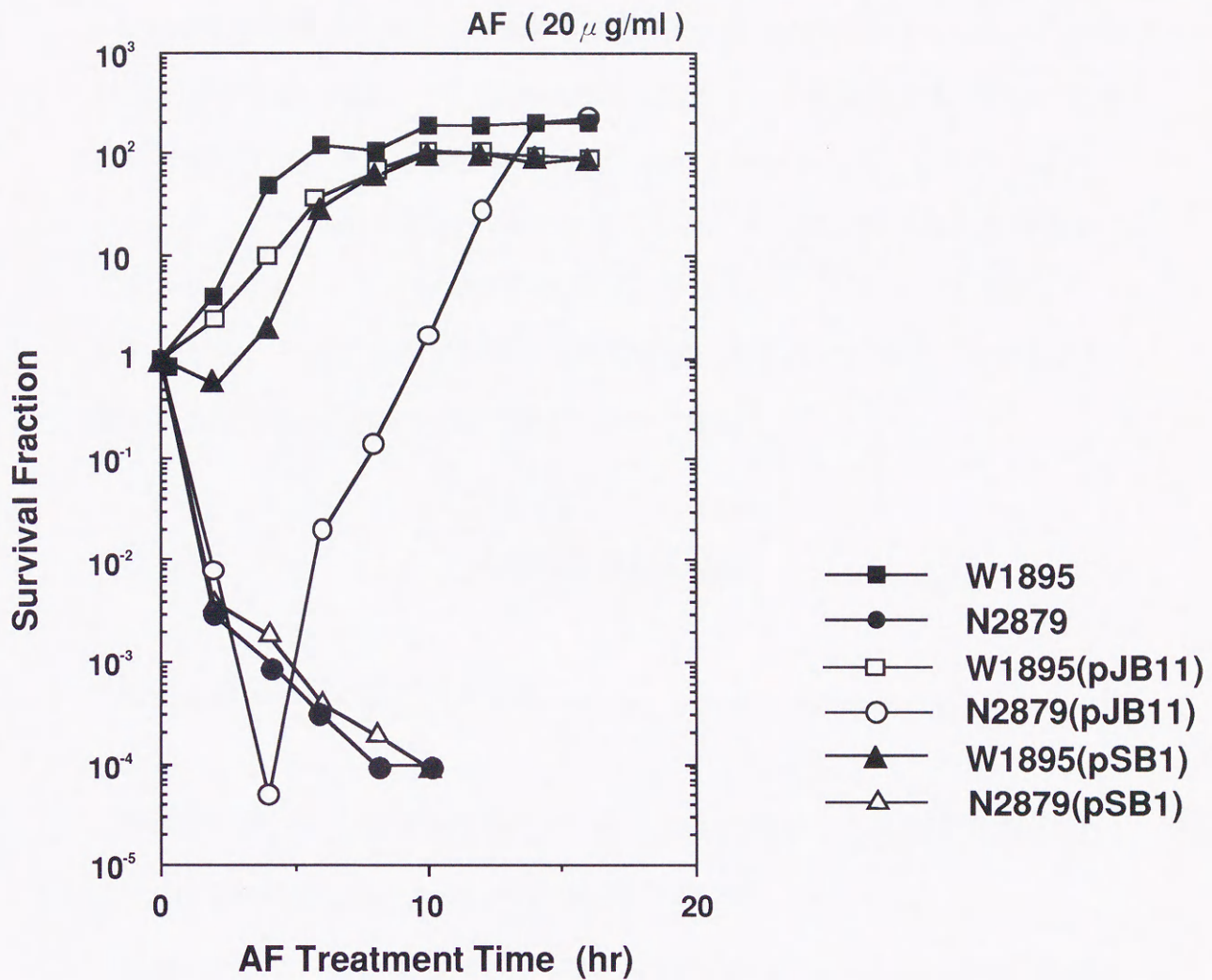


図6 アクリフラビン(20 μ g/ml)存在下における各種大腸菌株の生育曲線.

(pJB11; *acrB*⁺, pSB1; *acrB*⁻)

第2節 GyrB、GyrB^{acrB}、GyrAの各サブユニットの精製とこれらを用いた再構成Gyraseの生化学的性質について

Gyraseを構成する各GyrA(wild)およびGyrB(wildと *acrB*変異)サブユニットの精製をGSTを用いたタンパク質融合法と、陽イオン交換樹脂であるDEAEを使用したクロマトグラフィー法(34)および、Novobiocinを使用したアフィニティークロマトグラフィー法(35)によりおこなった。そして、得られた各種のサブユニットを用いて、Gyraseを再構成し、そのスーパーコイリング活性、ATPase活性、そして各サブユニットの再構成能をそれぞれ調べ、これらの結果から変異型Gyrase(A+B^{acrB})の特性について検討した。

実験材料および方法

・使用大腸菌株およびプラスミド

各種サブユニットの精製にあたり、その発現に使用した菌株はBL21(DE3)〔F⁻, *ompT*, *hsdS_B*(r_B⁻m_B⁻), *gal*, *dcm*(DE3)] 株を用いた。

各種サブユニットの発現ベクターとしてはpGEX4T-3(Pharmacia社製)を用いた。pBluescriptII(KS⁺)はStratagene社製のものをpBR322は宝酒造製のものを使用した。

・使用培地、試薬および酵素

各種サブユニットの大量発現は2 x YT培地〔1.6% Bacto tryptone(Difco社製), 1% Yeast extract(Difco社製), 0.5% NaCl pH7.4〕を使用した。

制限酵素、Ligation kitおよびPCR時のTaq EXは宝酒造製のものを使用し

た。Dithiothreitol (DTT)、ATP、Spermidine、BSA(V)、Novobiocin、Glycerol(分子生物学用)はナカライテスク社製を、DEAE(DE-52)はWhatman社製を使用した。*E.coli* t-RNAはBoehringer Mannheimのものを、そしてNovobiocin-アフィニティー用のレジンはEpoxy-activated Sepharose 6Bを、またSuperdex-200HR columnはPharmacia製のものをを使用した。Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)およびPhenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)は和光純薬製のものをを使用した。

・各種サブユニットの精製

各GyrB、GyrB^{acrB}、GyrAサブユニットはGSTタンパク質融合法(Pharmacia)で発現させ、DEAE-Sepharose column(34)そしてNovobiocin-Sepharose column(35)により精製した。

各種サブユニットのDNA断片を発現ベクターであるpGEX4T-3にそれぞれ構築した。なお、*gyrA*遺伝子の発現に関して、翻訳開始コドンから6番目のアルギニン(Arg)をコードするAGAコドンが大腸菌にとってレアーコドンであるため、同じArgコドンであるCGTにPCR法(1st.と2ndのPCR条件は94°C 1min, 50°C 1min, 72°C 3minの各20サイクル)により置換した。この際、使用したプライマーはフォワードプライマーとしては5'-TTATGGATCCATGAGCGA CCTTGCGCGTGAAATTACACCGG-3'とリバースプライマーは5'-AATACTCG AGTTATTCTTCTTCTGGCTCGTC-3'を用いた。すべてのサブユニットのDNA断片はpGEX4T-3ベクターの*Bam*HI(N末端)と*Xho*I(C末端)制限酵素切断部位に挿入した。これにより、各遺伝子産物はトロンビン酵素切断部位と翻訳開始のメチオニンとの間に、それぞれ2個のアミノ酸(GAA:グルタミン酸、TCC:セリン)が存在している(図7)。

これらの組み換え体プラスミドを保持する細胞を2 x YT培地2.5Lで培養

し、OD₆₀₀が0.5に達するまで30°Cで培養した。各種融合遺伝子の発現誘導は最終濃度が0.1mMのIPTGの添加によっておこなった。添加30分後(GyrBサブユニットの場合は15分)、培養液をすばやく氷で冷やし、細胞を遠心(HITACHI RPA9-2 roter, 4°C, 8,000rpm 5min)により集菌した。これより長時間の培養は可溶化不能なインクルージョンボデーの形成の原因となった。グルタチオン-Sepharose columnの方法はSmith とJohnsonらの方法に従った(36)。10% Glycerol, 5mM DTT そして1mMのPMSFを含む100mM PBS buffer pH7.4をcolumnの洗浄、トロンピンによる消化そしてタンパク質の溶出に使用した。

グルタチオン Sepharose 4B columnから溶出したGyrBサブユニットのサンプルは0.12MのNaClを含むTGED buffer(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 10% Glycerol, 5mM DTT, 1mM PMSF)3 Lで終夜透析をおこない、DEAE-Sepharose column(12ml体積)も同様のbufferで平衡化した。columnの通過分画を集め、次にNovobiocin-affinity columnに通した。ただし、GyrAサブユニットの精製の際にはDEAEのステップはおこなわなかった。

サンプルを3LのHEPES buffer(25mM HEPES, pH 8.0, 50mM KCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, 10% Ethyleneglycol)で終夜透析し、同様のbufferで平衡化したNovobiocin-affinity column (50ml体積)にかけた。GyrAサブユニットを得るためには、このcolumnで通過した分画を集めた。GyrBサブユニットの溶出の際には、野生型GyrBサブユニットの場合は5Mの尿素を含むHEPES bufferを使用し、*acrB*変異型GyrBサブユニットの場合はHEPES bufferに7Mの尿素を含んだものを使用した。

最終的にこれらのサンプルはNaClを除いたTGED buffer 3Lで終夜の透析をおこない、Centricon (Amicon)によって濃縮し、-80°Cにおいて保存した。

・ Gyraseの再構成

再構成buffer(20mM Tris-HCl pH7.6, 0.2mM EDTA, 70 mM KCl, 10mM MgCl₂,

5mM DTT, 360 μ g/ml BSA, 20% Glycerol)に精製した各GyrAとGyrBサブユニット(それぞれ7.5 μ g)を加えて、合計容量30 μ lで20 $^{\circ}$ Cで30分間保温することにより、Gyrase四量体を再構成させた。

・スーパーコイリングアッセイ

ラットの肝臓から調製したTopoisomerase IをpBluescriptII(KS+)プラスミドDNAに反応させることにより、リラックスプラスミドDNAを作成した(37)。

アッセイは50mM Tris-HCl, pH 7.5, 20mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1.5mM ATP, 5mM Spermidine, 50 μ g/ml BSA, 500 μ g/ml *E.coli*-tRNA, 10% Glycerolに1 μ gのリラックスしたpBluescriptII(KS+) DNAを加え、これに各種再構成Gyraseの適量unit数を加え、合計容量を60 μ lでおこなった。これらのサンプルを30 $^{\circ}$ Cで30分間保温し、その後、DNAの抽出はTE(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)飽和フェノール溶液とクロロホルム：イソアミノアルコール溶液でそれぞれ2回おこなった。DNAはエタノール沈殿によって回収し、TEに溶解した。0.8%のアガロースゲル電気泳動(50V一定、Mupid-I コスモバイオ社製)をおこない、泳動後ゲルを染色(0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド)した。

Gyraseの1unitあたりのスーパーコイリング活性はアガロースゲル電気泳動において、スーパーコイルDNAの位置に全DNA量の約50%が位置する量とした。

・ATPase活性

反応混合液(100 μ l)は50mM Tris-HCl, pH7.5, 20mMKCl, 10mM MgCl₂, 50

$\mu\text{g/ml}$ BSA, $1\mu\text{g}$ の再構成Gyrase(A,B各 $0.5\mu\text{g}$)を用い、そしてDNA存在下の場合には $2.5\mu\text{g}$ のリラックスしたpBluescriptII(KS⁺)DNAを加え、さらに 1mM のATPを加えた。これらの混合液は 30°C で10分間保温した。生じたADP量の測定はTaylor(38)らによる方法に従い、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって測定した。

・野生型および変異型GyrBサブユニットの四量体構成能

反応buffer(20mM Tris-HCl pH7.6, 0.2mM EDTA, 70mM KCl, 5mM DTT, $360\mu\text{g/ml}$ BSA)に各種サブユニット(A+B)をそれぞれ $7.5\mu\text{g}$ を加え、合計 $100\mu\text{l}$ で 20°C で30分間保温した。次に、反応液をゲルろ過用columnであるSuperdex-200HR columnにその全量を通した。なお、このcolumnは事前に平衡化buffer(20mM Tris-HCl pH7.6, 0.2mM EDTA, 70mM KCl, 5mM DTT)で平衡化した。そして、溶出したタンパク質分画をアセトンにより沈殿させ、これをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Multi-gel 4-20% gradient 第一化学社製)による定性分析をおこなった。

結果

・各種Gyraseサブユニットの精製

Gyraseを構成する各GyrA,Bサブユニットをコードする*gyrA*, *gyrB*遺伝子をGST融合プラスミドに挿入して大量発現させた。発現させたタンパク質をグルタチオン-Sepharose columnに通して精製したところ、GyrAとGyrBの各々の精製物両方において、少量ではあるが相手側のサブユニットの混在が見られた。これらGST融合タンパク質はN末端にGSTの大きなポリペプチドが含まれ

ているにもかかわらず、他のサブユニットと会合したものらしい。これは発現、精製する際に宿主のサブユニットが混入したためと考えられる。混入したサブユニットを除くため、各サブユニットはさらに、DEAE-Sepharose columnとNovobiocin-affinity columnを通して精製をおこなった。不純物除去の確認はSDS-ポリアクリルアミドゲル(Multi-gel 4-20% gradient 第一化学社製)電気泳動(図8)とスーパーコイリングアッセイによりおこなった。2.5Lの培養からそれぞれ約10mgのタンパク質が得られた。

- ・ 各種再構成Gyraseのアクリフラビン存在下におけるスーパーコイリング活性

*in vitro*での野生型および変異型GyrBサブユニットと、GyrAサブユニットを再構成(A₂B₂)させたGyraseの*in vitro*スーパーコイリング活性を測定した(図9)。その結果、Gyrase(A+B)の比活性は 3.2×10^6 units/mgと計算され、Gyrase(A+B^{acrB})は 4.0×10^4 units/mgと計算された。したがって、Gyrase(A+B^{acrB})の比活性はGyrase(A+B)より約80倍低いことがわかった。

また、スーパーコイリングアッセイにおけるアクリフラビンの作用について検討した(図10)。Gyraseは1unitではアクリフラビン1 μ g/mlの濃度において、スーパーコイリング反応に対して不完全な阻害を示し、6 μ g/mlのときには完全に阻害された。Gyraseが100unitsでは、アクリフラビンが10 μ g/mlにおいて若干の阻害を示した。これらの結果はGyrase(A+B)とGyrase(A+B^{acrB})に共通していた。このため、同一ユニット条件下ではGyrase(A+B^{acrB})特有のアクリフラビン感受性上昇は認められなかった。

・各種再構成GyraseのATPase活性

GyrBサブユニットのN末端領域にはATPase領域が存在する。そこで、Gyrase(A+B)とGyrase(A+B^{acrB})のATPase活性を調べた(図11)。DNAの非存在下において、これらの酵素は共に、報告されている内在するATPase活性値を示した。Lineweaver-Burk plotの結果、両者のATPに対するKm値も報告されている1.7mMと同じ値を示した(図12)(35)。一方、DNAの存在下における、ATPase活性はGyrase(A+B)と(A+B^{acrB})の間で大きな違いが見られた。Gyrase(A+B)のATPの脱リン酸化能はDNA添加によって、著しく促進されたが、Gyrase(A+B^{acrB})においては若干の促進しか観察されなかった。

図13はATPase活性へのアクリフラビンの阻害効果を示している。Gyrase(A+B)とGyrase(A+B^{acrB})で、DNAの非存在条件下における、若干の阻害が観察された。その阻害効果はDNA存在下において、Gyrase(A+B)の場合に最も高くなった。Gyrase(A+B)とGyrase(A+B^{acrB})の両者とも、その活性は高濃度のアクリフラビン(>3 μ g/ml)によって、DNA非存在下条件におけるATPase活性(内在するATPase活性)とまで低下した。これらの結果はアクリフラビンはDNA依存的ATPase活性を特異的に阻害することを示唆する。

・各種Gyrase四量体の再構成能

再構成させたGyraseの分子量はSuperdex-200HR columnによって評価した。また、溶出させたタンパク質はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)(図14)によって分析した。再構成したGyrase(A+B)とGyrase(A+B^{acrB})は、両者ともGyrase四量体の分子量と一致する約400kDaの分子量の位置に溶出されてきた。SDS-PAGEの結果から四量体を構成した各GyraseのGyrAとGyrBサブユニットの構成比は同じであることがわかった。これらの結果は、

Gyrase(A+B^{acrB})は四量体を正常に構築することができ、Gyrase(A+B^{acrB})の低い酵素活性は、GyrAサブユニットとの親和性が失われたためではないことが示された。

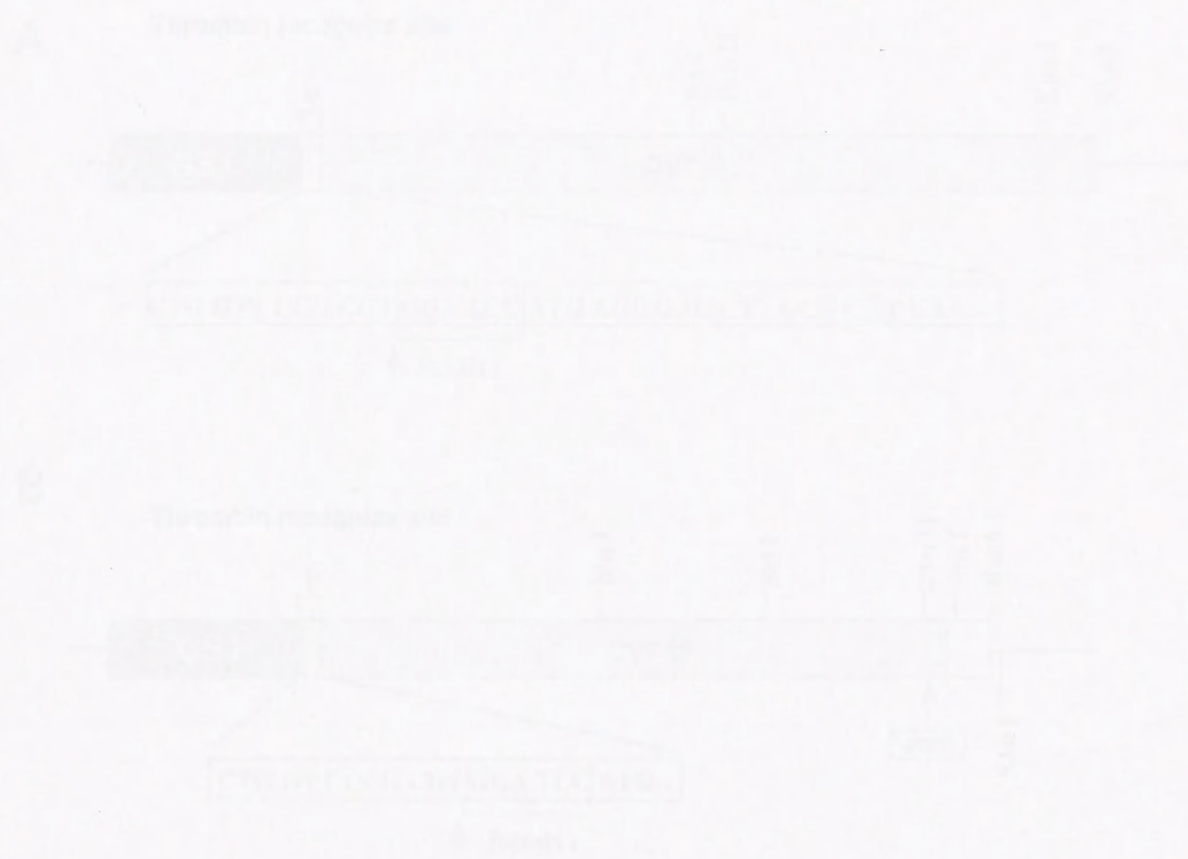


図7- pGEX4T-3プラスミド(BamHI-XbaI部位)への各Gyraseサブユニット遺伝子のクローニングが図

Aは $gyrA$ 遺伝子または、Bに示している $gyrB$ 遺伝子を示している。 $gyrA$ 遺伝子においてC-末端部CGTは本来の配列AGAを置換したものであるが、アミノ酸Arg(アルギニン)は変化していない。

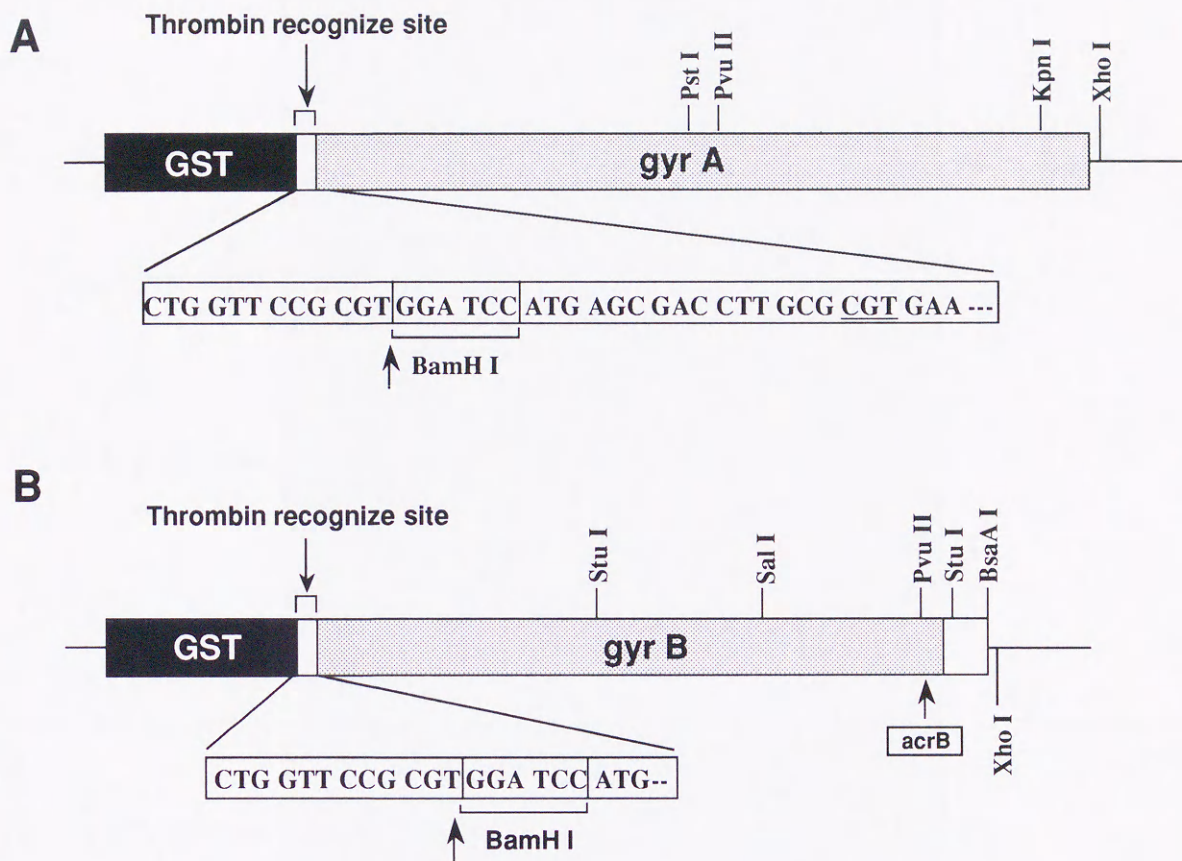


図7 pGEX4T-3プラスミド(*Bam*HI-*Xho*I部位)への各Gyraseサブユニット遺伝子のクローニング図

Aは*gyrA*遺伝子をまた、Bについては*gyrB*遺伝子を示している。
*gyrA*遺伝子において、下線部CGTは本来の配列AGAを置換したものであるが、アミノ酸Arg (アルギニン) は変化していない。

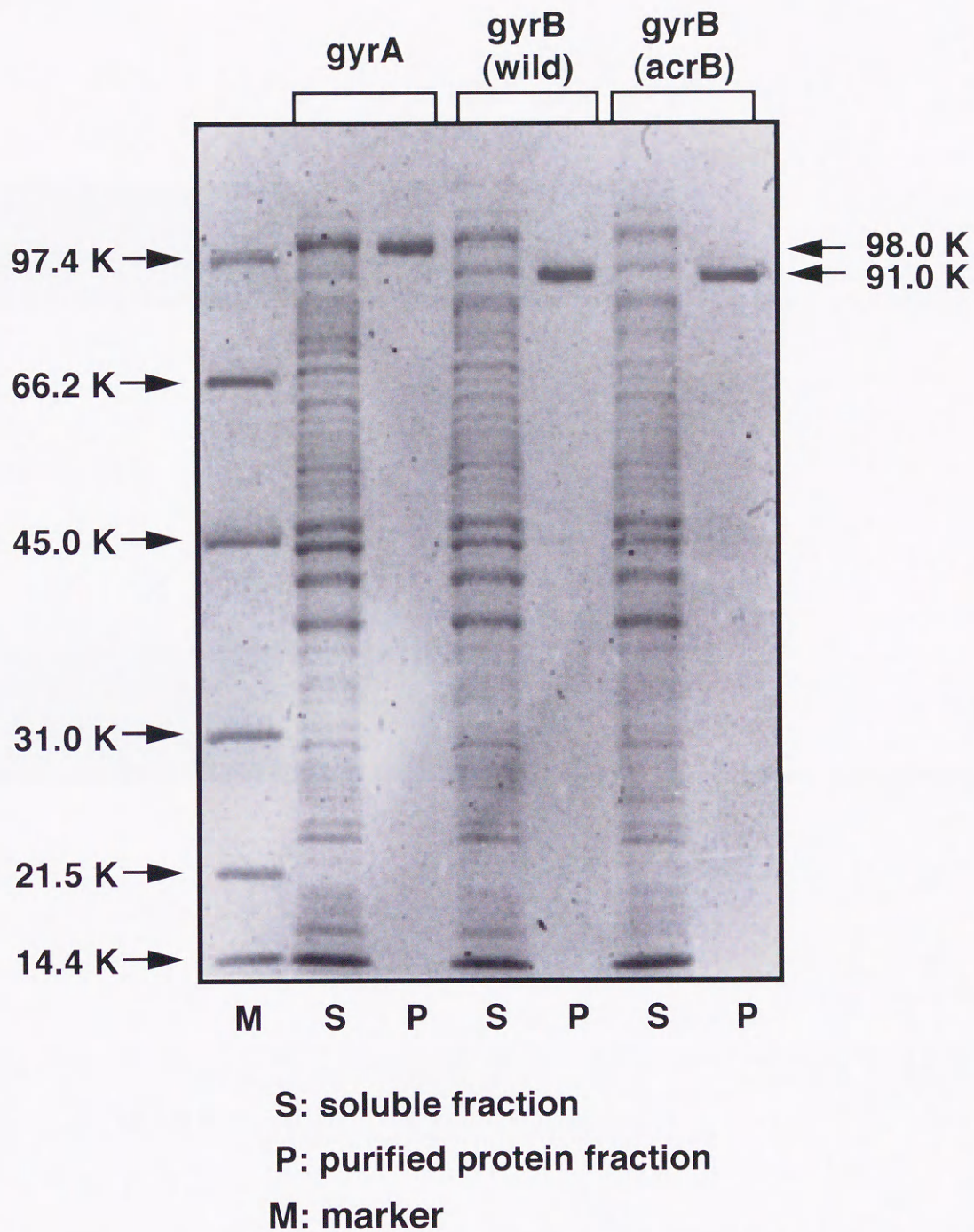
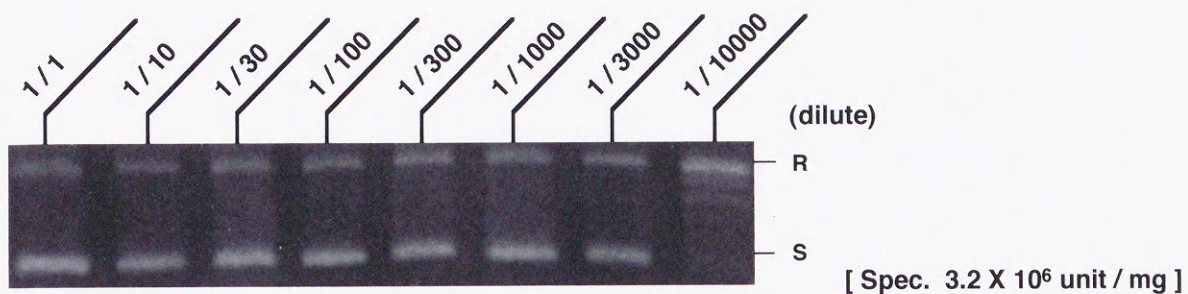


図8 GST融合法により精製した各種Gyraseサブユニットのポリアクリルアミドゲル電気泳動図.

[*gyrB*(wild)]



[*gyrB*(*acrB*)]

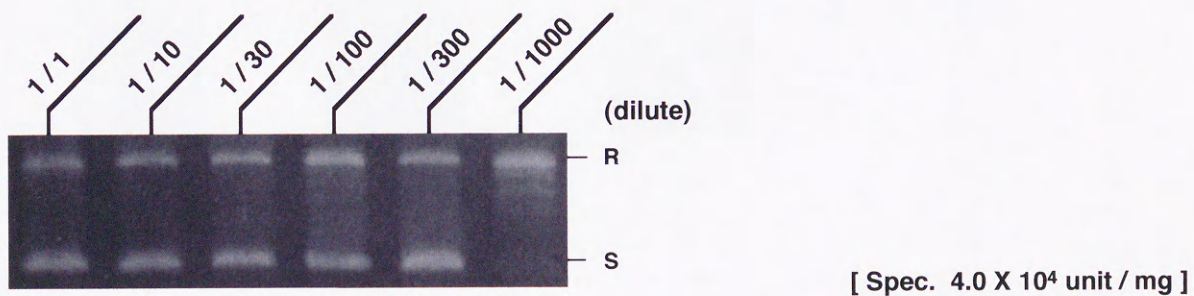


図9 野生型および*acrB*変異型のGyrBサブユニットを含む各再構成GyraseのSpecific activity.

RおよびSはリラックス型DNA(R)とスーパーコイル型(S)プラスミドの位置を示している。

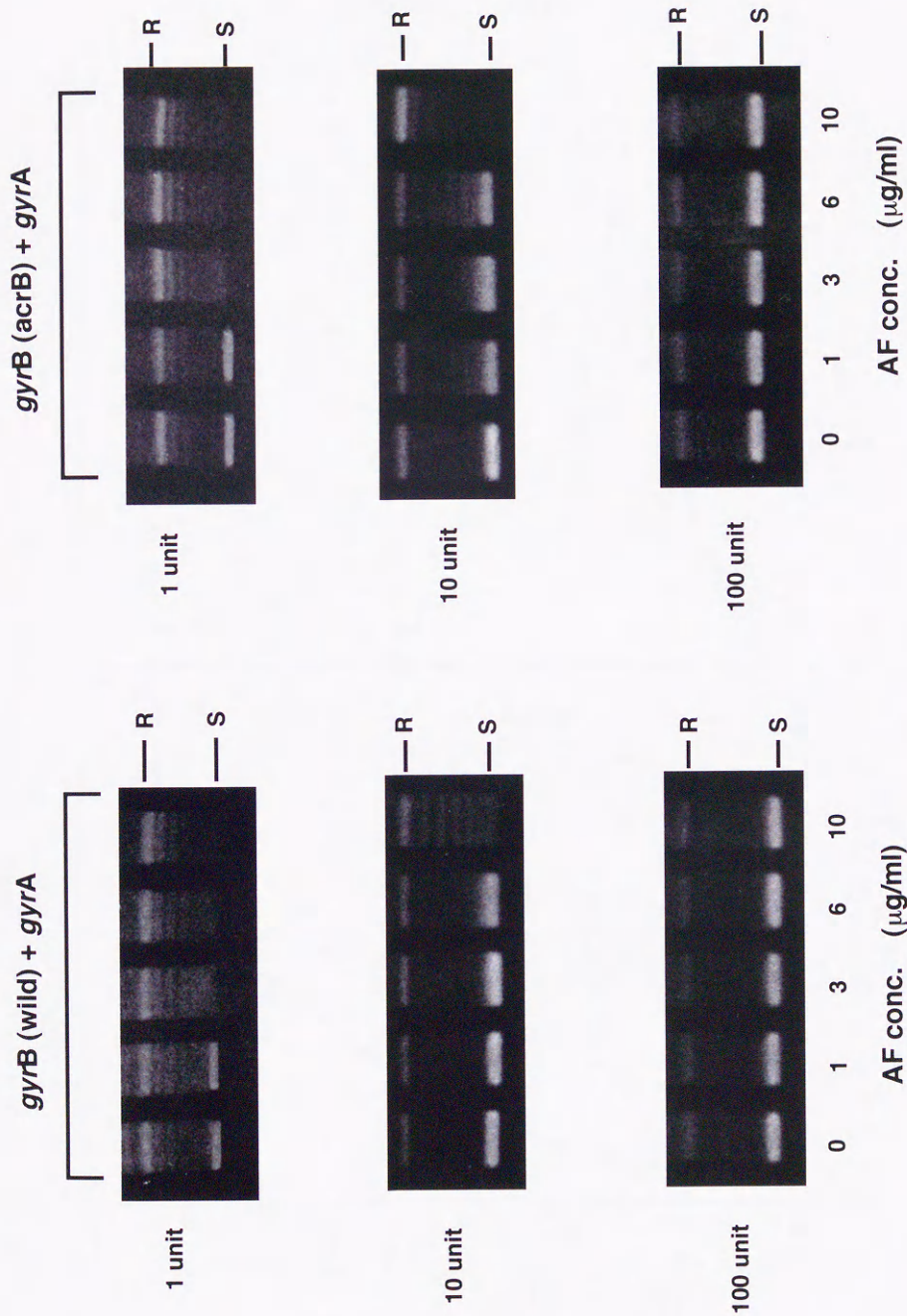


図10 アクリフラビン存在下における野生型および*acrB*変異型GyrBサブユニットを含む各再構成Gyraseのスーパーコイル活性

RおよびSはリラックス型DNA(R)とスーパーコイル型(S)プラスミドの位置を示している。1, 10, 100 unitはGyraseのSpecific activityを示している。

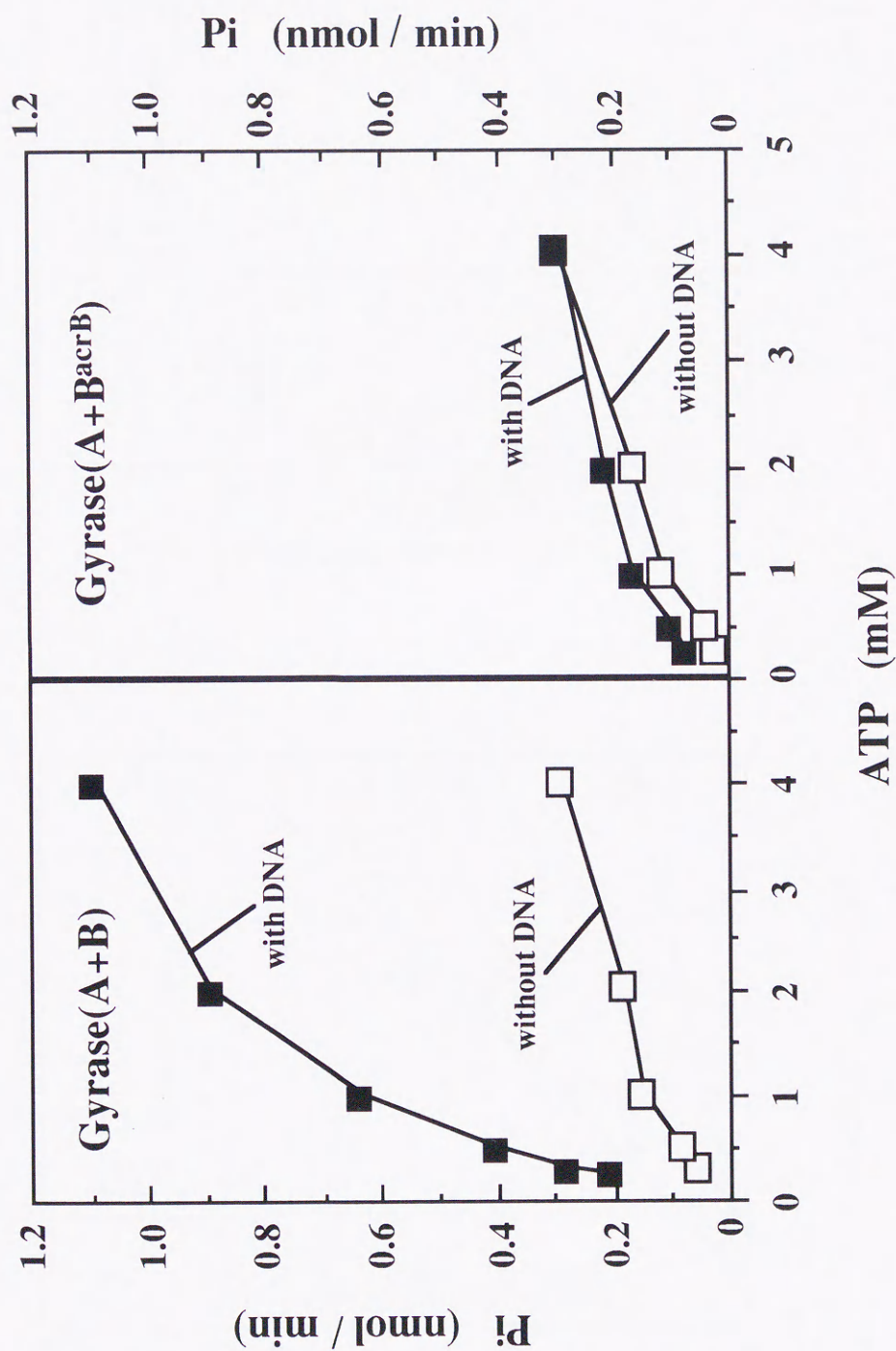


図11 野生型および*acrB*変異型GyrBサブユニットを含む再構成 GyraseのDNA依存性ATPase活性

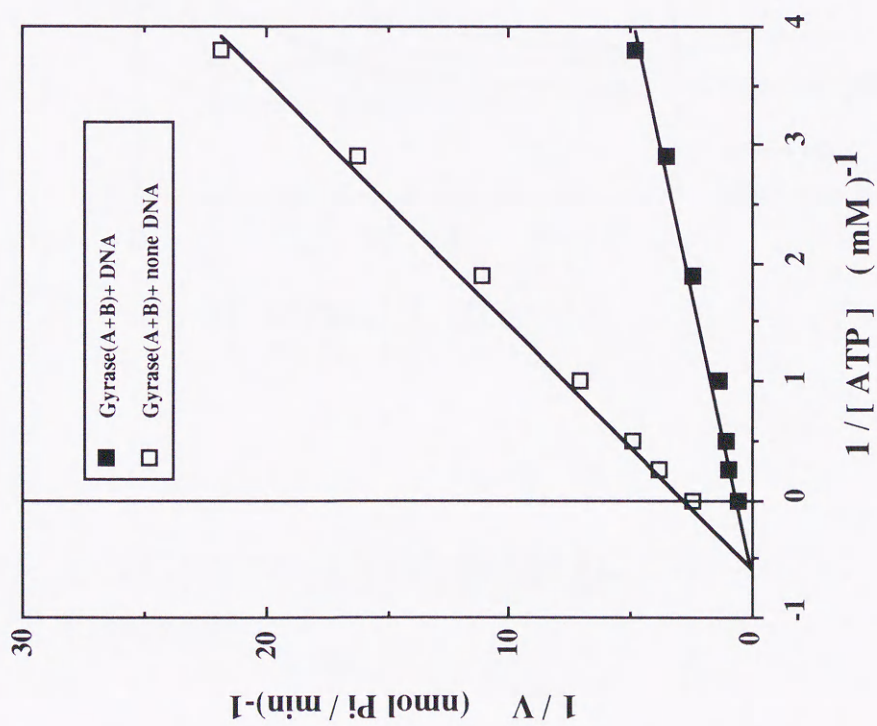
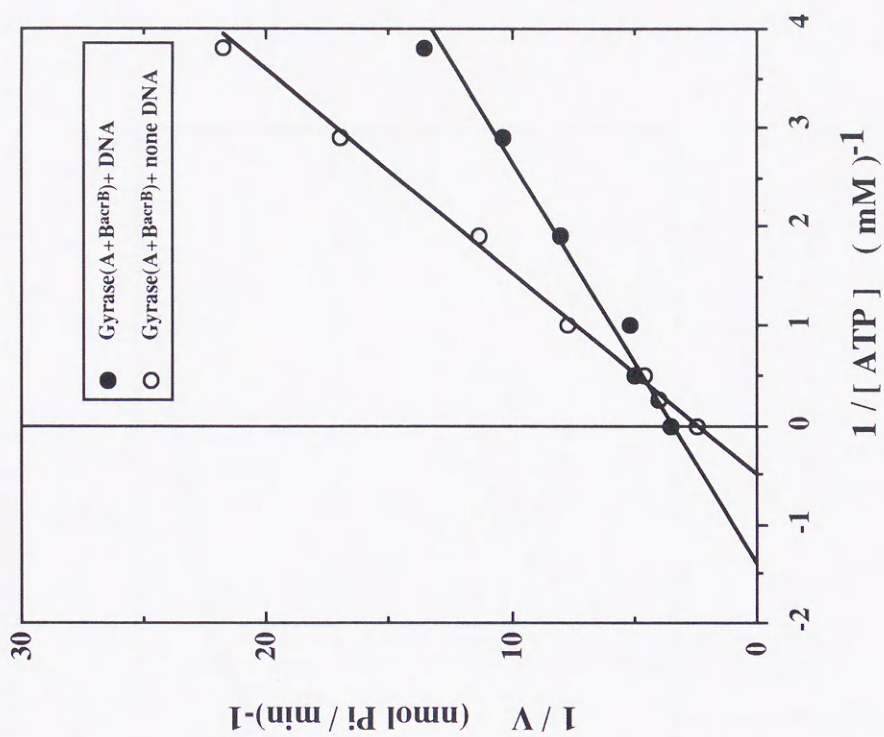


図12 野生型および*acrB*変異型GyrBサブユニットを含むGyraseのDNA存在、非存在下におけるATPに対するKm値 (Lineweaver-Burk plot)

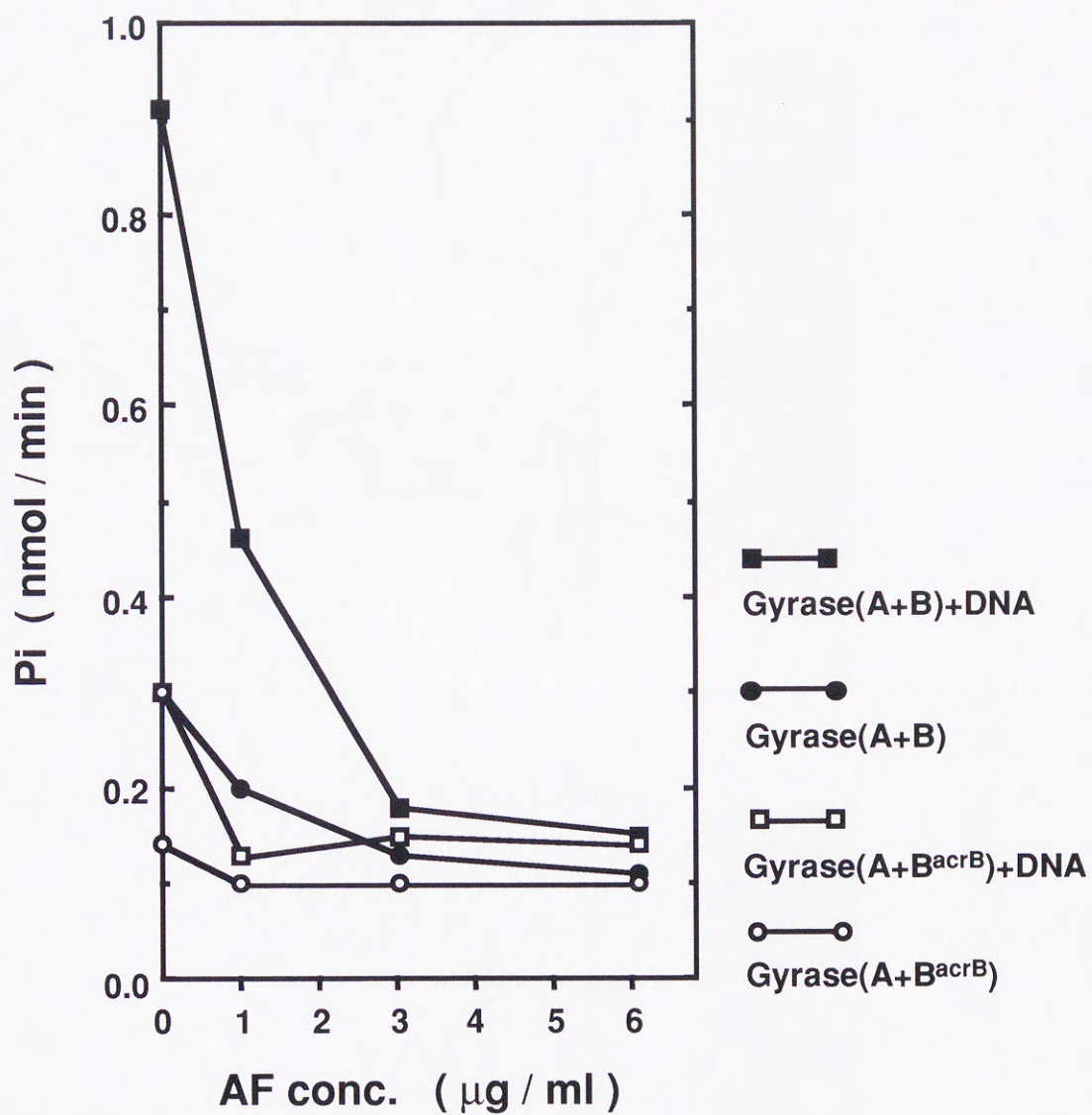


図13 各種GyraseのATPase活性におけるアクリフラビンの阻害効果

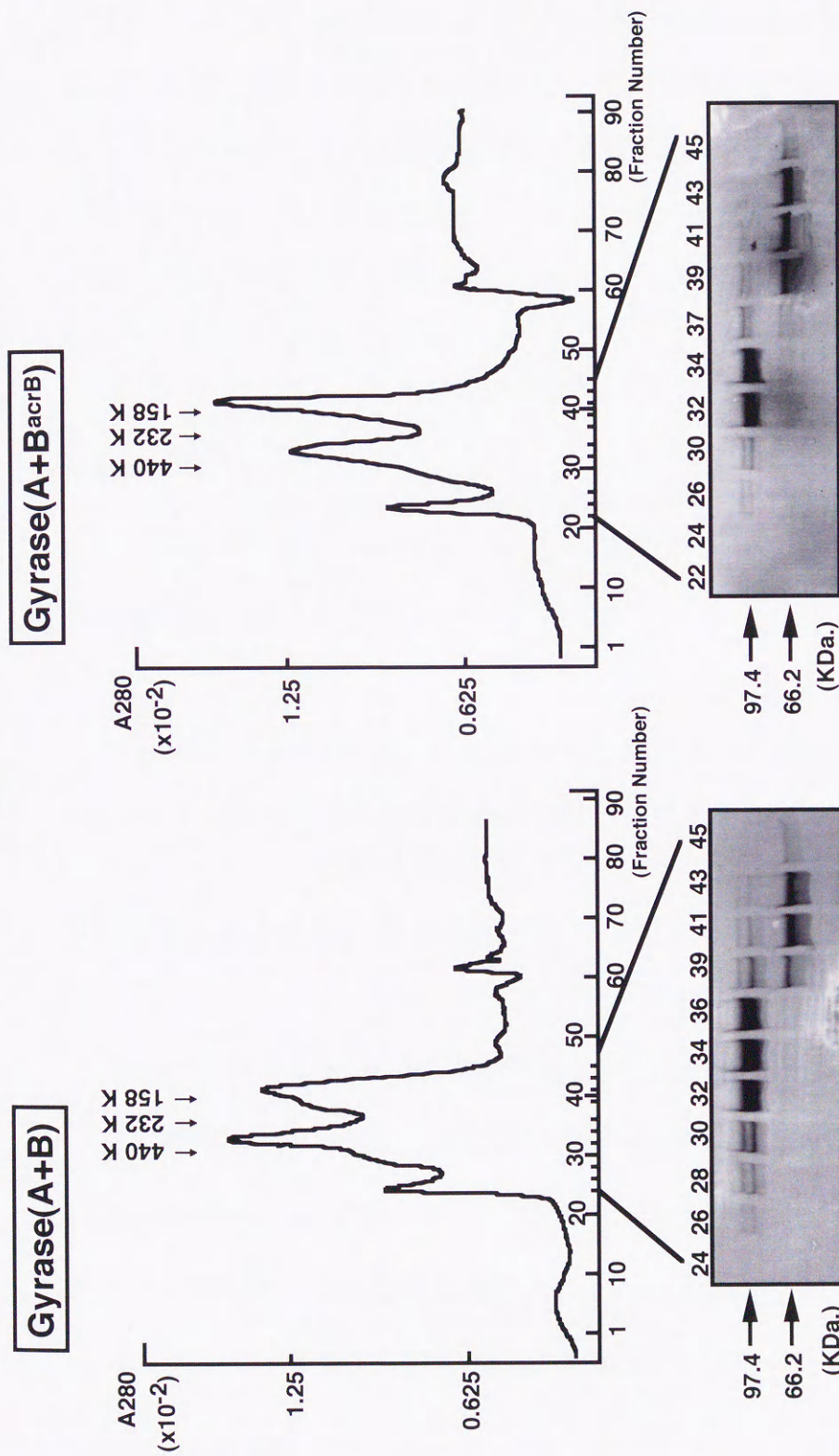


図14 各種Gyraseにおける四量体形成能の確認.

上部はゲルろ過による結果を示し、下部はゲルろ過による各フラクションを

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において分析した結果を示す.

第3節 *acrB*変異領域のDNA結合能について

これまでに*acrB*変異について、第1節および第2節を通じて、その変異箇所を明らかにし、*acrB*変異をもつGyraseは野生型Gyraseより、酵素活性が低下していることを明らかにした。そして、その酵素活性の低下の原因を探るために、ATPase活性、四量体形成能などを調べた。これらの結果よりDNA存在下でのATPase活性に野生型Gyraseと大きな違いが見つかった。そこで第3節においては、*acrB*変異とDNA結合の関係について、ゲルシフトアッセイ法を用いて、さらに検討をおこなった。

実験材料および方法

・試薬および酵素

T4 polynucleotide kinase、Ligation kitは宝酒造社製、poly(dIdC)-poly(dIdC)はSigma社製、Multi-gel 2-15% gradientは第一化学社製のものを使用した。

・ゲルシフトアッセイ

pBR322プラスミドのGyrase切断部位(塩基位置は886-1089)(39)はPCR法によって増幅し、pBluescriptII(KS+)にサブクローニングした。DNA断片をT4 polynucleotide kinaseを用いて、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ によりラベルした。結合反応はBachellirら(40)の方法を若干改変した。GyraseはGyrAサブユニットと各種GyrBサブユニットをそれぞれ5.0 μg で再構成した。このときの再構成buffer(20 μl)は第2節でのスーパーコイリングアッセイの項において述べたも

のを用いた。再構成Gyraseの1/2容量(10 μ l)を、ラベルしたDNA300pgと poly(dIdC)-poly(dIdC)を含む10 μ lの2 x結合buffer(80mM Tris-HCl, pH 7.6, 12mM MgCl₂, 40mM KCl, 4mM DTT, 20mM ATP)に加え、25 $^{\circ}$ C、60分間保温した。その後、電気泳動をおこなった。泳動はポリアクリルアミドゲル(Multi-gel 2-15% gradient)を使い、泳動bufferは25 mM Tris-HCl, pH8.4, 192 mM Glycine, 8 mM MgCl₂とした。プレランを90V一定、4 $^{\circ}$ Cで3時間おこない、サンプルをアプライする前に、新しい泳動bufferに交換した。サンプルは90V一定、4 $^{\circ}$ C、4時間の泳動によって分離させた。泳動後ゲルを乾燥し、X線フィルムに感光させた。GyraseとDNAの複合体の量はこれを含むゲルに含まれる放射活性をCerenkov法によって測定することにより定量した。

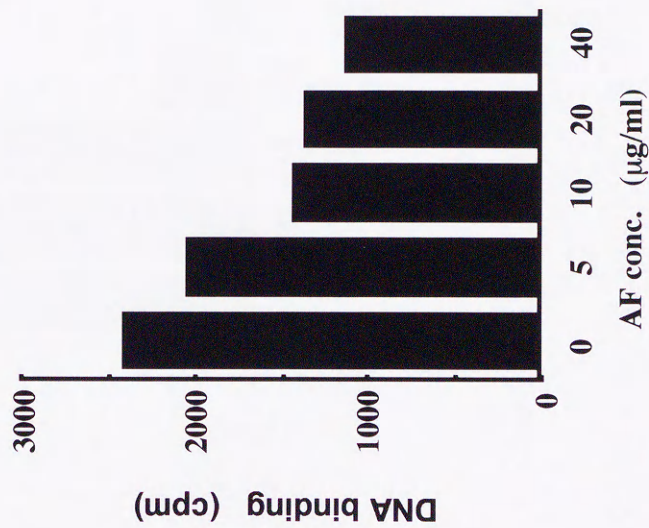
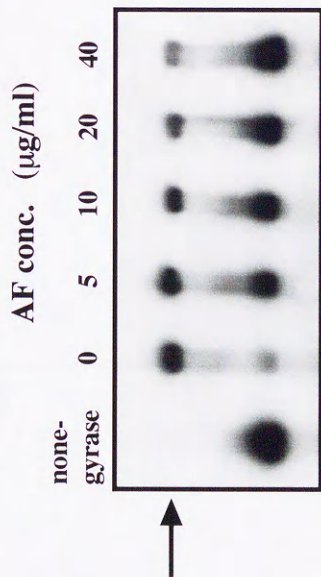
結果

・各種再構成GyraseのDNA結合能

ゲルシフトアッセイ法によって、Gyrase(A+B)とGyrase(A+B^{acrB})のDNA結合能を調べた。Gyrase(A+B)はGyraseによる切断領域を含んでいる204bpのDNA断片と著しく結合した(図15)。一方、Gyrase(A+B^{acrB})は少量の結合量しか示さなかった(図15)。Gyrase(A+B)とGyrase(A+B^{acrB})の両者とも、Gyrase-DNA複合体形成の量はアクリフラビンの濃度が高くなるにしたがって減少する傾向を示した。DNA結合の50%の阻害は両者とも、アクリフラビン濃度が20 μ g/mlで観察された。この結果、Gyrase(A+B^{acrB})はDNA結合においても、アクリフラビン感受性がGyrase(A+B)と同じであることが確認された。図16はGyraseのGyrAサブユニットと各GyrBサブユニットの競合条件下でのDNA結合を示している。これは野生型と変異型GyrBサブユニットの様々な量を、一定量の

GyrAサブユニットと混合し、再構成されたGyraseのゲルシフトアッセイをおこなった。この結果、変異型GyrBサブユニットの量が増加すると、GyraseのDNAへの結合が減少することが示された(図16)。一方、野生型GyrBサブユニットの過剰量の添加はDNA結合を阻害せず、変異型GyrB^{acrB}サブユニットによるDNA結合の低下の影響を受けなかった。

Gyrase(A+B)



Gyrase(A+BacrB)

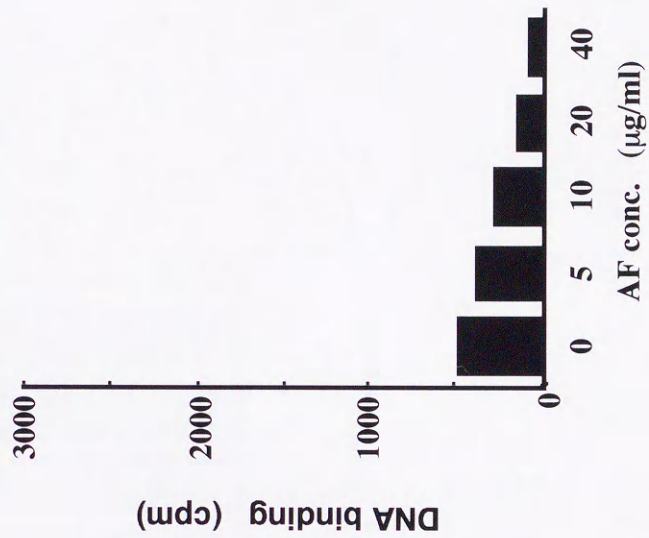
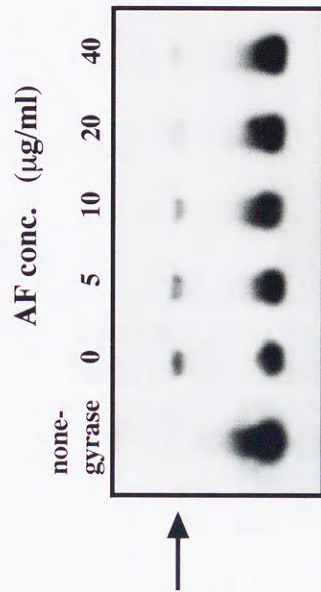


図15 ゲルシフトアッセイによる各種Gyraseのアクリフラビン存在下でのDNA結合に及ぼす影響。

矢印の位置はGyrase-DNA複合体を示している。

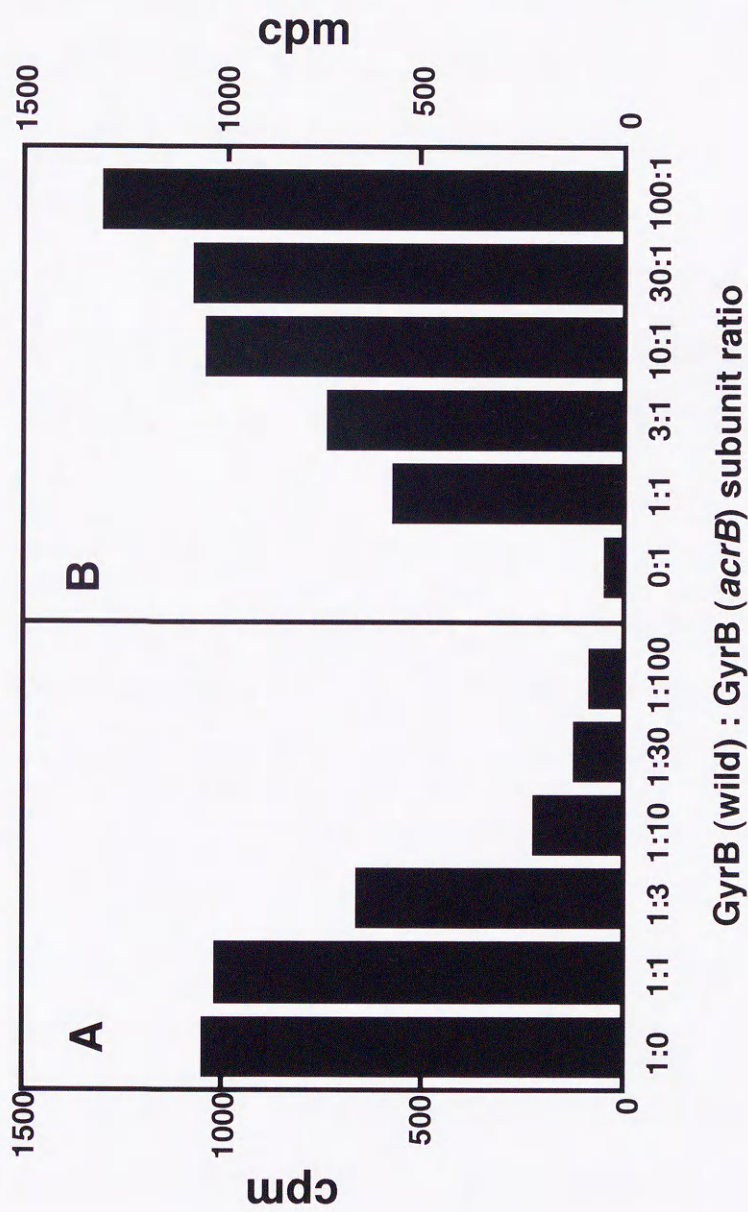


図16 DNA結合における各種GyrBサブユニットの競合実験の結果.

GyrAサブユニット7.5mgに対して野生型およびacrB変異型GyrBサブユニットの割合を変えて等量の

7.5mgのGyrBサブユニットを加え、その時のDNA結合能を調べた。Aは野生型GyrBサブユニットを1

としたもので、BはacrB変異型GyrBサブユニットを1とした場合のDNA結合能を示している。

考察

Gyraseを標的とするクマリン系薬剤はGyrBサブユニットのN末端領域に結合し、酵素におけるATPの脱リン酸化を阻害する。抗生物質であるキノロン薬はGyraseが一時的に切断されたDNAと共有結合することにより、結合した状態で酵素反応を停止させると推論されている。Gyrase遺伝子に対する一連の薬剤耐性変異の分析によって、それらの変異はこれら抗生物質の耐性機構に関係する領域に生じたことが明らかにされた。そしてこれらの薬剤耐性株より精製した変異型Gyraseを使用した実験では、*in vitro*においてもそれぞれの薬剤に対して耐性となるという特徴を示した(41-43)。

本章において、アクリフラビンがGyraseのDNA結合を抑制する(図15)こと、および*acrB*変異がDNA結合を低下させる(図15,16)ことを示した。これらの結果は、クマリン系薬剤やキノロン薬に対する耐性変異と同様に、*acrB*変異もアクリフラビンの作用機構に関与すると考えられる。アクリフラビンはDNAにインターカレートする物質であり、エチジウムブロマイドの作用のように、結合によってDNAのラセン密度を変化させ、DNA鎖の構造変化を引き起こすことが知られている。アクリフラビンは、Gyrase機能の開始段階であるDNA結合を阻害するため、それに続くATPaseの活性化(図13)やスーパーコイル活性の活性化(図10)を抑制すると考えられる。

一方*in vitro*では、*acrB*変異は、Gyraseのアクリフラビン感受性を変えるものではなかった。したがって、クマリン薬やキノロン薬に対する耐性変異機構とは異なる変異であることが明らかとなった。スーパーコイルングアッセイとゲルシフトアッセイ(図10, 15)の結果から、Gyrase(A+B^{acrB})はGyrase(A+B)に比較して比活性が低く、その原因がDNA結合能の低下に由来することが示された。これらのことから*acrB*変異株のアクリフラビン感受性上昇は、Gyraseの比活性の低下によって現われたものであることが示唆される。なお、データには示していないが、*acrB*変異株であるN2879株からポリミンP沈

殿法(35)によって調製したGyrase粗抽出物では、スーパーコイル活性を検出することができなかった。しかし、野生株であるW1895株の抽出物では予想された活性が見られた。このことから、*in vivo*においても変異酵素のGyrase活性は減少していることが予想される。しかしながら、*in vivo*でのアクリフラビン感受性上昇は複雑な現象であり、今だ未解決の問題を含んでいる。例えば、Gyrase(A+B^{acrB})の活性の低下は、ゲノムDNAのラセン密度の低下をもたらし、これによりアクリフラビンとDNAの結合に大きな影響を及ぼすことも考えられる。

*acrB*変異は、GyrBサブユニットのC末端近傍に2個(Ser⁷⁵⁹-Arg⁷⁶⁰⇒Arg-Cys)のアミノ酸置換を引き起こした(図4,5)。図5においては、その領域をC-TERMとして示している。この領域のN末端側に隣りあって位置する約170のアミノ酸配列(図5の黒部分)からなる領域は、グラム陽性細菌のGyraseや細菌Topoisomerase IV(*parE*遺伝子)、真核細胞のTopoisomerase IIにおいては、欠失している。この挿入によって、*acrB*変異領域はN末端部分と分離されるため、C-TERMは構造的に独立していることが予想されるが、その役割についてはこれまでのところ報告されていない。図17は*B.subtilis* GyraseのBサブユニットと大腸菌Topoisomerase IVの*parE*遺伝子産物のC-TERM領域での相同性を示す。*parE*タンパク質のC末端から29アミノ酸残基を欠失させると、*parC*タンパク質(GyrAサブユニットに相当する)(44)との会合能を失う。このことから、C-TERMは、Aサブユニットとの会合に必要な構造を含んでいると考えられる。C-TERM領域に起きた*acrB*変異もまた、GyrAサブユニットとの会合によるGyraseの再構成能力に関係する可能性が考えられた。しかし図14と図16に示す実験結果から、変異型GyrB^{acrB}サブユニットの四量体形成能は、野生型と比べて特に違いがないことが示された。これらのことから、DNA結合の低下は、C-TERM領域の構造変化によってもたらされたものであり、四量体構造の構成不能によるものではないと考えられた。

大腸菌Gyraseにおいて、高い保存配列を含む領域(図17-A)は、*acrB*変異部位からN末端側の約20アミノ酸残基の位置にある。この保存領域がGyrase四量体形成時において、もう片方のGyrBサブユニットに会合している。先に述べたように、C-TERM領域のC末端側はGyrAサブユニットと会合する。これらを合わせて考えるとC-TERM領域の両端は2つの機能的構造を保持しており、それぞれGyrAとGyrBサブユニットに会合することに関与していると推定される。

近年、Bergerら(45)は酵母のTopoisomerase IIの結晶構造を報告した。Topoisomerase IIの結晶構造解析から、上記の保存配列と*acrB*変異領域との間の構造は α ヘリックス構造をしており、これはTopoisomerase IIにおけるA'とB'のサブフラグメントの間を伸長した軸様構造を示している。C-TERMのN末端側の半分がもつこの軸様構造は、構造的にB'サブフラグメントを支える背骨の役割をはたしている。さらに、Topoisomerase IIの酵素反応において、ポリペプチド断片のちょうつがいの構造がA'とB'サブフラグメント間に位置することがSV8を用いたタンパク質分解の実験によって示めされた(46)。したがって、C-TERMのC末端部分はちょうつがいの機能を担う領域であると考えられる。さらに、筆者は結晶構造の解析からTopoisomerase IIのA'とB'サブフラグメント間は乱雑な構造をとるリンカー領域に相当していることから、C-TERMの役割の一つとして、この領域がGyraseの構造変化に必要な構造を担うという仮説をたてた。酵素反応において、2つのGyrBサブユニットはDNAの進入の際には一旦離れる必要がある。したがって、C-TERMはC末端部分のちょうつがいの機能によって、それぞれのGyrBサブユニットが分離する(45,47)。さらに、このような形をとるためには支柱となる部分が必要であり、おそらくこれに相当するのが、C-TERMのN末端側部分の軸様構造であると考えられる。したがって、C-TERMに位置する*acrB*変異の存在は、GyrBサブユニット全体、あるいはGyraseの構造変化の過程における特殊な構造に、歪みをもたらすことが予想される。

*acrB*変異により GyraseのDNA結合の親和性が低下するため、DNAの認識あるいは、DNA結合によって誘導されるGyraseの構造変化に支障をきたすことが予想された。酵母のTopoisomerase IIの結晶構造の解析からみて、*acrB*変異領域は、GyrAサブユニット内の活性チロシンや、CAP様DNA結合領域の近くに位置している。また、ハイドロフォビシティープロットより、*acrB*変異領域は親水性(図17-B)で、アミノ酸はタンパク質の表面に位置していることが推測される。さらに、*acrB*変異タンパク質では、DNAに直接作用することのできる正の電荷(Arg⁷⁶⁰)がCysに置換されている。このことから、*acrB*変異領域はDNAの認識やGyrAサブユニットへのDNA結合のためのDNA運搬に直接関係することが推測される。実際、Topoisomerase IIにおいて、*acrB*変異近くのC-TERMのC末端部分と一致する領域が、DNA結合によって構造が変化することが報告されている(44)。*acrB*変異領域の近傍のアミノ酸配列は*B.subtilis*のGyraseや大腸菌の*parE*遺伝子のアミノ酸配列においても保存されている(図17-A)。大腸菌のTopoisomerase IVに対して、ヌクレアーゼ(micrococcal nuclease)を消化させると真核生物のTopoisomerase IIの場合と同じDNAの短い領域(34bp)が保護される(48)。Topoisomerase IVは、Gyraseより真核生物のTopoisomerase IIと類似していると考えられている。これらの事実より、Gyraseの*acrB*変異領域は、GyrAサブユニットのC末端(33kDa領域)が関与すると考えられているGyraseに特異的なDNAラッピング(19)に関与するものよりはTopoisomerase IIにより普遍的なDNA結合と関連している。

「第2章」

DNA gyraseの反応機構における *acrB*変異領域とキノロン薬耐性変異領域の役割に関する研究

要約

第1章において、*acrB*変異がGyraseのDNA結合を低下させることを明らかにした。Gyraseを標的とする薬剤は多く知られている中で、キノロン系薬剤はGyraseとDNAが結合した次の酵素反応を阻害することが示唆されている。第2章においてはまずこのDNA結合に注目し、GyrBサブユニットの*acrB*変異領域とキノロン薬耐性変異領域の関係について検討した。つづいて、*acrB*変異領域と*gyrA*遺伝子のキノロン薬耐性変異領域との関係について調べた。*acrB*変異およびキノロン薬耐性(K447E; Glu⁴⁴⁷)変異を含む二重変異*gyrB*遺伝子の構築、そして、GyrAサブユニットにおけるキノロン薬耐性変異(D87N; Asn⁸⁷)遺伝子*gyrA96*のクローニングなどをおこなった。そして、これらの遺伝子から第1章で記述した方法と同様にして、各サブユニットを発現させて精製をおこない、*in vitro*で解析をおこなった。

再構成Gyraseのスーパーコイル活性を薬剤の存在下で調べたところ、キノロン薬耐性変異を導入したGyraseは既報どおり、すべて、キノロン薬の一種であるオキシリン酸に対して感受性が低くなっていた。ところが、これらキノロン薬耐性Gyraseはすべて、アクリフラビンに対して高い感受性を示した。

DNA結合能を調べたゲルシフトアッセイにおいて、GyrBサブユニットにキノロン薬耐性変異を導入したGyrase(A+B^{Glu447})は、野生型Gyrase(A+B)と同様のDNA結合を示した。また、アクリフラビンに対しては特に高い感受性を示さなかったが、GyrBサブユニット内に*acrB*変異との二重変異をもつ

Gyrase(A+B^{acrB-Glu447})は、そのDNA結合の感受性が増加した。*acrB*変異の単一変異では、第1章で述べた様にアクリフラビン感受性は示さなかった。これらの結果からGyraseのDNA結合には、少なくとも2つの段階があることが示唆された。そして、その段階には*acrB*変異領域が関与する段階と、キノロン薬耐性変異領域(Glu⁴⁴⁷部位とAsn⁸⁷部位)が関与する段階であると推測している。

第1節 キノロン薬耐性変異を導入した各種GyrBサブユニットの精製とそのスーパーコイリング活性

各GyrBおよびGyrB^{acrB}サブユニット内に、キノロン薬耐性変異(Glu⁴⁴⁷)を導入し、これらを分離精製した。得られた各サブユニットをGyrAサブユニットと再構成させ、それらの酵素活性をスーパーコイリングアッセイによって調べた。また、アクリフラビンとキノロン薬の一種であるオキソリン酸を用いて、これら薬剤の存在下でのスーパーコイリング活性について調べ、各サブユニットの変異領域の役割について検討した。

実験材料および方法

・使用大腸菌株およびプラスミド

各種サブユニットの発現に使用した菌株は、BL21(DE3) [F⁻,*ompT*,*hsdS_B*(r_B⁻*m_B*⁻),*gal*,*dcm*(DE3)] 株を用いた。

各種サブユニットの発現ベクターとしてはpGEX4T-3(Pharmacia社製)を用いた。pBluescriptII(KS⁺)はStratagene社製のものを使用した。

・使用培地、試薬および酵素

各種サブユニットの発現においては2 x YT培地 [1.6% Bacto tryptone(Difco社製), 1% Yeast extract(Difco社製), 0.5% NaCl pH7.4] を使用した。

各種制限酵素およびLigation kitは宝酒造製のものを使用した。Dithiothreitol (DTT)、ATP、Spermidine、BSA(V)、Novobiocinはナカライテスク社製をDEAE(DE-52)はWhatman社製を使用し、*E.coli* t-RNAはBoehringer Mannheimのものをそして、Novobiocin-アフィニティー用のレジンはEpoxy-activated Sepharose 6Bをまた、Superdex-200HR columnはPharmacia製のものを使用した。Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)およびPhenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)は和光純薬製のものを使用した。

・ *gyrB*遺伝子へのキノロン薬耐性変異の導入

キノロン薬耐性変異(A¹³³⁹⇒G, Lys⁴⁴⁷⇒Glu)をプラスミドpJB11(wild)とpSBI(*acrB*)の*gyrB*遺伝子に導入し、この方法は第1章において詳しく述べた(50)。変異を含む遺伝子のN末端はオリゴヌクレオチド5'-TTATGGATCCATGTCGAATTCCTTATGACTCC-3' (*gyrB*の*Bam*HI切断部位を含むN末端プライマー)と5'-CTCGACGTTGAGGATTTTACCCTT-3' (キノロン薬耐性変異部位のリバースプライマー)を使ったPCRによって得た。変異部位のC末端部位はオリゴヌクレオチド5'-AATACTCGAGTTAAATATCGATATTCGCCGC-3' (*Xho*I切断部位を含む*gyrB*のC末端プライマー)と5'-AAGGGTAAAATCCTCCCTCAACGTCGAG-3' (キノロン薬耐性変異部位のフォワードプライマー)を使って増幅した。それぞれ増幅したDNA断片をアニーリングし、セカンドPCRの鋳型とした。セカンドPCRは*gyrB*遺伝子のN末端とC末端プライマーを使って遺伝子の全長を増幅した。増幅したDNA断片は制限酵素である*Bam*HIと*Xho*Iで消化

し、2415 bpDNA断片を発現ベクターpGEX4T-3の同じ制限酵素切断部位に挿入し、pKF1(Glu⁴⁴⁷)とpKF2(*acrB*-Glu⁴⁴⁷)とそれぞれ名前を付けた。両挿入配列の確認のための塩基配列決定はDye Terminator Cycle Sequencing Redy Reaction Kit(ABI社)を使用した。

・各種GyrBサブユニットの精製

GyrAおよび各種GyrBサブユニットの精製は第1章、第2節の各サブユニット精製の項で詳しく述べた(50)。野生型GyrAとGyrB, GyrB^{acrB}, GyrB^{Glu447}とGyrB^{acrB-Glu447}の各サブユニットは大腸菌において、GSTとの融合タンパク質の形で発現させ、グルタチオンアフィニティークロマトグラフィーやトロンビン酵素切断によって精製した。一緒に精製される宿主のGyrAサブユニットおよびGyrBサブユニットは、DEAE-SepharoseクロマトグラフィーやNovobiocin-affinity columnによって除いた。GyrB^{Glu447}とGyrB^{acrB-Glu447}サブユニットはそれぞれ5Mと7M尿素を含むHEPES bufferによって溶出した。

・スーパーコイリングアッセイ

種々のGyrBサブユニットと野生型GyrAサブユニットの、再構成Gyraseのスーパーコイリングアッセイとゲルシフトアッセイは第1章、第2および第3節の項で詳しく述べた(50)。スーパーコイリングアッセイにおいて、リラックしたpBluescript II(KS⁺)1μgはラットの肝臓から調製したTopoisomerase IIによって作成(37)し、60μlの反応液で再構成Gyraseの100 unitと30°C,30min保温した。その後エタノール沈殿によりDNAを回収し、0.8%アガロースゲル電気泳動をおこない、その後ゲルを染色した。Gyraseの1 unitのGyrase活性は0.8%のアガロースゲル泳動で、スーパーコイルDNAの位置に全DNA量の約50%が位

置する量とした。

結果

・キノロン薬耐性変異GyrBサブユニット

図18,19に $acrB$ の変異部位とキノロン薬耐性変異部位を示している。キノロン薬耐性変異を保持するGyrBサブユニットのGlu⁴⁴⁷変異は、oligonucleotide-directed 部位特異的変異法によって、 $gyrB(wild)$ と $gyrB(acrB)$ 遺伝子にそれぞれ導入した。この変異は、Yamagishi(28)らによる $gyrB$ 遺伝子のタイプII変異と同じである。それぞれのGyrBサブユニットは、GSTタンパク質融合法および各種クロマトグラフィーを組合せて精製した。宿主のGyrAサブユニットのコンタミネーションがないことは、SDS-ポリアクリルアミドゲル(Multi-gel 4-20% gradient 第一化学社製)電気泳動とスーパーコイリングアッセイによって確認した。精製した各種のGyrBサブユニットは野生型のGyrAサブユニットと混合し、A₂B₂の四量体を形成させ、以下の実験に使用した。

・アクリフラビンおよびオキシリン酸存在下におけるDNAスーパーコイリング活性

各種のGyrBサブユニットを含む各種再構成Gyraseの酵素活性(Specific activity)を決定した。Gyrase(A+B^{Glu447}) (8.0×10^3 unit/mg)はGyrase(A+B) (3.2×10^6 unit/mg)より、約400倍の酵素活性が低下しており、Gyrase(A+B^{acrB-Glu447}) (1.4×10^2 unit/mg)はGyrase(A+B^{Glu447})はさらに約6倍低下していた(図20)。

スーパーコイリング活性における、アクリフラビンとオキシリン酸の効果を調べた。各種再構成Gyraseはそれぞれ同じユニット数(100 unit)を使った。キノロン薬(オキシリン酸)の阻害効果の結果を図21および表1に示した。

Gyrase(A+B^{Glu447})はGyrase(A+B)およびGyrase(A+B^{acrB})とを比較してオキソリン酸に対しては低い感受性を示した。また、Gyrase(A+B^{acrB-Glu447})もGyrase(A+B)およびGyrase(A+B^{acrB})と比較すると、オキソリン酸に対しては低い感受性であり、Gyrase(A+B^{Glu447})より高い感受性であった。

図22および表1にアクリフラビンに対する阻害効果を示している。

Gyrase(A+B)とGyrase(A+B^{acrB})は、これまでに示した(50)のように、アクリフラビン感受性は同程度であり、50%の薬剤阻害(ID₅₀)は約40 μ g/ml以上であった。一方、GyrB^{Glu447}とGyrB^{acrB-Glu447}サブユニットを含む各Gyraseは低濃度のアクリフラビンで阻害され、そのID₅₀は約15 μ g/mlであった。これらの結果から、Glu⁴⁴⁷変異はアクリフラビン感受性を増加させる傾向があることが示唆された。

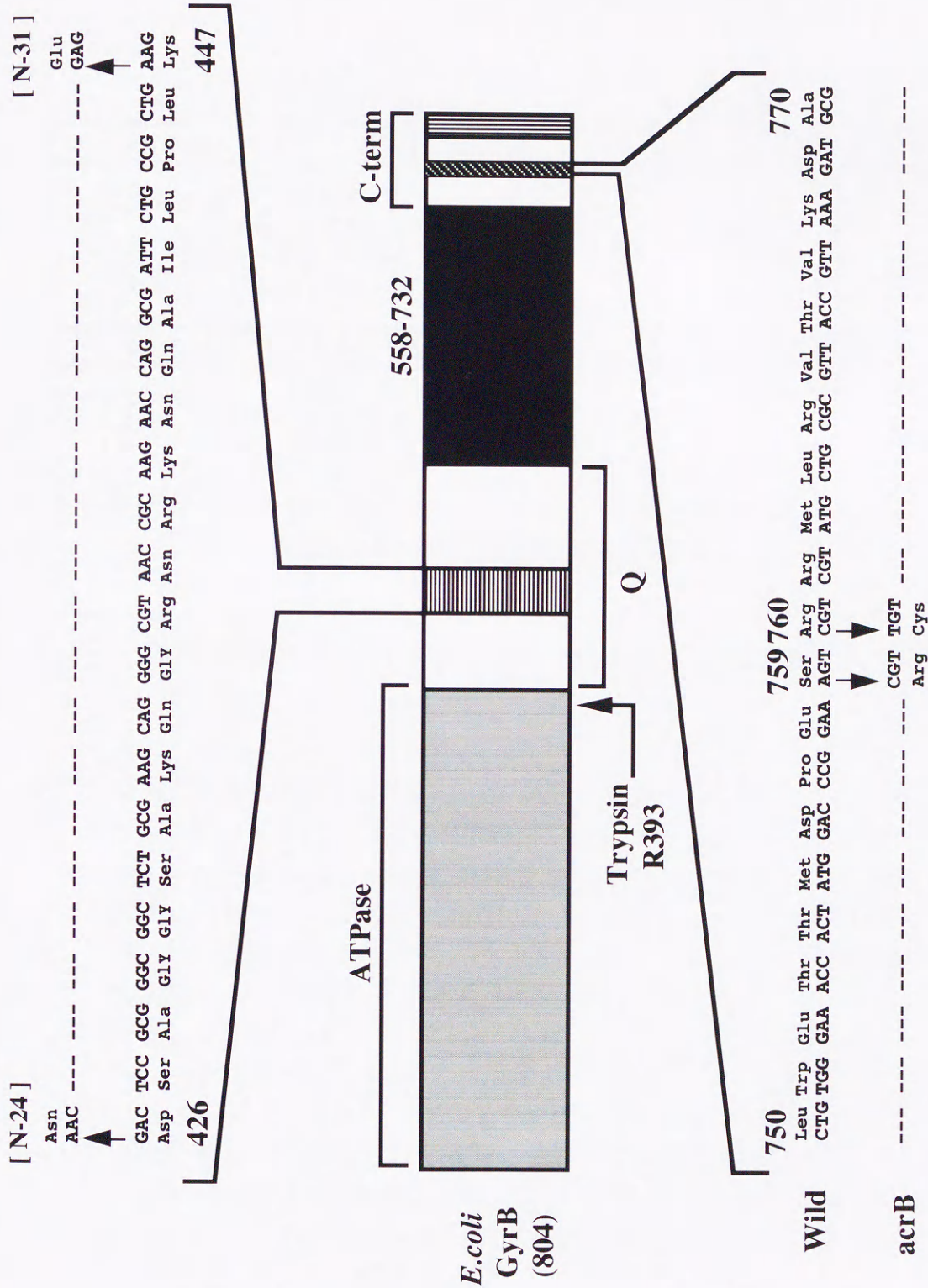
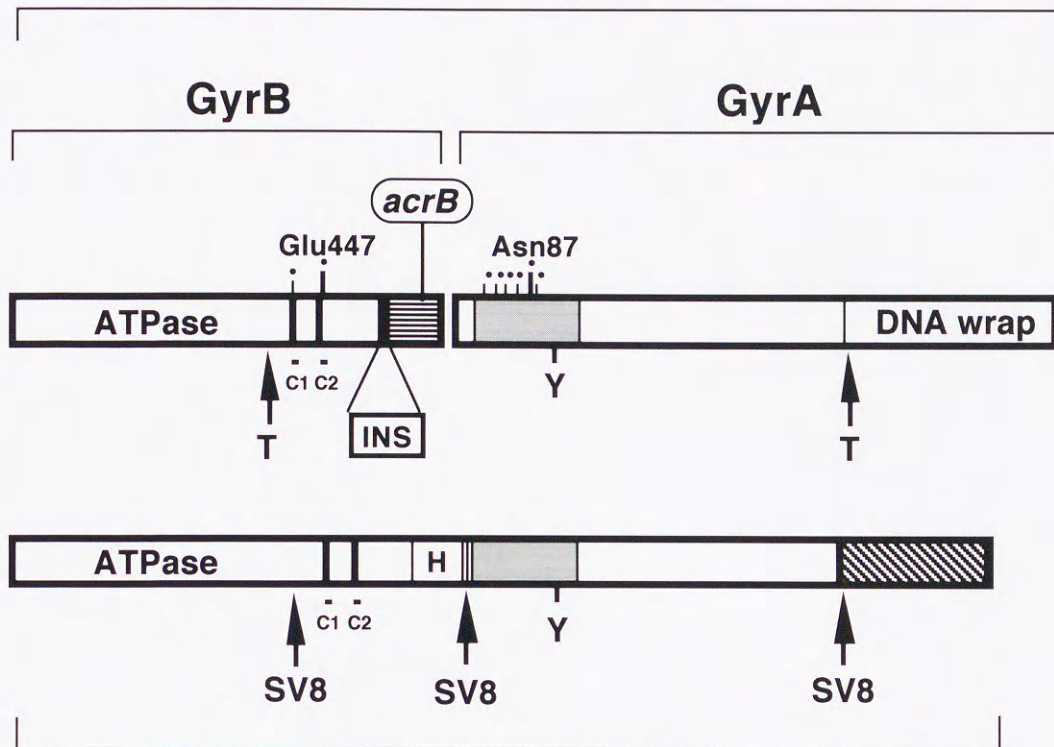


図18 大腸菌DNA gyrase BサブユニットにおけるacrB変異とキノロン耐性変異箇所の塩基配列とアミノ酸配列

E.coli DNA gyrase

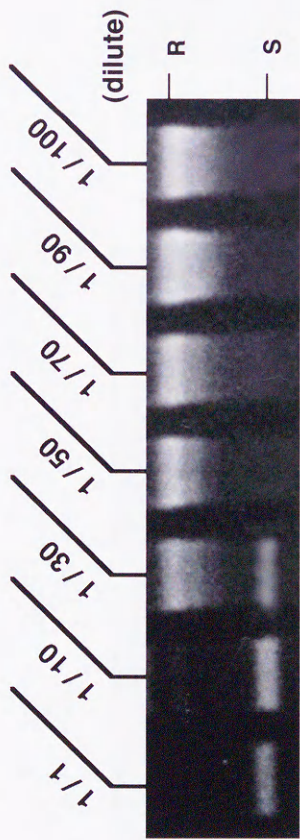


Yeast Topoisomerase II

図19 大腸菌DNA gyraseと酵母Topoisomerase IIの構造比較図

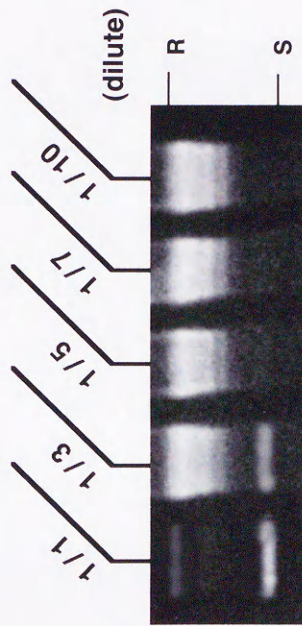
上段は大腸菌のDNA gyraseのAおよびBサブユニットを示している。INSは大腸菌をはじめ原核生物のgyraseにおいてのみ存在する非保存配列を示し、*acrB*変異はGyrBのC末端領域 (C-TERM)に位置する (■)。これまでに報告されているキノロン薬耐性変異は (・) によって示している。本実験においてはGlu447変異(K447E) およびAsn87変異(D87N)を用いた。矢印で示したTはトリプシン切断部位でYはGyrAサブユニットにおけるTyr122の位置を示している。下段は酵母のTopoisomerase IIを示しており、矢印で示したSV8はSV8プロテナーゼによる切断部位を示している。YはTyr783の位置を示し、(■)はC末端に位置する非保存配列を示している。HはHinge領域の位置を示している。また、C1およびC2はすべてのType II Topoisomeraseにおいて保存されている(C1; EGDSA, C2; PLRGK)アミノ酸配列を示している。(□)はDNA結合モチーフが存在するドメインの位置である。

Gyrase(A+B^{Glu447})



[Spec. 8.0×10^3 unit / mg]

Gyrase(A+B^{acrB-Glu447})



[Spec. 1.4×10^2 unit / mg]

図20 キノロン耐性変異を導入した各種GyraseのSpecific activity
RおよびSはリラックス型DNA(R)とスーパーコイル型(S)プラスミドの位置を示してゐる。

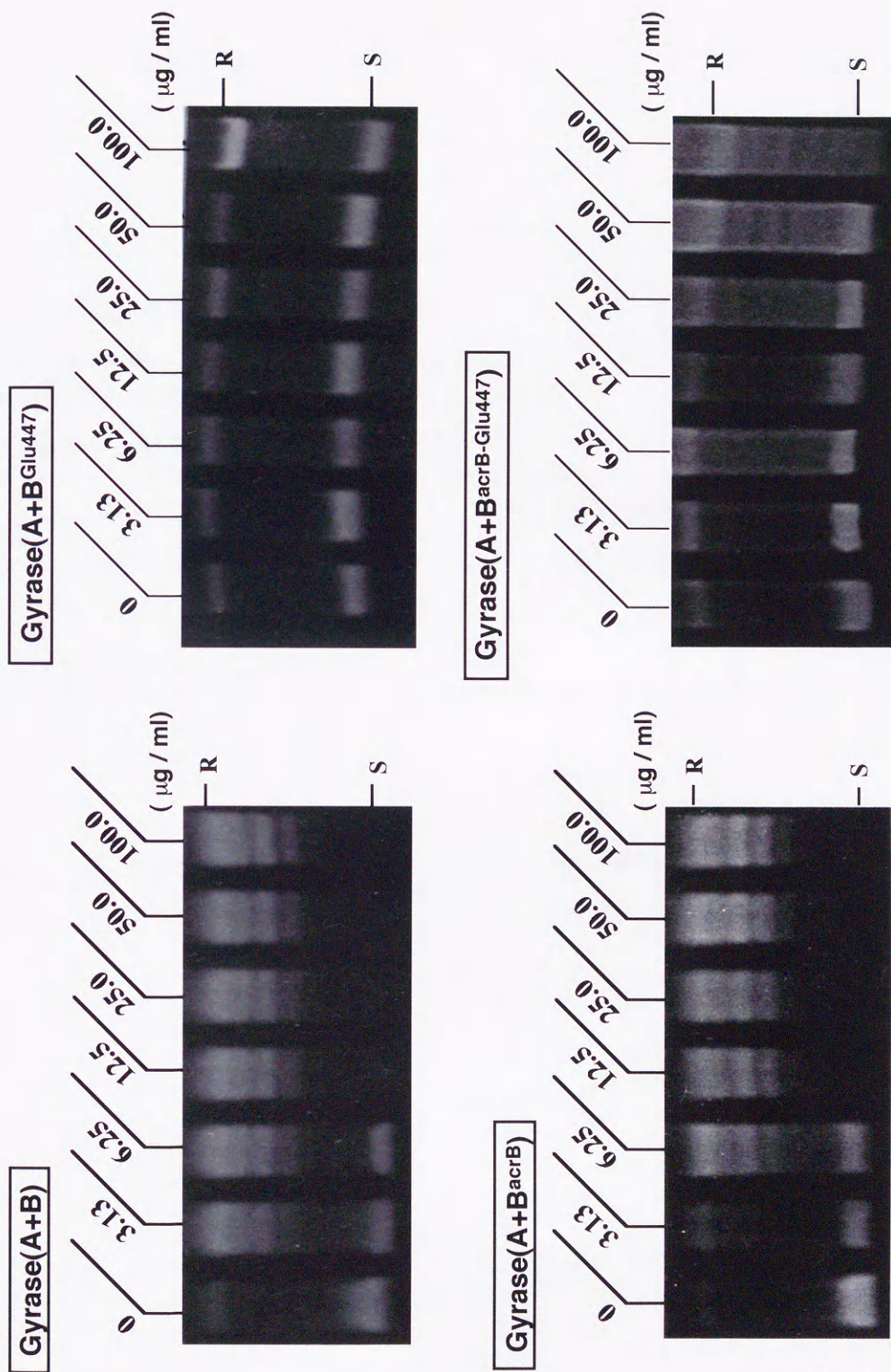


図21 オキソリニン酸存在下における各種再構成Gyraseのスーパーコイル活性

RおよびSはリラックス型DNA(R)とスーパーコイル型(S)プラスミドの位置を示している.

Reconstituted Gyrase	ID ₅₀ (μg/ml)	
	Acriflavine	Oxolinic acid
GyrA(Asn87)+GyrB(wild)	15	>100
GyrA(Asn87)+GyrB(acrB)	7.5	>100
GyrA(wild)+GyrB(wild)	>40	9
GyrA(wild)+GyrB(acrB)	>40	9
GyrA(wild)+GyrB(Glu447)	15	>100
GyrA(wild)+GyrB(acrB-Glu447)	15	75

表1 各種再構成Gyraseのスーパーコイリングアッセイ時におけるアクリフラビンおよびオキシソリン酸による50%阻害濃度 (ID₅₀)

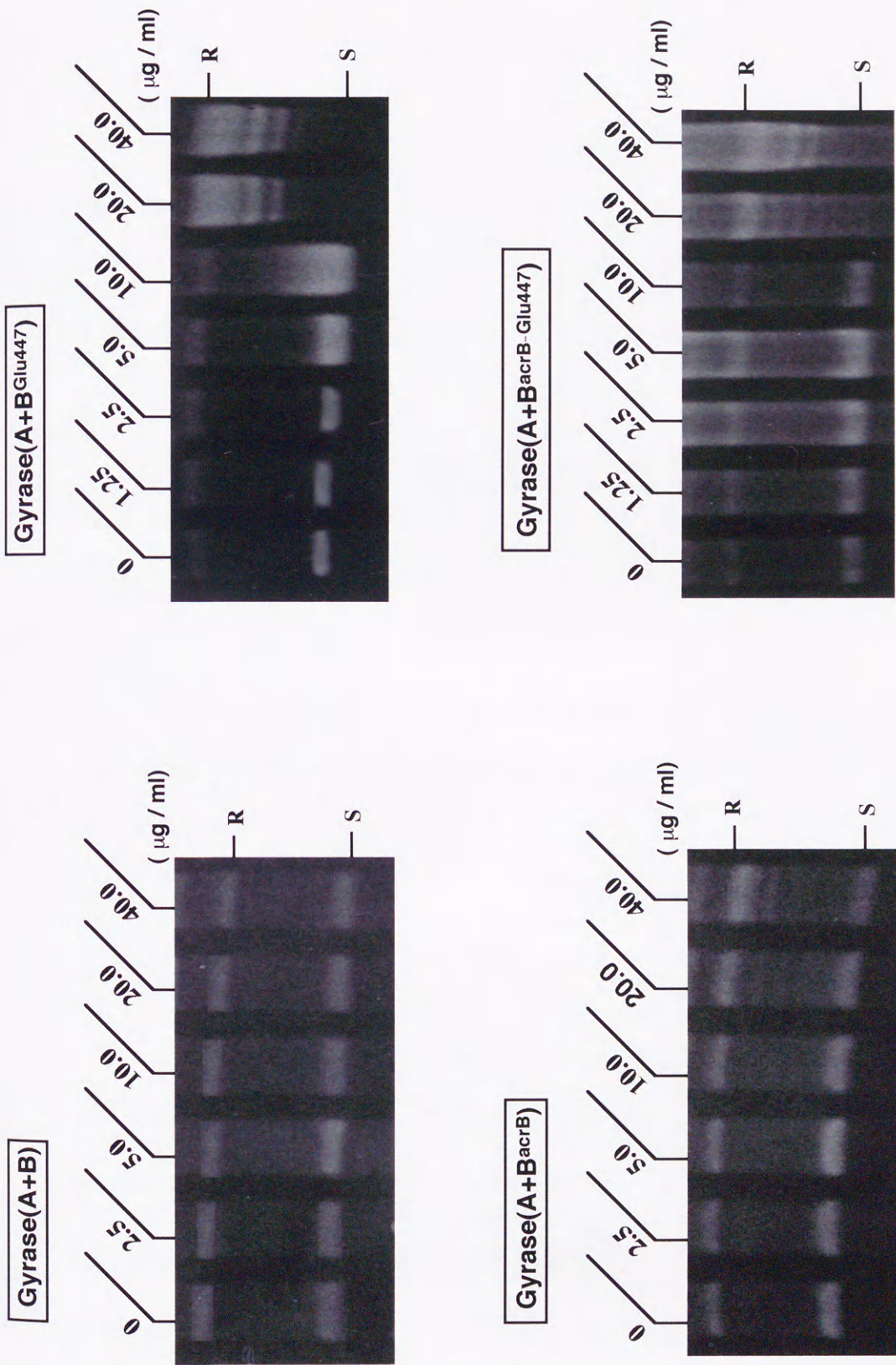


図22 アクリフラビン存在下における各種再構成Gyraseのスーパーコイル活性

RおよびSはリラックス型DNA(R)とスーパーコイル型(S)プラスミドの位置を示している.

第2節 キノロン薬耐性変異を保持するGyrBサブユニットのDNA結合能について

キノロン薬耐性変異を保持する各種のGyrBサブユニットを使用し、再構成Gyraseのアクリフラビンやオキシリン酸の存在下で、DNA結合能をゲルシフトアッセイによって調べた。そして、*acrB*変異領域とキノロン薬耐性変異領域について、そのDNA結合に関して検討した。

実験材料および方法

・ 試薬および酵素

T4 polynucleotide kinase、Ligation kitは宝酒造社製、poly(dIdC)-poly(dIdC)はSigma社製、ポリアクリルアミドゲル(Multi-gel 4-20% gradient)は第一化学社製のものを使用した。

・ ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイの方法は第1章、第3節で述べた(50)。pBR322プラスミド(886-1089の位置)のGyrase切断部位を含む204 bpの二重鎖DNAに、T4 polynucleotide kinaseによって $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ をラベルした。ラベルしたDNA断片(300 pg)を25 ngのpoly(dIdC)-poly(dIdC)の存在下で、5 μg の再構成Gyrase(各AおよびBサブユニットは2.5 μg)と共に25 $^{\circ}\text{C}$,60分間保温し、192 mMのグリシンと8 mMのMgCl₂を含む25 mM Tris-HCl bufferで、ポリアクリルアミドゲル電気泳

動をおこなった。ゲルに含まれるGyrase-DNA複合体の放射活性はチェレンコフ法により測定した。

結果

・アクリフラビンおよびオキシリン酸存在下におけるDNA結合能

DNA結合の活性は、Gyraseによる切断部位を含むpBR322プラスミドの204 bpの二重鎖DNAを使用して、そのDNA結合能をゲルシフトアッセイで調べた。

各種薬剤の非存在下において、Gyrase(A+B^{Glu447})とGyrase(A+B)のDNA結合能は同程度であった。また、Gyrase(A+B^{acrB-Glu447})はGyrase(A+B^{acrB})と同程度の結合であった。これらの結果はGlu⁴⁴⁷変異部位はDNA結合に影響を与えないことを示す(図23)。

これらのGyraseにおいて、DNA結合のアクリフラビンによる効果を図24に示す。アクリフラビンはGyrase(A+B)とGyrase(A+B^{Glu447})に対して同じ濃度で同程度の阻害をするが、より低濃度でGyrase(A+B^{acrB-Glu447})のDNA結合を抑制させる。Gyrase(A+B^{acrB-Glu447})のDNA結合のID₅₀は約2μg/mlであり、

Gyrase(A+B^{acrB})より著しく低い結果となった。

DNA結合におけるオキシリン酸の効果を図25、26に示す。Gyrase(A+B)において、オキシリン酸の濃度の上昇にともなって、Gyrase-DNA複合体は若干減少するが、DNA結合への著しい効果は見られなかった。Gyrase(A+B^{Glu447})はGyrase(A+B)と類似した傾向を示した。Gyrase(A+B^{acrB})の場合、低濃度のオキシリン酸において、Gyrase-DNA複合体が著しく増加した。12.5μg/mlの濃度ではGyrase(A+B)と同程度であった(図25)。Gyrase(A+B^{acrB-Glu447})は

Gyrase(A+B^{acr}B)よりDNA結合は低い傾向であるが、低濃度のオキソリン酸の存在下ではDNA結合が増加した(図26)。



Figure 26: DNA binding of Gyrase(A+B^{acr}B) and Gyrase(A+B^{acr}B) + Oxolinic acid. The y-axis represents DNA binding in counts per minute (cpm), ranging from 0 to 2000. The x-axis shows the concentration of Gyrase(A+B^{acr}B) and Gyrase(A+B^{acr}B) + Oxolinic acid at various concentrations (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0, 200.0, 500.0, 1000.0, 2000.0). The data indicates that Gyrase(A+B^{acr}B) has a lower DNA binding affinity compared to Gyrase(A+B^{acr}B) + Oxolinic acid, and that the addition of Oxolinic acid increases DNA binding at low concentrations.

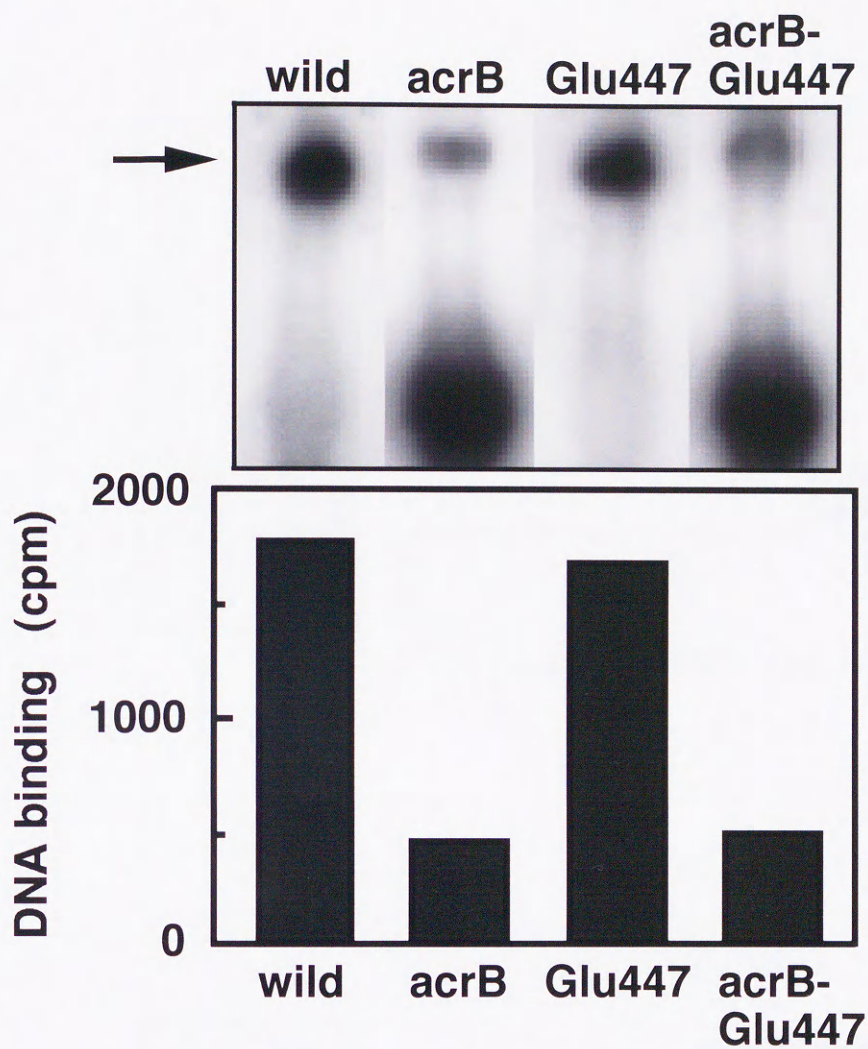
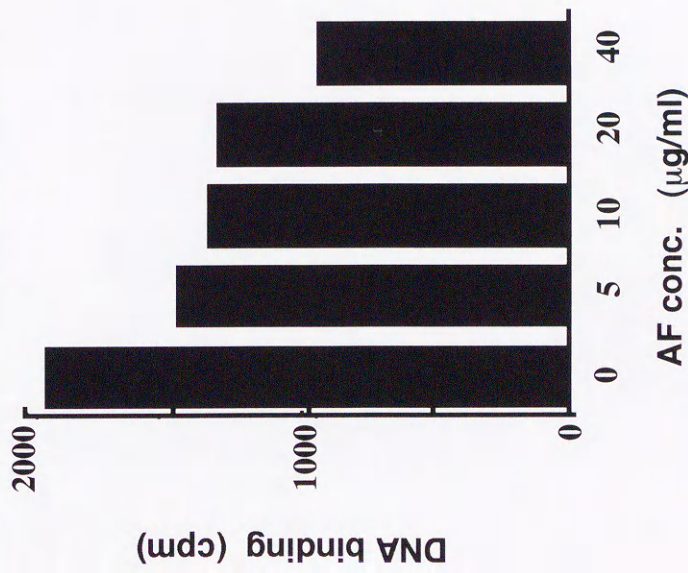
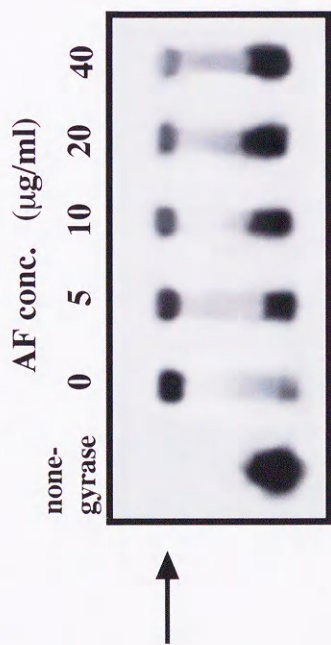


図23 各種GyrBサブユニットを含む再構成GyraseのDNA結合
 上段はゲルシフトアッセイによるDNA結合能を示しており、矢印
 はDNA-Gyraseの複合体の位置を示している。下段は複合体の量を
 グラフ化したものである。

Gyrase(A+BGlu447)



Gyrase(A+BacrB-Glu447)

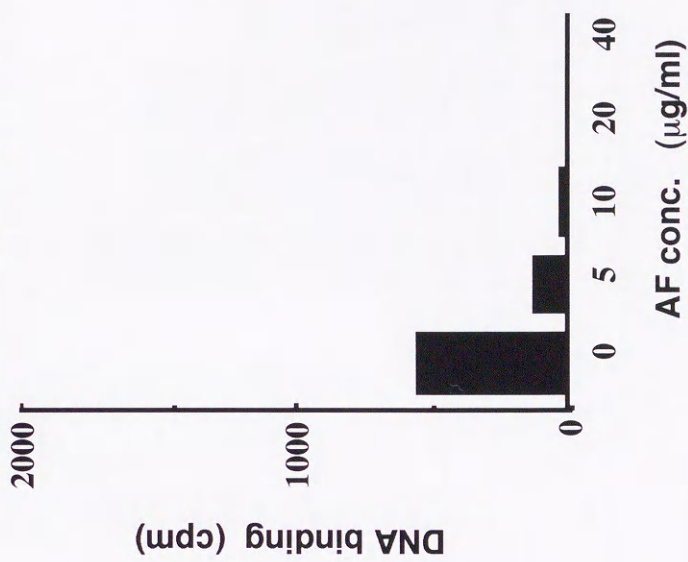
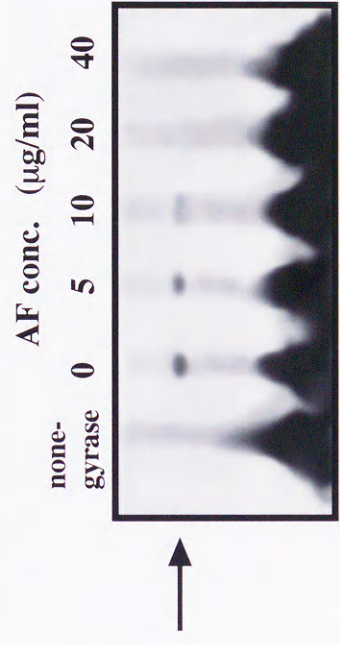


図24 ゲルシフトアッセイによる各種Gyraseのアクリフラビン存在下でのDNA結合に及ぼす影響
矢印の位置はGyrase-DNA複合体を示している。

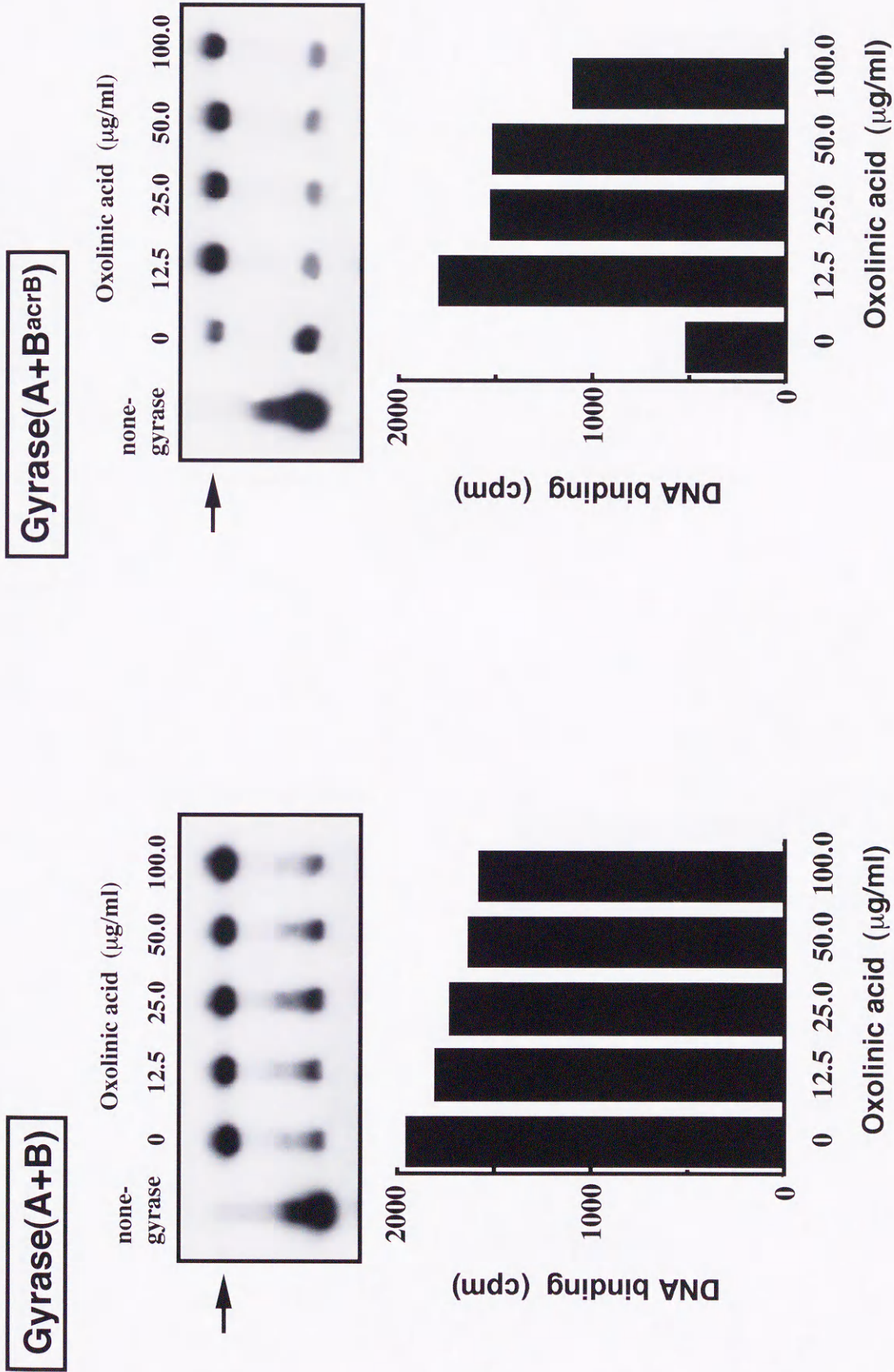
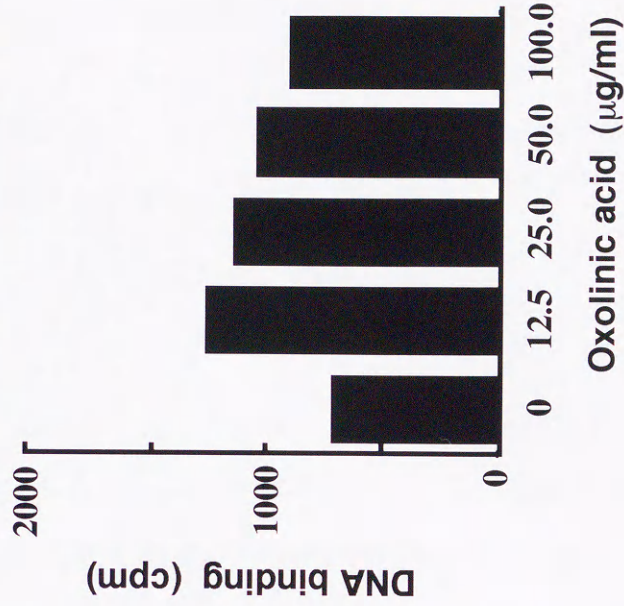
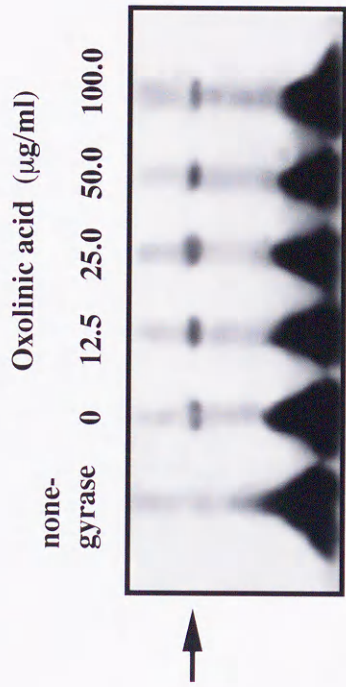


図25 ゲルシフトアッセイによる各種Gyraseのオキソリニン酸存在下でのDNA結合に及ぼす影響
矢印の位置はGyrase-DNA複合体を示している。

Gyrase(A+BacrB-Glu447)



Gyrase(A+B^{Glu447})

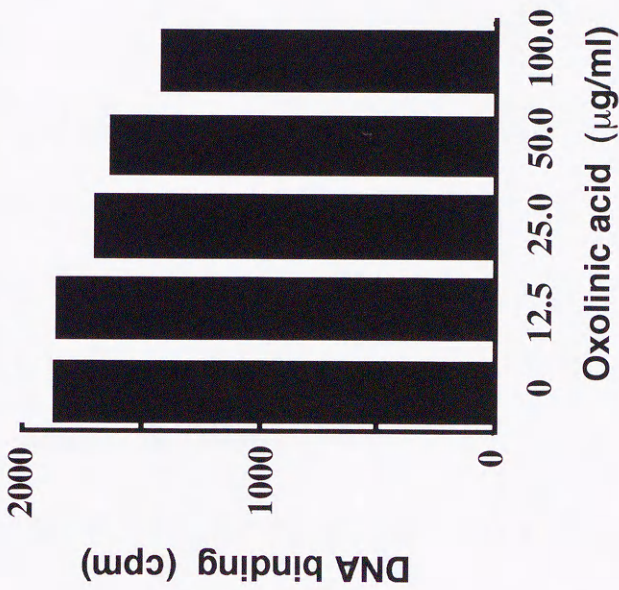
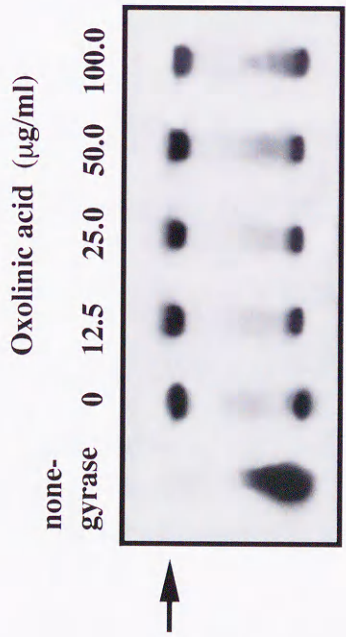


図26 ゲルシフトアッセイによる各種Gyraseのオキソリニン酸存在下でのDNA結合に及ぼす影響
矢印の位置はGyrase-DNA複合体を示している。

第3節 キノロン薬耐性変異GyrA^{Asn87}サブユニットの精製とこれを含む各種再構成GyraseのDNA結合能について

キノロン薬耐性変異には、これまでに述べた*gyrB*遺伝子に生じたものと*gyrA*遺伝子に生じたものが報告されている(25)。第3節では、キノロン薬の一種であるナリジキシム酸に耐性を示すJM109株からPCR法によって、この耐性遺伝子*gyrA96*のクローニングをおこなった。精製したGyrAサブユニットとGyrBおよびGyrB^{acrB}サブユニットとで再構成Gyraseを作成し、それらの酵素活性(Specific activity)や、アクリフラビンおよびオキシリン酸の存在下でのスーパーコイル活性を調べた。そして、*acrB*変異領域とこのGyrAサブユニットにおけるキノロン薬耐性変異領域(Asn⁸⁷)のDNA結合について検討した。

実験材料および方法

・使用大腸菌株とプラスミド

キノロン薬耐性変異遺伝子(*gyrA96*)のクローニングは大腸菌JM109 [*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, λ^- , Δ (Lac-proAB)] 株を用いた。

GyrA^{Asn87}サブユニットの精製に用いた発現ベクターとしては、pGEX4T-3(Pharmacia社製)をまたその発現に使用した菌株はBL21(DE3)

[F^- , *ompT*, *hsdS_B*($r_B^-m_B^-$), *gal*, *dcm*(DE3)] 株を用いた。スーパーコイルアッセイに用いたpBluescriptII(KS⁺) プラスミドはStratagene社製のものを使用した。

- ・使用培地、試薬および酵素

サブユニットの発現においては2 x YT培地〔1.6% Bacto tryptone(Difco社製), 1% Yeast extract (Difco社製), 0.5% NaCl pH7.4〕を使用した。

PCR時の修飾酵素Taq EXや各種制限酵素、Ligation kitおよびアガロースは宝酒造製のものを使用した。Dithiothreitol (DTT)、ATP、Spermidine、BSA(V)、Novobiocinはナカライテスク社製をDEAE(DE-52)はWhatman社製を使用し、*E.coli*-tRNAはBoehringer Mannheim社製をまた、Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)およびPhenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)は和光純薬製のものを使用した。

- ・ *gyrA96*遺伝子のクローニングとその塩基配列の解析

*gyrA96*遺伝子はPCR法により大腸菌JM109株の染色体DNAからクローニングした。クローニングに用いたフォワードプライマーは5'-TTATGGATCCATGAGCGACCTTGCGCGTGAAATTACACCGG-3'(N末端に制限酵素*Bam*HI切断部位を含み、翻訳開始コドンから6番目のAGAコドンをCGTに置換している)とリバースプライマーは5'-AATACTCGAGTTATTCTTCTTCTGGCTCGTC-3'(N末端に*Xho*I切断部位を含む)を用いた。増幅されたDNA断片をpGEX4T-3発現ベクターの*Bam*HI-*Xho*I切断部位にLigationした。この組み換え体プラスミドをpSAII(*gyrA96*)と名付けた。塩基配列の解析はDye Terminator Cycle Sequencing Redy Reaction Kit(ABI社)を使用した。

- ・ *GyrA*^{Asn87}サブユニットの精製

サブユニットの精製は第1章、第2節で述べた*GyrA*(wild)サブユニットを

精製する方法に基づいておこなった(50)。サブユニットの発現は、組み換え体プラスミドpSAII(*gyrA96*)を保持する菌株を2 x YT培地2.5Lで培養し、OD₆₀₀が0.5に達するまで30°Cで培養することによりおこなった。融合遺伝子の発現誘導は最終濃度が0.1mMのIPTGの添加によっておこなった。添加30分後に培養液をすばやく氷で冷やし、細胞を遠心(HITACHI RPA9-2 roter, 4°C, 8,000rpm 5min)により集菌した。10% Glycerol, 5mM DTT そして、1mMのPMSFを含む100mM PBS buffer pH7.4をcolumnの洗浄、トロンビン酵素による消化そして、タンパク質の溶出に使用した。

サンプルを3LのHEPES buffer(25mM HEPES, pH 8.0, 50mM KCl, 1mM EDTA, 5mMDTT, 10% Ethyleneglycol)で終夜透析し、同様のbufferで平衡化したNovobiocin-affinity column(50ml体積)にかけ、このcolumnで通過した分画を集めた。

最終的にこれらのサンプルはNaClを除いたTGED buffer 3Lで終夜の透析をおこない、Centricon (Amicon)によって濃縮し、-80°Cにおいて保存した。

・スーパーコイリングアッセイ

第1章、第2節に述べた方法でおこなった(50)。各種Gyraseは再構成buffer(20mM Tris-HCl pH7.6, 0.2mM EDTA, 70 mM KCl, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 360µg/ml BSA, 20% Glycerol)に各GyrAとGyrBサブユニット(それぞれ7.5µg)を加えて合計容量30µlで20°C、30分間保温し再構成させた。

アッセイは50mM Tris-HCl, pH 7.5, 20mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1.5mM ATP, 5mM Spermidine, 50µg/ml BSA, 500µg/ml *E.coli*-tRNA, 10% Glycerolに1µgのリラックスしたpBluescriptII(KS⁺) DNAを加え、これに各種再構成Gyraseの必要unit数を加え、合計容量を60 µlでおこなった。これらのサンプル

を30°Cで30分間保温し、その後のDNAの抽出はTE(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)飽和フェノール溶液とクロロホルム：イソアミノアルコール溶液でそれぞれ2回おこなった。DNAはエタノール沈殿によって回収し、TEに溶解した。0.8%のアガロースゲル電気泳動(50V一定、Mupid Iコスモバイオ社製)をおこない、再構成Gyraseの1unitあたりのGyrase活性はアガロースゲル電気泳動においてスーパーコイルDNAの位置に全DNA量の約50%が位置する量とした。

結果

・ *gyrA*96変異の同定

JM109株からの*gyrA*遺伝子のキノロン薬耐性領域(199-318)の塩基配列を調べた結果、259番目のグアニン(G)がアデニン(A)に置換していた。これにより87番目のアミノ酸はアスパラギン(Asp)がアスパラギン酸(Asn)に置換していた(図27)。この変異はYoshidaらによってすでに報告されているN-113株の変異と同じであった(25)。

・ アクリフラビンおよびオキシリン酸存在下におけるDNAスーパーコイルング活性

スーパーコイルングアッセイから、Gyrase(A^{Asn87}+B)とGyrase(A^{Asn87}+B^{acrB})の各酵素活性は前者が 1.0×10^4 unit/mgであり、後者は 3.0×10^3 unit/mgであった(図28)。得られた酵素活性をもとに同一ユニット数(100 unit)を用いて、オキシリン酸の存在下で活性を測定し、GyrAサブユニットにAsn⁸⁷を含むものは耐性が確認された(図29、表1)。しかし、アクリフラビンの存在下では、GyrA

サブユニットにAsn⁸⁷を含むものは特異的に感受性が高くなった(図10, 図30、表1)。

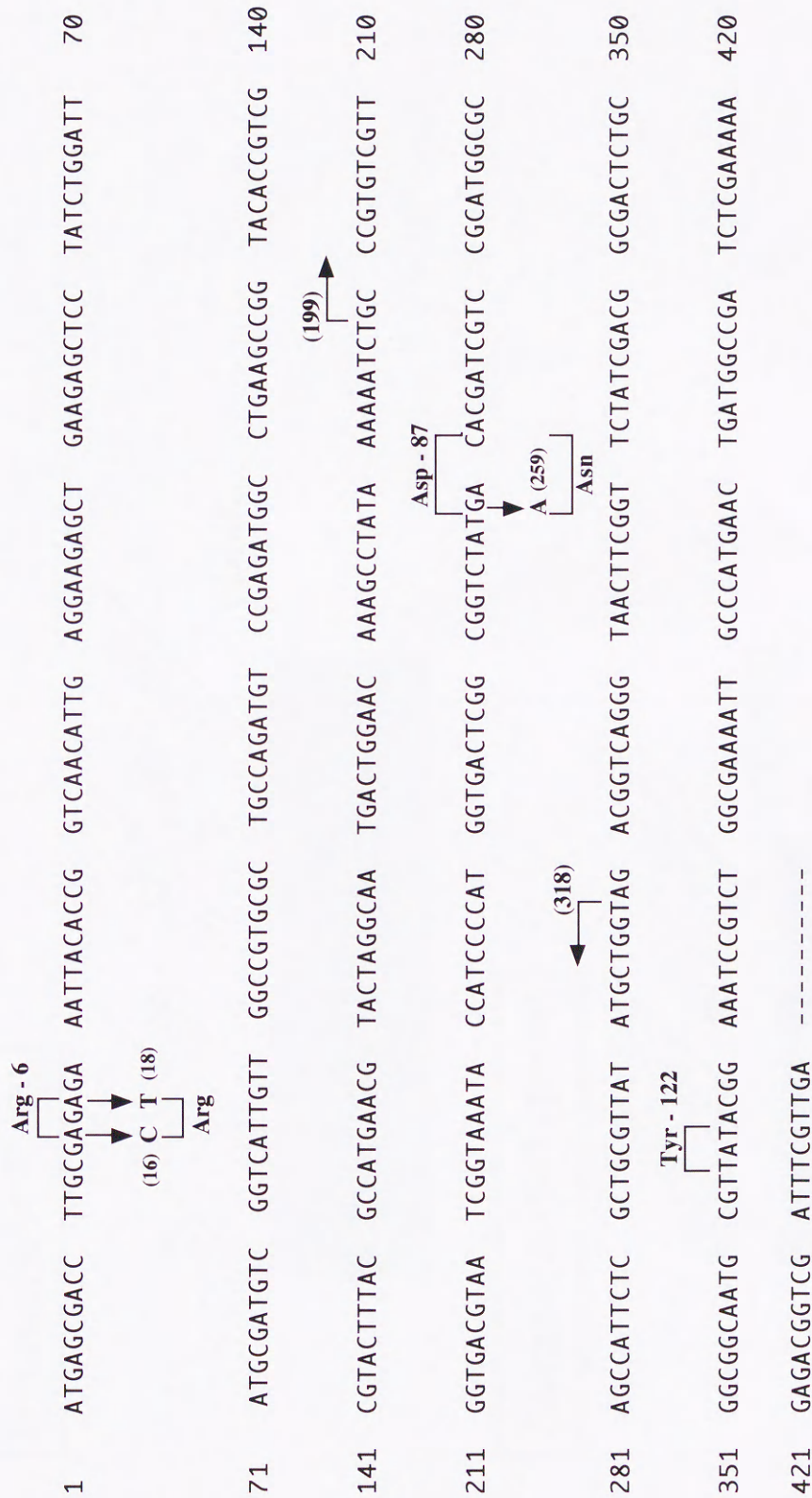


図27 *gyrA96* 遺伝子上流(1-440 bp)塩基配列

()内の数字は塩基番号を示し、各アミノ酸横の番号はそのアミノ酸の番号を示している。

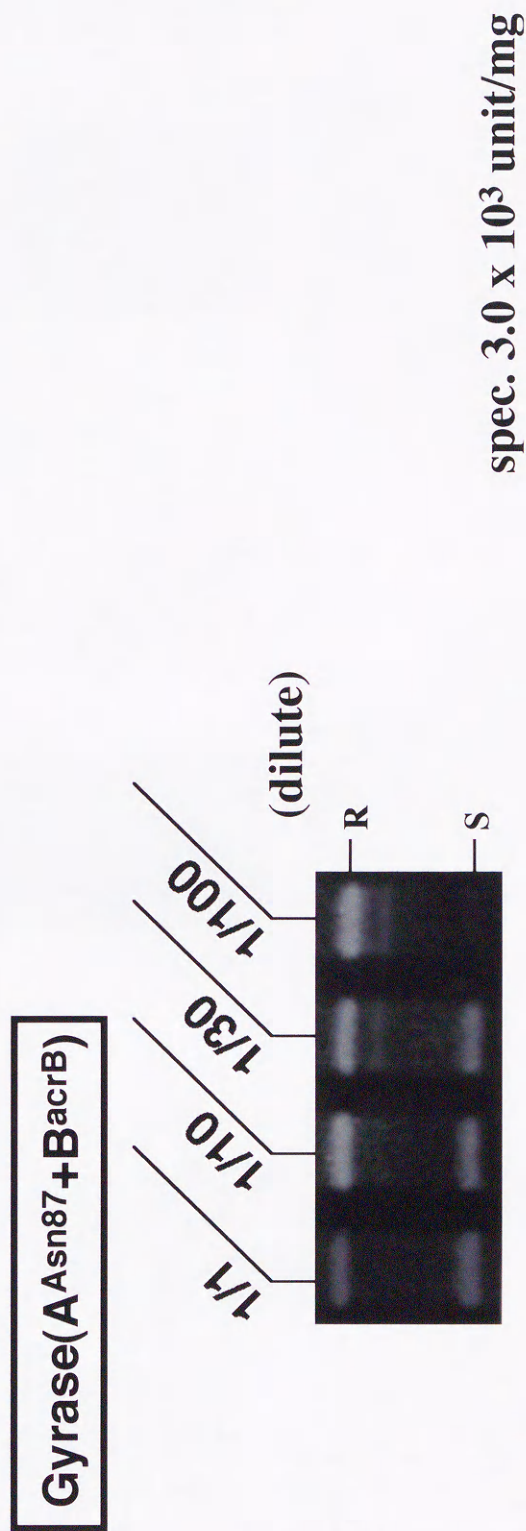
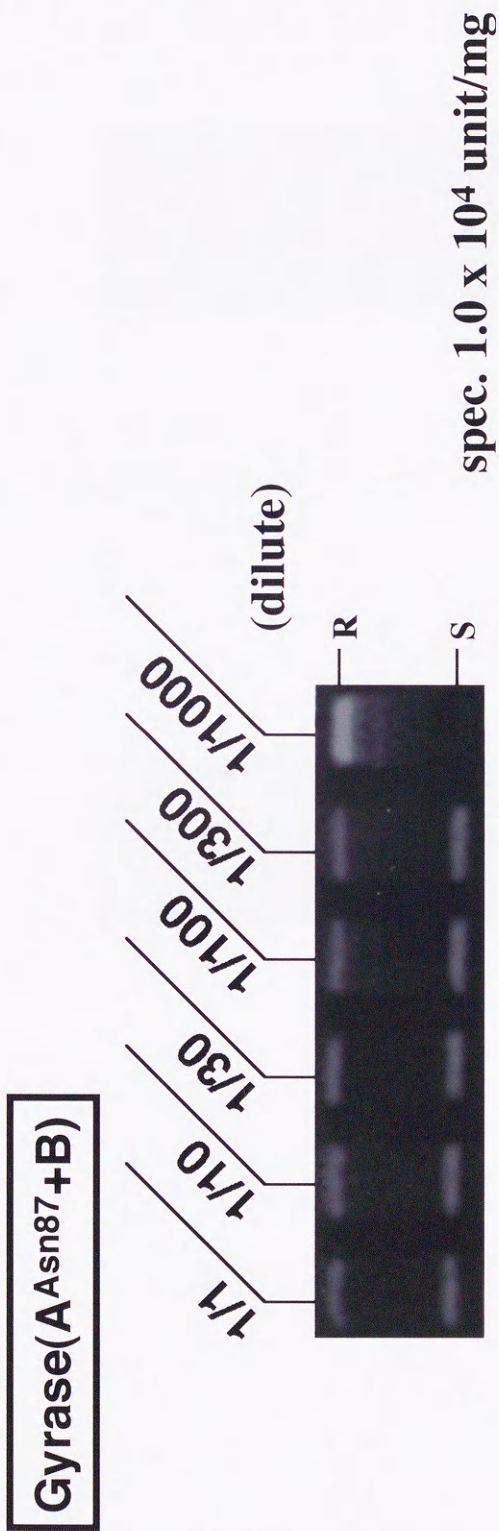
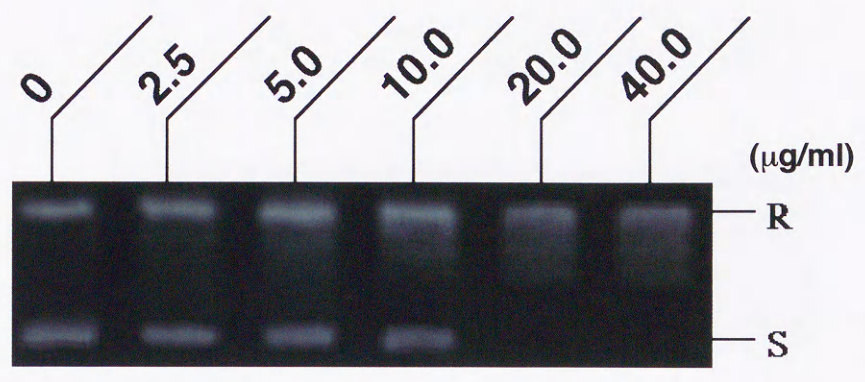


図28 変異型GyrA(Asn⁸⁷)サブユニットを含む各種GyraseのSpecific activity.
RはリラックスDNAの位置をSはスーパーコイルの位置を示している。

Gyrase(A^{Asn87}+B)



Gyrase(A^{Asn87}+B^{acrB})

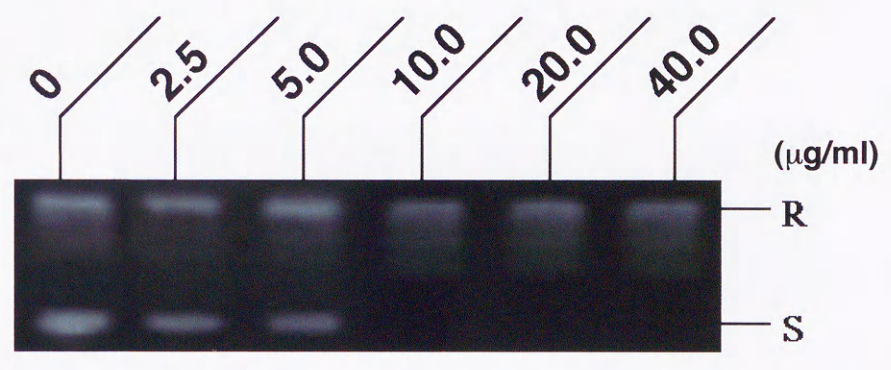


図29 オキシリン酸存在下における各種再構成 Gyraseのスーパーコイル活性

RはリラックスDNAの位置をSはスーパーコイルの位置を示している.各種Gyraseは100unitを用いた.

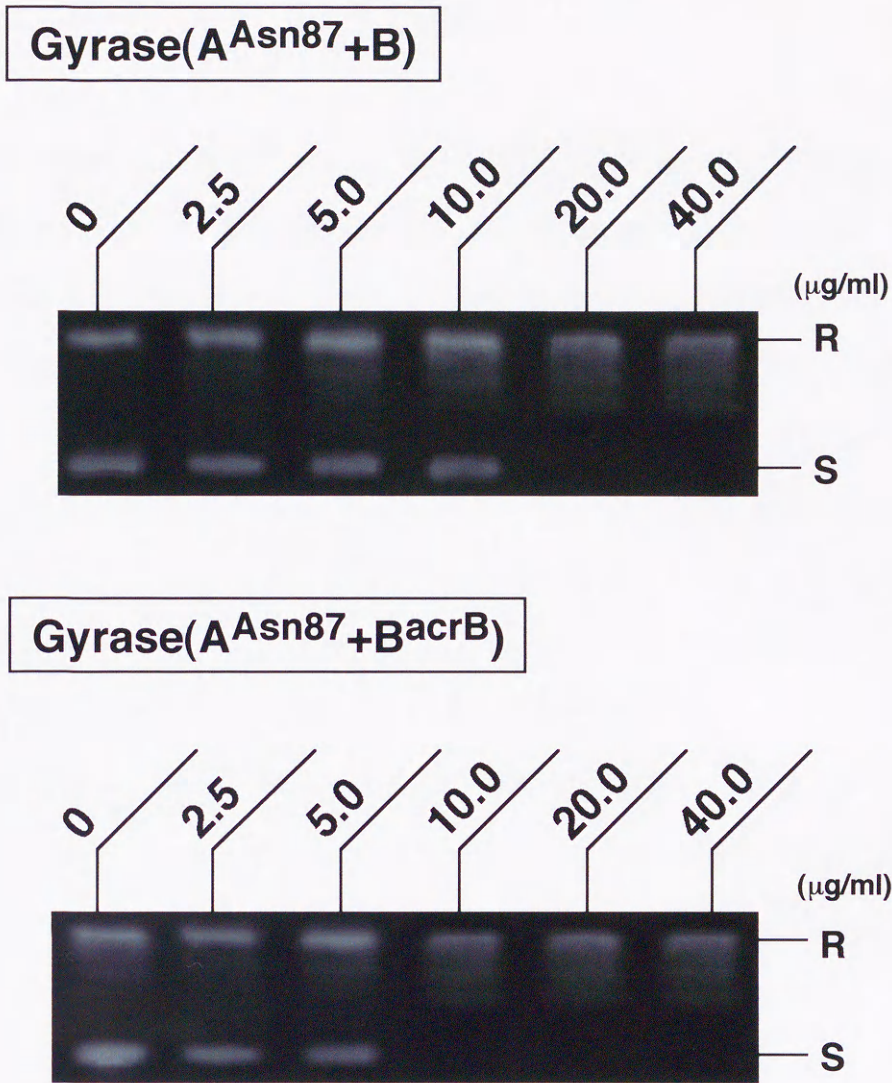


図30 アクリフラビン存在下における変異型GyrAサブユニットを含む各種Gyraseのスーパーコイル活性

RはリラックスDNAの位置をSはスーパーコイルの位置を示している.各種Gyraseは100unitを用いた.

考察

第1章において、GyrBサブユニットのC末端領域に*acrB*変異が位置することを明らかにし、この変異はGyraseのDNA結合能の低下をもたらすものであることを示した(図15, 16)(50)。そして、*acrB*変異を含むC末端領域がグラム陽性菌のGyraseには存在しない挿入配列によって、区切られる独立した機能部位であると考え、C-TERM領域と名づけその役割を考察した。Gyraseのコンフォメーション変化において、このC末端領域は真核生物Topoisomerase IIで知られているちょうつがいの構造機能部位に相当している。*acrB*変異部位がDNA結合に関係することから、コンフォメーション変化に関するC-TERM領域が、DNA結合に関与していることが予想された。キノロン薬耐性の変異領域は、GyrAサブユニットではDNA切断活性部位であるTyr¹²²からN末端側に存在している。また、GyrBサブユニットではATPase領域とC-TERM領域の間に位置する。真核生物のTopoisomerase IIの一次構造と比較すると、これらのキノロン薬耐性変異部位はC-TERM領域を挟むように存在している(図19)。Berger(45)らはTopoisomerase IIの結晶構造解析から、GyrAサブユニットのキノロン薬耐性変異のホットスポットがCAP様DNA結合ドメイン内にあり、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフのアミノ酸配列に相当することを指摘している。さらに、MoraisらはGyrA二量体のDNA結合部位ドメインの結晶構造解析から類似の報告をしている(51)。GyrBサブユニット(Asp⁴²⁶⇒AsnへまたLys⁴⁴⁷⇒Glu)のキノロン薬耐性変異もまたTopoisomerase IIにおいて、高度に保存された領域(EGDSA.....PLRGKモチーフ)に生じている。これらの変異部位はTopoisomerase IIの特異的な反応に必要な領域であると予想されるが、その機能については今日まで報告がされていない。キノロン薬はGyrase-DNA複合体において、切断したDNA鎖の5'末端とGyrAサブユニットのTyr¹²²アミノ酸残基が共有結合した状態を固定化すると考えられている。これ

らの特性はキノロン薬が酵素反応のDNA切断-再結合段階を認識・阻害し、また、GyrAとGyrBサブユニットのキノロン薬耐性変異を含んだ保存配列が、DNA切断-再結合反応と関係していることを示唆する。

本章では、野生型と *acrB* 変異型 GyrB サブユニットの両方に Glu⁴⁴⁷ 変異を導入し、キノロン薬（オキシリン酸）阻害における *acrB* 変異の関与について検討した。オキシリン酸存在下において、Gyrase(A+B^{*acrB*}-Glu⁴⁴⁷)と Gyrase(A+B^{Glu⁴⁴⁷})との間、また Gyrase(A+B^{*acrB*})と Gyrase(A+B)との間に感受性の違いは見られなかった(図21)。さらに、Glu⁴⁴⁷ 変異は薬剤の非存在下の状態で、DNA結合能に影響は示さなかった(図23)。これらの結果は、*acrB* 変異と Glu⁴⁴⁷ 変異を含む領域が、各々の役割において互いに直接関係していないことを示している。Gyraseは酵素反応の初期の段階でDNAと結合するが、DNA切断-再結合の反応はGyrase-DNA複合体形成の後に起こるため、この2つの反応は別々に起こることが考えられるからである。さらに、これらの結果は GyrB サブユニット内に *acrB* 変異を含む C-TERM 領域が挿入配列によって、Glu⁴⁴⁷ 変異領域と構造的に独立していることと一致する(図19)。

これまで述べたように、キノロン薬はGyrase-DNA複合体に結合することによって、その酵素反応を抑える。Dobbsらはキノロン薬が、切断したDNAを蓄積させると報告している(52)。本実験においてオキシリン酸はGyrase(A+B)とGyrase(A+B^{Glu⁴⁴⁷})のDNA結合には影響を示さなかった(図25,26)。それは切断されたDNAとの複合体は、通常のGyrase-DNA複合体と重なり、ゲルシフトアッセイでは同じ位置に示されたためと考えられる。これに対して Gyrase(A+B^{*acrB*}-Glu⁴⁴⁷)は通常のDNA結合が著しく低下しているため、オキシリン酸によるGyrase-DNA複合体の蓄積がはっきりと観察され(図26)、オキシリン酸耐性であることが示された(図21)。これらの結果、キノロン薬が酵素反応の阻害なしに Gyrase(A+B^{*acrB*}-Glu⁴⁴⁷)-DNA複合体を安定させることを示している。したがって、オキシリン酸はGyrase-DNA複合体と結合しその複合体を

安定化するが、少なくとも複合体の一部分に非切断DNA鎖を含む可能性があると考えられる。最近CritchlowとMaxwell(53)は、GyrAサブユニットのTyr¹²²の活性部位をSerまたはPheによって変換し、DNA切断能のないGyraseを作成した。このDNA切断能力を失ったGyraseとDNAの複合体にもキノロン薬が結合することから、Gyrase-DNA複合体へのキノロン薬結合にDNAの切断が必ずしも必要ではないことが明らかとなった。彼等はまた、GyrAサブユニットのDNAラッピング領域（C末端領域）を欠失したGyrA⁶⁴(Ser¹²²)のGyraseとDNA結合は通常の状態下では低下するが、キノロン薬の存在下では増加することを示した(53)。彼等の結果は、本実験結果と一致した。彼等はキノロン薬が切断したDNAよりむしろ、Gyrase-DNA複合体の特異的な構造を認識すると考察している。

予期せぬ結果であったが、スーパーコイリングアッセイにおいて、Gyrase(A+B^{Glu447})はアクリフラビン感受性を増加することが示された(図22)。この増加傾向は、GyraseのDNA結合が低下するGyrase(A+B^{acrB})においては観察されなかった。すでに述べたように、アクリフラビンはDNAへのインターカレーション剤として知られておりDNAの構造を変化させる。Gyrase活性阻害における機構の解明はまだ明確ではないが、アクリフラビンの主な効果の一つはDNA結合を阻害することである(50)。このことから、アクリフラビン存在下でGyrase(A+B^{Glu447})のDNA結合能を調べた。二重変異であるGyrase(A+B^{acrB-Glu447})は、スーパーコイリング活性と同様にDNA結合のアクリフラビンへの感受性は高くなっていることが示された(図24)。DNA結合阻害におけるID₅₀値は、スーパーコイリング活性阻害におけるID₅₀とほぼ等しかった。Gyrase(A+B^{acrB-Glu447})のスーパーコイリング活性のアクリフラビン高感受性の原因は、DNA結合における感受性の増加によって決定されていると考えられる。これらの結果から、*acrB*変異部位と同様にGlu⁴⁴⁷部位もまたDNA結合に関係していると考えられる。しかしながら、スーパーコイリング

アッセイにおいてGyrase(A+B^{Glu447})は、アクリフラビン感受性が同じく増加しているにもかかわらず、アクリフラビンに対するDNA結合能の感受性は野生型に対して変化がなかった(図24)。この結果は、Gyrase(A+B^{Glu447})のDNA結合能で示されるアクリフラビン高感受性となる部分を見るためには*acrB*変異の存在が必要であることが考えられる。このような現象はキノロン薬によるGyrase-DNA複合体の安定化を調べた際、*acrB*変異がないと複合体の安定化が観察できなかったことと類似している。つまり、*acrB*変異領域がないとGlu⁴⁴⁷変異部位が関与するDNA結合が検出できないということである。さらに、これらの結果はDNA結合に関して、2段階の結合様式が存在することを示している。一つは*acrB*変異領域が関与するものであり、もう一方はGlu⁴⁴⁷変異領域が関与するものである。Gyrase(A+B^{Glu447})において、Glu⁴⁴⁷変異部位と関係したDNA結合を検出するには*acrB*変異領域の存在が必須なものと考えられるからである。Glu⁴⁴⁷変異領域はおそらく、DNA切断-再結合段階に関与する特異的なDNA結合に関係しているものと考えられる。

キノロン薬結合部位はGyrase-DNA複合体の形成時に出現することが示唆されており、この部位へのキノロン薬の結合がGyrase活性を阻害することが知られている(52)。YoshidaらはGyrAとGyrBの各サブユニット上でキノロン薬耐性変異をもつ様々なGyraseのキノロン薬感受性を調べた。これらGyraseの各々の感受性はキノロン薬の化学構造式に関連をもち、さらに、低濃度条件下でキノロン薬の一種であるエノキサシンとGyraseとの結合定数が、Gyraseのエノキサシン感受性と対応していた。これらの結果から、彼等はDNA切断-再結合反応の間に、キノロン薬と特異的に結合するキノロンポケットがGyrase-DNA複合体に出現すること、また、キノロン薬の親和性はGyrAとGyrBサブユニット両者によって決定されていると考察している。これはGyrA、GyrBの両サブユニットにあるキノロン薬耐性変異を含む領域がキノロンポケットを構成する構造体の一部であることを示す。本章の実験結果か

ら、GyrBサブユニットのキノロン薬耐性変異領域が、*acrB*変異をもつC-TERM領域（図5）とは独立したDNA結合に関係していることが示された。このことは本来、各サブユニットにおけるキノロン薬耐性変異領域が、DNA切断-再結合反応の段階で、DNA結合に関与する機能領域の一部であることを示唆する。つまり、キノロン薬はGyraseの各サブユニットの機能領域とDNAが作る特異的な構造を認識して結合する可能性があることが考えられる。この可能性をさらに検討するために、第3節において、キノロン薬耐性変異(Asp \Rightarrow Asn⁸⁷)を含むGyrAサブユニットを調製し、スーパーコイリング活性でアクリフラビンの効果について調べた。Gyrase(A^{Asn87}+B)と Gyrase(A^{Asn87}+B^{acrB})の両再構成Gyraseは、GyrB^{Glu447}サブユニットを含むGyraseと同様にアクリフラビン感受性が増加した(図30)。これらの結果は、GyrBサブユニットのGlu⁴⁴⁷部位を含む領域と、GyrAサブユニットのAsn⁸⁷部位を含む領域に存在する保存配列が、どちらもDNA結合に関与していることを示唆するものである。そして、DNAとGyraseとの結合によって出現する構造が、キノロン薬によって認識されることが考えられる。また、このキノロン薬耐性変異領域が関与するDNAの認識は、GyraseとDNAが第一段階の結合過程を経て、次のDNA切断-再結合の段階に特異的であることが示唆される。しかしながら、Topoisomerase IIの結晶構造解析結果では、GyrBサブユニットのキノロン薬耐性変異領域が、活性部位であるチロシン(Tyr¹²²)やCAP様ドメインから離れた場所に位置している(47)。このことから、DNAと各サブユニットのキノロン薬耐性変異部位がつくる小さなポケットは、GyraseのDNA結合開始の段階（第一段階）でおこる大きな構造変化の結果、出現することが予想された。そしてその構造変化は、GyrBサブユニットの*acrB*変異領域を含むC-TERM領域が関与していることが考えられる。

「総合考察」

*acrB*変異はGyraseを構成するBサブユニットのC末端領域に2ヶ所の塩基置換変異であった。大腸菌以外の細菌のGyraseや真核生物(酵母)のTopoisomerase IIとの相同性を比較検討した結果、GyrBサブユニットのSer⁷⁵⁹-Arg⁷⁶⁰配列の760番目のArgは、特に良く保存されているアミノ酸であることがわかった。このことから、この領域が不可欠なものであることが考えられる。また、C-TERM領域(BサブユニットのC末端領域)の構造について考察すると、Topoisomerase IIの結晶構造解析、およびタンパク質分解酵素に対する感受性を調べた報告から、この部分が酵素反応中に、タンパク質の構造変化を支えるちょうつがいの的な構造様式をとっていることが示唆された。また、この領域はGyraseとDNAの結合時の初期段階で、Gyrase自身の構造変化によって、DNA鎖を誘導させるための領域ではないかと考えられた。

*acrB*変異によるアクリフラビン感受性上昇は、アクリフラビンのDNA鎖に対する作用機作を考慮すると理解が深まった。つまり、*acrB*変異をもつGyraseは、DNAに対する結合能力が著しく低下し、これが原因で酵素活性が低下し、結果的に*acrB*変異株はアクリフラビン感受性を示したと考えられる。

次に*acrB*変異領域とキノロン薬耐性変異領域の関係について調べた。作成したキノロン薬耐性変異を含むGyraseは、オキシリン酸とアクリフラビンに対する感受性において、*acrB*変異の影響を受けなかった。しかし、DNA結合におけるアクリフラビン高感受性は、*acrB*変異によって通常のDNA結合が低下した条件でのみ観察された。これらの結果から、GyraseとDNAとの結合には2つの段階の存在が予想された。最初の基質DNAと結合をおこなう段階(DNAの誘導を含む)では*acrB*変異領域が関与し、その次におこるDNA切断-再結合過程における特異的なDNA結合の段階には、キノロン薬耐性変異領域が関与していると考えられた。さらに、この双方の領域は互いに依存してい

るのではなく、独立に機能している領域であると考えられる。このことはC-TERM領域がタンパク質構造上、独立した領域であることと一致する。

最後に、本研究において得られた重要な成果をまとめる。一つはC-TERM領域がDNA結合に関与するということである。Gyraseを構成するGyrBサブユニットのC末端領域の役割については、これまでこの領域のちょうつがい構造によってGyraseの構造変化が生じること、およびGyrAサブユニットとの結合に関与することが報告されていた。本論文が示したこの領域がDNA結合に関与するという知見はまったく新規なものである。もう一つの重要な知見はGyrA、GyrBサブユニットに存在するキノロン薬耐性変異領域が協調してDNA結合に関わり、協調して出現した構造がキノロン薬に認識されるというものである。

今後、GyraseやTopoisomerase IIに関して構造学的な側面から詳細な機能解明がおこなわれ、著者の提起したこれらの概念の正当性が明らかになっていくことを期待する。

「引用文献」

1. D. F. Bradley and M. K. Wolf (1959) Aggregation of dyes bound to polyanions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **45**, 944-948
2. L. S. Lerman (1964) Asridine mutagen and DNA structure. *Journal of Celluler and Comparative Physiology* **64** supplement 1, 1-18
3. R. K. Tubbs, W. E. Ditmars and J. Q. Van Winkle (1964) Heterogeneity of the interaction of DNA with acriflavine. *J. Mol. Biol.* **9**, 545-557
4. Nakamura, H. (1965) Gene-controlled resistance to acriflavine and other basic dyes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **90**, 8-14
5. Nakamura, H., Hachiya, N., and Tojo, T (1978) Second acriflavine sensitivity mutation, *acrB*, in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **134**, 1184-1187
6. Nakamura, H. (1979) Novel acriflavine resistance gene, *acrC* and *acrD* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **139**, 8-12
7. Nakamura, H. and Okada, N. (1989) Genetic determination of extreme resistance to acriflavine in *Escherichia coli* K12. *Mem. Konan. Univ. Sci. Ser.* **36**, 83-88
8. Nakamura, H. (1968) Genetic determination of resistance to acriflavine, phenethyl alcohol and sodium dodecyl sulfate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **96**, 987-996
9. Nakamura, H. (1967) Phenethyl alcohol sensitivity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **93**, 1183-1184
10. Hase, A., Funatsuki, K., Kawakami, M., and Nakamura, H. (1990) Increased resistance to acriflavine by amplification of the *acrA* gene of *Escherichia coil* K-12. *Plant cell Physiol.* **31**, 1053-1057
11. Funatsuki, K., Hase, A., and Nakamura, H. (1992) Biological action of acridines. IV. Disappearance of a membrane protein by the *acrA* mutation in *Escherichia coil*. *Mem. Konan. univ. Sci. Ser.* **39**, 37-47
12. Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., and Hearst, J. E. (1993) Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* gene of

- Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 6299-6313
13. Klein, J. R., Henrich, B., and Plapp, R. (1991) Molecular analysis and nucleotide sequence of the *envCD* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 230-240
 14. Hansen, I. G. and von Meyenburg, K. (1979) Characterization of the *dnaA*, *gyrB* and other genes in the *dnaA* region of the *Escherichia coli* chromosome on specialized transducing phages λ tna. *Mol. Gen. Genet.* **175**, 135-144
 15. Backmann, B.J. (1983) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiol Rev.* **47**, 180-230
 16. Cozzarelli, N. R. (1980) DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **207**, 953-960
 17. Gellert, M. (1981) DNA topoisomerase. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 879-910
 18. Maxwell, A. and Gellert, M. (1986) Mechanistic aspects of DNA topoisomerases. *Adv. Prot. chem.* **38**, 69-107
 19. Reece, R. J. and Maxwell, A. (1991) DNA gyrase: structure and function. *CRC. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**, 335-375
 20. Kirchhausen, T., Wang, J. C. and Harrison, S. C. (1985) DNA gyrase and its complexes with DNA: direct observation by electron microscopy. *Cell* **41**, 933-943
 21. Wigley, D. B., Davies, G. J., Dodson, E. J., Maxwell, A., and Dodson, G. (1991) Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* **351**, 654-629
 22. Brown, P.O., Peebles, C. L., and Cozzarelli, N. R. (1979) A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 6110-6119
 23. Gellert, M., Fisher, L. M. and O'Dea, M. H. (1979) DNA gyrase: purification and catalytic properties of a fragment of gyrase B protein. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 6289-6293
 24. Price, J. R. (1949) Alkaloids of the Australian Rutaceae, *Melicope fareana*. *Australiam J. Sci. Res.* **2A**, 272-281

25. Yoshida, H., Bogai, M., Nakamura, M., and Nakamura, S. (1990) Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coil*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1271-1272
26. Yamagishi, J., Furutani, Y., Inoue, S., Ohue, T., Nakamura, S., and Shimizu, M. (1981) New nalidixic acid resistance mutations related to deoxyribonucleic acid gyrase activity. *J. Bacteriol.* **148**, 450-458
27. Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaki, M., Ito, H., Kojima, T., Hattori, H., and Nakamura, S. (1993) Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coil* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **37**, 839-845
28. Yamagishi, J., Yoshida, H., Yamayoshi, M., and Nakamura, S. (1986) Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coil*. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 367-373
29. Cosloy, S. D., and Oishi, M. (1973) The nature of the transformation process in *Escherichia coil* K12. *Mol. Gen. Genet.* **124**, 1-10
30. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coil* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
31. Adachi, T., Mizuuchi, M., Robinson, E. A., Appella, E., O'Dea, M. H., Gellert, M., and Mizuuchi, K. (1987) DNA sequence of the *E.coli*. *gyrB* gene: application of a new sequencing strategy. *Nucleic Acids Res.* **15**, 771-784
32. Watt, P. M., and Hickson, D. (1994) Structure and function of type II DNA topoisomerase. *Biochem. J.* **303**, 681-695
33. Wyckoff, E., Natalie, D., Nolan, J. M., Lee, M., and Hsieh, T. (1989) Structure of the *Drosophila* DNA topoisomerase II gene. Nucleotide sequence and homology among topoisomerases II. *J. Mol. Biol.* **205**, 1-13
34. Mizuuchi, K., Mizuuchi, M., O'Dea, M. H., and Gellert, M. (1984) Cloning and simplified purification of *Escherichia coil* DNA gyrase A and B proteins. *J. Biol. Chem.* **259**, 9199-9201
35. Staudenbauer, W. L., and Orr, E. (1981) DNA gyrase: affinity chromatography on

- novobiocin-sepharose and catalytic properties. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3589-3603
36. Donald, B. S., and Kevin, S. J. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40
37. Otter, R., and Cozzarelli, N. R. (1983) [11] *Escherichia coli* DNA gyrase. *Academic Press, Inc.* in *Methods Enzymol* **100** (pp171-180)
38. Taylor, M. W., Hershey, H. V., Levine, R. A., Coy, K., and Olivelle, S. (1981) Improved method of resolving nucleotides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **219**, 133-139
39. Fisher, L.M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., Ohmori, H., and Gellert, M. (1981) Site-specific interaction of DNA gyrase with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 4165-4169
40. Bachellier, S., Saurin, W., Perrin, D., Hofnung, M., and Gilson, E. (1994) Structural and functional diversity among bacterial interspersed mosaic elements (BIMES) *Mol. Microbiol.* **12**, 61-70
41. Gellert, M., O'Dea, M. H., Itoh, T., and Tomizawa, J. (1976) Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 4474-4478.
42. Contreras, A., and Maxwell, A. (1992) *gyrB* mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **6**, 1617-1624
43. Yoshida, H., Kojima, T., Yamagishi, J., and Nakamura, S. (1988) Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **211**, 1-7
44. Peng, H., and Marians, K, J. (1993) *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J. Biol. Chem.* **268**, 24481-24490
45. Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C., and Wang, J. C. (1996) Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* **379**, 225-232

46. Lindsley, J. E., and Wang, J. C. (1991) Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10485-10489
47. Berger, J. M., and Wang, J. C. (1996) Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 84-90
48. Peng, H., and Marians, K. J. (1995) The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. *J. Biol. Chem.* **270**, 25286-25290
49. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1992) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132
50. Funatsuki, K., Tanaka, R., Inagaki, S., Konno, H., Katoh, K., and Nakamura, H. (1997) *acrB* mutation located at carboxy-terminal region of gyrase B subunit reduces DNA binding of DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* **272**, 13302-13308
51. Morais Cabral J. H., Jackson A. P., Smith C. V., Shikotra N., Maxwell A., and Liddington R. C., (1997) Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature*, **388**, 903-906
52. Dobbs, S. T., Cullis, P. M., and Maxwell, A. (1992) The cleavage of DNA at phosphorothioate internucleotidic linkages by DNA gyrase. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3567-3573
53. Critchlow, S. E., and Maxwell, A. (1996) DNA cleavage is not required for the binding of quinolone drugs to the DNA gyrase-DNA complex. *Biochemistry* **35**, 7387-7393

「謝辞」

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻、御校閲を賜りました甲南大学理学部生物学科 中村運教授に心から感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始有意義な御教示と御校閲を賜りました塩野義製薬株式会社創薬第二研究所、加藤研治博士、稲垣秀一郎博士、田中玲爾博士に心から感謝申し上げます。さらに数々の御協力を頂きました同研究所細胞情報部門分子生物IIグループの皆様にも心から感謝申し上げます。

最後に、本研究の機会を与えて頂きました塩野義製薬株式会社渉外企画部長兼油日ラボラトリーズ長、武田禮二博士、前油日ラボラトリーズ長、林幸之博士ならびに前生物化学部門長、武内康義博士に心から感謝申し上げます。

「公表論文および口頭発表」

1. 公表論文リスト

副論文

- (1) Hase, A., Funatsuki, K., Kawakami, M., and Nakamura, H.
Increased resistance to acriflavine by amplification of the *acrA* gene of *Escherichia coli* K-12.
(1990, *Plant cell Physiol.* **31**, 1053-1057)
- (2) Nakamura, H., Hase, A., and Funatsuki, K.
Biological action of acridine compounds. I. Sensitivity of cell to the acridines.
(1990, *Mem. Konan Univ., Sci. Ser.*, **37** (2), 177-190)
- (3) Nakamura, H., Hase, A., and Funatsuki, K.
Biological action of acridine compounds. II. Cross-sensitivity and binding capacity to acriflavine of *Escherichia coli* K-12.
(1991, *Mem. Konan Univ., Sci. Ser.*, **38** (1), 53-63)
- (4) Nakamura, H., Hase, A., and Funatsuki, K.
Biological actions of acridines. III Effect of *acrA* mutation on stability of plasmid replication in *Escherichia coli*.
(1991, *Mem. Konan Univ., Sci. Ser.*, **38** (2), 131-144)
- (5) Funatsuki, K., Hase, A., and Nakamura, H.
Biological actions of acridines. IV Disappearance of a membrane protein by

the *acrA* mutation in *Escherichia coli*.

(1992, *Mem. Konan Univ., Sci. Ser.*, **39** (1), 37-47)

- (6) Funatsuki, K., Tanaka, R., Inagaki, S., Konno, H., Katoh, K., and Nakamura, H.

acrB mutation located at carboxy-terminal region of gyrase B subunit reduces DNA binding of DNA gyrase.

(1997, *J. Biol. Chem.* **272**, 13302-13308)

- (7) Funatsuki, K., Tanaka, R., Inagaki, S., Konno, H., Katoh, K., and Nakamura, H.

Quinolone-Resistant Mutations of DNA Gyrase Increase Sensitivity to Acriflavine.

(1998, *Biol. Pharm. Bull.* **21**, (7), in press.)

参考論文

- (1) Nabeta, K., Yamamoto, K., Hashimoto, M., Koshino, H., Tanaka, R., Funatsuki, K., and Katoh, K.

Biosynthesis of Kelsoene in Cultured Cells of Liverworts, *Ptychantus striatus*

(1998, *Chem. Commun.*, in press)

2. 口頭発表リスト

第55回 日本植物学会年会 (静岡) -1990-

細菌のDNAジャイレース変異株のアクリフラビン感受性

船附賢三¹⁾、長谷篤²⁾、小笠原豊、中村運³⁾ (1:塩野義製薬・油日ラボ、2:

大阪市立環科研、3:甲南大・理・生)

第56回 日本植物学会年会 (東京) -1991-

大腸菌細胞膜の*acrA*タンパク質はNa⁺ポンプである

船附賢三¹⁾、長谷篤²⁾、中村運³⁾ (1:塩野義製薬・油日ラボ、2:大阪市立環
科研、3:甲南大・理・生)

第57回 日本植物学会 (奈良) -1992-

大腸菌アクリフラビン感受性遺伝子*acrB*の構造と機能

船附賢三¹⁾、長谷篤²⁾、岡部恭子、中村運³⁾ (1:塩野義製薬・油日ラボ、2:
大阪市立環科研、3:甲南大・理・生)

第16回 日本分子生物学会年会 (幕張) -1993-

大腸菌K12株における*acrB*遺伝子のアクリフラビン耐性支配について

船附賢三、田中玲爾、加藤研治¹⁾、中村運²⁾ (1:塩野義製薬・油日ラボ、2:
甲南大・理・生)

第17回 日本分子生物学会年会 (神戸) -1994-

アクリフラビン耐性を支配する大腸菌K12株の*gyrB(acrB)*タンパク質の特性

船附賢三、田中玲爾、加藤研治¹⁾、中村運²⁾ (1:塩野義製薬・油日ラボ、2:
甲南大・理・生)

日本薬学会第116年会 (金沢) -1996-

DNAジャイレースのBサブユニットのC末端領域に位置するアクリフラビン

感受性突然変異(*acrB*)はジャイレースのDNA結合を減少させる

船附賢三、田中玲爾、加藤研治¹⁾、今野晴義²⁾、中村運³⁾ (1:塩野義製薬・
油日ラボ、2:岡山大・資生研、3:甲南大・理・生)

第19回 日本分子生物学会年会 (札幌) -1996-

DNA gyraseにおける*acrB*変異の役割とキノロン耐性決定領域の関係について

船附賢三、田中玲爾、加藤研治¹⁾、中村運²⁾、(1:塩野義製薬・油日ラボ、2:甲南大・理・生)

「付録」

1. 副論文
2. 参考論文

