

大腸菌の相同組換え初期反応は、
DNAの由来を認識して他種DNAを分解し、
同種DNAは修復する
「自己-非自己を識別する」反応である

半田 直史

①

大腸菌の相同組換え初期反応は、DNA の由来を認識して他種 DNA を分解し、

同種 DNA は修復する「自己 --- 非自己を識別する」反応である

半 田 直 史

目次

	page
要旨	1
序論	3
材料と方法	21
結果	37
1. 相同組換えのホットスポットであるカイ (χ) 配列を認識できない変異 RecBCD 酵素が認識する新しいカイ様配列	37
1-1. スクリーニング	39
1-2. <i>recC</i> *変異株でブランクサイズを増加させる DNA 配列の決定	39
1-3. <i>recC</i> *変異株が認識する χ *配列	42
1-4. 活性のある χ *配列は 5' GCTGGTGCTCG である	44
1-5. 二本鎖分解活性の阻害	44
1-6. χ *配列と RecBC*D 酵素の相互作用では相同組換えは促進されない	47
2. 分離後細胞死による制限修飾遺伝子の自己維持強制的証明	52
2-1. 制限修飾系を失った後の大腸菌の増殖抑制	52
2-2. 制限修飾系を失った後の細胞の形態	55
2-3. 染色体の断片化	59
3. 制限修飾遺伝子間の認識配列を巡る競争	61
3-1. 別のプラスミドにのせた制限修飾系による、制限修飾系をもつプラスミドの安定化に与える影響	63

4. 制限修飾系による細胞死に対する相同組換えの効果	66
4-1. 相同組換え欠損株での <i>EcoRI</i> 制限修飾系を失った後の大腸菌の成長阻害	66
4-2. 相同組換え欠損株での細胞の形態変化	70
4-3. <i>recBCD</i> 遺伝子の欠損による細胞死の増強	72
4-4. 相同組換え欠損株での制限修飾系を失った後の染色体切断	74
4-5. SOS 応答の誘導	77
4-6. 分離後宿主殺しのプレートアッセイ	79
4-7. 他の相同組換え遺伝子欠損株での分離後宿主殺し	81
4-8. 制限修飾系による細胞死に対する RecF 相同組換え経路の効果	86
4-9. RecF 経路は抑制変異がない場合にも機能している	92
5. RecE 相同組換え経路による III 型の制限抑制と RecBCD 酵素による制限促進	94
5-1. バクテリオファージの相同組換え機構による III 型の制限の抑制と、細菌の相同組換え機構による制限の促進	95
5-2. III 型の制限の抑制は、制限酵素遺伝子の突然変異によるものではない	98
5-3. III 型制限の抑制は、Rac プロファージがコードする I 型制限の抑制因子である Lar の機能によるものではない	99
5-4. RecE と RecT の組み合わせ、あるいは RecE と宿主細菌の RecA の組み合わせで III 型の制限の抑制には十分である	101
5-5. I 型、あるいは II 型の制限は <i>recBC sbcA</i> 細胞で低下しない	105
5-6. ラムダファージがコードする Red 組換え経路での III 型の制限抑制	107
5-7. III 型制限の抑制に対するカイ配列の効果	109
6. 自然に生じる大腸菌染色体の二本鎖切断の解析	110
6-1. 二本鎖切断された染色体の観察と培地の検討	110
6-2. 野生型 (<i>rec⁺</i>) バックグラウンドで染色体二本鎖切断の同定に重要な相同組換え遺伝子変異	113
6-3. <i>recBC sbcBC</i> バックグラウンドで染色体二本鎖切断の同定に重要な相同組換え遺伝子	

変異	116
6-4. <i>recBC sbcA</i> バックグラウンドで染色体二本鎖切断の同定に重要な相同組換え遺伝子変異	116
6-5. HU 変異	117
7. 制限修飾系が引き起こす染色体再編	118
7-1. 染色体に挿入した制限修飾系は置き換えに抵抗する	118
7-2. 不安定な部分 2 倍体として振る舞う形質導入体	124
7-3. 形質導入体は部分 2 倍体だった	128
7-4. 制限修飾系を失った後の大規模なゲノムの再編	131
考察	138
引用文献	169
謝辞	180

要旨

細菌の相同組換えの初期反応は、非常に奇妙である。その反応は、「DNA 二本鎖切断によって開始され、そこから分解しながら DNA 上を進行する酵素が、特別な配列に出会ったところで、分解をやめ組換えを促進する」というものである。相同組換えが DNA の修復のためにあるのなら、なぜこの反応に DNA の分解をとまなうのであろうか？ 最近、多くの微生物（細菌）ゲノムの全塩基配列が続々と決定されている。その結果分かってきたことのひとつは、細菌のゲノムが非常に柔軟性をもっていて、同じ種であっても、調べる細菌ごとにそのサイズと構成が異なっているということである。細菌の種は何によって規定され、他種と区別されるのか？ いくつかの細菌種から、「DNA 分解酵素とそれを防ぐ配列」という組み合わせが報告され、その DNA 分解酵素の分解を防ぐ配列がそのゲノム中に高頻度に現れることが明らかにされた。それは大腸菌では組換えのホットスポットとして知られるカイ (χ) 配列であった。細菌の世界では、制限修飾系遺伝子対が、配列特異的な DNA のメチル化によって、その DNA を切断するか否かを決める。すなわち「自己」と「非自己」の区別をしている。これによって制限修飾系の遺伝子対は、感染防御機能を宿主細菌細胞に与えるが、私たちの研究室では、この遺伝子対は細菌にその遺伝子対自身の維持を強制する、細菌ゲノムとは独立した遺伝単位であることを提唱している。この遺伝子対は、「それを失った細菌細胞の染色体を、残された遺伝子産物（＝制限酵素）が切断して細胞死を起こす」ことで、生きている細胞の中で安定に維持されるように仕組む。

私は、大腸菌の相同組換え機構が、この制限修飾系遺伝子対による DNA 二本鎖切断を治し、また、他種 DNA がこの細菌細胞に進入した際には、制限修飾系と協調してこ

れを排除（破壊）することを発見した。そのとき、大腸菌の染色体はカイ配列認識依存的に修復された。制限修飾系がなくても大腸菌の染色体には DNA 二本鎖切断が自然に生じていることを示すことができた。これらのことから、その DNA 分解酵素とそれを阻害する配列の相互作用によって、自身の染色体を修復し、ゲノム中に入り込んだ非自己配列を除くことが可能であると考えられた。また私は、DNA 二本鎖分解酵素の変異株の中には、別の配列を認識するものがあることを発見した。このことは、突然変異によって「DNA 分解酵素とそれを防ぐ配列」という組み合わせが多様化することを示している。さらに染色体上にある制限修飾系遺伝子対を失わせようとすると、細菌ゲノムが相同組換えによって大きく再編され、生き残りをはかる様子（=ゲノム進化）が観察できた。

これらのことから、細菌の相同組換えという機構は、その初期反応において DNA の「自己」と「非自己」の区別をする機能を持ち、細菌ゲノム中に入り込む利己的な遺伝子（侵入 DNA 配列）を排除することを示した。さらに相同組換え機構が、染色体切断によって自身の維持を図るような利己的な遺伝子に対しても、ゲノムを修復し、ときには多様化させて生き残る機能をもつことを示した。

序論

大腸菌で相同組換えの中心的機構である RecBCD 経路

相同組換え機構の中で最も詳しく解析されているのは、大腸菌で相同組換えの中心的機構としてはたらく RecBCD 経路である (Kowalczykowski et al. 1994; Myers & Stahl 1994; Smith 1994)。それは DNA 二本鎖切断点から、RecBCD 酵素と呼ばれる *recB*、*recC*、*recD* の3つの遺伝子産物からなるタンパク質が、二本鎖 DNA を巻き戻し、また分解しながら進行することによって開始される。RecBCD 酵素は、1) DNA 依存的 ATPase 活性、2) ATP によって促進される一本鎖 DNA 切断活性、3) ATP 依存的 一本鎖 DNA 分解活性、4) ATP 依存的二本鎖 DNA 分解活性、5) DNA ヘリケース活性 (Lloyd & Low 1996; Taylor & Smith 1980) と、6)カイ (χ) 配列 (5'GCTGGTGG) 特異的組換え促進活性をもつ (Bianco & Kowalczykowski 1997; Kowalczykowski et al. 1994; Stahl & Stahl 1977) 多機能酵素である。RecBCD 酵素はカイ配列をその 3'側から認識すると、そこで分解をやめて、カイ配列を末端にもつ一本鎖 DNA を生じさせる (Smith et al. 1981; Kobayashi et al. 1982; Stahl et al. 1986; Taylor et al. 1985; Dabert et al. 1992; Dixon & Kowalczykowski 1993; Dixon et al. 1994; Eggleston & West 1997; Kowalczykowski et al. 1994; Kuzminov et al. 1994; West 1993)。これを基質として RecA タンパク質が DNA 上の一本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) を置き換えながら会合していく。RecA タンパク質はカイ配列に親和性が高い (Tracy & Kowalczykowski 1996)。こうしてできた DNA-RecA フィラメントが相同な DNA を探し、相同な DNA との組換えを行う (図 1、Dixon & Kowalczykowski 1991)。相同な DNA が組み換えられる間にできる「二つの二本鎖 DNA 分子が相同なところで一本鎖を交換し

た構造」は「ホリデー構造」とよばれ。この連結点は、RecG、あるいは RuvAB タンパク質により、相同な DNA 上を移動する。RuvC、あるいは Rus タンパク質によってホリデー構造が切断され、一本鎖切断がシールされると、組換えが完了する。

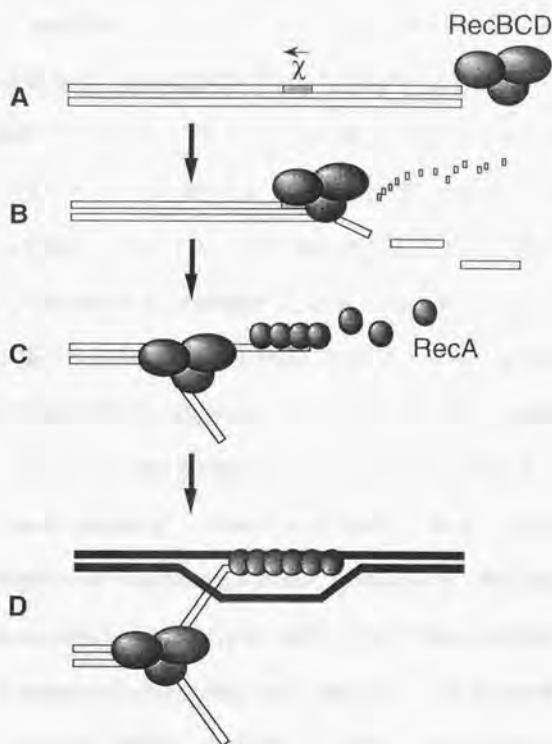


図1 RecBCD 経路による相同組換えの初期反応

RecBCD 酵素は、二本鎖切断点から DNA に入り込む (A)。RecBCD 酵素は、二本鎖 DNA を巻き戻し、同時に分解しながら進行する。このとき、3'端をもつ鎖が 5'端をもつ鎖よりも細かく分解される (B)。この酵素がカイ (χ) 配列を 3'端側から認識すると、カイ配列の 3'側に切断を入れるのを最後に、二本鎖 DNA の分解活性を失う。RecBCD 酵素 (ここで RecD サブユニットを失うとも考えられている) は、さらに DNA を巻き戻しながら進行し、カイ配列を 3'端にもつ一本鎖を生じさせる。ここへカイ配列との親和性が高い RecA タンパク質が会合し (C)、相同な DNA と組み換える (D)。

他の細菌の DNA 分解酵素（エキソヌクレアーゼ）とそれを阻害する配列

相同組換えの初期反応は、「DNA 分解酵素とそれを阻害する配列」の相互作用である。

カイ配列は、大腸菌でラムダ（ λ ）ファージ（より詳しくは、その *red gam* 変異体）のブランクサイズを増加させる DNA 配列として同定された（Henderson & Weil 1975; Lam et al. 1974）。この現象は、ファージゲノムが大腸菌細胞内に入ったときの相同組換えと、RecBCD 酵素の二本鎖 DNA 分解活性の阻害（Dabert et al. 1992）により、ローリングサークル型に複製するファージ線状ゲノムの分解を防ぐことによる。他の細菌でも、「DNA 分解酵素とそれを阻害する配列」の関係が、ローリングサークル型に複製するプラスミドを用いた実験系（Loir et al. 1994）で探された。その結果、大腸菌以外でも、インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）（Sourice et al. 1998）、あるいは進化的に遠縁のグラム陽性菌でも乳酸菌の一種（*Lactococcus lactis*）（Karoui et al. 1998; Biswas et al. 1995）と枯草菌（*Bacillus subtilis*）（Chedin et al. 1998）でもこの関係が保存されていることが報告された。グラム陰性菌の *Haemophilus influenzae* では、その配列は 5' GNTGGTGG、あるいは 5' GG/CTGGAGG であり、その配列はゲノム中に高頻度に現れる（Sourice et al. 1998）。グラム陽性菌では、二本鎖 DNA 分解酵素（ExoV）は、2つのサブユニットからなる酵素（例えば *Bacillus subtilis* では AddAB タンパク質）が担っており、それはグラム陰性菌の RecBCD 酵素とはホモロジーが低い。二本鎖 DNA 分解酵素活性を抑える配列は、*Lactococcus lactis* では、5' GCGCGTG であり、それは AddAB_{LI} のもつ二本鎖 DNA 分解酵素を抑えたばかりでなく、AddAB_{LI} による相同組換えも促進した（Karoui et al. 1998）。*Bacillus subtilis* のそれは、5' CCGCT であり、AddAB_{Bc} のもつ二本鎖 DNA 分解酵素を抑えた（Chedin et al. 1998）。

その他の組換え経路

大腸菌では、相同組換えの中心的機構である RecBCD 経路で重要な *recB*、あるいは *recC* 遺伝子に欠損があるときに、さらに抑制変異が入ると「RecE 経路」、あるいは「RecF 経路」と呼ばれる相同組換え機構が活性化されることが知られている。3つの相同組換え機構は、互いに後期に働くタンパク質を共有しているが、初期に働くタンパク質が、その経路特異的なもので、これが名前になっている。

大腸菌の RecF 経路

大腸菌の「RecF 経路」は、大腸菌ゲノムにコードされた、もうひとつの相同組換え機構である。3' → 5' 一本鎖 DNA 特異的 DNA 分解酵素 (Exonuclease I) をコードする *sbcB* 遺伝子への抑制変異によって活性化される (Kushner et al. 1971)。遺伝学的解析から、組換え能をもつ *recBC sbcB* 株は、さらに、*sbcC*、あるいは *sbcD* 遺伝子にも変異があることが明らかにされている (Lloyd & Buckman 1985; Gibson et al. 1992; Connelly et al. 1998)。

組換え機構は、DNA の修復機構として理解されているが、最近この経路の働きが、いったん止まった染色体 DNA 複製の再開に重要であると考えられる結果が報告されている。複製フォークが DNA 損傷に出会って止まると、複製装置はそこを離れる (脱会合する) (Kuzminov 1995)。紫外線照射などによって形成されるピリミジンダイマーによって、染色体複製が阻害されたときにも細胞は死ぬ。このようなダイマーは、UvrABC 遺伝子産物によって取り除かれる。最近、それでも残されたダイマーが、RecF 依存的な複製後修復過程で部分的に修復されることが示された (Cox 1998; Courcelle et al. 1997;

Kogoma 1997)。

RecF タンパク質は、組換えタンパク質として同定されていたが、紫外線照射後の複製の再開を助けることが報告された (Courcelle et al. 1997)。RecF, recQ, あるいは recR 変異によって紫外線感受性になる (Horii & Clark 1973; Sandler & Clark 1993) が、これらの株はいくつかの形の染色体の相同組換えはできる。つまり、これらは相同組換えというよりも、紫外線による損傷の修復に機能しているのである。それらの機能のひとつは RecA タンパク質を一本鎖 DNA 切断点に会合させることである。RecOR タンパク質複合体は、一本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) にコートされた DNA に RecA タンパク質を結合させ (Umezumi & Kolodner 1994)、RecA フィラメントの脱会合を防ぐ (Shan et al. 1997)。反対に、RecFR タンパク質複合体は、二本鎖 DNA に結合し、RecA フィラメントが一本鎖切断点を越えて更に会合するを阻止する (Webb et al. 1997)。

実際、recF 遺伝子とその相同遺伝子は、大腸菌、あるいは他の細菌ゲノムの中で、染色体複製に重要なタンパク質をコードする遺伝子とオペロン構造を形成している (Burland et al. 1993; URL = <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdb.html>)。

他の細菌での RecF 経路の役割

野生株でも RecF 相同組換え経路が重要な機能を果たしていることが、他の細菌種から報告されている。例えば、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) では、抑制変異がなくても機能している。淋菌がもつ、大腸菌の RecF 経路に相当する相同組換え経路は、繊毛の抗原変異 (pilin antigenic variation) に重要であった (Mehr & Seifert 1998)。つまり淋菌は、RecF 相同組換え経路によって繊毛の抗原性を多様化することによって、感染した宿主の免疫系

をかいぐくっていると考えられる。

他の細菌からも、RecF 経路に含まれる遺伝子と相同な遺伝子が見つかってきている (Alonso & Luder 1991; Qin et al. 1999; Fernandez et al. 1999; Zuber et al. 1994; Powell et al. 1999; Anderson et al. 1996)。また高等真核生物でも、RecF 相同組換え経路に必要な *recQ* 遺伝子と相同性を示す遺伝子が見つかってきており、例えばヒトでは4つ以上の RecQ ホモログが同定されている。その変異によって Werner 症候群、Bloom 症候群、ロズモンドトンプソン症候群などの病気が起きる (Yu et al. 1996; Ellis et al. 1995; Kitao et al. 1999) ことから、この相同組換え経路が生物種を越えて重要であることが示唆されている (Kusano et al. 1999; Chakraverty & Hickson 1999)。

大腸菌の RecE 経路

RecE 経路は、大腸菌染色体中に溶原化しているプロファージ (Rac ファージ) がコードするファージの組換え遺伝子、*recE*、*recT* の両遺伝子によってドライブされる相同組換え機構である (Gillen et al. 1981)。このようなファージの組換え機構 (Rac ファージの RecE 経路と λ ファージの Red 経路) については、私たちの研究グループで数年前からプラスミドを用いた実験系で、「二本鎖切断修復」に効率のよい機構であることを示している (Takahashi et al. 1990; Kusano et al. 1994b)。このタイプの相同組換えの特徴は、二本鎖切断によって開始され、その切断点が遺伝子変換によって修復されること、それに両側の交叉をとまなうことである (Kobayashi & Takahashi 1988; Yamamoto et al. 1988; Takahashi et al. 1990; Kusano et al. 1994; Kobayashi 1992)。これは制限修飾系による切断に対する防御手段として有効であると考えられた。

細菌ゲノムの柔軟性

最近、多くの微生物（細菌）ゲノムの全塩基配列が続々と決定されている（URL、<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdb.html>）。同じ細菌種で由来の異なる菌株の全塩基配列が決められ、同じ細菌種内でも調べる株によってそのゲノム構成が大きく異なることが分かってきた。例えば大腸菌では MG1655 株（実験室株）と、病原性大腸菌 O157（堺株、臨床分離株）の全塩基配列が決定されたが、そのゲノムサイズは 1Mb も違っていた（Blattner et al. 1997; 大西ら 1999）。病原細菌では pathogenicity islands によってサイズが大きく異なることが知られている。プロファージ、トランスポゾンも多く見つかった。また、ピロリ菌、古細菌、枯草菌についても、異なる株の全塩基配列が決定されたが、配列決定された 2 株の間には大きな逆位が見つかった（Alm et al 1999; 高橋ら 1999; 仲宗ら 1999）。病原性大腸菌と実験室の大腸菌のゲノム比較から、大きな DNA 断片が欠失、あるいは挿入されたと言うよりも、細かい欠失と挿入が繰り返し起きている様子が想像された（大西ら 1999）。

このことは、個々の遺伝子が頻繁に細菌のグループの間を水平移動していることを示唆している。すなわち、細菌のゲノムは、同じ細菌種であっても水平伝播する遺伝子（DNA）によって、そのサイズと構成が非常に流動的であることを示唆している。

実際に、DNA の水平伝播について、病原性大腸菌 O157（堺株）には、赤痢菌（*Shigella dysenteriae*）の DNA が、*mutS* 遺伝子領域に挿入されている様子が、塩基配列レベルで明らかにされた（Le Clerc et al. 1999）。多様性を獲得する過程には相同組換えが重要な機能を果たしていると考えられる。このとき、取り込むか排除するかの特異性があると考えられるが、それは何が決めているのであろうか。

細菌ゲノムに高頻度に現れる「自己マーカー」配列

先に述べた、カイ様配列がゲノムの「自己」を規定する配列として役だっているのかもしれない。ここで、この論文の中で使用する「自己」の定義は、「遺伝単位が自分と同じか違うかを識別して分解するか否かを決定すること」とする。細菌の染色体の全塩基配列が明らかにされ、細菌の「自己マーカー」配列ともいべき塩基配列が明らかにされてきている。大腸菌では、それは相同組換えのホットスポット配列であるカイ配列であった。その染色体上での頻度は高く、その方向性には決まりがあり、複製フォークの進行方向との相関が示唆されている (Burland et al. 1993)。これは、RecBCD 酵素がカイ配列をその 3' 側から認識したときに相同組換えを促進することから、複製フォークで二本鎖切断を生じた際の修復に都合がよいと推測されている。大腸菌以外でも、インフルエンザ菌、乳酸菌の一種のゲノム全塩基配列解析から、分解阻害配列は、その頻度が高いことが明らかにされている (Sourice et al. 1998; Bolotin et al. 1999)。

制限修飾系遺伝子対の振る舞い

II 型の制限酵素は、DNA 配列特異的に DNA を切断するエンドヌクレアーゼである (Roberts & Macelis 1999; Roberts & Halford 1993; Wilson & Murray 1991)。例えば、II 型制限酵素である *EcoRI* は、5' GAATTC という配列を認識してそこで DNA を切断する。この酵素をコードする遺伝子は、同じ配列を認識してメチル化することで制限酵素の切断から DNA を守る「修飾酵素」をコードする遺伝子と隣接して存在する。制限修飾系については、従来「ウイルスなどの外来の DNA と自分の DNA を区別し、自分という標識 (メチル化) のない外来 DNA を分解する」という細胞防御説によって説明されてきた (Brammar et al.

1974)。

私たちの研究室では「II 型の制限酵素と修飾酵素遺伝子のペア（制限修飾系遺伝子対）を失った細胞が、染色体の制限切断によって死ぬ」ことを発見し、宿主細菌に対してこれを失った細胞を殺すようにプログラムする「利己的な遺伝子」として振る舞い、これによって細菌の世界で進化し、維持されてきたと提唱している（Naito et al. 1995; Yarmolinsky 1995; Naito et al. 1998）。制限修飾系遺伝子をもつプラスミドが細胞内で維持されている間は、宿主細胞のゲノム DNA はメチル化されているので制限酵素によって切断されない。細胞分裂などによって、そのプラスミドをもたない細胞が生じると、その細胞中にはすでに翻訳された制限酵素と修飾酵素が残される。細胞の分裂増殖によってこれらの酵素は希釈され、修飾酵素がある濃度を下回ると、細胞の染色体 DNA のすべての認識配列をメチル化しきれなくなり、残された制限酵素による切断を受けて、このような細胞は死滅する。これはプラスミドの安定化機構として知られる「分離後宿主殺し」の機構である（Gerdes et al. 1986; Gerdes et al., in press; Jaffe et al. 1985; Nordstrom & Austin 1989; Nordstrom 1993）。

利己的な遺伝単位の維持戦略

このような「分離後宿主殺し」による「競争者に侵入され、排除されたときに自殺する」戦略は、制限修飾遺伝子が、似ているが故に相容れないライバル遺伝子と排他的な戦いをする上で有利に働くと考えられる（図 2）。実際、制限修飾遺伝子を持つプラスミドを不和合な複製制御機構をもつプラスミドで置き換えようとする、このような細胞死が観察された（Naito et al. 1995）。

このように制限修飾遺伝子が、分離後宿主殺し戦略によってライバルと戦う遺伝子として拡がり、進化し、維持されているという仮説によって、感染防御が短期間しか有効でないにもかかわらず保存されてきたこと、認識配列の長い制限修飾系の存在、制限修飾系の2つの遺伝子が密接にリンクしていること、制限修飾遺伝子の水平伝播、既存オペロンへの挿入 (Stein et al. 1998)、排除 (Nakayama et al. 1998) などのウィルスのような生活環 (Snyder 1995; Yu & Snyder 1994)、等多くの謎がうまく説明できる。これら制限修飾系の多くは、細菌ゲノムにはもともとなかったと考えられている。それでは、細菌自身はどのように「自己と非自己の区別」をしているのだろうか。

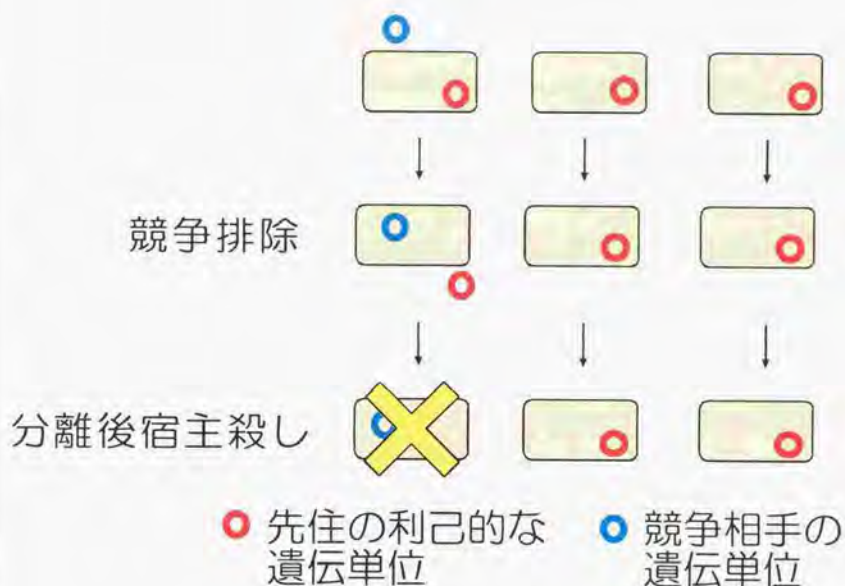


図2 細菌ゲノムとは独立した遺伝単位が、それを失った細胞を殺すことによって自分のコピーを安定に維持させる現象。

細菌ゲノムとは独立した遺伝単位である、例えばプロウイルスや制限修飾系（赤）は、それと共存できない競争相手、例えば別のウイルスや不和合プラスミド（青）によって存在をおびやかされると、その細胞をライバル遺伝子もろとも殺すように仕組む。このような機構としては、プラスミド喪失後に起きる場合の「分離後の宿主殺し」、ウイルス感染によって引き起こされる「ファージ排除」が区別される。これによって、先住の遺伝単位は、この細胞集団の中で相対的な頻度を増す、あるいは維持されると考えられる。

III 型制限修飾系

制限修飾系は、そのサブユニット構成、ターゲット配列の構造や切断位置、あるいは要求するコファクターなどによっていくつかのタイプに分類されている (Redaschi & Bickle 1996; Bickle & Kruger 1993)。例えば、典型的な III 型の制限修飾系である *EcoP1* と *EcoP15* 制限修飾系は、2つのポリペプチドをコードする遺伝子からなる。*mod* 遺伝子産物は単独でターゲット配列を認識し、メチル化を行い、*res* 遺伝子産物は、*mod* 遺伝子産物と一緒に初めて制限酵素活性を表す。これらの III 型の制限修飾系は、バクテリオファージ P1 とそれに関連した p15B プラスミドから見つかった (Ikeda et al. 1970, Hadi et al. 1983)。III 型の制限修飾系は、この他に *Haemophilus influenzae* から見つかった *HinfIII* (Kauc & Piekarowicz 1978) と、*Salmonella typhimurium* から見つかった *StyI* TI (De Backer & Colson 1991) しかその存在が確認されていないなかった。しかし、ゲノム解読によってそれらのホモログがピロリ菌などの細菌から続々と発見されている (REBASE)。*EcoP1* 制限酵素は、5 bp からなる配列 (5'AGACC) を認識し、*EcoP15* 制限酵素は、6 bp からなる配列 (5'CAGCAG) を認識する。どちらの場合も認識配列から 25~27 bp 下流で、ATP 依存的に DNA を切断する。

制限の抑制現象

DNA 二本鎖切断は、DNA ファージやプラスミドにとって致命的なイベントである。それ故、細菌の染色体とは独立したこれら水平伝播する遺伝単位・寄生遺伝子にとっては、制限修飾遺伝子は大きな脅威である。プラスミドやバクテリオファージのいくつかでは、制限の効果を抑制する「restriction alleviation」機構をもつことが知られている。

バクテリオファージ P1 による普遍形質導入頻度は、大腸菌染色体上にある I 型制限修飾系によって減少しない。バクテリオファージ P1 がコードするファージ殻内の DarAB タンパク質が注入されるファージゲノム DNA に結合して、制限酵素から DNA を守っているのである (Yarmolinsky & Sternberg 1988)。同様の働きをする Ard タンパク質が、ColIb-P9 (IncI1)、N3 (IncN)、Folac (IncFV)、R16 (IncB)、R621 (IncB) と R387 (IncK) を含む、いくつかの接合伝達プラスミドに見いだされている (Chilley & Wilkins 1995)。ラムダファージがコードする Ral タンパク質 (Court & Oppenheim 1983) と、Rac プロファージがコードするそのホモログ (King & Murray 1995) は、I 型のメチル化酵素の活性を亢進して、非修飾 DNA を効率的にメチル化する。T3、あるいは T7 バクテリオファージがコードする Ocr タンパク質は、I 型制限修飾系 *EcoKI* タンパク質に結合して、ターゲット配列のメチル化と切断を阻害する (Kruger et al. 1977)。

また、I 型の制限の抑制現象は、紫外線照射後にも観察されている (Thomas & Wackernagel 1982; Thomas & Wackernagel 1984)。DNA の損傷が、組換えを促進するばかりでなく、I 型の制限酵素の活性を抑制するわけである。この制限の抑制は、修復にもなって新しく合成された DNA を大腸菌自身が持つ I 型の制限修飾系によって切断されないようにメチル化するのに役立つと考えられている。SOS 応答によって誘導される UmuDC タンパク質も I 型の制限を抑制することが分かった (Hiom & Sedgwick 1992)。また、I 型の制限の抑制は、RecBCD 酵素の阻害因子 (ラムダファージがコードする Gam タンパク質) を大量に産生させることによっても観察された (Salaj-Smic et al. 1997)。これは、RecBCD 酵素が二本鎖切断点から二本鎖 DNA を分解するために、この阻害因子によって RecBCD 酵素の働きが抑えられることで、制限の効果が低くなるためと考えら

れた (Dharmalingam & Goldberg 1976; Simmon & Lederberg 1972)。

私は、以下に述べるように、III 型の制限修飾系で restriction alleviation を発見した。ファージ、あるいはプラスミドがコードする III 型の制限修飾系に対して、宿主に寄生しているプロファージがコードする二本鎖切断修復型の組換え機構がその作用を抑制した。

ゲノム内組換えによるゲノムの多様化

ゲノムの多様化は、水平伝播する DNA ばかりでなく、染色体中の異なる場所の間に起きる組換えでも引き起こされる。その帰結は、欠失、重複、逆位である。その機構としては、サイト特異的組換え、相同組換え、トランスポゾンによる組換えなどがある。ゲノムの異なる場所にある繰り返し配列間での相同組換え、すなわち不等交叉によってもこのようなゲノム再編が引き起こされる。染色体レベルでのこの現象が細菌の表現形に影響を与えることが明らかにされているのは、例えばペスト菌では、染色体上の繰り返し配列間の不等交叉による欠失によって、病原性を失うことが知られている (Fetherston et al. 1992)。同様に、不等交叉によって、rDNA や薬剤耐性遺伝子領域が重複することも知られている (Romero & Palacios 1997)。Mycoplasma の二つの種は、ゲノムが6つの部分に分かれ、それらの順番を組み換えた形になっていたが (Himmelreich et al. 1997)、これは、つなぎめにある反復配列での相同組換えによるものと想像されている。

自然に生じる染色体二本鎖切断

生物にとって染色体に生じる二本鎖切断は、それだけで「死」の原因となる脅威であることは、DNA に二本鎖切断を生じさせる化学物質や放射線処理によって細胞が死ぬことが

らも明らかである。最近、生物の染色体には、普通に生育しているときでも自然に二本鎖切断が起きていることが大腸菌 (Michel et al. 1997)、酵母 (Game et al. 1989)、トリ細胞 (Sonoda et al. 1998) の実験系から示された。大腸菌とトリ細胞では、相同組換え遺伝子欠損細胞株を使った解析から、それが相同組換えを介して修復されていることが示されている。

大腸菌では、染色体複製の過程で二本鎖切断と DNA の分解が起きることが示唆されている (Cox 1998)。DNA 二本鎖切断は相同組換えの開始に重要である。DNA 二本鎖切断点から、RecBCD 相同組換え経路は開始され (Kowalczykowski et al. 1994)、RecE、あるいは RecF 相同組換え経路はそれによって促進される (Takahashi et al. 1997; Takahashi et al. 1992)。複製による相同組換えの促進 (Kuzminov 1995) と、染色体複製の解析 (Kogoma 1997) から、複製フォークの停止が引き金となって、複製フォークに二本鎖切断が生じること、そこから開始される相同組換え反応が、複製フォークを再構成することが提唱された (Cox 1998)。

J. Game らは、酵母で環状染色体を使って染色体切断を好感度に検出する方法を開発した (Game et al. 1989)。パルスフィールドゲル電気泳動で、環状染色体はアガロースの中で移動できずにゲルのオリジンにとどまる。二本鎖切断によってそれが環状から線状に変わると、ゲル中をゆっくり進行するようになる。私は、相同組換えの機構についてその遺伝学的解析が最も進んでいる大腸菌で、自然に誘発される染色体上の二本鎖切断を、このパルスフィールドゲル電気泳動による方法で解析した。その結果、大腸菌の接合組換えに関与する遺伝子とその修復に重要であることが示唆された。B. Michel のグループもこの方法を使って、*recBC* 変異株で、普通に生育しているときと複製を止めたときの

壊れた染色体の蓄積を観察した (Michel et al. 1997)。また最近、相同組換え後期に働く RuvABC タンパク質が複製フォークの停止による染色体切断を起こすのに重要であることを示している (Seigneur et al. 1998)。

この学位論文の内容

この学位論文では、細菌のもつ相同組換え機構の初期反応である「DNA の分解反応」にスポットをあて、それが何のためにあるのか、また、細菌ゲノムが非常に柔軟性があるなかで、何が「自己」を規定するのかについて、「DNA の分解」の視点から考えてみたい。このような観点から相同組換え機構について考えることは、この分野の研究でもユニークな立場である。私がこれらの研究を始めるまでに、私たちの研究室では、プラスミドを用いた実験系で二本鎖切断修復機構の解析を行っていた (Takahashi et al. 1990; Kusano et al. 1994a)。また、細菌の世界で「自己」と「非自己」の区別をすることが知られる制限修飾系については、それがプラスミドを安定化させること、不和合なプラスミドによって置き換えにくいことがわかっていた (Naito et al. 1995)。

私は、まず相同組換えの中でも RecBCD 経路に興味を持ち、カイ配列認識が RecBCD 酵素の変異によって変化することを発見した。ついで、細菌ゲノムとは利害を異にする遺伝単位である制限修飾系の間に認識配列をめぐる競争があることを証明し、制限修飾系の配列認識の特殊化と多様化の要因を明らかにした。これらことから、相同組換え機構の奇妙な初期反応を、制限修飾系の振る舞いとあわせて考えることで、ゲノムの多様化を含めた「細菌の自己」を考えることはできないかと考えた。

上に挙げた課題を考えるにあたって、まず、「DNA 分解酵素とその活性を抑制す

る配列」という関係が多様化する場合について紹介する（結果の1章）。制限修飾遺伝子を失った後、細胞死が起きることを証明した実験を紹介する（結果の2章）。ついで、制限修飾系が認識配列をめぐる競争することを証明した実験について触れる（結果の3章）。その後、制限修飾系遺伝子対を失った後の染色体二本鎖切断を修復する場合に、相同組換え機構が自身の DNA を選択的に、「カイ配列依存的に」修復することを示す（結果の4章）。この研究を通して、「DNA 分解酵素とその活性を抑制する配列」の相互作用が制限修飾系と協調し、「自己」を修復し「非自己」を排除する機構であると考えられるにいたった。また別の実験から、バクテリオファージ特異的な二本鎖切断修復型の相同組換え機構が、ある種の制限の効果を抑えることを発見し、この研究の中でも細菌の相同組換え経路と制限修飾系が協調して他の利己的な遺伝単位を排除することを見いだした（結果の5章）。さらに、制限修飾系遺伝子対を失った細菌細胞が染色体を大規模に再編して、制限修飾系が仕組む細胞死に対して生き残りををはかる様子を観察できたのでそれについても紹介する（結果の7章）。

材料と方法

大腸菌、バクテリオファージ、プラスミド

この研究で使用した大腸菌、バクテリオファージ、プラスミドについては、それぞれ表 1、表 2、表 3 に示した。P1 バクテリオファージ (P1 vir) は、研究室のコレクションであり、普遍形質導入に使われた。

培地、DNA の単離と形質転換

大腸菌 (*E. coli*) の細胞は、L 培地 (1.0 % バクトトリプトン、0.5 % イーストエキストラクト、1.0 % NaCl を混ぜ、NaOH で pH を調整)、M9 最少培地 (1x M9 塩溶液 (Miller 1992) = 0.2 % グルコース、0.05 mM CaCl₂、0.5 mM MgSO₄、0.2 % カザミノ酸、1mg/ml ビタミン B1) で培養し、必要に応じて次の濃度で薬剤を加えた: アンピシリン (Amp) 50 µg/ml (これは常にメチシリン (Met) 200 µg/ml と一緒に加えた)、スペクチノマイシン (Spc) 30 µg/ml、カナマイシン (Kan) 10 µg/ml、クロラムフェニコール (Cml) 25 µg/ml。λファージをプレートにまくときは、トリプトン培地 (ラムダファージ感染用培地 = 1.0 % バクトトリプトン、0.5 % NaCl、0.2 % マルトース、10 mM MgSO₄、10 µg/ml ビタミン B1) で培養した。大腸菌染色体 DNA は、Kusano et al. 1994 の論文で報告されている方法で単離した。プラスミド DNA は、Sambrook et al. 1989 にしたがって単離し、エレクトロポレーション (GenePulser (Bio-Rad)、2.5 kV 25 mF、200 Ω) によって大腸菌細胞に形質転換された (Takahashi & Kobayashi 1990)。

Table 1. Bacterial strains

Name	Other name	Genotype	Comments	Source/ References
BW7622 KF1503	ME8481 ME8582	<i>TrpB114::Tn10 relA1 spoT1 thi-1 λ⁻ HfrPO45 (thyA-serA): recT::Tn10 sbcA111::Tn5 thr-300 ilv-318</i>		A. Nishimura (NIG) A. Nishimura (NIG)
JC9387	FS638	As JC7623, but <i>Su⁻</i>		F. W. Stahl
JM1	FS611	<i>recB21 recC22 sbcA20 supF</i>		F. W. Stahl
BIK0515	W3110	<i>IN(rmD-rmE)1 λ⁻ F⁻</i>		Y. Kohara
BIK0733		As AB1157, but <i>Δ(srlR-recA)306::Tn10</i>		K. Yamamoto/ Csonka & Clark 1979
BIK0749	JC8111	As JC7623, but <i>recF143</i>		A. J. Clark
BIK0751	JC5519	As AB1157, but <i>recB21 recC22</i>		T. Kato/ Willetts & Clark 1969
BIK0752	JC7623	As AB1157, but <i>recB21 recC22 sbcB15 sbcC201</i>		T. Kato/ Kushner et al. 1971; Lloyd & Buckman 1985
BIK0771	DH5	<i>recA1 endA1 hsdR17</i>		Takahashi et al. 1993
BIK0783	JC9239	As AB1157, but <i>recF143</i>		
BIK0784	JC8691	As JC8679, but <i>recE159</i>		A. J. Clark/ Gillen et al. 1981; Luisi-DeLuca et al. 1988
BIK0786	JC9610	As JC8679, but <i>recF143</i>		A. J. Clark/ Gillen et al. 1981
BIK0787	JC12123	<i>recJ284::Tn10 his-4</i>		A. Clark/ Lovett & Clark 1984
BIK0788	AB1157	<i>supE44 thr-1 ara-14 leuB6 Δ(gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 galK2 hisG4 rfbD1 mgl-51 rpsL31 kdgK51 xyl-5 mtl-1 argE3 thi-1 λ⁻ F⁻ recF143 argA his-4 met rpsL31 gal(?) xyl(?) ara(?) λ⁻ F⁻</i>		Laboratory collection/ Bachmann 1987
BIK0796	V66	<i>recF143 argA his-4 met rpsL31 gal(?) xyl(?) ara(?) λ⁻ F⁻</i>		G. Smith/ Schultz et al. 1983
BIK0800	NK5992	As W3110, but <i>argA81::Tn10</i>		A. Taylor
BIK0806		As AB1157, but <i>recD::Tn10</i>		Takahashi et al. 1993
BIK0808	FS620	C600 λ ⁻ <i>recB21 supE</i>		F. W. Stahl
BIK0813	JC8679	As AB1157, but <i>recB21 recC22 sbcA23 rac⁺</i>		A. J. Clark/ Gillen et al. 1981
BIK0814		As JC8679, but <i>recJ284::Tn10</i>		Kusano et al. 1994
BIK1044		As JC8679, but <i>recN1502::Tn5</i>		Takahashi et al. 1993
BIK1050		As JC8679, but <i>ruvC53 eda::Tn10</i>		Kusano et al. 1994
BIK1051	KEN72	As AB1157, but <i>ruvC53 eda::Tn10</i>		K. Yamamoto
BIK1179	KEN24	As AB1157, but <i>recO::Tn5</i>		K. Yamamoto
BIK1181	KEN87	As JC7623, but <i>ruvC53 eda::Tn10</i>		K. Yamamoto
BIK1188	JC9604	As JC8679, but <i>recA56</i>		A. J. Clark/ Gillen et al. 1981
BIK1192		As JC8679, but <i>recO::Tn5</i>		Kusano et al. 1994; Takahashi et al. 1993
BIK1206	SG13171	F ⁻ SA500 <i>his leu sulA malF::Tn10 lexA3 strA</i>		S. Mizusawa

BIK1212		As JC7623, but <i>recN262 tyrA16::Tn10</i>		Takahashi et al. 1992
BIK1244		As JC8679, but <i>recQ1803::Tn3</i>		Kusano et al. 1994
BIK1272	V69	As V66, but <i>recC73 recC1002</i>		G. Smith/ Schultz et al. 1983
BIK1273	V71	As V66, but <i>recC73 recC1003</i>		G. Smith/ Schultz et al. 1983
BIK1274	V72	As V66, but <i>recC73 recC1004</i>		G. Smith/ Schultz et al. 1983
BIK1275	V73	As V66, but <i>recC73 recC1001</i>		G. Smith/ Schultz et al. 1983
BIK1276	A211	As W3110, but <i>lacZs20Yconst gyrB⁺ recF⁺ zlc::Tn10</i>		A. Miura
BIK1282		As BIK1273, but <i>recF⁺ zlc::Tn10</i>		Handa et al. 1997
BIK1284		As BIK1274, but <i>recF⁺ zlc::Tn10</i>		Handa et al. 1997
BIK1286		As BIK1275, but <i>recF⁺ zlc::Tn10</i>	P1 (BIK1276) to BIK1275	This work
BIK1288		As V66, but <i>recF⁺ zlc::Tn10</i>		Handa et al. 1997
BIK1290		As BIK1272, but <i>recF⁺ zlc::Tn10</i>	P1 (BIK1276) to BIK1272	This work
BIK1291	DH10B	F ⁻ <i>araD139 Δ(ara, leu)7697 lacX74 galU galk mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) rpsL deoR φ80dlacZΔ M15 endA1 nupG recA1</i>		Y. Kitamura/ Grant et al. 1990
BIK1331	HRS1004	<i>ΔruvAB::Tc</i>		T. Shiba
BIK1399	AM265	As JC8679, but <i>recR252::mini-Tn10 Kan</i>		R. Lloyd/ Mahdi & Lloyd 1989; Takahashi et al. 1993
BIK1400	N2796	As JC8679, but <i>recG258::mini-Tn10 Kan</i>		R. Lloyd/ Lloyd & Buckman 1991
BIK1401	RDK1693	As JC8679, but <i>recQ1801</i>		S. Lovett/ Luisi-DeLuca et al. 1988
BIK1415		As JC8679, but <i>ΔrecA306::Tn10</i>		Kusano et al. 1994
BIK1427		As JC8679, but <i>recQ1801 recJ284::Tn10</i>		Kusano et al. 1994
BIK1460		As JC7623, but <i>rec⁺ argA81::Tn10</i>	P1 from BIK800 to JC7623	This work
BIK1470		As BIK1274, but <i>argA81::Tn10</i>	P1 from BIK800 to BIK1274	This work
BIK1478		As JC8679, but <i>ΔruvAB::Tc</i>	P1 (BIK1331) to JC8679	This work
BIK1538		As AB1157, but <i>recG258::mini-Tn10 Kan</i>	P1 (BIK1400) to AB1157	K. Kusano
BIK1597		BIK733 carrying <i>plK195</i>		This work
BIK1618	HRS1100	As AB1157, but <i>ruvC100::Cm</i>		Saito et al. 1995
BIK1620	HRS2302	As AB1157, but <i>ruvAB::Cm</i>		H. Iwasaki/ Ishioka et al. 1997
BIK1715	GC3403	<i>slfA::Mud (Ap lac) c62 trp::MuC Δlac thr leu pyrD thi malB (λ^S) rpsL (Str^r) gal slfC</i>		A. Nishimura (NIG)/ Huisman 1983
BIK1772		As JC7623, but <i>recJ284::Tn10</i>		This work
BIK1774		As JC7623, but <i>recQ1803::Tn3</i>		This work

BIK1776		As JC7623, but <i>recR252::mini-Tn10</i> Kan		This work
BIK1910	V1296	As V66, but <i>recC2145</i>		G. Smith/ Amundsen et al. 1990
BIK1911	V1360	As V66, but <i>recB2154</i>		G. Smith/ Amundsen et al. 1990
BIK1912	V1363	As V66, but <i>recB2155</i>		G. Smith/ Amundsen et al. 1990
BIK1945		As JC7623, but <i>recC1004 recC73</i> P1 from BIK1470 to JC7623 <i>argA81::Tn10</i>		This work
BIK2141	YNEC200	As BIK806, but <i>lacZ::paeR71 r⁺m⁺ Kan^R</i>	Linear transformant from <i>F1</i> fragment of pYNEC200	This work
BIK2142	YNEC201	As BIK806, but <i>lacZ::paeR71 r⁺m⁺ Kan^R</i>	Linear transformant from <i>F1</i> fragment of pYNEC201	This work
BIK2143	YNEC202	As BIK806, but <i>lacZ::Cml^R</i>	Linear transformant from <i>F1</i> fragment of pYNEC202	This work
BIK2144	YNEC203	As JC8679, but <i>lacZ::paeR71 r⁺m⁺ Kan^R</i>	P1 (BIK2141) to JC8679	This work
BIK2145	YNEC204	As JC8679, but <i>lacZ::paeR71 r⁺m⁺ Kan^R</i>	P1 (BIK2142) to JC8679	This work
BIK2146	YNEC205	As JC8679, but <i>lacZ::Cml^R</i>	P1 (BIK2143) to JC8679	This work
BIK2147	YNEC206	As BIK2146, but <i>trpB114::Tn10</i>	P1 (ME8481) to BIK2146	This work
BIK2148	YNEC207	BIK2147 [pTN4]		This work
BIK2149	YNEC208	As JC7623, but <i>lacZ::paeR71 r⁺m⁺ Kan^R</i>	P1 (BIK2141) to JC7623	This work
BIK2150	YNEC209	As JC7623, but <i>lacZ::paeR71 r⁺m⁺ Kan^R</i>	P1 (BIK2142) to JC7623	This work
BIK2151	YNEC210	As JC7623, but <i>lacZ::Cml^R</i>	P1 (BIK2143) to JC7623	This work
BIK2152	YNEC211	As BIK2151, but <i>trpB114::Tn10</i>	P1 (ME8481) to BIK2151	This work
BIK2153	YNEC212	BIK2152 [pTN4]		This work
BIK2154	YNEC213	As AB1157, but <i>lacZ::paeR71 r⁺m⁺ Kan^R</i>	P1 (BIK2141) to AB1157	This work
BIK2155	YNEC214	As AB1157, but <i>lacZ::paeR71 r⁺m⁺ Kan^R</i>	P1 (BIK2142) to AB1157	This work
BIK2156	YNEC215	As AB1157, but <i>lacZ::Cml^R</i>	P1 (BIK2143) to AB1157	This work
BIK2157	YNEC216	As BIK2156, but <i>trpB114::Tn10</i>	P1 (ME8481) to BIK2156	This work
BIK2158	YNEC217	BIK2157 [pTN4]		This work
BIK2176		As JC7623, but <i>ΔrecA306::Tn10</i>	P1 (BIK733) to JC7623	This work
BIK2411	V68	As V66, but <i>recC73</i>		G. Smith/ Schultz et al. 1983
BIK2413		As BIK796, but <i>Δ(srlR-recA)306::Tn10</i>	P1 from BIK1597 to BIK796	This work
BIK2414		As BIK1274, but <i>Δ(srlR-recA)306::Tn10</i>	P1 from BIK1597 to BIK1274	This work
BIK2445		As BIK1910, but <i>recF⁺ zic::Tn10</i>		Handa et al. 1997
BIK2446		As BIK1911, but <i>recF⁺ zic::Tn10</i>		Handa et al. 1997
BIK2447		As BIK1912, but <i>recF⁺ zic::Tn10</i>		Handa et al. 1997
BIK2563		As AB1157, but <i>recJ284::Tn10</i>	P1 (BIK787) to AB1157	This work
BIK2565		As AB1157, but <i>recN1502::Tn5</i>	P1 (BIK1044) to AB1157	This work
BIK2571		As AB1157, but <i>malF::Tn10 lexA3 (lnd⁺)</i>	P1 (BIK1206) to AB1157	This work
BIK2574		As AB1157, but <i>malF::Tn10</i>	P1 (BIK1206) to AB1157	This work
BIK2577		As AB1157, but <i>recR252::mini-Tn10</i> Kan	P1 (BIK1399) to AB1157	This work
BIK2680		As AB1157, but <i>recQ1803::Tn3</i>	P1 (BIK1224) to AB1157	This work
BIK2843		As AB1157, but <i>hupA::Cm</i>		J. Rouviere-Yaniv/ Li & Waters 1998
BIK2844		As AB1157, but <i>hupB::Km</i>		J. Rouviere-Yaniv/ Li & Waters 1998

BIK2875		As AB1157, but <i>hupA::Cm^r hupB::Km^r</i>		J. Rouviere-Yaniv/ Li & Waters 1998
BIK2876	N2101	<i>recB268::Tn10</i>		R. Lloyd/Lloyd et al. 1987
BIK2877	N2103	<i>recC266::Tn10</i>		R. Lloyd/ Lloyd et al. 1987
BIK3682	BNH682	As V69, but <i>argA81::Tn10</i>	P1 (BIK800) to V69	This work
BIK3686	BNH686	As AB1157, but <i>recC73 recC1002 argA81::Tn10</i>	P1 (BIK3682) to AB1157	This work
BIK3701	BNH701	As V69, but <i>recD::Tn10</i>	P1 (BIK806) to V69	This work
BIK3702	BNH702	As BIK1288, but <i>recR::mini-Tn10 kan</i>	P1 (BIK1399) to BIK1288	This work
BIK3703	BNH703	As BIK1290, but <i>recR::mini-Tn10 kan</i>	P1 (BIK1399) to BIK1290	This work
BIK3704	BNH704	As BIK2445, but <i>recR::mini-Tn10 kan</i>	P1 (BIK1399) to BIK2445	This work
BIK3705	BNH705	As BIK2446, but <i>recR::mini-Tn10 kan</i>	P1 (BIK1399) to BIK2446	This work
BIK3706	BNH706	As BIK2447, but <i>recR::mini-Tn10 kan</i>	P1 (BIK1399) to BIK2447	This work
BIK3707	BNH707	As BIK1288, but <i>recO::Tn5</i>	P1 (BIK1192) to BIK1288	This work
BIK3708	BNH708	As BIK1290, but <i>recO::Tn5</i>	P1 (BIK1192) to BIK1290	This work
BIK3709	BNH709	As BIK2445, but <i>recO::Tn5</i>	P1 (BIK1192) to BIK2445	This work
BIK3710	BNH710	As BIK2446, but <i>recO::Tn5</i>	P1 (BIK1192) to BIK2446	This work
BIK3711	BNH711	As BIK2447, but <i>recO::Tn5</i>	P1 (BIK1192) to BIK2447	This work
BIK3713	BNH713	As BIK1288, but <i>Tc^S</i>	Selected by fusaric acid plate (Bochner et al. 1980)	This work
BIK3728	BNH728	As BNH713, but <i>recD::Tn10</i>	P1 (BIK806) to BNH713	This work
BIK3732	BNH732	As BIK2411, but <i>argA81::Tn10</i>	P1 (BIK800) to BIK2411	This work
BIK3738	BNH738	As BNH713, but <i>recC73 argA81::Tn10</i>	P1 (BIK732) to BNH713	This work
BIK3884	BNH884	As JC8679, but <i>recT101::Tn10</i>	P1 (KF1503) to JC8679	N. Kobayashi
BIK3919	BNH919	As JC5519, but <i>argA81::Tn10</i>		This work
BIK3920	BNH920	As GC3403, but <i>recBC argA81::Tn10</i>		This work
BIK3921	BNH921	As BIK2411, but <i>rec⁺ argA81::Tn10</i>		This work
BIK3931	BNH931	As JC9604, but <i>recT::Tn10</i>	P1 (BNH884) to JC9604	This work
BIK3961	BNH961	As AB1157, but <i>recB268::Tn10</i>	P1 (BIK2876) to AB1157	This work
BIK3963	BNH963	As AB1157, but <i>recC266::Tn10</i>	P1 (BIK2877) to AB1157	This work
BIK4034	BNH1034	As AB1157, but <i>recC73 argA81::Tn10</i>	P1 (BIK3732) to AB1157	This work

Table 2. λ strains.

Name	Genotype	Comments	Source/References
LIK351	cl-71		Laboratory collection
LIK	vir		Laboratory collection
LIK630	ΔB gam210 imm434 χ^+C157 nin5		Laboratory collection
LIK810	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ imm21 nin5 = D69 shn6 ⁰		S. Mizusawa/ Mizusawa & Ward 1982
LIK814	wild type	= λ PaPa	H. Ikeda
LIK848	Jh int ⁺ red3 gam210 cl26 = MMS748 Sam7		F. W. Stahl
LIK891	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ Δ (red-gam)	SaI-SaI fragment was removed from LIK810	This work
LIK907	As LIK891, but int::E. coli	Carries an E. coli fragment with χ^+ (Sau3AI fragment at 79 min shown in Figure 1)	This work
LIK916	As LIK891, but int	BamHI site in int gene was filled in with Klenow fragment.	This work
LIK950	As LIK891, but int:: χ^+C157	Amplified fragment of LIK630 containing χ^+C157 (38411-38620 in the map of wild-type λ) was inserted into LIK891	This work
LIK1054	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ Δ (red-gam)	LIK916 ligated with right region from XhoI site of LIK814.	This work
LIK1056	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ :: χ^+ Δ (red-gam)	LIK992 ligated with right region from XhoI site of LIK814.	This work
LIK1058	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ :: χ^+-9^- Δ (red-gam)	LIK1030 ligated with right region from XhoI site of LIK814.	This work
LIK1059	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ :: χ^+-10^- Δ (red-gam)	LIK1032 ligated with right region from XhoI site of LIK814.	This work
LIK1062	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ :: χ^+-11^- Δ (red-gam)	LIK1034 ligated with right region from XhoI site of LIK814.	This work
LIK1066	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ :: χ^+-8^- Δ (red-gam)	LIK1023 ligated with right region from XhoI site of LIK814.	This work
LIK1068	As LIK848, but Δ (red-gam)	SaI-SaI fragment was removed from LIK848	This work
LIK1098	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ Δ (red-gam)	LIK916 and LIK814 recombined <i>in vitro</i> at Salfsite	This work
LIK1099	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ :: χ^+ Δ (red-gam)	LIK950 and LIK814 recombined <i>in vitro</i> at Salfsite	This work
LIK1100	Bam1 ⁰ ΔB int ⁺ :: χ^+ Δ (red-gam)	LIK907 and LIK814 recombined <i>in vitro</i> at Salfsite	This work
LIK1101	Jh ΔB int ⁺ Δ (red-gam) cl26 Sam7	LIK916 and LIK 848 recombined <i>in vitro</i> at Salfsite. Jh was crossed in from LIK848	This work
LIK1102	Jh ΔB int ⁺ :: χ^+ Δ (red-gam) cl26 Sam7	LIK950 and LIK 848 recombined <i>in vitro</i> at Salfsite. Jh was crossed in from LIK848	This work
LIK1103	Jh ΔB int ⁺ :: χ^+ Δ (red-gam) cl26 Sam7	LIK907 and LIK 848 recombined <i>in vitro</i> at Salfsite. Jh was crossed in from LIK848	This work

Table 3. Plasmids.

Name	Genotype	Comments	Source/ References
pACYC184			laboratory collection
pBR322	ampicillin (Amp) tetracycline (Tet)		laboratory collection
pMB4	<i>EcoRI</i> r ⁺ m ⁺ Amp		F. W. Stahl/ Betlach et al. 1976
pUC4K	Amp, kanamycin (Kan)		Vieira and Messing, 1982
pUC18	Amp		Laboratory collection
p8C2S		Cml fragment of Tn9 inserted into pUC8. One <i>HindIII</i> site is changed to a <i>SmaI</i> , so that <i>SmaI</i> excises Cml fragment.	J. Kato
pMC1403SH-1		The <i>SmaI</i> site of pMC1403 was exchanged to <i>HindIII</i> site.	Casadaban et al., 1980
pIK137	<i>PaeR7I</i> r ⁺ m ⁺ Amp	= pPAORM3.8	T. Gingeras/ Naito et al. 1995; Gingeras & Brooks 1983
pIK163	<i>EcoRI</i> r ⁺ m ⁺ Amp	replacing a <i>BamHI-SalI</i> fragment of pBR322 with a <i>BamHI-SalI</i> fragment of pMB4	Kusano et al. 1995
pIK164	<i>EcoRI</i> r ⁺ m ⁺ Amp	cleavage of pIK163 with <i>HindIII</i> in the <i>r</i> gene, digestion with T4 DNA polymerase, and self-ligation. This should delete 4 bp (bp 526-529) in the <i>r</i> coding region, change the reading frame after amino acid 68, and generate a stop codon (TAG) 25 amino acids downstream.	Kusano et al. 1995
pIK166	<i>EcoRI</i> r ⁺ m ⁺ Amp	deleting a <i>BamHI-HindIII</i> fragment of pIK163, which stabilizes plasmids (data not shown)	Kusano et al. 1995
pIK167	<i>EcoRI</i> r ⁺ m ⁺ Amp	deleting a <i>BamHI-HindIII</i> fragment of pIK164.	Kusano et al. 1995
pTN4	<i>PaeR7I</i> r ⁺ m ⁺ Amp		Naito et al. 1995
pHSG415	Amp chloramphenicol (Cml) kanamycin (Kan)	= pSC101ts replication	Hashimoto-Gotoh et al. 1981
pIK172	pSC101ts <i>EcoRI</i> r ⁺ m ⁺ Amp Cml		Naito et al. 1995
pIK173	pSC101ts <i>EcoRI</i> r ⁺ m ⁺ Amp Cml	restriction-minus version of pIK172	Kusano et al. 1995
pIK179	pSC101ts <i>EcoRI</i> r ⁺ m ⁺ Cml	Amp ^S version of pIK173. inserting a <i>BamHI</i> linker (5' CCGGATCCGG) into a <i>HincII</i> site in the <i>bla</i> (Amp ^R) gene, which confers resistance to Amp.	Kusano et al. 1995
pIK180	Amp	= pTZ18R	K. Mizobuchi/ Zagursky & Berman 1984
pIK181	<i>RsaI</i> r ⁺ m ⁺ Amp	= pTZ18U- <i>RsaI</i> rm	A. L. Bari & R. I. Gumpfort/ Kaszubska et al. 1989
pTN9	pSC101ts <i>PaeR7I</i> r ⁺ m ⁺ Amp Cml Kan		Naito et al. 1995
pTN11	pSC101ts <i>PaeR7I</i> r ⁺ m ⁺ Amp Cml Kan	restriction-minus version of pTN9	Naito et al. 1995
pTN18	pSC101ts <i>PaeR7I</i> r ⁺ m ⁺ Amp	Amp ^S version of pTN9. cleaving the <i>bla</i> gene of pTN9	Kusano et al. 1995

	Cml Kan	with <i>Pst</i> I, removal of 4-bp equivalents with T4 DNA polymerase, and self-ligation,	
pIK195	miniF-Km <i>recA</i> 98		A. Bailona & R. Devoret/ Dutreix et al. 1989
pIK519	pSC101 ^{ts} <i>spc rcr ori</i> χ^0 = pIND		A. Gruss & D. Ehrlich/ Dabert et al. 1992
pIK520	pBR322 cl857 pL <i>rcr-rep</i> = HELPER Amp		A. Gruss & D. Ehrlich/ (Figure 2 of) Dabert et al. 1992
pIK552	synthetic χ^+	inserting the χ^+ -containing 19-bp long sequence: 5'-GATCCAGCTGCCACCAGCA-3' 3'-GTCGACGGTGGTCGTTTCA-5' The fragment was inserted into the <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site of pIK519 so that the 5' end of the upper strand as shown above was close to the rolling-circle replication origin.	Handa et al. 1997
pIK554	synthetic χ^+	inserting the χ^+ -containing 22-bp long sequence: 5'-GATCCAGCTGCGAGCACCAGCA-3' 3'-GTCGACGCTCGTGGTCGTTTCA-5' The fragment was inserted into the same <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site of pIK519.	Handa et al. 1997
pRM212	pBR322 <i>Eco</i> P11 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺ Amp		J. R. Scott/ Mural et al. 1979
pNH212	pBR322 <i>Eco</i> P11 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺ Δ <i>Hind</i> III fragment of pRM212 Amp		This work
pSH180	pBR322 <i>Eco</i> P151 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺ Amp		T. A. Bickle / Humbelin et al. 1988
pNH213	pBR322 <i>Eco</i> P151 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺ Δ <i>Hind</i> III fragment of pSH180 Amp		This work
pNR201	pACYC184 <i>Eco</i> P11 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁻ Cml		T. A. Bickle / Humbelin et al. 1988
pNH224	pACYC184 <i>Eco</i> P11 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺ Δ <i>Hind</i> III site in R of pNR201 Cml		This work
pNR301	pACYC184 <i>Eco</i> P151 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺ Cml		T. A. Bickle / Humbelin et al. 1988
pNH225	pACYC184 <i>Eco</i> P151 <i>r</i> ⁻ Δ <i>Hind</i> III site in R of pNR301 <i>m</i> ⁺ Cml		This work
pIK187	<i>lar</i> ⁺ Amp	<i>Pst</i> I fragment of pRAC3 was ligated with pUC18	This work.
pRAC3	<i>recE</i> ⁺ <i>T</i> ⁺ <i>lar</i> ⁺ Amp		Willis et al. 1985
PJC980	<i>recE</i> ⁺ <i>T</i> ⁺ <i>lar</i> Amp		A. J. Clark/ Clark et al. 1993
PJC1501	<i>recE</i> ⁺ <i>T</i> ⁻ <i>lar</i> Amp		A. J. Clark/ Clark et al. 1993; Kusano et al. 1994
PJC1509	<i>recE</i> ⁺ <i>T</i> ⁻ <i>lar</i> Amp		A. J. Clark/ Clark et al. 1993; Kusano et al. 1994
pNH263	<i>recE</i> ⁺ <i>T</i> ⁺ <i>lar</i> Amp	Δ <i>Hpa</i> I- <i>Sph</i> I fragment of pRAC3	This work
pNH271	<i>recE</i> ⁺ <i>T</i> ⁺ <i>lar</i> Amp, Kan	Δ <i>Age</i> I site in <i>lar</i> and ligated with Kan ^R fragment of	This work

		pUC4K	
pYNEC206	PaeR7I r ⁺ m ⁺ Amp	An <i>EcoRV</i> linker oligonucleotide (5'CGATATCG) was inserted into the <i>NruI</i> site of pPAORM3.8. This work	
pYNEC208	PaeR7I r ⁺ m ⁺ Amp	The shorter <i>Bam</i> HI fragment of pUC4K was inserted into the <i>Bam</i> HI site of pYNEC206. This work	
pYNEC200	PaeR7I r ⁺ m ⁺ Amp	The <i>EcoRV</i> fragment of pYNEC208 was inserted into the <i>EcoRV</i> site of pMC1403SH-1. This work	
pYNEC204	PaeR7I r ⁺ m ⁺ Amp	The shorter <i>Bam</i> HI fragment of pUC4K was inserted into the <i>Bam</i> HI site of pTN4. This work	
pYNEC214	PaeR7I r ⁺ m ⁺ Amp	An <i>EcoRV</i> linker oligonucleotide (5'CGATATCG) was inserted into the <i>NruI</i> site of pYNEC204. This work	
pYNEC201	PaeR7I r ⁺ m ⁺ Amp	The <i>EcoRV</i> fragment of pYNEC214 was inserted into the <i>EcoRV</i> site of pMC1403SH-1. This work	
pYNEC202	Amp, Cml	The <i>SmaI</i> fragment of p8C2S was inserted into the <i>EcoRV</i> site of pMC1403SH-1. This work	

χ^+ 配列のクローン化

大腸菌 W3110 の染色体 DNA を単離し、*Sau3AI* で 2 回処理し完全に消化した。断片化された DNA は、4% Nusieve GTG アガロースゲル電気泳動によって分離され、350 bp 以下のものを回収した。これらは *Bam*HI で消化した LIK891 ラムダファージベクター DNA とライゲーション反応によって結合され、ラムダファージの試験管内パッケージング反応によって、大腸菌染色体断片をもつファージライブラリーとした。このライブラリーを大腸菌 BIK1284 (= *recC*^{*}) にプレートし、そこで大きなブランクを形成した 134 個について、大腸菌 *recC*^{*} 株にさらに感染させて、スポットアッセイで確認した。23 個の候補のうち、13 個については、野生型である *recBCD*⁺ 株にスポットしても大きなブランクを形成しない (χ を含まない) ことを確認した。残り 10 個は野生株でも大きなブランクを形成したので、 χ を含むと判断してこれ以上解析しなかった。挿入された断片が大きいものについては、PCR (プライマー: SSSS-1 = 5' TATCGCTTATCTGCTTCTCAAGA と SSSS-2 = 5' TCATCCGGCACAGTATCAAGGTAT) によって増幅した DNA 断片を、さらに *Sau3AI* で切断するというサイクルを繰り返して候補となる配列を短くしていった。

DNA 配列決定

recC^{*} 株で大きいブランクサイズを示したファージは、単一ブランクから SM バッファー (0.1 M NaCl, 5 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, 0.01 % gelatin) に懸濁した。ファージベクターに挿入された大腸菌染色体由来の断片は、PCR (プライマー: SSSS-3 = 5' CTCTGTTACAGGTCACCTAAT (λ ゲノムの 27580 から 27599 に相当) と、SSSS-4 = 5' TCAGACTTCAATGGAAGT (λ ゲノムの 28387 から 28368 に相当)) によって増幅され、

サイクルシーケンス法 (Hattori *et al.* 1992) によって決定した (プライマー: SSSS-1、あるいは SSSS-2)。決定された配列は、FASTA (Pearson & Lipman 1988) を用いて、GenBank データベースの上で大腸菌染色体のどこに相当するか解析した。

ラムダファージの 1 ステップ子ファージ産生量の測定

大腸菌は対数増殖期まで培養し、遠心により回収し 2×10^8 / ml の濃度になるように、TM バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) -10 mM MgSO₄) で再懸濁し、37 °C で 1 時間あたためた。このうち 0.25 ml が、あたためておいたファージ液 (多重感染度 = multiplicity of infection (moi) が 0.05 となるように懸濁された) 0.25 ml と混ぜられた。この溶液は、37 °C で 15 分おいた後、このうち 0.05 ml をあたためておいた λ 抗体 ($K = 1$ / 分) 入りの TM バッファー、0.45 ml と混ぜた。5 分後、そのうち 0.0125 ml を 5 ml のラムダファージ感染用培地に加え、37 °C で振とう培養した。このとき、はじめに存在したファージの数 (infective center) を調べておく。70 分後、数滴のクロロフォルムを加えて、37 °C で 10 分振とうした後、大腸菌 JC8679 株にプレートして翌日プラーク数を計測した。1 ステップの子ファージ産生量は、[90 分後のファージ数 / はじめに存在したファージの数] として計算した。吸着率はこの条件で 95 % 以上だった。

プラスミドのローリングサークル型複製の誘導

28 °C で培養してきた、2 つのプラスミド TARGET と HELPER (Dabert *et al.* 1992 の Figure 2) をもつ大腸菌を、40 °C に移して 3 時間、あるいは 4 時間後にその総 DNA を回収した。

5×10^8 個の細胞を遠心により集菌し、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM EDTA、15 % ショ糖溶液 80 ml に懸濁した。つづいて、ライソザイム (10 mg/ml) を加えて 37 °C で 10 分おいて溶菌させた。さらに、10 % SDS 溶液 10 μ l を加え、65 °C で 10 分ときどき混ぜながら置いた。RNase A (10 μ g/ml) 2 μ l を加えた後、37 °C で 10 分処理し、Proteinase K (10 μ g/ml) 2 μ l を加えてさらに 37 °C で 10 分おいた後、激しくボルテックスで攪拌した。こうして得られた総 DNA (20 μ l) は、0.7 % アガロースで 25 V、12 時間泳動した後、エチジウムブロマイド溶液 (0.5 μ g/ml) で染色し、紫外線 (60 mJ) を照射し、0.25 M HCl で 1 時間処理した後、0.4 M NaOH 10 分間処理したゲルをトランスファーし、TARGET (= pIK519) をプローブとしてサザン解析した。

ラムダファージの組換え実験

大腸菌は 37 °C で、 1.5×10^8 cells/ml の濃度までラムダファージ感染用培地で培養し、このうち 0.1 ml を、あたためておいたファージ液 (かけあわせる 2 種類のファージ (LIK916, LIK950, LIK907 と LIK1068) の数がそれぞれ 7.5×10^8 pfu; 多重感染度 (moi) = 5) 0.1 ml と混ぜた。37 °C で 30 分振とうした後、0.05 ml を 5 ml のラムダファージ感染用の培地に加え、37 °C で 1 時間振とう培養した。数滴のクロロフォルムを加えて、37 °C で 10 分振とうした後、*Jh S*⁺ 組換え体は大腸菌 BIK808 株にプレートし、透明なブランクと濁ったブランクを計測した。総子ファージは、大腸菌 JM1 にプレートすることで計測した。挿入した配列が組換えのホットスポットとして機能したかは、[濁ったブランク/ 透明なブランク] の割合によって求めた。組換え頻度は、[BIK808 でのブランク数/ JM1 でのブランク

数] $\times 100$ によって求めた。Sam7 変異の復帰は 10^{-4} 以下であった。

プラスミドの安定化

安定性を調べたいプラスミド pIK172 ($r^+ m^+$)、pIK173 ($r^- m^+$)、あるいは pIK174 ($r^- m^-$) を、調べたい大腸菌に形質転換し Amp を加えた L 培地上にプレートとする。こうして得られた新しい形質転換体を、5 ml の薬剤の入っていない L 液体培地にとり、30 °C で振とう培養した。一晚培養後、同じ培地に 10^{-6} 、あるいは 10^{-3} に希釈し植え継いだ。世代数は、薬剤の入っていない L 培地上で成長するコロニーの数から $[\log (T = i / T = 1) / \log 2]$ の計算式によって計算した。プラスミド保持率は、Amp を加えた L 培地上で育成したコロニーの数と、薬剤の入っていない L 培地上で育成するコロニーの数の比とした。

プラスミドの複製の阻害

大腸菌細胞は、プラスミドを選択するために Amp を加えた L 液体培地で 30 °C で振とう培養した。対数増殖初期 ($OD_{660\text{ nm}} = 0.3$) に集菌して、薬剤の選択をしない L 液体培地で 42 °C で振とう培養を続けた。その後は、 $OD_{660\text{ nm}}$ が 0.3 になる度に希釈した。総細胞数 (Total cell) は顕微鏡下での細胞の数、生菌数 (viable cells) は薬剤の選択をしない L 培地上で 30 °C で生育したコロニー数、プラスミド保持菌数 (Plasmid-carrying cells) は Amp の選択をした L 培地上で 30 °C で生育したコロニー数である。

細胞の形態

大腸菌は培養温度を高温に移した後、示された時間ごとにサンプリングして等量のメタノール-ホルムアミド溶液 (2:1) で固定した。氷上で 10 分おいた後、集菌し DAPI を加えた TM バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 10 mM MgSO₄) に再懸濁し、顕微鏡で観察した。

染色体切断の観察 (アガロースゲル電気泳動)

大腸菌細胞の総 DNA は、上記プラスミドのローリングサークル型複製の誘導での方法と同じ方法で調製した。電気泳動は、0.8 % アガロースゲルで行った。

SOS 応答の誘導 (ベータガラクトシダーゼ活性の測定)

stfA-lacZ 融合レポーター遺伝子を染色体中にもつ大腸菌の培養液 (OD 660 nm = 0.3) のベータガラクトシダーゼ活性の測定は Miller の方法 (Miller 1992) にしたがった。ベータガラクトシダーゼ濃度 (U/ml) は、 $[1000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / t \times v \times OD_{600}]$ の計算式で求めた。ここで、 t は反応時間、 v は反応の量である。

RecBCD 変異株の表現形 (カイ認識の確認)

recBCD 突然変異株の表現形のうち、カイ配列の認識を調べるのに、そのゲノム中にカイ配列をもつ (Chi⁺)、あるいはもたない (Chi⁰) ラムダファージを用いた。調べたい大腸菌株を対数増殖初期までラムダファージ感染用の液体培地で振とう培養し、溶かしておいたトッパトッパアガー (寒天濃度の低いアガー) と混ぜ、ラムダファージ感染用の寒

天培地の上にプレートした。

RecBCD 変異株の表現形（紫外線（UV）感受性）

対数増殖期まで L 液体培地で振とう培養し、これを M9 最小培地で希釈して、L 寒天培地上に塗り拡げた。このプレートに、紫外線（254 nm）をいろいろな量で照射した後、37 °C で一晩暗黒下で培養し、20 時間後にコロニー数を計測した。

制限酵素活性の測定

プラスミドをもつ、あるいはもたない大腸菌をプラスミドをもつ場合には薬剤の選択をして、一晩培養した培養液を 1/100～1/50 に希釈した後、トリプトン液体培地で対数増殖期まで振とう培養した。この培養液をラムダファージ（ λ vir）の宿主細胞として使用した。Red 組換え経路の遺伝子を連結したプラスミドをもつ大腸菌は、その発現のために β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG、0.1 mM）を含む培地で 2 時間以上培養した。

アガロース内での染色体 DNA の調製

染色体 DNA を調整したい大腸菌を 5 ml の L 液体培地で対数増殖期（OD 660 = 0.4）まで振とう培養し、アガロースゲル内に細胞溶菌液の調整は Kusano et al. (1989) の論文に記載された方法で行った。すなわち：培養液を遠心集菌し、2, 4-ジニトロフェノール（終濃度 0.01 %）を加えてその呼吸を止めた。遠心後、沈殿をバッファー（10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 M NaCl）で 2 回洗い、同じバッファーに 0.5 ml 懸濁する。これを等量の溶かし、ておいた 1.0 % InCert アガロース（FMC）と混ぜ、鋳型に流し込んで 4 °C で固めた。こ

うしてできたプラグは、I 溶液 (6 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 M NaCl、0.1 M EDTA、Brij-58 (0.5 %)、0.2 % ソディウム・デオキシコレート (sodium deoxycholate)、0.5 % ソディウム・ラウロイル・サルコシネート (sodium lauroyl sarcosinate)、ライソザイム (1 mg/ml)、RNase A (20 mg/ml) に加えて 15 時間、37 °C に置いた。これを 0.5 M EDTA (pH 9.5) で洗った後、II 溶液 (0.5 M EDTA、1 % SDS、2 mg/ml プロティネース K (pH 9.5)) に変えて、48 時間、50 °C に置き、0.5 M EDTA (pH 9.5) で洗った。

パルスフィールドゲル電気泳動

上記の方法で調整したプラグを 1.0 % SeaKem GTG アガロース (FMC) の泳動用ゲルのウェルに挿入し、溶かした 1.0 % アガロースを加えて固める。パルスフィールドゲル電気泳動は、Pharmacia/LKB の器械で、1 x TBE (45 mM Tris-borate/ 1.25 mM EDTA) 泳動バッファー、165V、パルスタイム 120 秒、泳動時間 24 時間、泳動温度 10 °C の条件で行った。サイズマーカーとして、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の染色体 (Pharmacia) を使用した。泳動後、エチジウムブロマイド溶液 (0.5 µg/ml) で染色し、紫外線を照射して写真を撮り、巨大染色体 DNA 領域を VILBER LOURMAT の器械と BIO-PROFIL ソフトウェアで定量的に解析した。このとき、一定量泳動していた酵母染色体マーカーをインターナルコントロールとして、DNA 量の分かっているラムダ DNA で描いた定量曲線をもとに DNA 量を算出した。

結果

1. 相同組換えのホットスポットであるカイ (X) 配列を認識できない変異 RecBCD 酵素が認識する新しいカイ様配列

大腸菌の RecBCD 相同組換え経路で重要な、*recB* および *recC* 遺伝子の突然変異は、それがコードする多機能酵素である RecBCD 酵素の機能の中で、欠損している機能によって分類されている (Amundsen et al. 1990; Eggleton & Kowalczykowski 1993a; Eggleton & Kowalczykowski 1993b; Holbeck and Smith 1992; Schultz et al. 1983)。その中で *recC1004* と呼ばれる突然変異は、カイ配列によって相同組換えが促進されない変異の一つとして報告された (Schultz et al. 1983)。私は、このカイ配列を認識できない変異株が、認識する新しいカイ様配列を発見した。

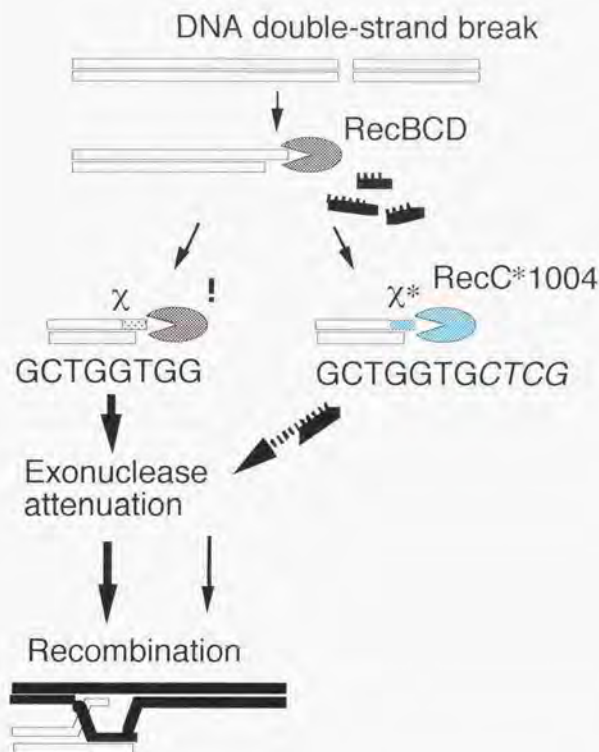


図3 野生型の RecBCD 酵素は、8 塩基からなる χ （カイ）配列を認識すると二本鎖 DNA の分解をやめ組換えを促進するが、変異型 RecC*1004 酵素は、 χ^* （カイスター）という新しい 11 塩基からなる配列を認識した。 χ^* 配列は、RecC*1004 酵素のもつ二本鎖 DNA 分解活性を抑えたが、ラムダファージを用いた系で組換えは促進しなかった。

1-1. スクリーニング

バクテリオファージは、大腸菌に感染するとその線状ゲノムを細胞に注入する。大腸菌ライゲースによって環状化したゲノムはシータ型に複製するが、実はこの単量体ゲノムはパッケージされることはなく子ファージにならない。それ故パッケージされるためには、分子間での相同組換えによって多量体を形成するか、ファージゲノムは感染後期にシータ型からローリングサークル型に複製のモードをスイッチするが、それによってタンデムに並んだコンカテマーゲノムを形成することが必須である。ファージ自身の持つ相同組換え機能を欠損させたラムダファージゲノム中にカイ配列があると、野生型の大腸菌に感染した場合、その両方のルートによって子ファージの産生量が増し、ブランクサイズが増大する。

カイ配列を認識できない変異株の一つである *recC1004* (*recC**株 (Schultz et al. 1983)) を用いて、これに反応するシスの DNA エLEMENTを探ることを試みた。この変異酵素は、知られている限り、カイ配列認識以外の二本鎖 DNA 分解活性 (Schultz et al. 1983) や、カイ配列によらない組換え活性 (Schultz et al. 1983 の Table 7)、ヘリケース活性 (Arnold et al. 1998) は野生型並であった。

ラムダファージベクターに大腸菌染色体 DNA 由来の短い DNA 断片を挿入したライブラリーを調整し、ブランクサイズが増大したクローンを回収した。

1-2. *recC**変異株でブランクサイズを増加させる DNA 配列の決定

大腸菌染色体 DNA を 4 塩基認識の制限酵素である *Sau3A*I で切断し、遺伝子ではなくシスのELEMENTを検索する目的で 350 bp 以下の断片を λ *red gam* ベクターに挿入し、試験管内パッケージング反応によりファージライブラリーとした。65,000 のクローンが

ら 23 個が *recC**変異株で大きなブランクを形成した。このうち、13 個が野生型 (*recBCD*⁺) で小さいブランクを形成したので本来のカイ配列を含まない目的の配列をもつ候補となった。

この 13 個のうち、挿入の短い 10 個について挿入されていた配列を決定した。配列決定したすべての *Sau*3A1 断片は、大腸菌の染色体の 3 カ所 (43 min の *fliO* (GeneBank accession# L22182 と L21994)、73 min の *rplD* (accession# X02613) と 79 min の *yhjO* (accession# U00039) (図 4)) のいずれかの *Sau*3A1 断片を含んでいた。これらの 3 カ所の断片はそれぞれ、3 回、1 回、9 回ずつ繰り返し得られていた。すべてに共通してみられた配列は、5' GCTGGTGCTCG (図 4) であった。この 11 塩基は、7 塩基目まで本来のカイ配列と同一であるが、8 番目の塩基から異なっていた。得られたクローン中ですべての向きは同一で、それはカイ配列が活性化する向きと同じであった (Kobayashi *et al.* 1982)。私は、これを *recC** 変異株に対応するカイ様の配列ということで χ^* (カイスター) 配列と名付けた。

χ

GCTGGTGG

χ^* cloned	t g c a c g GCTGGTG CTCG g c g t t	2019755
	a t g t c a GCTGGTG CTCG t c a g g	3449593
	g a t t g t GCTGGTG CTCG g c t a c	3691893
χ^* synthetic	g g a t c c GCTGGTGCTCG g a t c c	
χ^*-8^-	g g a t c c GCTGGTG ATCG g a t c c	
χ^*-9^-	g g a t c c GCTGGTG CACG g a t c c	
χ^*-10^-	g g a t c c GCTGGTG CTAG g a t c c	
χ^*-11^-	g g a t c c GCTGGTG CTCC g g a t c c	

図4 χ 、 χ^* と変異 χ^* 配列。最初の行が本来の χ 配列である。2から4行目がここで得られた断片の中に見られた配列である。Blattner の情報を元にその染色体での位置を右に示した。 χ^*-8^- 、 χ^*-9^- 、 χ^*-10^- と χ^*-11^- は、合成によって8番目から11番目の塩基にそれぞれ1塩基置換を導入した χ^* 変異配列である。

1-3. *recC**変異株が認識する χ *配列

この χ *配列が、実際に *recC**変異株で λ ファージの増殖を促進することを1ステップの子ファージの産生量を測定することによって確認した(図5)。 $\lambda\chi^*$ の子ファージの産生量は、野生型では $\lambda\chi^+$ のそれより少ないが($p < 0.0007$, Student's *t* 検定による)(図5A)、*recC**変異株では、 $\lambda\chi^*$ の子ファージの産生量は、 $\lambda\chi^+$ のそれより多かった($p < 0.0183$)(図5B)。野生型で $\lambda\chi^*$ の子ファージの産生量が、 $\lambda\chi^0$ に比べて多い($p < 0.0001$)のは、これが、7塩基目まで本来のカイ配列と同じである(1塩基変異)ためと考えられる。このことは、野生型の RecBCD 酵素も χ *配列に弱く反応していることを示している(Arnold、半田、小林、Kowalczykowski 投稿中)。

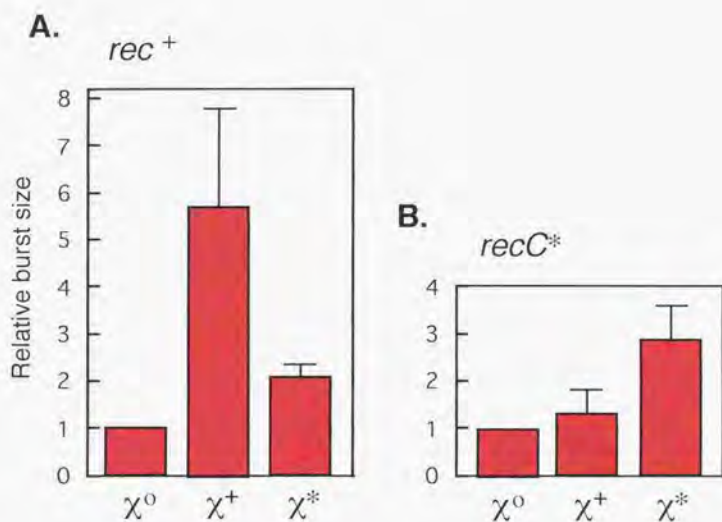


図5 χ^* 配列が λ の増殖に与える影響。(A) 野生型 (BIK1288) と(B) *recC^{*}*株 (BIK1284) での LIK916、LIK950 と LIK907 の相対的な1ステップ子ファージ産生量。6回の実験の平均値 (と標準偏差)。(A) χ^0 の子ファージ産生量は、 10.8 ± 1.68 。(B) χ^0 の子ファージ産生量は、 12.9 ± 2.89 。

1-4. 活性のある χ^* 配列は 5' GCTGGTGCTCG である

χ^* 配列はそれを合成して λ ファージに挿入した際にも *recC*^{*} 株での子ファージの産生量を増加させた。 χ 配列で、その 8 塩基中 1 塩基を変えただけで、その活性が低下することが知られている (Cheng & Smith 1984; Cheng & Smith 1987)。そこで合成した DNA を λ ファージに挿入することで、 χ^* 配列の 1 塩基配列置換 (図 4、6-9 行目) による χ^* 配列に与える影響を調べた。その結果、 χ^* 配列の後半の 4 塩基はいずれもこの活性に必要であることが明らかになった。1 ステップの子ファージ産生量実験の結果 ($n = 4$) は、以下の通りである。 χ^0 ; 9.08 ± 1.75 , χ^* ; 15.9 ± 3.61 , χ^{*-8} ; 10.8 ± 0.17 , χ^{*-9} ; 9.32 ± 1.00 , χ^{*-10} ; 10.9 ± 1.60 , χ^{*-11} ; 9.43 ± 0.58 。その差は小さいが、統計的に有意であった ($p < 0.0442$, $p < 0.0066$, $p < 0.0172$, $p < 0.0087$, Student's *t* 検定による)。この結果から、5' GCTGGTGCTCG を χ^* 配列として再定義した。

1-5. 二本鎖分解活性の阻害

λ ファージの子ファージの産生量を増加させるのには、相同組換えと二本鎖 DNA 分解活性の抑制の両方のルートがあった (上述)。本来の χ 配列は、野生型の RecBCD 酵素との相互作用でこの両方の働きをもっていた。私は、この変異酵素と χ^* 配列の相互作用で、この 2 つの働きがともに保存されているのか、それともどちらかの働きしかもたないのかをそれぞれ調べてみた。まず、 χ^* 配列が RecC^{*}酵素の持つ二本鎖 DNA 分解活性を抑え、それによってファージゲノムのローリングサークル型複製を促進できたのかについて調べた。ローリングサークル型の複製を誘導できるプラスミドの系 (Dabert et al. 1992) を用いた。ローリングサークル型に複製をさせるプラスミド (TARGET) には、そのための複

製起点と、シータ型の複製起点、さらに温度感受性のシータ型複製に要求されるタンパク質の遺伝子がのっている。ローリングサークル型複製に要求されるタンパク質の遺伝子は、高温で誘導されるプロモーターの下流に接続され、別のプラスミドから供給される。これら2つのプラスミドをもつ大腸菌細胞の培養を高温に移すと、シータ型からローリングサークル型に複製のモードがスイッチする (Dabert et al. 1992)。

この実験で、 χ 配列は野生型 ($recBCD^+$) の大腸菌の中で、以前の報告 (Dabert et al. 1992) 通りに、TARGET プラスミドの多量体を蓄積させた。このとき χ^* 配列では、わずかにしか多量体は観察されなかったが、それは χ^0 に比べると多かった (図6)。一方、 $recC^*$ 変異株では、 χ^* 配列をそのプラスミドにのせることによって、プラスミドの多量体が蓄積した (図6)。この株では、 χ 配列がないときでも、野生型よりも多くの多量体の蓄積が観察された。この実験は、より多量体を観察しやすいように、大腸菌の RecBCD 酵素以外の、別の DNA 分解酵素をコードする *sbcBC* 遺伝子に変異をもつ大腸菌で行った (Zaman & Boles 1994)。

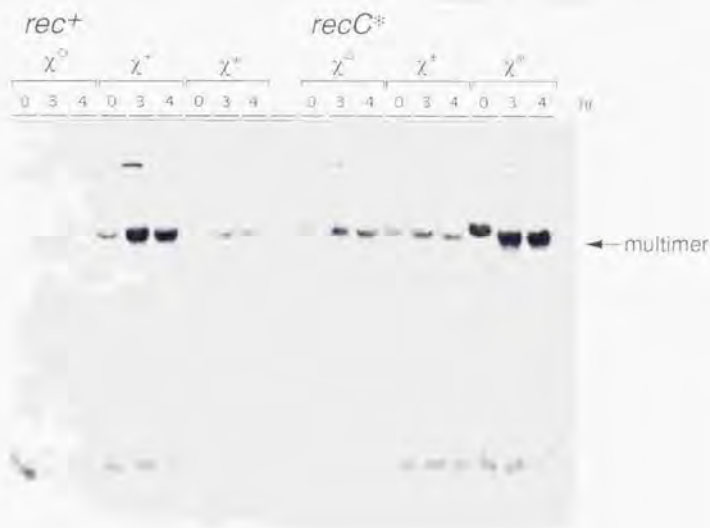


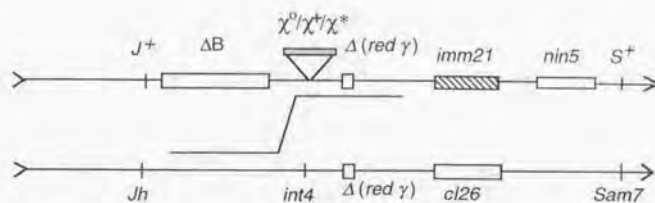
図6 χ^+ 配列は *RecC**酵素のもつ二本鎖 DNA 分解活性を阻害する。大腸菌 (BIK1460 and BIK1945) は、ローリングサークル型に複製させることのできるプラスミド (TARGET) とそれに必要なタンパク質を供給する2つのプラスミドをもつ。TARGET は、特別な配列をもたないもの (pIK519)、合成した χ 配列 (pIK552)、あるいは合成した χ^+ 配列 (pIK554) を挿入したものを用意した。28 °C から 40 °C に培養を移した後、記載された時間後に、細胞の総 DNA を単離し、アガロースゲル電気泳動をした後、サザン解析によって TARGET プラスミドを検出した。

1-6. χ^* 配列と RecBC*D 酵素の相互作用では相同組換えは促進されない

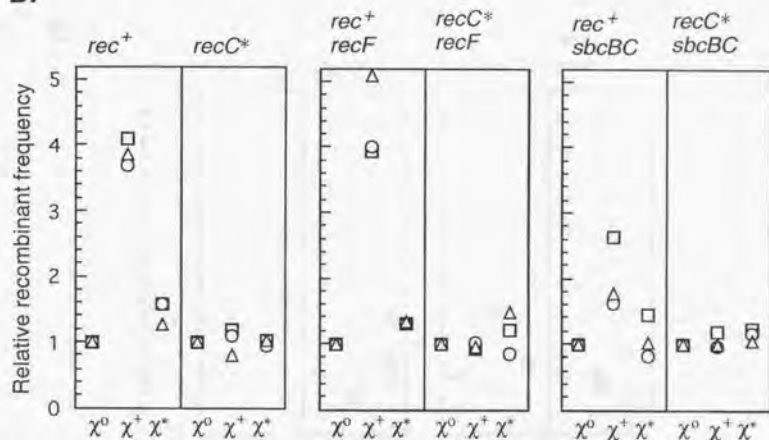
次に私は、 χ^* 配列と RecC*変異酵素の相互作用によって相同組換えが促進されるかについて、 λ ファージを用いた実験系で調べてみた（図7AとD）。相同組換えの頻度はファージゲノム上のJ遺伝子とS遺伝子の間で起こったものを測定した。同時にこの系では、組換え体が形成するプラークの形態によって（ cl^+ vs cl^- ）、挿入した配列が相同組換え促進配列として機能したかがわかる。

図7 (次頁) χ^* 配列の相同組換えに与える影響。 (A) λ ファージの相同組換え実験系 I。両親 λ ファージともファージの組換えに重要な Red 経路の遺伝子、RecBCD 酵素の働きを阻害する Gam タンパク質と部位特異的組換えに重要な Int タンパク質をコードする遺伝子は欠損させている。上に描かれた λ ファージ (LIK916、LIK950、あるいはLIK907) は、それぞれ χ_0 、 χ^+ 、あるいは χ^* 配列を *int* 遺伝子の部分に挿入してある。かけあわせ後、 $Jh S^+$ の組換え体を選択し、さらにその中で濁ったプラークを形成する cl^+ (*cl* 遺伝子の左側で組換えを起こしたことを示す) か、透明なプラークを形成する cl^- (*cl* 遺伝子の右側で組換えを起こしたことを示す) かを計測した。 (D) λ ファージの相同組換え実験系 II。両親 λ ファージは、組み換え体のマーカーとなる3カ所以外は、挿入した配列の部分を含めてアイソジェニック。かけあわせ後、 $Jh S^+$ の組換え体を選択し、*cl* の表現形を調べた。 (B) 実験系 I での組換え頻度。 $Jh S^+$ 組換え体の総数を相対値でプロットした。調べた大腸菌は、BIK1288、BIK1284、BIK796、BIK1274、BIK1460、と BIK1945。 χ_0 ファージの組換え頻度 (1とした値) と標準偏差は、それぞれ 0.37 ± 0.14 、 0.45 ± 0.14 、 0.29 ± 0.052 、 0.26 ± 0.093 、 0.54 ± 0.26 と 0.45 ± 0.065 だった。 (C) 実験系 I でのホットスポット活性。 cl^+ / cl^- の比をプロットした。3回の独立した実験での別の反応の平均値を示した。 (E) 実験系 II での組換え頻度。調べた大腸菌は、BIK1288、BIK1284、BIK796 と BIK1274。 χ_0 ファージの組換え頻度 (1とした値) と標準偏差は、それぞれ 1.74 ± 0.93 、 1.02 ± 0.48 、 4.67 ± 1.27 と 3.18 ± 0.97 だった。 (F) 実験系 II でのホットスポット活性。3回、あるいは4回の独立した実験での別の反応の平均値を示した。

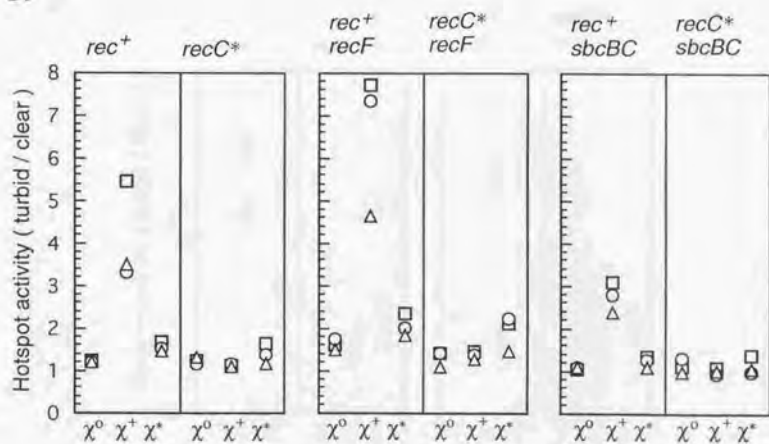
A.



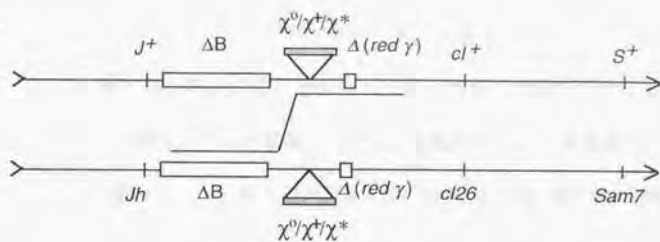
B.



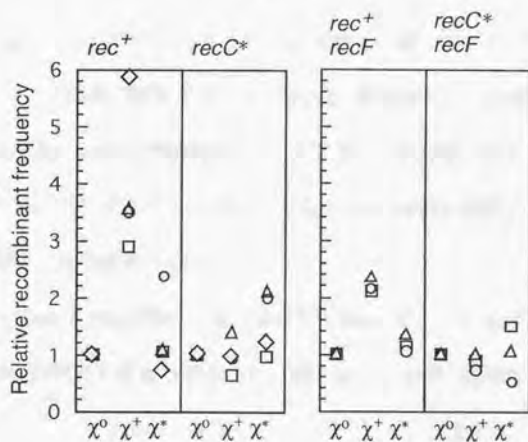
C.



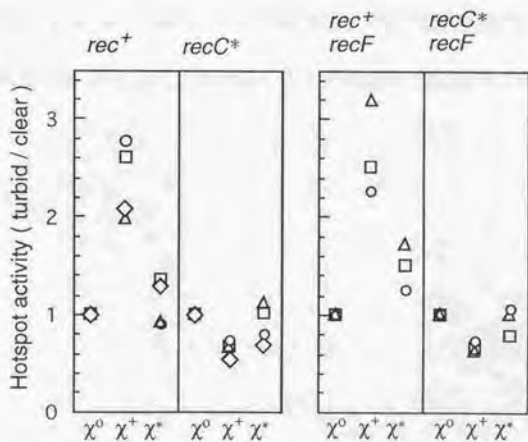
D.



E.



F.



野生型 (rec^+) では、 χ 配列によって、 χ^* 配列よりも相同組換えを促進した (図 7 BC)。 $recC^*$ 変異株では、 χ 配列は、明らかなホットスポット活性を示さなかった。これは以前の報告 (Schultz et al. 1983) と一致する。ただし χ^* 配列でも、この変異株では相同組換えを促進しなかった (図 7 C)。組換え頻度とホットスポット活性の間には相関が見られた (図 7 B)。

別の大腸菌のバックグラウンド ($sbcBC$ 変異株 (図 7 BC、中央) と $recF$ 変異株 (図 7 BC、右)) でも同様の結果であった。 $sbcBC$ 変異株は、二本鎖分解活性の阻害を観察した株であるため、 $recF$ 変異株は、バックグラウンドで働く別の組換え経路の関与がない株であるために用いた。ホットスポット活性は、 $sbcBC$ 変異によって以前の報告 (Razavy et al. 1996) 通り減少していた。

私は、この結果を別の実験系 (図 7 B) でも確認した。この実験系でも χ^* 配列は、 $recC^*$ 変異株で相同組換えを促進しなかった (図 7 EF)。 $recF$ 変異株でも同様であった (図 7 EF、右)。

この結果は、 χ^* 配列と $RecBC^*D$ 酵素の相互作用では相同組換えを促進しないこと、また本来の χ 配列は、野生型で χ^* 配列よりも相同組換えを促進することを示唆した。

2. 分離後細胞死による制限修飾遺伝子の自己維持強制的証明

私たちの研究室では、制限修飾遺伝子対が細菌細胞から失われにくいことを発見し、それが制限修飾遺伝子を失った細胞の染色体が、残された遺伝子産物である制限酵素によって切断されるために細胞が死ぬことを示唆するデータを得ていた (Naito et al. 1995)。私は、この現象が細胞死であることを証明するために、個々の細胞の形態変化を観察し、精細胞数の変化と対応付けた。

2-1. 制限修飾系を失った後の大腸菌の増殖抑制

複製に必要なタンパク質が温度感受性であるために、複製が温度感受性であるプラスミドに II 型の制限修飾系である、*EcoRI* 制限修飾系を連結した。同調的に細胞死を起こすために、このプラスミドをもつ大腸菌を非許容温度下に移して培養した。高温に移すことでプラスミドの複製は停止するので、培養を高温に移してから 2 時間後くらいからプラスミドを分配されない細胞が現れる (図 8 A)。

顕微鏡下で計測した総細胞数 (Total cell) と薬剤の選択をしない L 培地上で形成したコロニー数 (viable cell) は、制限酵素の遺伝子が欠損しているとき、プラスミドの増殖が阻害されても何の影響も受けずに増加を続ける (図 8 CB)。一方、完全な制限修飾系をもつプラスミドの増殖が阻害されると、細胞の増殖は劇的に抑制された (図 8 CB) その結果、生きている細胞の中でプラスミドをもつ細胞の割合は、制限酵素遺伝子がない場合に比べてある場合の方が、時間が経過しても高かった (E)。顕微鏡下での細胞数に対しての生菌数の割合は、制限酵素がある場合に低くなった (D)。さらに時間が経過すると、細胞の増殖は回復し (B)、生菌数の割合も回復した (D)。これらの特徴は、こ

れまでに報告のある他の「分離後宿主殺し」機構に見られる特徴とよく似ていた (Jaffe et al. 1985; Gerdes et al. 1986)。



Figure 1. Schematic diagram illustrating the 'separation after host killing' mechanism. The diagram shows a cell with a nucleus and various organelles. A virus particle is shown entering the cell and interacting with the nucleus. The diagram is divided into two panels, (a) and (b), showing the progression of the process. Panel (a) shows the initial interaction, and panel (b) shows the subsequent steps, including the separation of the virus from the host cell components.

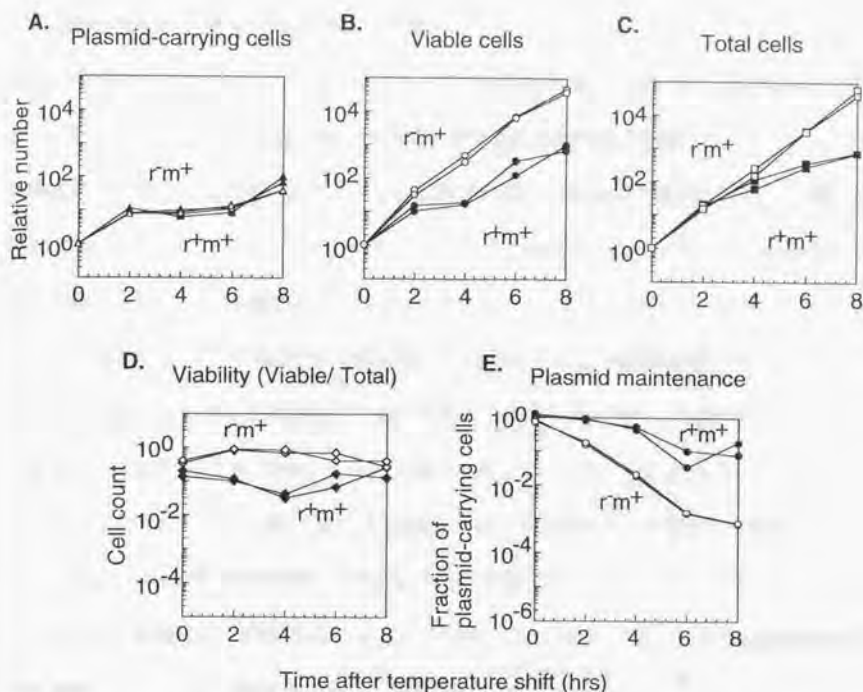


図 10 制限修飾系をもつプラスミドの増殖停止にともなう細胞の増殖の様子

EcoRI 制限修飾系を連結した温度感受性プラスミド (pIK172)、あるいはその制限酵素遺伝子を欠損したもの (pIK173) をもつ大腸菌 JC8679 株を、30 °C で L 液体培地で薬剤の選択をして振とう培養したもの、薬剤の選択をはずして 42 °C で培養した。A: プラスミド保持菌数 (Plasmid-carrying viable cells)。B: 生菌数 (Viable cells)。C: 顕微鏡下での総細胞数 (Total cells)。D: 顕微鏡下での総細胞数に対する生菌数の割合。E: 生菌数の中でのプラスミド保持菌数の割合。A~C までは、温度シフトした時間 ($t = 0$) を 1 として表した。塗りつぶされた記号は、完全な制限修飾系 (r^+m^+) をもつプラスミド失ったことを、塗られていない記号は、制限酵素遺伝子に欠損をもつ (r^-m^+) プラスミド失ったことを示す。デュプリケートで行った実験結果をプロットした。

2-2. 制限修飾系を失った後の細胞の形態

EcoRI 制限修飾系を連結したプラスミドをもつ大腸菌の培養を高温に移し、2時間ごとにサンプリングして、DAPI でその核（染色体）を染めた後顕微鏡で観察した（図11A）。大腸菌は、染色体切断などによって SOS と呼ばれる一連の反応が誘導されると、細胞が分裂をやめるために、伸長することが知られている（Jaffe & D'Ari 1985）。制限修飾系を失った場合にも、多くの細胞はフィラメント状になっていた（図11）。細胞を、その長さで核の有無によって4つのタイプに分類した（図12）。制限修飾系をもつプラスミドを失った場合、伸長した細胞が多く見られるようになった。伸長した細胞の中でその染色体は、はじめその長さに見合うくらいの数に分裂しているが、後にそのフォーカス（核）はだんだん小さくなっていき、ついには見えなくなった（温度シフト後6～8時間）。同様の結果は、*PaeR7I* 制限修飾系の場合にも観察することができた（図11B）。このような細胞の形態変化は、制限酵素の遺伝子が欠損している場合には、どちらの制限修飾系でも観察されなかった（図11, 12）。

A

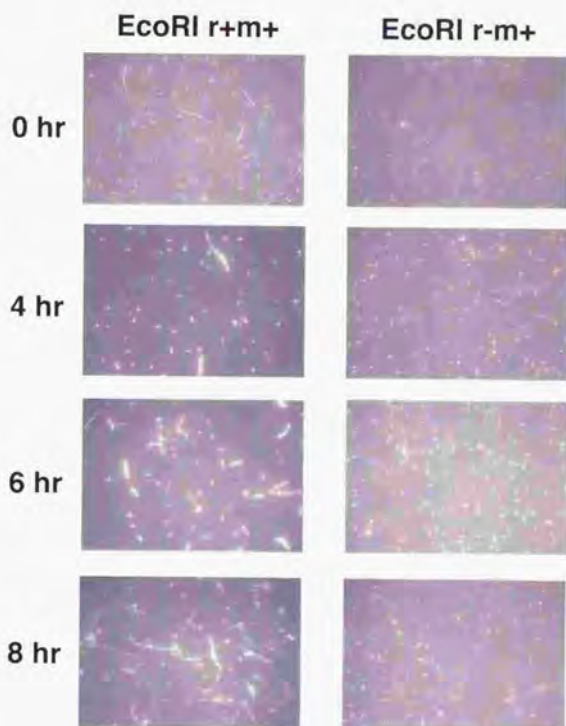
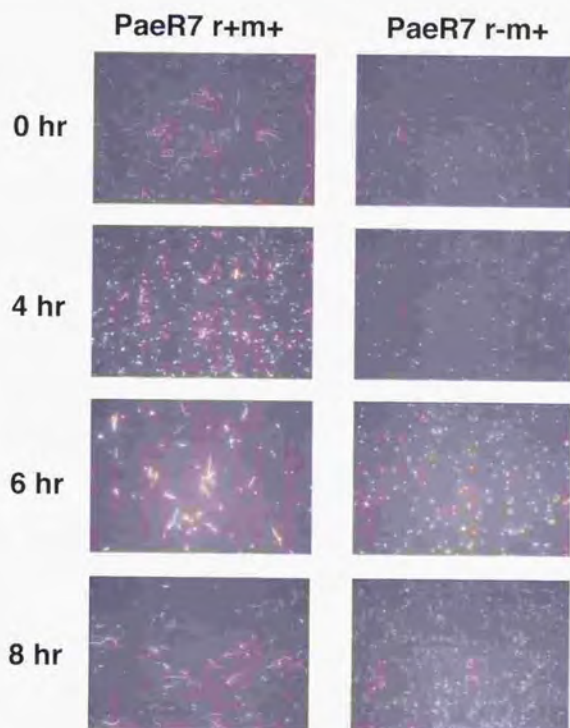


図 1 1 制限修飾系をもつプラスミドを失った後の細胞の形態

(A) pIK172 (pSC101ts - *EcoRI* r⁺m⁺ - Amp^r)、あるいは pIK173 (その制限酵素欠損プラスミド) をもつ大腸菌 JC8679 株を 30 °C から 42 °C へ移して振とう培養し、その時点から示された時間後の形態を観察した。(B) pTN9 (pSC101ts - *PaeR7I* r⁺m⁺ - Amp^r)、あるいは pTN11 (その制限酵素欠損プラスミド) の場合。

B



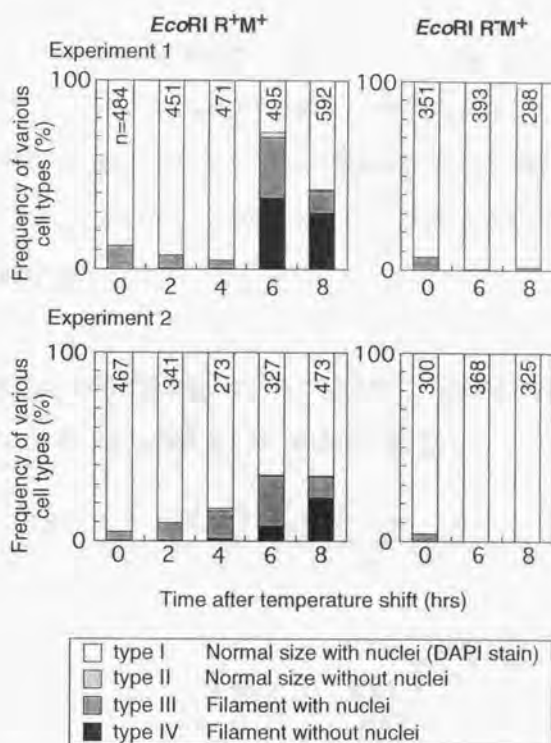


図 1 2 *EcoRI* 制限修飾系を失った後の細胞の形態の分類

pIK172 (pSC101ts - *EcoRI* r⁺m⁺ - Amp^r)、あるいはpIK173 (その制限酵素欠損プラスミド) をもつ大腸菌JC8679株を30 °Cから42 °Cへ移して振とう培養し、図 1 1 で記載したように、細胞の形態を観察した。細胞は、視覚的な面から4つのタイプに分類した。1つの細胞の長さが、制限酵素遺伝子のないプラスミドを失った細胞2つ分よりも長いとき、それは伸長していると判断した。染色体の有無は、DAPIで染色されるかによって決定した。この結果は、2回の独立に行った実験を示している。各カラムの上の数字は、観察した細胞の数である。

2-3. 染色体の断片化

制限修飾系を失った後に染色体の断片化が起きているか、アガロースゲル電気泳動で観察した。制限修飾系をのせたプラスミドをもつ細胞の培養を高温に移してから、示された時間後にその総 DNA を単離し、アガロースゲルで電気泳動した。染色体上の不規則な場所が切断されたことを示す比較的短い DNA 断片のスメアが観察できた(図13)。このスメアは、制限酵素の遺伝子が欠損している場合には見られなかった。

以上この章の結果は、制限修飾遺伝子が細胞から失われにくいのは、染色体切断によって細胞が死ぬためであるという仮説を強く支持するものである。

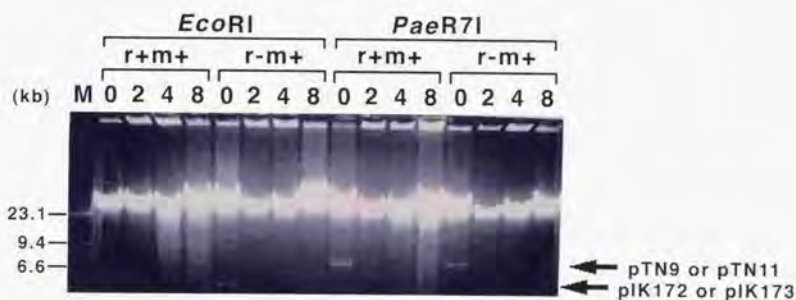


図 1 3 制限修飾系を失った後の染色体の断片化

(左) pIK172 (pSC101ts - *EcoRI* r^+m^+ - Amp^r)、あるいは pIK173 (その制限酵素欠損プラスミド) をもつ大腸菌 JC8679 株を 30 °C から 42 °C へ移して振とう培養し、その時点から各レーンに示された時間後に細胞の総 DNA を単離し、アガロースゲルで電気泳動した。(右) pTN9 (pSC101ts - *PaeR7I* r^+m^+ - Amp^r)、あるいは pTN11 (その制限酵素欠損プラスミド) の場合。0 時間で見られる短い DNA は、はじめに存在したプラスミドである。

3. 制限修飾遺伝子間の認識配列を巡る競争

制限修飾系遺伝子対を失った細胞の染色体が、残された遺伝子産物である制限酵素によって切断されるために細胞が死ぬことを前章までみてきた。私はそれを発展させて、制限修飾系間に認識配列を巡る競争があることを証明した。

制限修飾系が宿主細胞死を仕組むのには、制限修飾遺伝子が存在する時にはメチル化されていた染色体上の認識配列のメチル化がはすれること（複製後にメチル化されなくなる）が重要であると考えられる。1つの大腸菌細胞の中に2つの異なる制限修飾系が存在する場合を考える（図15）。2つの制限修飾系が互いに異なる認識配列をもつ場合、どちらか一方の制限修飾系が失われても、それによって残された制限酵素によって染色体が切断され、細胞死が起こる（図15、中央）。しかし、2つの制限修飾系が互いに同じ認識配列をもつ場合には、どちらかの制限修飾系が失われても、同じ配列をもう一方がメチル化するので、その染色体は切断されず、細胞死も起こらない。それ故、この場合には、細胞から失われる制限修飾系は細胞に対して自己の安定化を強制できないと考えられる。（図15、右）。

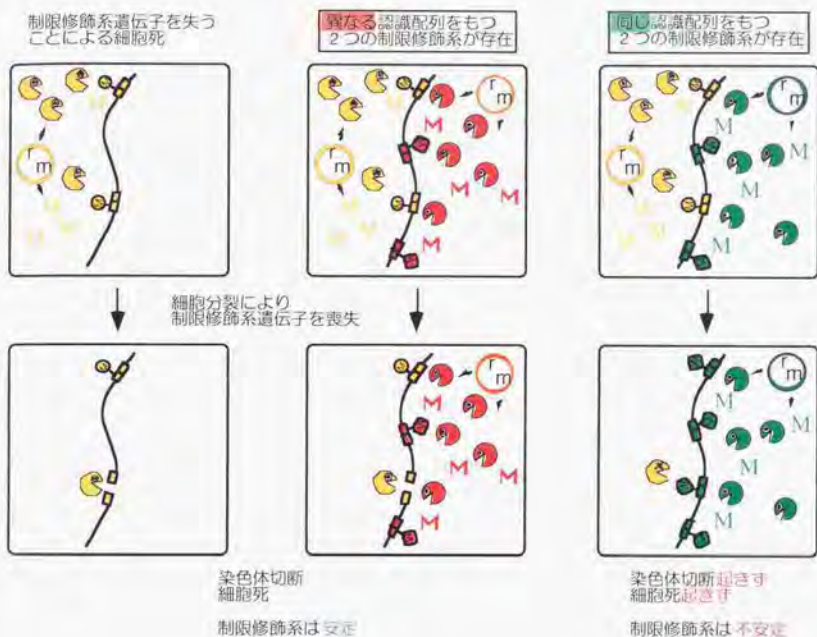


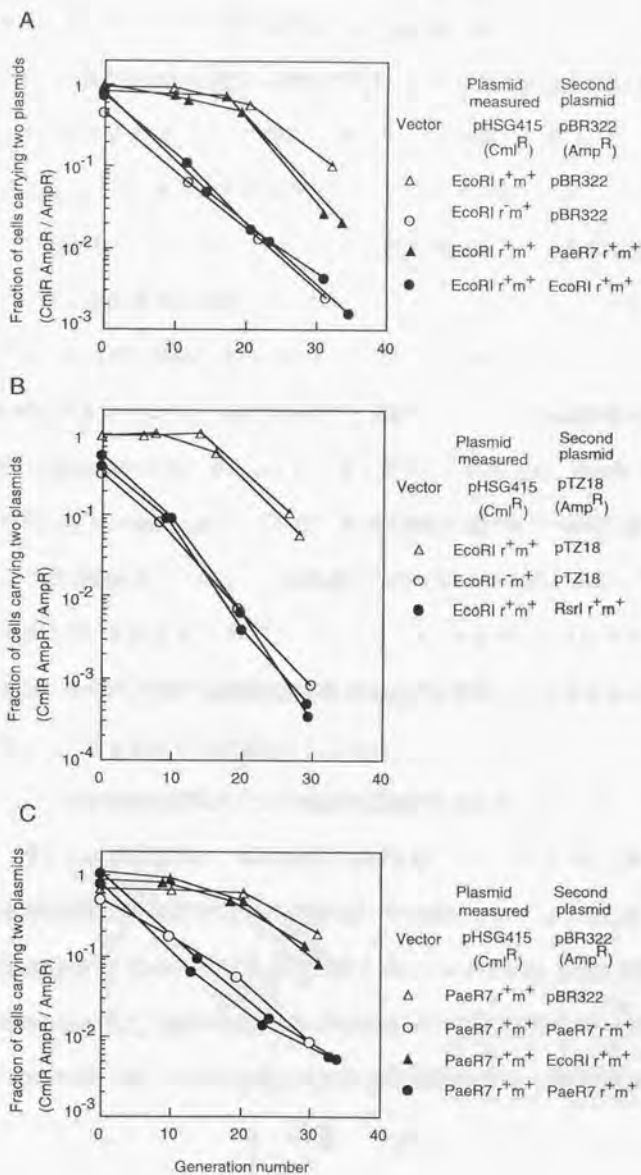
図 15 1つの細胞の中に2つの異なる制限修飾系が存在する場合。

(左) 1つの細胞に1つの制限修飾系をのせたプラスミドがある場合。プラスミドの喪失により、メチル化酵素が希釈され細胞死が起こる。(中央) 1つの細胞に2つの「認識配列の異なる」制限修飾系をのせたプラスミドが存在する場合。どちらか一方のプラスミドを失っても細胞死が起こる(左と同様)。(右) 1つの細胞に2つの「認識配列の同じ」異なる制限修飾系をのせたプラスミドが存在する場合。どちらかのプラスミドを失っても、もう一方が染色体の同じ配列をメチル化するために細胞死は起きない。

3-1. 別のプラスミドにのせた制限修飾系による、制限修飾系をもつプラスミドの安定化に与える影響

EcoRI 制限修飾系をもつプラスミドの安定化は、別の共存できるプラスミド (ColEI 由来) から同じ *EcoRI* 制限修飾系を発現させたときには見られなくなった (図 16A)。しかし、別のプラスミドに認識配列の異なる *PaeR7* 制限修飾系 (Gingeras & Brooks 1983) があっても、*EcoRI* 制限修飾系をもつプラスミドの安定性に影響はなかった (図 16A)。この実験では、宿主の大腸菌としてプラスミドが比較的不安定な (Summers & Sherratt 1984) *recBC sbcA* (JC8679) 株を用いた。

図 16 (次頁) 1つの細胞に2つの制限修飾系が存在する場合のプラスミドの安定性 (A) *PaeR7* 制限修飾系をもつプラスミド (pIK137)、あるいは*EcoRI* 制限修飾系をもつColEI由来のプラスミド (pIK166) を持たせたときの、*EcoRI* r^+m^+ 制限修飾系をもつプラスミド (pIK178)、あるいは制限酵素の遺伝子を欠損させたpSC101由来のプラスミド (pIK179) の安定性。宿主大腸菌としてJC8679 株を用い、ColEI由来のプラスミドをAmpを加えて選択し、もう一方 (pSC101由来) の選択をしないで30 °C で振とう培養した。植え継ぎは 10^{-3} 希釈で行った。pSC101由来のプラスミドの保持率は、Cml耐性コロニーとAmp耐性コロニーの数の比で求めた。(B) *RsaI* 制限修飾系をもつプラスミド (pIK181)、あるいは制限修飾系をもたないColEI由来のプラスミド (pIK180) を持たせたときの、*EcoRI* r^+m^+ 制限修飾系をもつプラスミド (pIK178)、あるいは制限酵素の遺伝子を欠損させたpSC101由来のプラスミド (pIK179) の安定性。(C) *EcoRI* 制限修飾系をもつプラスミド (pIK166)、*PaeR7* 制限修飾系をもつプラスミド (pIK137)、あるいは制限修飾系をもたないColEI由来のプラスミド (pBR322) を持たせたときの、*PaeR7* r^+m^+ 制限修飾系をもつプラスミド (pTN18)、あるいは制限酵素の遺伝子を欠損させたpSC101由来のプラスミド (pTN4) の安定性。



RsaI 制限修飾系は、*EcoRI* 制限修飾系と同じ認識配列をもち、そのメチル化部位も同じであるが、それをコードする遺伝子のホモロジーはそれほど高くない (Kaszubski et al. 1989; Stephenson et al. 1989)。これを別のプラスミドに連結し、そのプラスミドを選択しているところでは、*EcoRI* 制限修飾系をもつプラスミドの安定化は見られなくなった (図 1 6 B)。この結果は、1 つの細胞の中で同じ認識配列をもつ 2 つの制限修飾系が存在するときに、一方の制限修飾系が失われても細胞死を起こさないし、それ故に、宿主に細胞死によって自己の維持を強制しないという、先に述べた仮説と一致する。

同じ制限修飾系によるプラスミドの安定性の消失は、*PaeR7* 制限修飾系でも観察された。*PaeR7* 制限修飾系をもつプラスミドを選択することによって、*PaeR7* 制限修飾系の安定化は見られなくなった (図 1 6 C) が、異なる認識配列を持つ *EcoRI* 制限修飾系をもつプラスミドを選択することによっては影響を受けなかった (図 1 0 C)。プラスミドの安定性の消失には、制限酵素がなくてもよく、メチル化酵素遺伝子の存在が重要であった。この結果は、失われる制限修飾系の認識配列のメチル化が、プラスミドの安定性の消失に重要であることを示唆している (図 1 6 C)。

つまり、2 つの制限修飾系が 1 つの細胞内に存在するとき、それらが同じ認識配列をもつとき、それらは細胞に対して安定維持を強制することができないのである。このことは、制限修飾系の中にも共存できない、いわば「不和合性」が存在することを示唆している。同じ認識配列 (5' G-A-A-T-T-C) をもつアイソシゾマーである *EcoRI* 制限修飾系と *RsaI* 制限修飾系は、ひとつの不和合グループを形成していると言える。*PaeR7* 制限修飾系とそのアイソチゾマーは、5' C-T-C-G-A-G を認識する別のグループと定義することができる。

4. 制限修飾系による分離後細胞死に対する相同組換えの効果

制限修飾遺伝子対は、それを失った細胞の染色体が切断されることによって、その制限修飾系の安定維持を仕組み、それによって制限修飾系の配列認識の多様性が説明できることを前章で述べた。染色体切断は、単細胞生物である細菌にとっては、致命的なイベントであるので、細菌側もそれへ応答して生き残りをはかっていると考えられる。ターゲット配列のメチル化がはずれるのは、複製フォークの進行とカップルしていると考えられる。完全にメチル化された DNA 上を複製フォークが通ると、一方の鎖のみがメチル化されたヘミメチル DNA が残り、さらにもう一度複製フォークが通り過ぎると非メチル化 DNA が露出すると考えられる。そのときに制限酵素による染色体の二本鎖切断が起きるのだろう。染色体二本鎖切断は、一本鎖切断のある DNA 部分での、複製フォークの進行によっても生じると考えられている。そして、その修復に RecBCD 相同組換え経路が重要であると考えられてきた (Asai & et al. 1994; Kuzminov 1995)。

制限修飾系による細胞死の際にも染色体切断がその引き金になると考えられるので、大腸菌の相同組換え機構が欠損したときの、制限修飾系による細胞死に与える影響を調べた。

4-1. 相同組換え欠損株での *EcoRI* 制限修飾系を失った後の大腸菌の成長阻害

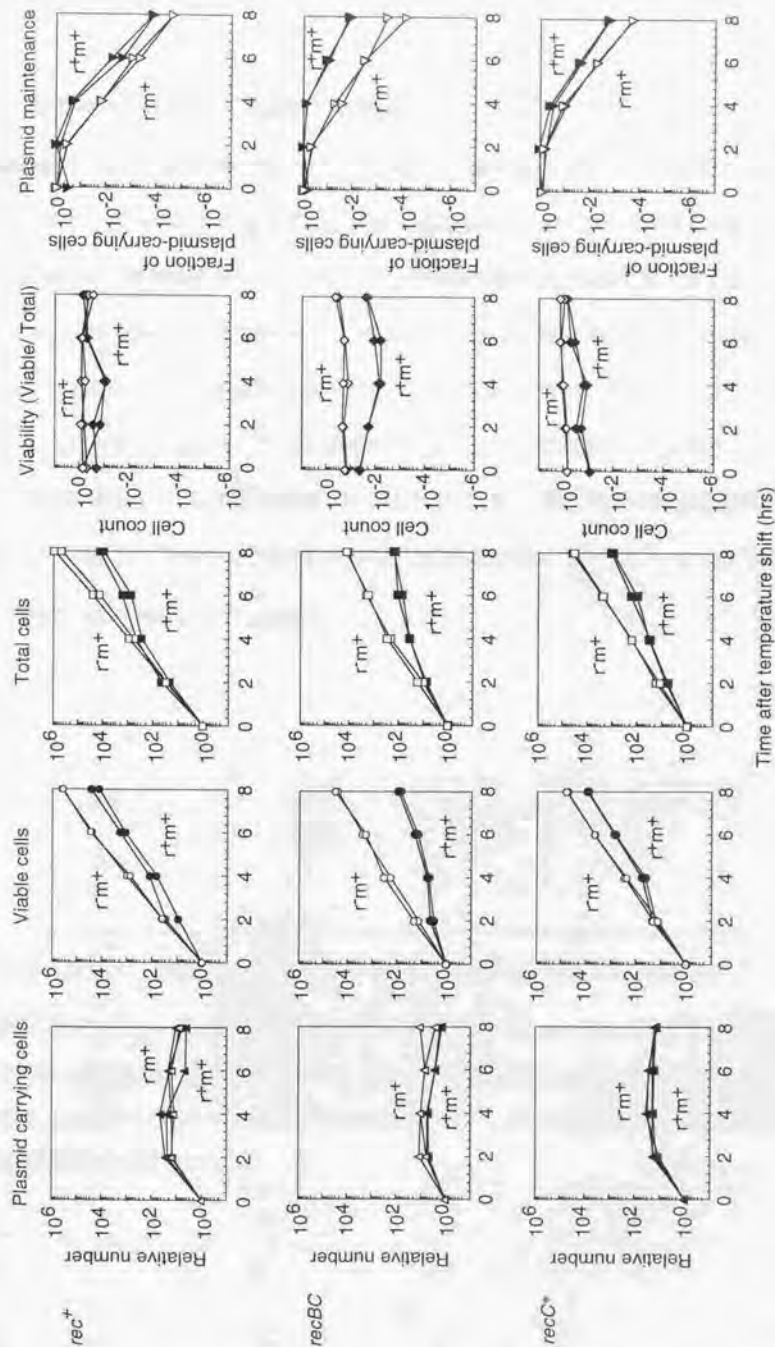
前の章でも使った、複製が温度感受性であるプラスミドに *EcoRI* 制限修飾系を接続したものを野生型 (rec^+ = AB1157株) の大腸菌に形質転換した。培養を高温に移し、そのプラスミドの複製を停止させると、その大腸菌の増殖が抑制されることを見た (図17)。高温で培養すると、制限修飾系がある場合、ない場合に関わらずプラスミドの増殖が止まり

(図17上、左端)、制限修飾系がある場合特異的に、その生菌数(図17上、左から2番目)、顕微鏡下での総細胞数(図17上、左から3番目)とも低下する。このとき、制限酵素遺伝子に欠損がある場合には増殖し続けた。顕微鏡下での総細胞数に対する生菌数の割合(viable cell count/ total cell count)は、制限修飾系がある場合に温度シフト後にいったん低下するが、時間が経過すると回復した(図17上、右から2番目)。細胞の増殖阻害の結果として、生きている細胞の中でのプラスミド保持率(plasmids- carrying cells/ viable cells)は、制限酵素のない場合に比べてある場合に高くなった(図17上、右端)。この結果は、前の章で私が行った他の大腸菌株での結果、あるいは、他の「分離後宿主殺し」の機構を持つプラスミドの結果と同様であった(Gerdes et al. 1986; Gerdes et al., in press; Jaffe et al. 1985)。

この結果は、大腸菌の相同組換え経路が欠損したときに、特に顕著であった(後述、図17、中央の列)。

図 17 (次頁) 制限修飾系を失った後の大腸菌の成長の抑制

野生型 (rec^+ = AB1157)、RecBCD 相同組換え経路に重要な遺伝子を欠損した株 ($recB21$ $recC22$ = JC5519) とカイ配列を認識できない突然変異の一つである $recC^*$ 株 ($recC1002$ = BIK3686) に、 $pIK172$ ($pSC101ts$ - $EcoRI$ r^+m^+ - Ap^r)、あるいは $pIK173$ (その制限酵素遺伝子を欠損させたもの) を形質転換し、プラスミドの複製を阻害する実験を行った。最初のカラム: プラスミド保持菌数 (Plasmid-carrying viable cells)。2 番目のカラム: 生菌数 (Viable cells)。3 番目のカラム: 顕微鏡下での総細胞数 (Total cells)。4 番目のカラム: 顕微鏡下での総細胞数に対する生菌数の割合。5 番目のカラム: 生菌数の中でのプラスミド保持菌数の割合。左から 3 番目のカラムまでは、温度シフトした時間 ($t = 0$) を 1 として表した。塗りつぶされた記号は、完全な制限修飾系 (r^+m^+) をもつプラスミド失ったことを、塗られていない記号は、制限酵素遺伝子に欠損をもつ (rm^+) プラスミド失ったことを示す。



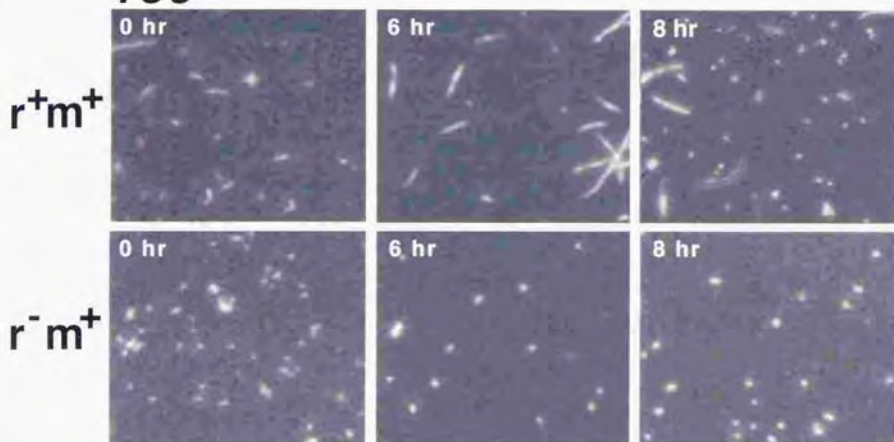
4-2. 相同組換え欠損株での細胞の形態変化

制限修飾系を失った後の野生型(*rec*⁺)での細胞の形態変化を観察した(前の章では JC8679 株だった)。プラスミドの増殖を止めた後、時間を追ってサンプリングし、DAPI でその染色体を染めて顕微鏡で観察した。野生型でも細胞の伸長は観察された(図 18、上)が、その多くは核(染色体)を複数持っていた。いくつかは核が染まらないように見えた。細胞は、その長さや染色体の有無によって4つのタイプに分類した(図 19、上)。最も伸長していたのは、温度シフトから6時間後で、さらに時間が経過すると修復されたと考えられる正常な細胞が、また多く観察されるようになった。細胞の伸長は制限修飾系がある場合に特異的に見られた。制限修飾系特異的な細胞の伸長は、プラスミドの複製可能な 30 °C でもわずかに見られた(0時間)。

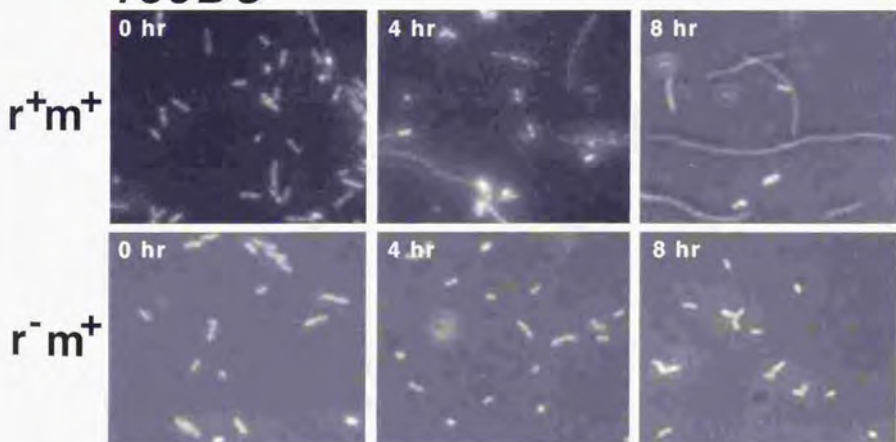
図 18 (次頁) 制限修飾系をもつプラスミドを失った後の細胞の形態

pIK172 (pSC101ts - *EcoRI* r⁺ m⁺ - Amp^r)、あるいは pIK173 (その制限酵素欠損プラスミド)をもつ野生型 (*rec*⁺ = AB1157) と RecBCD 相同組換え経路に重要な遺伝子を欠損した株 (*recB21 recC22* = JC5519) の培養を 30 °C から 42 °C へ移して、その時点から示された時間後の形態を観察した。

rec⁺



recBC



4-3. *recBCD* 遺伝子の欠損による細胞死の増強

次ぎに私は上記の実験を、RecBCD 相同組換え経路が欠損した大腸菌でも行った。制限修飾系を連結したプラスミドの複製停止による細胞の増殖阻害は、野生型のときと比べてその生菌数（図17中央、左から2番目）でみても、顕微鏡下での総細胞数（図17中央、左から3番目）でみても顕著であった（図17、中央）。また、既に報告されているように（Capaldo-Kimball & Barbour 1971）、低温でも顕微鏡下での総細胞数に対する生菌数の割合（viable cell count/ total cell count）は低かったが、温度シフトによってさらに低下した（図17中央、右から2番目）。このときの生きている細胞の中でのプラスミド保持率（plasmids-carrying cells/ viable cells）は、この細胞死のために、野生型の場合に比べてより高くなった（図17中央、右端）。

さらに、制限修飾系をもつプラスミドを失った後の細胞の伸長についても、*recBC* 欠損株は顕著であった（図18、19）。時間が経過しても細胞の伸長は止まらず、また DAPI で染色されない核を失った細胞が多く観察された（図18、下）。染色体をもたない細胞の割合は、野生株（*rec*⁺）でのそれと比較して有意に差があった（実験1で、 $p < 0.0005$ ）。

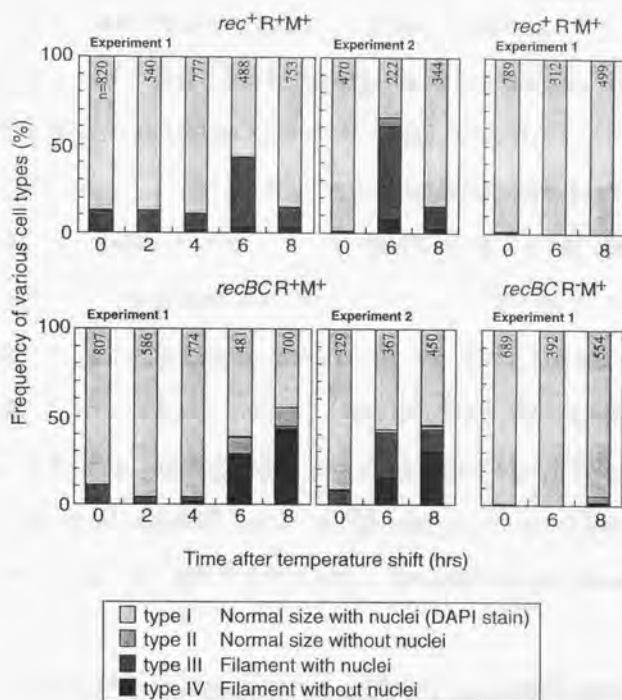


図 19 *EcoRI* 制限修飾系を失った後の相同組換え欠損株の形態の分類

pIK172 (pSC101ts - *EcoRI* r⁺m⁺ - Amp^r)、あるいはpIK173 (その制限酵素に欠損変異を導入したもの) をもつ野生型 (*rec*⁺ = AB1157) と *recBC* 欠損株 (*recB21 recC22* = JC5519) の培養を 30 °C から 42 °C へ移して、図 18 で記載したように、細胞の形態を観察した。細胞は、視覚的な面から 4 つのタイプに分類した。1 つの細胞の長さが、制限酵素遺伝子のないプラスミドを失った細胞 2 つよりも長いとき、それは伸長していると判断した。核の有無は、DAPI で染色されるかによって決定した。制限酵素がある場合の結果は、2 回の独立に行った実験を示している。各カラムの上の数字は、観察した細胞の数である。

4-4. 相同組換え欠損株での制限修飾系を失った後の染色体切断

制限修飾系を失った後に引き起こされる分離後宿主殺しによる細胞死は、残された遺伝子産物である制限酵素に細胞の染色体上のターゲット配列が切断されることによって起きると想定していた。そこで、このときの宿主である大腸菌の染色体切断をパルスフィールドゲル電気泳動によって観察した(図20)。染色体切断を示すスメアは、制限酵素をもつプラスミドを失ったときに特異的に観察された。このスメアは野生型に比べて、*recBC* 欠損株で顕著だった。このとき、染色体の切断パターンがスメアになるのは、染色体上のターゲット配列(*EcoRI* サイト)のうち、どこが切断されるかは個々の染色体ごとに異なるためであると考えられる。細胞の中の他の DNA 分解酵素が関与して、DNA をその末端から分解しているのかもしれないが、それについては分からない。*recBC* 欠損株では、細胞の中で最も強い二本鎖 DNA 分解酵素がないので、それ故野生型よりも分解産物がよく見えるのかもしれない。

ここでもうひとつ注目したいのは、ウェルのすぐ下に染色される巨大な(> 700 kbp) 線状 DNA である。これは、プラスミドに制限修飾系がないときにも、相同組換え欠損株で観察されるので、大腸菌染色体に自然に生じる二本鎖切断であると考えられる(後述)。大腸菌の染色体は環状なので、切れ目がないとウェルに包埋したアガロース・ブラグから移動することはないが、もし染色体に二本鎖切断が生じると、アガロースゲル中に入り込んで少しか移動する(Game et al. 1989; Kusano et al. 1989)。この染色体に自然に生じる二本鎖切断は、野生型ではほとんど見られないのに対し、*recBC* 欠損株では顕著だった(図20)。このことは、*RecBCD* 相同組換え経路が欠損していると、制限修飾系による二本鎖切断ばかりでなく、染色体に自然に生じる二本鎖切断も修復されないことを

示唆している。

このとき、カイ配列を認識できない *recC**株では、そのレベルは野生型と *recBC* 欠損株の中間程度であった。*recBC* 欠損株や *recC**株で顕著なこのバンドは、制限修飾系を失った際に、さらに観察されるようになった。

この結果は、相同組換え欠損株では、制限修飾系をもつプラスミドを失った後の切断された染色体の修復をできないことを強く示唆している。私はこの結果から、RecBCD 酵素 -- カイ配列の相互作用が、制限酵素による染色体切断を修復すると考えた。*recBC* 欠損株では、制限修飾系がない場合にも顕著な巨大DNAが観察できた。この制限修飾系によらない染色体切断も野生型では修復され、ほとんど見えなかった。このことは、他の研究グループの報告 (Michel et al. 1997) と一致する。

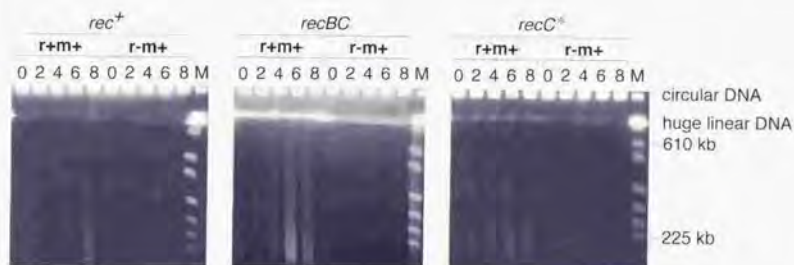


図 2 0 制限修飾系を失った後の相同組換え欠損株の染色体の断片化

pIK172 (pSC101ts - *EcoRI* r^+m^+ - Amp^r)、あるいは pIK173 (その制限酵素欠損プラスミド) をもつ野生型 (rec^+ = AB1157)、*recBC* 欠損株 (*recB21 recC22* = JC5519) と *recC*^Δ 変異株 (*recC1002* = BIK3686) の培養を 30 °C から 42 °C へ移して、その時点から各レーンに示された時間後にサンプリングし、パルスフィールドゲル電気泳動した。泳動は、1.0% のアガロースゲルを用い、15°C、165 V の条件で TBE で泳動した。「M」のレーンには、サイズマーカーとして酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の染色体を泳動した。

4-5. SOS 応答の誘導

制限修飾系による細胞死に対して応答するのは、RecBCD 相同組換え機構ばかりではない。そのときに、細胞が伸長したことは、SOS 応答が誘導されていることを推測させた。そこで私は、SOS 応答が制限修飾系による染色体切断に対して起こっているのか調べてみた。染色体上の SOS 誘導遺伝子のひとつである *sfiA* 遺伝子の下流に *lacZ* 遺伝子を連結したレポーター遺伝子 (*sfiA::lacZ*) をもつ大腸菌で、*lacZ* 遺伝子産物であるベータガラクトシダーゼの活性の変化を測定することによって、SOS 応答が誘導されるか調べてみた (Miller 1992)。プラスミドが複製できる 30°C でもわずかな SOS 応答が誘導されていた (図 2 1、0 時間)。複製が温度感受性のプラスミドに *EcoRI* 制限修飾系 (r^+m^+) を連結したものをもち大腸菌の培養温度を、42°C に移すことによってプラスミドの複製を止めると、強い SOS 応答が誘導された (図 2 1)。SOS 応答の誘導は、制限酵素遺伝子と *recBC*⁺ 機能依存的に起きた (図 2 1)。

RecBCD 酵素は、二本鎖切断点から DNA を巻き戻しながら進行するので、SOS 誘導のシグナルとなる一本鎖 DNA を生み出すと考えられる。つまり、RecBCD 酵素は、相同組換えばかりでなく SOS 応答にも重要な機能を果たしているので、*recBC* 欠損株で制限修飾系による細胞死が顕著であるのは、相同組換えと SOS 応答の両方が欠損しているためであると考えられる。

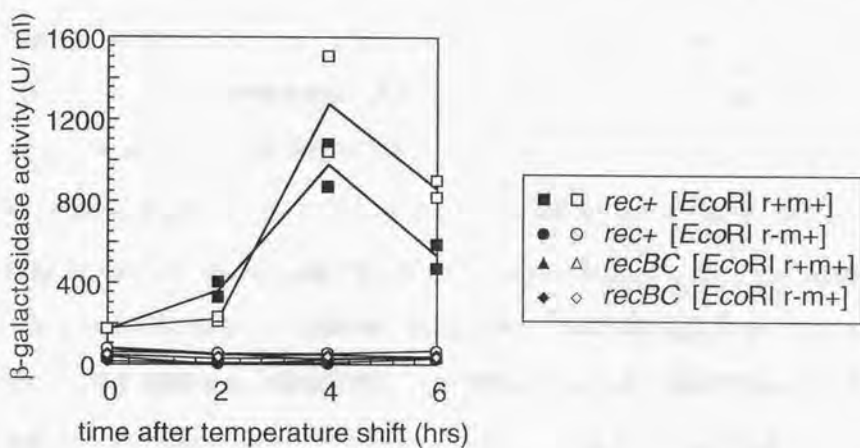


図2-1 *EcoRI* 制限修飾系を失った後の SOS 応答の誘導

pIK172 (pSC101ts - *EcoRI* r^+m^+ - Amp^r)、あるいは pIK173 (その制限酵素欠損プラスミド) をもつ *sfiA-lacZ* 融合遺伝子を染色体中にもつ野生型 (rec^+ = BIK3920) と *recBC* 欠損株 ($recBC$ = BIK3921) で、図1-7同様のプラスミドの複製阻害実験を行い、温度シフト後、示された時間にベータガラクトシダーゼ濃度を測定した。2回の独立に行った実験の結果を示した。

4-6. 分離後宿主殺しのプレートアッセイ

次に私は、制限修飾系を失った後の細胞死を、プレート上での簡便なアッセイで調べた。*EcoRI* 制限修飾系を連結したプラスミドを、前章でも使った *sfiA-lacZ* 融合遺伝子を染色体中にもつ大腸菌に導入し、薬剤の選択をして、30 °C で対数増殖期まで培養した。この培養液を、薬剤の入っていない L 培地上に塗り拡げて半許容温度 (35 °C) でインキュベートした。このとき、制限酵素遺伝子が欠損している、あるいはベクターの場合に比べて、小さく、少ないコロニーが観察された (図 2 2)。このコロニーサイズとコロニー数の減少は、細胞死を反映しているのだろう。この細胞死は、35 °C に比べて、37 °C (図 2 3)、あるいは 42 °C のときにより顕著であった (データは示していない)。また、この大腸菌では SOS が誘導されると *sfiA* 遺伝子の下流に接続された *lacZ* が発現し、X-gal を加えた培地上で青色を発色する。制限修飾系を失った大腸菌のコロニーは、青色を発色した。その青色は、許容温度下 (30 °C) でもわずかに見られたが、35 °C ではより顕著であった (図 2 2)。この結果は、液体培養での定量的な SOS 誘導の測定 (図 2 1) と定性的には似ており、このプレートによるアッセイによって、制限修飾系による分離後宿主殺しと SOS 誘発の測定が可能であることを示している。

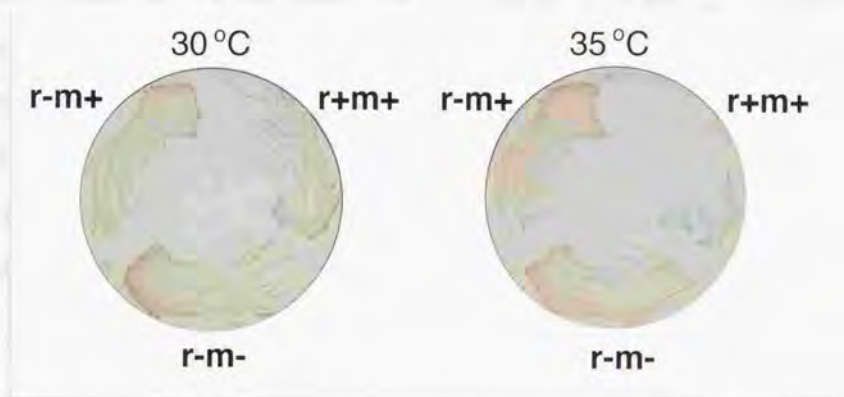


図 2.2 制限修飾系を失った後の大腸菌の増殖阻害とSOS誘導

pIK172 (pSC101ts - *EcoRI* r^+m^+ - *Amp^r*)、pIK173 (その制限酵素に欠損をもつ = r^-m^+)、あるいは pIK174 (制限修飾両酵素に欠損をもつ = r^-m^-) を *sfiA-lacZ* 融合遺伝子を染色体中にもつ大腸菌 (GC3403) に導入し、L 培地で薬剤の選択をして 30 °C で培養した。その後、抗生物質の入っていない、X-gal 入り (20 ng/ ml) の L 培地に塗り拡げ、30 °C、あるいは 35 °C に一晩プレートをおいた。

4-7. 他の相同組換え遺伝子欠損株での分離後宿主殺し

前章のプレートアッセイで、RecBCD 遺伝子の欠損による効果を調べた。EcoRI 制限修飾系をもつプラスミドを失ったときのコロニー形成と、制限酵素の遺伝子が欠損しているプラスミドを失ったときのコロニー形成の様子を比較した（図23、1枚のプレートの中で左右を比較）。30℃では、その両者に差は見られなかった（データは示していない）。前章までの結果（図17）同様、*recBC* 欠損株では、野生型に比べて劇的なコロニー数の減少が観察された（図23、iの上下を比較）。RecBCD 酵素は、二本鎖切断点から DNA を分解する。そして、カイ配列（5' GCTGGTGG）に出会うと分解をやめて RecA 依存的に相同組換えを促進するのである（Dixon et al. 1994; Kowalczykowski et al. 1994; Kuzminov et al. 1994; Stahl et al. 1983）が、そのカイ配列を認識できない突然変異株のひとつである *recC1002* 変異株（Schultz et al. 1983）でも、野生型に比べて劇的にコロニー数が減少した（図23、iii）。

液体培養での分離後宿主殺し実験（図17）に比べて、*recC**変異株の細胞死はプレート上の方が顕著であるように見えた。*recC**株での EcoRI 制限修飾系をもつプラスミドを失った後の染色体切断は、野生型よりも顕著であった（図20右）。

他の RecBCD 相同組換え経路に重要な相同組換え反応の中期から後期にはたらく遺伝子（*recA*、*ruvAB*、*ruvC* と *recG*）の欠損による効果を調べた。これらは、いずれもより強い細胞死を示した（図23、ii、v、vi、iv）。二本鎖切断修復に重要な *recN* 遺伝子の欠損株での細胞死は、野生型よりは顕著だったが、上記の RecBCD 相同組換え経路の変異株よりは弱かった。

同様に、弱いが野生型よりも顕著な細胞死が、*lexA3* 突然変異株で観察された（図

23, viii)。これは SOS 応答の誘導ができない突然変異株である。これらの結果は、これまでの結果とあわせて、RecBCD 相同組換え経路と SOS 応答の誘導がともに制限修飾系の仕組み分離後宿主殺し機構に対して抵抗していることを示している。

sbmA 変異は、Rac プロファージがコードする RecET 相同組換え経路を活性化させる変異である (Kolodner et al. 1994)。この相同組換え機構は、プラスミドの系で II 型の制限修飾系による切断の修復に機能していた (Kusano et al. 1994b)。*sbmA* 変異は、*recBC* 変異株での制限修飾系による劇的な細胞死を、部分的に抑制した (図 23, ix)。

プレートアッセイによって簡便に観察した *EcoRI* 制限修飾系を失った後の細胞死は、許容温度下で培養してきたそれぞれの細胞を高温でプレートし、そのコロニー形成能を測定することによって定量化した (表 4)。結果は、プレートアッセイの結果とだいたい一致していた。

図 2 3 (次頁) 大腸菌突然変異株での *EcoRI* 制限修飾系を失った後の増殖阻害

いろいろな大腸菌突然変異株に pLK172(pSC101ts - *EcoRI* r^+m^+ - Amp^r)、あるいは pLK173 (その制限酵素欠損プラスミド) を導入し、対数増殖初期までプラスミドの選択をして 30°C で振とう培養した培養液を、薬剤の入っていない培地に塗り拡げて 37°C で 18~23 時間インキュベートした。(i) JC5519 (*recB21 recC22*) と AB1157 (*rec*⁺)。 (ii) BIK733 ($\Delta recA306::Tn10$) と AB1157 (*rec*⁺)。 (iii) BIK3686 (*recC73recC1002 argA81::Tn10*) と AB1157 (*rec*⁺)。 (iv) BIK1538 (*recG258::Tn10 mini-Kan*) と AB1157 (*rec*⁺)。 (v) HRS2302 (*ruvAB::Cm*) と AB1157 (*rec*⁺)。 (vi) HRS1100 (*ruvC100::Cm*) と AB1157 (*rec*⁺)。 (vii) BIK2565 (*recN1502::Tn5*) と AB1157 (*rec*⁺)。 (viii) BIK2571 (*lexA3*) と BIK2574 (*lexA*⁺)。 (ix) JC8679 (*recB21 recC22 sbcA23*) と JC5519 (*recB21 recC22*)。 $r^+ : r^+m^+$ プラスミドを、 $r^- : r^-m^+$ プラスミドを失わせた。 WT: 野生型の大腸菌。

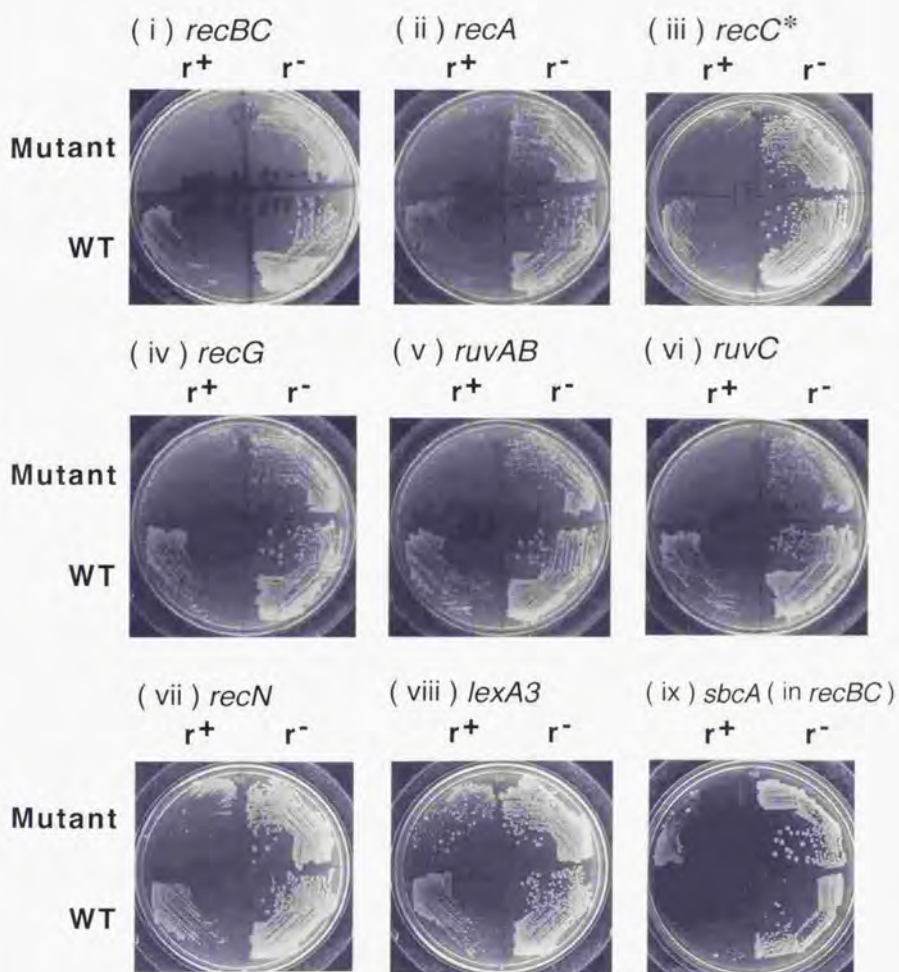


表4 大腸菌突然変異株での *EcoRI* 制限修飾系を失った後のコロニー形成能

strain	Viability (r+m+/ r-m+)
<i>rec+</i>	0.21 ± 0.13
<i>recA</i>	$5.5 \times 10^{-2} \pm 1.7 \times 10^{-2}$
<i>recBC</i>	$2.1 \times 10^{-2} \pm 1.3 \times 10^{-2}$
<i>recC*</i>	$1.3 \times 10^{-2} \pm 3.3 \times 10^{-3}$
<i>recG</i>	$1.2 \times 10^{-3} \pm 3.2 \times 10^{-4}$
<i>ruvAB</i>	$1.4 \times 10^{-3} \pm 1.3 \times 10^{-3}$
<i>ruvC</i>	$3.8 \times 10^{-3} \pm 3.8 \times 10^{-4}$
<i>recN</i>	$4.2 \times 10^{-2} \pm 1.6 \times 10^{-2}$
<i>lexA3</i>	$0.11 \pm 2.4 \times 10^{-2}$
<i>sbcA</i> (in <i>recBC</i>)	$0.14 \pm 6.7 \times 10^{-2}$

コロニー形成能は以下のようにして求めた。pIK172、あるいは pIK173 をもつ各大腸菌を、対数増殖初期までプラスミドの選択をして 30 °C で振とう培養した培養液を、TM バッファ（10 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 10 mM MgSO₄）で適当に希釈した後、薬剤の入っていない培地と薬剤（Amp）入りの培地に塗り拡げて、それぞれ 37 °C と 30 °C で 20 時間インキュベートした。コロニー形成能は、[37 °C で薬剤のない培地で生えてきたコロニー数 / 30 °C で薬剤入りの培地上で生えてきたコロニー数] によって計算した。結果は、2 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示した。

4-8. 制限修飾系による細胞死に対する RecF 相同組換え経路の効果

大腸菌には RecBCD 経路以外にも、RecF 経路と呼ばれる別の相同組換え機構があるので、私は次にその経路に重要な遺伝子の欠損が、制限修飾系の仕組み分離後宿主殺しにどのような影響を与えるかについて調べてみた。

ここで1つのジレンマがある。RecF 相同組換え経路の遺伝子の欠損の効果を調べたいが、大腸菌の相同組換えで中心的に機能している RecBCD 経路が正常では、この経路によって、染色体切断が修復されるので、RecF 相同組換え経路の影響を調べることはできない(図24、中央)。また、RecBCD 経路を完全に欠損させると、その効果が大きすぎてやはり RecF 相同組換え経路の影響を調べることは技術的に困難なのである(図24、左)。

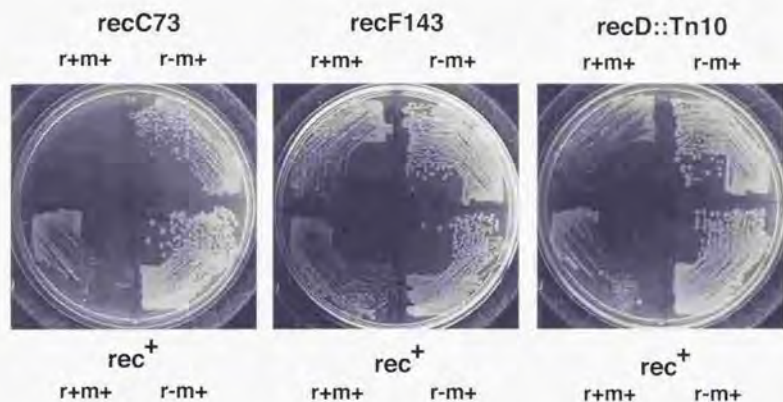


図 2 4 制限修飾系を失った後の細胞死

いろいろな大腸菌突然変異株に pIK172(pSC101ts - *EcoRI* *r⁺m⁺* - *Amp^r*)、あるいは pIK173 (その制限酵素欠損プラスミド) を導入し、対数増殖初期までプラスミドの選択をして 30°C で振とう培養した培養液を、薬剤の入っていない培地に塗り拡げて 37°C で 18~23 時間インキュベートした。(左)BNH738(*recC73*)と IK1288(*rec⁺*)。(中央)V66 (*recF143*) と BIK1288 (*rec⁺*)。(右) BNH728 (*recD::Tn10*) と BIK1288 (*rec⁺*)。

RecBCD 酵素は多機能酵素であるが、その機能（活性）のいくつかだけを欠損する突然変異株が単離され、分類されている (Amundsen et al.1990; Holbeck & Smith 1992)。これらの *recBC* 部分突然変異株の中で、カイ配列認識に異常のあるいくつかの突然変異株を使ってみたところ、RecF 経路に重要な遺伝子の欠損による細胞死の効果を調べることができた (図 2 6)。まず、「これらの突然変異は、*recF* 遺伝子が欠損しているときにカイ配列を認識できなくする」という報告があるので、私が作成した大腸菌の *recF*⁺バックグラウンドでその表現形を確認した (図 2 5)。図 2 5 は、カイ配列をそのゲノム中にもつ、あるいはもたないラムダファージをスポットした結果である。バクテリオファージラムダは、相同組換えによって子ファージの産生量が増加するので、そのゲノム中にカイ配列がある (Chi⁺) とき、宿主大腸菌がそれを認識できる場合に大きなブランクを形成する。実際に野生型では、このとき、カイ配列をもたないもの (Chi⁰) に比べ大きなブランクを形成している (図 2 5)。一方、*recC73*、*recD*、あるいはカイ配列を認識できない *recC1001*、*recC1002*、*recC1003*、*recC1004*、*recB2154*、*recB2155*、あるいは *recC2145* 変異株では、両方のファージ (Chi⁰ と Chi⁺) のブランクサイズは互いに差がなかった。また、RecBCD 酵素の持つ二本鎖 DNA 分解酵素活性 (Exonuclease V) を欠損している *recC73* 変異株では、ファージの線状ゲノムが分解されないため多くの子ファージを産生した。*recD* 遺伝子の完全欠失変異株もカイ配列認識できない変異株として知られるものであるが、これは同時に高い組換え能を示すことが知られている。この変異株では、制限修飾系喪失後の細胞死は野生型でのそれと変わらなかった (図 2 4 右)。

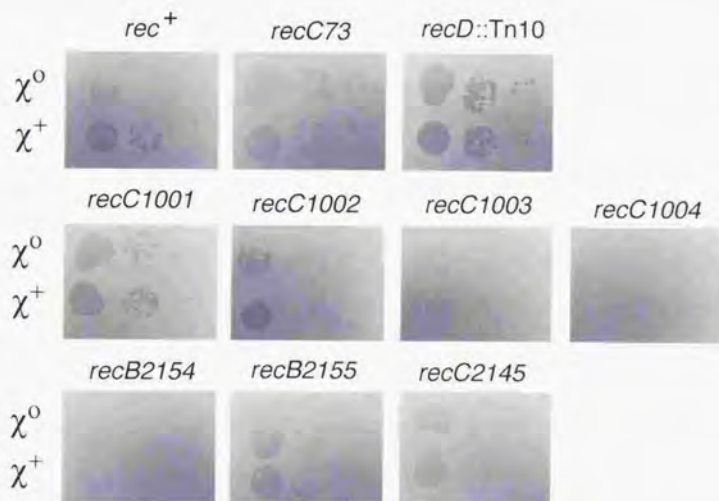


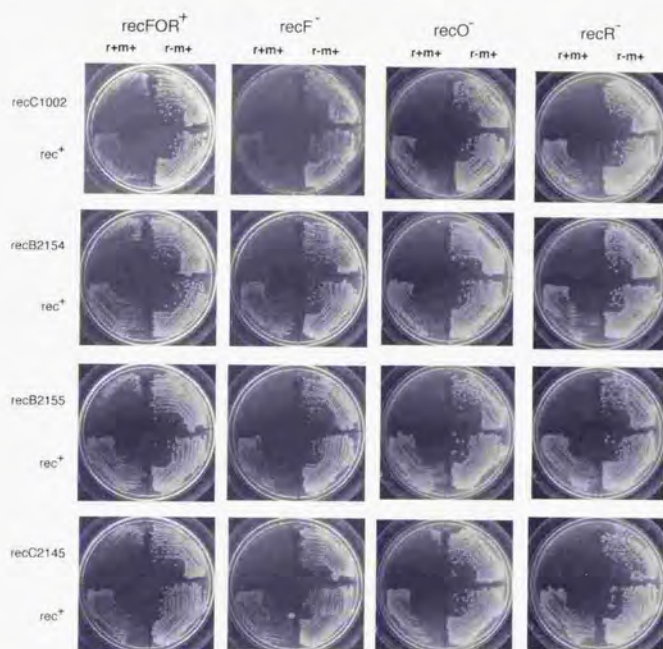
図2-5 プラークサイズアッセイ

LIK916 と LIK950 は、それぞれ Chi^0 と Chi^+ 配列をそのゲノム中にもつ。

RecF 相同組換えに重要な遺伝子に変異を持つ大腸菌株で、前章でも使った分離後宿主殺しの簡便なプレートアッセイを行った。*EcoRI* 制限修飾系をもつ (r^+m^+) プラスミドをそれぞれの株に導入し、それを塗り拡げたプレートを高温下 (37 °C) に置くことによってプラスミドを失うことによる細胞死を観察した。ネガティブコントロールとして、 r^+m^+ プラスミドを失わせたとときと比較した (図 2 6、1 枚のプレートの中で左右を比較)。*recC1002*、*recB2154*、*recB2155* と *recC2145* のバックグラウンドで、*recF*、*recO*、あるいは *recR* 変異によって、RecF 経路が正常なとき (各細胞の左端のプレート) に比べて顕著な細胞死が観察できた。これらの結果は、RecBCD 相同組換え経路ばかりでなく、RecF 相同組換え経路も、染色体切断によって細胞死を起こそうとする制限修飾系の振る舞いに対して抵抗し、その生き残りに重要であることを強く示唆している。

図 2 6 (次頁) カイ配列認識に異常がある *recBC* 突然変異のバックグラウンドで、RecFOR 遺伝子産物も制限修飾系による細胞死に抵抗する

いろいろな大腸菌突然変異株に *pIK172* (*pSC101ts - EcoRI r⁺m⁺ - Amp^r*)、あるいは *pIK173* (その制限酵素欠損プラスミド) を導入し、プレートアッセイによる分離後宿主殺し実験を行った。(1 段目) *recC1002* 変異のバックグラウンド。(2 段目) *recB2154* 変異のバックグラウンド。(3 段目) *recB2155* 変異のバックグラウンド。(4 段目) *recC2145* 変異のバックグラウンド。(1 列目) *rec⁺*、(2 列目) *recF143*、(3 列目) *recO::Tn5*、(4 列目) *recR::mini-Tn10kan*。



4-9. RecF経路は抑制変異がない場合にも機能している

ここで、少し主題からそれるが重要であると思われるので記述しておきたいことがある。

RecF 相同組換え経路は、大腸菌の中で中心的に機能している RecBCD 相同組換え機構が欠損しているときに、抑制変異によって活性化されることが知られている。しかし、*sbcBC* 変異がないときにも、プラスミドの相同組換えに関与することが知られていた (Fishel & Kolodner 1989)。また、*recF* 遺伝子の単独欠損によって大腸菌細胞は、紫外線に感受性になることが知られている (Horii & Clark 1973; Sandler & Clark 1993)。定量的な紫外線照射後の生存曲線を描くことで、RecFOR 相同組換え機構が抑制変異のないときにも機能していることを確認できた (図 27)。*recC73* 変異株に *recF* 遺伝子の変異が重なっているときには、さらに強い紫外線感受性を示した (*recBC* での結果 = Kato et al. 1977)。この結果は、RecFOR 相同組換え機構が抑制変異 (*sbcB*) のないときにも紫外線による DNA 損傷を組換えによって修復していることを示唆している。

前章で使用したカイ配列認識変異として分類されてきた RecBCD 変異株は、これらが単離・解析されてきたのが *recF* 遺伝子を欠損したバックグラウンドであったために、紫外線高感受性であった。制限修飾系による細胞死が、その影響で説明できるかを *recF* 遺伝子をプラスに戻すことによって確認した。その結果、紫外線感受性がほとんど見られなくなった (図 27) ことから、制限修飾系による細胞死がこれらの変異で劇的になるのは、DNA 修復能がないためではないことが示唆された。

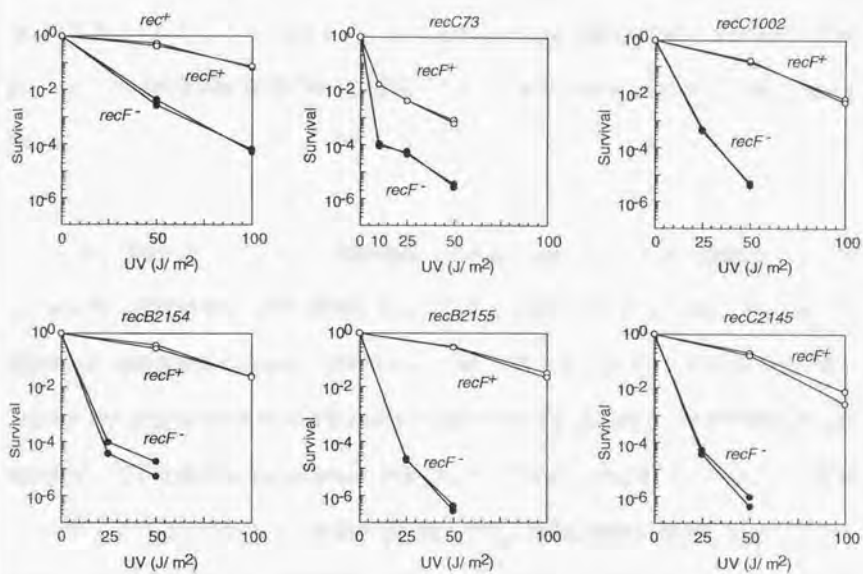


図27 カイ配列認識変異株の紫外線感受性

2回の独立に行った実験でこれは確認された。そのうちの1回の実験の重複して行った実験結果をプロットした。

5. RecE 相同組換え経路による III 型の制限抑制と RecBCD 酵素による制限促進

もうひとつある大腸菌の相同組換え経路である RecE 経路についても、上記の II 型制限修飾系のひとつである *EcoRI* 制限修飾系遺伝子対を失った後の染色体切断による細胞死への抵抗は観察できた (図 2-3, ix)。ここでは、別の実験系からも「相同組換えが制限修飾系の振る舞いを抑えるように働くこと」と「細菌のもつ相同組換え経路と制限修飾系が協調して他の利己的な遺伝単位に対して抵抗する」ことを私が発見したので、それについて述べる。

私が発見したのは、III 型の制限修飾系である *EcoP1* や *EcoP15* の制限が、それをもつ細菌側の相同組換え経路に依存して変化するということである。特に、もともと大腸菌の相同組換え経路ではない、溶原化した *Rac* プロファージがコードする「借り物」の組換え経路である RecE 相同組換え経路が活性化されているときに、III 型制限酵素の活性が劇的に低下する現象 (alleviation) を見つけた。これは、非修飾ファージの単一感染 (シングルインフェクション) の条件で観察できた。同様の現象は部分的にラムダファージの *Red* 組換え経路でも観察することができた。また、反対に細菌の組換え経路である RecBCD 経路によって、III 型制限酵素の活性は促進された。これらの結果は、制限修飾系をもつ細菌に感染するバクテリオファージが、制限酵素による切断に適應した相同組換え機構を持つこと、また細菌のもつ相同組換え機構は III 型制限修飾系と一緒にファージの感染を阻止するように働くと考えられることができる。

5-1. バクテリオファージの相同組換え機構による III 型の制限の抑制と、細菌の相同組換え機構による制限の促進

制限修飾系は、大腸菌細胞がそれをもつとき、その大腸菌に対する非修飾バクテリオファージの感染を「制限」する。ラムダファージのブランクアッセイ、すなわち単一感染（一つの細胞に一つのラムダ粒子が感染する状態）の条件で、制限の強さを調べてみると、Rac プロファージ、あるいはその一部を大腸菌がもつときに *EcoP1*、あるいは *EcoP15* という2つの III 型制限の効果が低下していた（図28）。野生型大腸菌（AB1157 株）が *EcoP1*、あるいは *EcoP15* の III 型制限修飾系をもつときに、ラムダファージの感染（ブランク形成効率）をそれぞれ3桁、あるいは4桁ほど抑制した（図28、中段）のに対して、Rac プロファージが溶原化し、その組換え経路である *RecE* 経路が活性化されている細胞（JC8679 株）では、ラムダファージの感染（ブランク形成効率）をそれぞれ1桁ほどしか抑制しなかった（図28、上段）。III 型の制限抑制については、以前 *dam* 変異によって、III 型の制限が部分的に抑制される現象が報告されている（Efimova et al. 1998）。その変異による影響を最も受けたのは、I型の制限修飾系である *EcoK* であり、II型の *EcoRI* 制限修飾系はまったく影響を受けなかった。

I 型制限の抑制現象の中には、制限修飾系を連結するプラスミドが pACYC184 由来のとき特異的なものがあった（Salaj-Smic et al. 1997）が、JC8679 株での III 型制限の抑制は、制限修飾系を連結するプラスミドが pBR322 由来でも、pACYC184 由来でも同様に観察された（データは示していない）。

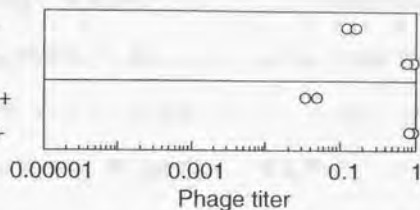
AB1157 株と JC8679 株の違いの一つは、JC8679 株では、大腸菌の本来の組換え経路が欠損し、Rac プロファージによる *RecE* 相同組換え経路が活性化されているという

ことである。私は、まずこの現象がこの Rac ファージ組換え機能を含む一部 (pRAC3 プラスミドの存在) によって起こることを確認した (図 2 8, 中段下)。このことは、III 型制限の抑制が、pRAC3 に含まれる部分で十分であることを示している。

また、ここでもうひとつ注目したいのは、細菌の中心的な相同組換え経路である RecBCD 経路が欠損しているときにも、III 型制限の効果が 1 桁ほど抑制されたことである (図 2 8, 下段)。このことは、III 型の制限酵素による切断点から RecBCD 酵素がファージ DNA を分解するために、野生型では見かけ上制限酵素の活性が高く見えたと考えられる。すなわち、この実験系でも細菌のもつ相同組換え機構と、制限修飾系が協調して他の利己的な遺伝単位の侵入を防ぐ様子が観察できたのである。

JC8679

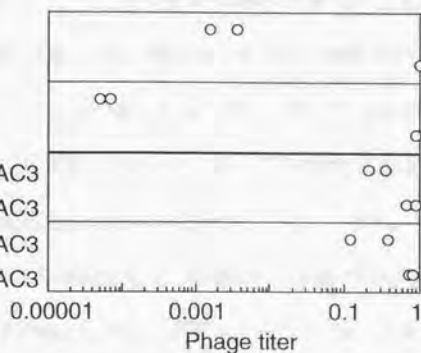
recBCsbcA rac⁺ EcoP1 r⁺m⁺
 EcoP1 r⁻m⁺
 EcoP15 r⁺m⁺
 EcoP15 r⁻m⁺



AB1157

rec⁺ rac⁻

EcoP1 r⁺m⁺
 EcoP1 r⁻m⁺
 EcoP15 r⁺m⁺
 EcoP15 r⁻m⁺



JC5519

recBC⁻

EcoP1 r⁺m⁺
 EcoP1 r⁻m⁺
 EcoP15 r⁺m⁺
 EcoP15 r⁻m⁺
 EcoP1 r⁺m⁺ pRAC3
 EcoP1 r⁻m⁺ pRAC3
 EcoP15 r⁺m⁺ pRAC3
 EcoP15 r⁻m⁺ pRAC3

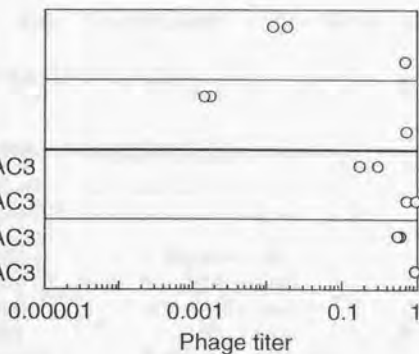


図 2 8 相同組換え経路による III 型制限の効果の違い

5-2. III 型の制限の抑制は、制限酵素遺伝子の突然変異によるものではない

制限修飾系をプラスミドにのせて大腸菌に形質転換するとき、しばしば制限酵素の活性の低いものが観察される。それは、制限酵素の存在は、細胞の染色体を切断する危険があるので、制限酵素遺伝子に突然変異の起きたものが選択的に得られるためと考えられる。そこで私は、最初にこの現象が単純な制限酵素遺伝子に突然変異が生じたことによるものではないことを確認した。図 2 8 で III 型制限酵素の活性抑制を起こした大腸菌からプラスミドを回収し、別の III 型制限酵素の活性抑制を起こさない大腸菌 DH5 株へ形質転換したとき、それらはバクテリオファージの感染を明らかに抑制した (表 5)。つまり、*Rac* プロファージの部分によって引き起こされる III 型の制限酵素の活性抑制は、制限酵素遺伝子の単純な突然変異によることではないことを示している。また、III 型制限の活性は、DH5 株では AB1157 株でより高かったが、両者は多くの点で異なるので、これが *recA* 変異によるものかは不明である。しかし、アイソジェニックな *recA* マイナス株でも、野生型よりも制限活性が高くなることを確認したので (データは示していない)、これは *recA* 遺伝子の突然変異によるものと考えられる。

表 5 III 型制限酵素の活性抑制は、制限酵素遺伝子に突然変異が起きたわけではない

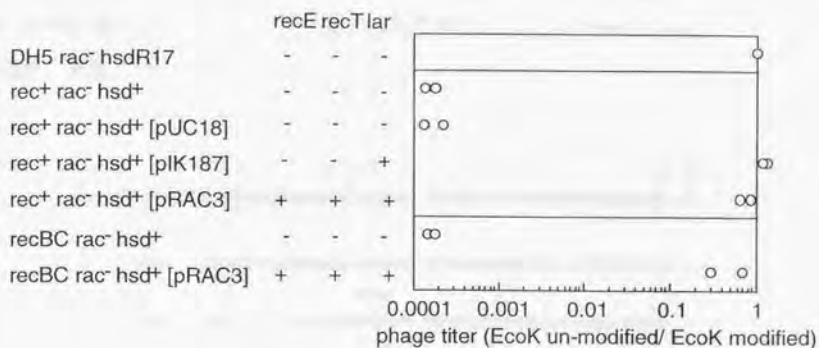
Strain	RM plasmid	Type III RM	DNA prepared from	λ vir
DH5	-			=1
DH5	pNR201	EcoP1 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺	DH5 [pNR201]	$1.47 \times 10^{-5} \pm 3.68 \times 10^{-6}$
DH5	pNH224	EcoP1 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺	DH5 [pNH224]	1.135 ± 0.049
DH5	pNR301	EcoP15 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺	DH5 [pNR301]	$2.72 \times 10^{-6} \pm 1.95 \times 10^{-7}$
DH5	pNH225	EcoP15 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺	DH5 [pNH225]	1.037 ± 0.089
DH5	pNR201	EcoP1 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺	JC8679 [pNR201]	$4.35 \times 10^{-5} \pm 3.82 \times 10^{-6}$
DH5	pNR301	EcoP15 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺	JC8679 [pNR301]	$4.85 \times 10^{-6} \pm 1.19 \times 10^{-6}$
DH5	pNR201	EcoP1 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺	AB1157 [pRAC3, pNR201]	$3.89 \times 10^{-5} \pm 9.62 \times 10^{-6}$
DH5	pNR301	EcoP15 <i>r</i> ⁺ <i>m</i> ⁺	AB1157 [pRAC3, pNR301]	$2.65 \times 10^{-6} \pm 5.59 \times 10^{-7}$

(N = 2 ± S.D.)

5-3. III 型制限の抑制は、Rac プロファージがコードする I 型制限の抑制因子である Lar の機能によるものではない

JC8679 株では I 型の *EcoK* 制限が低下する。これは、Rac プロファージがコードする *lar* 遺伝子産物によることが分かっている (Simmon & Lederberg 1972; Toothman 1981; King & Murray 1995)。私は、最初 III 型の制限酵素の活性抑制もこの遺伝子産物によるものと考えて、*lar* 遺伝子の存在によって III 型制限酵素の活性が低下するかどうか調べてみた (図 29)。まず、pRAC3 からクローン化した *lar* 遺伝子が *EcoK* の制限酵素活性を低下させることを確認した。図 29 で *lac* プロモーターの下流に接続した *lar* 遺伝子をもつ pLK187 をもつときに、以前の報告 (King & Murray 1995) 通りの *EcoK* 制限の抑制が観察された。しかし、このプラスミドが存在しても III 型制限の抑制は見られなかった (図 29)。このことは、III 型制限の抑制には、*lar* 遺伝子産物だけでは十分でないことを示唆している。

A.



B.

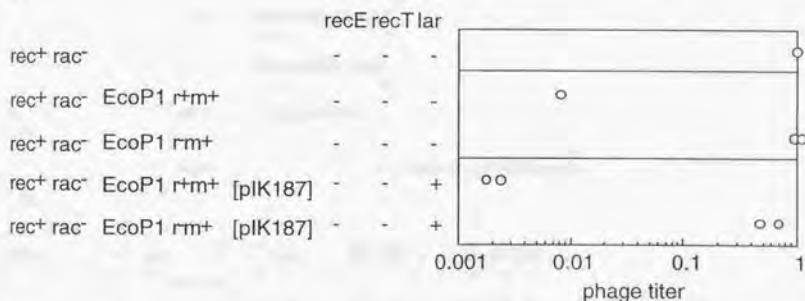


図29 *lar* 遺伝子産物がI型とIII型の制限に与える影響

(A) *Rac* ファージがコードする *Lar* タンパク質によるI型 *EcoK* 制限の抑制。(B) *Lar* タンパク質によってIII型 *EcoP1* 制限は抑制されない。

5-4. RecE と RecT の組み合わせ、あるいは RecE と宿主細菌の RecA の組み合わせで III 型の制限の抑制には十分である

次に、III 型の制限の抑制を起こすのに十分であった pRAC3 を少しずつ削っていき、この現象に必要な遺伝子を決めた。ここで使用したプラスミドとそれがもつ Rac ファージ由来の遺伝子を図 3 0 に示す。

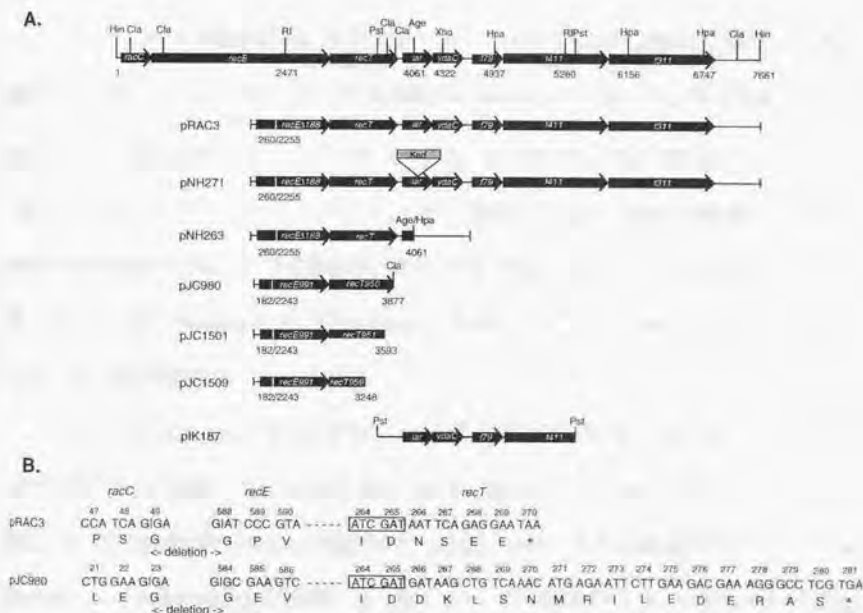


図 3 0 Rac プロファージの部分を含むプラスミドの遺伝子構成

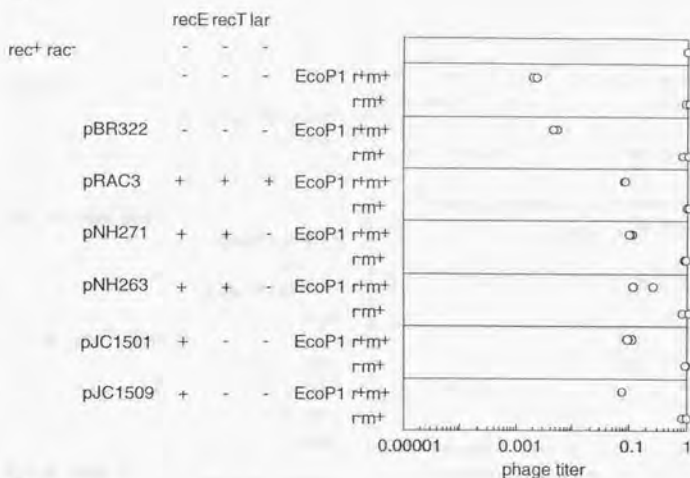
(A) プラスミドの構成。(B) pRAC3 と pJC980 由来のプラスミドでの欠失位置の違い。pJC980 由来のプラスミドは、recT 遺伝子の 3'側の *Clal* サイトとバクテリアの *Clal* サイトが結合されることによって、RecT タンパク質の C 末側の 4 アミノ酸が欠失して、代わりにこれと異なる 15 アミノ酸が付加されている。

III 型制限修飾系の活性抑制には、野生型 (*rec⁺*) のバックグラウンドでは、Rac ファージがコードする組換え遺伝子のうち *recE* 遺伝子のみが要求され、*recA* 突然変異のバックグラウンドでは、*recE* と *recT* の両方の遺伝子が必要であることをが分かった (図 3 1 AB)。このことは、*recT* 遺伝子産物と *recA* 遺伝子産物が機能的に交換可能であることを示している。

また、*recA* 突然変異のバックグラウンドで、RecT タンパク質の C 末の 4 アミノ酸を欠失したもの (pJC980) では III 型制限の抑制は起こらなかった (データは示していない)。このプラスミドは *recET⁺* プラスミドとして報告されたものであった (Clark et al. 1993) が、私は、このプラスミドにコードされる遺伝子では、*recBC* 突然変異株の紫外線感受性を回復させることができるが、DNA 二本鎖切断を修復できないことを、プラスミドを使った系 (Kusano et al. 1994a; Kusano et al. 1994b; Takahashi et al. 1993) で確認している (論文準備中)。

私はさらに、*recT* 遺伝子産物と *recA* 遺伝子産物を互いに交換できることを、遺伝学的解析からも確認した。JC8679 株の *recA*、あるいは *recT* 遺伝子を欠損させたときには、III 型の制限は部分的にしか戻らなかったが、*recA*、*recT* の両遺伝子をともに欠損させると、その活性は完全に回復した (図 3 2)。この結果からも、III 型の制限の抑制には、RecE タンパク質と、RecT、あるいは RecA タンパク質が必要であることが示唆された。

A.



B.

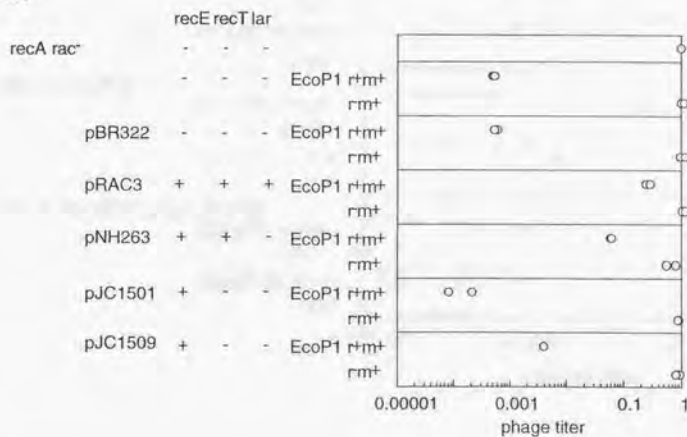


図3-1 III型制限酵素の活性抑制に要求される遺伝子産物

(A) 野生型 (*rec*⁺) のバックグラウンド。(B) *recA* 突然変異のバックグラウンド。

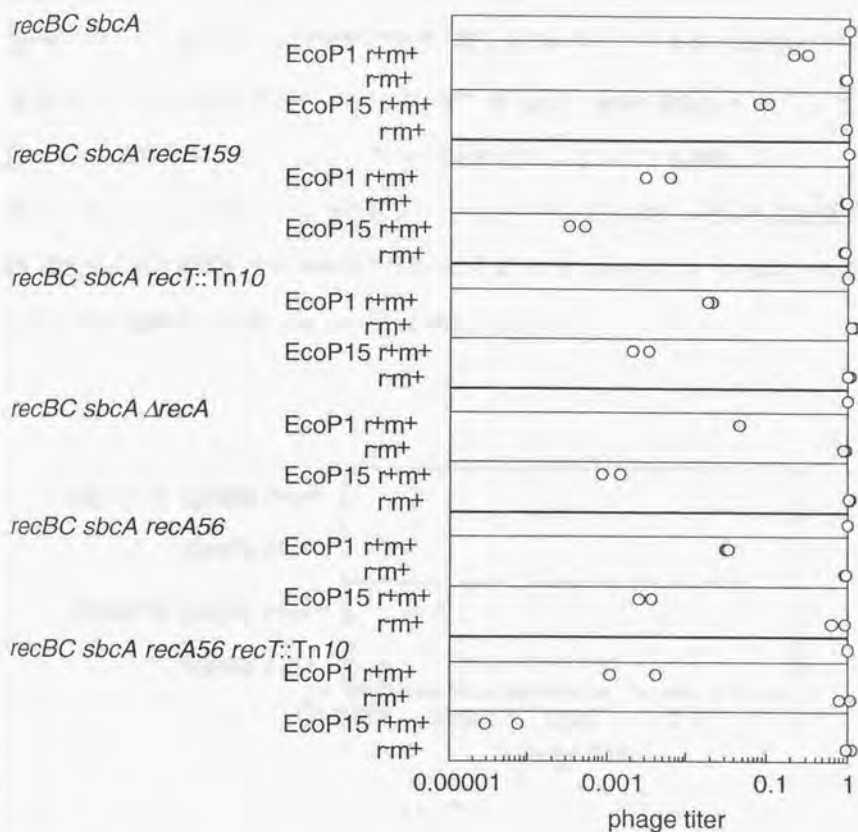


図 3 2 III 型制限の抑制に要求される遺伝子機能

5-5. I型、あるいはII型の制限は、単一感染の条件で *recBC sbcA* 細胞で低下しない
 III型の制限は、*recBC sbcA* 細胞の中で抑制された。このことは他の制限修飾系（I型、あ
 るいはII型）でも観察されるのか調べてみた。図33に示すように、II型の制限酵素であ
 る *EcoRI* は、*recBC sbcA* 細胞でもその効果は野生型 (*rec+*) 細胞と差はなかった。また、
 別のII型の制限酵素である *PaeR7I* でもその活性が変化しないことを確認した（データ
 は示していない）。これは、シングルインフェクションの条件であり、II型の制限切断が
 同じ細胞内にある相同なDNAを鋳型とするRecE経路の相同組換えによって修復される
 という初期の結果（Kusano et al. 1994b）と矛盾しない。

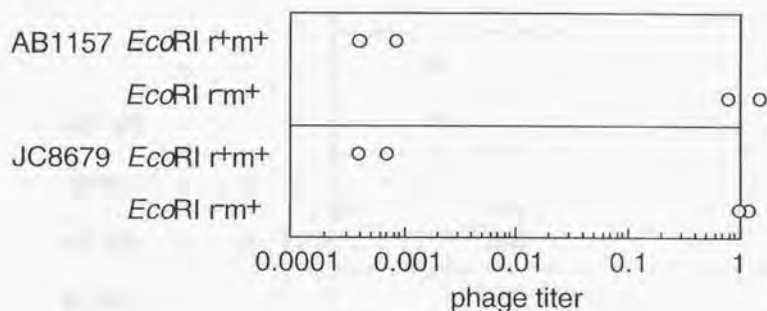


図33 野生型 (*rec+*) と JC8679 (*recBC sbcA*) 株での II 型制限酵素 *EcoRI* の活性

I型の制限は、*sbca* 株では抑制される (King & Murray 1995)。これは、*Rac* ファージのゲノム上の *recT* 遺伝子の直下流に存在する *lar* 遺伝子産物によることが分かっている。I型の制限酵素 *EcoK* の活性が、*RecE* 相同組換え機構によって影響を受けるのか調べるために、*lar* 遺伝子を欠損したプラスミドを構築した。図 3 4 に示すように、*recET* 遺伝子だけでも、I型の制限は部分的に抑制された (*pJC980* と *pNH271* の結果)。*pJC980* では *lar* 遺伝子が完全に欠失しているが、*pNH271* では、*lar* 遺伝子の C 末の 27 アミノ酸が欠失した構造なので部分的に *lar* 遺伝子産物の活性が残っていたのかもしれない。

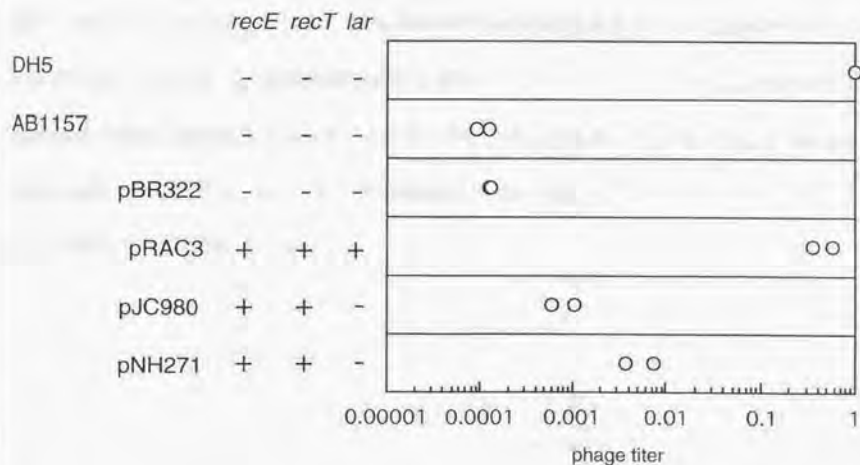


図 3 4 *RecE* 相同組換え経路による I 型の制限への影響

5-6. ラムダファージがコードする Red 組換え経路での III 型の制限抑制

DNA 二本鎖切断修復型の相同組換え機構は Rac ファージばかりでなく、ラムダファージもコードしていることが知られている (Takahashi & Kobayashi 1990)。そこで私は、ラムダファージがコードする Red 組換え経路でも III 型の制限の抑制が起こるかどうか調べてみた。図 3 5 に示すように、*red* 遺伝子があるときに III 型の制限の効果が部分的に抑制された。ここで用いたプラスミドは、この条件でプラスミドの系では DNA 二本鎖切断修復を効率よく行っていた (Takahashi & Kobayashi 1990)。

また、感染させるファージを λ vir (*red⁺ gam⁺*) から λ *red gam* に変えると、ファージの感染効率は劇的に低下した (表 6)。このことは、ラムダファージの Red 組換え経路 (あるいは Gam タンパク質) が III 型制限酵素の活性を抑えて、自己の感染を効率よくしている、すなわち III 型制限酵素の活性抑制が、ファージがコードする二本鎖切断修復型組換え機構 (あるいは Gam タンパク質) で起こることを示している。また、 λ *red gam* でも *recBC* 変異株では、*rec⁺* に比べ感染効率がよくなった。このことは、 λ vir で言えたこと (図 2 8) を再現している。

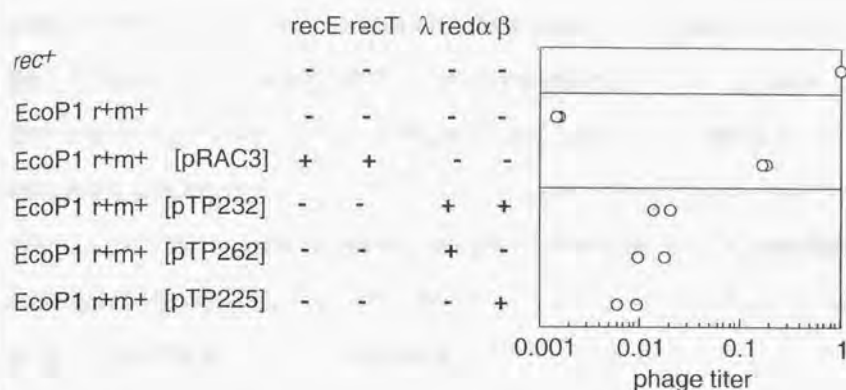


図 3 5 ラムダファージがコードする Red 組換え経路による III 型制限の抑制

表 6 野生型大腸菌 (*rec*⁺) と *recBC* 欠損株での λ vir (*red*⁺ *gam*⁺) と λ *red gam* の感染効率の違い

	<i>r</i> ⁺ / <i>r</i> ⁻	
	<i>rec</i> ⁺	<i>recBC</i>
<i>EcoP1</i> λ <i>red</i> ⁻ <i>gam</i> ⁻	7.5×10^{-5}	3.8×10^{-4}
λ <i>red</i> ⁺ <i>gam</i> ⁺	1.2×10^{-2}	1.4×10^{-2}
<i>EcoP15</i> λ <i>red</i> ⁻ <i>gam</i> ⁻	2.9×10^{-6}	3.1×10^{-6}
λ <i>red</i> ⁺ <i>gam</i> ⁺	7.3×10^{-5}	1.4×10^{-3}

λ vir (*red*⁺ *gam*⁺) と λ *red gam* を、III 型 EcoPI 制限修飾系をもつ野生型 (*rec*⁺) と *recBC* 欠損株に単一感染の条件で感染させた。

5-7. III 型制限の抑制に対するカイ配列の効果

III 型制限の抑制は、本当に RecE 相同組換え経路特異的な現象なのか、細菌の RecBCD 経路も影響を及ぼさないか、感染させるファージにカイ配列を持たせることでこの経路を活性化して調べてみた。pRAC3 をもたせた野生型の大腸菌 (*rec⁺*) で III 型制限酵素の活性抑制を観察する実験を行い、このときラムダファージの持つ RecBCD 酵素の阻害因子 (Gam タンパク質) を欠損させて代わりにカイ配列をもたせておいても、III 型制限酵素の活性抑制には何の変化もなかった (データは示していない)。また、pRAC3 がない場合にも、III 型制限酵素の活性にカイ配列の有無で差は見られなかった (データは示していない)。ただし、このときカイ配列はラムダファージ中に 1 カ所しか挿入しなかった。ラムダファージゲノムには EcoP1 認識配列が 4 9 個もあるので、より小さいゲノムを持つバクテリオファージで実験を行う必要があるかもしれない。

6. 自然に生じる大腸菌染色体の二本鎖切断の解析

DNA に二本鎖切断を入れることが明らかな II 型の制限修飾系を大腸菌がもつときに、その修復に細菌の相同組換え組換え機構が重要であることを 4 章でみた。自然界では制限修飾系がない場合も考えられるが、そのときには相同組換え機構は不要であるのか？制限酵素がないときに染色体 DNA に二本鎖 DNA 切断が生じるかをパルスフィールドゲル電気泳動の実験系で調べてみた。その結果、II 型の制限修飾系がなくても自然に染色体 DNA に二本鎖 DNA 切断が生じており、その修復に相同組換え機構が重要なことが分かった。

6-1. 二本鎖切断された染色体の観察と培地の検討

大腸菌の培養液をアガロースプラグ中に包埋し、ここで溶菌して調整した染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動で泳動した。図 3-6 に一例を示すように、エチジウムブロマイドによってゲルの 3 つの部分に染色される。二本鎖切断のない完全な染色体 DNA は、アガロースの網目を通過できないのでウェルにとどまる。二本鎖切断によって、環状の染色体が線状になると、アガロース中に入り込むようになり少しだけ移動し、ウェルの直下に 700 kb 以上の大きさと推測できるバンドを形成する。染色体が多数の複製フォークをもつような場合には、アガロース中で移動するのに 1 回以上の二本鎖 DNA 切断が必要になると考えられる。染色体 DNA が分解されてもっと小さな断片になっているときには、ゲルのもっと下の方まで泳動されることになる。これらの解釈は、環状染色体を使った酵母染色体の解析によっている (Game et al. 1989)。この章では、この解析で巨大 DNA のバンドに注目する。

以前の大腸菌での同様の解析では、最少培地を用い、巨大 DNA 量を複製過程で取

り込ませたトリチウムを定量していた (Michel et al, 1997; Seigneur et al, 1998)。私は、この解析をもっと簡便に行うことを考えた。なぜなら、私はすでに4章の制限修飾系が失われた後の染色体の断片化を観察したときに、相同組換えに重要な遺伝子の欠損によって、自然に染色体に生じる二本鎖切断の量に明らかに違いがあることを見だしていたからである。図35に示すように、最少培地で培養した野生型 (*rec*⁺) の大腸菌では染色体切断を観察できた。しかし、L培地で培養した同じ大腸菌株では、それはほとんど観察されなかった。この条件で *recB21 recC22* 変異株では、明らかな染色体切断が観察できた。

私は、なぜ培養する培地によって、このような違いが出るのか明らかにしていない。最少培地に比べて、L培地で培養した方が複製中の染色体の数が多いと考えられる。最少培地で生育中の比較的少数の染色体をもつような細胞の場合には、少ない二本鎖切断によってその切断を巨大 DNA として観察できるが、L培地で生育している多くの複製中の染色体をもつ細胞の場合には、多くのイベントが必要であり、それ故L培地の方が二本鎖切断をより観察しにくいと考えている。私は、相同組換えに関与する遺伝子の欠損による染色体切断の量の違いを比較したいので、実験をL培地で培養することにした。

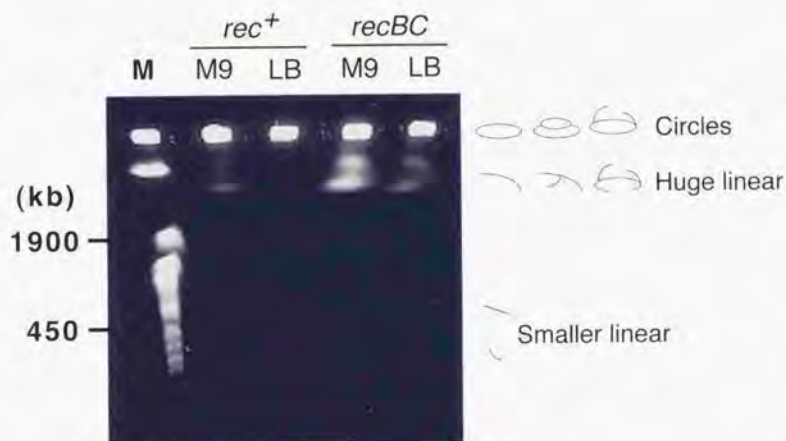


図 3 6 パルスフィールドゲル電気泳動による巨大線状染色体の検出

野生型 (*rec*⁺ = AB1157) と *recBC* 変異株 (JC5519) を最少培地 (M9)、あるいは L 培地で培養し、アガロース中に包埋して調整した染色体をパルスフィールドゲル電気泳動で解析した。巨大な環状染色体は、ウェルにとどまる。二本鎖切断を生じた線状染色体は、ウェルの直下にバンドを形成する。分解された染色体はスメアとしてゲルの下部に見られると考えられるが、ここでは見えていない。サイズマーカーとして、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の染色体を泳動した。

6-2. 野生型 (*rec*⁺) バックグラウンドで染色体二本鎖切断の同定に重要な相同組換え遺伝子変異

染色体二本鎖切断による巨大 DNA の蓄積は、*recB*、あるいは *recC* 遺伝子の完全欠損 (*recB21 recC22* と *recC73*) によって観察できた (図 3 7 A、図 3 8 A、この学位論文 4 章、Michel *et al.* 1997)。これらの変異株では二本鎖 DNA 分解酵素 (RecBCD 酵素) がいないので、切断された染色体をさらに小さい DNA に分解しないし、壊れた染色体を相同組換えによって、環状の染色体に治すことができない。そのために、パルスフィールドゲル電気泳動で巨大な DNA として染色体二本鎖切断を観察できたと考えられる。*recD* 変異株では、このような切断は観察されない (図 3 7 A、図 3 8 A)。それはこの変異によって二本鎖 DNA 分解酵素活性はなくなるが、この株がハイパーレックな表現形を示し、染色体修復ができるためだと考えられる。その他の完全欠失ではない *recBCD* 変異 (*recC1001*, *recC1002*, *recC1003*, *recC1004*, *recB2145*, *recB2154*, *recB2155*) でも壊された染色体 DNA の蓄積は観察されなかった (図 3 7 B、図 3 8 B)。これらは、RecBCD 酵素の二本鎖 DNA 分解活性が残っているため、二本鎖切断点から分解されて切れ目のない構造にしまうためであると考えられる。

他の相同組換えに重要な遺伝子の欠損 (*recA*, *recF*, *recG*, *recJ*, *recN*, *recO*, *recQ*, *recR*, *ruvAB*, *ruvC*) でも、壊された染色体は観察できなかった (図 3 7 A、図 3 8 A)。これも RecBCD 酵素が正常であるために、その二本鎖 DNA 分解活性で切断点から分解されるためであると考えられる。*recC* 完全欠失株の巨大線状染色体の蓄積は、*recF* 変異によってその効果を抑制された (図 3 7 B、図 3 8 B)。RecF の機能は、切断点からのさらなる分解を抑制する、あるいは環状染色体を再生するような修復を防ぐことが考えられた。

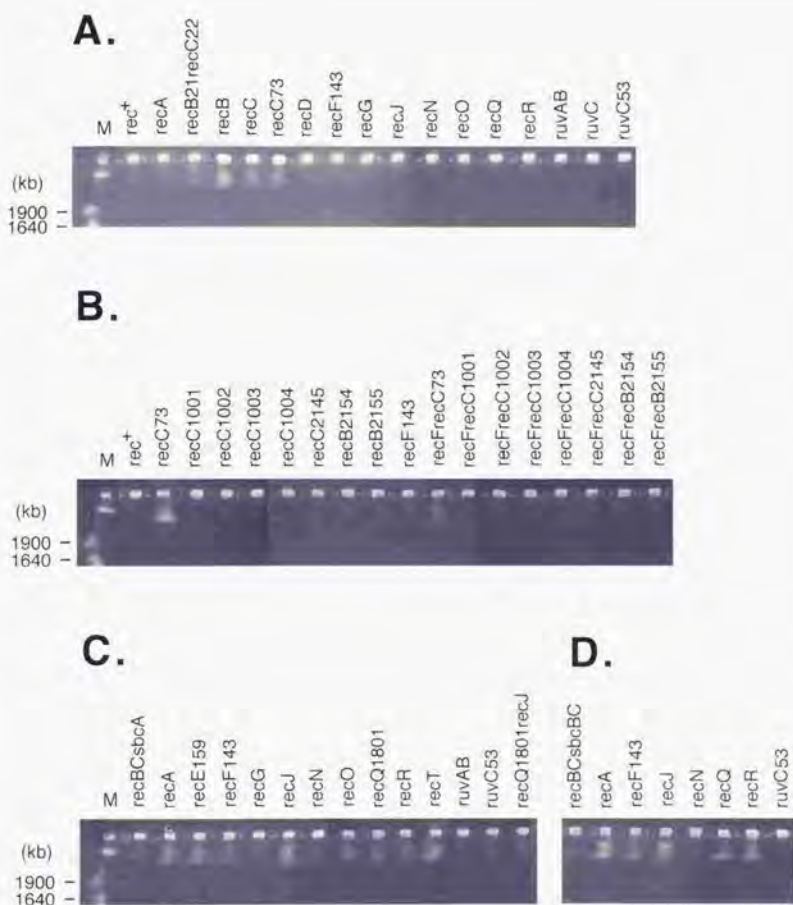
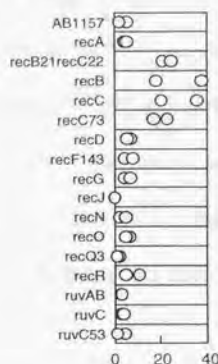


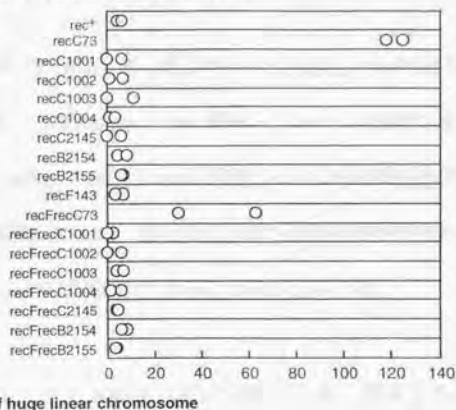
図3-7 染色体二本鎖切断による相同組換え遺伝子欠損株の巨大線状染色体の蓄積

(A) *rec*⁺ バックグラウンド。(B) いろいろな *recBCD* 変異株。(C) *recBC sbcA* バックグラウンド。(D) *recBC sbcBC* バックグラウンド。

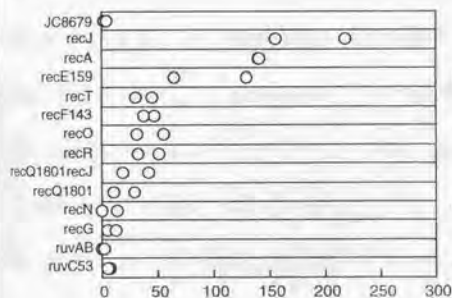
A. *rec*⁺



B. *recBC* Chi recognition mutants



C. *recBCsbcA*



D. *recBCsbcBC*

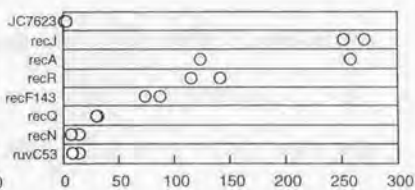


図 3 8 巨大線状染色体の定量

(A) *rec*⁺ バックグラウンド。(B) いろいろな *recBCD* 変異株。(C) *recBC sbcA* バックグラウンド。(D) *recBC sbcBC* バックグラウンド。巨大線状染色体の量は、で表してある。2 回の独立に行った実験結果を示す。

6-3. *recBC sbcBC* バックグラウンドで染色体二本鎖切断の同定に重要な相同組換え遺伝子変異

recBC sbcBC 株では、RecBCD 酵素が欠損していて、RecFOR 酵素と RecQJ 酵素が RecA タンパク質とともに接合を促進する (Lloyd and Low 1996)。*recBC sbcBC* 変異のバックグラウンドでは、*recA*、*recF*、*recJ*、*recQ* と *recR* 変異によって巨大染色体が蓄積した (図 3 7 D、図 3 8 D)。*recJ* 変異によって、最も切断された染色体が観察された。しかし、*ruvC* 変異によってはそのような巨大染色体の蓄積は見られなかった。

6-4. *recBC sbcA* バックグラウンドで染色体二本鎖切断の同定に重要な相同組換え遺伝子変異

recBC sbcA 株では、*sbcA* 変異により溶原化した Rac プロファージがコードする *recET* 遺伝子が発現され、二本鎖切断点での相同組換えを促進している。巨大線状染色体の蓄積は、*recBC sbcBC* バックグラウンド同様、*recA*、*recF*、*recJ*、*recQ* と *recR* 変異によって観察された (図 3 7 C、図 3 8 C)。また、*recO*、*recE*、*recT* 変異によってもそれを観察できた。ホリデー構造 (組換え中間体) をプロセスする *recG*、*ruvAB*、*ruvC* 変異によっては、このバックグラウンドでも壊れた染色体の蓄積は見られなかった。*recJ* 変異によって、多くの切断された染色体が観察されたが、それは *recQ* 変異によって抑制された。このことは、*recJ* 変異の効果が *recQ* 変異によって抑制されるという、*recBC sbcA* 株におけるプラスミドでの二本鎖切断修復の解析 (Kusano et al. 1994a) を支持する。

6-5. HU 変異

最近、染色体結合タンパク質である HU をコードする、*hupAB* 遺伝子の欠損も相同組換えができなくなることが示された (Boubrik & Rouviere-Yaniv 1995; Li & Waters 1998)。そこで、この変異についても、巨大 DNA の蓄積を調べてみた。*Hup* 変異によっても、壊れた巨大染色体の蓄積が観察された (図 3 9)。

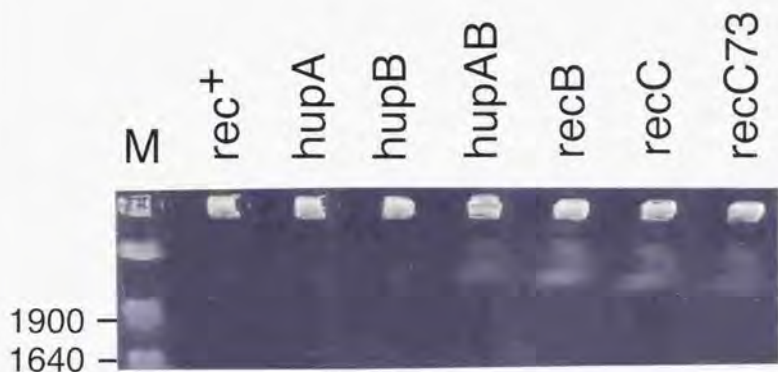


図 3 9 HU 変異による巨大線状染色体の蓄積

7. 制限修飾系が引き起こす染色体再編

制限修飾系が細菌ゲノムとは独立した遺伝単位として存在し、現在まで維持されているのは、それが細胞から失われたときに染色体に二本鎖切断を導入して細胞死を仕組み、その維持を細胞に強制するためであること、その細胞死に対しては細菌は相同組換えによって抵抗することを示してきた。これまでの制限修飾系の実験は、制限修飾系をプラスミド上にのせて行ってきたが、現在知られる制限修飾系はプラスミド上ばかりではなく、細菌の染色体上からも見つかったので、細胞死を仕組み自己の維持をはかる効果は、それが染色体上にあるときにも機能すると考えられた。そこで私は、染色体上にある制限修飾系を、それと相同な DNA によって置き換えて、細胞から失わせる実験を行った。

7-1. 染色体に挿入した制限修飾系は置き換えに抵抗する

染色体上の制限修飾系が、それと相同な DNA による置き換えに対して、それを失ったときに細胞死を仕組むことで抵抗するかどうかを調べるために、図 40 に示すような実験を行った。置き換えは、バクテリオファージ P1 による普遍形質導入によって行った。

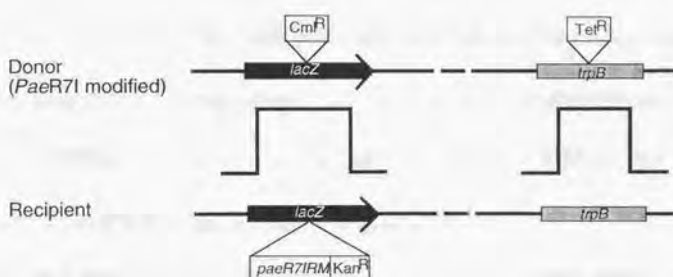


図 4 0 実験デザイン

lacZ 遺伝子に *PaeR7I* 制限修飾系をカナマイシンの薬剤耐性遺伝子 (Kan^R) とリンクさせて挿入し、これをレシピエントとし、これと同じ部分にクロラムフェニコールの薬剤耐性遺伝子 (Cml^R) を挿入した大腸菌をドナーとして、バクテリオファージ P1 による普遍形質導入によって置き換えた。ドナー DNA は pTN4 プラスミドによって、*PaeR7I* サイトを修飾した。ドナー大腸菌には、そこから離れた *trpB* 遺伝子にテトラサイクリンの薬剤耐性遺伝子 (Tet^R) もあり、この形質導入頻度によって Cml^R の頻度を補正した。

以前、私たちの研究室で *PaeR7I* 制限修飾系をプラスミドにのせておくと、そのプラスミドを別の同居できない（不和合な）プラスミドで置き換えると細胞死が起き、置き換えに抵抗することを示した（Naito et al. 1995）。同じ *PaeR7I* 制限修飾系を今度は、染色体上の *lacZ* 遺伝子にカナマイシンの薬剤耐性遺伝子（ Kan^R ）と一緒に挿入した（詳しくは図 44）。コントロールとしては、制限酵素の遺伝子が欠損しているものと、制限修飾系のないものを用意した。これと同じ部分にクロラムフェニコールの薬剤耐性遺伝子（ Cml^R ）を挿入した大腸菌をドナーとした。この株には、*lacZ* 遺伝子とは離れた *trpB* 遺伝子にテトラサイクリンの薬剤耐性遺伝子（ Tet^R ）を挿入してある。

ドナー株で調整した P1 バクテリオファージをレシピエント株に感染させることによって、ドナー染色体 DNA をレシピエントに導入し、ドナーの選択マーカーであるクロラムフェニコール耐性（ Cml^R ）を選択した。形質導入頻度は、クロラムフェニコール耐性形質導入頻度を、テトラサイクリン耐性形質導入頻度で割ることで、実験ごとに補正した。ドナーの DNA は、*PaeR7I* メチル化酵素遺伝子をもつプラスミドをもたせて培養することで、*PaeR7I* サイトを修飾してあるので、ドナー DNA が制限修飾系をもつレシピエント株に入ったときに切断されることはない。その修飾効率、*PaeR7I* 制限修飾系をもつ、あるいはもたない大腸菌にバクテリオファージを感染させてその頻度に明らかな差がないことと確認した（データは示していない）。

表 7 に示すように、形質導入頻度は *PaeR7I* 制限修飾系があると、それがない場合に比べて、減少した。その頻度はプレートを置く時間によって変化し、培養時間が短い方がその差が大きかった。その頻度は、レシピエント株で活性化されている相同組換え経

路によっても差があり、とくに5章で述べた二本鎖切断修復に有効な RecE 経路が活性化されているとき、置き換えの頻度の低下は小さかった。また、このときの形質導入体のコロニーのサイズは、置き換えに抵抗する場合に（その頻度が低いときに）小さかった（図41）。

表 7 染色体上の制限修飾系は、相同な DNA による置き換えに抵抗する

rec genotype	Recombination pathway	Recipient	Relative frequency ^a Incubation (20hrs)	Relative frequency ^a Incubation (40hrs)	Kan ^R R ⁺ Cm ^R (%)	Products ^b R ⁺ R ⁺ Cm ^R (%)	Others c (%)
rec ⁺	RecBCD	Kan ^R PaeR71 R ⁺ M ⁺ Kan ^R PaeR71 R ⁺ M ⁺	$\equiv 1$ 0.027 \pm 0.023 0.73 \pm 0.42	$\equiv 1$ 0.12 \pm 0.068 0.81 \pm 0.36	72 100	24	4
recBC sbcA	RecE	Kan ^R PaeR71 R ⁺ M ⁺ Kan ^R PaeR71 R ⁺ M ⁺	$\equiv 1$ 0.14 \pm 0.11 1.2 \pm 0.76	$\equiv 1$ 0.52 \pm 0.068 1.1 \pm 0.26	99 100	0.5	0.5
recBC sbcBC	RecF	Kan ^R PaeR71 R ⁺ M ⁺ Kan ^R PaeR71 R ⁺ M ⁺	$\equiv 1$ 9 $\times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-3}$ 1.1 \pm 0.58	$\equiv 1$ 0.15 \pm 0.095 1.2 \pm 0.31	32 97	67	1 3

a: 大腸菌は対数増殖初期 (OD = 0.3) まで培養して遠心によって集菌し、 5×10^8 cells/ml の濃度になるように 0.1 M MgSO₄ - 5 mM CaCl₂ で懸濁した。5 ml の培養液に対して、 1×10^9 pfu のそれぞれのドナー菌で調整したバクテリオファージ P1 (多重感染度 (moi) = 0.4) を感染させた。その細菌とファージの混合液を 37 °C で 20 分おいて遠心によって集菌し、0.1 M sodium citrate (pH 5.5) を含む 1 ml の L 液体培地を加えて、37 °C で 1 時間おいた後、プレートした。この条件で、感染効率は 99% 以上であった。実験は、それぞれ 4 回の結果をまとめたものである。

b: 2 回の独立の実験から、191 個、あるいは 192 個の形質導入体を単離し、薬剤耐性と制限修飾系の表現形を調べた。

c: Cm^R Kan^R R⁺ M⁺ or Cm^R Kan^R R⁺ M⁺。

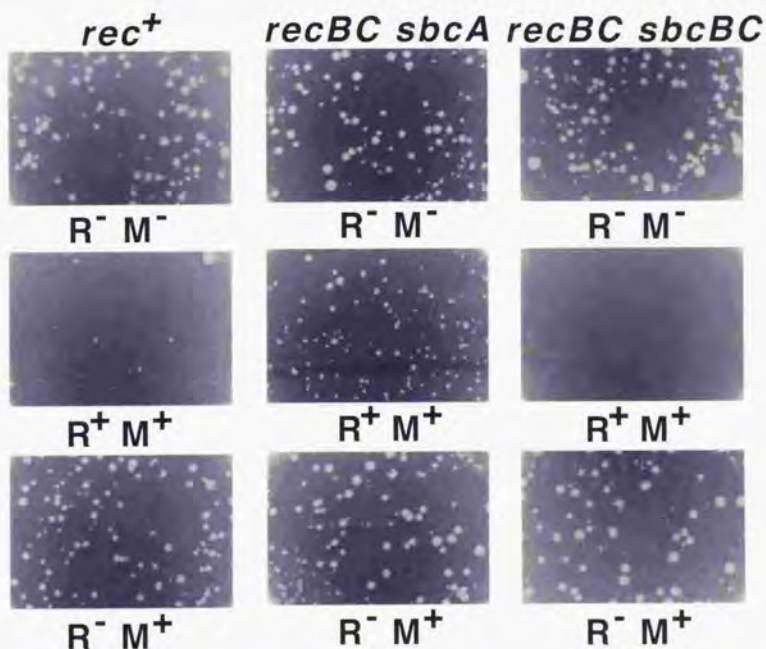


図 4 1 形質導入体のコロニー形成の様子

37 °C で 40 時間培養した形質導入体のコロニーの様子。レシピエント株の制限修飾系について記載した。

7-2. 不安定な部分2倍体として振る舞う形質導入体

この実験で得られた形質導入体の薬剤耐性と制限修飾系の表現形を確認した。驚いたことに、制限修飾系をもつ (r^+m^+) レシピエントでの置き換え実験から得られた形質導入体を解析したところ、形質導入体の多くで、置き換えたはずのカナマイシン耐性 (Kan^R) と制限修飾系の表現形が、クロラムフェニコール耐性 (Cm^R) の表現形とともに観察されたのである (表7)。その両方の薬剤耐性を示す形質導入体から薬剤の選択をはずして培養を続けると、ドナー側の薬剤耐性マーカーはゆっくりと失われていった (図42)。つまり、これらの形質導入体は、制限修飾系を挿入した *lacZ* 遺伝子部分について不安定な部分2倍体として振る舞ったのである。

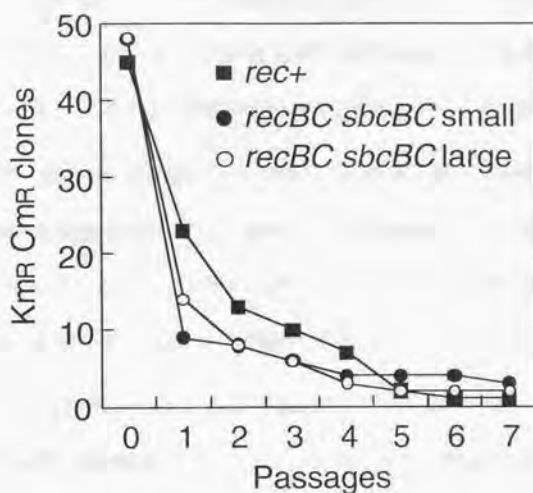


図 4.2 選択をはずした後のドナー側薬剤マーカーの喪失

$CmI^R Kan^R$ 両耐性の形質導入体を CmI と Kan を含む L 寒天培地に塗り拡げた。単一コロニーを薬剤の入っていない L 液体培地に回収して $37^\circ C$ で一晩振とう培養した。この培養液を 1000 倍に希釈してさらに培養を続けた。この操作を繰り返して、植え継ぐときにその培養液を薬剤の入っていない L 寒天培地に塗り拡げ、そこから 6 つの単一コロニーを、薬剤耐性が維持されているか調べるために、さらに CmI 、あるいは Kan を含む L 寒天培地、あるいは薬剤の入っていない L 寒天培地に塗り拡げた。そのうち 1 つ以上の CmI^S を示した培養液は CmI^R マーカーが不安定だと判断した。安定な $CmI^R Kan^R$ クローン数をプロットした。

これはどのようなことが起こったと考えられるか？図4-3に、考えられる部分2倍体（重複）を生じる過程を示した。制限修飾系を挿入した *lacZ* 部分の両側に、順向きの繰り返し配列が存在する場合に、姉妹染色体間の相同組換え（不等交叉）によって、その順向き繰り返し配列で挟まれた領域が重複すると考えられる。制限修飾系をもつ2つの *lacZ* 領域のうち、形質導入の実験で、一方がドナーのマーカー（ Cml^R ）によって交換されても、制限修飾系は失われないので、染色体に二本鎖切断は生じず細胞死も起きないと考えられる。このドナーとレシビエントの双方のマーカーをもつ部分2倍体は不安定で、同じ相同組換え（不等交叉）によって1倍体に戻ることが考えられる。このとき、どちらの重複領域が失われるかは2分の1の確率なので、ドナーのマーカー（ Cml^R ）が失われても何も起きないが、制限修飾系のレシビエントのマーカーが失われた場合には、置き換えと同じことであるので、染色体に二本鎖切断が生じ細胞死が引き起こされると考えられる。実際、形質導入の実験で形成されるコロニーは、制限修飾系（ r^+m^+ ）が置き換えられた場合には小さくなった。これは、その状態が固定したものではなく、また1つに戻るためにその過程でも細胞死が起きていることを示唆している。

大腸菌は、その全ゲノム配列が明らかにされているので、制限修飾系を挿入した遺伝子領域の両側にこのような繰り返し配列がないか探してみたところ、IS5 と IS3 がそれぞれおよそ 250 kb と 300 kb も離れているが、*lacZ* 領域を挟むように存在することが分かった（Blattner et al. 1997）。後に示すように、IS3 が上にあげたモデルで、この現象に含まれていることが明らかになった。

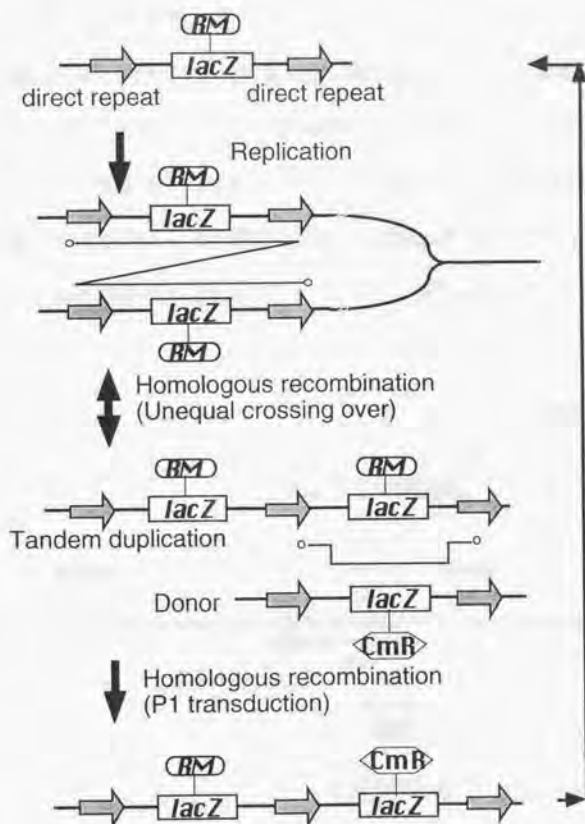


図 4 3 不安定な部分 2 倍体形成を説明する不等交叉モデル

順向きの繰り返し配列に挟まれた *lacZ* 領域を含む部分が、相同組換え（不等交叉）によって重複される。2つの *lacZ*::RM-Kan^R 領域の一方のみが、ドナー DNA (*lacZ*::Cm^R) によって交換される。長い重複を持つ染色体構造は、その間での相同組換えによって重複のない染色体に戻ろうとするので不安定になる。このとき、ドナーマーカー (*lacZ*::Cm^R) を失っても何も起こらないが、制限修飾系 (*lacZ*::RM-Kan^R) を失うと、分離後宿主殺しが起こる。

7-3. 形質導入体は部分 2 倍体だった

染色体上に制限修飾系を持つ場合に、それを相同な制限修飾系のない DNA で置き換えた形質導入体が部分 2 倍体であることを、サザン解析によって確認した。この実験で用いた *lacZ* 領域の詳しいマップを図 4 4 に示す。ドナー、レシビエント、両方のマーカーを持つ形質導入体染色体 DNA を調整し、制限酵素 *EcoRV* で切断しアガロースゲル電気泳動したメンブレンに対し、*lacZ* 遺伝子の一部をプローブにしてサザン解析した。

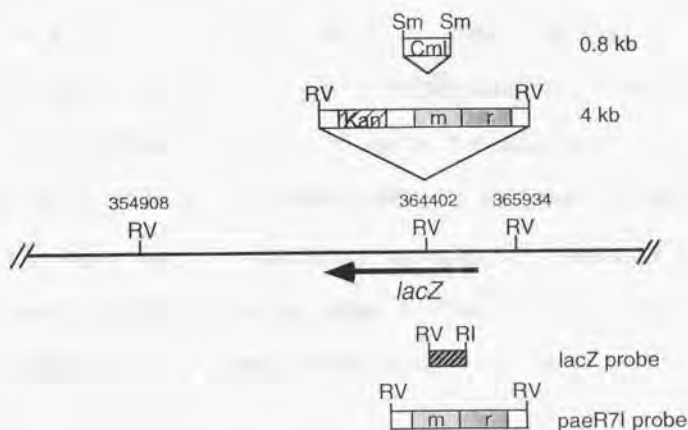


図 4 4 制限修飾系を挿入した *lacZ* 遺伝子領域

lacZ 遺伝子中の *EcoRV* サイト (364402 = MG1655 株での Blattner マップ位置 (Genbank, Accession U00096)) に、レシビエント株では *PaeR7I* 制限修飾系 (4 kb) を、ドナー株ではクロラムフェニコール耐性遺伝子 (0.8 kb) を挿入した。*LacZ* 遺伝子の一部をプローブに *EcoRV* で切断した染色体でサザン解析すると、レシビエントでは 1.5 kb、ドナーでは約 12 kb のバンドが観察される。*Sm*: *Sma*I、*RV*: *EcoRV*、*RI*: *EcoRI* サイト。

その結果を図 4 5 に示す。レシピエントでは 1.5 kb、ドナーでは約 12 kb の単一のバンドが観察された。これはレシピエントとドナーがそれぞれ *lacZ* 遺伝子領域を 1 コピー持つことを示している。一方、染色体上の制限修飾系の置き換え実験で得られた、ドナーとレシピエントの双方のマーカーをもつ形質導入体は、調べたすべてでこの 1.5 kb と約 12 kb の、それぞれレシピエントとドナーに相当するバンドが観察された。これは、これらの染色体中には、*lacZ* 遺伝子領域が 2 コピーあることを示唆している。

レシピエントと形質導入体に実際に制限修飾系遺伝子があることも、*PaeR7I* 遺伝子領域（図 4 4）をプローブとしたサザン解析によって確認した（図 4 5、下）。

また、順向き繰り返し配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子は、その薬剤の選択によってコピー数を増す現象が知られているので（Romero & Palacios 1997）、ドナー株とレシピエント株については、それぞれの大腸菌を培養するときに薬剤の選択のある場合とない場合の結果を同時に示した。その結果からは、私が選択に使った薬剤濃度では、そのようなコピー数の増加は認められなかった。すなわち、部分 2 倍体を生じるのは、薬剤耐性遺伝子を制限修飾系とリンクして挿入したためではないことが示唆された。

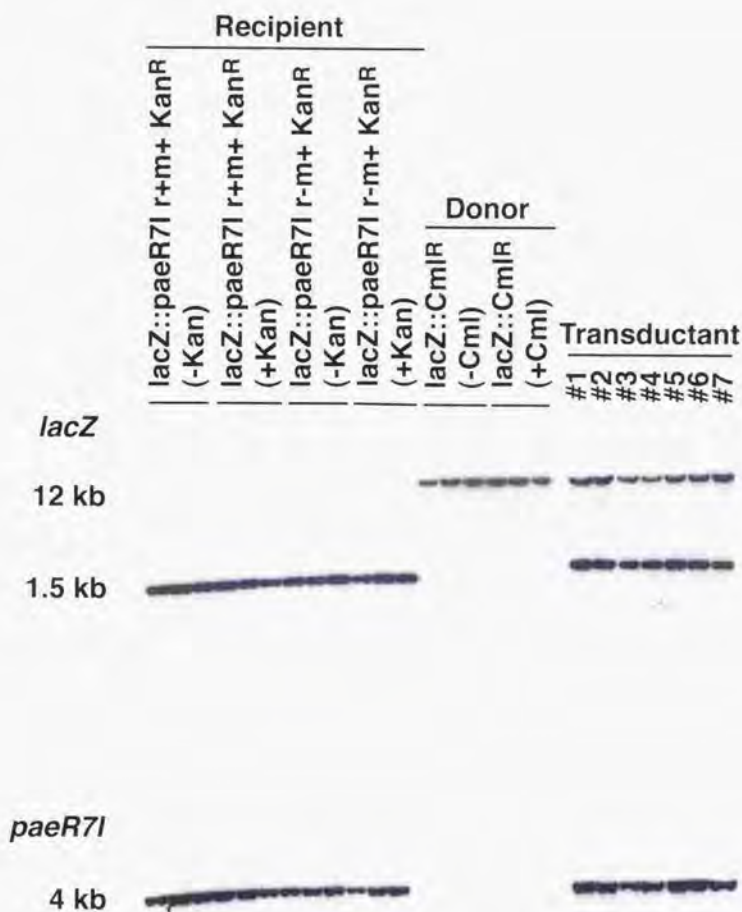


図 4 5 形質導入体にドナーとレシピエントマーカーが存在していること（部分 2 倍体であること）の証明
染色体 DNA は制限酵素 *EcoRV* で切断された。プローブとしては、*lacZ* 遺伝子の一部（上）、あるいは *PaeR7I* 制限修飾系（下）を用いた（図 4 4）。

7-4. 制限修飾系を失った後の大規模なゲノムの再編

次に私は、制限修飾系を挿入した *lacZ* 遺伝子領域の両側に存在する順向きの繰り返し配列 IS3 が、図 4 3 に示すような不等交叉に関与したと考え、IS3 を切断しない制限酵素 *EcoRV* でドナー、レシピエント、*lacZ* 領域の重複をもつ形質導入体の染色体を切断し、IS3 配列をプローブにサザン解析を行った（図 4 6）。

図 4 6 を見れば分かるように、調べたすべての形質導入体で、ドナー、レシピエントと IS3 のサザン解析によるバンドパターンが異なっていた。このことは、ここで起きた染色体の再編（重複）に IS3 が関与していることを強く示唆する。ドナー、レシピエントでは、MG1655 株のゲノム配列から予想される通りの 5 本のバンドが観察できた。形質導入体のバンドパターンは 3 つのグループ（グループ 1 : クローン # 1、2、3、6 と 7、グループ 2 : クローン # 4、グループ 3 : クローン # 5）に分けられた。IS3 配列の 1 点を便宜上の組換え点として定め、大腸菌染色体に存在する 5 カ所の IS3 でそれぞれ組み換えたときのバンドパターンの予想サイズから、リアレンジしたバンドサイズを正確に推測することができた。このことから、染色体上に制限修飾系をもつ大腸菌から、制限修飾系を置き換えようとしたときに起きた染色体の大規模な再編が明らかになった（図 4 7）。

それぞれの形質導入体では、数回の IS3-IS3 間での相同組換え（不等交叉）イベントが起きていたことが分かった。IS3 配列の便宜上定めた点によって、それぞれの IS3 を 2 つに分けて名前をつけた（例えば、大腸菌ゲノム上（Blattner のマップ位置）で最初に現れる IS3 は IS3A と IS3B からなる、とした）。解析した 7 つのクローンすべてで起こっていたことは、逆向きの IS3AB と IS3HG との間の相同組換えによる大きな「逆位」と、それによって生じた IS3HB とそれと順向きの IS3EF との間の相同組換えによる「重

複」であった。IS3HB と IS3EF の間には、制限修飾系を挿入された lacZ 遺伝子領域があるので、この IS3HB と IS3EF 間の相同組換えによる重複が、図 4 3 のモデルで示した問題の重複であった。

解析した 7 クローンのうち 5 クローンは、この 2 回の相同組換え反応が起きていたが、残りの 2 つのクローンでは、さらにもう一回逆向きの IS3 間(クローン # 5 では IS3EB と IS3DC 間、クローン # 4 では IS3EB と IS3AG 間)で、独立に逆位が起きていた(図 4 7)。

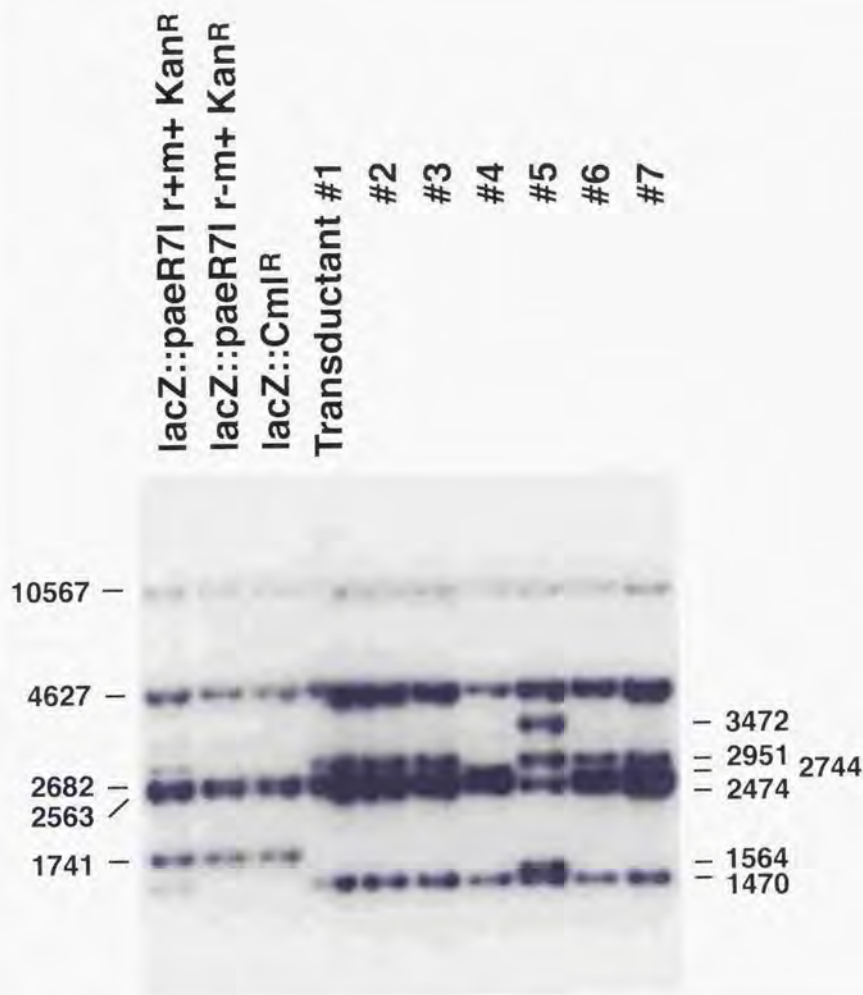


図 4 6 ゲノム再編には、繰り返し配列であるIS3が関与していた

染色体DNAは制限酵素EcoRVで切断された。PCR（プライマー：5' TCAACCAGTAAAAA CCCCCG と 5' TAATTAAACACCGTTGCCCG）で増幅されたIS3配列をプローブとしたときのバンドパターンの変化。それぞれのバンドサイズの値は、Blattnerの解析結果（Blattner et al. 1997）による。

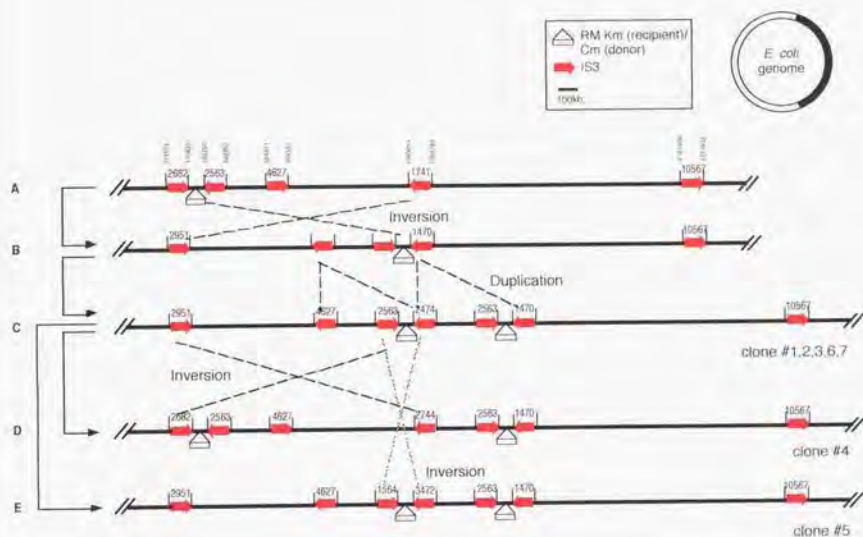


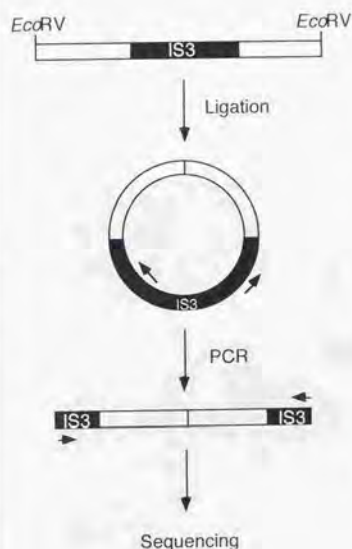
図 4-7 ゲノム再編の過程

染色体上の離れた IS3 間での不等交叉によって大規模な逆位と重複が数回にわたって起きていた。IS3 を示す矢印の数字は、EcoRV 切断によって観察されるバンドの大きさ。

さらに私は、IS3 配列をプローブとしたサザン解析から予想した図 4 7 の染色体再編の過程が正しいかを検証するために、再編によってできた新しい IS3 を含む DNA 断片（図 4 6 のクローン # 5 の 1564 bp の *EcoRV* 断片）をアガロースゲルから回収し、インバース PCR 法（図 4 8 A）によって、その IS3 の両端に続く DNA 配列を決定した。その結果、不等交叉によって予想通りの再編が起きていたことを証明した（図 4 8 B）。

染色体中に制限修飾系をもつ大腸菌から、それを置き換えによって失われたときに、染色体レベルの大規模な再編が起きることは、ドナー、レシビエント双方のマーカーをもつ形質導入体をパルスフィールドゲル電気泳動で解析することによっても観察できた。制限修飾系 *XbaI* で切断したときのバンドパターンを図 4 9 に示す。このとき、形質導入体で新しく観察されるようになったバンドのいくつかは、IS3-IS3 間での相同組換えによって説明できたが、いくつかは説明できなかった。実際、IS5 をプローブに図 4 6 で示したようなサザン解析をしたときに、一部の形質導入体で少なくとも 1 つのバンドパターンが変化していた（データは示していない）。これについてはこれ以上の解析をしていない。パルスフィールドゲル電気泳動による解析は、*NotI*、あるいは *rrn* 領域を特異的に切断することが知られる *I-CeuI* でも行った（データは示していない）。*NotI* 切断によっては、*XbaI* 切断同様、形質導入体でイレギュラーな巨大なバンドが多く観察できたが、*I-CeuI* 切断では、ドナー、レシビエントのバンドパターンと違いが見られなかった。その理由は、*I-CeuI* が切断する *rrn* 領域では、再編が起きていないためと考えられた。

A.



B.

IS3(B)

CGTGTGGCGGCTCATCCGGACAAATTGAAAACAAGAA
 CCTCGCTTAGGCTGTGTCCATATACGTGGTAGGAT
 CATAAAGTCCTCGGGTCGTGTGCCACTCTTTTGGCATG
 TCAGCATATTCACATACCGTACCAGCAAAAGTTTCAAC
 OGTGAGCAAATCGACCGATTTTGTTGACGGTTCAAACG
 TGGAAACGAAATGCAATATCGAACACACCAGATACTACG
 TTACCGGTATGGTCAGCGATGTTGCCGCTGGTCAGTTC
 CAGTTTGTTCAGTACGGAAAGCTTCAGTATCGAATGAT
 CAACGTTACATCCAATACACCGCGTTAGTTACGGTIG
 ATAGTATTGGCGTACAGGTTGTAATCTGATCTTAACCA
 GCAATAGTGGACACCGCGCTAAGTGAGTAAACTCTCAG
 TCAGAGGTGACTCACATGACAAAAACAGTATCAACCA
 IS3(D)

図 4 8 IS3-IS3 間での不等交叉の証明

(A) インバース PCR のデザイン 図 4 6 に示した形質導入体(クローン#5)の再編によってできた IS3 を含む *EcoRV* 断片を回収し、自己結合させた。PCR プライマーは、IS3 から外側に向かってデザインした。(B) 配列 赤: IS3 配列。緑と青: IS3 の両端に存在した配列。自己結合させた *EcoRV* サイトを囲んで示した。

lacZ::PaeR7 r+m+
lacZ::CmI

Transductants

(kb)

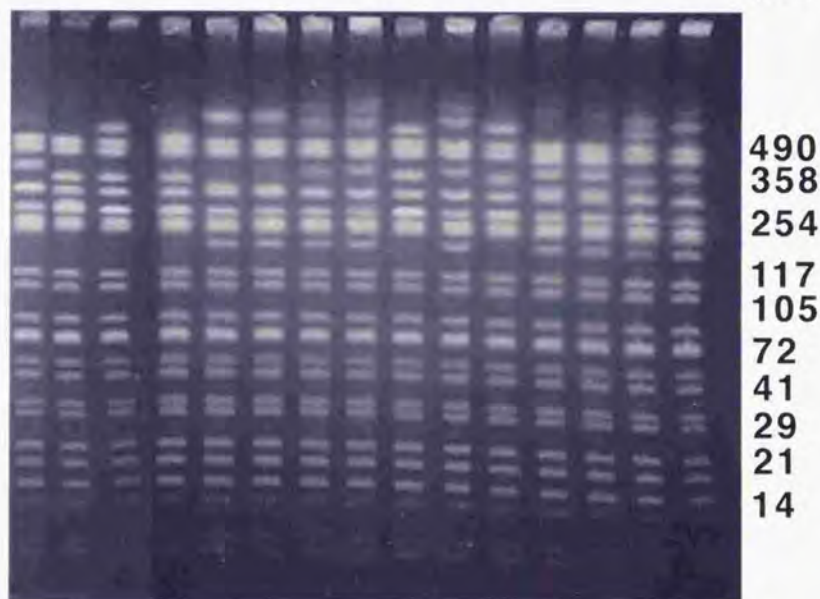


図 4 9 パルスフィールドゲル電気泳動による大規模な染色体再編の観察
染色体 DNA は制限酵素 *Xba*I で切断した。

考察

私は、大腸菌で中心的な組換え経路である RecBCD 経路の RecBCD 酵素の変異によって認識する配列がカイ配列から、カイ様の配列に変化することを発見した（結果の1章）。これは単に「相同組換え酵素と相同組換えを促進する配列」という関係だけではなく、「DNA 分解酵素とその活性を抑制する配列」という関係でもある。このような関係は、細菌の世界で保存されていて、DNA 分解酵素とそれが認識する分解を抑える配列は、細菌の種ごとに多様化していた。その DNA 分解酵素の分解を抑える配列はその細菌ゲノム中には高頻度に現れる（GenBank; 表8と表9）ので、自分がコードする DNA 分解酵素によって自分の染色体は分解されにくく、またもし分解している DNA が自分自身であっても相同組換えで修復することができるのである。

表8に、これまでにいくつかの細菌から同定されているカイ様配列の、いろいろな細菌ゲノム中での存在頻度を示した。カイ様配列は、そのゲノム特有のものであり、自身がコードする DNA 分解酵素に対する分解抑制配列が高頻度に存在するのに対して、他細菌のそれは、およそ予測される存在頻度通りに存在していることがわかる。また、それらの細菌に感染するバクテリオファージゲノムは、それが感染する宿主の DNA 分解抑制配列の頻度を増すようには進化していないので、ファージの感染防御にも機能すると考えられた（表9）。

細菌の世界に広く存在する制限修飾系は、多様な認識配列に特異化している。制限修飾系をもち、そのメチル化酵素によって修飾された細菌ゲノムと、それに侵入する DNA とを修飾によって区別し、侵入 DNA を制限酵素が切断することで「自己」と「非自

己」の区別をする。制限修飾系が認識する配列の多様性が、自己と非自己を区別する鍵となるので、その配列にはバリエーションがあることが重要である。私は、制限修飾系を失うと宿主細菌が細胞死を起こすことを個々の細菌細胞の観察によって証明し（結果の2章）、制限修飾系の認識配列が多様化する選択圧を証明した（結果の3章）。

前者の「DNA 分解酵素とその活性を抑制する配列」と後者の「制限酵素とそれが認識する配列」は、DNA を分解するのが、エクソヌクレアーゼとエンドヌクレアーゼという違いはあるが、それが認識する DNA 配列を巡って多様化しているという意味においてもよく似ていたのである（図50）。すなわち、細菌自身がコードする相同組換え初期反応機構は、「細菌の自己」を決定する機構であると考えられた。そう考えると、DNA 分解酵素遺伝子の突然変異によって、その働きを抑制する配列が変化したという私の発見は、細菌の種が多様化する瞬間をとらえたと考えられるのである。

表 8 細菌全ゲノム配列中のカイ様配列

[illegible]

全ゲノム配列が公表されている細菌ゲノムの一部でカイ様配列として同定されている配列と、その相補鎖配列を解析した。各セルの実数が、実際に存在する数。() 内は、各配列と各ゲノムのGC%から予想される存在確率上の数。

表9 バクテリオファージ全ゲノム配列中のカイ様配列

Bacterio phage	Size (bp)	host species	ChIEC		ChIH		ChII		ChIBs	
			5GCTGATGG	5'CCACGAGC	5GNTGATGG	5'CCACGAGC	5GCTGATGG	5'CCACGAGC	5'CCGCT	5'AGCGG
11	6407	Escherichia	1 (0.058)	0 (0.027)	5 (0.288)	0 (0.132)	0 (0.166)	0 (0.113)	7 (3.76)	2 (2.81)
			0 (0.043)		0 (0.043)	0 (0.037)				
1d	6408	Escherichia	1 (0.058)	0 (0.027)	3 (0.287)	0 (0.131)	0 (0.165)	0 (0.112)	5 (3.76)	2 (2.81)
			0 (0.042)		0 (0.042)	0 (0.037)				
G4	5577	Escherichia	1 (0.032)	0 (0.096)	0 (0.042)	0 (0.038)	0 (0.154)	1 (0.257)	5 (5.19)	2 (3.03)
			0 (0.031)		0 (0.031)	0 (0.024)				
lke	6883	Escherichia	0 (0.073)	0 (0.023)	1 (0.384)	0 (0.105)	1 (0.185)	0 (0.104)	5 (3.45)	1 (3.31)
			0 (0.053)		0 (0.053)	0 (0.027)				
λ	48502	Escherichia	0 (0.584)	0 (0.895)	4 (2.21)	8 (3.82)	2 (2.59)	3 (3.21)	50 (53.3)	54 (40.7)
			1 (0.503)		1 (0.503)	0 (1.04)				
MS2	3569	Escherichia	0 (0.066)	0 (0.062)	2 (0.557)	0 (0.920)	0 (0.272)	0 (0.253)	4 (4.06)	3 (3.82)
			0 (0.063)		0 (0.063)	0 (0.065)				
P4	11624	Escherichia	0 (0.165)	0 (0.175)	1 (0.570)	4 (0.705)	1 (0.864)	1 (0.685)	10 (10.6)	15 (11.4)
			0 (0.175)		0 (0.175)	1 (0.165)				
phiK	6069	Escherichia	0 (0.091)	0 (0.036)	0 (0.072)	0 (0.141)	0 (0.266)	0 (0.168)	9 (4.57)	1 (3.86)
			0 (0.072)		0 (0.072)	0 (0.046)				
φX174	5386	Escherichia	1 (0.077)	0 (0.033)	0 (0.057)	0 (0.141)	0 (0.228)	0 (0.148)	10 (3.87)	2 (3.49)
			0 (0.064)		0 (0.064)	0 (0.039)				
PRD1	14925	Escherichia	2 (0.243)	0 (0.150)	1 (0.059)	0 (0.043)	1 (0.830)	1 (0.652)	30 (10.9)	51 (15.0)
			0 (0.291)		0 (0.291)	0 (0.125)				
ST3	5386	Escherichia	1 (0.077)	0 (0.030)	0 (0.253)	0 (0.144)	0 (0.322)	0 (0.138)	9 (3.73)	3 (3.40)
			0 (0.266)		0 (0.266)	0 (0.139)				
HP1	32355	Haemophilus	0 (0.179)	0 (0.189)	1 (0.038)	0 (0.040)	1 (0.606)	0 (0.624)	25 (13.0)	41 (18.2)
			0 (0.179)		0 (0.179)	0 (0.140)				
F2A	19566	Bacillus	0 (0.145)	0 (0.072)	0 (0.214)	0 (0.157)	0 (0.403)	0 (0.284)	13 (6.38)	17 (12.0)
			0 (0.145)		0 (0.145)	0 (0.157)				
bIL87	22195	Lactococcus	0 (0.066)	0 (0.088)	1 (0.212)	0 (0.049)	0 (0.222)	0 (0.257)	9 (8.32)	5 (5.59)
			0 (0.066)		0 (0.066)	0 (0.102)				
c2	22172	Lactococcus	0 (0.097)	0 (0.065)	0 (0.063)	0 (0.092)	0 (0.276)	1 (0.225)	5 (6.49)	17 (8.88)
			0 (0.117)		0 (0.117)	0 (0.054)				
phig1e	42259	Lactococcus	0 (0.244)	3 (0.437)	0 (0.103)	0 (0.091)	1 (0.894)	0 (1.33)	47 (33.8)	32 (18.7)
			0 (0.102)		0 (0.102)	0 (0.085)				
skt	28451	Lactococcus	2 (0.090)	0 (0.072)	0 (0.210)	0 (0.508)	2 (0.359)	0 (0.232)	9 (8.01)	16 (8.48)
			0 (0.091)		0 (0.091)	0 (0.409)				
			0 (0.081)		0 (0.081)	0 (0.071)				

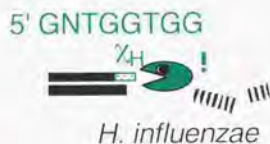
全ゲノム配列が公表されているバクテリオファージの一部でカイ様配列と、その相補鎖配列を解析した。
各セルの実数が、実際に存在する数。()内は、各配列と各ゲノムのGC%から予想される存在確率上の数。

A.



B.

グラム陰性菌



グラム陽性菌

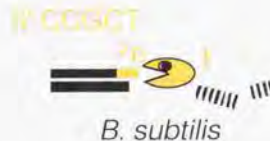
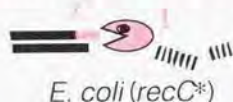
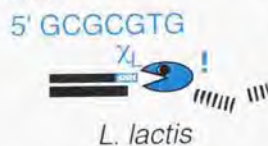


図50 細菌の「自己」と「非自己」を区別する仕組み

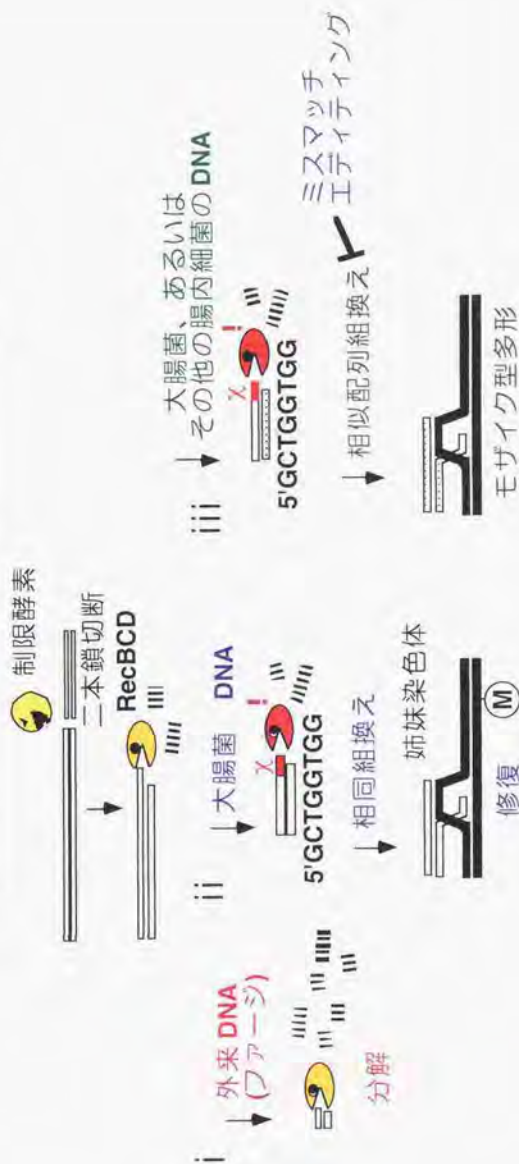
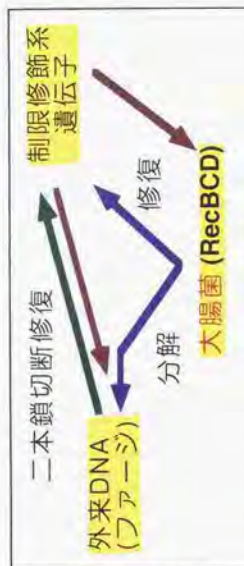
(A) 制限修飾系。利己的な振る舞いによりその認識配列が多様化している。(B) 相同組換えの初期反応(大腸菌の RecBCD 経路)。細菌種ごとに多様化している。

この DNA 二本鎖切断点からの DNA の分解にはじまる相同組換え初期反応は、制限酵素の働きと協調して、バクテリオファージなどの水平伝播する、細菌ゲノムとは独立して存在する遺伝単位の侵入を防ぐことが考えられる。実際に、制限修飾系遺伝子対を失った後の染色体二本鎖切断を、相同組換え機構が自身の DNA を選択的に、「カイ配列依存的に」修復した（結果の 4 章）。この結果は、「DNA 分解酵素とその活性を抑制する配列」の相互作用が制限修飾系と協調し、「自己」を修復し「非自己」を排除する機構であることを示唆した（図 5 1）。また別の実験から、バクテリオファージ特異的な二本鎖切断修復型の相同組換え機構が、ある種の制限の効果を抑えることを発見（結果の 5 章）し、この結果からも、細菌の相同組換え経路と制限修飾系が協調して他の利己的な遺伝単位を排除すると考えられた。

図 5 1（次頁） RecBCD 酵素 -- カイ配列相互作用の DNA 分解、修復機能による「自己」認識仮説

（囲みの中）細菌の世界には、3つの遺伝単位がある。制限修飾系は、それが入り込んでいる細胞に侵入してくるバクテリオファージの DNA ばかりではなく、宿主である細菌の染色体 DNA も切断する。バクテリオファージは、自身のコードする二本鎖切断修復機構によってそのゲノムを修復する。大腸菌では RecBCD 酵素が、まず二本鎖切断点から DNA に入り込んで、それを分解する。それがカイ配列をもたない「非自己」配列であれば最後まで分解してしまう (i) が、カイ配列をもつ DNA であれば (ii)、DNA 分解を止めて、相同組換えによって修復するのである。大腸菌の染色体上には、このカイ配列が高頻度で存在するので、途中まで削ってもそこで相同組換えに切り替え修復すると考えられる。

また、外来の DNA であってもそれが近縁の DNA でカイ配列をもつような場合には (iii)、やはり DNA 分解を止めて相同組換えによってそれを染色体中に取り込み、モザイク型の染色体多型を形成すると考えられる。



大腸菌をはじめとする細菌のゲノム構造は、水平伝播する遺伝子、あるいは、ゲノム中の繰り返し配列による不等交叉によって柔軟に変化することが示唆されている。それはすなわち、ゲノム配列を決めてもそれだけでは細菌の種を同定できないことを意味している。そこで、細菌の「自己」を何によって規定したらよいかという問題がもちあがる。細菌ゲノムの全塩基配列が続々と決定されている昨今、ポストゲノム研究を考える上でもこの問題は重要である。私は、この学位論文を通して、細菌の「自己」を相同組換え初期反応によって定義することを提唱する。またこれによって、相同組換え初期反応の奇妙さも説明できるのである。細菌ゲノムとは独立して存在するトランスポソンの転移 (Benjamin & Kleckner 1992; Hagemann & Craig 1993)、あるいは制限修飾系遺伝子対を失ったときに起きる染色体切断に対して、細菌の相同組換え機構は、その染色体を大規模に再編して生き残りをはかることを発見した (結果の7章)。染色体 DNA を修復するばかりではなく、このように、ゲノム構成を破壊してしまうことも、細菌の相同組換え機構の存在意義のひとつであった。

以下、もう少し詳しく個々の実験結果について考察したい。

相同組換えのホットスポットである χ 配列を認識できない RecBCD 変異株が認識する新しいカイ様配列

私は、カイ様の 11 bp のカистер配列 ($\chi^* = 5' \text{GCTGGTGCTCG}$) が、カイ配列を認識できない *recC1004* 変異株でラムダファージのブランクサイズを増大させることを見いだした。このカистер配列の存在によって、*recC**変異をもつ大腸菌でプラスミドの多量体形成が促進されることを観察した。プラスミドの多量体形成は、カистер配列による RecC*1004 酵素のもつ DNA 分解活性の抑制によると考えられる (Myers et al. 1995; Kowalczykowski et al. 1994; Dixon & Kowalczykowski 1993; Dabert et al. 1992; Kuzminov et al. 1994; Zaman & Boles 1994)。また、野生型 (*rec*⁺) 酵素にもこのカистер配列は部分的に認識されていた。

この現象は、RecBCD*酵素とカистер配列の相互作用によるものと考えられる。最近私と、カリフォルニア大学の Kowalczykowski 博士らのグループとの共同研究によって in vitro でもこの現象を確認できた (Arnold、半田、小林、Kowalczykowski 投稿中)。このとき、野生型の RecBCD⁺酵素は、カイ配列と相互作用するばかりでなく、カистер配列とも相互作用することを観察できた。しかし、RecBCD*変異酵素では本来のカイ配列との相互作用は観察されなかった。RecBCD 酵素の変異は、それがもつ活性のどの機能に影響があるかによって分類されている。これらの変異遺伝子の配列解析はほとんどされていないが、突然変異点を決めることによって、この酵素の機能ドメインをある程度予測できると考えられる。

χ^* -RecBCD*の相互作用は、 χ^+ -RecBCD⁺の相互作用と同じくらいの効率で、RecBCD 酵素のもつ二本鎖 DNA 分解活性を抑制した (結果の 1-5 章)。 *recC**変異株に

おいては、 χ^0 でもいくらか、プラスミドの多量体形成が見られたので、 χ^0 との相対的な多量体形成を比較すると、野生型のコンビネーションには及ばないかもしれない。このプラスミドのアッセイによる二本鎖 DNA 分解活性の抑制の結果は、 χ^* -RecBCD⁺の相互作用でのラムダファージの増殖の促進の結果ともよく一致していた。

ラムダファージでの相同組換えの実験系では、 χ^* -RecBC*D の相互作用では、野生型 (χ -RecBCD⁺) の相互作用のような促進は見られなかった。つまり、私の発見したカイスター配列は、RecBC*D 酵素との相互作用で、野生型の相互作用がもつ、RecBCD 酵素の二本鎖 DNA 分解酵素の分解を抑える機能と、相同組換えを促進する機能のうち、前者の機能しか観察できなかった。これは、 χ -RecBCD 酵素の相互作用による 2 つの機能をはじめて分離したものと考えている。このことから、 χ -RecBCD 酵素の相互作用による相同組換えの促進には、RecBCD 酵素のもつ二本鎖 DNA 分解活性を抑えるだけでは不十分であることを示唆している。

この χ -RecBCD の相互作用と、 χ^* -RecBC*D の相互作用の違いは何によるのだろうか？それは、その酵素の χ 配列と χ^* 配列に対する親和性の違いで説明できるのだろうか？ラムダファージの相同組換えの実験系に比べて、プラスミドの多量体形成の実験系の感度が良かったのだろうか？それとも、 χ -RecBCD の相互作用というよりも、RecBCD 酵素の活性の変化 --- 例えば DNA 分解の鎖特異性の変化やサブユニット構成の変化、あるいは RecA タンパク質のような、他の相同組換えに関与するタンパク質との相互作用に異常があるのかもしれない (Anderson & Kowalczykowski 1997; Dixon et al. 1994; Dixon & Kowalczykowski 1995; Koppen et al. 1995; Myers et al. 1995; Rinken & Wackernagel 1992; Thaler et al. 1989)。

これらの疑問に答えるには *in vitro*、あるいは *in vivo* での更なる解析が必要である。しかし、細菌の種を自身のもつ DNA 分解酵素から守る「カイ配列」で定義するなら、この発見は種分化の途中経過とも考えることができるのである。

制限修飾系の振る舞い

私は、私たちの研究室で発見した II 型の制限修飾系によるプラスミドの安定化と、共存できないプラスミドによる置き換えに対する抵抗 (Naito et al. 1995) 現象の解析をさらに発展させ、制限修飾系を失った後の大腸菌細胞の形態変化の解析と、制限修飾系の多様化の選択圧の証明を行った (結果の 2, 3 章)。

制限修飾系をもつプラスミドの喪失後、多くの細胞が伸長し、また染色体を失っていた。染色体を失った細胞が現れること、増殖の阻害が観察され、生菌数が低下すること、これらの細胞が実際に死んでいることを示している。生きている細胞の中で、制限修飾系をもつプラスミドが安定に維持されるのも、この細胞死のためと考えられる。すなわち、他の遺伝子系で報告されていた「分離後宿主殺し」機構 (Jaffe et al. 1985; Gerdes et al. 1986; Jensen & Gerdes 1995) が制限修飾系にもあてはまることが強く支持された。

私の実験系では、制限修飾系を複製が温度感受性であるプラスミドに接続しているので、温度シフトによってプラスミドの複製が止まると、プラスミドを受け取らない娘細胞が現れると考えられる。しかし、そのような細胞であっても、分裂前にあった制限修飾系遺伝子対の遺伝子産物である制限酵素と修飾酵素は、細胞質とともに受け継がれる。この娘細胞がさらに分裂するか、これらの酵素の分解によって、修飾酵素は細胞の新規に複製された染色体のすべての認識配列をメチル化しきれなくなると考えられる。このター

ゲット配列が、同じく希釈・分解されているが残されていた制限酵素によって切断されると細胞が死ぬと考えられる。両鎖ともメチル化された染色体のメチル化が完全にはずれる（制限酵素のターゲットとなる）には、複製フォークが通り、片方の鎖だけがメチル化された（ヘミメチル化）状態にさらにもう一回複製フォークが通過する必要がある。そのため、温度シフトから細胞死が観察され始めるまでには時間差があると考えられる。

このような過程で細胞死が進行すると考えられるので、制限修飾系を失った細胞が死ぬか生き残るかは、細胞側の修復機構やその他の二本鎖切断に対応する細胞機構の影響を受けると考えられる（後述）。この実験で、細胞の伸長や染色体の断片化が観察されたことから予想されたように、SOS 応答も関与していた（後述）。相同組換えが複製フォークに生じる DNA 二本鎖切断を修復することが提唱されている（Cox 1998）し、組換え修復が DNA 二本鎖切断を修復する証拠がある（Smith 1998）。特に大腸菌の RecE 経路が活性化している細胞では、制限酵素で切断されたプラスミド DNA が効率よく修復されていた（Takahashi et al. 1997）。

制限修飾系が認識する配列の多様化

制限修飾系遺伝子対は、現在までに多数、多種のものが知られている。1つの細菌種中から、1つの細菌株からも多種類の制限修飾系が見つかっている（REBASE、小林 1999）。複数の制限修飾系が1つの細胞の中で、細胞に対して安定維持を強制するには、それらが互いに異なる認識配列をもつことが必要であった（結果の3章）。細菌の世界では、多くの制限修飾系があるので、ある制限修飾系が（例えば接合プラスミドに接続されて）新しい細胞に侵入するとき、すでに別の制限修飾系が存在する場合には、それらが互いに異な

る配列を認識するものでないと、どちらかが細胞から失われてしまうだろう。また、同じ認識配列をもつ場合でも、その認識の強さ、すなわち特異性の高い方が、それを失ったときに細胞死を仕組むのに都合がよいと考えられる。つまり、個々の制限修飾系は、この認識配列をめぐる競争ゆえに、その認識配列を巡って多様化し、また高い配列特異性を獲得してきたと考えられるのである。

同じ認識配列をもつ2つの制限修飾系が細胞に対して安定化を強制できないのには、同じ配列を認識するメチル化酵素遺伝子の存在で十分であった。細菌ゲノム、バクテリアファージゲノム、あるいはプラスミドには、制限酵素遺伝子パートナーのない「オーファンメチル化酵素」も存在する。それらは、制限修飾系の侵入に対して「ワクチン」として振る舞うことが予想される (Barbeyron et al. 1984)。実際、当研究室のメンバーと私は、*EcoRII* による分離後細胞死による宿主細菌への安定維持強制が、同じ 5' CCWGG を認識するオーファンメチル化酵素 *Dcm* によって阻害されることを示した (内藤ら 1999)。

同じ論理から、制限修飾遺伝子には、配列認識の特異性が緩くなる淘汰圧が存在すると考えられる。例えば、5' CCW (W = A あるいは T) GG を認識する制限修飾遺伝子と 5' CCN (N = A, T, G, C のどれか) GG を認識する制限修飾遺伝子がともに存在する細胞を考える。前者の喪失による分離後細胞死は、後者によって抑えられる。しかし、後者の喪失による細胞死は、前者によっては抑えられない。競争において、5' CCNGG を認識するほうが勝つことになる。これらの予想は、当研究室のメンバーと私との実験によって確かめられた (知念ら 1999)。

この配列認識の緩い方への淘汰の圧力にバランスする圧力は何だろうか？一つの

候補は、相互排除である。制限修飾遺伝子が細胞に侵入するときには、制限酵素の発現を遅らせる制御機構がはたらく。既に、細胞の中にある制限修飾遺伝子のこの制御機構が働いて、侵入する制限修飾遺伝子にいきなり制限酵素を発現させて染色体切断を起こさせて、宿主細胞を殺させることが私たちの研究室で発見された (Nakayama & Kobayashi 1998)。これは、ライバル遺伝単位の侵入に対する自殺型防御のもう一つの例であり、「相互排除」「アポトーシス型相互排除」と名付けられた。この制御機構が働けば、より配列認識が緩くなるように変異した制限修飾遺伝子が親の制限修飾遺伝子のいる細胞に侵入できないだろう。この可能性は検討中である。

制限修飾系による細胞死に対する宿主の応答

制限修飾系は、それを失った細胞の染色体を切断し、細胞死を引き起こすことで自己の維持を細胞に強制していた。染色体二本鎖切断は死に至る損傷なので、細胞側もこれに対する修復機構をもっている。細菌の相同組換え機構が、どう制限修飾系の振る舞いに抵抗して、制限修飾系による染色体二本鎖切断を修復し、生き残ろうとするのかを知るために、相同組換えに重要な遺伝子を欠損させてその影響を調べた。その結果分かったことは以下の通りである。すなわち、1) *recBC* 変異によって切断された染色体が蓄積し、細胞死が顕著になった。2) *recC**、*recA*、*ruvAB*、*ruvC*、*recG*、*recN*、あるいは *lexA* 変異によっても細胞死が顕著になった。3) このとき *RecBC* 依存的に *SOS* 応答が誘導された。4) *RecF* 相同組換え経路の遺伝子の欠損によっても細胞死が顕著になった。

recBC、*recA*、*recG*、*ruvAB*、*ruvC* 遺伝子は、大腸菌の相同組換えの中心的機構である *RecBCD* 経路に含まれる遺伝子である (Kowalczykowski et al. 1994; Lloyd & Low

1996)。ここから導かれることは、細菌の相同組換え機構がII型の制限修飾系によって仕組まれた染色体切断を修復する、制限修飾系の振る舞いに抵抗するということである。制限修飾系による細胞死は、その遺伝子対を失った後に複製フォークが進行し、非メチル化ターゲット配列が現れることが必要であると考えられる。複製フォークが通過した後の二本鎖切断は、RecBCD 酵素の入り口になると考えられている (Horiuchi et al. 1994) し、またその修復には、一方 (ヘミメチル化 DNA 鎖) が組換え修復の相手になると考えられる。しかし、相同組換えによる細胞死への抵抗、染色体の修復も完全なわけではなく、相同組換え機構が完全なとき (野生型細胞) でも細胞死は観察された。

この経路では、RecBCD 酵素が DNA 上のカイ配列を認識して相同組換えを促進することが *in vivo* と *in vitro* の解析から明らかにされていた (Smith 1998)。ここで用いた *recC**変異株は、そのカイ配列を認識できない RecBCD 変異の1つである (Schultz et al. 1983)。この変異酵素は、カイ配列認識以外の知られている RecBCD 酵素の活性については、野生型と違いはなかった (Schultz et al. 1983)。それにも関わらずこの株で野生株より顕著な細胞死が観察されたことから、染色体上の二本鎖切断の修復には、カイ配列の認識が重要であると考えられた。この結果は、他のカイ配列認識変異である *recC2145*、*recB2154*、あるいは *recB2155* 変異株でも同様に観察できた (結果 4-8 章)。

recD 遺伝子の完全欠失によっても、カイ配列の認識はできなくなるが、このとき制限修飾系による細胞死にはほとんど影響がなかった (結果の 4-8 章)。この変異株は、ハイパーレック (相同組換え活性が亢進してる) 表現形を示すことが知られているので、この結果は、カイ配列が認識できないというよりも、カイ配列非依存的に相同組換えによる修復がなされるためと考えられる。

recN 変異株は、紫外線には感受性を示さないが、X 線に対して感受性を示すことが知られている。X 線に感受性を示すということは、この株が二本鎖切断修復に欠損があると考えられる。またこの遺伝子は SOS 応答によって誘導されることが知られている (Picksley et al. 1984; Rostas et al. 1987)。RecN 遺伝子産物が、制限修飾系による細胞死に要求されるという観察 (結果の 4-7 章) は、制限修飾系を失った後の致死的な損傷が、染色体二本鎖切断であるという仮説と一致する。

ruvAB、*ruvC*、あるいは *recG* 変異株は、DNA に損傷を与える試薬、処理に対して感受性を示し (Lloyd et al. 1984)、相同組換えにも欠損がある。RuvA 遺伝子産物と RuvB 遺伝子産物は一緒に、RecG 遺伝子産物は単独で組み換え中間体のホリデー構造を移動させ (Lloyd & Sharples 1993; West 1997)、RuvC 遺伝子産物は、この構造を切断して相同組換えを完了させる (West 1997)。制限修飾系を失った後の細胞死がこれらの遺伝子の欠損株で顕著であることから、これらの遺伝子産物が、他の可能性 (Seigneur et al. 1998) を排除していないが、制限酵素による切断からはじまる組換え修復の後期の過程に機能していると考えられる。

制限修飾系を失った後の細胞死は、*recBC* 欠損株で顕著に観察されたが、それは *sbcA* 変異によって部分的に抑制された (結果の 4-7 章)。この変異によって大腸菌に溶原化している *Rac* ファージがコードする別の相同組換え機構である、RecE 経路が活性化される。バクテリオファージがコードする RecE、あるいは Red 組換え経路は、II 型の制限酵素による DNA 二本鎖切断を修復することができる (Silberstein et al. 1995; Kobayashi & Takahashi 1988; Takahashi & Kobayashi 1990; Kusano et al. 1994b; Takahashi et al. 1997) ので、この抑制変異によって欠損変異の影響が抑制されるというのは考えやすい。

ただしここでは、Rac ファージがコードする組換え機能以外の遺伝子の効果の可能性を排除できていない (King & Murray 1995)。

制限修飾系を失った大腸菌細胞は、RecBC 遺伝子産物依存的に SOS 応答を誘導した。これはおそらく、制限酵素による二本鎖切断点から、RecBCD 酵素がそのヘリケース活性によって、SOS シグナルとなる一本鎖 DNA を生み出すためと考えられる (Chaudhury & Smith 1985; Sassanfar & Roberts 1990)。それ故、*recBC* 変異によって、制限修飾系による細胞死が顕著になるのは、相同組換えができないばかりでなく、SOS 応答ができないためでもあることが示唆された。しかし、*recBC* 変異の効果が、SOS 応答がないためだけではないことは、SOS 応答ができなくなる *lexA3* 変異 (Mount et al. 1972) によっては、制限修飾系による細胞死への影響が野生株よりは顕著であるが、*recBC* 変異株ほどは劇的ではないことから分かる。また、SOS 応答によって上に挙げた *ruvAB* や *recN* 遺伝子を含むいくつかの組換え遺伝子が誘導される (Rostas et al. 1987; West 1997) こと、あるいは、安定染色体複製 (stable chromosomal replication) が誘導される (Asai & et al. 1993) ことも、制限修飾系が仕組む細胞死から生き残るために重要なかもしれない。

sbcA 変異株、あるいは SOS 応答によって、I 型の制限が抑制されることが知られているが、ここで観察された *sbcA* 変異株での効果については、*EcoRI* のような II 型の制限においては、その効果が抑制されることは観察されていない (Thoms & Wackernagel 1982) ので、*sbcA* 変異による制限抑制によるものではないと考えられる。

また、*recF*、*recO*、あるいは *recR* 遺伝子の欠損によっても、制限修飾系による細胞死は顕著になった。この結果は、もうひとつの大腸菌の相同組換え経路である RecFOR

経路も制限修飾系の振る舞いに抵抗していることを示唆している。ここで用いた大腸菌は、RecBCD 経路に部分的に欠損をもっていた。その欠損とは、RecBCD 酵素のもつカイ配列認識ができないことであるが、それによって RecF 経路の関与を知ることができた。カイ配列認識変異は、それだけでも野生株よりも強い細胞死が観察された（結果の 4-7、4-8 章）。これらのバックグラウンドに、さらに *recF*、*recQ*、あるいは *recR* 遺伝子を欠損させることによって、さらに顕著な細胞死が観察できた。

これは相同組換えの機能によるものか、最近報告されているような止まった複製の再開の機能（Cox 1998; Courcelle et al. 1997; Kogoma 1997）によるのかは明らかではない。

RecBCD 酵素 -- カイ配列相互作用による分解と修復機構による「自己」認識仮説
分解と修復という相反する機能をもつ RecBCD 酵素 -- カイ配列相互作用については、図 5-1 のように説明することができる。制限修飾系は、それが、侵入してくる DNA であろうと、宿主細菌の染色体であろうと、非メチル化認識サイトを切断する。RecBCD 酵素は二本鎖切断点から DNA に入り込んで、それを分解する。分解している DNA が侵入者ならこれが完全に分解されるであろう。RecBCD 酵素が「自己」の識別を可能にするカイ配列を認識すると、DNA 分解を止めて相同組換えによって修復するであろう。つまり、細菌の RecBCD 経路は、制限修飾系と共同で働いて侵入してくる DNA を破壊し、この同じ 2 つの機構だけでそれ自身の染色体を守るのである。

それ故、RecBCD 酵素 -- カイ配列の相互作用は、自己認識システムの 1 つと見なせるのである（Handa et al. 1997b; Handa et al. 1997a; Kobayashi 1998）。以前にも、

相同組換えと制限修飾系について、外来 DNA による侵入という同じ様な圧力の下で進化したことが提唱されていた (Price & Bickle 1986)。

いくつかの大腸菌以外の細菌にも、RecBCD 様の DNA 分解酵素とそれが認識し、その分解を抑える配列の相互作用というものがあることが分かってきている (Karoui et al. 1998; Sourice et al. 1998; Chedin et al. 1998)。細菌の染色体 DNA の一部が、他種の細菌中に侵入していくときに、それらが互いに同じカイ配列特異性をもっていたら、侵入してきた DNA は、相同組換えによってその染色体中に取り込まれてしまうだろう (図 5 1、Dabert & Smith 1997)。カイ配列が他種類の細菌で同一であると、ナチュラルコンピテンス能 (DNA を細菌細胞内に取り込む) をもつ細菌のグループ間での DNA のやりとりによって、ゲノム構造が破壊されてしまうと考えられるので、カイ配列を多様化して「自己」を維持する必要があったのではないか。

DNA を染色体に取り込むか否かの決定には、ミスマッチ認識の機構が関与する (Matic et al. 1996) が、これとは別のレベルで RecBCD 酵素 - カイ配列相互作用による相同組換え機構も、その決定に関与し、同種細菌由来の DNA を取込んで現在のような細菌種内のモザイク型の多型を生じたと考えられる (McKane & Milkman 1995; LeClerc et al. 1999; Smith et al. 1991)。

DNA 二本鎖切断修復型相同組換えによる制限の抑制

III 型の制限の効果が、大腸菌染色体中に溶原化した Rac ファージ、あるいはラムダファージがコードする相同組換え経路によって抑制された。バクテリオファージがコードするこれらの相同組換え機構は DNA 二本鎖切断を、相同な DNA との組換えによって修復でき

るが、私が発見したこの現象は、バクテリオファージの単一感染の条件で見いだされた。他の制限修飾系では観察されなかったことから、これが III 型特異的な切断様式によるものであり、おそらく感染させたバクテリオファージの複製が関与すると考えられるが、それについては今後の解析が必要である。

この現象には、*recA*⁺大腸菌では、*Rac* ファージがコードする *recE* と *recT* の両遺伝子が要求されたが、野生型 (*recA*⁺) では、*recT* 遺伝子は不要だった。このことは、III 型の制限酵素の活性抑制において、*RecT* タンパク質の機能を *RecA* タンパク質で交換できることを示していた。また、この実験系でも細菌のもつ相同組換え機構と、制限修飾系が協調して他の利己的な遺伝単位の侵入を防いでいた。

DNA 二本鎖切断修復モデルでは、二本鎖切断はそれと相同な DNA をコピーすることによって修復される。それ故、こうして修復された DNA には、しばしば遺伝子変換と交叉をとまなう。それによって、その二本鎖切断を生じさせた制限酵素の認識配列が失われるというのは、バクテリオファージが制限修飾系による攻撃に対抗、あるいは適応してきたことをうかがわせる。

バクテリオファージがこのような二本鎖切断修復に特異化した相同組換え機構をもつ理由は、図 5 2 のように考えている。ファージが感染する細菌には頻繁に制限修飾系が存在することが考えられ、そこで制限酵素によりファージゲノムが二本鎖切断を受けると考えられる。これをまったく同じゲノムを再構成するような修復機構で治すと、修復されたゲノムを持つ子孫ファージは、その周辺のクローン細菌に感染する際にも、あるいはその制限修飾系による修飾がはすれてしまえば、同じ制限修飾遺伝子にてあったときに同様の制限を受けることになる。しかし、バクテリオファージの持つ二本鎖切断型の相同組

換え機構は、切断点について遺伝子変換を伴うので、鋳型として、その細胞にすでに溶原化していたファージ、あるいは同時に感染した別のファージの DNA を選んでできた新生ファージゲノムは、この制限修飾系の認識配列を失う可能性がある。さらに、遺伝子変換に伴う交叉によって、制限修飾サイトについて多様な組み合わせが生じるだろう。そのうち、今の制限修飾系の組み合わせの環境の中で、もっとも生き残りやすいものがその頻度を増やすと考えられる。このバクテリオファージが別の細菌集団に感染すると、別の組み合わせの制限修飾系に出会い、また同じサイクルの繰り返しで、制限修飾系に抵抗しながらファージゲノムが適応、進化していくと考えられる。

また、単に相同組換えによって III 型の制限が抑制されたのではないことは、野生型と *recBC* 欠損株での III 型の制限の効果を比較したときに、後者（組換え機能欠損）の方が、その働きが抑制されたことから明らかである（結果の 5-1 章）。これは、細菌のもつ相同組換え機構は、バクテリオファージがもつ相同組換え機構とは反対に、III 型制限を強めるように機能することを示している。すなわち、RecBCD 経路では、III 型の制限酵素による切断点から RecBCD 酵素がファージ DNA を分解し、バクテリオファージの感染を防御したと考えられる。一方、*recBC* 欠損株では、RecBCD 酵素による切断されたファージゲノムの分解が起こらないために、ファージの組換え機構によって修復されるチャンスが増えたと考えられるのである。すなわち、この結果も細菌のもつ相同組換え機構と、制限修飾系が協調して他の利己的な遺伝単位の侵入を防ぐことを示していた（図 5 3）。

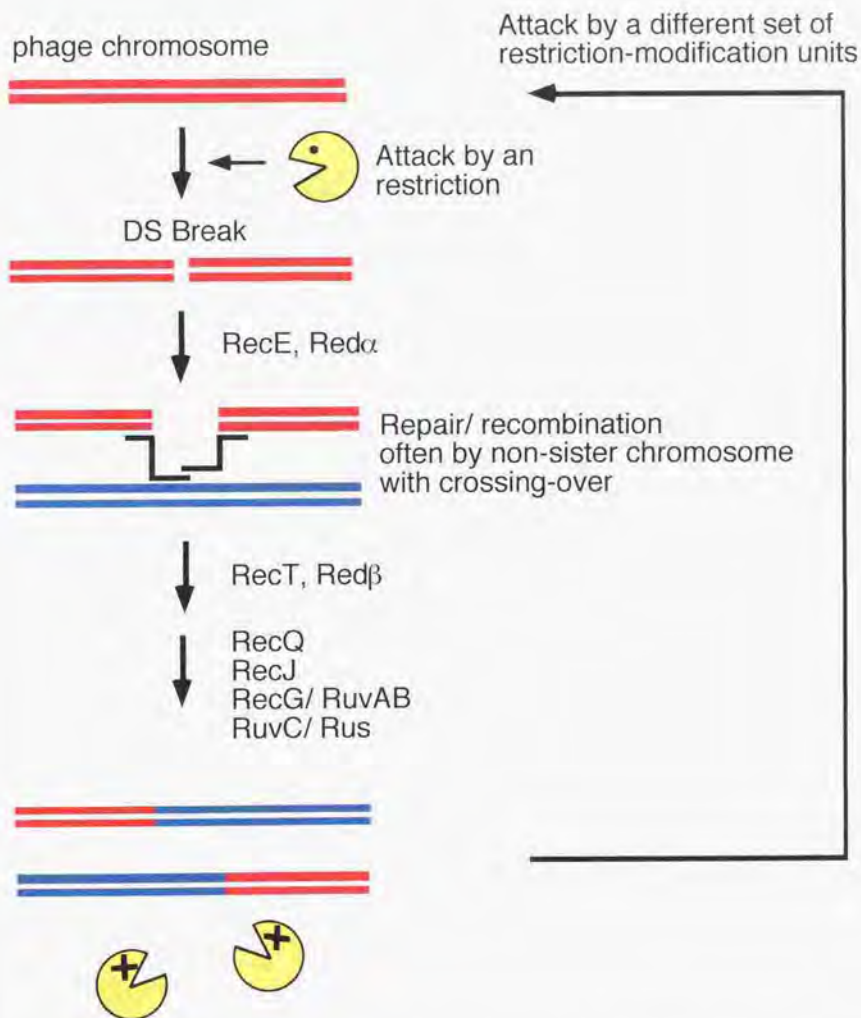
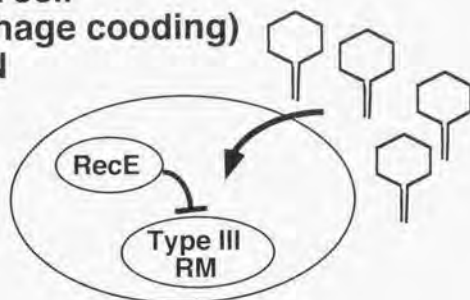
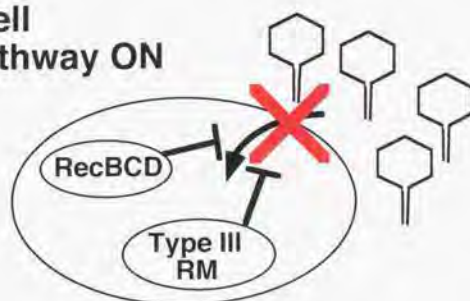


図 5 2 バクテリオファージが二本鎖切断修復型相同組換え機構をもつ意味
二本鎖切断修復によって生み出された新生ゲノムは、同じ制限酵素によって破壊されない。

recBC sbcA cell
 RecE (prophage coding)
 pathway ON



Wild type cell
 RecBCD pathway ON



recBC cell
 RecBCD pathway OFF

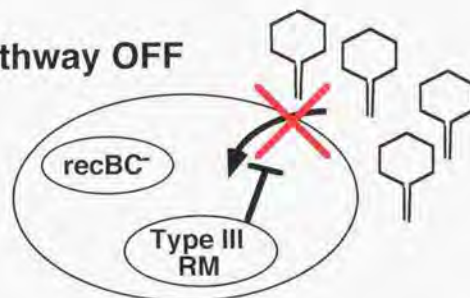


図 5 3 バクテリオファージの単一感染による III 型の制限酵素の活性が、大腸菌株によって異なる理由 (モデル)

プラスミド DNA 二本鎖切断修復と III 型制限の抑制の相違

recT 遺伝子は、*recA* 遺伝子とほとんどホモロジーはないが、その遺伝子産物は RecA タンパク質同様、*in vitro* で相同な一本鎖 DNA の対合を促進する (Hall et al. 1993; Noirot & Kolodner 1998)。以前、私たちの研究室で RecE 経路による DNA 二本鎖切断修復は、*recA*⁺ バックグラウンドであっても、*recE* と *recT* 遺伝子産物に依存していることを報告した (Kusano et al 1994b)。つまり、そのプラスミドの系では、RecT タンパク質は RecA タンパク質と交換できなかった。*recBC sbcA* 株の紫外線による DNA 損傷の修復には、RecT タンパク質よりも RecA タンパク質の方が重要である (データは示していない)。このバックグラウンドで *recE* 遺伝子の欠損によって紫外線感受性が上昇する。すなわち、紫外線による DNA 損傷の修復には、RecE タンパク質と RecA タンパク質の組み合わせの方が、RecE タンパク質と RecT タンパク質の組み合わせよりも重要であることを示唆している。

さらに、プラスミドの系では DNA 二本鎖切断修復を、*Rac* ファージの RecE 経路と同じくらい高効率で行った、ラムダファージの Red 相同組換え経路では、III 型制限酵素の活性を部分的にしか抑制しなかった (結果の 5-6 章)。このプラスミドでの DNA 二本鎖切断修復の実験系での結果と III 型制限酵素の活性抑制の実験結果の相違は、これら 2 つの現象が少し異なる機構によることを示唆しているのかもしれない。III 型の制限の抑制は、DNA 二本鎖切断修復機構よりも、紫外線照射後の DNA 修復機構に近い機構によって行われているのかもしれない。RecF 経路が、III 型の制限に影響するかは、興味ある問題である。III 型の制限酵素による切断と、他の制限酵素による切断の違いを説明するには、更なる解析が必要である。III 型の制限サイトの数を操作できるプラスミドのトランスフォーメーション、あるいは小型の DNA ファージが解析に適しているかもしれない。

自然に生じる大腸菌染色体の二本鎖切断の解析

組換え機能欠損株において、制限修飾系遺伝子がなくても、自然にその染色体が切断されている様子をパルスフィールドゲル電気泳動によって観察した。このことは、相同組換えが実際に染色体切断を修復することを証明したものである。単細胞微生物の世界では、染色体上の二本鎖切断はその個体の死にもつながるイベントであるので、この実験系からも相同組換えが染色体切断に対抗する手段であることが示された。

recBC sbcA 株では、*recJ* 変異によって、多くの切断された染色体が観察されたが、それは *recQ* 変異によって抑制された。このことは、*recJ* 変異の効果が *recQ* 変異によって抑制されるという、*recBC sbcA* 株におけるプラスミドでの二本鎖切断修復の解析 (Kusano et al. 1994a) を支持する。また、*recBC sbcBC* バックグラウンド同様、*recBC sbcA* 株で *recF* と *recO* 遺伝子の変異によって壊れた染色体が観察されたが、このバックグラウンド (RecE 経路) での RecF 経路の遺伝子産物の働きは不明である。

この自然に生じる大腸菌染色体の二本鎖切断の解析において、どの組換え経路のバックグラウンドでも相同組換え中間体形成以後その解離までの過程に必要な、組換え後期に働く遺伝子の欠損では壊れた染色体の蓄積は観察されなかった。また反対に、壊れた染色体を蓄積させる *recBC* 欠損株に、さらにそれらの組換え後期遺伝子の欠損を合わせると、その蓄積が抑制された (データは示していない, Seigneur et al. 1998)。このことは、組換えの後期に働くと考えられてきたこれらの遺伝子産物が、組換えの初期過程、とくに DNA に二本鎖切断を導入するステップに関与していることを示唆した。

制限修飾系が引き起こす染色体再編

II 型の制限修飾系は、プラスミド上ばかりではなくて、染色体上にも多数見つかっている (Roberts & Macelis 1999; 小林 1999)。染色体上の制限修飾系も、それを相応な DNA による置き換えによって失わせるようとしたときに、その置き換えに対して抵抗し、その遺伝子対を失った細胞を殺した (結果の 7 章)。つまり、制限修飾系による分離後宿主殺し戦略による自己の安定化は、それがプラスミド上にあるときばかりではなくて、染色体上に存在する場合でも同様に観察されたのである。これによって導かれる「制限修飾系が利己的な遺伝子である」という仮説は、II 型の制限修飾系に関する謎のいくつかを説明する (Alm & et al. 1999; Kobayashi 1996; Kobayashi 1998; Kobayashi 1999; Kusano et al. 1995; Nakayama & Kobayashi 1998; Rocha et al. 1998)。

これについての私の発見を要約すると以下ようになる。すなわち、1) 染色体上の制限修飾系を、それと相応な DNA で置き換えようするとそれに抵抗した。2) 置き換え体 (形質導入体) の多くで、置き換えたはずの制限修飾系が、置き換えるドナーのマーカールとともに残り、不安定な部分 2 倍体として振る舞っていた。3) これらの生き残りでは、(重複を含む) 大規模なゲノム再編が起きていた。4) そのゲノム再編には複数の IS3-IS3 間の不等交叉を伴っていた。

1) の発見は、私たちの研究室で以前報告した、制限修飾系をもつプラスミドをそれと共存できない別のプラスミドで追い出そうとすると、それに抵抗し、制限修飾系をもつプラスミドを失った細胞を殺すこと (Naito et al. 1995; Naito et al. 1998) によく似ていた。そのときも、共存できない導入プラスミドを選択したときのコロニーの数とサイズが減少しており、多くのものが制限修飾系をもつプラスミドを依然として含んでいた。つ

まり、プラスミドの安定化戦略として議論されてきた「分離後宿主殺し」という機構は、プラスミドに限ったことではなく遺伝単位が安定に維持されるための一般的な戦略であるといえる。この戦略は、制限修飾系をもつ細菌集団の一部の細胞に、細菌ゲノムとは独立した水平伝播する遺伝単位が、それと共存できないプラスミドにのって、あるいは相同な DNA にのって侵入して来たときに、分離後宿主殺しによって自殺することで近くにある自己のクローンを、その侵入者から守るのに役立つ(図2)。このような遺伝子は、遺伝学的な意味において「利己的な遺伝子」と呼ばれる(Hurst et al. 1996)。

細菌ゲノム中には、しばしば多くの制限修飾系が見つかる。例えば、2種のピロリ菌(*Helicobacter pylori*)の全塩基配列から、それぞれ50個弱の制限修飾遺伝子ホモログが同定されている(Tomb et al. 1997; Alm et al. 1999; REBASE; 信里ら 1999)。またインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)や淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)のゲノムにも多くの制限修飾系が見つかった(Fleischmann et al. 1995; Stein et al. 1995)。これらの細菌は自然に DNA を取り込む能力をもっているので、制限修飾系を含む DNA が水平伝播してくることが考えられる。私が実験で示したように、制限修飾系が染色体上に入り込んでいた場合、それを失うと死んでしまうので、維持され、その数が増えていったと考えられる。

制限修飾系をそれと相同な DNA で置き換える実験で、その頻度が細菌の組換え経路に依存していた。それは、その経路による相同組換え機構の特色を反映し、例えば、制限酵素による DNA 二本鎖切断修復に特異化した相同組換え機構である RecE 経路(Takahashi et al. 1992)は、制限修飾系を失った後の染色体切断を直ちに修復するために、あるいは、相同組換えが染色体切断によって促進されるために(Galitski & Roth 1997)、

その頻度の低下（細胞死）が少ないと考えられる。

制限修飾系の置き換えの実験で、IS3-IS3 間の不等交叉によってゲノムの再編が起きたものが選択的に生き残っていた（結果の 7-4 章）。ゲノムの再編は、制限修飾系遺伝子対の置き換え実験によって選択されたにすぎないのか？それとも、制限修飾系を失い、染色体に二本鎖切断が生じる過程で引き起こされたのだろうか？IS3 をプローブに行ったサザン解析の結果（図 4 6）で、制限修飾系をもつ（r⁺m⁺）とき特異的に、置き換えをしなくても、それを培養しているだけで、染色体再編を示すバンドが観察されていた。それは、形質導入体で見られた新しいバンドを含む。このことから、制限修飾系をもつと、それを培養している間に、そのゲノム構造は再編されて図 4 3 のような過程で制限修飾系を含む領域が重複したものができ、それを引き継いだ細胞が、置き換え実験でそのうちの一方がドナーによって置き換えられても、制限修飾系が 1 コピー残ることから、選択的に生き残ったと考えられる。

また、何故生き残りに必要な重複だけではなく、大きな逆位を必ずともなっていたのだろうか？IS3 の転移によって再編が起きることも考えられるかもしれないが、その頻度はここで観察したイベントに比べて桁違いに低い（Sekine et al 1999; Sekine et al. 1994）ので、それでは説明できない。制限修飾系遺伝子対の中には、逆位を起こすインベルターゼの遺伝子と密接にリンクしているものがいくつかある（REBASE）。制限修飾系の働きには、逆位との何らかの関係があるのかもしれないが、私が実験で使った大腸菌株には知られているインベルターゼの遺伝子はなかった。この問題とあわせて考えたいのは、何故 IS3 を、再編を引き起こす不等交叉に使ったのかということである。実は制限修飾系を挿入した *lacZ* 遺伝子領域の両側には、重複を起こし得る順向きの繰り返し配列として

は、より互いの距離が近い IS5 がある。しかし、IS5 をプローブとしたサザン解析の結果、得られた形質導入体で起きていた染色体再編を IS5 による不等交叉では説明できなかった（データは示していない）。IS5 も IS3 もともに、2 kb 弱からなる繰り返し配列であるが、実は染色体中のそれぞれの配列間のホモロジーが若干異なるのである。大腸菌染色体中の IS5 のホモロジーは、90%前後であるが、染色体中に 5 カ所しか存在しない IS3 のホモロジーは 100%である。近くにあるホモロジーの低い IS5 よりも、遠くてもホモロジーの高い IS3 を使っていることも、相同組換えがこの染色体再編を引き起こしたという解釈と一致する。図 4 7 に示したように、私が解析したすべての再編に 1 つの IS3 の部分 (IS3H) が含まれていた。この近くに二本鎖切断によって活性化される複製依存的なカイ配列が存在する可能性 (Kobayashi et al. 1982; Stahl et al. 1983a; Stahl et al. 1983b) や、近接して複数のカイ配列が存在することによって相同組換え活性が高い可能性 (Handa et al. 1997b) があるが、またこの部分が、染色体全体の中でも特に相同組換え活性の高い、複製終結点 (Ter サイト) と近いことが重要であるかもしれない (Nishitani et al. 1993; Louarn et al. 1991; Louarn et al. 1994)。この位置に制限修飾系を近づけることが重要であったために、解析したクローンのすべてでここを含む大きな逆位が起きていたのかもしれない。

この現象が、制限修飾系の制限酵素が染色体を切断したことによるためのものであって、制限修飾系のメチル化酵素による、メチル化 DNA 特異的な切断 (大腸菌染色体上の *mcr*、あるいは *mrr* 遺伝子産物による (Heitman & Model 1987; Raleigh & Wilson 1986)) だけによるものではないことも、図 4 6 の IS3 をプローブとしたサザン解析で制限酵素があるとき特異的に (r'm*)、培養しているだけで再編を示す新しいバンドが出現ことから明らかである。

まとめ

以上、大腸菌の相同組換えの初期反応 --- 組換えのホットスポットであるカイ配列と組換え酵素の相互作用の研究から、大腸菌のメジャーな組換え機構の奇妙な振る舞いを、細菌ゲノムとは独立した遺伝単位である制限修飾系遺伝子の解析を通して考えてきた。

制限修飾系遺伝子はもともと細菌ゲノムには要らないのに、宿主に入り込んで「中毒状態」を作り出し、それなしではゲノムが禁断症状によって死んでしまうということがわかった。染色体にある制限修飾系遺伝子を取り除こうとしたところ、抵抗がおこり、部分重複を含む大規模なゲノム再編 --- ゲノム進化が起きた。

結論としては、細菌ゲノムは常に寄生者の脅威にさらされているので、細菌の相同組換えという機構は、「寄生者である侵入 DNA が自己マーカー配列であるカイ配列を持っていれば、「自己」として取り込むが、そうでなければ分解する機構」、すなわち水平伝播する遺伝子によって流動的なゲノムの中で、「非自己」を排除しながら「自己」を維持する機構であると考えられた。それは、制限修飾系をはじめとする細菌染色体に二本鎖切断を導入する利己的な遺伝子の振る舞いに抵抗するが、ときには、細菌細胞に入り込んだ制限修飾系遺伝子対と協調して、別の利己的な遺伝単位を排除する。その際にはカイ配列の認識が重要である。染色体 DNA には、自然にも二本鎖切断を生じ、その修復にも相同組換え機構は重要である。寄生者であるファージも独自の相同組換え経路をもっており、それは宿主に感染し、同じ寄生遺伝子である制限修飾系に対しても自己の頻度を増加させるのに適したものであった。

細菌のゲノムというものは、寄生遺伝子、あるいは水平伝搬してきた遺伝子との競争を反映して今も柔軟に変化していた。ゲノムが細菌種を決めるのではなく、相同組換

え機構が細菌の「自己」を決めているというのが私の提案である。

引用文献

- Alm, R. A., Ling, L. S., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., DeJonge, B. L., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., Jiang, Q., Taylor, D. E., Vovis, G. F. & Trust, T. J. (1999) *Nature* 397, 176-180.
- Alonso, J. C. & Luder, G. (1991) *Biochimie* 73, 277-280.
- Amundsen, S. K., Taylor, A. F., Chaudhury, A. M. & Smith, G. R. (1990) *Genetics* 126, 25-40.
- Anderson, D. G. & Kowalczykowski, S. C. (1997) *Genes & Dev.* 11, 571-581.
- Anderson, P. E., Matsunaga, J., Simons, E. L. & Simons, R. W. (1996) *Biochimie* 78, 1025-1034.
- Arnold, D. A., Bianco, P. R. & Kowalczykowski, S. C. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 16476-16486.
- Asai, T., Bates, D. B. & Kogoma, T. (1994) *Cell* 78, 1051-1061.
- Asai, T., Sommer, S., Bailone, A. & Kogoma, T. (1993) *EMBO J.* 12, 3287-3295.
- Bachmann, B. J. (1987) In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology.* eds Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (American Society for Microbiology, Washington, D.C.), pp. 1190-1219.
- Barbeyron, T., Kean, K. & Forterre, P. (1984) *J. Bacteriol.* 160, 586-590.
- Benjamin, H. W. & Kleckner, N. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4648-4652.
- Betlach, M., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H. M. & Boyer, H. W. (1976) *Fed. Proc.* 35, 2037-2043.
- Bianco, P. R. & Kowalczykowski, S. C. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, pp. 6706-6711.
- Bickle, T. A. & Kruger, D. H. (1993) *Microbiol. Rev.* 57, 434-450.
- Biswas, I., Maguin, E., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2244-2248.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-

- Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997) *Science* 277, 1453-1474.
- Bochner, B. R., Huang, H. C., Schieven, G. L. & Ames, B. N. (1980) *J. Bacteriol.* 143, 926-933.
- Bolotin, A. P., Mauger, S., Malarne, K., Ehrlich, S. D. & Sorokin, A. V. (1999) *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 27-76.
- Boubrik, F. & Rouviere-Yaniv, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3958-3962.
- Brammar, W. J., N. E. Murray, and S. Winton. (1974) *J. Mol. Biol.* 90, 633-647.
- Burland, V., Plunkett III, G., Daniels, D. L. & Blattner, F. R. (1993) *Genomics* 16, 551-561.
- Capaldo-Kimball, F. & Barbour, S. D. (1971) *J. Bacteriol.* 106, 204-212.
- Casadaban, M. J., Chou, J. & Cohen, S. N. (1980) *J. Bacteriol.* 143, 971-980.
- Chakraverty, R. K. & Hickson, I. D. (1999) *BioEssays* 21, 286-294.
- Chaudhury, A. M. & Smith, G. R. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 201, 525-528.
- Chedin, F., Noirot, P., Biaudet, V. & Ehrlich, S. D. (1998) *Mol. Microbiol.* 29: 1369-1377.
- Cheng, K. C. & Smith, G. R. (1984) *J. Mol. Biol.* 180, 371-377.
- Cheng, K. C. & Smith, G. R. (1987) *J. Mol. Biol.* 194, 747-750.
- Chilley, P. M. & Wilkins, B. M. (1995) *Microbiology* 141, 2157-2164.
- Clark, A. J., Sharma, V., Brenowitz, S., Chu, C. C., Sandler, S., Satin, L., Templin, A., Berger, I. & Cohen, A. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 7673-7682.
- Connelly, J. C., Kirkham, L. A. & Leach, D. R. F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7969-7974.
- Courcelle, J., Carswell-Crumpton, C. & Hanawalt, P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3714-3719.
- Court, D. & Oppenheim, A. B. (1983) In *Lambda II*, eds Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W. & Weisberg, R. A. (New York: Cold Spring Harbor Press), pp. 251-277.
- Cox, M. M. (1998) *Genes Cells* 3, 65-78.
- Csonka, L. N. & Clark, A. J. (1979) *Genetics* 93, 321-343.
- Dabert, P. & Smith, G. R. (1997) *Genetics* 145, 877-889.
- Dabert, P., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12073-12077.

- De Backer, O. & Colson, C. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 1321-1327.
- Dharmalingam, K. & Goldberg, E. B. (1976) *Nature* 260, 406-410.
- Dixon, D. A. & Kowalczykowski, S. C. (1991) *Cell* 66, 361-371.
- Dixon, D. A. & Kowalczykowski, S. C. (1993) *Cell* 73, 87-96.
- Dixon, D. A. & Kowalczykowski, S. C. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 16360-16370.
- Dixon, D. A., J. J. Churchill, and S. C. Kowalczykowski. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2980-2984.
- Duttreix, M., Moreau, P. L., Bailone, A., Galibert, F., Battista, J. R., Walker, G. C. & Devoret, R. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 2415-2423.
- Efimova, E. P., Delver, E. P. & Belogurov, A. A. (1998) *Mol. Gen. Genet.* 214, 313-316.
- Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T.-Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocchi, S., Proytcheva, M. & German, J. (1995) *Cell* 83, 655-666.
- Eggleston, A. K. & Kowalczykowski, S. C. (1993a) *J. Mol. Biol.* 231, 605-620.
- Eggleston, A. K. & Kowalczykowski, S. C. (1993b) *J. Mol. Biol.* 231, 621-633.
- Eggleston, A. K. & West, S. C. (1997) *Current Biol.* 7, R745-R749.
- El Karoui, M., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 626-631.
- Fernandez, S., Kobayashi, Y., Ogasawara, N. & Alonso, J. C. (1999) *Mol. Gen. Genet.* 261, 567-573.
- Fetherston, J. D., Schuetze, P. & Perry, R. D. (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 2693-2704.
- Fishel, R. & Kolodner, R. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 3046-3052.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedbolm, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L., Fuhrmann, J. L., Geoghagen, N. S. M., Gnehm, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. O. & Venter, J. C. (1995) *Science* 269, 496-512.
- Galitski, T. & Roth, J. R. (1997) *Genetics* 146, 751-767.
- Game, J. C., K. C. Sitney, V. E. Cook & R. K. Mortimer. (1989) *Genetics* 123, 695-713.

- Gerdes, K., Rasmussen, P. B. & Molin, S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3116-3120.
- Gerdes, K., Ayora, S., Canosa, I., Ceglowski, P., Diaz, R., Franch, T., Gulyaev, A. P., Jensen, R. B., Kobayashi, I., Macpherson, C., Summers, D., Thomas, C. & Zielenkiewicz, U. (In press) in *Plasmid maintenance systems*. In *Plasmid Biology*. ed. Thomas, C. M. (Harwood Academic Publishers, Amsterdam).
- Gibson, F. P., Leach, D. R. F. & Lloyd, R. G. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 1222-1228.
- Gillen, J. R., Willis, D. K. & Clark, A. J. (1981) *J. Bacteriol.* 145, 521-532.
- Gingeras, T. R. & Brooks, J. E. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 402-406.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4645-4649.
- Hadi, S. M., Bachi, B., Iida, S. & Bickle, T. A. (1983) *J. Mol. Biol.* 165, 19-34.
- Hagemann, A. T. & Craig, N. L. (1993) *Genetics* 133, 9-16.
- Handa, N., Ohashi, S., Kusano, K. & Kobayashi, I. (1997a) *Genes Cells* 2, 525-536.
- Handa, N., Ohashi, S. & Kobayashi, I. (1997b) *Microb. Comp. Genomics* 2, 287-298.
- Hashimoto-Gotoh, T., Franklin, F.C.H., Nordheim, A. & Timmis, K.N. (1981) *Gene* 16, 227-235.
- Hattori, M., Yoshioka, K. & Sakaki, Y. (1992) *Electrophoresis* 13, 560-565.
- Heitman, J. & Model, P. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 3243-3250.
- Henderson, D. & Weil, J. (1975) *Genetics* 79, 143-174.
- Himmelreich, R., Plagens, H., Hilbert, H., Reiner, B. & Herrmann, R. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 701-712.
- Hiom, K. J. & Sedgwick, S. G. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 231, 265-275.
- Holbeck, S. L. & Smith, G. R. (1992) *Genetics* 132, 879-891.
- Horii, Z. & Clark, A. J. (1973) *J. Mol. Biol.* 80, 327-344.
- Horiuchi, T., Fujimura, Y., Nishitani, H., Kobayashi, T. & Hidaka, M. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 4656-4663.
- Huisman, O. & D'Ari, R. (1983) *J. Bacteriol.* 153, 169-175.
- Humbelin, M., Suri, B., Rao, D. N., Hornby, D. P., Eberle, H., Pripfl, T., Kenel, S. & Bickle, T. A. (1988) *J. Mol. Biol.* 200, 23-29.

- Hurst, L. D., Atlan, A. & Bengtsson, B.O. (1996) *Quart. Rev. Biol.* 71, 317-364.
- Ikeda, H., Inuzuka, M. & Tomizawa, J. (1970) *J. Mol. Biol.* 50, 457-470.
- Ishioka, K., Iwasaki, H. & Shinagawa, H. (1997) *Genes Genet Syst* 72, 91-99.
- Jaffe, A., Ogura, T. & Hiraga, S. (1985) *J. Bacteriol.* 163, 841-849.
- Jaffe, A. & D'Ari, R. (1985) *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 136A:159-64
- Jensen, R. B. & Gerdes, K. (1995) *Mol. Microbiol.* 17, 205-210.
- Karoui, M. E., Ehrlich, D. & Gruss, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 626-631.
- Kaszubska, W., Aiken, C., O'Connor, C. D. & Gumpert, R. I. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 10403-10425.
- Kato, T., Rothman, R. H. & Clark, A. J. (1977) *Genetics* 87, 1-18.
- Kauc, L. & Piekarowicz, A. (1978) *Eur. J. Biochem.* 92, 417-426.
- King, G. & Murray, N. E. (1995) *Mol. Microbiol.* 16, 769-777.
- Kitao, S., Lindor, N. M., Shiratori, M., Furuichi, Y. & Shimamoto, A. (1999) *Genomics* 61, 268-276.
- Kobayashi, I. (1992) *Adv. Biophysics* 28, 81-133.
- Kobayashi, I. (1996) in *Epigenetic mechanisms of gene expression*, eds. Russo, V., Martienssen, R. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), pp. 155-172.
- Kobayashi, I. (1998) *Trends Genet.* 14, 368-374.
- Kobayashi, I. (1999) *Current Opinion in Genetics and Development.* 9, 649-656.
- Kobayashi, I., Murialdo, H., Craseman, J. M., Stahl, M. M. & Stahl, F. W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5981-5985.
- Kobayashi, I. & Takahashi, N. (1988) *Genetics* 119, 751-757.
- Kogoma, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3483-3484.
- Kolodner, R., Hall, S. & Luisi-DeLuca, C. (1994) *Mol. Microbiol.* 11, 23-30.
- Kopen, A., Krobisch, S., Thoms, B. & Wackemagel, W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6249-6253.
- Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D. & Rehauer, W. M. (1994) *Microbiol. Rev.* 58, 401-465.
- Kruger, D. H., Schroeder, C., Hansen, S. & Rosenthal, H. A. (1977) *Mol. Gen. Genet.* 153, 99-106.

- Kusano, K., Berres, M. K. & Engels, W. R. (1999) *Genetics* 151, 1027-1039.
- Kusano, K., Naito, T., Handa, N. & Kobayashi, I. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11095-11099.
- Kusano, K., Nakayama, K. & Nakayama, H. (1989) *J. Mol. Biol.* 209, 623-634.
- Kusano, K., Sunohara, Y., Takahashi, N., Yoshikura, H. & Kobayashi, I. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1173-1177.
- Kusano, K., Takahashi, N. K., Yoshikura, H. & Kobayashi, I. (1994b) *Gene* 138, 17-25.
- Kushner, S. R., Nagaishi, H., Templin, A. & Clark, A. J. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 824-827.
- Kuzminov, A. (1995) *Mol. Microbiol.* 16, 373-384.
- Kuzminov, A., Schabtach, E. & Stahl, F. W. (1994) *EMBO J.* 13, 2764-2776.
- Lam, S. T., Stahl, M. M., McMillin, K. D. & Stahl, F. W. (1974) *Genetics* 77, 425-433.
- Le Clerc, J. E., Li, B., Payne, W. L. & Cebula, T. A. (1999) *J. Bacteriol.* 181, 7614-7617.
- Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S. D. & Langella, P. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 5135-5139.
- Li, S. & Waters, R. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 3750-3756.
- Lloyd, R. G., Benson, F. E., Shurvinton, C. E. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 194, 303-309.
- Lloyd, R. G. & Buckman, C. (1985) *J. Bacteriol.* 164, 836-844.
- Lloyd, R. G., Buckman, C., Benson, F. E. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133, 2531-2538.
- Lloyd, R. G. & Buckman, C. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 1004-1011.
- Lloyd, R. G. & Low, B. (1996) In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed., Neidhardt (editor-in-chief). (American Society for Microbiology Washington, D. C.), pp. 2236-2255.
- Lloyd, R. G. & Sharples, G. J. (1993) *EMBO J.* 12, 17-22.
- Louarn, J., Cornet, F., Francois, V., Patte, J. & Louarn, J.-M. (1995) *J. Bacteriol.* 176, 7524-7531.
- Louarn, J.-M., Jouarn, J., Francis, V. & Patte, J. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 5097-5104.
- Lovett, S. T. & Clark, A. J. (1984) *J. Bacteriol.* 157, 190-196.
- Luisi-DeLuca, C., Clark, A. J. & Kolodner, R. D. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 5797-5805.
- Mahdi, A. A. & Lloyd, R. G. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 216, 503-510.
- Matic, I., Taddei, F. & Radman, M. (1996) *Trends Microbiol.* 4, 69-72.

- McKane, M. & Milkman, R. (1995) *Genetics* 139, 35-43.
- Mehr, I. J. & Seifert, H. S. (1998) *Mol. Microbiol.* 30, 697-710.
- Michel, B., Ehrlich, S.D. & Uezst, M. (1997) *EMBO J.* 16, 430-438.
- Miller, J. H. (1992) *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- Mizusawa, S. & Ward, D. F. (1982) *Gene* 20, 317-322.
- Mount, D. W., Low, K. B. & Edmiston, S. J. (1972) *J. Bacteriol.* 112, 886-893.
- Mural, R. J., Chesney, R. H., Vapnek, D., Kropf, M. M. & Scott, J. R. (1979) *Virology* 93, 387-397.
- Myers, R. S. & Stahl, F. W. (1994) *Annu. Rev. Genet.* 28, 49-70.
- Myers, R. S., Kuzminov, A. & Stahl, F. W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6244-6248.
- Naito, T., Kusano, K. & Kobayashi, I. (1995) *Science* 267, 897-899.
- Naito, Y., Naito, T. & Kobayashi, I. (1998) *Biol. Chem.* 379, 429-436.
- Nakayama, Y. & Kobayashi, I. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6442-6447.
- Nishitani, H., Hidaka, M. & Horiuchi, T. (1993) *Mol. Gen. Genet.* 240, 307-314.
- Noirot, P. & Kolodner, R. D. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12274-12280.
- Nordstrom, K. & Austin, S. J. (1989) *Annu. Rev. Genet.* 23, 37-69.
- Nordstrom, K. (1993) In *Plasmids: A Practical Approach*, ed. Hardy, K. G. (IRL Press, Oxford), Vol. pp. 1-38.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448.
- Picksley, S. M., Attfield, P. V. & Lloyd, R. G. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 195, 267-274.
- Powell, B., Peters, H. K. 3rd, Nakamura, Y. & Court, D. (1999) *J. Bacteriol.* 181, 5111-5113.
- Price, C. & Bickle, T. A. (1986) *Microbiol. Sci.* 3, 296-299.
- Qin, M. H., Madiraju, M. V. & Rajagopalan, M. (1999) *Gene* 233, 121-130.
- Raleigh, E. A. & Wilson, G. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9070-9074.
- Razavy, H., Szigety, S. K. & Rosenberg, S. M. (1996) *Genetics* 142, 333-339.
- Redaschi, N. & Bickle, T. A. (1996) In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. 2nd ed., Neidhardt (editor-in-chief). (American Society for

- Microbiology, Washington, D. C.), pp. 773-781.
- Rinken, R. & Wackemagel, W. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 1172-1178.
- Roberts, R. J. & Halford, S. E. (1993) In *Nucleases*, 2nd Edition, ed. Linn, S. M., Lloyd, R. S. & Roberts, R. J. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor), pp. 35-88.
- Roberts, R. J., and D. Macelis. (1999) *Nucleic Acids Res.* 27, 312-313.
- Rocha, E.P.C., Viari, A. & Danchin, A. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26, 2971-2980.
- Romero, D. & Palacios, R. (1997) *Annu. Rev. Genet.* 31, 91-111.
- Rostas, K., Morton, S. J., Picksley, S. M. & Lloyd, R. G. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 5041-5049.
- Saito, A., Iwasaki, H., Ariyoshi, M., Morikawa, K. & Shinagawa, H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7470-7474.
- Salaj-Smic, E., Marsic, N, Trgovcevic, Z & Lloyd, R. G. (1997) *J. Bacteriol.* 179, 1852-1856.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)
- Sandler, S. J. & Clark, A. J. (1993) *Genetics* 135, 643-654.
- Sassanfar, M. & Roberts, J. W. (1990) *J. Mol. Biol.* 212, 79-96.
- Schultz, D. W., Taylor, A. F. & Smith, G. R. (1983) *J. Bacteriol.* 155, 664-680.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S. D. & Michel, B. (1998) *Cell* 95, 419-430.
- Sekine, Y., Aihara, K. & Ohtsubo, E. (1999) *J. Mol. Biol.* 19, 21-34
- Sekine, Y., Eisaki, N. & Ohtsubo, E. (1994) *J. Mol. Biol.* 4, 1406-1420
- Shan, Q., Bork, J. M., Webb, B. L., Inman, R. B. & Cox, M. M. (1997) *J. Mol. Biol.* 265, 519-540.
- Silberstein, Z., Tzfati, Y. & Cohen, A. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 1692-1698.
- Simmon, V. F. & Lederberg, S. (1972) *J Bacteriol* 112, 161-169.
- Smith, G. R. (1994) *Experientia* 50, 234-241.
- Smith, G. R. (1998) In *DNA Damage and Repair-1998*. ed. Nickoloff, J. A. & Hoekstra, M. F. (Humana Press, Totowa, New Jersey), pp.135-162.
- Smith, G. R., Kunes, S. M., Schultz, D. W., Taylor, A. & Triman, K. L. (1981) *Cell* 24, 429-436.

- Smith, J. M., Dowson, C. G. & Spratt, B. G. (1991) *Nature* 349, 29-31.
- Snyder, L. (1995) *Mol. Microbiol.* 15, 415-420.
- Sonoda, E., Sasaki, M. S., Buerstedde, J. M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y. & Takeda, S. (1998) *EMBO J.* 17, 598-608.
- Sourice, S., Biauudet, V., El Karoui, M., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. (1998) *Mol. Microbiol.* 27, 1021-1029.
- Stahl, F. W. & Stahl, M. M. (1977) *Genetics* 86, 715-725.
- Stahl, M. M., Kobayashi, I., Stahl, F. W. & Huntington, S. K. (1983a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2310-2313.
- Stahl, F. W., Kobayashi, I. & Stahl, M. M. (1983b). In: *Mechanisms of DNA replication and recombination* ed. Cozzarelli, N. R. (New York), pp. 773-783.
- Stahl, F. W., Kobayashi, I., Thaler, D. & Stahl, M. M. (1986) *Genetics* 113, 215-227.
- Stein, D. C., Gunn, J. S. & Piekarowicz, A. (1998) *Biol. Chem.* 379, 575-578.
- Stein, D. C., Gunn, J. S., Radlinska, M. & Piekarowicz, A. (1995) *Gene* 157, 19-22.
- Stephenson, F. H., Ballard, B. T., Boyer, H. W., Rosenberg, J. M. & Greene, P. J. (1989) *Gene* 85, 1-13.
- Summers, D. K. & Sherratt, D. J. (1984) *Cell* 36, 1097-1103.
- Takahashi, K. N., Sakagami, K., Kusano, K., Yamamoto, K., Yoshikura, H. & Kobayashi, I. (1997) *Genetics* 146, 9-26.
- Takahashi, N. & Kobayashi, I. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2790-2794.
- Takahashi, N. K., Yamamoto, K., Kitamura, Y., Luo, S.-Q., Yoshikura, H. & Kobayashi, I. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5912-5916.
- Takahashi, N., Kusano, K., Yokochi, T., Kitamura, Y., Yoshikura, H. & Kobayashi, I. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 5176-5185.
- Taylor, A. F. & Smith, G. R. (1980) *Cell* 22, 447-457.
- Taylor, A. F., Schultz, D. W., Ponticelli, A. S. & Smith, G. R. (1985) *Cell* 41, 153-163.
- Thaler, D. S., Sampson, E., Siddiqi, I., Rosenberg, S. M., Thomason, L. C., Stahl, F. W. & Stahl, M. M. (1989) *Genome* 31, 53-67.
- Thomas, B. & Wackernagel, W. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 186, 111-117.
- Thomas, B. & Wackernagel, W. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 197, 297-303.

- Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Venter, J. C. et al. (1997) *Nature* 388, 539-547.
- Toothman, D. (1981) *J. Virol.* 38, 621-631.
- Tracy, R. B. & Kowalczykowski, S. C. (1996) *Genes & Dev.* 10, 1890-1903.
- Trautner, T. A. & Noyer-Weidner, M. (1993) In *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics*, ed. Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. & Losick, R. (American Society for Microbiology, Washington, D.C.)
- Umez, K. & Kolodner, R. D. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30005-30013.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982) *Gene* 19, 259-268.
- Webb, B. L., Cox, M. M. & Inman, R. B. (1997) *Cell* 91, 347-356.
- West, S. C. (1993) In *Nucleases*, 2nd Edition, eds Linn, S. M., Lloyd, R. S. & Roberts, R. J. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 145-169.
- West, S. C. (1997) *Annu. Rev. Genet.* 31, 213-244.
- Willets, N. S. & Clark, A. J. (1969) *J. Bacteriol.* 100, 231-239.
- Willis, D. K., Satin, L. H. & Clark, A. J. (1985) *J. Bacteriol.* 162, 1166-1172.
- Wilson, G. G. & Murray, N. E. (1991) *Annu. Rev. Genet.* 25, 585-627.
- Yamamoto, K., Yoshikura, H., Takahashi, N. & Kobayashi, I. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 212, 393-404.
- Yarmolinsky, M. (1995) *Science* 267, 836-837.
- Yarmolinsky, M. B. & Sternberg, N. (1988) In *The Bacteriophages*, vol. 1, ed. Calendar, R. (New York: Plenum press), pp. 291-438.
- Yu, C.-E., Oshima, J., Fu, Y.-Z., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., Mathews, S., Nakura, T., Miki, T., Ouais, S., Martin, G. M., Mulligan, J. & Schellenberg, G. D. (1996) *Science* 272, 258-262.
- Yu, Y.-T. & Snyder, L. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 802-806.
- Zagursky, R. J. & Berman, M. L. (1984) *Gene* 27, 183-191.
- Zaman, M. M. & Boles, T. C. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 5093-5100.

- Zuber, M., Hoover, T. A., Powell, B. S. & Court, D. L. (1994) *Mol. Microbiol.* 14, 291-300
- 大西真、田中千穂、久原哲、石井一夫、服部正平、黒川顕、安永照男、牧野耕三、品川日出夫、村田敬寛、中山恵介、寺脇良郎、林哲也 (1999) 第 22 回日本分子生物学会、1P-0001
- 小林一三 (1999) *細胞工学* 18: 1846-1857
- 高橋幹男、河原林裕、田中敏広、工藤裕、櫛田憲弘、青木健一、増田さやか、澤野寿彦、細山哲、小杉大樹、福井重広、小口晃央、永井芳美、高宮美奈子、菊池久 (1999) 第 22 回日本分子生物学会、1P-0006
- 内藤泰宏、半田直史、知念秋人、小林一三 (1999) 第 22 回日本分子生物学会、W4G-7
- 仲宗根薫、高見英人、益井宣明、高木善弘、佐々木るみえ、前野剛、崎山徳起、平間千恵、藤富美枝、堀越弘毅 (1999) 第 22 回日本分子生物学会、1P-0004
- 知念秋人、内藤泰宏、半田直史、小林一三 (1999) 第 22 回日本分子生物学会、2P-0322
- 信里綾香、内山郁夫、大橋青史、小林一三 (1999) 第 22 回日本分子生物学会、2P-0059

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おいて、小林一三助教授の指導のもとで行われたものです。実験結果の内の以下の部分については、同助教授の研究室の各氏と共同で行われたものであり、データを提供して下さった以下に示す方々に深く感謝いたします。カистер配列のスクリーニング（結果の1-2章）は、大橋青史氏によるものです（ラムダファージライブラリー中の挿入配列の長いものについては、一部私が解析した）。制限修飾系の多様化への選択圧の証明（結果の3-1章）は、草野好司氏と共同で行いました。いろいろな相同組換え変異株での制限修飾系による細胞死のプレートアッセイ（結果の4-7章）は、市毛朝雄氏と共同で行いました。また、染色体上の制限修飾系を、それと相同なDNAで置き換える実験（結果の7-1章）は、中山洋一氏によるものです。

材料のリストに挙げた、西村昭子、F. W. Stahl、小原雄治、山本健二、T. Kato、A. J. Clark、G. Smith、A. Taylor、S. Mizusawa、A. Miura、Y. Kitamura、T. Shiba、R. Lloyd、S. Lovett、岩崎博史、J. Rouviere-Yaniv、小林規子、加藤潤一、T. Gingeras、K. Mizobuchi、A. L. Dari、R. I. Gumport、A. Bailone、R. Devoret、A. Gruss、D. Ehrlich、J. R. Scott、T. A. Bickleの諸先生には、大腸菌株や、プラスミド、バクテリオファージ株を分与していただきました。

草野好司博士、市毛朝雄博士には、大腸菌の遺伝学を基礎から教えていただき、実験結果を理論的に解釈するトレーニングをしていただきました。小林規子博士、知念秋人氏は、この学位論文を書くにあたって、ためになるコメントをいただきました。カリフ

オルニエ大学の Steve Kowalczykowski 博士と Deana Arnold 博士には、1996年の夏に彼らの研究室に滞在して以来、本研究に助言をいただいています。同研究部の池田日出男教授、加藤潤一博士、内藤泰宏博士、小方康至博士をはじめとするメンバーの方々には、本研究について励まされ、ためになる助言をいただき大変感謝しています。中込弥男博士と中堀豊博士には、私自身の研究を続ける環境を整えていただきました。DNA 塩基配列解析には、東京大学医科学研究所のヒトゲノムセンターを利用させていただきましたことをここに感謝したいと思います。

本研究は、半田に対する日本科学協会からの研究費と日本学術振興会の特別研究員フェローシップ、小林への、文部省科学研究費（基盤研究 A、基盤研究 B、基盤研究 C、萌芽的研究、重点領域研究（組換え、修復、ゲノム）、国際学術研究）、NEDO の研究事業費、武田科学振興財団の研究助成、ヤクルト・バイオサイエンス研究財団の研究助成、長瀬科学技術振興財団の研究助成の研究費によって行われました。

2000年1月

