

非相同的組換えにおけるDNA複製因子の役割

山下 照仁

①

目次

非相同的組換えにおける
DNA複製因子の役割

山下 照仁

目次

<はじめに>

第1章 序論

- 1-1 DNAの組換えについて
- 1-2 非相同期組換えとDNA複製の関係 (本研究の動機)
- 1-3 DNA複製について

第2章 紫外線照射によって誘導される非相同期組換え

- 2-1 実験結果
- 2-1-0 非相同期組換えの検出系
- 2-1-1 Spi-ファージの形成頻度を与えるDNA複製の影響
- 2-1-2 正常な切り出しを抑制する変異を導入した株での、Spi-ファージの形成頻度を与えるDNA複製の影響
- 2-1-3 ファージの生育に対してdnaB変異が与える影響
- 2-1-4 組換え型ファージの組換え部位の分布
- 2-1-5 組換え型ファージの組換え部位の塩基配列の解析
- 2-2 考察

第3章 DNA gyraseに依存する非相同期組換え

- 3-1 実験結果
- 3-1-1 Spi-ファージの形成頻度を与えるDNA複製の影響
- 3-1-2 正常な切り出しを抑制する変異を導入した株での、Spi-ファージの形成頻度を与えるDNA複製の影響
- 3-1-3 組換え型ファージの組換え部位の分布
- 3-1-4 組換え型ファージの組換え部位の塩基配列の解析
- 3-2 考察

第4章 DnaB蛋白の過剰発現による非相同期組換えの誘発現象の発見

- 4-1 実験結果
- 4-1-1 Spi-ファージの形成頻度を与える影響
- 4-1-2 ラムダファージの自然誘発に与える影響
- 4-1-3 非相同期組換えに対するRecA蛋白の関与
- 4-1-4 組換え型ファージの組換え部位の分布
- 4-1-5 組換え型ファージの組換え部位の塩基配列の解析
- 4-2 考察

第5章 その他の複製関連因子

- 5-1 DnaA
- 5-2 DnaC
- 5-3 DNA ligase
- 5-4 λ O

第6章 結論

第7章 実験材料及び実験方法

- 7-1 実験材料 (大腸菌株・プラスミド・ファージ株)
- 7-2 Spi-アッセイ
- 7-3 シングルバースト法
- 7-4 ファージ粒子を鋳型としたPCR法
- 7-5 組換え部位の分布の及び塩基配列の決定
- 7-6 ラムダファージの自然誘発の測定
- 7-7 ラムダファージの一段増殖
- 7-8 大腸菌の形質転換

<謝辞>

<参考文献>

<はじめに>

私は次に挙げる2つの目的を持って本研究に取り組んだ。

その目的の一つは、病気の原因を知りたい、そしてその疾患を治療したいという事である。現在では細菌やウイルスなどによる外因性の疾患がワクチンや抗生物質によって制圧されてきている。それに反比例して内因性の病気が台頭してきた。自分の体の中にある原因、つまり病因遺伝子がその大きな割合を占めてきていると考えられる。たとえば癌を例に挙げると、癌の最初の細胞は必ず自分の体の中の一つの細胞であり、その細胞の増殖が変化すること、つまり遺伝子に変化が起きて異常増殖することが原因の一つであることは疑いない。このような遺伝子の変化を引き起こす原因として染色体異常があげられる。染色体異常は、欠失、逆位、重複、転座などによって遺伝子の機能の変化を引き起こしている。染色体異常（ここであげる染色体異常は、ダウン症などに見られる染色体の本数の増減ではなく、ある染色体の中に注目して変化が起きているようなもの例えばハンチントン病のような遺伝病に見られるものを指す）が起こる分子的機構については未知な部分がほとんどであるが、染色体の組換わった部分の解析から非相長的組換えがその形成に深く関わっていると考えられている。

目的のもう一つとして、我々生物がどこから生まれどのように進化していくかを知りたいという事である。我々を取り巻く生物界には多種多様な生き物たちが生死を繰り返している。生き物の本質は「生きること」であり、その種の繁栄のためにあれこれ試みて進化を繰り返してきた。結果として多様な生物界ができた。一個体として増殖するには、自分と同じものを作る「自己複製」つまり正確な複製さえすればよいが、生き物としての個体は普遍であるが多様で個別的で「自己創出」な存在である。大腸菌からヒトまで遺伝子は普遍なものを共有しているのに、明らかに異なる生き物と見えるのは、各生物がそれぞれに特有な遺伝子のセット(genome)を持っていて、そのgenomeの多様性が生物の多様性をもたらしているからである。生物が進化する過程でgenomeの改変を繰り返してきたことは疑いのないことであり、分子レベルでDNAの組換え、特に非相長的組換えが原動力となって働いてきたと考えられる。

私は非相長的組換えに関わる因子を同定しそれが持つ機能を解析する事によって、上に挙げた目的を多少なりとも達成できると考えている。

この本の趣意について

この本は、日本の経済発展と、その背景にある社会文化の変遷を、歴史的な視点から探ることを目的として書かれた。戦後、日本は驚異的なスピードで経済成長を遂げ、先進国の一列に数えられるようになった。しかし、その背後には、戦前からの社会制度や価値観の転換、そして戦時体制からの脱却といった大きな変革があった。本書は、そうした変革の過程を、経済学だけでなく、社会学や文化研究の視点から掘り下げる。読者は、日本の経済的成功の裏面に隠れた社会の動きや、人々の生活意識の変化を、より深く理解することができるだろう。

第1章

序論

序論として、本書の目的と、その対象とする範囲を明らかにする。本書は、戦後日本の経済発展を、戦前からの社会文化の背景と照らし合わせて考察する。特に、戦時体制からの脱却と、戦後民主主義の確立が、日本の経済発展にどのような影響を与えたのかを、詳しく分析する。また、戦後の高度経済成長期における、社会文化の急激な変化と、その経済発展との関係についても、掘り下げる。読者は、日本の経済的成功の裏面に隠れた社会の動きや、人々の生活意識の変化を、より深く理解することができるだろう。

本書の構成は、序論、第1章から第5章までである。序論では、本書の目的と、その対象とする範囲を明らかにする。第1章では、戦前からの社会文化の背景を、詳しく分析する。第2章では、戦時体制からの脱却と、戦後民主主義の確立が、日本の経済発展にどのような影響を与えたのかを、詳しく分析する。第3章では、戦後の高度経済成長期における、社会文化の急激な変化と、その経済発展との関係についても、掘り下げる。第4章では、戦後の高度経済成長期における、社会文化の急激な変化と、その経済発展との関係についても、掘り下げる。第5章では、戦後の高度経済成長期における、社会文化の急激な変化と、その経済発展との関係についても、掘り下げる。

本書の構成は、序論、第1章から第5章までである。序論では、本書の目的と、その対象とする範囲を明らかにする。第1章では、戦前からの社会文化の背景を、詳しく分析する。第2章では、戦時体制からの脱却と、戦後民主主義の確立が、日本の経済発展にどのような影響を与えたのかを、詳しく分析する。第3章では、戦後の高度経済成長期における、社会文化の急激な変化と、その経済発展との関係についても、掘り下げる。第4章では、戦後の高度経済成長期における、社会文化の急激な変化と、その経済発展との関係についても、掘り下げる。第5章では、戦後の高度経済成長期における、社会文化の急激な変化と、その経済発展との関係についても、掘り下げる。

1-1

DNAの組換えについて

DNAの組換えは普遍的組換え(*general recombination*)と非正統的組換え(*illegitimate recombination*)、さらに部位特異的組換え(*site-specific recombination*)に大別される。普遍的組換えは相同的組換え(*homologous recombination*)とも呼ばれ、組換えが生じる二つのDNA間に長い相同性が必要である。完全な相同性を持つ部位間で相同的組換えが生じると、その組換え体は見かけ上もとの部位と変わらない。細菌では、接合によって移行した遺伝子を受容菌が染色体上に取り込む際に相同的組換えを用いている。大腸菌においてはRecA蛋白がその中心的役割を担っており、さらにRecBCD蛋白によって、ほぼすべての相同的組換えを行っている。真核生物では減数分裂の際に相同染色体間で高頻度に相同的組換えが起こっており、その機構の解析の格好の材料となっている。特に近年大腸菌RecA蛋白の相同蛋白が高等真核生物で次々に同定され、その生化学的遺伝学的解析が待たれる所となっている。部位特異的組換えは、特定のDNA配列が特定の因子によって認識されて生じる組換えのことを指し、トランスポソンの転移や、ラムダファージDNAが大腸菌ゲノム上に挿入されたり切り出されたりする現象があげられる。非正統的組換えは、相同性のない二つのDNA間、あるいは相同性が非常に短いDNA間で生じる組換えを指す。この様な性質から、一般的に非相同的組換え(*non-homologous recombination*)と呼ばれる。

非相同的組換えは非常に稀に起こるため、またその組換え部位が限定されていないため、その検出は困難である。しかし、ラムダファージがその大腸菌のゲノムの一部を含む現象(形質導入ファージの形成)が観察されており、これは非相同的組換えによって説明されている。

非相同的組換えはその非特異性を特徴とし、染色体DNAの至る所で組換えを起こす可能性を含んでいる。実際、染色体の欠失、逆位、重複、転座などは長い相同性を持たないところで起こっており、その結果、染色体構造の大きな変化が生じる。我々高等真核生物に見られる癌や遺伝子疾患のいくつかは染色体異常を伴っており、欠失や転座によって起こ

る遺伝子産物の変化が原因であると近年明らかにされた。しかし、その組換え現象がどのような機構によって起こっているのかは、未知である。

非相同時的組換えとDNA複製の関係（本研究の動機）

生物が増えるためには自己を複製しなくてはならない。特に遺伝情報の複製は必須であり、DNA複製の機構は全生物に普遍的に存在している。大腸菌の染色体DNAの複製に直接関与するのはDNA polymerase IIIホロ酵素である。この酵素は約 10^{-4} /塩基対の頻度で誤った塩基対形成（ミスベア）をすることが*in vitro*のDNA合成系などの研究から推定されている(Sloane et al., 1988)。単純にDNA合成が行われると、自然突然変異の発生頻度よりも10万倍以上もエラーが生じる計算になる。また、重複や欠失などの変異も、ミスベアによる塩基置換の1/10~1/100の頻度で誘発される。大腸菌で見られる染色体上の突然変異の解析によって、これらミスベアによる変異は順向きや逆向きの反復配列の部分に片寄って発生していることがわかっている。これらの変異を引き起こす複製エラーは、DNAポリメラーゼがDNA合成の際に鋳型上をスリップして反復配列間で鋳型の乗り換えによって生じると考えられている。また、発ガンや遺伝病での変異でも、サテライト配列や反復配列での欠失や重複によるものも見いだされており(Holt et al., 1989; Kornreich et al., 1990; Palena et al., 1994)、大腸菌のみならず、真核生物でもDNA複製エラーによる変異の可能性がある。

生体内ではDNAポリメラーゼによる複製エラーの99.99%はその酵素自身に備わっている校正機能によって、具体的には形成されたミスベアを3'→5'エキソヌクレアーゼの作用によって取り除く(Brenowitz et al., 1991)。さらに除去しきれなかったミスベアはミスマッチ修復系によって修正される(reviewed in Modrich, 1991)。このような機能により*in vivo*では塩基置換の起こる頻度が約 10^{-10} /塩基対/細胞分裂といったごく低い頻度に押さえられている。

ところで、大腸菌が染色体DNAを合成する速度は、毎秒500~1000塩基対と言われている(Chandler et al., 1975)。欠失する範囲が数千塩基対であれば、わずかな時間に進んだDNAポリメラーゼがその反復配列間でスリップすることは想像できるかもしれない。しかし、50キロ塩基対に及ぶ欠失はどうだろう。あるいは異なる染色体間での転座はど

うだろう。このような大きな領域を含む欠失や転座した部分が反復配列の塩基配列を残していることから、DNAポリメラーゼのスリップではなく、短い相同性を利用した非相同的組換えの機構によって形成されたと考える方が理にかなっている。

Yamaguchiらは、紫外線照射によって誘発される非相同的組換えによって形成した組換え体の組換え部位周辺に、順向き反復配列が多く存在することを見いだした(Yamaguchi *et al.*, 1995)。そこで、上述したDNA複製酵素が潜在的に持つミスベアリングする性質から、DNA複製が反復配列上で起こすスリップによって、非相同的組換えが誘導されるモデルを提出した(図1-2)。(1)紫外線照射による染色体上の損傷がDNA複製の進行をブロックし、それによって順向き配列間のスリップが誘引され、(2)スリップによって生成した一本鎖DNAがループアウトして、(3)そのような高次構造を認識する酵素が切断する。(4)さらに複製フォークの解離が起こり単鎖DNA末端を露出した二重鎖切断が生成し、(5)それらがヘリケースやエキソヌクレアーゼによって剥がされたり削られたりして、短い相同性を利用した対合により組換え体を形成する。以上のDNA組換えのモデルでは、最初のステップでDNA複製のフォークが進行していることが必要と考えられる。

私は、非相同的組換えにDNA複製が与える影響を明らかにするために本研究を行った。

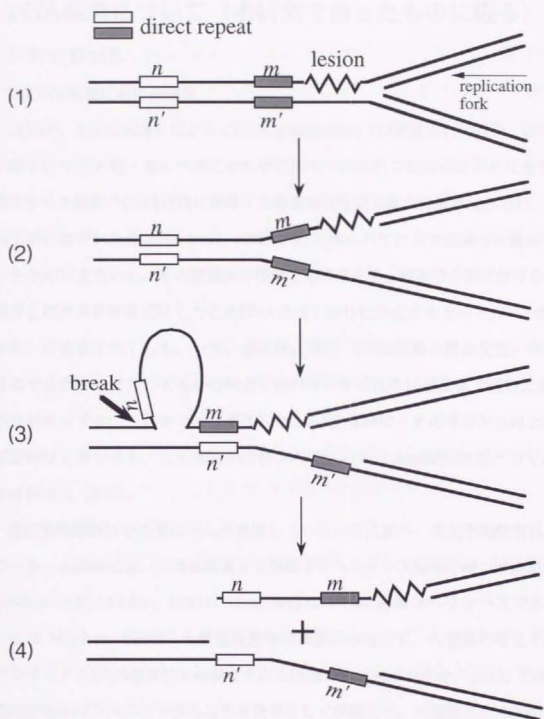


図 1-2

反復配列によって誘発される非相等的組換えのモデル

(Yamaguchi et al., 1995)

1-3

DNA複製について（本研究で扱ったものに限る）

1-3-1: DnaB

(A)DNA複製における知見

1956年、KornbergらによってDNA polymerase Iが発見されて以来、DNA複製に関わる因子は生化学的・遺伝学的にそれぞれ持ちつ持たれつ明らかにされてきた。1960年代後半から大腸菌のDNA合成に関与する温度感受性変異株の分離が試みられ、多数の*dna*遺伝子が同定された(Hirota *et al.*, 1968)。現在知られている大腸菌*dna*遺伝子について表1-3-1(A)にまとめた。その変異株の性質で即時停止型と遅延停止型に分けられている。即時停止型は非許容温度にしたときDNA合成が直ちに停止するもので、「DNA複製の伸長反応」が阻害されている。一方、遅延停止型は「DNA複製の開始反応」が阻害されているので非許容温度にしてもその時点で進行中の伸長反応は最後まで進むため徐々にDNA合成が停止する。これまでに分離された*dnaB*変異株は、その性質からほとんどの変異株が即時停止型であり、反応開始が阻害されているのは*dnaB252*ただ一つである(Zyskind and Smith, 1976)。

遺伝学的解析はその後ほとんど進展していないのに比べ、生化学的解析は飛躍的に進んでいる。大腸菌には、二重鎖塩基対を開裂するヘリケース活性を持つ酵素が10数種類ある(reviewed in Matson, 1991)。DnaB蛋白はDNAに必須なヘリケースであり(LeBowitz and McMacken, 1986)、大腸菌染色体の複製のみならず、大腸菌に寄生するファージやプラスミドのDNA複製にも必要とされる(Kornberg and Baker, 1991)。DnaB蛋白は分子量52kDaのサブユニットからなる6量体として精製され、大腸菌あたり20分子程度存在しているとその蛋白量から算出されている(Ueda *et al.*, 1978; Arai *et al.*, 1981)。その6量体は三回対称の環状構造をとっていることが電子顕微鏡の観察によって明らかになった(Stamford *et al.*, 1995)。ヘリケースとしての機能以外に細かく色々な活性が測定されている。Araiらによって、ATP結合能、単鎖DNA依存ATP加水分解活性、単鎖及び二重鎖

DNA結合能などを持っていることが明らかにされた。またDnaB蛋白は他の蛋白とも相互作用している。DnaC (Wickner and Hurwitz, 1975), DnaG primase (LeBowitz and McMacken, 1986), tau subunit in DNA polymerase III (Kim *et al.*, 1996), lambda phage-encoded P protein (Wickner, 1978), P1 phage-encoded Ban protein (Lanka *et al.*, 1978)などであり、相互作用しているいずれの蛋白も大腸菌染色体やファージのDNA複製に必須である。*in vitro*の活性や蛋白との相互作用に基づいて、NakayamaらはDnaB蛋白の部分分解によって活性ドメインを分類した；N末側の12kDaには、DnaCやDnaGさらにlambda Pとの相互作用部位があり、またヘリケース活性に必須である一方、C末側の33kDaには、leucine zipperが存在し、ATPやDNAとの結合やDnaB自身の相互作用をするのに必須である(Nakayama *et al.*, 1984; Biswas *et al.*, 1994)。

本研究で用いたdnaB変異株は、DNA複製の伸長反応を阻害するdnaB14変異株と、DNA複製の開始反応を阻害するdnaB252変異株である。dnaB252変異株は、299番目のグリシンがアスバラギンに置き換わっており、DnaC蛋白との相互作用に欠損がある(Saluja and Godson, 1995)。dnaB14変異株は本研究によってその変異部位が同定され、16番目のグルタミンがリジンに置き換わっている事がわかった。

(B)DNA組換えにおける知見

DNA組換えは主にRecA遺伝子産物に代表される相長的組換え過程を経て行われる(Clark and Margulies, 1965; Masukata *et al.*, 1983)。ところで組換え中間体が組換え体として完成するためには、新たに得た遺伝情報のDNAを複製して新生鎖を作り、失われた遺伝情報を補う必要がある。そのとき細胞内では、大腸菌の複製開始点oriCから開始される染色体全体のDNA複製(表1-3-1(B)、図1-3-1(B)に大腸菌のDNA複製に関与する蛋白を示す)とは区別される「DNA修復」や「相長的組換え」のためのDNA合成が行われる。また、通常のDNA複製の開始には蛋白合成を必要とするが、紫外線照射などでSOS誘導をかけたときには、蛋白合成を阻害してもDNA合成の再開始が起こる。この現象は一般のDNA複製と区別して誘導的安定DNA複製(iSDR: inducible stable DNA replication)と呼ばれる。このような組換えに伴うDNA複製には、DnaB、DnaC、DnaT、

DnaG、DNA polymerase III、DNA polymerase Iは共通して活用されるが、*oriC*と配列特異的に結合するDnaAは関与せずに、PriA、PriB、PriCが必要とされる(Asai *et al.*, 1994; Masai *et al.*, 1994; Kogoma *et al.*, 1996)。Kogomaらは、DNA複製の開始を伴う相長的組換えとして次のようなモデルを提出している(図1-3-1(A))。まず、相長的組換え反応過程の導入過程である単鎖DNA末端が相同性を持つ二重鎖DNAへRecAによって進入の後、その3'末端がDNA合成のプライマーとして働き、新たなreplisomeが形成されDNA複製が行われる(Asai *et al.*, 1994)。このような相長的組換えの複製過程におけるDNA合成にもDnaB蛋白は関与していると考えられる。

1-3-2: DnaA

大腸菌染色体のDNA複製開始に関与する。大腸菌染色体上の複製開始起点である*oriC*配列に20~30分子結合し、*oriC*周辺の二重鎖DNAを開裂させる(open complex)。*oriC*配列は複数の蛋白と複合体(Inisosome)を形成し、その中でDnaA蛋白による*oriC*の活性化が起こると考えられている(Bramhill and Kornberg, 1988)。その実体と形成の制御機構は明らかになりつつある。Jacobらによって提唱されたレプリコン仮説に当てはめれば、細胞内DnaA蛋白の分子数が*oriC*を開始点とする染色体複製の開始時期を制御していると考えられているが、過剰発現したり*oriC*を持ったプラスミドを導入したりすることで細胞内DnaA蛋白の濃度を増減しても開始時期は変わらないとも言われている(Xu and Bremer, 1988)。

このDnaA-DNA複合体によって開裂した一本鎖DNA上にDnaB-DnaC蛋白複合体が加わり、二本鎖DNAの開裂が固定され(prepriming complex)、続くDNAポリメラーゼによるDNA合成が始まる。

1-3-3: DnaC

DnaB蛋白と結合し、DNA複製の伸長と開始に関与している。複製開始点周辺で開裂した一本鎖DNAに、DnaB-DnaC複合体として侵入する。DnaBが一本鎖DNAを囲む様に6量体の環状分子になると解離し、DnaBの有する単鎖DNA依存ATP加水分解活性により、

二重鎖の開裂を開始する。

1-3-4: DNA ligase

DNA複製の際lagging鎖側には1キロから2キロ塩基対の岡崎fragmentが合成されるが、隣接したこれらのDNA断片を連結するのにligase活性が必要とされる。その変異株では多量の岡崎fragmentが細胞内に蓄積する(Okazaki *et al.*, 1979)。

1-3-5: DNA gyrase

DNA鎖を一時的に切断し再結合することによって、DNAのトポロジーを変化させる酵素をDNAトポイソメラーゼと呼ぶ。その反応様式によって、I型とII型に分けられる。I型は二本鎖DNAの一方の鎖を切断再結合し、II型はDNAの二本鎖を同時に切断再結合する活性を持つ。大腸菌においては、Top I、Top IIIが前者にあたり、DNA gyraseやTop IVは後者である。

DNA複製との関わり合いという点で述べると長い線状二本鎖DNAや閉環状の二本鎖DNAでは、DNA複製が進み二本鎖DNAの巻き戻しが進むにつれて、DNA分子の他の部分にひずみが生ずる。このひずみを解消するために自然と正の超らせんが複製フォークの前方に過剰に生ずる。トポイソメラーゼが超らせんを取り除くことが出来ることから、この酵素がDNA複製に関与していると考えられる(Gellert *et al.*, 1976)。また、複製の終了後に出来た二つの染色体DNAは数回の絡み合い(catenation)をしており、細胞分裂する時に両方の細胞に分離するためにもDNAトポイソメラーゼが必要と考えられている。

本研究で注目したDNA gyraseは大腸菌のII型トポイソメラーゼであり、DNA複製に必須である。DNAを切断して再結合する活性から、非相同的組換えに関与している可能性が考えられた。Ikedaらは、試験管内でDNA gyraseとファージDNA及びプラスミドDNAを反応させた後、組換え体を回収してその組換え部位を解析して、全く相同性を持たない部分同士での組換えが起こっていることを見いだした。これは(GyrA)₂(GyrB)₂のヘテロ4量体からなるDNA gyraseがそれぞれのサブユニット(GyrAGyrB)を交換することによって、形成され则认为られる(Ikeda *et al.*, 1982; Naito *et al.*, 1984)。生体内では、DNA

gyrase の温度感受性変異株を用いて組換えへの関与が検討されている(Kumagai and Ikeda, 1991; Shimizu *et al.*, 1995)。

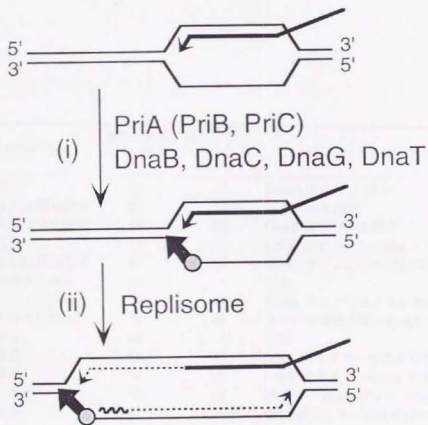
また、DNA gyrase 特異的阻害剤であるオキシソリン酸は、DNA gyrase が染色体DNA上で二重鎖切断を入れた状態で薬剤-蛋白DNA複合体を作る(cleavable complex)。この反応は可逆的であるが、高濃度で投与すると大腸菌は死んでしまう。適当な濃度で与えると、非相同期組換えを上昇させることがわかっている(Shimizu *et al.*, 1995)。また、後述するSpi-アッセイを利用して、Shimizuらは非相同期組換えを自然誘発するDNA gyrase の変異株を単離し(Shimizu *et al.*, 1997)、生体内でも直接非相同期組換えに関与していることを示している。

1-3-6: λ O蛋白

ラムダファージがコードする蛋白の一つで、 λ P蛋白とともに、ラムダDNAの複製に関与している。ラムダファージDNAが複製されるためには、ラムダDNA上の複製開始点 ori_{λ} 近傍で λ O蛋白の結合による二重鎖の開裂、そして λ P蛋白と大腸菌DnaBの複合体がさらに結合し、大腸菌のDNA polymerase III が加わる事が必要である(Alfano and McMacken, 1989)。 λ P蛋白はDnaB蛋白と相互作用することによって、複製開始の阻害を行っているが、熱などのショックによって発現する大腸菌のシャペロン蛋白(DnaK, DnaJ, GrpE)が λ P蛋白のフォールディングを変化させ、複製が開始される(Wegrzyn *et al.*, 1995)。 λ O蛋白は、大腸菌における $oriC$ /DnaAの関係に対応して、ラムダファージの複製に於いて ori_{λ} / λ Oの関係を持って複製の開始反応を制御していると考えられる。

タンパク質	遺伝子	分子量 (kDa)	機 能
DNA複製に必須なタンパク質			
DnaA タンパク	<i>dnaA</i>	52	複製開始, <i>oriC</i> 結合能
DNA ジャイレース			複製開始および終結, DNA の高次構造の変化
α サブユニット	<i>gyrA</i>	97	DNA 鎖切断, 再結合
β サブユニット	<i>gyrB</i>	90	ATPase
SSB タンパク	<i>ssb</i>	19	一本鎖 DNA 結合, 安定化
プライモラーゼ			ラギング鎖のプライミングと二本鎖 DNA の開裂
プライマーゼ	<i>dnaG</i>	66	プライマー合成
DnaB タンパク	<i>dnaB</i>	52	ヘリカーゼ
DnaC タンパク	<i>dnaC</i>	29	DnaB タンパクと結合
ι タンパク	<i>dnaI</i>	19	?
ν タンパク	?	14	?
ν' タンパク	?	76	ヘリカーゼ
ν'' タンパク	?	17	?
Pol III 酵素			DNA 鎖の伸長
α サブユニット	<i>dnaE</i>	132	DNA ポリメラーゼ
ε サブユニット	<i>dnaQ</i>	27	3'→5' エキソヌクレアーゼ
θ サブユニット	?	10	?
β サブユニット	<i>dnaN</i>	37	movable clamp, processivity
γ サブユニット	<i>dnaXZ</i>	52	γ-複合体 β サブユニットのプライマー-鋳型 DNA へ の転移・結合および活性化
δ サブユニット	?	35	
δ' サブユニット	?	33	
ε' サブユニット	?	15	
φ サブユニット	?	13	
τ サブユニット	<i>dnaXZ</i>	71	開始複合体の安定化, processivity
Pol I	<i>polA</i>	103	プライマーの除去, ギャップの修復
DNA リガーゼ	<i>lig</i>	74	DNA 鎖の連結
DNA合成への関与が示唆されているタンパク質			
RNA ポリメラーゼ			複製開始の調節
α サブユニット	<i>rpoA</i>	37	
β サブユニット	<i>rpoB</i>	150	
β' サブユニット	<i>rpoC</i>	160	
α' サブユニット	<i>rpoD</i>	82	
RNase H	<i>rnh</i>	18	複製開始の調節, プライマーの除去
DNA トポイソメラーゼ I	<i>topA</i>	105	複製開始の調節, DNA 高次構造の変化
HU タンパク	<i>hupA, B</i>	10	複製開始の調節, 二本鎖 DNA 結合
DNA アデニンメチラーゼ	<i>dam</i>	31	複製開始の調節, ミスマッチ修復
DnaK タンパク	<i>dnaK</i>	70	σファージ DNA 複製の開始調節
DnaJ タンパク	<i>dnaJ</i>	41	
Rep タンパク	<i>rep</i>	66	ヘリカーゼ
DNA ヘリカーゼ II	<i>uvrD</i>	82	ヘリカーゼ

表 1-3-1(A) 大腸菌DNA複製に関する蛋白



☒ 1-3-1(A)

DNAの複製の開始を伴う相同的組換えのモデル

(Cell 85 pp.625)

遺伝子	変異株の性質	遺伝子地図上の位置 (分)	遺伝子産物の分子量 (kDa)	精製遺伝子産物の性質
<i>dnaA</i>	開始阻害	83	52	DnaA-Box への結合
<i>dnaB</i>	伸長または開始阻害	92	52	ヘリカーゼ活性
<i>dnaC</i>	伸長または開始阻害	99	28	DnaB タンパクと結合
<i>dnaE</i>	伸長阻害	4	130	DNA ポリメラーゼIII α サブユニット
<i>dnaG</i>	伸長または開始阻害	67	66	岡崎フラグメントのRNAプライマー合成
<i>dnaI</i>	複製が徐々に停止	40	?	不明
<i>dnaJ</i>	複製が徐々に停止	0	41	DnaK タンパクとともに機能
<i>dnaK</i>	複製が徐々に停止	0	69	タンパク質複合体の形成に介在
<i>dnaL</i>	伸長阻害	28	?	不明
<i>dnaN</i>	伸長阻害	83	41	DNA ポリメラーゼIII β サブユニット
<i>dnaQ</i>	伸長阻害	5	28	DNA ポリメラーゼIII ϵ サブユニット
<i>dnaT</i>	終了に異常	99	19	γ タンパク, DnaGプライマーゼと複合体を形成 ⁴¹
<i>dnaZ</i> (X)	伸長阻害	11	71(57)	DNAポリメラーゼIII δ (γ)サブユニット ⁴²

表 1-3-1(B) 大腸菌 *dna* 遺伝子とその性質

第2章

紫外線照射によって誘導される 非相同的組換えの解析

紫外線照射によって非相動的組換えが誘発される。これは、紫外線の持つエネルギーによって形成されるピリミジンダイマーなどの二本鎖DNA上の損傷が直接の原因と考えられている。しかし、それが非相動的組換え体として完成するまでの過程は未知である。現在まで、*gyrA* (Shimizu *et al.*, 1995)、*recJ* (Ukita *et al.*, 1996)、*recQ* (Hanada *et al.*, 投稿中)、*hupA**hupB* (投稿準備中)、*fis*、*himA*、*himD* (Shanado *et al.*, 投稿中)などが非相動的組換えに関与する遺伝子群としてIkedaらのグループによって明らかにされてきた。

本研究では、紫外線照射で得られた非相動的組換え体の構造の特徴である顕著な順向き繰り返し配列に注目し、DNA複製の関与を検討した。

2-1

実験結果

2-1-0

非相同期組換えの検出系について

大腸菌に溶原化したラムダファージが誘発される際に生じる非相同期組換えを定量的に測定する系、Spi⁺アッセイを非相同期組換えの検出系として用いた(Ikeda *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1995)。

ラムダファージは宿主大腸菌に感染すると、その約48キログラム塩基対からなるDNAを大腸菌細胞内に注入する。線状で侵入したラムダDNAは環状化しいったん複製する。その一部のラムダDNAは大腸菌染色体上の*gal*遺伝子と*bio*遺伝子の間にある*attB*部位に、それと同一性を持つラムダDNA上の*attP*部位との部位特異的組換えによって組み込まれる(図2-1-00: Campbell, 1962)。こうしてラムダDNAが大腸菌染色体に組み込まれることをラムダファージの「溶原化」という。溶原化したラムダDNAは大腸菌染色体の一部として振る舞い、細胞分裂に伴う染色体の複製もそのまま行われるし、細菌交配による染色体の移行もそのまま移る。この組み込まれたファージDNAは「溶菌」過程によって、*attR*と*attL*との間で部位特異的組換えによる大腸菌染色体からの切り出しが起こり、最終的に子孫ファージが放出される。一般的にファージDNAが切り出されるためには、紫外線、DNA損傷性薬剤、DNA合成阻害剤などによって染色体にストレスがかかって「溶菌」過程が誘発される必要がある。こうして部位特異的組換えは非常に正確に行われるが、稀に*att*部位以外で切り出されることがある。そのような切り出しによって形成されたラムダファージは、*att*部位の近傍にある大腸菌の*gal*遺伝子や*bio*遺伝子を取り込んでいることが知られている。そのような組換え型ラムダファージを λ *gal*、 λ *bio*と表記し、それぞれは大腸菌の限られた遺伝子(*gal*、*bio*)だけを持ちうるので、特殊形質導入ファージと呼ばれる。ファージの「頭」はバッケーキングできる塩基数に限界があるため、隣接した大腸菌の遺伝子を取り込んだファージDNAは必ず自分自身ファージDNAの欠失を伴う。このうち λ *bio*は*attR*側の*attL*側のファージDNAを取り込んだ分*attL*側のファージDNAを欠失する事

がほとんどであり、特にファージの *red* 遺伝子や *gam* 遺伝子周辺まで欠失する事が多い。ここで注目すべき点は、*red* 遺伝子と *gam* 遺伝子を同時に変異を持つラムダファージが P2 ファージが溶原化した大腸菌においてプラークを形成することができる事である (Lindahl *et al.*, 1970)。この性質を Spi⁻ と表現している。正常な切り出しによって形成するラムダファージは P2 溶原菌上にプラークを形成できない (Spi⁺: sensitive to P2 inhibition) ので、P2 溶原菌を指示菌としたときのプラーク数から非相同期組換えによって形成されたファージ数のみを求めることが出来る。Spi⁻、Spi⁺ いずれのファージも一般的に用いられる非溶原菌を指示菌とすればプラークを形成するので、全ファージ数を求めることが出来る。このようにして非相同期組換えを定量的に検出する系を、λ Spi⁻ アッセイ系と呼んでいる (図 2-1-0)。

この Spi⁻ アッセイを用いて、様々な DNA 損傷によって誘導される非相同期組換えを検出できることが示されている (Ikeda *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1995)。

本研究では、Spi⁻ アッセイを非相同期組換え頻度の指標として用い、DNA 複製が非相同期組換えに関与していることの証明、及びその組換え機構の解析を目的として実験を行った。

2-1-1

Spi⁻ ファージ形成頻度を与える DNA 複製の影響

目的:

Yamaguchi らは、非相同期組換えによって形成される Spi⁻ ファージの構造解析から、組換え体の 57% は高発部位 (Hotspot D) で起こっており、その組換え部位周辺に顕著な反復配列が見られる事を示した。そして、反復配列に起因する二重鎖切断が起こる機構を提案した (図 2-1-1: Yamaguchi *et al.*, 1995)。このモデルは、複製の進行が紫外線による染色体上の損傷に出会うことで反復配列間でのスリップを誘引して単鎖 DNA のループアウトを起こし、そこに何らかのヌクレアーゼが切断を入れることで、組換えの基質である二重鎖切断が生成するとしている。

そこで、紫外線照射によって上昇する非相同期組換え頻度に影響を与えるDNA複製因子の探索を目的に以下の実験を行った。大腸菌のDNA複製に関わる遺伝子群は、*dna*変異として数多く単離されているが、今回は複製の伸長や開始に関わるDnaBヘリケースに注目して実験を行った。その他の遺伝子産物の関与は項を改めて後記する。

結果：

(A)*dnaBts14*変異株における Spi^- ファージ形成頻度

大腸菌FI14 *dnaB*⁻株及びFI14 *dnaBts14*株それぞれに λ cI857ファージを溶原化させて、 Spi^- アッセイを行った。その結果を表2-1-1(A)、図2-1-1(B)に示す。 Spi^- ファージ形成頻度が野生株に比べて約100分の1に低下した。

(B)*dnaBts252*変異株における Spi^- ファージ形成頻度

大腸菌594 *dnaB*⁻株及び594 *dnaBts252*株それぞれに λ cI857ファージを溶原化させて、 Spi^- アッセイを行った。その結果を表2-1-1(B)、図2-1-1(B)に示す。 Spi^- ファージ形成頻度は野生株と同じだった。

結論：

以上の結果から、非相同期組換えにDNA複製が関与していることが示唆された。また、複製の開始の一時的な阻害は非相同期組換えに関与せず、複製の進行の阻害によって非相同期組換えが影響を受けていることを示した。

2-1-2

正常な切り出しを抑制する変異を導入した株での、 Spi^- ファージ形成頻度を与えるDNA複製の影響

目的：

*dnaB*温度感受性変異株を高温処理して複製の進行を阻害している間、*att*部位間の正常な切り出しが起こって、染色体上に溶原化しているファージDNAが喪失してしまうと、非相同期組換え反応の有無に関わらず Spi^- ファージ形成能が低下する事が予想される。この可能性を排除するために、次の実験を行った。

大腸菌に溶原化しているラムダファージDNAの通常の切り出しにはラムダファージの蛋

白であるInt、Xis、大腸菌の蛋白であるFis、IHF蛋白が関与している。Shanadoらによって、*xis*遺伝子の変異株で細胞あたりのSpI⁺ファージの形成頻度が野生株の約200倍上昇する事が示されている(Shanado *et al.*,投稿中)。つまり、SpI⁺ファージの形成を指標にした非相同的組換えは、ラムダファージDNA特有のものではなく、染色体全体で起こっている非相同的組換えと共通する現象であり、また通常の切り出しがほとんど起こらないので、組換えの基質として染色体上にプロファージが残っていることが期待される。

結果：

λ cI857 *xis*Iファージを大腸菌F114 *dnaB*⁺株及びF114 *dnaBts*14株に溶原化させた株で、SpI⁺アッセイを行った。その結果を表2-1-2、図2-1-2に示す。SpI⁺ファージ形成頻度は野生株に比べて細胞あたり約100分の1に低下した。

結論：

SpI⁺ファージ形成頻度の低下は、溶原化しているラムダファージが正常な切り出しが行われることによって非相同的組換えの基質になる機会を失っているからではない。

2-1-3

ファージの生育に対して*dnaB*変異が与える影響

目的：

切り出されたファージは環状化した後、大量に複製されてからファージ粒子にパッケージされる。*dnaB*変異によって環状化された後の複製が正常に行われなためSpI⁺ファージの形成頻度が低下している可能性を排除するために、ファージの一段増殖実験を行った。

結果：

大腸菌F114 *dnaB*⁺株及びF114 *dnaBts*14株を対数増殖期まで増やし、 λ cI857ファージを感染させその増殖能を測定した。結果を表2-1-3に示す。*dnaB*14変異によってパーストサイズは野生株に対して紫外線なしでは37%、紫外線照射(20J/m²)では60%に低下する事がわかった。

結論：

Spi⁻ファージの形成頻度が100分の1に低下することから考えて、この生育の低下が非相
同的組換え頻度の低下の主要因ではないと言える。

2-1-4

組換え型ファージの組換え部位のjunctionの分布

目的：

Yamaguchiらによって非相同的組換えにより生成したSpi⁻ファージの組換え部位の分布
には偏りがあることが示されている。57%の組換え体が高発部位(Hotspot I)で組換わって
いる。DNA複製の停止によって組換えの起こる部位が影響を受けるかどうかを明らかに
するために、紫外線照射することによって生成する組換え型ファージの組換え部位の
junctionの分布を調べ、*dnaB*変異株及び野生株で比較した。

結果：

λ cI857ファージを溶原化した野生株及び*dnaB14*変異株を紫外線照射($20\text{J}/\text{m}^2$)して、シ
ングルバースト法によりそれぞれ独立したSpi⁻ファージを多数得た。これらについてPCR
法を用いて、それぞれの組換え部位のjunctionの分布を決定した(図2-1-4)。野生株か
ら得られたSpi⁻ファージの組換え部位のjunctionの54%に存在した高発部位(Hotspot I)が、
*dnaB*変異株の場合には17%に減少することが明らかになった。代わりにHotspot IIでの組
換えが13%から67%に上昇した。また、野生株で7%存在したHotspot IIIでの組換え体に
相当するものは見いだせなかった。

結論：

高発部位(Hotspot I)での組換えにDNA複製が関与している。また、高発部位以外の組
換え部位全体の分布には影響していないが、頻度全体の低下に伴って、新たな高発部位
(Hotspot II)での組換え体の割合が増加した。またHotspot IIIでの組換え体が見られなか
った。

2-1-5

組換え型ファージの組換え部位の塩基配列の解析

目的：

紫外線照射することによって生成する組換え型ファージは、大腸菌及びファージそれぞれの親DNA間で、3bp~13bpの相同配列で組換わっていた(Yamaguchi *et al.*, 1995)。*dnaB*変異株に紫外線照射することによって生成する組換え型ファージの組換え部位の塩基配列を決定し、その特徴を調べた。

結果：

2-1-3で野生株及び*dnaB*変異株から得られた組換え型ファージの組換え部位の塩基配列を決定した(図2-1-5)。組換え体の構造解析から、野生株では(2bp~13bp)、変異株では(3bp~13bp)の短い相同な配列の間で組換えが起こっていた(表2-1-5)。また、その平均塩基長は野生株及び*dnaB*変異株それぞれ9.1bpと11.8bpであった。

結論：

組換え体に見られる、大腸菌・ファージそれぞれの親DNAに対して組換え部位の相同な配列の長さ(3bp~13bp)は、野生株に紫外線照射したときと同じ(2bp~13bp)程度であった。

2-2

考察

DNA複製は「複製の開始」と「複製の進行」に分けることが出来る。*dnaB*遺伝子の変異としてすでに多数単離されている中で、「複製の開始」に関わる変異は*dnaB252*だけであり、*dnaB14*を含むその他の変異は「複製の進行」に関わるものである。

今回得られた結果は、*dnaB14*によってSpi⁺ファージの形成頻度が野生株に比べて100分の1に低下していることである。頻度の低下を起こす原因として、

(1)複製の進行が直接非相同期組換えの機構に関与しているからである、

(2)複製が停止している間に、大腸菌染色体に溶原化しているファージDNAが*attR-attL*間での部位特異的組換えによって切り出されてしまうと、非相同期組換えの基質の喪失が起ってしまうからである、

(3)ファージの生育が複製の阻害によって低下するためである、などが考えられる。

ラムダファージの持つXis蛋白は、ファージDNAが大腸菌染色体から部位特異的組換えによって切り出される時に必要な蛋白である。Shanadoらによって、その*xis1*変異は*att*間での部位特異的組換えは非常に低下させるが、Spi⁺ファージの形成頻度には影響を与えないことが示されている。この*xis1*変異を導入することで、複製の進行が停止している間でも、ファージDNAが喪失しないことが期待される。2-1-2の結果から先に挙げた(2)の基質の喪失による頻度の低下の可能性はなくなった。

組換えによって環状化したファージDNAが*dnaB*変異によって大きな影響を受けないことは2-1-3の結果から明らかになったので(3)のファージの生育の阻害による組換え頻度の低下の可能性も排除できた。

DNAの複製に関わる非相同期組換えとして次の二つが考えられる。

(A)DNA複製によって姉妹染色体を作ることが非相同期組換えの基質を作る。

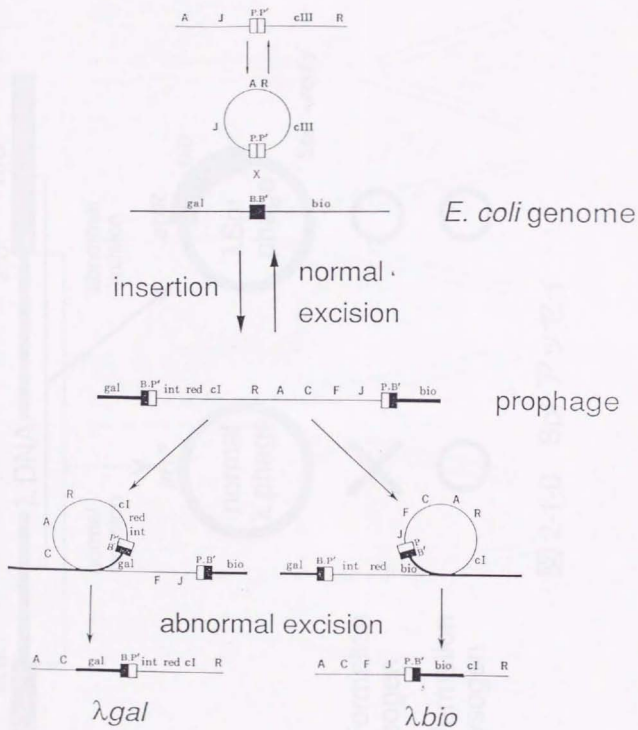
(B)DNA複製が直接、非相同期組換えを起こす。

まず最初の(A)の場合について述べる。細胞が特定の遺伝子産物を必要とする状況にさら

されたとき、その遺伝子の増幅現象が起こることが知られている(Brown and Dawid, 1968; Alt *et al.*, 1978)。真核生物ではテトラヒメナのribosomal RNAの遺伝子増幅や(Gall, 1974; Yao *et al.*, 1974)、ショウジョウバエの唾液腺や絨毛腺の遺伝子増幅が観察されている(Spradling, 1981)。このような遺伝子増幅は異常な複製が起こって出来た姉妹染色体間同志で組換えを起こすと、部分的に染色体DNAが重複した組換え体が出来ると考えられている。これを溶原化したラムダファージに当てはめると(図2-2-2(A))、(1)紫外線照射によって誘起される複製開始点以外からのDNA複製が、*ori λ* あるいはその他の*oriM*などから複製が行われて、部分的に染色体の増幅を起こす。(2) λ DNA周辺の姉妹染色体間で短い相同性を利用した非相同的組換えが行われる。この時 λ DNAと大腸菌*bio*遺伝子間で組換えが行われると図に示したような λ DNAに挟まれた大腸菌遺伝子*bio*が重複する。(3) 続く熟誘発でファージDNAの切り出しが行われる。近い*att*部位間あるいは遠い*att*部位間での切り出されたDNAは環状化して複製が行われる。(4) ファージDNAはローリングサークル型の複製を行い、*cos*部位を挟んだDNAがファージ粒子の中に組み入れられる。つまり、上記の切り出しによって出来た大腸菌*bio*遺伝子を持ってかつ λ DNAを重複して持ったDNAであっても、*cos*間でのパッケージングによって、Spi⁺ファージが形成するのである。

次の(B)はYamaguchiらのモデルで説明できる(図2-2-2(B))。まず、順向き繰り返し配列間で複製フォークがスリップを行い二重鎖切断を誘発する。この末端が同一染色体内の非相同的組換えを起こし、組換え型ファージとして大腸菌染色体から欠失する。この組換え型ファージDNAは欠失した際に環状化し、正常なファージと同様にローリングサークル型の複製を行いファージ粒子の中に組み入れられる。このようにして非相同的組換えによるSpi⁺ファージが形成する。

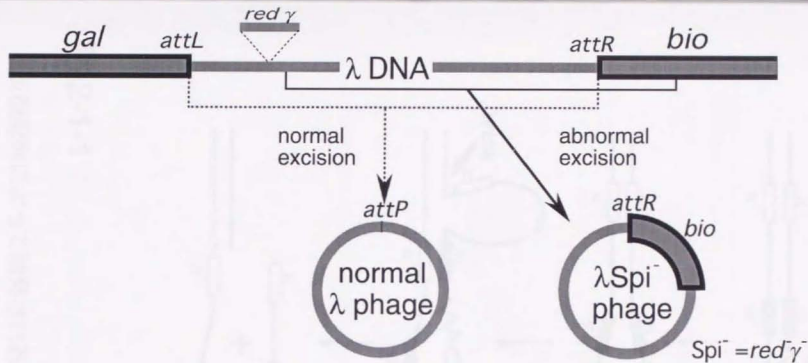
本研究によって、DNA複製を阻害すると非相同的組換えの頻度が低下すると同時に、組換え体の構造解析から高発部位Hotspot Iでの組換えが非常に減少した。このことは、(2)による順向き繰り返し配列による組換えモデルを強く支持する。今後さらに組換え体の構造解析を行い、このような繰り返し配列の存在割合を明らかにする必要がある。



☒ 2-1-00

Campbellのモデル

(Campbell, 1962)

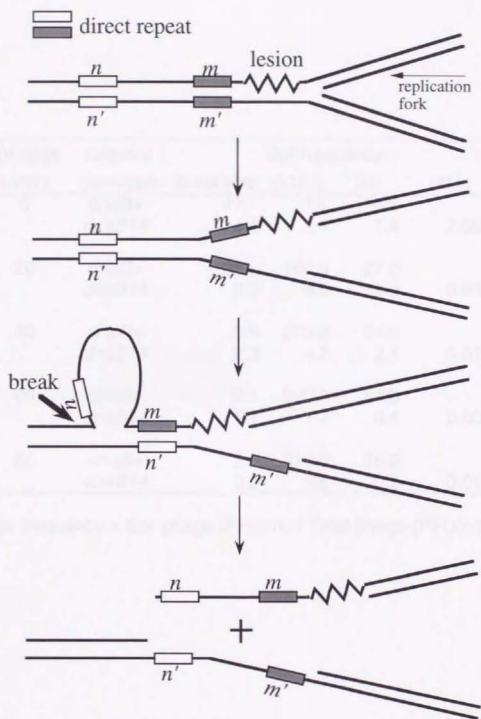


26

Plaque Formation
on P2 lysogen

Plaque Formation
on non-lysogen

☒ 2-1-0 Spi⁻ アッセイ



☒ 2-1-1

反復配列によって誘発される非相等的組換えのモデル

UV dose (J/m ²)	relevant genotype	Spi frequency			
		burst size	(x10 ⁻⁹)	SE	ratio
0	<i>dnaB+</i>	47.	1.5	0.5	1
	<i>dnaB14</i>	4.1	3.1	1.4	2.067
20	<i>dnaB+</i>	21.	100.0	27.0	1
	<i>dnaB14</i>	2.5	3.9	2.2	0.039
40	<i>dnaB+</i>	5.9	270.0	51.0	1
	<i>dnaB14</i>	2.3	4.2	2.1	0.016
60	<i>dnaB+</i>	2.1	290.0	67.0	1
	<i>dnaB14</i>	1.1	1.7	0.4	0.006
80	<i>dnaB+</i>	2.1	310.0	28.0	1
	<i>dnaB14</i>	0.9	3.6	0.3	0.012

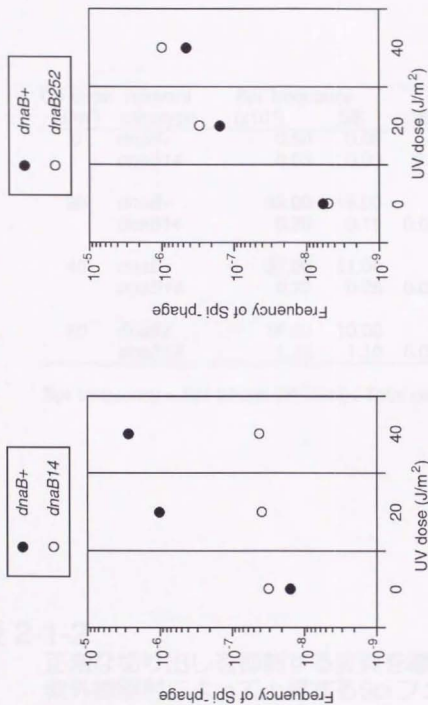
Spi frequency = Spi phage (PFU/ml) / Total phage (PFU/ml)

表 2-1-1 (A) *dnaBts14* 変異株
紫外線照射によって上昇するSpiファージの
形成頻度に与える*dnaBts* 変異の影響

UV dose (J/m ²)	relevant genotype	Spi ⁺ frequency		
		burst size	(x10 ⁸)	ratio
0	<i>dnaB+</i>	45.	0.6	1
	<i>dnaB252</i>	18.	0.5	0.83
20	<i>dnaB+</i>	35.	16.0	1
	<i>dnaB252</i>	8.8	30.0	1.88
40	<i>dnaB+</i>	11.	45.0	1
	<i>dnaB252</i>	1.2	100.0	2.22

Spi⁺ frequency = Spi⁺ phage (PFU/ml) / Total phage (PFU/ml)

表 2-1-1 (B) *dnaBts252* 変異株
紫外線照射によって上昇するSpi⁺ファージの
形成頻度に与える*dnaBts* 変異の影響



(A) *dnaBts14*変異株

(B) *dnaBts252*変異株

☒ 2-1-1

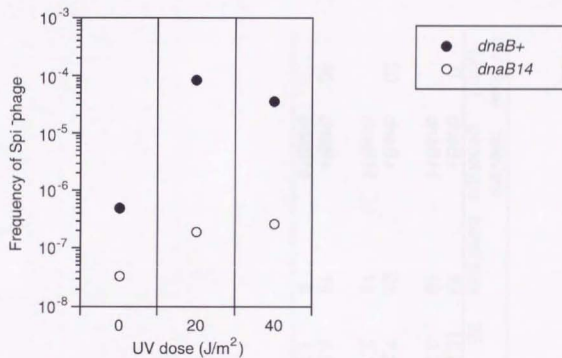
紫外線照射によって上昇するSpi⁺ファージの形成頻度に対する*dnaBts*変異の影響

UV dose (J/m ²)	relevant genotype	Spi frequency		
		(x10 ⁶)	SE	ratio
0	<i>dnaB+</i>	0.50	0.08	1
	<i>dnaB14</i>	0.03	0.03	0.06
20	<i>dnaB+</i>	82.00	18.00	1
	<i>dnaB14</i>	0.20	0.19	0.002
40	<i>dnaB+</i>	37.00	11.00	1
	<i>dnaB14</i>	0.27	0.26	0.007
60	<i>dnaB+</i>	16.00	10.00	1
	<i>dnaB14</i>	1.10	1.10	0.069

Spi frequency = Spi phage (PFU/ml) / Total cell (CFU/ml)

表 2-1-2

正常な切り出しを抑制する変異を導入して、紫外線照射によって上昇するSpiファージの形成頻度に与える*dnaBts14* 変異の影響



☒ 2-1-2

プロファージの正常な切り出しを阻害することによる、紫外線照射によって上昇するSpi⁺ファージ形成頻度を与える*dnaBts14*変異の影響

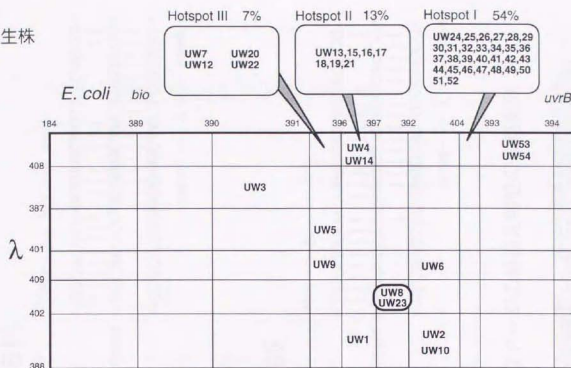
UV dose (J/m ²)	relevant genotype	burst size	SE	ratio
0	<i>dnaB+</i>	49	10.0	1
	<i>dnaB14</i>	18	3.7	0.37
20	<i>dnaB+</i>	22	7.2	1
	<i>dnaB14</i>	13	2.1	0.60
40	<i>dnaB+</i>	16	4.9	1
	<i>dnaB14</i>	9	1.7	0.54

表 2-1-3

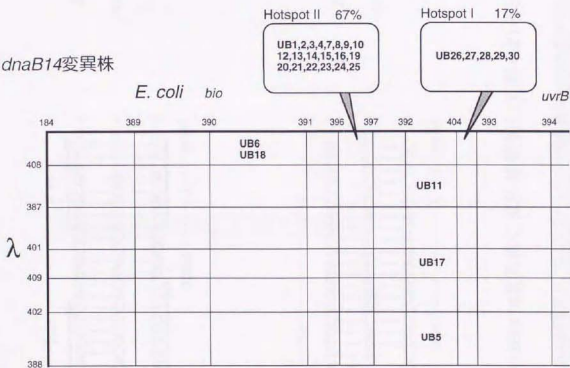
ファージの生育に対して *dnaBts14* 変異が与える影響

2-1-4 紫外線照射によって生成する組換え型ファージの組換え部位の分布

(1) 野生株

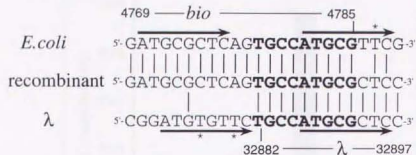


(2) *dnaB14*変異株

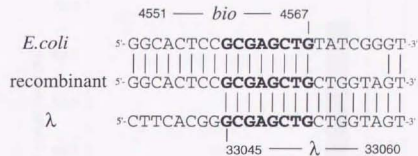


換輪は大腸菌 *bio* 遺伝子及び *uvrB* 遺伝子上のプライマー番号、縦軸はラムダファージDNA上のプライマー番号を示している。それぞれのプライマーの塩基配列と染色体DNA上の位置は、第7章にまとめて記す。
組換え型ファージを種型として用い大腸菌側とλ側のプライマーで組換え部位を挟むようにしてPCRを行った。最も小さなPCR産物が得られたプライマーの組を、組換え部位が存在する範囲として分布位置を決定した。また、大腸菌側・λ側それぞれ#387と#404プライマーでPCRを行い、Yamaguchiらが以前単離したHotspot Iで組換わっているファージを参照に用いて、同じ長さのPCR産物を示すものをHotspot Iとして分類した。同様にしてHotspot IIも分類した。図中のHotspotの右側のパーセンテージは組換え体全体に対するそれぞれのHotspotが占める割合である。また、同じ塩基配列で組換わっているものは太い枠で囲った。

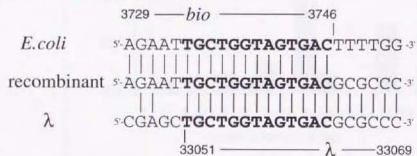
Hotspot I



UB11



Hotspot II



UB5

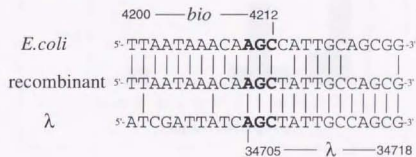
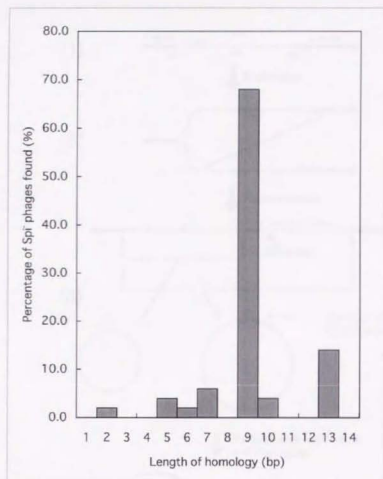
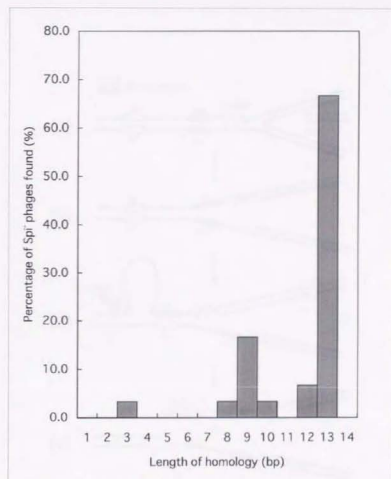


図 2-1-5 *dnaBts14* 変異株に紫外線照射して得られる Spi⁺ ファージの組換え部位の塩基配列

組換え部位の junction 周辺の塩基配列を、ラムダファージと大腸菌遺伝子の塩基配列をもとにそれぞれ比較して、親 DNA の組換え部位を特定した。図中の太字は大腸菌とラムダファージの組換え部位に見られる相同性の長さを表す。同一塩基は縦線で結んで表現してある。矢印は 5 塩基以上の順向き繰り返し配列を示している。



(1) 野生株 (平均塩基長 9.1bp)



(2) *dnaB14* 変異株 (平均塩基長 11.7bp)

表 2-1-5

紫外線照射によって生成する組換え型ファージの組換え部位に存在する相同配列の長さの分布

横軸は組換え部位に存在する親DNA間の相同配列の塩基長(bp)、縦軸は組換え体全個数に対してある同じ長さの相同配列を持った組換え体の占める割合(%)である。

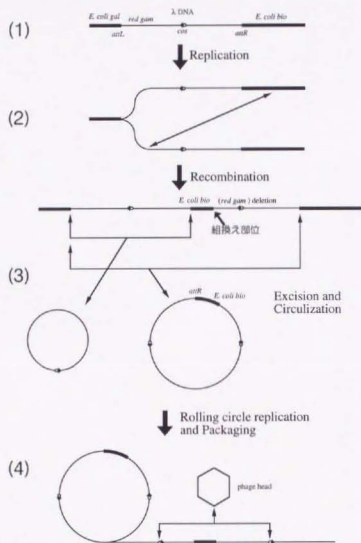
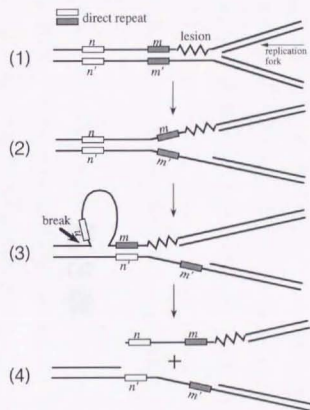


図 2-2-2

(A) 姉妹染色体間での非相等的組換えのモデル



(B) 反復配列によって誘発される非相等的組換えのモデル

第3章

DNA gyraseに依存する 非相同的組換えの解析

オキシリシン酸は大腸菌のII型トポイソメラーゼであるDNA gyraseの特異的阻害剤である。大腸菌細胞にオキシリシン酸処理を行うと、大腸菌染色体上に結合しているDNA gyraseに相互作用して薬剤-蛋白-DNA複合体(cleavable complex)を形成する。Shimizuらは、オキシリシン酸処理によって非相長的組換えの頻度が100倍上昇することを示した。また、得られた組換え体の構造解析から、組換え部位には親DNA間の相同性がほとんど見られないことを示した(Shimizu *et al.*, 1995)。このようなオキシリシン酸処理によって誘発された非相長的組換えに、DNA gyraseが関与していることが示されたが、その機構は明らかになっていない。

また、薬剤-蛋白-DNA複合体(cleavable complex)の形成によって、DNA複製が数分のうち即座に阻害される(Goss *et al.*, 1964)。このようなオキシリシン酸によるDNA複製の阻害は、cleavable complexを作るために必要な薬剤量に比べてかなり低い濃度で起こる(Snyder and Drlica, 1979)。オキシリシン酸処理をすることによって誘発される*in vivo*の非相長的組換えは、DNA gyraseと伴にDNA複製も関与していると考えられる。

本研究では、オキシリシン酸処理によって誘発される非相長的組換えに、*dnaB*変異株の与える影響を検討した。

3-1

実験結果

3-1-1

Spi^rファージ形成頻度に与えるDNA複製の影響

目的:

オキシソリン酸によって誘発される非相長的組換えにDNA複製が必要とされるかを検討する事を目的に実験を行った。オキシソリン酸処理によって誘発される組換えは、紫外線を照射したときに染色体上の損傷が誘引するのは異なり、DNA gyraseと薬剤の複合体による染色体DNA上の二重鎖切断の先のステップが阻害されることが直接の原因と考えられている。ただし薬剤を取り除くと、この二重鎖切断はDNA gyraseの結合活性によって元に戻る。結合過程が阻害された二重鎖切断を組換えの基質として活性化状態にするためにDNA複製の進行による相互作用が必要と考えた。

結果:

実験の結果を表3-1-1、図3-1-1に示す。オキシソリン酸処理をすることによって野生株ではSpi^rファージの形成頻度を上昇させるが、*dnaB14*株では100分の1に低下したままである。

結論:

オキシソリン酸によって引き起こされる非相長的組換えにDNA複製が関与している。

3-1-2

正常な切り出しを抑制する変異を導入した株での、Spi^rファージ形成頻度に与えるDNA複製の影響

目的:

2-1-2で考えられた可能性を排除し、正常な切り出しを抑制してオキシソリン酸処理によるSpi^rファージの形成頻度にDNA複製が関与していることを明らかにする事を目的に、Spi^rアッセイを行った。

結果:

実験の結果を表3-1-2、図3-1-2に示す。Spi⁺ファージ形成頻度は野生株に比べて約100分の1に低下した。

結論：

2-1-2の結果と同様に、オキシリン酸によって誘引される非相長的組換えにDNA複製の進行が関与していることを示した。

3-1-3

組換え型ファージの組換え部位のjunctionの分布

目的：

Shimizuらの解析により、オキシリン酸処理によって誘発する組換え体の構造から高発部位(Hotspot I)で組換わっているものが見られた(Shimizu *et al.*, 1995)。DNA複製がこのオキシリン酸処理によって誘発される高発部位での組換えに関与しているか否かを明らかにするために、オキシリン酸で処理することによって生成する組換え型ファージの組換え部位のjunctionの分布を調べ、*dnaB*変異株及び野生株と比較した。

結果：

λ cI857ファージを溶原化した野生株及び*dnaB14*変異株をオキシリン酸(5 μ g/ml)で処理して、シングルパースト法によりそれぞれ独立したSpi⁺ファージを多数得た。これらについてPCR法を用いて、それぞれの組換え部位のjunctionの分布を決定した(図3-1-3)。野生株から得られたSpi⁺ファージの組換え部位のjunctionの66%に存在した高発部位(Hotspot I)が、*dnaB*変異株の場合には5%に減少することが明らかになった。一方でHotspot IIでの組換えは野生株の7%から*dnaB*変異株の73%に上昇した。

結論：

DNA gyraseによって誘発されるHotspot Iでの組換えにDNA複製が関与している。

3-1-4

組換え型ファージの組換え部位の塩基配列の解析

目的：

オキシリニン酸処理をすることによって生成する組換え型ファージは、紫外線照射時に見られた3bp~13bpの相同配列を持つ組換え体の他に、0bp~3bpと非常に短い相同配列を持つ組換え体が存在した (Shimizu *et al.*, 1995)。dnaB変異株をオキシリニン酸で処理することによって生成する組換え型ファージの組換え部位の塩基配列を決定し、その特徴を調べた。

結果：

3-1-3でdnaB変異株から得られた組換え型ファージの組換え部位の塩基配列を決定した (図3-1-4)。今まで見られたような、6~13bpの比較的長い相同配列を持つ組換え体の他に、短い1bpの相同配列を持った組換え体が存在した。これは、野生株をオキシリニン酸処理して得られる組換え体の塩基配列の特徴 (きわめて短い相同配列と長い相同配列が存在) と似ていた。また、組換え部位の親DNA間の相同配列の塩基長の平均は、野生株8.6bpで、dnaB変異株で11.5bpであった (表3-1-4)。更に、同じ部位で組換わっているものが一組(OB20,OB30)あった。

結論：

DNA複製を阻害することでも、DNA gyraseが直接関与している大変短い相同性の組換えに影響はしていない。またdnaB変異株では組換え部位に存在する相同配列の塩基長が若干長くなった。

3-2

考察

オキシリソンは大腸菌のII型トポイソメラーゼであるDNA gyraseの特異的阻害剤である。大腸菌細胞にオキシリソンの処理を行うと、大腸菌染色体上に結合しているDNA gyraseに相互作用して薬剤-蛋白-DNA複合体(cleavable complex)を形成する。Shimizuらは、オキシリソンの処理によって非相対的組換えの頻度が100倍上昇することを示した。また、得られた組換え体の組換え部位の構造解析から、組換え部位にはほとんど相同性が見られないことを示した(Shimizu *et al.*, 1995)。このようなオキシリソンの処理によって誘発された非相対的組換えに、DNA gyraseが関与していることが示されたが、その機構は明らかになっていない。Ikedaらは、染色体上にあるDNA gyraseのヘテロ4量体(A_2B_2)間で、一時的に8量体(A_4B_4)を作り、(AB)のサブユニットを交換するモデルを提唱している(図3-2(A))。実際のところ、ヘテロ4量体は安定な存在で、自律的にABのサブユニットに分離することはないと考えられる。このような安定な構造体が染色体上に存在していると、複製フォークがその構造体と出会うことで、相互作用することが考えられる。D'ArpaらはDNA複製の進行によって染色体上のDNAトポイソメラーゼ(ここではDNA gyraseについて)が5'末端と共有結合した状態で(AB)のサブユニットに分離してしまう可能性を示唆した(D'Arpa *et al.*, 1989; 1990)。この時、DNA gyraseサブユニットに保護されたDNA末端の他に自由な3'末端を持つDNAが存在する。これは複製の進行によって起こる二重鎖末端の生成の一つの可能性である(図3-2(B))。ここでDNA gyraseが関与する非相対的組換えの機構についていくつかの可能性をあげたい。

(1) サブユニット交換モデル

さらにDNAの複製が関与するものとしては、

(2) DNA gyrase分離モデル

(3) 自由末端生成モデル

最初のサブユニット交換モデルについては上記した通りである。2番目のDNA gyrase分離モデルは最近単離された非相対的組換えを自然誘発するDNA gyraseの変異株の解析

により、ヘテロ4量体のAサブユニット間の結合に関わる変異株から得られた組換え体の組換え部位は相同性を全く必要としない事が示された(Shimizu *et al.*, 1997)。ヘテロ4量体を形成するための(AB)サブユニット間の結合が弱いDNA gyraseはDNA複製の進行に対して感受性であると考えられる。直接複製複合体との相互作用を受けなくとも、DNA複製の進行による染色体上の超らせんの増加などのストレスで、DNA末端と結合したまま(AB)サブユニットに分離してしまうものが増加するだろう。分離したサブユニットは他の分離したサブユニットと再び結合することで、新たなヘテロ4量体を形成しそれぞれのDNA末端を結合することで相同性を全く持たない組換え体を生成する。

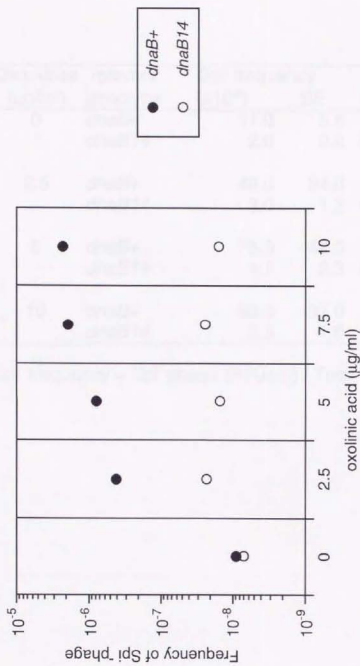
3番目の自由末端生成モデルは、染色体上のDNA gyraseヘテロ4量体が、複製の進行による超らせんを頻繁に(50回/秒)解消しているときに複製フォークが直接ぶつかりDNA gyraseとは共有結合していない岡崎fragment側のDNAが自由末端となって組換えの基質として働く。オキソリニン酸処理したときは、DNA gyraseが染色体上で二重鎖切断を入れた状態で固定されているので、複製フォークと出会ったときに岡崎fragment側のDNAは容易くはずれることが考えられる。この蛋白に保護されていないDNA末端は、エキソヌクレアーゼやヘリケースの格好の攻撃対象になり、3'末端あるいは5'末端が削られたり二重鎖がほどこかれたりプロセッシングを受け組換え基質となると考えられる。

Oxo. dose ($\mu\text{g/ml}$)	relevant genotype	burst size	Spi frequency		
			($\times 10^8$)	SE	ratio
0	<i>dnaB+</i>	44.	0.6	0.2	1
	<i>dnaB14</i>	19.	3.4	0.3	5.667
2.5	<i>dnaB+</i>	16.	87.0	12.0	1
	<i>dnaB14</i>	20.	2.2	0.7	0.025
5	<i>dnaB+</i>	15.	180.0	38.0	1
	<i>dnaB14</i>	21.	3.0	0.8	0.017
10	<i>dnaB+</i>	9.2	350.0	82.0	1
	<i>dnaB14</i>	13.	7.5	1.6	0.021

Spi frequency = Spi phage (PFU/ml) / Total phage (PFU/ml)

表 3-1-1

オキシソリン酸処理によって上昇するSpiファージの
形成頻度に与える*dnaBts14* 変異の影響



☒ 3-1-1

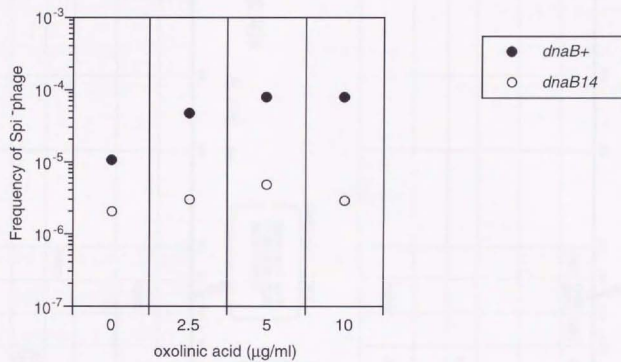
オキシリン酸処理によって上昇する
Spi⁺フアーシ形成に与えるdnaBts14変異の影響

Oxo. dose ($\mu\text{g/ml}$)	relevant genotype	Spi ⁱ frequency		
		($\times 10^6$)	SE	ratio
0	<i>dnaB+</i>	11.0	5.6	1
	<i>dnaB14</i>	2.0	0.8	0.182
2.5	<i>dnaB+</i>	48.0	24.0	1
	<i>dnaB14</i>	3.0	1.2	0.063
5	<i>dnaB+</i>	78.0	42.0	1
	<i>dnaB14</i>	4.8	2.3	0.062
10	<i>dnaB+</i>	80.0	37.0	1
	<i>dnaB14</i>	2.8	1.0	0.035

Spi frequency = Spi phage (PFU/ml) / Total cell (CFU/ml)

表 3-1-2

正常な切り出しを抑制する変異を導入して
オキシリン酸処理によって上昇するSpiⁱファージの
形成頻度を与える*dnaBts14* 変異の影響

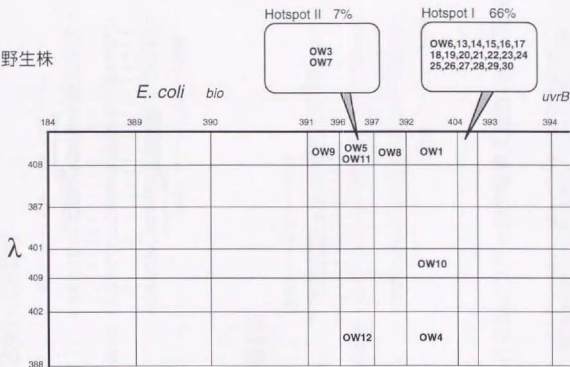


☒ 3-1-2

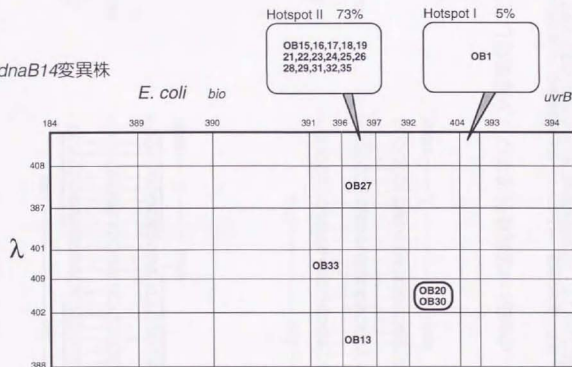
プロファージの正常な切り出しを抑制する変異を導入して、オキソリン酸処理によって上昇するSpi⁻ファージ形成に与える *dnaBts14*変異の影響

図 3-1-3 オキシリン酸処理によって生成する組換え型ファージの組換え部位の分布

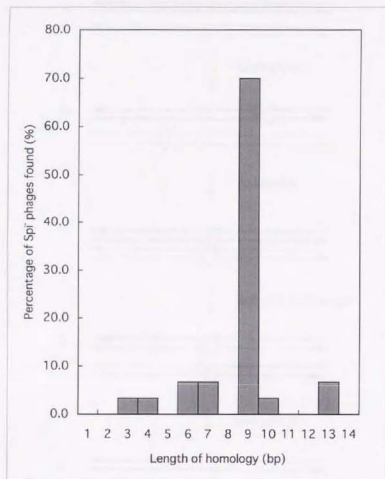
(1) 野生株



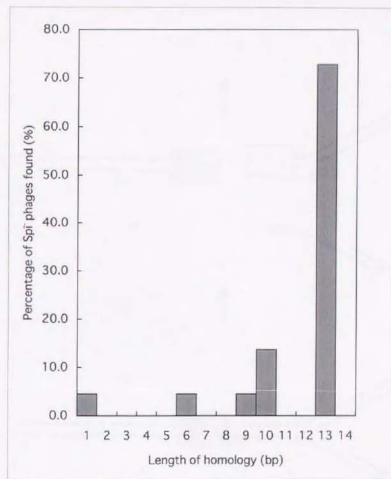
(2) *dnaB14*変異株



縦軸は大腸菌 *bio* 遺伝子及び *uvrB* 遺伝子上のプライマー番号、縦軸はラムダファージDNA上のプライマー番号を示している。それぞれのプライマーの塩基配列と染色体DNA上の位置は、第7章にまとめて記す。
組換え型ファージを鋳型として用い大腸菌側と入側のプライマーで組換え部位を挟むようにしてPCRを行った。最も小さなPCR産物が得られたプライマーの組を、組換え部位が存在する範囲として分布位置を決定した。また、大腸菌側・入側それぞれ#387と#404プライマーでPCRを行い、Yamaguchiらが以前単離したHotspot Iで組換わっているファージを参照に用いて、同じ長さのPCR産物を示すものをHotspot Iとして分類した。同様にしてHotspot IIも分類した。図中のHotspotの右側のパーセンテージは組換え体全体に対するそれぞれのHotspotが占める割合である。また、同じ塩基配列で組換わっているものは太い枠で囲った。



(1) 野生株 (平均塩基長 8.6bp)

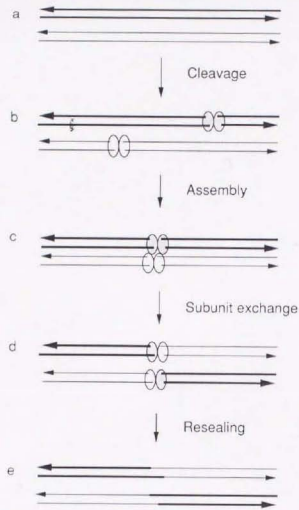


(2) *dnaB14* 変異株 (平均塩基長 11.5bp)

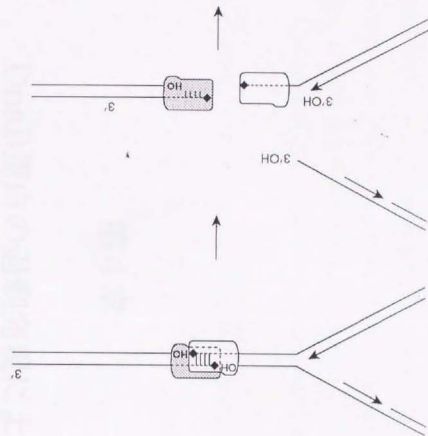
表 3-1-4

オキシリン酸処理により生成する組換え型ファージの組換え部位の相同配列の長さの分布

横軸は組換え部位に存在する親DNA間の相同配列の塩基長(bp)、縦軸は組換え体全個数に対してある同じ長さの相同配列を持った組換え体の占める割合(%)である。



(A) DNA gyrase サブユニット交換モデル
(Ikeda *et al.*, 1982)



(B) DNA複製が誘発する二重鎖切断モデル
(D'Arpa & Liu, 1989)

☒ 3-2 DNA gyraseが関与する非相同的組換えのモデル

第4章

DnaB蛋白の過剰発現による 非相同的組換えの誘発現象の発見

*dnaB*変異株がSpi⁺ファージの形成頻度を低下させることを第1章・第2章にて示してきた。この非相同的組換えに関する欠損を相補させるために、DnaB蛋白を過剰発現することを試みた。その実験の過程で、*dnaB*変異株及び野生株ともに、紫外線照射を行わない状態でも、DnaB蛋白を過剰発現するとSpi⁺ファージの形成頻度が顕著に上昇することを発見した。

本章では、DnaB蛋白を過剰発現することによって誘発する非相同的組換えの解析を行った。

4-1

実験結果

4-1-1

Spi⁺ファージ形成頻度に与える影響

目的:

*dnaB*変異株における温度感受性及びSpi⁺ファージ形成頻度の低下を、野生型DnaB蛋白を過剰発現してそれぞれを回復させることを目的に実験を行ったところ、DnaB蛋白を過剰発現させることでSpi⁺ファージの自然誘発が上昇する現象を偶然見つけた。紫外線照射した時と比較して、非相同期組換え頻度の上昇の程度を測定した。

結果:

λ *ci857*を溶原化した大腸菌FI14 *dnaB*⁻株に、pBR-KmA2、pRLM6をそれぞれ導入して、Spi⁺アッセイを行った。pRLM6 (Nakayama *et al.*, 1984)は大腸菌染色体上の*dnaB*遺伝子をpBR322由来のプラスミドにクローニングしたものであり、プロモーターは*dnaB*遺伝子自身のものを用いている。pBR322プラスミドは細胞内で数十コピーで保持されるので、プラスミド上に乗っている遺伝子は、染色体上に乗っている遺伝子の発現量より結果的に過剰発現することになる。pBR322プラスミドにカナマイシン耐性遺伝子をクローニングしたpBR-KmA2は対照実験に用いた。それぞれのプラスミドの構造は第7章の図7-1に載せておく。

実験の結果を表4-1-1、図4-1-1に示す。紫外線照射なしの時に、DnaB蛋白を過剰発現した場合Spi⁺ファージの形成頻度が約100倍上昇した。

結論:

以上の結果から、DnaB蛋白の過剰発現によって紫外線照射による染色体上の損傷が起これなくとも、非相同期組換えの頻度を上昇することが明らかになった。

4-1-2

ラムダファージの自然誘発に与える影響

目的:

Spi⁺ファージの形成には染色体の二重鎖切断を必要とする。非相等的組換え頻度の上昇は細胞内の二重鎖切断の多さを反映していると考えられる。DnaB蛋白の過剰発現による非相等的組換え頻度の上昇が二重鎖切断の起こり易さに起因している可能性を検討するため、ラムダファージの自然誘発を測定した。

結果：

野生型ラムダファージλpapaを溶原化した大腸菌594株に4-1-1で用いたプラスミドを導入して、Spi⁺アッセイを行った。実験の結果、表4-1-2に示したように、それぞれのバーストサイズはコントロールと大差なかった。

結論：

以上のことから、DnaB蛋白を過剰発現しても染色体上の二重鎖切断が起こりやすくなっているわけではないということが示唆された。

4-1-3

誘発された非相等的組換えに対するRecA蛋白の関与

目的：

これまでSpi⁺ファージ形成頻度を指標にした非相等的組換えの誘発にRecA蛋白は関与していないことが示されている(Shimizu *et al.*, 1995; Ukita *et al.*, 1996)。DnaB蛋白を過剰発現したときの非相等的組換えの誘発が、RecA蛋白に依存しているか否かを調べることを目的に行った。

結果：

4-1-1と同様にλcI857を溶原化した大腸菌F114 *dnaB*⁺株に、pBR-KmA2、pRLM6をそれぞれ導入して、Spi⁺アッセイを行った。結果を表4-1-3、図4-1-3に示す。紫外線照射を行わずに、DnaB蛋白を過剰発現することによって上昇するSpi⁺ファージ形成頻度は80倍程度であるが、*recA*変異を導入してもSpi⁺ファージの形成頻度の上昇は70倍程度見られた。

結論：

DnaB蛋白の過剰発現による非相同期組換えの誘発はRecA蛋白に依存しない。

4-1-4

組換え型ファージの組換え部位のjunctionの分布

目的：

野生株に対して紫外線照射やオキシソリン酸処理によって生成する組換え型ファージは、高発部位(Hotspot D)で組換わる組換え体が6~7割を占めている事がわかっている(Yamaguchi *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1995)。ところが、*dnaB*変異株では組換え体全体に占めるHotspot Iの割合が1~2割に低下することを、本研究の第2章・第3章で明らかにしてきた。さらに、4-1-1で示したように、DnaB蛋白を過剰発現することによって非相同期組換えの頻度は顕著に上昇する事がわかった。そこで、この頻度の上昇は*dnaB*変異株で影響があったHotspot Iでの組換えが過剰発現されたDnaB蛋白によって効率よく利用されている可能性を検討するため、DnaB蛋白を過剰発現することによって生成する組換え型ファージの組換え部位のjunctionに特徴ある分布がないかを調べた。

結果：

4-1-1で用いた大腸菌株F114 *dnaB*⁺(λ *cl857*) pRLM6を用いて、シングルパースト法によりそれぞれ独立したSpi⁺ファージを多数得た。これらについてPCR法を用いて、それぞれの組換え部位のjunctionの分布を決定した(図4-1-4)。野生株から得られたSpi⁺ファージの組換え部位のjunctionの54%に存在した高発部位(Hotspot D)が、DnaB蛋白を過剰発現した場合にも40%存在することがわかった。また、Hotspot IIIでの組換え体も6%存在し、野生株におけるHotspot IIIの割合(7%)とほぼ同じであった。さらに、分布範囲を決める時、PCR断片の長さが同じものが多数存在し、いくつかの組換えは同じ部分で起こっている。したがって、新しいHotspotがあると考えられた。

結論：

DnaB蛋白を過剰発現することで誘発される非相同期組換えは、野生株の場合と同様に、高発部位(Hotspot D)での組換えやHotspot I以外での組換えが観察された。

4-1-5

組換え型ファージの組換え部位の塩基配列の解析

目的:

野生株を紫外線処理して得られる組換え型ファージの特徴は、組換え体すべて、大腸菌及びファージの親DNA間で短い相同配列が存在することである(Yamaguchi *et al.*, 1995)。また、4-1-4の実験において、いくつかの組換え体は同じ部位で組換えを起していることが考えられた。そこで、DnaB蛋白を過剰発現することによって生成する組換え型ファージの組換え部位の塩基配列を決定し、その特徴を調べた。

結果:

4-1-4で単離したSpi⁺ファージのうち、32体について組換え部位近傍の塩基配列を決定した。その配列の一部を図4-1-5に示す。また組換え部位に見られる親DNA間の相同配列の塩基長の分布を表4-1-5に示す。

(1)すべての組換え体に親DNA間の4bp~13bpの短い相同配列が存在している。高発部位(Hotspot I)をのぞいた組換え体全体の組換え部位に見られる相同配列の塩基長の平均は7.8bpである。

(2)また、同じ部位で組換えを起している組換え体が、それぞれ新しいHotspotとして5組存在することが明らかになった。

(3)組換え部位近傍に顕著な順向き配列が存在する組換え体もあるが、その割合は全体の半数にすぎない。

結論:

すべての組換え部位に短い相同性が見られ、また5組の新しい高発部位が出現した。

4-2

考察

dnaB 遺伝子を多コピープラスミドに乗せて、野生株大腸菌に導入したところ、 Spi^+ フェージの形成頻度を顕著に上昇させた。これは紫外線を照射しなくても非相長的組換えが自然に誘発される事を示している。まず、 Spi^+ フェージ形成頻度が上昇するためにはDNAの二重鎖切断を必要とする。それには、DnaB蛋白質が過剰に発現することによって、何らかの機構が働き細胞内で染色体の二重鎖切断が多くなる可能性があげられる。今までに知られていることとして、大腸菌では細胞内で二重鎖切断が起こりエキソヌクレアーゼなどによって単鎖DNAが生成すると、それを修復するための緊急反応(SOS応答)が起こる。そして、組換え修復関連の遺伝子群が発現する*lexA-recA*機構の誘導や、溶原化したラムダフェージの切り出しの誘発がRecAプロテアーゼ活性によるラムダリプレッサーCIの切断によって起こることが知られている。4-1-2の結果より、DnaB蛋白質を過剰発現させても溶原化したラムダフェージの誘発は上昇しない事が言えた。つまり、SOS応答が起こるほど顕著に二重鎖切断は起こっていないと考えられる。

さらに、Shimizuらは紫外線照射によって誘起される非相長的組換えはRecA蛋白に依存しない事を示したが、DnaB過剰発現によって上昇する非相長的組換えにRecA蛋白が関与しているかどうかを検討した。4-1-3の結果より、DnaB蛋白を過剰発現したときに誘起される非相長的組換えにはRecA蛋白が関与していない事を示唆する。これは4-1-5で示した組換え部位の塩基配列の特徴とも関係しているかもしれない。

現在まで、*gyrA* (Shimizu *et al.*, 1995)、*recJ* (Ukita *et al.*, 1996)、*recQ* (Hanada *et al.*, 投稿中)、*hupAhupB* (投稿準備中)、*fis*、*himA*、*himD* (Shanado *et al.*, 投稿中)などが非相長的組換えに関与する遺伝子群としてIkedaらのグループによって明らかにされてきた。

野生株、*gyrA*変異株、*recJ*変異株、*recQ*変異株、*hupAhupB*二重変異株それぞれから得られた Spi^+ フェージの組換え部位の塩基配列の解析が行われている(Yamaguchi *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1995; Ukita *et al.*, 1996; Shanado *et al.*, 投稿中)。いずれの組換え

体にも短い相同性が見られたが、DnaBを過剰発現して得られたSpi⁺ファージの組換え部位の相同性は平均7.8bpという長さを持ち、これは野生株を紫外線処理して得られた組換え体の組換え部位で見られた相同性の長さの平均8.4bp (Yamaguchi *et al.*, 1995)と同じである。その他に、DnaB蛋白の過剰発現した株と*recQ*変異株では、(1)紫外線照射による染色体の損傷がない状態でSpi⁺ファージの形成頻度を上昇させている点で、(2)また、新たな組換えの高発部位を出現させる点で、その特徴が似通っている。

recQ、*uvrD*、*helD*は大腸菌のDNAヘリケースをコードする遺伝子群である。*recQ*変異株では非相同的組換えに関与していることが示されている(Hanada *et al.*, 投稿中)が、*uvrD*、*helD*いずれの変異体も非相同的組換えには関与していない(Shanado and Ikeda, personal communication)。また*recBCD*遺伝子もヘリケースをコードしているが、非相同的組換えには関与していない。本研究はDNA複製に注目しているが、非相同的組換えに関与している遺伝子である*dnaB*はヘリケース活性を有している。Hanadaらは、RecQ蛋白が非相同的組換えを押さえしている可能性を示したが、この事実に基づいて次のように考えられる。DnaB蛋白が過剰になると、DNA複製機構からあぶれたDnaB蛋白とRecQ蛋白が競合的に働いて*recQ*変異株と同様な状態になる。つまり、RecQ蛋白によって抑制されていた非相同的組換えが過剰発現しているDnaB蛋白によって誘発されている可能性が考えられる。

上に挙げた非相同的組換えにおけるRecQ蛋白の機能は図4-2-1(A)に示したように、短い相同性で出来た組換え中間体を分解してしまうことを予想している(Hanada *et al.*, 投稿中)。ここで私は、DnaB蛋白とRecQ蛋白とのhelicase活性の方向性及び基質に対する結合性の違いから、DnaB蛋白質を過剰発現した時に、それぞれが競合的に働くことを予想した。RecQはその*in vitro*の解析から、突出した3'端の単鎖DNA上からしか対合している二重鎖DNAに侵入できない。これは短い相同性を利用して接合しているDNA鎖同志を剥がすのに都合よく働く。一方、過剰発現したDnaB蛋白は複製に関わる分子以外は自由に単鎖DNAに結合する。この自由なDnaB蛋白はRecQが侵入しようとしている単鎖DNAに結合して5'→3'方向に進み、RecQ蛋白が3'末端から5'方向へ進む事を阻止する。その結果

的、*recQ*変異株が紫外線照射しないときに非相動的組換え頻度を上昇させるのと同じように、過剰発現したDnaB蛋白質による非相動的組換え頻度の上昇が起こる。

また別の考えとして、(2) replisome中でtandemに存在するDnaB helicaseが誘導する二重鎖切断のモデルである。DNA複製が行われている場所は多くの蛋白が複合体を形成しており、それらをまとめてreplisomeと呼んでいる(図4-2-2)。この中でDnaB helicaseは6量体からなる環状構造が1分子含まれるだけと考えられている。DnaB蛋白を過剰発現した場合には、大腸菌複製開始部位で最初に形成されるprimosomeに多数のDnaB蛋白が集合していくつもの環状分子が形成される。このようにtandemに並んだDnaBに続いてreplisomeが作られてDNA複製が開始する。並んだDnaB蛋白のうち複製に関わるのはDNA polymerase III ホロ酵素のtauサブユニットに直接結合している最後尾の分子だけである。前方の分子はそれぞれreplisomeとは関係なく二重鎖DNAの開裂を行って進むであろう。replisomeという足かせを持ったDnaB蛋白分子に比べて、フリーなDnaB蛋白分子はどんどん先に進み、単鎖DNA部分を露出していく。単鎖DNAは二重鎖の時に比べて極端に物理的ストレスや化学的反応に弱く、切断を起こしやすい。この切断の起こった部分が、続いてやってくる複製フォークによって複製されずに、二重鎖末端が生成する。このモデルの特色は、切断を起こすのに特殊な配列を要求しないことである。特に図4-1-4に挙げた組換え部位の分布が非常に広範囲にわたっている(25 site)こと、また図4-1-5に挙げた組換え部位の塩基配列に特徴がないことによって支持されよう。切断を起こした後は、エキソヌクレアーゼやヘリケースによるプロセスを受けて、短い相同性同志での結合を経て、非相動的組換え体が生成すると考えられる。

UV dose (J/m ²)	plasmid	burst size	Spi frequency		
			(x10 ⁻⁸)	SE	ratio
0	pBR-KmA2	49.	2.3	0.5	1
	pRLM6	14.	190.0	65.0	83.0
	no plasmid	43.	1.2	0.4	0.5
20	pBR-KmA2	31.	66.0	27.0	1
	pRLM6	11.	220.0	45.0	3.3
	no plasmid	31.	31.0	12.0	0.5
40	pBR-KmA2	14.	190.0	41.0	1
	pRLM6	5.7	480.0	99.0	2.5
	no plasmid	18.	170.0	29.0	0.9

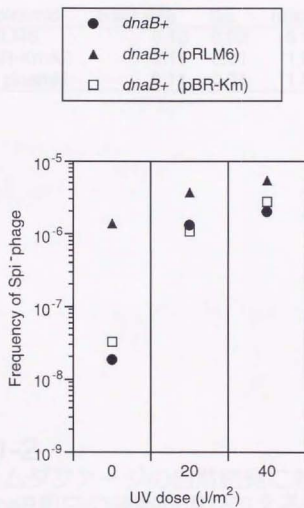
Spi frequency = Spi phage (PFU/ml) / Total phage (PFU/ml)

表 4-1-1

DnaB蛋白の過剰発現によって上昇する
Spi ファージの形成頻度に与える影響

☒ 4-1-1

DnaB蛋白の過剰発現によって
Spi⁻ファージ形成頻度を与える影響



plasmid	burst size	SE	ratio
pRLM6	0.10	0.02	0.91
pBR-KmA2	0.11	0.01	1.00
no plasmid	0.11	0.01	1.00

表 4-1-2

ラムダファージの自然誘発に対して
DnaB蛋白の過剰発現が与える影響

UV dose (J/m ²)	plasmid	relevant genotype	burst size	Spi frequency		
				(x10 ⁻⁸)	SE	ratio
0	pBR-KmA2	<i>rec+</i>	38.	2.3	1.4	1
		<i>recA306</i>	23.	3.2	1.3	1.4
	pRLM6	<i>rec+</i>	9.	200.0	28.0	1
		<i>recA306</i>	15.	83.0	22.0	0.45
	no plasmid	<i>rec+</i>	24.	3.8	2.9	1
		<i>recA306</i>	17.	8.4	7.4	2.2
20	pBR-KmA2	<i>rec+</i>	23.	63.0	14.0	1
		<i>recA306</i>	4.7	61.0	31.0	0.96
	pRLM6	<i>rec+</i>	3.6	320.0	37.0	1
		<i>recA306</i>	3.6	180.0	37.0	0.56
	no plasmid	<i>rec+</i>	14.	77.0	31.0	1
		<i>recA306</i>	3.	150.0	62.0	1.9

Spi frequency = Spi phage (PFU/ml) / Total phage (PFU/ml)

表 4-1-3

DnaB蛋白の過剰発現によって上昇するSpiファージの
形成頻度に与える*recA* 変異の影響

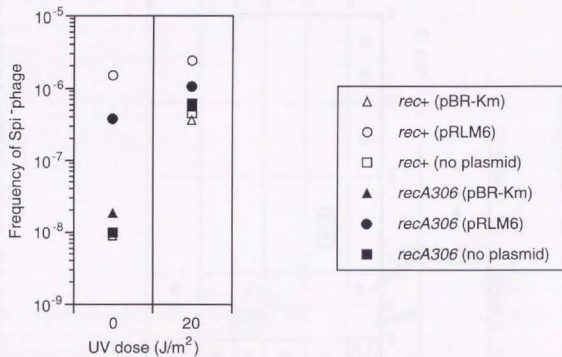
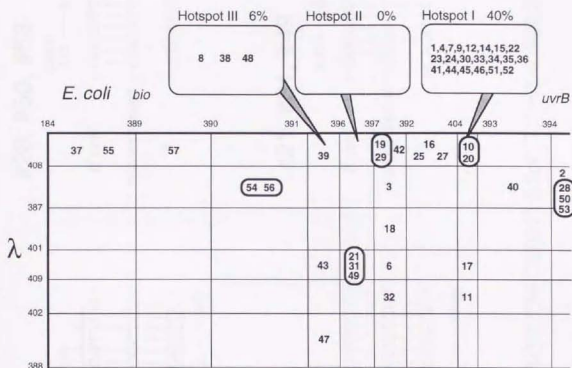


図 4-1-3

DnaB蛋白の過剰発現によって上昇するSpi⁻ファージの形成頻度に与える*recA*変異の影響

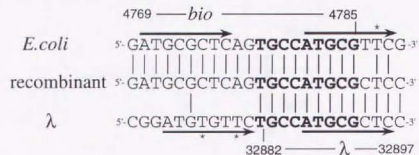
☒ 4-1-4

DnaB蛋白を過剰発現させることによって生成する
組換え型ファージの組換え部位の分布

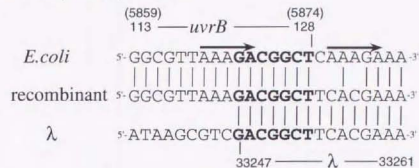


縦軸は大腸菌 *bio* の遺伝子及び *uvrB* 遺伝子上のプライマー番号、縦軸はラムダファージ DNA 上のプライマー番号を示している。それぞれのプライマーの塩基配列と染色体 DNA 上の位置は、第 7 章にまとめて記す。
組換え型ファージを轉型として用いた大腸菌側と λ 側のプライマーで組換え部位を挟むようにして PCR を行った。最も小さな PCR 産物が得られたプライマーの組を、組換え部位が存在する範囲として分布位置を決定した。また、大腸菌側・ λ 側それぞれ #387 と #404 プライマーで PCR を行い、Yamaguchi らが以前単離した Hotspot I で組換わっているファージを参照に用いて、同じ長さの PCR 産物を示すものを Hotspot I として分類した。同様にして Hotspot II も分類した。図中の Hotspot の右側のパーセンテージは組換え体全体に対するそれぞれの Hotspot が占める割合である。また、同じ塩基配列で組換わっているものは太い枠で囲った。

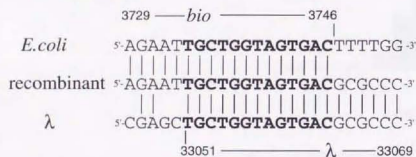
Hotspot I



#28, #50, #53



Hotspot II



#21, #31, #49

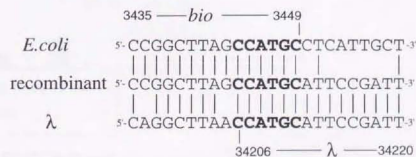
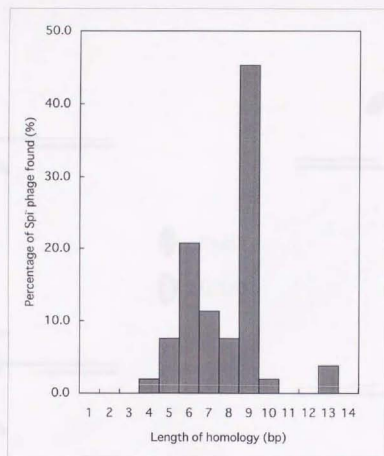


図 4-1-5 DnaB蛋白を過剰発現させた時に得られるSpi⁺ファージの組換え部位の塩基配列

組換え部位のjunction周辺の塩基配列を、ラムダファージと大腸菌遺伝子の塩基配列をもとにそれぞれ比較して、親DNAの組換え部位を特定した。図中の太字は大腸菌とラムダファージの組換え部位に見られる相同性の長さを表す。同一塩基は縦線で結んで表現してある。矢印は5塩基以上の順向き繰り返し配列を示している。

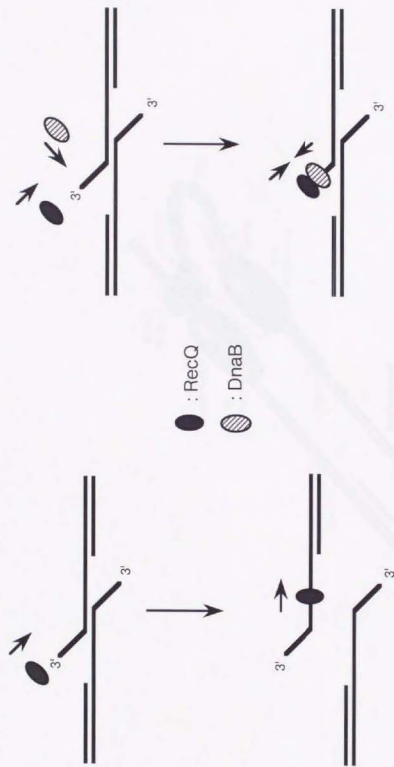


DnaB過剰発現株（平均塩基長 7.8bp）

表 4-1-5

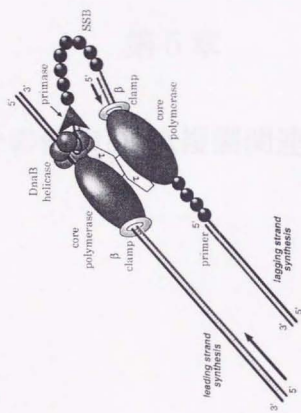
DnaB蛋白を過剰発現させることによって生成する組換え型ファージの組換え部位に存在する相同配列の長さの分布

横軸は組換え部位に存在する親DNA間の相同配列の塩基長(bp)、縦軸は組換え体全個数に対してある同じ長さの相同配列を持った組換え体の占める割合(%)である。



(A) DnaB蛋白が過剰発現していないとき (B) DnaB蛋白が過剰発現しているとき

図 4-2-1 DnaB-RecQ競合モデル



☒ 4-2-2 replisome

第5章

その他のDNA複製関連因子

これまで、DNA複製に必須な*dnaB*遺伝子の変異株が非相同的組換え頻度を野生株に比べて有意に低下させる事を明らかにした。その他のDNA複製因子についても、Spiアッセイを用いて非相同的組換えに対する影響を調べた。

5-1

DnaA

5-2

DnaC

5-3

DNA ligase

5-4

λO蛋白

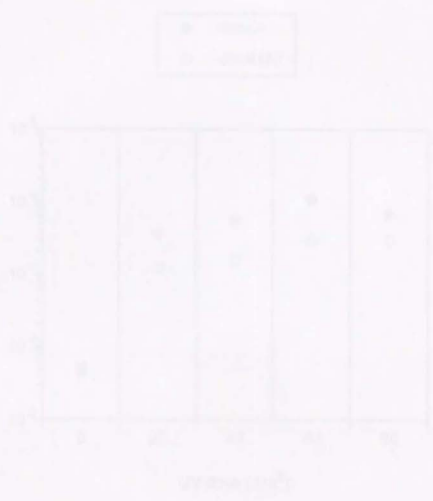
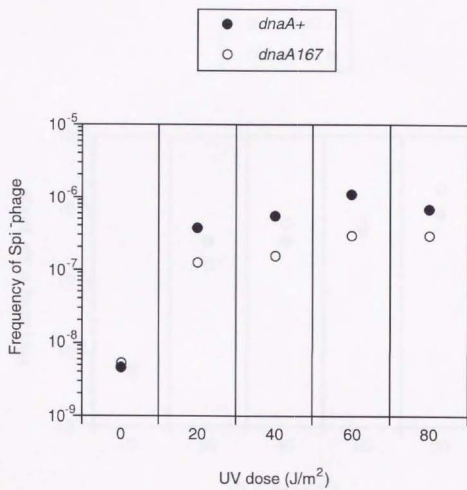


図 5-1 *dnaB* 遺伝子の変異株が非相同的組換え頻度を野生株に比べて有意に低下させる事を明らかにした。



☒ 5-1 *dnaA167* 変異が与える影響

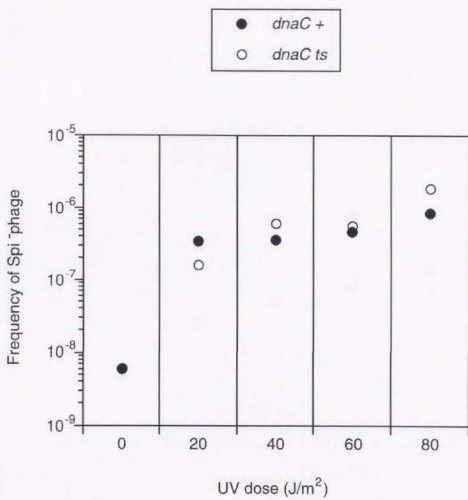


図 5-2 *dnaCts* 変異が与える影響

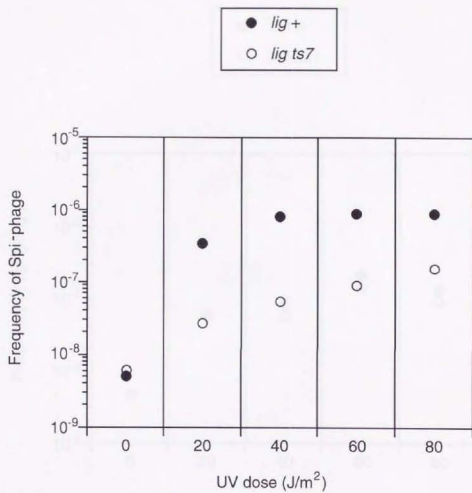
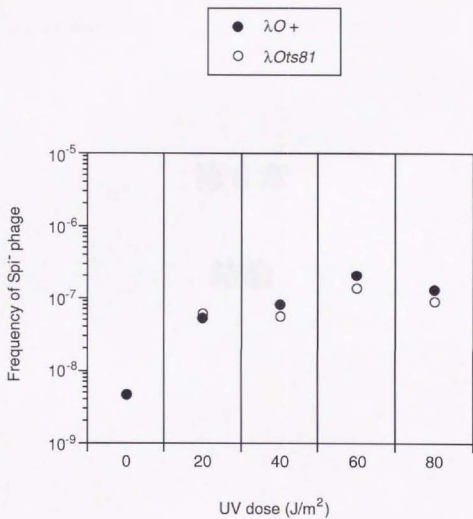


図 5-3 Ligase *ts7* 変異が与える影響



☒ 5-4 $\lambda Ots81$ 変異が与える影響

第 5 章 結論

第 6 章

結論

第2章において、紫外線によって誘発する非相等的組換えにDNA複製が関与していることを示した。第3章において、オキシリン酸によって誘発するDNA gyrase依存性の非相等的組換えにDNA複製が関与していることを示した。第4章において、DnaB蛋白を過剰発現することによって非相等的組換えが誘発する現象を初めて見つけた。以上より、非相等的組換えにはDNA複製が関与していると結論づけることができる。

本研究に用いた大量測定用ガラス管

1. 測定用ガラス管の製造

2. 測定用ガラス管の洗浄

3. 測定用ガラス管の乾燥

4. 測定用ガラス管の検出

5. 測定用ガラス管の保管

6. 測定用ガラス管の廃棄

7. 測定用ガラス管の再利用

8. 測定用ガラス管のメンテナンス

9. 測定用ガラス管の故障

10. 測定用ガラス管の修理

11. 測定用ガラス管の交換

12. 測定用ガラス管の廃棄

13. 測定用ガラス管の再利用

14. 測定用ガラス管のメンテナンス

15. 測定用ガラス管の故障

16. 測定用ガラス管の修理

17. 測定用ガラス管の交換

18. 測定用ガラス管の廃棄

19. 測定用ガラス管の再利用

20. 測定用ガラス管のメンテナンス

21. 測定用ガラス管の故障

22. 測定用ガラス管の修理

23. 測定用ガラス管の交換

24. 測定用ガラス管の廃棄

25. 測定用ガラス管の再利用

26. 測定用ガラス管のメンテナンス

27. 測定用ガラス管の故障

28. 測定用ガラス管の修理

第7章

実験材料及び実験方法

7-1

本研究に用いた大腸菌株及びプラスミド

●大腸菌株

strain#	parent	relevant genotype	prophage
HI1756	FI14	<i>dnaB⁺ maI::Tn9</i>	λ cI857
HI2151	FI14	<i>dnaBts14 maI::Tn9</i>	λ cI857
HI2160	FI14	<i>dnaB⁺ maI::Tn9 ΔrecA306::Tn10</i>	λ cI857
HI2161	FI14	<i>dnaBts14 maI::Tn9 ΔrecA306::Tn10</i>	λ cI857
HI2158	FI14	<i>dnaB⁺ maI::Tn9</i>	λ cI857 <i>xis1</i>
HI2159	FI14	<i>dnaBts14 maI::Tn9</i>	λ cI857 <i>xis1</i>
HI2154	594	<i>dnaB⁺ maI::Tn9</i>	λ cI857
HI2155	594	<i>dnaBts252 maI::Tn9</i>	λ cI857
HI1760	HR6	<i>dnaC⁻</i>	λ cI857
HI1771	HR6	<i>dnaCts</i>	λ cI857
HI2156	594	<i>dnaA⁺ zid::Tn10</i>	λ cI857
HI2157	594	<i>dnaAts167 zid::Tn10</i>	λ cI857
HI1669	N2668	<i>ligts7 strA</i>	λ cI857
HI1699	N1623	<i>lig⁺</i>	λ cI857
HI1547	594		λ cI857 <i>O⁺</i>
HI1691	594		λ cI857 <i>Ots81</i>
HI2031	594		λ papa
Ymel		<i>supE supF mel-1</i>	-
WL95		<i>supE supF metB trpR hsdR tonA</i>	P2
FI14		<i>sup0</i>	-
594		<i>sup0</i>	-

●プラスミド

plasmid#	gene	drag resistant	comment
pRLM6	<i>dnaB</i>	Km ^R	pKC7 (pBR322 var.)
pBR-KmA2	-	Km ^R	pBR322

上記したラムダファージ溶原菌は全てmonoclonogenであることを#184, #bio-in, #185のプライマーを用いたPCR法によって確認した。

7-2 λ Spi⁻ アッセイ

大腸菌の λ cI857 溶原菌を中型試験管中の 2 ml の入培地に植菌する。摂氏 30 度で一晩振盪培養を行う。一晩培養液を、 λ YP 培地で 50~100 倍に希釈し、摂氏 30 度で細胞数が $1 \sim 2 \times 10^8$ /ml になるまで培養する。培養終了後、水中に置き、培養液の一部をとり、血球計算版にて細胞数を確認する。直径 8.5 cm のガラスシャーレに培養液を 2 ml とり、挿らしながら 15 W の殺菌灯で紫外線を照射する。用いるラムダファージには cI857 変異が入れてあるので、紫外線照射によって誘発は起こらない。紫外線照射後、培養液をシャーレから予め水中で冷却しておいた中型試験管に移す。摂氏 42 度で 15 分間培養後、摂氏 37 度で 90 分間から 2 時間培養することにより誘発を行う。これを溶菌液とする。クロロホルムを 2~3 滴加え更に摂氏 37 度で 5 分間培養する。得られた溶菌液を小試験管に移し、摂氏 4 度で 20 分間、HITACHI の PRPS4 ローターを用いて 3000 rpm で遠心分離を行い、クロロホルム、細胞残渣を沈殿させる。上清を注意深く 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し替える。各溶菌液に対して希釈系列を作り、指示菌（大腸菌 Ymel 株）にプレートする。プレートは、 λ 上層寒天培地を 2.0 ml、指示菌の一晩培養液を 0.1 ml、希釈した溶菌液を 0.05~0.1 ml の条件で寒天培地に注ぎ込みを行う。摂氏 37 度で一晩培養する。ここで得られるプラーク数から溶菌液中の全ファージの濃度を計算する。この濃度から、ファージ数が 2×10^7 PFU/ml になるような溶菌液の容量を求め、その容量の溶菌液を P2 溶原菌を指示菌（大腸菌 WL95 株）としてプレートする。プレートは、 λ T 上層寒天培地を 2.0 ml、指示菌の一晩培養液を 0.1 ml、必要量の溶菌液を λ T 寒天培地に注ぎ込みを行う。摂氏 37 度で一晩培養する。ここで得られるプラークが Spi⁻ 型ファージのものである。得られたプラーク数をプレートしたファージ数で除した数を非相同期組換えの頻度とする。

λ 培地 (11 あたりトリプトンを 10g、NaCl を 5g)

λ 上層寒天培地 (λ 培地に寒天を 0.5% 加えたもの。)

λ 寒天培地 (λ 培地に寒天を 1.2% 加えたもの。)

λ T 上層寒天培地 (11 あたりトリプティケースベプトンを 10g、NaCl を 5g、寒天を 5g)

λ T 寒天培地 (寒天を 12g にする以外は、 λ T 上層寒天培地と同じ)

λ YP 培地 (11 あたりトリプトンを 10g、NaCl を 10g、滅菌・冷却後、M9A 溶液 (下記) 10 ml、1 M MgSO₄ を 1.5 ml 加える。)

M9A 溶液 (11 あたり無水 Na₂PO₄ を 150g、KH₂PO₄ を 75g)

7-3 シングルパースト法

起源が互いに独立なSpi型入ファージの収集法

誘発させるべき培養液を適当な数の試験管に分割して熟誘発を行えば、各試験管から得られるSpi型入ファージは、起源が互いに独立になっている。

紫外線照射までは入Spi⁺アッセイと同様である。紫外線照射後、培養液をシャーレから予め氷中で冷却しておいた中型試験管に移す。0.5mlあたり1個のSpi型入ファージを得られるように、この段階で入YP培地で適当な希釈をおこなう。ここから、0.5mlづつ冷却しておいた小試験管に移しアルミキャップをかぶせる。小試験管は、少なくとも収集したいサンプルの数だけ準備しておく。小試験管ラックに小試験管をセットし、ラックごと摂氏42度で15分間培養後、摂氏37度で90分間から2時間培養する。クロロホルムを1滴加え更に摂氏37度で5分間培養し溶菌液とする。得られた溶菌液を摂氏4度で、HITACHIのPRPS4ローターを用いて3000rpmで遠心分離を行い、クロロホルム、細胞残渣を沈殿させる。上清を注意深く1.5mlのエッペンドルフチューブに移し替える。0.01mlの溶菌液をP2溶原菌(WL95)を指示菌としてプレートする。プレートは、入T上層寒天培地を2.0ml、指示菌の一晚培養液を0.1ml、0.01mlの溶菌液を入T寒天培地に行う。一つの試験管から一つだけブランクを楊枝で1mlのM9緩衝液(下記)に回収する。ここで回収したファージは、ほとんどがSpi型ファージであるはずだが、P2溶原菌でブランクを形成できない野生型ラムダファージが混入している可能性があるため、P2ファージを溶原化していない大腸菌上、例えばYmel上でシングルブランク分離を行う。Spi型ファージを回収したM9緩衝液の0.01mlをYmelに対しプレートする。得られたブランクのうち他のブランクとよく分離しているものをパスツールピペットを用い、指示菌のローン、上層寒天培地、寒天培地とともに回収する。中型試験管に入YP培地を1ml、Ymelの一晚培養液を0.03mlを用意して、ここに回収したブランクを移す。摂氏37度で5~6時間、振盪培養を行い、クロロホルムを1滴添加しさらに5分間振盪し、溶菌液を得る。得られた溶菌液を摂氏4度で、HITACHIのPRPS4ローターを用いて3000rpmで遠心分離を行い、クロロホルム、細胞残渣を沈殿させる。上清を注意深くバイアル瓶や、1.5mlのエッペンドルフチューブに移し栓をして摂氏4度で保存する。

M9緩衝液(純水950mlにM9A溶液(下記)を40mlを加え滅菌する。滅菌・冷却後M9B溶液(下記)を10ml加える。)

M9A溶液(1lあたり無水Na₂PO₄を150g、KH₂PO₄を75g)

M9B溶液(1lあたりNaClを50g、NH₄Clを100g、MgSO₄を20g)

7-4 ファージ粒子を鋳型にしたPCR法

ラムダファージのDNAを精製することなく溶菌液を純水で希釈するだけでPCRに用いることができる。

溶菌液のファージ粒子の濃度を、Ymelを指示菌としてプレートし求める。溶菌液を5～ 10×10^6 PFU/mlになるように滅菌水で希釈する。この時点でファージ粒子は、破裂しファージゲノムが溶液中に出てくる。夾雑酵素を失活させるため、沸騰水中で10分間処理する。これを、鋳型DNA溶液とする。摂氏-20度で保存する。反応は、以下の条件で10ml中で行う。鋳型DNA溶液は、1 μ l用いる。つまり、鋳型DNAは1チューブ中に5000～10000コピー存在することになる。プライマーは、 10×10^{-6} Mになるよう調整し、終濃度が、 0.4×10^{-6} Mとなるように用いる。dNTPは、各塩基が2.5mMの混合液を用意し、終濃度が、0.2mMとなるように用いる。DNAの伸長反応には、TaKaRa Taqを2.5U用いた。TaKaRa Taqに添付の10倍濃度の反応用緩衝液を1/10容(1 μ l)加える。

PCRは、摂氏94度2分間の前処理の後、摂氏94度30秒間 (DNAの変性)、摂氏55度30秒間 (プライマーのアニーリング)、72度2分間 (DNAの伸長) の処理を25～30回繰り返す。その後、摂氏72度8分間後処理を行う。上記の処理は、Perkin Elmer Cetus 社の Gene Amp PCR System 9600 により行った。

PCR産物は直接、電気泳動による確認、塩基配列決定のための鋳型に用いた。

No.408	lam	33122	5'-GAGTTCAGCCATGAACGCTT-3'	lam	33103
No.387	lam	33559	5'-GATATGATCATCAAGGCCGC-3'	lam	33540
No.401	lam	34002	5'-CGCTCGTAACTAAACAGGAG-3'	lam	33983
No.409	lam	34235	5'-ATGGATGCAAGCTGCAATCG-3'	lam	34216
No.402	lam	34521	5'-GTCCGAGAATAACGAGTGGA-3'	lam	34502
No.388	lam	35091	5'-CATAACATGCAGTGGACGCC-3'	lam	35072
bio-in	bio	211	5'-GCGCTGGATATAGAACGTAT-3'	bio	191
No.185	lam	28068	5'-TTGCATCATCTCGTCGCGAA-3'	lam	28049
No.184	lam	27411	5'-TCAGCTGCGTCGTTTGACAT-3'	lam	27430
No.389	bio	1012	5'-ATAAAGCAACCGGCTTCACC-3'	bio	1031
No.390	bio	1896	5'-GCAAGATCGTCCGTTGTCAT-3'	bio	1915
No.391	bio	3026	5'-GAATATTACAACGCGCAGC-3'	bio	3045
No.396	bio	3440	5'-TTAGCCATGCCTCATGCTG-3'	bio	3459
No.397	bio	3881	5'-CGTCGCTGGCGGTCATTCGC-3'	bio	3900
No.392	bio	4185	5'-GCTGCATGGCAACGGTTAAT-3'	bio	4204
No.403	bio	4517	5'-AATCTCGCAGTGCAGTGGTG-3'	bio	4536
No.404	bio	4761	5'-TTGATGATGCGCTCAGTGCC-3'	bio	4780
No.393	bio	4925	5'-GGAGTGATTGCTCGTGAGTA-3'	bio	4944
No.394	uvrB	101	5'-TGCACGCGAATTGGCGTTAA-3'	uvrB	120

表7-4 PCRに用いたプライマーの塩基配列

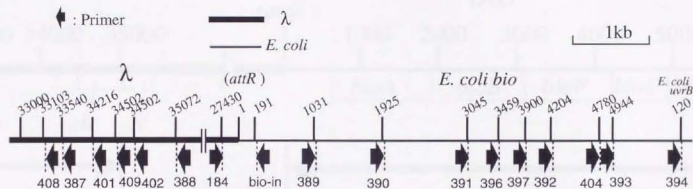


図 7-4 PCRに用いたプライマーの位置

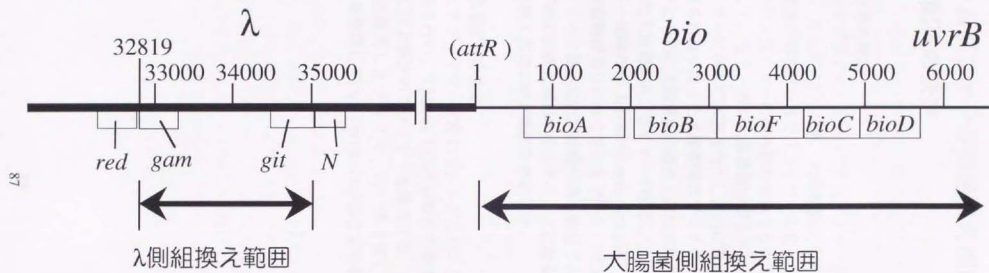


図 7-4(b) Spi⁻アッセイで検出できる組換え部位の範囲

7-5 Spi⁻型ラムダファージの組換え部位の分布 及び塩基配列の決定

(1) 組換え部位の分布の決定

表7-4、図7-4に示すプライマーを用いてラムダファージを鋳型にしたPCR法により、組換え部位を特定する。ラムダファージ側、大腸菌側のプライマーからそれぞれ一つを選び、PCRを行う。PCR産物が得られるまでプライマーの組み合わせをかえて繰り返す。PCR産物が得られれば、そのプライマーの組み合わせのうち片方、たとえばラムダファージ側のプライマーを固定して、もう一方の大腸菌側のプライマーを一段階外側 (*attR*から*uvrB*への方向)のプライマーにかえてPCRを行う。この作業をPCR産物が得られなくなるまで行う。PCR産物が得られなくなった大腸菌側のプライマーと最後にPCR産物が得られた大腸菌側のプライマーとの間に大腸菌側の組換え部位が存在することになる。つぎに、最後にPCR産物が得られた大腸菌側のプライマーを固定して、今まで固定していたラムダファージ側のプライマーを一段階外側 (*attR*から*attL*への方向)のプライマーにかえてPCRを行う。この作業をPCR産物が得られなくなるまで行う。PCR産物が得られなくなったラムダファージ側のプライマーと最後にPCR産物が得られたラムダファージ側のプライマーとの間にラムダファージ側の組換え部位が存在することになる。以上の作業で、ラムダファージ側、大腸菌側の組換え部位の存在範囲を特定した。

(2) 組換え部位の塩基配列の決定

表7-4、図7-4に示すプライマーを用いてシングルバースト法により得られたSpi⁻ファージを鋳型にしたPCRを行い、0.8kb以下のPCR断片を得る。スピナラムmicrocon-100 (AMICON)を用いてPCR断片のプライマーを除去する。このPCR断片を鋳型DNAとし、PCR断片を得るのに使用したプライマーの一方を用い、ABI PRISM 310 sequencer (PERKIN ELMER)を使用してDye Terminator法により塩基配列を決定した。

7-6 ラムダファージの自然誘発の測定

野生型 λ ファージ(λ papa)溶原菌を中試験管中2mlの λ 培地にて摂氏30度で一晩培養する。一晩培養液をTY培地で1/100に希釈し、摂氏30度で3時間振盪培養する。菌濃度が 2×10^8 /mlになったら、その一部を用いて適当な希釈をM9緩衝液で行い、 λ 寒天培地に播いてコロニー数を測定する。濃度が 2×10^8 /mlになった培養液をさらにTY培地で1/50に希釈し、摂氏30度で2時間振盪培養する。クロロホルムを1滴添加してさらに5分間振盪し、溶菌液を得る。得られた溶菌液を摂氏4度で、HITACHIのPRPS4ローターを用いて3000rpmで遠心分離を行い、クロロホルム、細胞残渣を沈殿させる。上清を、大腸菌Ymel株でプレートし自発的に誘発したファージ数を検出する。得られたコロニー数でファージ数を割り、バーストサイズを計算する。

7-7 ラムダファージの一段増殖

大腸菌を中試験管中2mlの λ 培地にて摂氏30度で一晩培養する。一晩培養液を λ YP培地で1/50に希釈し、摂氏30度で3時間振盪培養する。菌濃度が 2×10^8 /mlになったら、その一部を用いて適当な希釈をM9緩衝液で行い、 λ 寒天培地に播いてコロニー数を測定する。濃度が 2×10^8 /mlになった培養液5mlを15ml遠沈管に移し、摂氏4度で、TOMYのTS-7ローターを用いて5分間、3000rpmで遠心分離を行い、細胞を沈殿させる。上清を取り除き、得られた沈殿を λ 希釈緩衝液(10mM Tris-Cl(pH7.5), 10mM MgSO₄)を0.5ml加え、丁寧に懸濁する。 λ c1857溶菌液を100~300ml加え(moi=2)、摂氏30度で15分間静置し、ファージの吸着を行う。氷冷した λ YP培地を加えて5mlにする。直径8.5cmのガラスシャーレに懸濁液を2mlとり、攪拌しながら、紫外線を照射(0, 20J/m²)する。紫外線照射後、懸濁液を中型試験管に移す。摂氏42度で15分間培養後、摂氏37度で2時間培養してファージの誘発を行う。クロロホルムを1滴添加してさらに5分間振盪し、溶菌液を得る。得られた溶菌液を摂氏4度で、HITACHIのPRPS4ローターを用いて3000rpmで遠心分離を行い、クロロホルム、細胞残渣を沈殿させる。上清を、大腸菌Ymel株でプレートしファージ数を検出する。得られたコロニー数でファージ数を割り、バーストサイズを計算する。

7-8 大腸菌の形質転換

(1) コンピテントセルの調製

形質転換すべき大腸菌をLB培地（1lあたり、トリプトンを10g、イーストエキストラクトを5g、NaClを10g、NaOHでpHを7.0にする）に植菌する。適当な温度で一晩培養する。この一晩培養液を50～100倍にLB培地で希釈する。細胞数が、1mlあたり 4×10^8 /ml (mid-log phase)になるまで培養する。予め氷冷した50ml遠心管に移し、氷上で5～10分間静置する。摂氏4度で1100xg、10分間遠心し、上清を除く。予め氷冷した10%(v/v)グリセロール溶液を20ml加える。丁寧に再懸濁し、摂氏4度で1100xg、10分間遠心し、上清を除く。さらに氷冷してある10%グリセロール溶液を20ml加える。丁寧に再懸濁し、摂氏4度で1100xg、10分間遠心し、上清を除く。最後に氷冷してある10%グリセロール溶液を、50ml培養液あたり1ml加える。丁寧に再懸濁し、1.5mlのエッペンドルフチューブに100 μ lずつ分注し、液体窒素中で急速凍結させ、摂氏-80度で保存する。

(2) プラスミドDNAの大腸菌への導入

1.5mlのエッペンドルフチューブ中に、1ng程度のDNA溶液を用意する。摂氏-80度で保存しておいたコンピテントセルを氷上で融解し、その40 μ lをプラスミド溶液と穏やかに混和する。氷冷したキュベットに混合溶液を移し、高電圧パルスをかける。これには、Bio-Rad社のGene-Pulser Apparatus (2.5kV, 25 μ F and 200 ohm parallel resistor)とGene-Pulser Cuvette(0.2cm gap)を用いた。すぐに、予め適当な温度に保温しておいたLB培地を1ml加え、穏やかにキュベット中で混和する。中型試験管に移し、適当な温度で1時間振盪培養する。その後、適当な選択培地に播く。適当な温度で一晩培養し、コロニーを形成させる。

<謝辞>

本研究は、東京大学医科学研究所生物物理化学研究部に於いて、池田日出男教授のもとに行われました。薬学部4年生の卒業研究時代から数えて七年間、叱咤激励しつつ長きに亘って御指導下さった池田教授に感謝致します。時に屋外に逃亡しがちな私が研究を続けてくれたのも、研究をはじめとする行動一般に自主性を重んじて下さったおかげです。

本研究には、生物物理化学研究部の方々、特にSpiグループの先輩・同期・後輩たちの協力が必要でした、改めて感謝します。

最後に、人生の半ばまで学生を続けることに有形無形の援助をしてくれた両親に感謝します。

Alfano, C., and McMacken, R. (1989).

J Biol Chem **264**,10699-708.

Ordered assembly of nucleoprotein structures at the bacteriophage lambda replication origin during the initiation of DNA replication.

Alt, F. W., Kellems, R. E., Bertino, J. R., and Schimke, R. T. (1978).

J Biol Chem **253**,1357-70.

Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells.

Arai, K., and Kornberg, A. (1981).

J Biol Chem **256**,5267-72.

Mechanism of dnaB protein action. IV. General priming of DNA replication by dnaB protein and primase compared with RNA polymerase.

Arai, K., and Kornberg, A. (1981).

J Biol Chem **256**,5260-6.

Mechanism of dnaB protein action. III. Allosteric role of ATP in the alteration of DNA structure by dnaB protein in priming replication.

Arai, K., and Kornberg, A. (1981).

J Biol Chem **256**,5253-9.

Mechanism of dnaB protein action. II. ATP hydrolysis by dnaB protein dependent on single- or double-stranded DNA.

Arai, K., Yasuda, S., and Kornberg, A. (1981).

J Biol Chem **256**,5247-52.

Mechanism of dnaB protein action. I. Crystallization and properties of dnaB protein, an essential replication protein in *Escherichia coli*.

Asai, T., Bates, D. B., and Kogoma, T. (1994).

Cell **78**,1051-61.

DNA replication triggered by double-stranded breaks in *E. coli*: dependence on homologous recombination functions.

Biswas, S. B., Chen, P. H., and Biswas, E. E. (1994).

Biochemistry **33**,11307-14.

Structure and function of *Escherichia coli* DnaB protein: role of the N-terminal domain in helicase activity.

Bramhill, D., and Kornberg, A. (1988).

Cell **54**,915-8.

A model for initiation at origins of DNA replication. [Review].

Campbell, A. (1962).

Adv Genet **11**,101-146.

Clark, A. J., and Margulies, A. (1965).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **53**,451-459.

Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K12.

D'Arpa, P., and Liu, L. F. (1989).

Biochim Biophys Acta **989**,163-77.

Topoisomerase-targeting antitumor drugs. [Review].

D'Arpa, P., Beardmore, C., and Liu, L. F. (1990).

Cancer Res **50**,6919-24.

Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons.

Gall, J. G. (1974).

Proc Natl Acad Sci U S A **71**,3078-81.

Free ribosomal RNA genes in the macronucleus of Tetrahymena.

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Nash, H. A. (1976).

Proc Natl Acad Sci U S A **73**,3872-6.

DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA.

Gellert, M., O'Dea, M. H., Itoh, T., and Tomizawa, J. (1976).

Proc Natl Acad Sci U S A **73**,4474-8.

Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase.

Goss, W., Deitz, W., and Cook, T. (1964).

J. Bacteriol. **88**,1112-1118.

Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*.

Hirota, Y., Ryter, A., and Jacob, F. (1968).

Cold Spring Harb Symp Quant Biol **33**,677-93.

Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division.

Holt, I., Cooper, R. G., and Hopkins, S. J. (1991).

Eur J Clin Invest **21**,479-84.

Relationships between local inflammation, interleukin-6 concentration and the acute phase protein response in arthritis patients.

Ikeda, H., Aoki, K., and Naito, A. (1982).

Proc Natl Acad Sci U S A **79**,3724-8.

Illegitimate recombination mediated in vitro by DNA gyrase of *Escherichia coli*: structure of recombinant DNA molecules.

Kim, S., Dallmann, H. G., McHenry, C. S., and Marians, K. J. (1996).

J Biol Chem **271**,21406-12.

tau couples the leading- and lagging-strand polymerases at the *Escherichia coli* DNA replication fork.

Kogoma, T., Cadwell, G. W., Barnard, K. G., and Asai, T. (1996).

J Bacteriol **178**,1258-64.

The DNA replication priming protein, PriA, is required for homologous recombination and double-strand break repair.

Kornberg, A., and Baker, T. A. (1991).

DNA Replication, 2nd Edition, Volume , ed. eds. (New York: Freeman).

Kornreich, R., Bishop, D. F., and Desnick, R. J. (1990).

J Biol Chem **265**,9319-26.

Alpha-galactosidase A gene rearrangements causing Fabry disease. Identification of short direct repeats at breakpoints in an Alu-rich gene.

Krauss, R. M., Lindgren, F. T., Williams, P. T., Kelsey, S. F., Brensike, J., Vranizan, K., Detre, K. M., and Levy, R. I. (1987).
Lancet **2**,62-6.

Intermediate-density lipoproteins and progression of coronary artery disease in hypercholesterolaemic men.

Kumagai, M., and Ikeda, H. (1991).

Mol Gen Genet **230**,60-4.

Molecular analysis of the recombination junctions of lambda bio transducing phages.

LeBowitz, J. H., and McMacken, R. (1986).

J Biol Chem **261**,4738-48.

The Escherichia coli dnaB replication protein is a DNA helicase.

LeBowitz, J. H., and McMacken, R. (1986).

J Biol Chem **261**,4738-48.

The Escherichia coli dnaB replication protein is a DNA helicase.

Lindahl, G., Sironi, G., Bialy, H., and Calendar, R. (1970).

Proc Natl Acad Sci U S A **66**,587-94.

Bacteriophage lambda; abortive infection of bacteria lysogenic for phage P2.

Masai, H., Asai, T., Kubota, Y., Arai, K., and Kogoma, T. (1994).

Embo J **13**,5338-45.

Escherichia coli PriA protein is essential for inducible and constitutive stable DNA replication.

Masukata, H., Fujii, T., Ogawa, T., and Ogawa, H. (1983).

Mol Gen Genet **189**,226-34.

Biologically active recombinant formed through DNA pairing by purified recA protein in vitro.

Matson, S. W., and Kaiser-Rogers, K. A. (1990).

Annu Rev Biochem **59**,289-329.

DNA helicases. [Review].

Modrich, P. (1991).

Annu Rev Genet **25**,229-53.

Mechanisms and biological effects of mismatch repair. [Review].

Naito, A., Naito, S., and Ikeda, H. (1984).

Mol Gen Genet **193**,238-43.

Homology is not required for recombination mediated by DNA gyrase of Escherichia coli.

Nakayama, N., Arai, N., Bond, M. W., Kaziro, Y., and Arai, K. (1984).

J Biol Chem **259**,97-101.

Nucleotide sequence of dnaB and the primary structure of the dnaB protein from Escherichia coli.

Nakayama, N., Arai, N., Kaziro, Y., and Arai, K. (1984).

J Biol Chem **259**,88-96.

Structural and functional studies of the dnaB protein using limited proteolysis. Characterization of domains for DNA-dependent ATP hydrolysis and for protein association in the primosome.

Okazaki, T., Kurosawa, Y., Ogawa, T., Seki, T., Shinozaki, K., Hirose, S., Fujiyama, A., Kohara, Y., Machida, Y., Tamanoid, F., and Hozumi, T. (1979). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1**,203-19.

Structure and metabolism of the RNA primer in the discontinuous replication of prokaryotic DNA.

Palena, A., Blau, A., Stamatoyannopoulos, G., and Anagnou, N. P. (1994). *Blood* **83**,3738-45.

Eastern European (delta beta) zero-thalassemia: molecular characterization of a novel 9.1-kb deletion resulting in high levels of fetal hemoglobin in the adult [see comments].

Roberts, J. M., Buck, L. B., and Axel, R. (1983).

Cell **33**,53-63.

A structure for amplified DNA.

Roberts, J. M., Buck, L. B., and Axel, R. (1983).

Cell **33**,53-63.

A structure for amplified DNA.

Saluja, D., and Godson, G. N. (1995).

J Bacteriol **177**,1104-11.

Biochemical characterization of Escherichia coli temperature-sensitive dnaB mutants dnaB8, dnaB252, dnaB70, dnaB43, and dnaB454.

Shimizu, H., Yamaguchi, H., and Ikeda, H. (1995).

Genetics **140**,889-96.

Molecular analysis of lambda bio transducing phage produced by oxolinic acid-induced illegitimate recombination in vivo.

Sloane, D. L., Goodman, M. F., and Echols, H. (1988).

Nucleic Acids Res **16**,6465-75.

The fidelity of base selection by the polymerase subunit of DNA polymerase III holoenzyme.

Snyder, M., and Drlica, K. (1979).

J Mol Biol **131**,287-302.

DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid.

Spradling, A. C. (1981).

Cell **27**,193-201.

The organization and amplification of two chromosomal domains containing Drosophila chorion genes.

Ueda, K., McMacken, R., and Kornberg, A. (1978).

J Biol Chem **253**,261-9.

dnaB protein of Escherichia coli. Purification and role in the replication of phiX174 DNA.

Ukita, T., and Ikeda, H. (1996).

J Bacteriol **178**,2362-7.

Role of the recJ gene product in UV-induced illegitimate recombination at the hotspot.

Umezu, K., and Nakayama, H. (1993).

J Mol Biol **230**,1145-50.

RecQ DNA helicase of *Escherichia coli*. Characterization of the helix-unwinding activity with emphasis on the effect of single-stranded DNA-binding protein.

Wegrzyn, A., Wegrzyn, G., and Taylor, K. (1995).

Mol Gen Genet **247**,501-8.

Plasmid and host functions required for lambda plasmid replication carried out by the inherited replication complex.

Wickner, S., and Hurwitz, J. (1975).

Proc Natl Acad Sci U S A **72**,921-5.

Interaction of *Escherichia coli* dnaB and dnaC(D) gene products in vitro.

Xu, Y. C., and Bremer, H. (1988).

Mol Gen Genet **211**,138-42.

Chromosome replication in *Escherichia coli* induced by oversupply of DnaA.

Yamaguchi, H., Yamashita, T., Shimizu, H., and Ikeda, H. (1995).

Mol Gen Genet **248**,637-43.

A hotspot of spontaneous and UV-induced illegitimate recombination during formation of lambda bio transducing phage.

Yao, M. C., and Gorovsky, M. A. (1974).

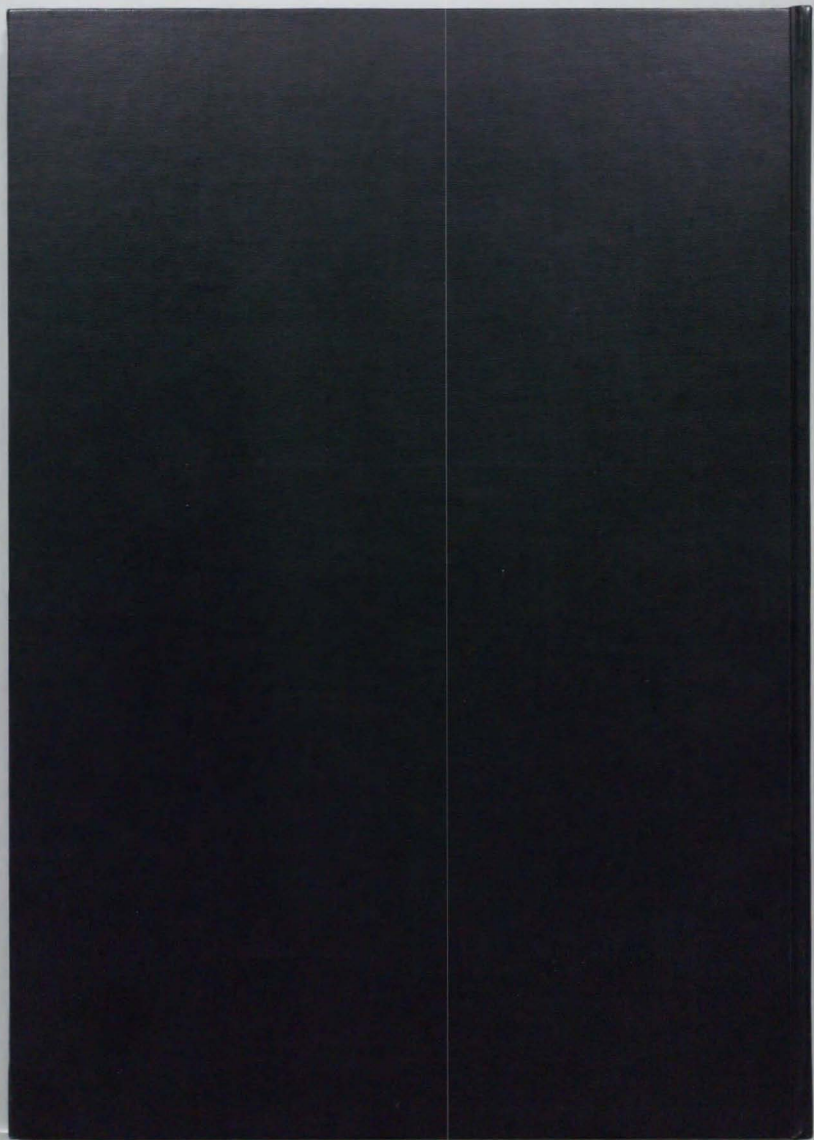
Chromosoma **48**,1-18.

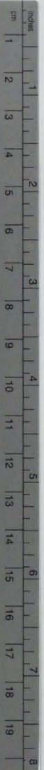
Comparison of the sequences of macro- and micronuclear DNA of *Tetrahymena pyriformis*.

Zyskind, J. W., and Smith, D. W. (1977).

J Bacteriol **129**,1476-86.

NOVEL *Escherichia coli* dnaB mutant: direct involvement of the dnaB252 gene product in the synthesis of an origin-ribonucleic acid species during initiation of a round of deoxyribonucleic acid replication.





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007. TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

