

ヌクレオチド除去修復による  
自然突然変異の誘発経路

沙魚川 公子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 原核生物分子遺伝学講座

(真木 寿治 教授)

平成20年1月28日提出

# 目次

<b>第 1 章 序論</b> .....	5-12
1 自然突然変異について	
2 ヌクレオチド除去修復について	
3 本研究の目的	
<b>第 2 章 材料と方法</b> .....	13-39
1 菌株	
2 プラスミド	
3 P1 ファージ	
4 試薬・酵素・培地	
5 プラスミド DNA の調製	
6 アガロースゲル電気泳動	
7 プラスミドによる形質転換法	
8 P1 ファージを用いた形質導入	
9 One-step gene disruption 法を用いた遺伝子破壊株の作製	
10 組換え DNA プラスミドの作製	
11 部位特異的変異導入法	
12 突然変異頻度測定	
13 突然変異スペクトラム解析	
14 UV による感受性試験	
15 SOS 応答の確認	

### 第3章 結果 .....40-77

- 1 自然突然変異の発生における NER の役割
  - a) 自然突然変異の発生における NER の働きは？
  - b) NER 欠損株における自然突然変異の発生頻度 (*rpoB*)
  - c) NER 欠損株における自然突然変異の発生頻度 (*rpsL*)
  - d) NER 過剰発現株における自然突然変異の発生頻度 (*rpoB*)
  - e) NER 過剰発現株における自然突然変異の発生頻度 (*rpsL*)
  - f) NER 過剰発現株における SOS 応答の確認
  - g) NER 過剰発現下で生じる SOS 応答に依存した突然変異の有無
  - h) NER 過剰発現による修復 DNA 合成への影響
  - i) NER 過剰発現による修復 DNA 合成への TLS ポリメラーゼの関与
- 2 NER によって生じる自然突然変異は修復 DNA 合成時の DNA pol I の複製エラーによって生じていた
  - a) DNA pol I の校正機能の欠損株において NER の欠損あるいは過剰発現を加えた場合の自然突然変異の発生頻度 (*rpoB*)
  - b) DNA pol I の校正機能の欠損株において NER の欠損を加えた場合の自然突然変異の発生頻度 (*rpsL*)

### 第4章 考察 .....78-84

- 1 自然突然変異における NER の関与
- 2 NER による自然突然変異の誘発経路
  - a) NER によって突然変異が固定される
  - b) NER の認識段階でのターゲットについて
- 3 NER の自然突然変異発生への寄与は
  - a) NER の制御について
  - b) 自然突然変異における NER の寄与

c) NER によって生じる自然突然変異と NER の存在意義

**第 5 章 付録 .....87-103**

1 各種スペクトラム解析による結果 (付録表)

2 NER 欠損株におけるリファンピシン感受性について

**謝辞..... 102**

**参考文献 .....103-108**

# 第1章 序論

## 1 自然突然変異の発生と抑制

自然突然変異とは、通常の生育環境下において、まれに生じる突然変異のことである。細胞内の DNA は常に安定性を求められるのと同時に、様々な要因により常に変化を受けている。その原因は、細胞内メカニズムにあるという考え方が一般的である (Von Borstel, 1969; Cox, 1976; Sargentini et al., 1985)。主要なものとしては、DNA 複製装置である DNA ポリメラーゼによる複製エラー (Bessman et al., 1974)、内在性の変異原による自然 DNA 損傷 (Ames and Gold, 1991; Friedberg et al., 1995)、そしてヌクレオチドプールの損傷 (Maki and Sekiguchi, 1992) などが挙げられる。自然突然変異は、長期的には進化の原動力という有益な側面をもつが、短期的にはガン、遺伝病、老化の原因になる。このため、遺伝情報である DNA を安定に保持するための、自然突然変異を抑制する機構が多数そなわっている。しかし、これらの抑制機構をすり抜けてしまうことがまれにあり、自然突然変異が生じる (図 1)。

自然突然変異の主な原因の一つとして挙げた、DNA ポリメラーゼによる複製エラーについては、校正機能を欠いた DNA ポリメラーゼのミスペア形成頻度が約  $10^{-4}$  であることが *in vitro* の実験系により、報告されている (Brenowitz et al., 1991)。しかしながら、細胞内において複製エラーが DNA 鎖上に固定される頻度は、ポリメラーゼ自体の校正機能とミスマッチ修復 (Mismatch repair; MMR) により、非常に低く抑えられている。*in vitro* において、大腸菌の DNA ポリメラーゼ III の複製エラーは、自身の校正機能により 99~99.9% が除去されること示唆されている (Brenowitz et al., 1991)。さらに、MMR に関与する遺伝子の変異株を用いた、遺伝学的解析から、MMR もまた 99~99.9% の精度でミスマッチ塩基の修復を行うと考えられている (Parker et al., 1992)。このことから、校正機能と MMR を合わせると、その修復効率は 99.999% となる。結果として、一回の細胞分裂で自然突然変異が生じる頻度は、 $10^{-9}$ ~ $10^{-10}$  という極めて低い頻度に抑えられていることになる。

同様に、内在性の変異原によって生じる自然 DNA 損傷や変異原性ヌクレオチドについても、多くの抑制機構が存在している。内在性の変異原のうち、自然突然変異、特に塩基置換の発生に大きく関与すると考えられているものが酸素ラジ

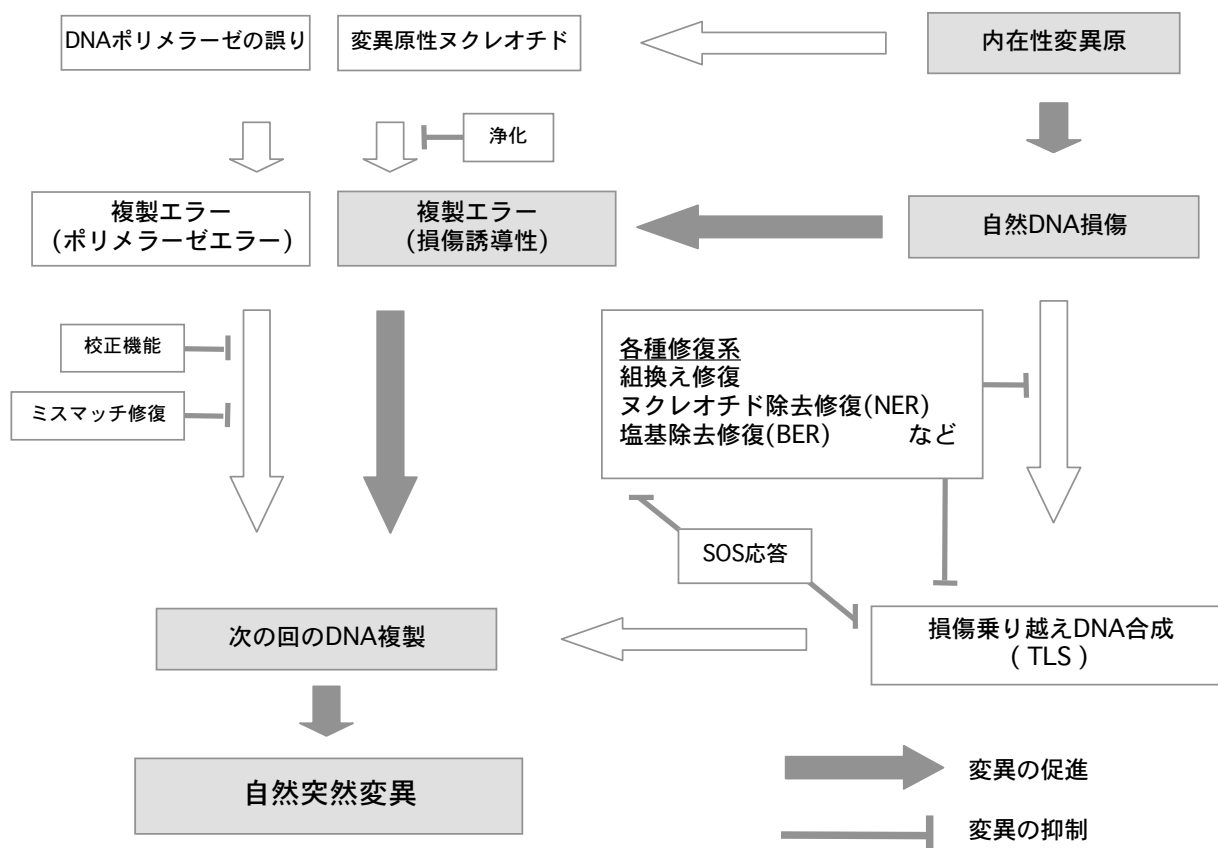


図1 自然突然変異の発生と抑制の分子機構

DNAポリメラーゼの誤り、変異原性ヌクレオチド、内在性の変異原のような自然突然変異を引き起こす原因から、前変異損傷が生じ、これが修正されずにDNA鎖上に固定されることで、自然突然変異が生じる。また、自然突然変異の発生を抑制する変異原の除去機構、DNA修復機構、修正機構が存在する。このような、自然突然変異の発生と抑制の分子機構の全体像を上記に示した。

カルである。このため、酸素ラジカルによる自然突然変異の抑制機構は、以下に挙げるように多数存在している。まず、酸素ラジカル自体の除去には、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼなどが働き (Imlay *et al.*, 2003)、酸素ラジカルによって生じた酸化塩基損傷の修復には、MutM、MutY タンパクなどの修復系のタンパクが働くと考えられている (Michaels *et al.*, 1992)。さらに、変異原性ヌクレオチドのを除去する機構としては、MutT の存在が知られている (Maki and Sekiguchi, 1992)。このように、酸化塩基損傷やこれに起因する自然突然変異を抑制するシステムが多数存在するにも関わらず、自然突然変異のスペクトラムと酸化塩基損傷に起因する突然変異のスペクトラムはよく似ており (Wu *et al.*, 1999)、これらの報告は、自然突然変異に対する酸素ラジカルの寄与が大きい可能性を示唆している。さらに本研究室における、有酸素、無酸素培養条件下での自然突然変異のスペクトラム解析の結果から、*rpsL* 標的遺伝子上で生じる点突然変異のうち、89%は酸素に依存することを示す直接的な結果を得ている (Sakai *et al.*, 2006)。主な自然 DNA 損傷としては、上記に挙げた MutM、MutY タンパクにより修復されるグアニンが酸化されて生じる 8-オキソグアニン (8-oxoG) の他に、シトシンが脱アミノ化されて生じたウラシルや、グアニンがメチル化されて生じる O<sup>6</sup>-メチルグアニンがある。それぞれ、特異的な修復系の存在が明らかになっている (Ames and Gold, 1991; Friedberg *et al.*, 1995; Duncan and Miller, 1980; Demple *et al.*, 1982; Sekiguti *et al.*, 1996)。

以上のような点から自然突然変異は、内在性の変異原に起因する自然 DNA 損傷、特に酸化塩基損傷が、DNA 鎖上に形成され、これを鋳型として DNA 複製がなされた場合に、次の回の DNA 複製を通じて生じる可能性が示唆されている。

また、自然 DNA 損傷が形成された DNA を鋳型とした場合に生じる複製エラーについて、複製型の DNA ポリメラーゼ (DNA pol I, DNA pol III) 以外の、損傷乗り越え DNA 合成 (Translesion DNA synthesis ; TLS) で働く、TLS ポリメラーゼが関与している可能性が考えられる。自然 DNA 損傷の中で、複製途中の DNA ポリメラーゼや転写途中の RNA ポリメラーゼの進行を妨げるようなものがあるとなれば、突然変異にいたる以前に、複製や転写の阻害により細胞死が生じる可能性がある。このため、複製や転写の阻害に備えて、様々な損傷を取り除くための DNA 修復機構が存在する。同時に、上記に述べた損傷を乗り越えて複製を続けることができる TLS ポリメラーゼもまた、ここで働いている可能性が考えられる。大腸菌では、TLS を行うとされている三つの DNA ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼ II (Pol B)、DNA ポリメラーゼ IV (DinB)、DNA ポリメラーゼ V (UmuDC) が存

在する。これらの DNA ポリメラーゼは、塩基対合の規則に沿わなくても、A、T、C、G のいずれかの塩基を挿入して、新生鎖を形成することができるが、誤った塩基を合成中の DNA 鎖に挿入する可能性も高くなる (Paz-Elizur *et al.*, 1997; Friedberg *et al.*, 1995)。

本研究室の研究において、TLS ポリメラーゼの三重欠損株を用いた解析が行われたが、野生株における自然突然変異の発生頻度と大きな違いは認められず、TLS ポリメラーゼが自然突然変異の発生に大きく寄与することを示す証拠は得られていない (蟹江ら、未発表)。TLS ポリメラーゼの欠損株で影響が認められない理由としては、二つ可能性が考えられている。その一つが、自然 DNA 損傷の多くは、TLS ポリメラーゼによって乗り越えられる以前に、速やかに修復されており、TLS によって生じる自然突然変異の影響は、極めて低いレベルに抑えられている可能性である。このことを明らかにするためには、TLS ポリメラーゼが働く以前に、DNA 損傷の除去に働くことが予想される DNA 修復機構と組み合わせた解析が必要になる。二つめの理由として考えられているのが、TLS ポリメラーゼにより生じる複製エラーは、MMR により効率よく修復されるために、自然突然変異の発生頻度に大きな影響を及ぼさない可能性である。このことに関しては、TLS と MMR の二重欠損株を用いた解析から、TLS ポリメラーゼによる複製エラーが MMR によって修復される以前の変異スペクトラムを解析することで、自然突然変異スペクトラムに TLS が関与している痕跡を確認しつつある (蟹江ら、未発表)。

## 2 ヌクレオチド除去修復について

ヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair ; NER) は DNA 鎖上に生じた損傷を取り除くことで、複製、転写の阻害や突然変異の生成を抑制する DNA 修復機構の一つである。また、大腸菌から酵母、ヒトまで高度に保存された重要な生物機能である (Sancar, 1996)。NER は、様々なタイプの DNA 損傷に対して働くとされているが、その中で比較的大きな損傷である、シクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) や(6-4)光産物(6-4PPs)のような紫外線損傷に対して、特に効率よく働くことが知られている。損傷自体の立体構造には共通性がなく、DNA 構造をゆがめる損傷の多くに働くことから、損傷によって生じた DNA 鎖上のゆがみを認識すると考えられている (Selby and Sancar, 1990; Sancar, 1996; Van Houten *et al.*, 2005)。さらに、損傷によって停止した RNA ポリメラーゼもまた、NER によって認識される (Sancar, 1996; Selby *et al.*, 1991)。NER の反応経路には、ゲノム全体



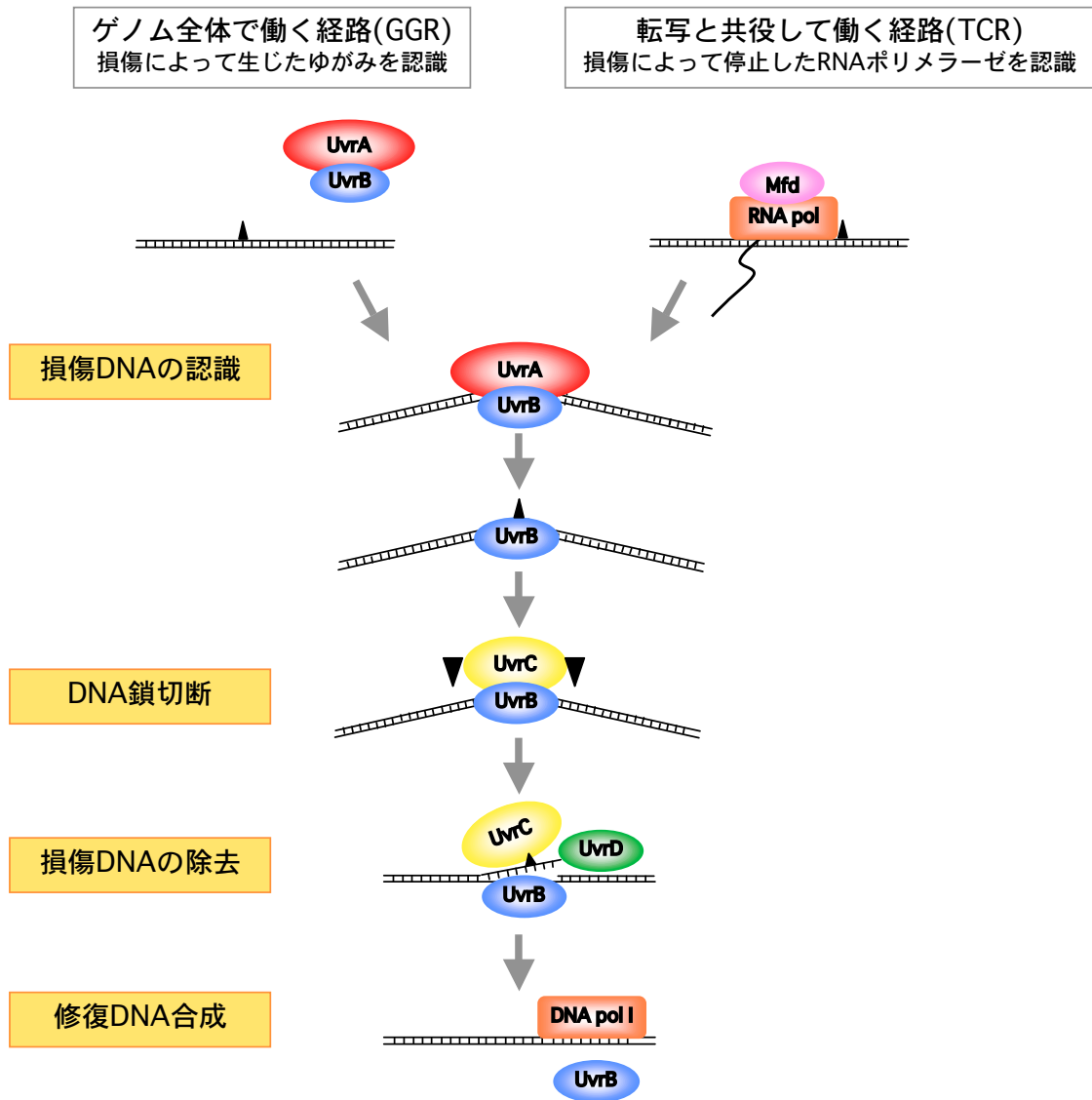


図2 NERの分子機構

NERには認識段階の違いによりGGRとTCRの2つの経路がある。認識後は、UvrA、UvrB、UvrC、UvrD、DNAポリメラーゼI、DNAリガーゼを用いた同様の反応、①損傷DNAの認識、②DNA鎖切断、③損傷DNAの除去、④修復DNA合成を経て、DNA鎖上の損傷を修復する。

に発生した損傷を対象とする修復経路（Global genome repair ; GGR）と、転写鎖を優先的に修復する転写と共役した修復経路（Transcription-coupled repair ; TCR）の二つがある（Sancer, 1996）。GGR では損傷による DNA 鎖上のゆがみを UvrA<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 複合体が、TCR では損傷により RNA ポリメラーゼが停止したことを Mfd 介して認識するが、その後は同様のメカニズムによって損傷が取り除かれる。まず、UvrA<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 複合体が DNA 鎖上の損傷を認識し結合する。次に、UvrB の ATP 依存的なヘリケース活性により損傷を含む二本鎖 DNA が巻き戻され、UvrA が外れた後に、部分的に開いた二本鎖 DNA に UvrB が結合した、pre-incision complex を形成される。UvrC は、UvrB-DNA 複合体と親和性をもつことから複合体を形成し、ATP 依存的な触媒部位の構造変化を通して、損傷の 5'側と 3'側の DNA 鎖を切断する。切断部位が形成されると、ここから UvrD のヘリケース活性により損傷を含む 12~13bp のオリゴヌクレオチドがはがされ、同時にオリゴヌクレオチドに結合した UvrC も解離する。最後にギャップは、DNA ポリメラーゼ I による修復 DNA 合成により埋め戻され、DNA リガーゼによるニックの連結という段階を経て、損傷 DNA を修復するとされている（図 2）（Van Houten *et al.*, 2005）。

### 3 本研究の目的

本研究室では、自然突然変異の発生と抑制の分子機構の解明を目的とした研究が行われてきたが、これらの多くは、DNA ポリメラーゼによる複製エラーや活性酸素のような代謝産物によって生じる突然変異に着目していた。また、前述の TLS ポリメラーゼに関する研究から、細胞内で生じた様々なタイプの自然 DNA 損傷は修復機構により速やかに修復されている可能性が示唆される。修復機構の一つである NER は、多種類の損傷に働くものの、その対象は DNA の二本鎖構造を大きく歪める、比較的大きな損傷であると考えられてきた。しかし、最近の報告によれば、酸化塩基損傷を含めた、DNA の二本鎖構造にほとんど影響を与えない小さな損傷に対しても働くことが示されている（Branum *et al.*, 2001）。NER が、酸化塩基損傷のような小さなタイプの損傷から、特異的な修復機構を持たない未知の大きな損傷まで、広範にわたる損傷に対して働けるのであれば、自然突然変異の抑制においても大きく寄与していることが予想される。しかし、NER の自然突然変異に関する報告はいくらかあるものの、一種類のみの変異から突然変異頻度を算出する復帰突然変異の系を用いていることと、実験区数が少ないことから、その寄与がどの程度であるのかについて、明らかにはされていない。そこで本研究では、NER に

関与する遺伝子を改変した大腸菌株を作製し、通常の生育条件下においてNERが突然変異の抑制にどの程度寄与しているのかについて、大規模な解析を行うことにした。

ところが、修復機構であるNERを欠損させた大腸菌株では変異頻度が上昇するという予想に反し、*rpoB*を標的遺伝子とした場合のNER欠損株における塩基置換の発生頻度は、野生株と比較して低下していることが明らかになった。また、TCRのみを欠損させた株においても変異頻度の低下が認められた。このことから、通常の生育条件下においてNERは、自然突然変異の抑制には働いておらず、むしろ自然突然変異の一部の発生に関わっており、この過程にはGGRとTCRの両方が関与することが示唆された。

除去修復系は、損傷の5'側と3'側の二カ所の一本鎖切断によって、損傷を含む側のDNA鎖のみを除去することから、反対側のDNA鎖の塩基配列情報は確実に保存される。このため、正しい塩基配列情報を元に正確なDNA合成を行うことが可能となり、信頼性の高い修復機構とされてきた。しかし*in vitro*の実験系において、損傷のないDNA鎖上においてもNERによるDNA鎖切断が生じることが報告されている(Branum *et al.*, 2001)。このことから、もしもNERが、通常の生育条件下において過剰な修復反応を行っているとするれば、その反応過程のうち、修復DNA合成の際に突然変異を誘発する可能性が考えられる。上記に示したように、たとえ鋳型となる正しい塩基配列情報が残っていたとしても、DNA合成が行われれば、ある頻度でDNAポリメラーゼによる複製エラーが生じるためである。また、複製エラーを修復するMMRは、複製直後のDNA鎖に対してのみ働くとされているため(Friedberg *et al.*, 1995)、修復機構の中で行われる複製に対しては働かず、複製エラーを固定しやすい状態にある可能性も考えられる。通常の生育条件下において、NERが必要以上に起こり、突然変異を誘発しているという考えは、上記に示したNER欠損株での自然突然変異の発生頻度の低下と一致する。また、NERの反応過程で働くタンパクの発現量が、現在報告されているだけでも3つの機構により抑制されているという点も(Selby and Sancar, 1990; Courcelle *et al.*, 2001; Ogasawara *et al.*, 2005; Neher *et al.*, 2006)、上記の考えに矛盾しない。さらに、修復機構が自然突然変異の発生要因になっているという報告は現在のところなされておらず、もしもNERが自然突然変異の発生原因であるとするれば、自然突然変異の新たな要因を特定することができる。

以上のような理由から本研究では、遺伝学的手法を用い、NERの反応過程のうち二つのポイントに焦点を当てて研究を進めることにした。一つ目として、NERの認識段階、DNA鎖切断段階に働くタンパクの欠損株と過剰発現株を用いて、自

然突然変異の発生頻度や反応中間体であるギャップ形成の頻度に影響を与えるのかについて調べた。二つ目として、NERの修復合成時に働くとされている DNA pol Iの校正機能の欠損に、NERの欠損や過剰発現を加えた大腸菌株を作製し、修復 DNA 合成時の複製エラーが、自然突然変異の発生頻度に影響を与えるのかについて調べた。

## 第2章 材料と方法

### 1 菌株

本研究に用いた菌株はすべて大腸菌 K-12 株由来であり、遺伝子型などについては表 1 に記載した。

DH5  $\alpha$  は新しく構築したプラスミドを修飾させる際の宿主菌として用いた。突然変異スペクトラム解析のためには、以下のような大腸菌株を用いた。MK811 は野生株で、MK6008、MK6016、MK6024、MK6048 は NER 欠損株、MK7607 は NER のうち TCR のみの欠損株として用いた。MK811 に pBR322、pUVRAB、pUVRABC を形質転換導入した大腸菌株は、NER 過剰発現株として用いた。MK811、MK6008、MK6016、MK6024、MK7607 に pPOLA2 を形質転換導入し、染色体上の *polA* 遺伝子を欠損させた大腸菌株は、Pol I の校正機能である *polA3'*→*5'exo* 株として用い、NER に関与する遺伝子の欠損を加えることで、NER の修復 DNA 合成時の影響を調べるために使用した。また、pPOLA2 と pUVRAB または pUVRABC を保持し、染色体上の *polA* 遺伝子を欠損させた大腸菌株は、*polA3'*→*5'exo* 株で NER に関与するタンパクの過剰発現による影響を調べる際に用いた。

SOS 誘導の確認のためには、野生株である MG1655 に pSK1003 を形質転換した大腸菌株を用い、さらに pUVRAB、pUVRABC を形質転換することにより、NER 過剰発現時の SOS 応答の確認をした。また、SOS 応答が生じない株として *lexA1* (*ind*<sup>-</sup>) 株を作製し、これに pUVRAB を形質導入することで、SOS 誘導に依存しない条件下での変異頻度測定に用いた。

UV 感受性の確認のためには、*recA* 欠損株である FS03 を用い、pUVRAB を形質転換したものを NER 過剰発現株として、UV 感受性の回復について調べた。

表 1 菌株リスト

菌株名	遺伝子型	入手方法
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15 ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ) <i>phoA, supE44</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	当研究室のストック
MG1655	LAM <sup>-</sup> , <i>rph-1</i>	当研究室のストック
MK811	MG1655 <i>rpsL</i> (Sm <sup>r</sup> )	当研究室のストック

MK8014	MG1655 $\Delta uvrC$ , pSK1002 pUVRAB	本研究にて作製
MK8016	MG1655 $\Delta mfd$ , pSK1002 pUVRAB	本研究にて作製
BD792	F <sup>-</sup> $\lambda$ E.coli K-12	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
BW25113	BD792 $lacI^q$ $rrnB_{T14}$ $\Delta lacZ_{WJ16}$ $hsdR514$ $\Delta araBAD_{AH33}$ $\Delta rhaBAD_{LD78}$	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
BW25141	BD792 $lacI^q$ $rrnB_{T14}$ $\Delta lacZ_{WJ16}$ $\Delta phoBR580$ $hsdR514$ $\Delta araBAD_{AH33}$ $\Delta rhaBAD_{LD78}$ $galU95$ $endA_{BT333}$ $uidA(\Delta mluI)::pir^+$ $recA1$	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
BT340	DH5 $\alpha$ , pCP20	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
CJ278	CM4722 $\Delta polA::Km^r$	Joyce and Grindley, 1984 東北大学山本氏より分与
AB1157	<i>thr-1 his-4 argE3 proA2 thi-1 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44</i>	Bachmann, 1972
KY1220	AB1157, <i>phr-36::Cm<sup>r</sup></i>	Akasaka and Yamamoto, 1991
KY1221	KY1220, <i>lexA1malE::Tn10</i>	Akasaka and Yamamoto, 1991 東北大学山本氏より分与
KY1225	KY1220, <i>recA56srlC::Tn10</i>	Akasaka and Yamamoto, 1991 東北大学山本氏より分与
FS03	KY1225butTet <sup>S</sup>	Kiyosawa <i>et al.</i> , 2001 東北大学山本氏より分与
FS03-Y	FS03, pSF11 pNP10	本研究にて作製
FS03-M	FS03, pUVRAB	本研究にて作製

## 2 プラスミド

One-step gene disruption 法を用いた遺伝子破壊株の作製の際には、表 2 に記した三つのプラスミドを使用した。pKD46 は、 $\lambda$ Red recombinase をコードする領域を保持しているため、導入した DNA 断片中の Km 耐性遺伝子と染色体 DNA 上の欠損させたい遺伝子を組み換えるために用いた。また pKD46 は、TS のレプリコンを保持しているため、37°C で培養することにより、これを除去することが可能である。pKD13 は、Km 耐性遺伝子と FRT サイトを保持していることから、5'-、3'-両末端に欠損させる遺伝子との相同配列を持ち、内部に Km 耐性遺伝子を持たせた、組み換えに使用することができる断片を作製するための鋳型として用いた。また、pCP20 は TS のレプリコンを保持しているため、Km 耐性遺伝子を除去した

---

MK6008	MK811 $\Delta uvrA$	本研究にて作製
MK6016	MK811 $\Delta uvrB$	本研究にて作製
MK6024	MK811 $\Delta uvrC$	本研究にて作製
MK6048	MK811 $\Delta uvrABC$	本研究にて作製
MK7607	MK811 $\Delta mfd$	本研究にて作製
MK7610	MK811 $\Delta uvrA \Delta mfd$	本研究にて作製
MK8103	MK811 $lexAI(ind^+)$ , pBR322	本研究にて作製
MK8105	MK811 $lexAI(ind^+)$ , pUVRAB	本研究にて作製
MK6252	MK811, pBR322	本研究にて作製
MK6260	MK811, pUVRAB	本研究にて作製
MK6268	MK811, pUVRABC	本研究にて作製
MK7686	MK811 $\Delta mfd$ , pUVRAB	本研究にて作製
MK6531	MK811 $\Delta polB$ , pUVRABC	本研究にて作製
MK6507	MK811 $\Delta dinB$ , pUVRABC	本研究にて作製
MK6537	MK811 $\Delta umuDC$ , pUVRABC	本研究にて作製
MK6525	MK811 $\Delta polB \Delta dinB \Delta umuDC$ , pUVRABC	本研究にて作製
MK6220	MK811 $\Delta polA$ , pPOLA1	本研究にて作製
MK6292	MK811 $\Delta polA$ , pPOLA1, pBR322	本研究にて作製
MK6296	MK811 $\Delta polA$ , pPOLA1, pUVRAB	本研究にて作製
MK6298	MK811 $\Delta polA$ , pPOLA1, pUVRABC	本研究にて作製
MK6236	MK811 $\Delta polA$ , pPOLA2	本研究にて作製
MK6240	MK811 $\Delta uvrA \Delta polA$ , pPOLA2	本研究にて作製
MK6248	MK811 $\Delta uvrB \Delta polA$ , pPOLA2	本研究にて作製
MK7676	MK811 $\Delta uvrC \Delta polA$ , pPOLA2	本研究にて作製
MK7682	MK811 $\Delta mfd \Delta polA$ , pPOLA2	本研究にて作製
MK6264	MK811 $\Delta polA$ , pPOLA2 pUVRAB	本研究にて作製
MK6272	MK811 $\Delta polA$ , pPOLA2 pUVRABC	本研究にて作製
MK8000	MG1655, pSK1002	本研究にて作製
MK8002	MG1655, pSK1002 pBR322	本研究にて作製
MK8004	MG1655, pSK1002 pUVRAB	本研究にて作製
MK8006	MG1655, pSK1002 pUVRABC	本研究にて作製

---

pCP20 は、組換え体の選択後に、FRT サイトと作用させて、Km 耐性遺伝子を除去する際に用いた。また、pCP20 は TS のレプリコンを保持しているため、Km 耐性遺伝子を除去した後に 43°C にて培養し、これを除去することが可能である。

UvrAB 過剰発現用のプラスミドである pUVRAB は、プラスミドベクターである pBR322 の *PvuI*-*AseI* 部位に、*uvrA*、*uvrB* 遺伝子及びプロモーター領域と転写終結シグナルを含む DNA 断片をクローニングして作製した。また、*uvrA*、*uvrB* を連結させるために *NotI* の配列を、さらに *uvrC* を組み込むための制限酵素サイトとして用いるために、*ApaI* と *AscI* の配列を *uvrA*、*uvrB* 遺伝子の間に付加した。pBR322 は、一方向性の複製起点である ColE1 様のレプリコンを持つため、クローニングの際には、pBR322 の複製方向と *uvrA*、*uvrB* の遺伝子の方向が同じになるように、これらの遺伝子を組み込んだ。UvrABC 過剰発現用のプラスミド、pUVRABC は、pUVRAB に付加されている *ApaI*-*AscI* 部位に、*uvrC* 遺伝子及びプロモーター領域と転写終結シグナルを含む DNA 断片をクローニングしたものである。pUVRAB の作製時と同様に、pBR322 の複製方向と *uvrC* の遺伝子の方向が同じになるように組み込んだ。

*polA* 遺伝子をクローニングしたプラスミド、pPOLA1 には、プラスミドベクターである pACYC184 の *BamHI*-*HindIII* 部位に、*polA* 遺伝子及びそのプロモーター領域と転写終結シグナルを含む DNA 断片を導入し作製した。また、DNA pol I の校正機能である 3'→5'エキソヌクレアーゼの活性部位にアミノ酸置換を導入し、3'→5'エキソヌクレアーゼのみを欠損させた *polA* 遺伝子をクローニングしたプラスミド、pPOLA2 は、*polA* 遺伝子内の 424 番目の Asp を Ala に置換したもので、その詳細は「11 部位特異的変異導入法」の項に記載した。

SOS 誘導の確認のために用いたプラスミド、pSK1002 は、pBR322 由来で *lac* 遺伝子が組み込まれたプラスミド、pMC1043 の *EcoRI*-*BamHI* 部位に *umuD* 遺伝子、*umuC* 遺伝子の一部分及び *umuDC* のプロモーター領域がクローニングされたものである。UmuDC は、SOS 誘導により発現が上昇するタンパクの 1 つであるため、SOS 誘導が生じれば、*umuDC* のプロモーターを介して、pSK1002 にクローニングされた *lac* 遺伝子の産物、β-ガラクトシダーゼが発現する。このため、ONPG の β-ガラクトシド結合の切断活性を調べることで、SOS 誘導が生じているのか否かについて調べることができる。その詳細は「15 SOS 誘導の確認」の項に記載した。



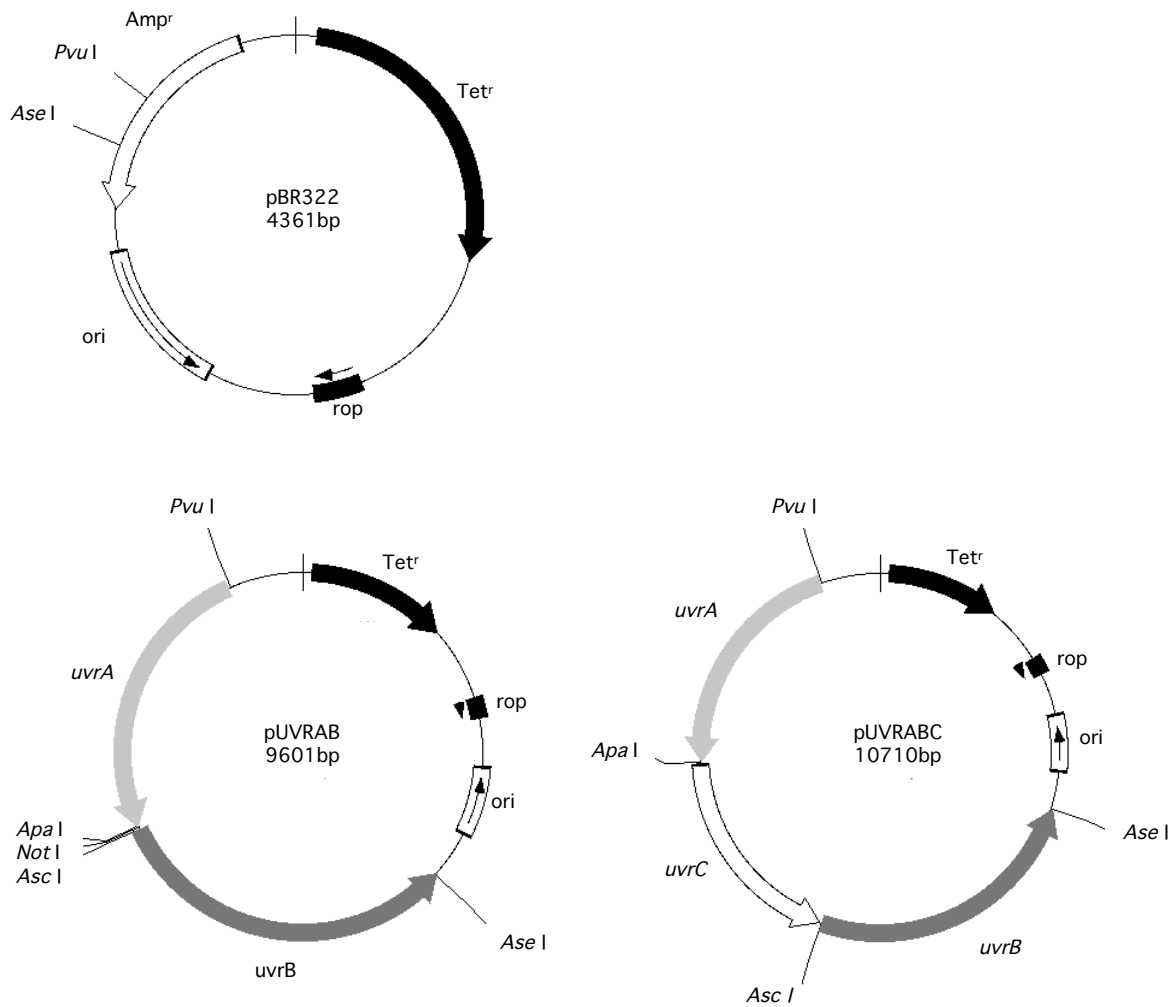


図3-1 NER過剰発現株で使用したプラスミド

oriの矢印は複製の方向、黒い矢印は各遺伝子の転写方向を表している。pUVRABは、pBR322のAse I とPvu I の位置に、*uvrA*、*uvrB*遺伝子及びプロモーター領域と転写終結シグナルを含むDNA断片を、*uvrA*遺伝子と*uvrB*遺伝子の間に新たな制限酵素部位、*Apa* I、*Not* I、*Asc* I をクローニングした。pUVRABCは、pUVRABの*Apa* I と*Asc* I の位置に、*uvrC*遺伝子及びプロモーター領域と転写終結シグナルを含むDNA断片をクローニングした。

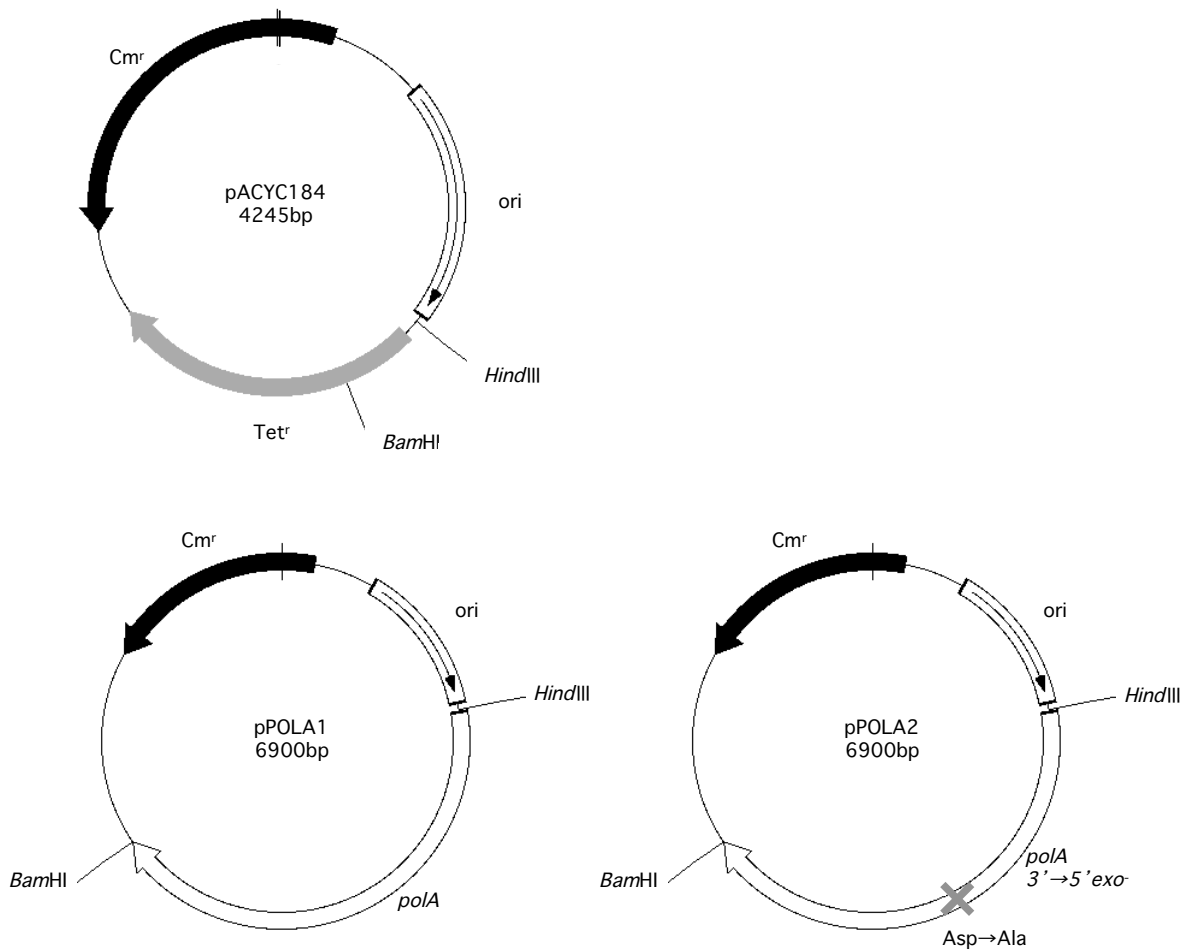


図3-2 *polA*3'→5'exo-株で使したプラスミド

oriの矢印は複製の方向、黒い矢印は各遺伝子の転写方向を表している。pPOLA1、pPOLA2はpACYC184のHindIIIとBamHIの位置に、*polA*遺伝子及びプロモーター領域と転写終結シグナルを含むDNA断片をクローニングしたもので、pPOLA2については、*polA*の424番目のAspをAlaに置換した。

表2 プラスミドリスト

菌株名	遺伝子型	入手方法
pKD46	$\lambda$ Red recombinase, <i>araC-P<sub>araB</sub></i> , Ap <sup>r</sup>	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
pKD13	Km <sup>r</sup> (FRT)	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
pCP20	FLP, Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
pBR322	Tet <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , <i>rop</i> gene, pMB1ori	当研究室のストック
pUVRAB	<i>uvrA uvrB</i> gene, Tet <sup>r</sup> , <i>rop</i> gene, pMB1ori	本研究にて作製
pUVRABC	<i>uvrA uvrB uvrC</i> gene, Tet <sup>r</sup> , <i>rop</i> gene, pMB1ori	本研究にて作製
pACYC184	Cm <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , pSC101ori	当研究室のストック
pPOLA1	<i>polA</i> gene, Cm <sup>r</sup> , pSC101ori	本研究にて作製
pPOLA2	<i>polA</i> gene, Cm <sup>r</sup> , pSC101ori	本研究にて作製
pSF11	<i>uvrA</i> gene, Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>s</sup> , pBR322ori	Kiyosawa <i>et al.</i> , 2001 東北大学山本氏より分与
pNP10	<i>uvrB</i> gene, Tet <sup>r</sup> , pBR322ori	Ormond <i>et al.</i> , 1981 東北大学山本氏より分与
pSK1002	<i>umuC'-lacZ</i> fused gene, Ap <sup>r</sup> , <i>rop</i> gene, pMB1ori	Shinagawa <i>et al.</i> , 1983 大阪大菱田氏より分与

### 3 P1 フェージについて

P1 フェージについては、当研究室でストックしている P1 *vir* フェージを必要に応じて希釈して用いた。希釈には LB 培地を用いた。

### 4 試薬・酵素・培地

一般的な試薬は特に記載がない限り、NaCl、KCl 等の塩類や HCl、NaOH 等の酸・アルカリ、抗生物質等は和光純薬工業および Sigma 社から、それ以外の試薬は Sigma 社から購入したものを使用した。本研究で使用した *Taq*DNA ポリメラーゼ、*ExTaq* ポリメラーゼは TAKARA 社製のものを、制限酵素は TAKARA、NEB または TOYOBO 社製のものを製造元の指示に従って使用した。

特に記載がない限り、培地には脱イオン水を、各試薬の調製には MilliQ 水を使用した。

一般の大腸菌の培養には、LB 培地 [1.0% Bacto trypton (Difco 社製)、0.5% Bacto yeast extract (Difco 社製)、1.0% NaCl] をオートクレーブ滅菌して使用した。プ

プレートとして使用する場合には Bacto agar (Difco 社製) をさらに加え、最終濃度が 1.5% となるようにして使用した。また培地には、必要に応じて抗生物質を無菌的に添加した。

P1 フェージの形質導入の際には、R-top agar [1% Bacto trypton (Difco 社製) <sup>※1</sup>, 0.1% Bacto yeast extract (Difco 社製) <sup>※1</sup>, 0.8% NaCl<sup>※1</sup>, 0.8% Bacto agar (Difco 社製) <sup>※1</sup>, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub><sup>※2</sup>, 0.1% glucose<sup>※3</sup>] (※1 は合わせてオートクレーブ滅菌した。※2 は※1 とは別にオートクレーブ滅菌した。※3 はフィルター滅菌した) を使用した。プレートとして用いる場合には、Bacto agar (Difco 社製) を最終濃度が 1.2% になるように加えた。

エレクトロポレーション法の際には SOC 培地 [2% Bacto trypton (Difco 社製) , 0.5% Bacto yeast extract (Difco 社製) <sup>※1</sup>, 0.05% NaCl<sup>※1</sup>, 2.5 mM KCl<sup>※1</sup>, 20 mM glucose<sup>※3</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub><sup>※2</sup>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>(pH 7.0) <sup>※2</sup>] (※1 は合わせてオートクレーブ滅菌した。※2 は※1 とは別に各々オートクレーブ滅菌した。※3 はフィルター滅菌した) を使用した。

SOS 誘導の確認の際には glucose minimal medium [10.5 mg/ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><sup>※1</sup>, 4.5 mg/ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>※1</sup>, 1.0 mg/ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>※1</sup>, 0.5 mg/ml sodium citrate · 2H<sub>2</sub>O<sup>※1</sup>, 0.001 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O<sup>※2</sup>, 0.0005% B1<sup>※3</sup>, 0.2% glucose<sup>※3</sup>] (※1 は合わせてオートクレーブ滅菌した。※2 は※1 とは別にオートクレーブ滅菌した。※3 はフィルター滅菌した) を使用した。また培地には必要に応じて、抗生物質を無菌的に添加した。

培地に加える抗生物質の最終濃度は、特に記載のない場合、アンピシリン(Amp)、ストレプトマイシン (Sm)、およびリファンピシン (Rif) は 100 µg/ml、クロラムフェニコール (Cm) は 25 µg/ml、カナマイシン (Km) は 50 µg/ml、テトラサイクリン (Tet) は 5 µg/ml とした。アンピシリン、ストレプトマイシンは滅菌水に溶解して 100 mg/ml とし、カナマイシンは 50 mg/ml とした。リファンピシンは 100% メタノール、クロラムフェニコールは 100% エタノール、テトラサイクリンは 50% エタノールに溶解し、それぞれ濃度を 10 mg/ml、50 mg/ml、5 mg/ml とした。これらの溶液は、-30℃で保存し、使用時には室温にて溶解させた。

## 5 プラスミド DNA の調製

プラスミドの精製には Qiagen カラム (QIAGEN 社製) を用いた。適当な抗生物質を含む LB 培地、5 ml にシングルコロニーを接種し、適当な温度で一晩回転培養した。適当な抗生物質を含む LB 培地 100 ml に、培養液 100 µl を加え、適当な

温度、250 rpm/min で一晩培養した。この培養液を 4 °C、5200 rpm で 15 分間遠心することにより集菌した (BECKMAN 社製 Rotor JA14)。集菌した菌体を、P1 緩衝液 (50 mM Tris-Cl(pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) 4 ml に懸濁した。これに、P2 緩衝液 (200 mM NaOH, 1% SDS(w/v)) を 4 ml 加え、室温で 5 分間静置した。冷却した P3 緩衝液 (3.0 M KAc(pH 5.5)) を 4 ml 加え、QIA filter に流し入れた後、室温で 10 分間静置した。次に、QIAGEN-tip100 へ、QBT 緩衝液 (750 mM NaCl, 50 mM MOPS(pH 7.0), 15% イソプロパノール(v/v), 0.15% Triton®X-100(v/v)) を 4 ml 流し入れ、平衡化した。この QIAGEN-tip100 に、QIA filter を通した溶出液を流し入れた。プラスミド DNA が吸着した QIAGEN-tip100 を、Buffer QC (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS(pH 7.0), 15% イソプロパノール(v/v)) 10 ml で 2 回洗浄し、Buffer QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl(pH 8.5), 15% イソプロパノール(v/v)) 5 ml でプラスミド DNA を溶出した。溶出液にイソプロパノール 3.5 ml を加え、4°C、14000 rpm で 30 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA25.5)、プラスミド DNA を沈殿させた。上清を除き、70% エタノール 2 ml で洗浄し、4°C、14000rpm で 10 分間遠心した (BECKMAN 社製 Rotor JA25.5)。上清を取り除き、風乾後、TE (10 mM Tris-Cl(pH 8.0), 1 mM EDTA) を 40 µl 加え、プラスミド DNA を溶解した。

次に、必要がある場合のみフェノール抽出、エタノール沈殿を行った。まず、DNA 溶液と等量のフェノール・クロロホルム (1:1) を加えてよく混ぜ、静置した。水層をとり、等量のフェノール・クロロホルム (1:1) を再度加えてよく混ぜ、静置した。この操作を繰り返し、水層とフェノール層の間にタンパクの膜が残らなくなったことが確認した後、水層に等量のクロロホルムを加えてよく混ぜ、静置した。プラスミド DNA を含む水層をとり、3 M NaOAc および、エタノールをそれぞれ、DNA 溶液の 1/10、2.5 倍量加えた。よく懸濁して、4°C、14000 rpm で 15 分間遠心し (TOMY 社製 Rotor TMA-6)、プラスミド DNA を沈殿させた。上清を捨てて、70% エタノールを 2.5 倍量加えて洗浄し、4°C、14000 rpm で 15 分間遠心した。上清を捨てて、風乾し、滅菌水に溶かした (TOMY 社製 Rotor TMA-6)。

## 6 アガロースゲル電気泳動

アガロースは、AgaroseLO3 (TAKARA 社製) を用い、ゲル濃度は、分子量に応じて 0.7%~1.5%(w/v) で使用した。緩衝液は TAE 緩衝液 (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA(pH 8.0)) を用いた。基本的な操作はすべて Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 2001) に従った。泳動にはすべて、ミューピット泳動槽 (コスモ・バイオ社)

及びまる楽泳動 PiCO-96(タイテック株式会社製)を用い、電圧 100 V、あるいは 50 V で 20~60 分通電した。泳動後、0.5  $\mu\text{g/ml}$  のエチジウムブロマイド水溶液に 30 分間浸して DNA を染色し、UV トランスイルミネーター (ATTO 社製) を用いてゲルに紫外線を照射し、DNA を観察した。

## 7 プラスミドによる形質転換法

大腸菌にプラスミドを形質転換導入する際には、塩化カルシウム法を用い、組換えプラスミド DNA の作製と one-step gene disruption の際の DNA 断片の導入にはより効率の良い電気穿孔法 (エレクトロポレーション法) を用いた。

### a) 塩化カルシウム法

#### a)-1 コンピテントセルの作製

LB 培地 5 ml に任意の菌体のシングルコロニーを接種し、30°C で一晩回転培養した。LB 培地 100 ml に、この培養液 1 ml を加え、37°C、250 rpm で、O.D.<sub>600</sub> が 0.3~0.4 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) に達するまで回転培養した (BECKMAN 社製 DU640 spectrophotometer)。O.D.が目的の値に達したら、培養液を、冷却した 50 ml の滅菌遠心管 2 本に移し、氷上で 10 分間静置した。4°C、4100 rpm で 10 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA25.5)、上清を完全に取り除き、菌体を回収した。菌体に冷却した  $\text{MgCl}_2\text{-CaCl}_2$  溶液 (80 mM  $\text{MgCl}_2$ 、20 mM  $\text{CaCl}_2$ ) を 30 ml を加え、再懸濁した。4°C、4100 rpm で 10 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA25.5)、上清を完全に取り除いた。次に冷却した 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  1 ml を菌体に加え、再懸濁した。これを、1.5 ml の滅菌マイクロチューブに 200  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。

#### a)-2 プラスミド DNA の導入

コンピテントセル 200  $\mu\text{l}$  にプラスミド DNA を 100 ng 程度 (10  $\mu\text{l}$  未満) 加え、よく混合した後に、30 分間氷上で静置した。42°C、30 秒間のヒートショックを加え、すぐに氷上に戻して、2 分間静置した。SOC 培地 800  $\mu\text{l}$  を加え、適当な温度、160 rpm/min で 45 分間振とう培養した。培養後は適当な抗生物質を含む LB プレート上に、原液をそれぞれ 900  $\mu\text{l}$ 、100  $\mu\text{l}$ 、10  $\mu\text{l}$  ずつ塗布した。適当な温度で静置培養し、形質転換体を選択した。選択したコロニーに関しては、2 回の画線培養を行った。最後に、得られたシングルコロニーを液体培養し、培養液に最終濃

度が 15%になるようにグリセロールを加え、液体窒素を用いて急激に凍結させた後に、-80℃に保存した。

## b) 電気穿孔法（エレクトロポレーション法）

### b)-1 コンピテントセル作製

LB 培地 5 ml に、適当な大腸菌株のシングルコロニーを接種し、適当な温度で一晩、回転培養した。塩濃度を下げた LB 培地 [1.0% Bacto trypton (Difco 社)、0.5% Bacto yeast extract (Difco 社)、0.5% NaCl] 500 ml に、この培養液 2.5 ml を接種した。BW25113 を用いる場合にのみ、最終濃度が 10mM になるように、L-アラビノースを加えた。適当な温度、250 rpm で、O.D.<sub>600</sub> が 0.3~0.4 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) に達するまで回転培養した (BECKMAN 社製 DU640 spectrophotometer)。O.D.が目的の値に達したら、培養液を冷却した 250 ml の滅菌遠心管 2 本に移した。2℃、5200 rpm で 15 分間遠心して上清を取り除き、菌体を回収した (BECKMAN Rotor JA14)。菌体に冷却した 10% グリセロール 250 ml×2 を加え、穏やかに懸濁した。2℃、5200 rpm で 20 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA14)、上清を捨てた。再度、菌体に冷却した 10% グリセロール 250 ml を加え、穏やかに懸濁した。2℃、5200 rpm で 20 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA14)、上清を捨てた。さらに、冷却した 10% グリセロール 40 ml を菌体に加え、穏やかに懸濁した。2℃、5200 rpm で 20 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA14)、上清を捨てた。全量が 1 ml になるように冷却した GYT 培地を加え、菌体を懸濁した。これを 1.5 ml の滅菌マイクロチューブに 40  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素を用いて急激に凍結させた後、-80℃で保存した。保存したコンピテントセルは、使用時には氷上で融解した。

### b)-2 プラスミド DNA の導入

エレクトロポレーションは、Bio-Rad 社製の *E.coli* Gene Pulser を用いて行った。コンピテントセル 40  $\mu$ l に、プラスミド DNA を 100 ng 程度加えてよく混合した後に、冷却しておいた 0.2 cm 間隔のジーンパルサーキューベット (Bio-Rad 社製) に移し、氷上に 1 分間静置した。キューベットをジーンパルサーにセットし、電圧 2.5 kV で通電した。通電後は、すぐに SOC 培地 1 ml をキューベット内に加え、これを全て小試験管に移し、適当な温度、160 rpm/min で 1 時間振とう培養した。培養液を適当な濃度に希釈後、適当な抗生物質を含む LB プレートに塗布し、適当な温度で静置培養して、形質転換体を選択した。選択したコロニーに関しては、2 回の画線培養を行った。これを液体培養して、培養液に最終濃度が 15%になるよ

うにグリセロールを加え、液体窒素を用いて急激に凍結させた後に、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。

## 8 P1 ファージを用いた形質導入

実験に用いる菌株の background をそろえ、目的の遺伝形質を持つ菌株を作製するために、P1 ファージを用いた形質導入を行った。

### a) P1 溶菌液の調製

目的の遺伝形質とその導入がなされたものを選択できる薬剤マーカーを保持した菌株(donor)を、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存したグリセロールストックより、LBプレート上に画線培養した。シングルコロニーを、適当な薬剤を含むLB培地 5 ml に接種し、適当な温度で一晩回転培養した。5 mM  $\text{CaCl}_2$  を含むLB培地 5 ml に培養液 50  $\mu\text{l}$  を加え、適当な温度、160 rpm/min で、 $\text{O.D.}_{600}$  が 0.4~0.5 ( $1 \times 10^8$  cells/ml)に達するまで振とう培養した (BECKMAN 社製 DU640 spectrophotometer)。このような培養液 1 ml を小試験管に取り、ここにP1 ファージ  $1.0 \times 10^7$  pfu 程度を加えた後、 $37^{\circ}\text{C}$ で 20 分間保温し、P1 ファージを donor に感染させた。混合液と  $55^{\circ}\text{C}$ で保温しておいた R-top agar 2.5 ml を穏やかに混合し、すばやく R-plate 上に流し込んだ。プレート表面を上に向けて、 $37^{\circ}\text{C}$ で 8 時間静置培養した。8 時間培養後、R-プレート表面の、R-top agar をスプレッターでかきとり、滅菌遠心チューブに入れた。次に、プレート表面をLB培地 1 ml で洗い、洗液も滅菌遠心チューブに加えた。クロロホルム 100  $\mu\text{l}$  を加え、30 秒間、vortex により懸濁した。 $4^{\circ}\text{C}$ 、9000 rpm で 20 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA20.1)、上清を 1.5 ml の滅菌マイクロチューブに回収した。最後に、40  $\mu\text{l}$  のクロロホルムを加え、懸濁し、 $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### b) 溶菌液による形質導入

目的の遺伝形質を導入したい菌株 (recipient) を、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存したグリセロールストックより、LBプレート上に画線培養した。シングルコロニーをLB培地 5 ml に接種し、適当な温度で一晩回転培養した。このような培養液 1 ml を、1.5 ml の滅菌マイクロチューブに移し、 $20^{\circ}\text{C}$ 、3000 rpm で 5 分間遠心した (TOMY 社製 Rotor TMA-6)。上清を完全に除去し、MC buffer (100 mM  $\text{MgSO}_4$ 、5mM  $\text{CaCl}_2$ ) を 1 ml 加え、再懸濁した。この懸濁液 ( $1.0 \times 10^9$  cells/ml 程度) を 100  $\mu\text{l}$  (1.0



×10<sup>8</sup> cells 程度) に対して、P1 ファージを 1.0×10<sup>9</sup> pfu、1.0×10<sup>8</sup> pfu、1.0×10<sup>7</sup> pfu 程度をそれぞれ混合した後、37°Cで 20 分間保温し、受容菌に P1 ファージを感染させた。P1 ファージが、さらに再感染することを防ぐために、1M クエン酸溶液 (pH 5.5)を 200 µl 加えた。次に、薬剤耐性遺伝子を発現させるために、適当な温度で 1 時間振とう培養した。培養後は、耐性を獲得した菌株の選択のために、適当な薬剤を含む LB プレート上に、培養液を 100 µl ずつ塗布した。プレートは適当な温度で、一晩、静置培養した。得られたコロニーをさらに 2 回、適当な薬剤を含む LB プレート上で画線培養した。シングルコロニーを液体培養し、培養液に最終濃度が 15%になるようにグリセロールを加え、液体窒素を用いて急激に凍結させた後に、-80°Cで保存した。また、作製した菌株については、コロニーPCRにより目的遺伝子の欠損と薬剤耐性遺伝子の導入の確認をした。また、点突然変異を薬剤耐性遺伝子とともに形質導入させた場合には、塩基配列を確認した。鋳型 DNA の調製、PCR 反応液の調製、シーケンスに関しては「13 突然変異スペクトラム解析」の項に詳細に記載した。使用したプライマーについては表 3-2 に記載した。

## 9 One-step gene disruption 法を用いた遺伝子破壊株の作製

### a) 欠損させる遺伝子と薬剤耐性遺伝子の組換えに用いる断片の作製

プラスミド DNA pKD13 の中のカナマイシン耐性遺伝子、FLP recognition target site を挟んで外側に位置している Priming site 1, 20bp、あるいは Priming site 4, 20bp を 3'側に、不活性化させる遺伝子の近辺領域に対して相同な 50bp の範囲を 5'側に配置した 70bp のプライマーを設計した (Datsenko *et al.*, 2000) (表 3-1)。鋳型 DNA として用いた pKD13 は、「5 プラスミド DNA の調製」に記載した通りに調製した。オリゴマーDNA は、北海道システム・サイエンス株式会社、あるいは株式会社ジーンデザインに依頼し、HPLC 精製されたものを、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA) に溶解して、-30°Cで保存した。使用時は氷上で溶解させ、適当な濃度に希釈して使用した。

PCR 反応は、Ex Taq DNA ポリメラーゼ (TAKARA 社製)、10×Ex Taq buffer、dNTPmix、適当な 2 種類のプライマー(表 3-1 に記載したものを使用)、鋳型の pKD13 を用いて行った。反応は 10-20 µl で行い、最終濃度は (10 mM Tris-HCl(pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 各 200 µM dNTP, 1.5×10<sup>-2</sup> U/ µl TaqDNA polymerase, 各 4 pmol/10 µl プライマー、1-10 ng/10 µl pKD13) とした。反応には、Gene Amp PCR

System 9600(PERKIN ELMER 社製) を用いた。反応条件は、95°C、1 分の後、サイクルとして変性反応：95°C、30 秒、アニーリング反応：55°C、30 秒、伸長反応：72°C、1.5 分を 30 サイクル繰り返して行い、最後に 72°C で 5 分おいた。

PCR 反応後は、アガロースゲル電気泳動により目的の位置にバンドが増幅したことを確認した。

次に、PCR 反応液中の鋳型 DNA を除去するために、*DpnI* 処理を行った。*DpnI* (20 U/μl) は、PCR 反応液 50 μl に対して 1 μl 加え、37°C で 1 時間反応させた。その後、反応液中のタンパク質を除去するために、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、得られた DNA 断片を滅菌水に溶解した。操作の詳細については、「5 プラスミド DNA の調製」の項に記載した。

表 3-1 遺伝子破壊株作成用プラスミドリスト

名称	使用目的	プライマー配列 <sup>1)</sup>
dUVRA4P1F	$\Delta uvrA$ 株作製	CAGCATCGGCTTAAGGAAGCGTGCCGTGTGTGATGCTTC <u>GCACTCCGCGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
dUVRA4P4R	$\Delta uvrA$ 株作製	ATGGATAAGATCGAAGTTCGGGGCGCCCGCACCCATAAT CTCAAAAACATATTCCGGGGATCCGTCGACC
dUVRB2P1F	$\Delta uvrB$ 株作製	TTTGCTCATGATTGACAGCGGAGTTTACGCTGTATCAGA <u>AATATTATGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
dUVRB2P4R	$\Delta uvrB$ 株作製	TTACGATGCCGCGATAAACAGCTCACGCAGCTGATGCAA CTGGTCACGAAATTCCGGGGATCCGTCGACC
dUVRC2P1F	$\Delta uvrC$ 株作製	CACCTGGCAATTCGCCATGGTCTGTGTAATGCGGAGACA <u>TTATCAAGTCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
dUVRC2P4R	$\Delta uvrC$ 株作製	CTGCCAGACCTTGCGAAATACCCGGCACTTTTGCAATTC CTCGACGCTGATTCCGGGGATCCGTCGACC
dMFD2P1F	$\Delta mfd$ 株作製	ATATGCCCCATATGTTGAGGCATATCCTAACGAGAATC <u>TGACAACCGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
dMFD2P4R	$\Delta mfd$ 株作製	GAATTTGTAAATGTTGCAGATGGGGCGCAGAAACGCCC CCGATTTACCAATTCCGGGGATCCGTCGACC

1)下線の引いてある配列は pKD13 上に存在している priming site 1 と相同な領域であり、イタリック体で示した配列は同様に pKD13 上に存在している priming site 4 と相同な領域である。

## b) 欠損株の作製

目的の遺伝子が不活性化した大腸菌株を得るために、「8-a) 欠損させる遺伝子と薬剤耐性遺伝子の組換えに用いる断片の作製」にて作製した DNA 断片を、組換え能を高める工夫がなされている大腸菌株 BW25113 に導入した。BW25113 は  $\lambda$  Red recombinase をコードする領域が組み込まれており、アラビノースの添加により発現が誘導されるプラスミド、pKD46 を保持している。このため、導入した DNA 断片中の Km 耐性遺伝子と染色体 DNA 上の不活性化したい遺伝子を組み換えるために用いた。DNA 断片の導入は、「6-b) 電気穿孔法 (エレクトロポレーション法)」に記載した通りに行ったが、コンピテントセル作製の際の培養液には 10 mM L-アラビノース、100  $\mu$ g/ml Amp を加えたものを用い、培養温度は 30°C とした。また、1 回の形質転換に用いる DNA 量は 100 ng 程度で、形質転換後の培養も 30°C で行った。培養液の希釈は行わず、適当な抗生物質を含む LB プレート上に塗布した。LB プレートは 37°C で培養し、pKD46 を除去した。選択したコロニーは、一度画線培養を行い、シングルコロニーを形成させた。これを液体培養して、培養液に最終濃度が 15% になるようにグリセロールを加え、液体窒素を用いて急激に凍結させた後に、-80°C にて保存した。

次に、変異頻度測定に用いる菌株の background をそろえるために、MK811 の background で、目的の遺伝形質を持つ菌株を作製した。実験は、「7 P1 フェージを用いた形質導入」に記載した通りに行った。

作製した菌株については、各段階で、コロニー PCR により目的遺伝子の欠損とカナマイシン耐性遺伝子の導入の確認をした。また、点突然変異をカナマイシン耐性遺伝子とともに形質導入させた場合には、塩基配列を確認した。鋳型 DNA の調製、PCR 反応液の調製、シーケンスに関しては「13 突然変異スペクトラム解析」の項に詳細に記載した。使用したプライマーについては表 3-2 に記載した。

## c) 薬剤耐性遺伝子の除去

目的の遺伝子が不活性化した大腸菌株を得るために用いた、カナマイシン耐性遺伝子をポップアウトするために、FLP を発現することができるプラスミド、pCP20 を形質転換導入した。実験操作は「7-b) 塩化カルシウム法」の項に記載した通りに行い、1 回の形質転換には 100 ng 程度のプラスミド DNA を用いた。pCP20 を形質転換導入後は、クロラムフェニコールを含む LB プレートに塗布し、30°C

で一晩、静置培養した。得られた形質転換体を 30°C で画線培養し、同時にカナマイシン感受性になっていることを確認した。次に、pCP20 を脱落させるために、43°C で画線培養後、クロラムフェニコール感受性になっていることを確認した。

作製した菌株については、コロニーPCR により目的遺伝子の欠損とカナマイシン耐性遺伝子がポップアウトしていることを確認した。また、点突然変異をカナマイシン耐性遺伝子とともに形質導入させた場合には、塩基配列を確認した。鋳型 DNA の調製、PCR 反応液の調製、シーケンスに関しては「13 突然変異スペクトラム解析」の項に詳細に記載した。使用したプライマーについては表 3-2 に記載した。

表 3-2 遺伝子破壊株作成確認用プライマーリスト

名称	相同領域	プライマー配列
kt	Km 耐性遺伝子	CGGCCACAGTCGATGAATCC
k1	Km 耐性遺伝子	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
k2	Km 耐性遺伝子	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
dUVRA1F	<i>uvrA</i>	TTTATCACGCCAGGATTCG
dUVRA1R	<i>uvrA</i>	GAAAAACGTAAATTGCTGGTGC
dUVRB1F	<i>uvrB</i>	TGATTGACAGCGGAGTTTACG
dUVRB1R	<i>uvrB</i>	ACCGCCAGTTGTTACATAACG
dUVRC1F	<i>uvrC</i>	TGTTGAGCTGACTCACCTGG
dUVRC1R	<i>uvrC</i>	GCAACGTAGGGATATTAATGTC
dMFD1F	<i>mfd</i>	ACTGACACTCCTGCTGGTTTATCCC
dMFD1R	<i>mfd</i>	TGAATTATGGATGGTGACAGTGTCG
dPOLA1F	<i>polA</i>	TGTA AAAACGAAAGCTTAGTTATCCACATGACGATTTGC
dPOLA4R	<i>polA</i>	CAGGAAACAGGGATCCATTTCTAATAGCCATCACAAAACG
dLEXA1F	<i>lexA</i>	TGTTATGGTTCGATTTTGGATAACC
dLEXA1R	<i>lexA</i>	CAGCAACGGAACGGTGATATTGG

## 10 組換え DNA プラスミドの作製

pBR322 に *uvrA* と *uvrB* 遺伝子をクローニングしたプラスミド、pUVRAB を作製した。ベクタープラスミドに用いた pBR322 は「5 プラスミド DNA の調製」の項に記載したように精製し、制限酵素処理を行った。制限酵素は完全消化に最低必要な量の 10 倍程度を使用した。DNA 断片は、低融点アガロースゲル電気泳動により分離した。電気泳動後は、アガロースゲルを  $\beta$ -アガラーゼ I (NEB 社製)

により消化し、イソプロパノール沈殿により精製した。*uvrA* 遺伝子、*uvrB* 遺伝子を含むインサートはそれぞれ、制限酵素サイトとリンカー配列を付加したプライマー(表 3-3) を用いて、PCR により増幅し、制限酵素処理を行った。制限酵素処理後は、フェノール・クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿により精製した。このようにして用意したベクタープラスミドと *uvrA* 遺伝子、*uvrB* 遺伝子を含むインサートを T4 リガーゼによって結合させた。反応条件については、Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989) に従った。次に pUVRAB に、*uvrC* 遺伝子を含むインサート DNA を挿入したプラスミド、pUVRABC を作製した。作製の手順は上記に記載したのと同様である。このようにして作製したプラスミド DNA の塩基配列を調べ、目的の遺伝子がクローニングされたことと変異が挿入されていないことを確認した。鋳型 DNA の調製、PCR 反応液の調製、シーケンスに関しては「13 突然変異スペクトラム解析」の項に詳細に記載した。使用したプライマーについては表 3-4 に記載した。

また、DNA pol I の校正機能である 3'→5'エキソヌクレアーゼの活性部位に変異を挿入したプラスミド、pPOLA2 を作製するために、まず、*polA* 遺伝子を pACYC184 にクローニングしたプラスミド pPOLA1 を、pUVRAB を作製した場合と同様の手順で作製した。

表 3-3 組換えプラスミド作成用プライマーリスト

名称	相同領域	プライマー配列
dPOLA1F	<i>polA</i> のプロモーター付近	TGTA AAAACGAAAGCTTAGTTATCCACATGACGAT TTGC
dPOLA4R	<i>polA</i> のターミネーター付近	CAGGAAACAGGGATCCATTTCTAATAGCCATCAC AAAACG
dUVRAOV1F	<i>uvrA</i> のプロモーター付近	TGTA AAAACGAGCGGCCGCGACGGCCAGTGGCGCG CCTTCCAATACTGTATATTCATTCA
dUVRAOV1R	<i>uvrA</i> のターミネーター付近	CAGGAAACAGATTAATAAACGTAAATTGCTGGTG C
dUVRBOV1F	<i>uvrB</i> のプロモーター付近	TGTA AAAACGACGATCGGATTGACAGCGGAGTTTA CG
dUVRBOV1R	<i>uvrB</i> のターミネーター付近	CAGGAAACAGGCGGCCGCGGGCCACCGCCAGTT GTTACATAACG
dUVRCOV1F	<i>uvrC</i> のプロモーター付近	TTA AAAACGAGGGCCCAATGGCGTTAAGCCAGATC G

---

dUVRCoV1R *uvrC* のターミネーター付近 CAGGAAACAGGGCGCGCCGACCAATACAAAGAA  
TGGGATAAGG

---

表 3-4 組換えプラスミド作成確認用プライマーリスト

名称	相同領域	プライマー配列 <sup>1)</sup>
dPOLA1F	<i>polA</i>	TGTA AACCGAAAGCTTAGTTATCCACATGACGATTGTC
dPOLA2F	<i>polA</i>	GCTGACCTGTGAACA ACT
dPOLA3F	<i>polA</i>	CCACCAAGCAGTTACAAACC
dPOLA4F	<i>polA</i>	GGACTGGATACGCTGTATGC
dPOLA5F	<i>polA</i>	AACGGTGTGAAGATCGATCC
dPOLA2R	<i>polA</i>	TTCAACGTCGGTTTTAATCG
dPOLA3R	<i>polA</i>	CCTGTTTTTCAAAGAGAATGG
dPOLA4R	<i>polA</i>	CAGGAAACAGGGATCCATTTCTAATAGCCATCACAAAACG
dUVR A1F	<i>uvrA</i>	TTTATCACGCCAGGATTTCG
dUVR A2F	<i>uvrA</i>	CAAGCGTCTGATGCTACTC
dUVR A3F	<i>uvrA</i>	CAGAATCCGGA ACTGTTCG
dUVR A4F	<i>uvrA</i>	TGAATTACCTGACGCTTTCC
dUVR A5F	<i>uvrA</i>	GGTGGGTCTGTTTACCTGC
dUVR A6F	<i>uvrA</i>	GAGTTCTTTGATGCCGTACC
dUVR A1R	<i>uvrA</i>	GAAAAACGTAAATTGCTGGTGC
dUVR B1F	<i>uvrB</i>	TGATTGACAGCGGAGTTTACG
dUVR B2F	<i>uvrB</i>	GAGCAGATGCGTTTGTCC
dUVR B3F	<i>uvrB</i>	GGCTGACCCAGCGTACC
dUVR B4F	<i>uvrB</i>	GTCACCACACTGACCAAGC
dUVR B1R	<i>uvrB</i>	ACCGCCAGTTGTTACATAACG
dUVR C1F	<i>uvrC</i>	TGTTGAGCTGACTCACCTGG
dUVR C2F	<i>uvrC</i>	TCTATCAGCCGCGTTACAACG
dUVR C3F	<i>uvrC</i>	CGTCACCGAAAAACAATTCG
dUVR C4F	<i>uvrC</i>	AACCGTCGCTTCTGTGTGG
dUVR C1R	<i>uvrC</i>	GCAACGTAGGGATATTAAATTGC
d15AR	pACYC184	ATGCCAGGAAGATACTTAACAGG
dPBR3221F	pBR322	CCGGCTCCAGATTTATCAGC
dPBR3221R	pBR322	CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACG

---

## 11 部位特異的変異導入法 (Site-directed Mutagenesis)

pPOLA1 の中に挿入されている、*polA* 遺伝子の 1271 番目の A を C に変化させる方法として、部位特異的変異導入法を用いた。1271 番目の A は Asp をコードする GAT の 2 番目の A であり、この A を C に変化させると Ala にアミノ酸置換される。DNA pol I の校正機能である 3'→5'エキソヌクレアーゼの活性中心は 424 番目の Asp にあり、これを Ala にアミノ酸置換することで構造や、ポリメラーゼ活性には影響を与えないが、3'→5'エキソヌクレアーゼが大幅に低下することが報告されている (Derbyshire *et al.*, 1991)。そこで、*polA* 遺伝子をこのように変化させたプラスミドを作製し、pPOLA2 と命名した。

変異を導入する際には、Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit (TOYOBO 社製) で用いられている方法を参考にした。まず、変異を中央にもち、その両側に正しい配列を伸ばしたプライマーを設計した。また、このプライマーに対して相補的な配列を持つプライマーも設計した (表 3-5)。PCR 反応は、*Pfu* DNA ポリメラーゼ (STRATAGENE 社製)、10×reaction buffer、dNTPmix、プライマー dPOLAM1F、dPOLAM1R (表 3-5)、鋳型としたプラスミド DNA、pPOLA1 を用いて行った。反応は 50 µl で行い、最終濃度は(20 mM Tris-HCl (pH 8.8) , 10 mM KCl, 2.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% TritonX-100, 100 µg/ml, 各 50 µM dNTP, 5.0 × 10<sup>-2</sup> U/µl *pfu* Turbo DNAPolymerase,各 125 ng/50µl プライマー, 5-50 ng/50µl pPOLA1) とした。反応には、Gene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社製) を用いた。反応条件は、95°C、30 秒の後、サイクルとして変性反応：95°C、30 秒、アニーリング反応：55°C、1 分、伸長反応：68°C、14 分を 30 サイクル繰り返して行った。PCR 反応後は、アガロースゲル電気泳動により目的の位置にバンドが増幅したことを確認した。次に、反応液中に含まれる鋳型 DNA、pPOLA1 を除去するために *DpnI* 処理を行った。PCR 反応液に *DpnI* (0.20 U/µl) を加え、37°C で 1 時間反応させた後、エタノール沈殿により DNA を濃縮した。次に、これを大腸菌に導入し、細胞内でニックを結合させ、完全なプラスミド DNA とした。形質転換には電気穿孔法を、コンピテントセルとして DH5α を、形質転換体の選択にはプラスミドが持つ選択マーカーであるクロラムフェニコールを用いた。形質転換体を選択した後、*polA* 遺伝子の塩基配列を確認し、pPOLA2 とした。*polA* 遺伝子の 1271 番目の A を C に変化させると、元の *polA* 遺伝子上の 1269 番目から 1274 番目の位置にある *PuvI* による切断部位の塩基配列が変化し、*PuvI* によって切断されなくなる。そこでまず、塩基配列を確認するために、選択した形質転換体を用

いてコロニーPCRを行い、*polA* 遺伝子を増幅後、*PvuI* 処理によって切断されなくなるものを選択した。次に、この形質転換体のプラスミド DNA の塩基配列を調べ、目的の変異が挿入されていることと、その他の変異が挿入されていないことを確認した。鋳型 DNA の調製、PCR 反応液の調製、シーケンスに関しては「13 突然変異スペクトラム解析」の項に詳細に記載した。使用したプライマーについては表 3-4 に記載した。

表 3-5 部位特異的変異導入用プライマーリスト

名称	相同領域	プライマー配列 <sup>1)</sup>
dPOLAM1F	<i>polA3</i> ' →5' <i>exo</i>	GTCGGGCAAAACCTGAAATACGCTCGCGGTATTCTGGAGAA CTAC
dPOLAM1R	<i>polA3</i> ' →5' <i>exo</i>	CTAGTTCGCCAGAATACCGCGAGCGTATTTTCAGGTTTTGCC GAC

## 12 自然変異頻度の測定

### a) 変異頻度の測定方法

-80°Cに保存した任意の菌体を LB プレート上にて、30°Cで 24 時間画線培養した。ここで得られたシングルコロニーを LB 培地 5ml に接種し、30°C、160 rpm/min で 12 時間培養した。この培養液を、LB 培地で 10<sup>-6</sup>まで希釈し、希釈液を LB 培地 5 ml に 100 μl 加えた。(LB 培地 5 ml に対して任意の菌体を約 100 細胞程度含有する。) 次に、このような希釈液を、37°C、160 rpm/min で、O.D.<sub>600</sub> が 1.0 (1 × 10<sup>8</sup> cells/ml 程度) 前後に達するまで振とう培養した (BECKMAN 社製 DU640 spectrophotometer)。このような培養液を、1 枚のプレート上に適当なコロニー数が得られる濃度まで希釈、あるいは濃縮した。生菌数測定には LB プレートを、変異体数測定には適当な薬剤を含有するプレートを用い、それぞれの菌液をプレート上に塗布した。また、生菌数測定については希釈系列を独立に 3 つ立て、各々 2 枚のプレートに塗布した。変異体数の測定については原液、あるいは濃縮液を塗布する場合は 3 枚以上のプレートに、希釈する場合には生菌数測定の場合と同様の条件で塗布した。プレートは、37°Cで 24 時間静置培養し、この間に出現したコロニー数から、培養液 1 ml あたりの生菌数、変異体数を算出した。以上のようにして求めた値から、培養液 1 ml あたりの変異体数を算出し、変異頻度とした。この一連の過程を 1 実験区とし、各実験区でもとめた突然変異頻度の中央値を各



菌株の突然変異頻度とした。(ただし、*rpsL* 前進突然変異検出系に関しては、平均値を突然変異頻度とした。)

#### b) *rpsL* 前進突然変異検出系について

*rpsL* 前進突然変異検出系は、本研究室にて、自然突然変異の発生と抑制の分子機構を解明するための解析手段の一つとして構築された検出系である。この検出系で用いている大腸菌は、リボソームサブユニット S12 をコードし、ストレプトマイシンに対して感受性を示す *rpsL* 遺伝子を 2 つ保持する部分二倍体細胞である。1 つは変異を導入することで、リボソームタンパク質の機能は保持したまま、ストレプトマイシン耐性を獲得した変異型の *rpsL* 遺伝子で、もう 1 つが新たに挿入した野生型の *rpsL* 遺伝子である。ただし、野生型の形質が変異型に対して優性であるために、この大腸菌は通常、ストレプトマイシンに対して感受性を示し、標的とする新たに挿入した *rpsL* 遺伝子に変異が生じた場合のみストレプトマイシン抵抗性となる。このことを利用して、*rpsL* 遺伝子上に変異が生じた細胞を選択し、スペクトラム解析を行うことで、どのような変異が生じているのかを確認している。

この検出系では、変異型の *rpsL* 遺伝子を保持しているために、塩基置換、1 塩基フレームシフト、配列置換、欠失、重複、IS が生じ、標的とする野生型のリボソームタンパクの機能が失われた場合にも、生育が可能であるため、ほとんどの変異を検出することができる。また、部分二倍体細胞を用いており、変異型の *rpsL* 遺伝子の 127 番目のアデニンがシトシンに置換されているために、野生型の *rpsL* と変異型の *rpsL* の間でアレル間組換えが生じた場合にこれを検出することが可能である (図 4)。

### 13 突然変異スペクトラム解析

突然変異測定に用いた株において、どのような変異が、どの位置で起こるのかを塩基配列レベルで調べるために、突然変異スペクトラム解析を行った。

#### a) ボイル法による鋳型 DNA の調製

変異頻度測定時に、薬剤含有プレート上に出現したコロニーを、各実験区から同数ずつ(ただし、出現数が極端に少ない実験区に関しては出現したものすべて)を、無作為に選びだし、これを新しい薬剤プレート上で単離した。コロニーの出

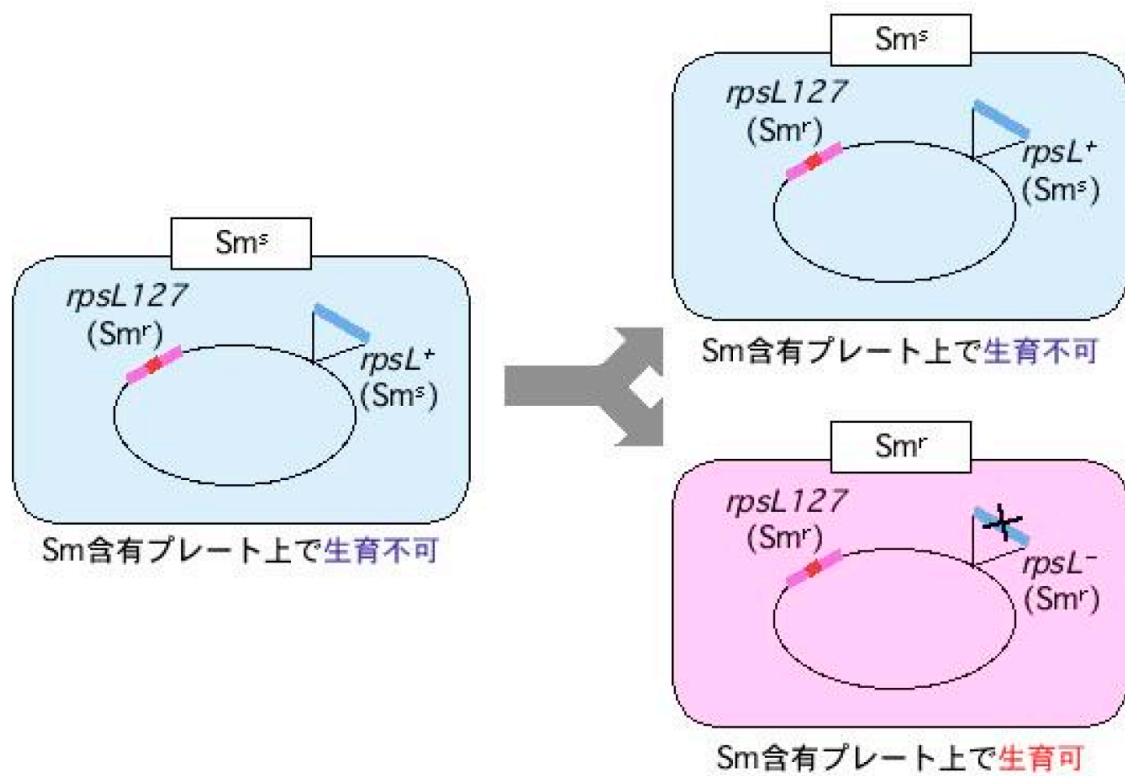


図4 *rpsL*前進突然変異検出系

導入した野生型の*rpsL* 遺伝子に変異が生じなければストレプトマイシン感受性となり、変異が生じればストレプトマイシン耐性となる。このことから、ストレプトマイシン含有LBプレート上にコロニーが形成されるか否かで、突然変異を検出することができる。

現を確認できたら、これを爪楊枝の先端でかきとり、TE 緩衝液(10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA) 20  $\mu$ l に懸濁し、99°C で 3 分間加熱した後、20°C、3000 rpm で 5 分間遠心し、この上清を PCR の鋳型 DNA とした。

#### b) PCR による標的遺伝子の増幅

PCR 法で用いたオリゴマーDNA は、dFOR-21 および dREV21R については日本製粉株式会社に依頼し、逆相カートリッジで精製されたものを、dRPOB1F、dRPOB1R、dRPOB2F、および dRPOB2R に関しては北海道システム・サイエンス株式会社に依頼し、ゲルろ過精製されたものを TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl(pH8.0) , 1mM EDTA) に溶解して、-30°C で保存した。使用時は氷上で溶解させ、適当な濃度に希釈して使用した。以下の表 3-6 に、PCR に用いたプライマー配列を示した。

PCR 反応は、TaqDNA ポリメラーゼ (TAKARA 社製)、10×reaction buffer、dNTPmix、適当な 2 種類のプライマー (表 3-6 に記載したものを使用)、上記に記したように作製した鋳型 DNA 1  $\mu$ l を用いた。最終濃度は (10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 各 200  $\mu$ M dNTP,  $1.5 \times 10^{-2}$  U/ $\mu$ l TaqDNA polymerase, 各 4 pmol/ $\mu$ l プライマー) とし、反応液全量を 10  $\mu$ l とした。反応には、Gene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社製) を用いた。反応条件は、*rpsL* を標的遺伝子とした場合には、95°C、1 分の後、サイクルとして変性反応 : 95°C、30 秒、アニーリング反応 : 60°C、30 秒、伸長反応 : 72°C、1.5 分を 30 サイクル繰り返して行い、最後に 72°C で 5 分おくこととした。*rpoB* を標的遺伝子とした場合には、95°C、1 分の後、サイクルとして変性反応 : 95°C、30 秒、アニーリング反応 : 61°C、30 秒、伸長反応 : 72°C、1 分を 30 サイクル繰り返して行い、最後に 72°C で 5 分おくこととした。

表 3-6 シーケンス解析用プライマーリスト

名称	標的遺伝子	プライマー配列
dFOR-21	<i>rpsL</i>	TGTA AACGACGGCCAGTCAGCCAGATGGCCTGGTG
dREV21R	<i>rpsL</i>	CAGGAAACAGCTATGACCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG
dRPOB1F	<i>rpoB</i> クラスタ-1	AATGTCAAATCCGTGGCGT
dRPOB1R	<i>rpoB</i> クラスタ-1	CCAACCGCAGACAAGTCATA
dRPOB2F	<i>rpoB</i> クラスタ-2	CGTCGTATCCGTTCCGTTGG
dRPOB2R	<i>rpoB</i> クラスタ-2	TTCACCCGGATACATCTCGTC

*rpoB* 標的遺伝子のプライマー作製は、Miller *et al.*,1992; Severinov *et al.*, 1993; Garibyan *et al.*,2003 を参考にした。

### c) アガロース電気泳動

前記のような PCR の後に、増幅させた断片については、標的遺伝子の増幅の有無とそのサイズを、アガロースゲル電気泳動にて確認した。

### d) プライマーの除去

PCR 産物からのプライマーの除去には PCR product pre-sequencing kit (usb 社製) を用い、製造元の指示を参考にして精製した。反応には、Exonuclease I、Shrimp alkaline phosphatase、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA) を用いた。最終濃度が (1 mM Tris-HCl(pH 8.0), 100  $\mu$ M EDTA,  $1.0 \times 10^{-2}$  U/ $\mu$ l Exonuclease I,  $2.0 \times 10^{-3}$  U/ $\mu$ l Shrimp alkaline phosphatase) となるように調整し、PCR 反応液 9  $\mu$ l に、上記のものを 1  $\mu$ l 加え、全量を 10  $\mu$ l とした。37°C で 30 分間の酵素反応を行った後、81°C で 30 分間熱処理を行い、酵素を失活させた。これを、次に行うサイクルシーケンスの鋳型 DNA とした。

### e) DNA 塩基配列決定

DNA 塩基配列決定のための蛍光ラベルの検出および解析に用いるシーケンサーは、サンプル数により、3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製)、Megabase 1000 (Amersham pharmacia biotech 社製) のいずれかを用いた。3100 Genetic Analyzer は 16 サンプルごと、Megabase 1000 は 96 サンプルごとに決めて使用した。

#### e) -1 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製)

3100 Genetic Analyzer を使用する場合には、鋳型 DNA、プライマー (表 3-6 に記載したものを使用)、Big dye® terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) を用いた。反応液は 1 サンプルあたり 5  $\mu$ l [5  $\times$  buffer 1  $\mu$ l、Big dye terminator mixture 0.5  $\mu$ l、primer (2 pmol/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、dH<sub>2</sub>O 2.5  $\mu$ l、鋳型 DNA 0.5  $\mu$ l] で作製し、反応には、Gene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社製) を用いた。サイクルシーケンス反応は、95°C、1 分の後、サイクルとして変性反応 : 96°C、10 秒、アニーリング反応 : 50°C、5 秒、伸長反応 : 72°C、4 分を 25 サイクル、繰り返して行った。反応後は、1 サンプルあたり 10~20  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O を加え、未反応 dye terminator の除去のために、ゲル濾過により精製した。ゲル濾過には、Multiscreen N45 (Millipore 社製) に sephadexG-75 (Amersham pharmacia 社製) を約 65  $\mu$ l ずつ詰め、dH<sub>2</sub>O を 300  $\mu$ l 加えて、一晚 (最低 3 時間以上) 膨潤させたものを用いた。使用する際には、2900rpm、20°C で 10 分間遠心することで (BECKMAN

社製 Rotor S4180 Horizontal Rotors)、膨潤に用いた dH<sub>2</sub>O を除き、サイクルシーケンシング反応で得られた反応液を全量アプライした後、再度、2900rpm、20°Cで10分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor S4180 Horizontal Rotors)、精製された反応液を回収した。精製後は、95°Cで3分間熱処理し、氷上で急冷した。このようにして作製したサンプルの塩基配列決定には、3100 Genetic Analyzer を用いた。使用方法は、使用説明書である 3100 Sequencing 簡易操作ガイドに従った。

#### e) -2 Megabase 1000 (Amersham pharmacia biotech 社製)

Megabase 1000を使用する場合には、鋳型DNA、プライマー (Table7に記載したものを使用)、DYEnamicET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham pharmacia biotech社製) を用いた。反応液は、1サンプルあたり5 µlとして作製し (DYEnamicET Terminator Regent Premix 0.5 µl, primer (2pmol/ µl) 0.4 µl, dH<sub>2</sub>O 2.85 µl, 鋳型DNA 0.5 µl)、反応には、Gene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELMER社製) を用いた。サイクルシーケンシング反応は、サイクルとして変性反応：95°C、25秒、アニーリング反応：50°C、20秒、伸長反応：60°C、1分を50サイクル繰り返して行った。反応後は1サンプル当たり10 µlのdH<sub>2</sub>Oを加え、未反応dye terminatorを除去するために、ゲル濾過により精製した。ゲル濾過には、Multiscreen N45 (Millipore社製) にsephadexG-50 (Amersham pharmacia社製) を約65 µlずつ詰めて、dH<sub>2</sub>Oを300 µl加え、一晚 (最低3時間以上) 膨潤させたものを用いた。使用する際には、2000 rpm、20°Cで5分間遠心して (BECKMAN社製 Rotor S4180 Horizontal Rotors)、膨潤に用いたdH<sub>2</sub>Oを除き、サイクルシーケンシング反応で得られた反応液を全量アプライし、2000 rpm、20°Cで5分間遠心し (BECKMAN社製 Rotor S4180 Horizontal Rotors)、精製された反応液を回収した。このようにして作製したサンプルの塩基配列決定には、Megabase 1000を用いた。使用方法は、使用説明書である簡易取扱説明書 Version 2.0に従った。

#### f) シスター変異排除による変異頻度の補正

*rpsL* 前進突然変異検出系では、解析した変異のうち、ある割合で、1つの塩基もしくは1つの領域に、同一の変異が集中する場合がある。これらをシスター変異としている。通常、百細胞程度からスタートし、10<sup>8</sup>細胞程度まで培養するうち、突然変異は最後の数世代の分裂の際に生じていると考えられる。しかし、それ以前の初期の段階で突然変異が生じると、全体の変異のうち、数種類の変異の割合が極めて高くなってしまい、この結果がシスター変異であると考えている。シス

ター変異を含む実験区の各々の変異頻度は、数種類の変異の割合が高いために、正確に算出することができない。そこで本研究では、*rpsL* 前進突然変異検出系を用いる際に、シスター変異を含む実験区に関しては、補正を行った。

補正については、以下に詳細を示した。まず、全ての実験区に関してそれぞれ、検出された変異を部位別種類別に分類した。次に全ての実験区から、部位別種類別の検出数の中央値を算出した。この時、検出数が 0 の実験区に関しては、1 として中央値を算出した。最後に、全実験区の中で、中央値の 5 倍を超える値をシスター変異と考えて排除し、変異頻度の補正を行った。補正した値に関しては、部位別種類別変異頻度（「第 4 章 付録」の項を参照）に赤で記載した。

## 15 UV 感受性試験

NER の過剰発現株において、過剰発現した NER の認識段階に働くタンパクが機能していることを確認するために、*recA* 欠損株で認められる UV 感受性が NER の過剰発現によって回復するのか否かについて、UV 感受性試験により調べた。任意の菌体を LB 5 ml に接種し、終夜培養液を作製した。この培養液を  $10^{-2}$  希釈し、さらに、5 段階、 $1/5$  希釈し、左から順に  $4 \mu\text{l}$  ずつスポットした。スポット後は、 $5 \text{ J/m}^2$  を照射した。UV の照射には、UV Stratalinker 1400 (STRATAGENE 社製) を使用した。UV 照射後は、ただちにアルミホイルで遮光し、 $37^\circ\text{C}$  で一晩、静置培養した。同時に、コントロールとして、UV 照射を行わないものを作製し、両者を比較した。

## 16 SOS 応答の確認

pBR322 に *lac* 遺伝子と UmuDC のプロモーター、*umuD* 遺伝子の全領域と *umuC* 遺伝子の一部分がクローニングされているプラスミド、pSK1002 を MG1655 に形質転換導入し、この大腸菌株を SOS 応答の確認のためのコントロールとした。まず、 $-80^\circ\text{C}$  に保存した任意の菌体を LB プレート上にて、 $30^\circ\text{C}$ 、24 時間画線培養した。次に、ここで得られたシングルコロニーを適当な抗生物質を含む LB 培地 5ml に接種し、 $30^\circ\text{C}$ 、160 rpm/min で 12 時間培養した。この培養液を、glucose minimal medium 5 ml に、 $80 \mu\text{l}$  分を接種した。このような希釈液を、 $37^\circ\text{C}$ 、160 rpm/min で 5 時間振とう培養後、氷上で 20 分間静置した。この時の O.D.<sub>600</sub> の値を測定し、記録した。次に培養液  $500 \mu\text{l}$  を小試験管に移し、Z buffer (pH 7.0) ( $60 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot$

7H<sub>2</sub>O, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50 mM β-メルカプトエタノール) を 500 μl とトルエン 20 μl を加えた後に、10 秒間、vortex をかけた。フタを開けて、37°C、40 分間保温した後、28°C で、5 分間置いた。4.0 mg/ml ONPG を 200 μl 加えた後、37°C、20 分間保温し、発色させた。1M NaCO<sub>3</sub> を 500 μl 加えて反応を停止させた。O.D.<sub>420</sub>、O.D.<sub>550</sub> の値を測定し、O.D.<sub>600</sub>、O.D.<sub>420</sub>、O.D.<sub>550</sub> の値から β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

## 第3章 結果

### 1 自然突然変異の発生における NER の役割

#### a) 自然突然変異の発生における NER の働きは？

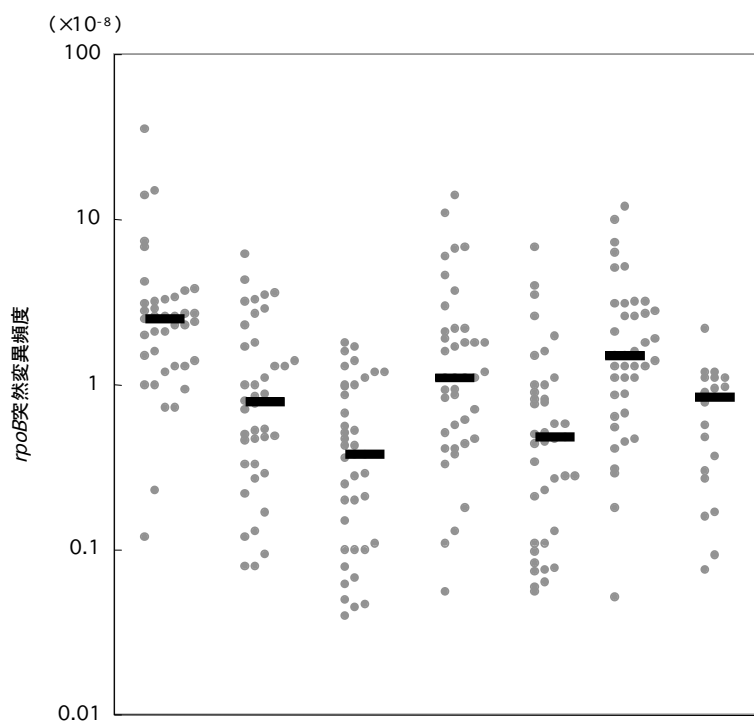
NER は紫外線損傷をはじめとした、比較的大きな損傷の修復に関わる修復機構とされてきた (Selby and Sancar, 1990; Sancar, 1996; Van Houten *et al.*, 2005)。しかし最近の報告によれば、酸化塩基損傷のような小さな損傷に対しても働くことが示されている (Branum *et al.*, 2001)。NER は損傷の種類自体を認識するのではなく、損傷によって生じるゆがみを認識するという性質と、酸化塩基損傷のような小さな損傷に対しても働くという結果から、小さな損傷を含む未知の損傷に対しても働き、自然突然変異の抑制についても重要な働きをしている可能性が考えられた。しかし、NER の自然突然変異に関する報告はいくらかあるものの (Sargentini *et al.*, 1981)、その寄与がどの程度であるのかについては、観察結果が不足しており、明らかにはなされてはいない。このため、NER の自然突然変異の抑制への寄与の程度を明らかにすることを目的として、NER の各段階に働く遺伝子の欠損株を作製し、人為的に変異原を与えない、通常の生育条件下における自然突然変異の発生頻度を調べることにした。

#### b) NER 欠損株における自然突然変異の発生頻度 (*rpoB*)

野生株と NER に関与する遺伝子の欠損株 ( $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株、 $\Delta uvrC$  株、 $\Delta uvrABC$  株、 $\Delta mfd$  株、 $\Delta uvrA \Delta mfd$  株) を、通常の生育条件下で培養し、自然突然変異の発生頻度を求め比較することで、NER の寄与について調べた。変異頻度の測定には、比較的多くの種類の塩基置換を検出することか可能である *rpoB* を標的遺伝子として用いた。変異頻度は、40 から 20 の独立した実験を行い、その中央値を求めることで決定した。上記に示したように、NER は紫外線損傷をはじめとした様々な損傷に働くこととされていることから、通常の生育条件下においても、NER の欠損を加えることにより、塩基置換の発生頻度が上昇することが予想された。

ところが予想に反して、野生株の変異頻度が  $2.5 \times 10^{-8}$  であるのに対し、 $\Delta uvrA$  株では  $0.79 \times 10^{-8}$ 、 $\Delta uvrB$  株では、 $0.38 \times 10^{-8}$ 、 $\Delta uvrC$  株では、 $1.1 \times 10^{-8}$ 、 $\Delta uvrABC$  株では  $0.48 \times 10^{-8}$  であった。野生株と比較すると、それぞれ、 $\Delta uvrA$  株では 0.32





菌株	WT	$\Delta uvrA$	$\Delta uvrB$	$\Delta uvrC$	$\Delta uvrABC$	$\Delta mfd$	$\Delta mfd \Delta uvrA$
実験区数	40	40	40	40	40	40	20
変異頻度 ( $\times 10^{-8}$ )	2.5	0.79	0.38	1.1	0.48	1.5	0.84
-比	(1.0)	0.32	0.15	0.44	0.19	0.60	0.34

図5 NER欠損株における自然突然変異の発生頻度(*rpoB*)

大腸菌野生株及びNER欠損株における自然突然変異の発生頻度を示した。  
40実験区の各実験区の変異頻度を灰色のドット、各実験区の変異頻度から算出した  
中央値を黒のバーで示した。

倍、 $\Delta uvrB$  株では 0.15 倍、 $\Delta uvrC$  株では 0.44 倍、 $\Delta uvrABC$  株では 0.19 倍に、全ての株で野生株よりも塩基置換の発生頻度が低下していた (図 5)。UvrC にはホモログである Cho (UvrC homologues) が存在し、UvrC のみでは除去効率の悪い損傷に対して、損傷の 3'側切断のバックアップすることで、NER による損傷の除去効率を上昇させることが、*in vitro* の実験系により報告されている (Moolenaar *et al.*, 2002)。そこでホモログである *cho* と *uvrC* の二重欠損株を作製し、これについても変異頻度を調べた。しかし二重変異株の変異頻度は、 $1.4 \times 10^{-8}$  となり、野生株と比較して 0.60 倍で、*uvrC* 単独欠損株の値と変わらなかった。このため、*uvrC* 欠損下での、Cho の大きな効果は認められなかった。

以上のような結果から、通常の生育環境下において NER は、自然突然変異の抑制よりもむしろ、一部の自然突然変異の誘発に関わる可能性が示唆された。ただし、 $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株では、リファンピシンに対する感受性が上昇することが明らかになっている。このため、変異頻度の低下の程度を大きく見積もっている可能性がある (詳細については、第 5 章 付録、2 NER 欠損株におけるリファンピシン感受性についての項に記載した)。

次に、転写と共役して損傷を除去する経路 (TCR) のみに働く、Mfd を欠損させた場合の頻度を、野生株の値と比較した。その結果、 $\Delta mfd$  株の変異頻度は、 $1.5 \times 10^{-8}$  であり、野生株と比較して 0.60 倍まで低下していた (図 5)。また、*uvrA mfd* 二重欠損株を用いた場合には、変異頻度が  $0.84 \times 10^{-8}$  で、野生株の 0.34 倍となり、 $\Delta uvrA$  株と同じレベルまで変異頻度が低下していた (図 5)。さらに UvrAB を過剰発現すると、野生株と比較して変異頻度が 6.8 倍にまで上昇するが、*mfd* の欠損を加えると、UvrAB 過剰発現株の 0.74 倍まで低下していた (図 12)。

以上のような結果から、*mfd* の欠損株で認められた変異頻度の低下は、Mfd 単独の働きによって生じたものではなく、NER の経路を通して生じていると考えられた。このことから、NER によって生じる自然突然変異の一部は Mfd を介した、転写と共役した形で生じていることが示唆された。

次に、*rpoB* 標的遺伝子上に生じた変異の中身について調べるために、スペクトラム解析を行った。サンプルは、野生株、NER 欠損株の変異頻度測定の際に、リファンピシン耐性として得られたコロニーから無作為に選択した。サンプル数は、WT については 36 実験区から合計 180 サンプル、 $\Delta uvrA$  株については 34 実験区から合計 170 サンプルとした。

*rpoB* を標的遺伝子とした場合の、野生株、NER 欠損株のスペクトラム解析の結果は図 6-7、表 4-1 に示した。野生株と NER 欠損株のスペクトラム解析の結果を

部位別種類別に分類すると、野生株において2実験区以上で検出された21の変異のうち、443 A→T、1534T→C、1535 C→T、1538 A→T、1546 G→A、1547A→G、1565C→T、1576C→T、1578C→T、1687A→C、1714A→C、1715T→Gのような12のタイプでは、 $\Delta uvrC$ 株、 $\Delta mfd$ 株において、変異頻度が低下するか、検出されなくなっていた(図6)。また、このような部位の多くでは、他のNER欠損株( $\Delta uvrA$ 株、 $\Delta uvrB$ 株、 $\Delta uvrABC$ 株)でも、塩基置換の発生頻度が低下していた(図7)。つまり、特定の部位で生じる塩基置換のいくつかは、NERの働きによって生じている可能性が強く示唆された。

以上のように野生株とNER欠損株を用いた解析から、通常の生育条件下においてNERは自然突然変異を抑制するよりもむしろ、誘発していることが示唆された。

### c) NER欠損株における自然突然変異の発生頻度 (*rpsL*)

同様に、*rpsL*を標的遺伝子とした場合の、NER欠損株における突然変異スペクトラムについても解析し、その結果を野生株のスペクトラムと比較した。結果は、図8、表4-5、4-6に示した。*rpsL*前進突然変異検出系では先に述べたように(「第2章 材料と方法」の項を参照)、塩基置換以外にアリル間組換え、一塩基フレームシフト、欠失、重複、ISのような様々な突然変異が検出される。そこでこれらについて、野生株と $\Delta uvrC$ 株の変異頻度を比較した結果、比較的高頻度に検出されるアリル間組換え、塩基置換、ISについて、大きな差は認められなかった。一塩基フレームシフト、欠失については、若干の低下傾向が認められた。重複についても、若干の低下傾向が認められたが全体に占める検出数が少ないため、議論することは難しい(図8)。塩基置換の発生頻度が変わらないことについては、*rpoB*で得られている結果と矛盾する。しかし*rpsL*遺伝子上で、野生株を用いた場合に検出される塩基置換は、全体の46%を占める一方で、そのうちのホットスポット型塩基置換が占める割合31%は非常に大きい。また、*rpsL*遺伝子上でのホットスポット型塩基置換、G:C→C:GとA:T→T:Aの多くは、酸素ラジカルに依存することが示されている(Sakai *et al.*, 2006)。このことから、酸素ラジカルに依存する塩基置換のホットスポット型塩基置換31%とG:C→C:G、A:T→T:Aトランスバージョン変異4.8%を除くと、NERに依存する可能性がある塩基置換は10%の中で解析することになる(図9)。このため、これらの変異について部位別種類別に分類し、野生株、 $\Delta uvrC$ 株で比較すると、変異頻度に差が見られる部位、つまり*uvrC*の欠損によりその頻度が低下する部位が存在するが(data not shown)、検出数自体は少ないため、さらに解析数を増やさなければ議論しにくい。

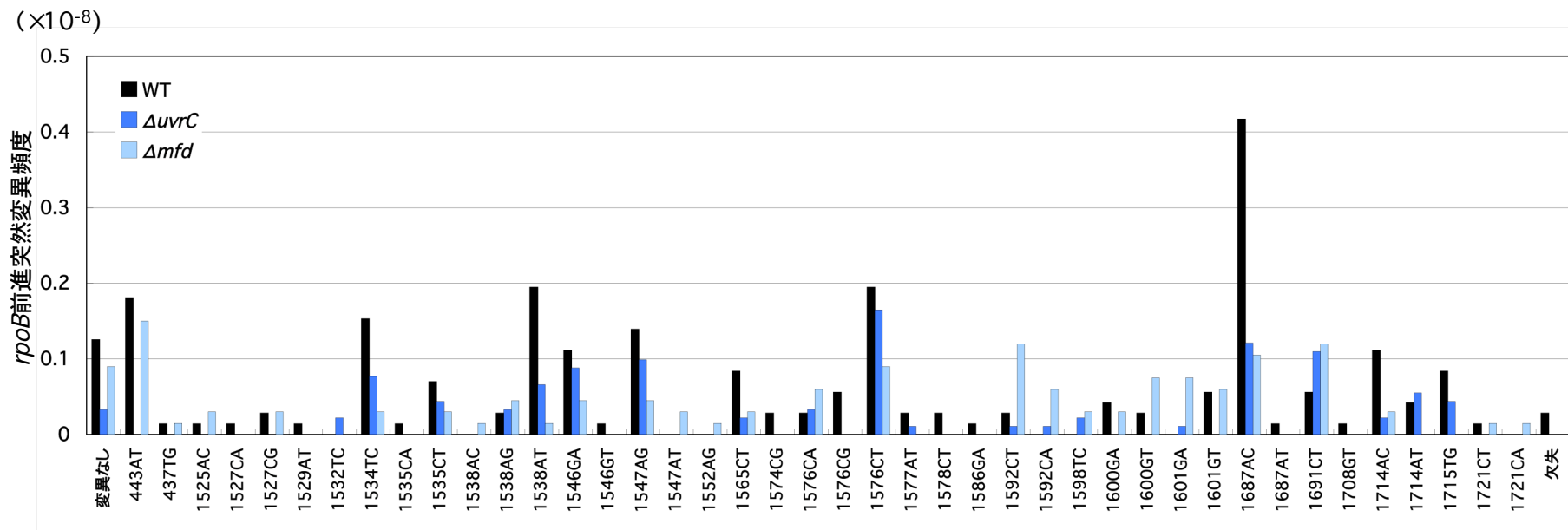


図6 NERの欠損株における部位別種類別の変異頻度 (*rpoB*)

野生株 (180サンプル)、 $\Delta uvrC$ 株 (100サンプル)、 $\Delta mfd$ 株 (100サンプル) のスペクトラム解析結果から、部位別種類別変異頻度をそれぞれ算出し比較した。縦軸には、*rpoB*前進突然変異頻度を、横軸には、変異が検出された部位、元の塩基と置換後の塩基を示した。

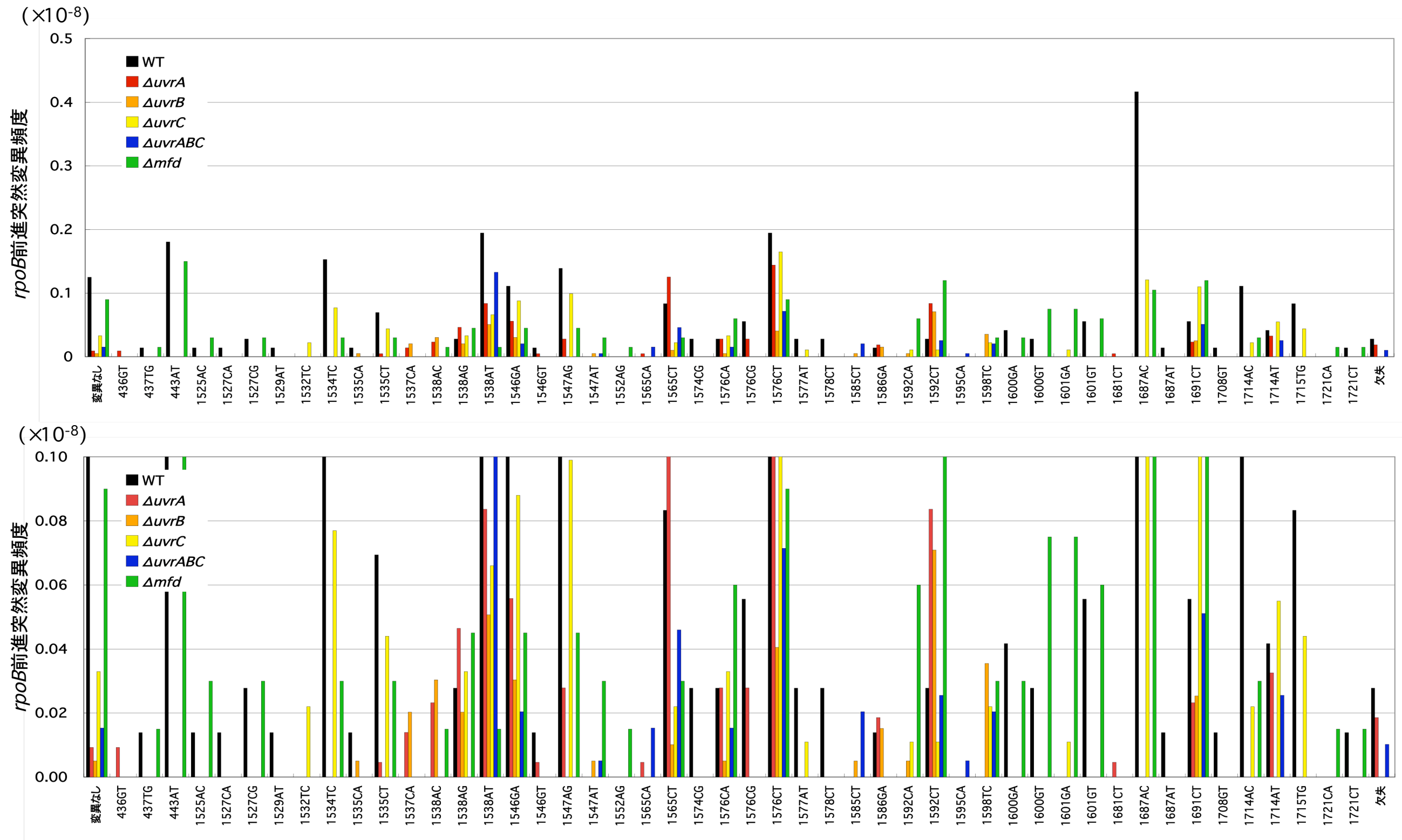
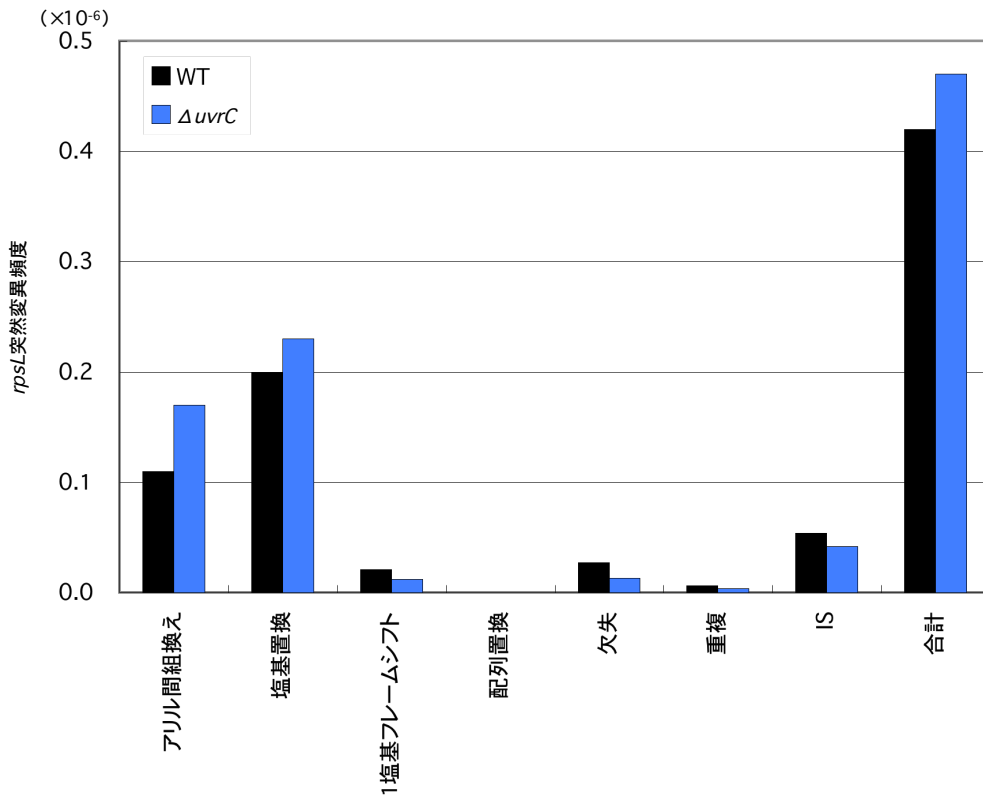


図7 NERの欠損株における部位別種類別の変異頻度 (*rpoB*)

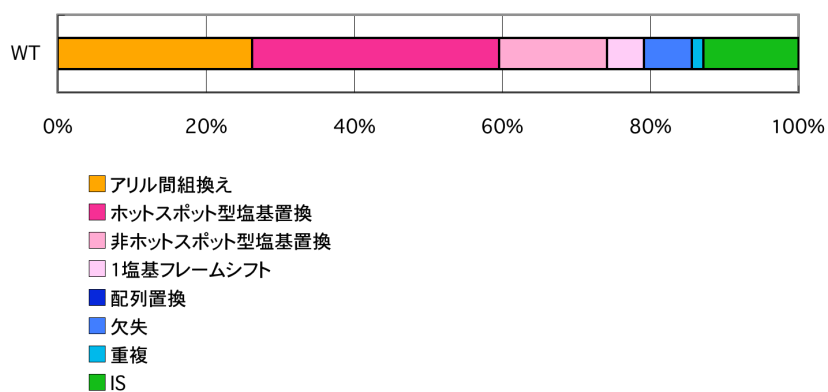
野生株 (180サンプル)、 $\Delta uvrA$ 株 (170サンプル)、 $\Delta uvrB$ 株 (75サンプル)、 $\Delta uvrC$ 株 (100サンプル)、 $\Delta uvrABC$ 株 (94サンプル)、 $\Delta mfd$  (100サンプル) 株のスペクトラム解析結果から、部位別種類別変異頻度をそれぞれ算出し比較した。縦軸には、*rpoB*前進突然変異頻度を、横軸には、変異が検出された部位、元の塩基と置換後の塩基を示した。上の棒グラフは縦軸の最大値を0.50とし、下の棒グラフは縦軸の最大値を0.10とした。



	WT	ΔuvrC
実験区	240×5	48×6
アリル間組換え	0.11	0.17
塩基置換	0.20	0.23
1塩基フレームシフト	0.021	0.012
配列置換	ND	ND
欠失	0.027	0.013
重複	0.0064	0.0039
IS	0.054	0.042
全体	0.42	0.47

図8 NER欠損株における突然変異スペクトラム(*rpsL*)

野生株と ΔuvrC株の変異スペクトラムについて比較した。野生株では5実験区、ΔuvrC株では6実験区の平均値を算出した。



	WT
アリル間組換え	26%
ホットスポット型塩基置換	31%
非ホットスポット型塩基置換	15%
1塩基フレームシフト	4.6%
配列置換	ND
欠失	6.3%
重複	1.7%
IS	15%
その他	0.40%

図9 野生株、NER欠損株における変異の種類別の検出割合(*rpsL*)

野生株の変異スペクトラム解析の結果から、変異の種類別検出割合をまとめた。

#### d) NER 過剰発現株における自然突然変異の発生頻度 (*rpoB*)

NER 欠損株を用いた解析から、NER は自然突然変異の誘発に働いていることが示唆された。そこで NER 過剰発現株を用いても同様の結果が得られるのかについて調べた。

NER 過剰発現株としては、pUVRAB、pUVRABC を野生株である MK811 に形質転換した大腸菌株を用いた。pUVRAB は *uvrAB* 遺伝子、pUVRABC は *uvrABC* 遺伝子がそれぞれ、pBR322 に組み込まれたプラスミドである。またコントロールとして、pBR322 を形質転換した大腸菌株を用いた。

まず、本研究で作製した NER 過剰発現株において、UvrA、UvrB が機能していることを確認するために、下記の報告を参考に実験を行った。*recA* 欠損株において、UvrA、UvrB を過剰発現することにより、*recA* 欠損株で認められていた UV 感受性の一部が回復するという報告がなされている (Kiyosawa *et al.*, 2001)。そこで上記の報告の中で *recA* 欠損株として用いられた FS03 に、本研究で使用した pUVRAB を形質転換し、UV 感受性が回復するのかについて調べた。その結果、形質転換前後を比較すると、UvrA、UvrB の過剰発現により UV 感受性が回復することが確認できた (図 10)。このことから、pUVRAB を形質転換した大腸菌株では、UvrA、UvrB が過剰発現しており、これらは正常に働いていると判断した。

そこでこれまでの実験と同様に、*rpoB* を標的遺伝子として、通常の生育条件下における変異頻度を調べた。変異頻度は、40 の独立した実験を行い、その中央値を求めることで決定した。

その結果、コントロールである WT/vector 株の変異頻度は  $0.79 \times 10^{-8}$  であるのに対し、WT/pUVRAB 株では  $5.4 \times 10^{-8}$ 、WT/pUVRABC 株では  $1.9 \times 10^{-7}$  であり、WT/vector 株と比較して、WT/pUVRAB 株では 6.8 倍に、WT/pUVRABC 株では 24 倍に、それぞれ塩基置換の発生頻度が上昇した (図 11)。さらに、 $\Delta mfd$ /pUVRAB 株の変異頻度は  $4.0 \times 10^{-8}$  となり、WT/pUVRAB 株と比較して 0.74 倍に低下していた。このことから、NER の過剰発現による変異頻度の上昇の一部は、TCR によって生じていることが示唆された。

次に、先に示したのと同様に、各々 NER 過剰発現株について、20 実験区、合計 100 サンプルについてスペクトラム解析を行い、変異の中身について調べた。結果は、図 13、表 4-2 に示した。NER 欠損株において変異頻度が低下していた 12 の変異のうち、443 A→T、1534 T→C、1538 A→T、1546 G→A、1547 A→G、1576 C→T、1714 A→C、1715 T→G のような 8 タイプの塩基置換の発生頻度が、NER 過剰発現株では上昇していた (図 12)。特に、1547 A→G での変異頻度の上昇は



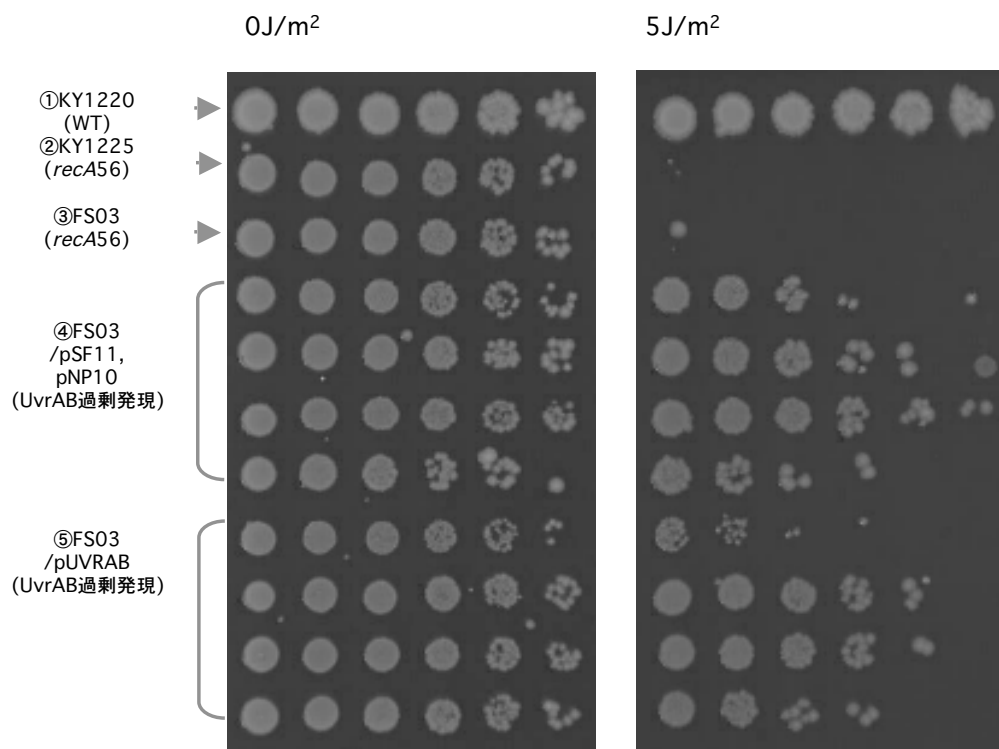
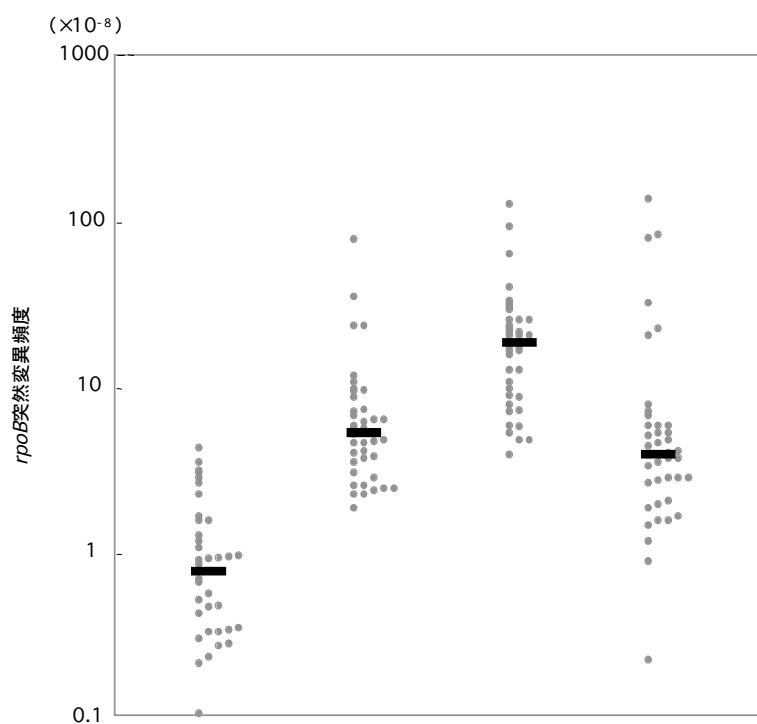


図10 *recA*欠損株において認められるUV感受性のNER過剰発現による回復の確認

上から、①KY1220 (*phr-36::Cm*)、②KY1225 (*recA56 phr-36::Cm Tn10*)、③FS03(*recA56*)、④FS03/pSF11(*uvrA*をクローニングしたもの)、pNP10 (*uvrB*をクローニングしたもの) (①~④東北大学山本和生教授より供与)、⑤FS03/pUVRAB (*uvrAB*をクローニングしたもの、本研究にて作成)とした。終夜培養液の $10^{-2}$ 希釈液を、5段階、1/5希釈していき、4 μlを左から順にスポット後、37°Cで培養した。右のプレートについては、培養前にUV 5J/m<sup>2</sup>を照射した。



菌株	WT /vector	WT /pUVRAB	WT /pUVRABC	$\Delta mfd$ /pUVRAB
実験区数	40	40	40	40
変異頻度 ( $\times 10^{-8}$ )	0.79	5.4	19	4.0
-比	(1.0)	6.8	24	5.1
-比		(1.0)		0.74

図11 NER過剰発現株における自然突然変異の発生頻度(*rpoB*)

大腸菌野生株及びNER過剰発現株における自然突然変異の発生頻度を示した。40実験区の各実験区の変異頻度を灰色のドット、各実験区の変異頻度から算出した中央値を黒のバーで示した。

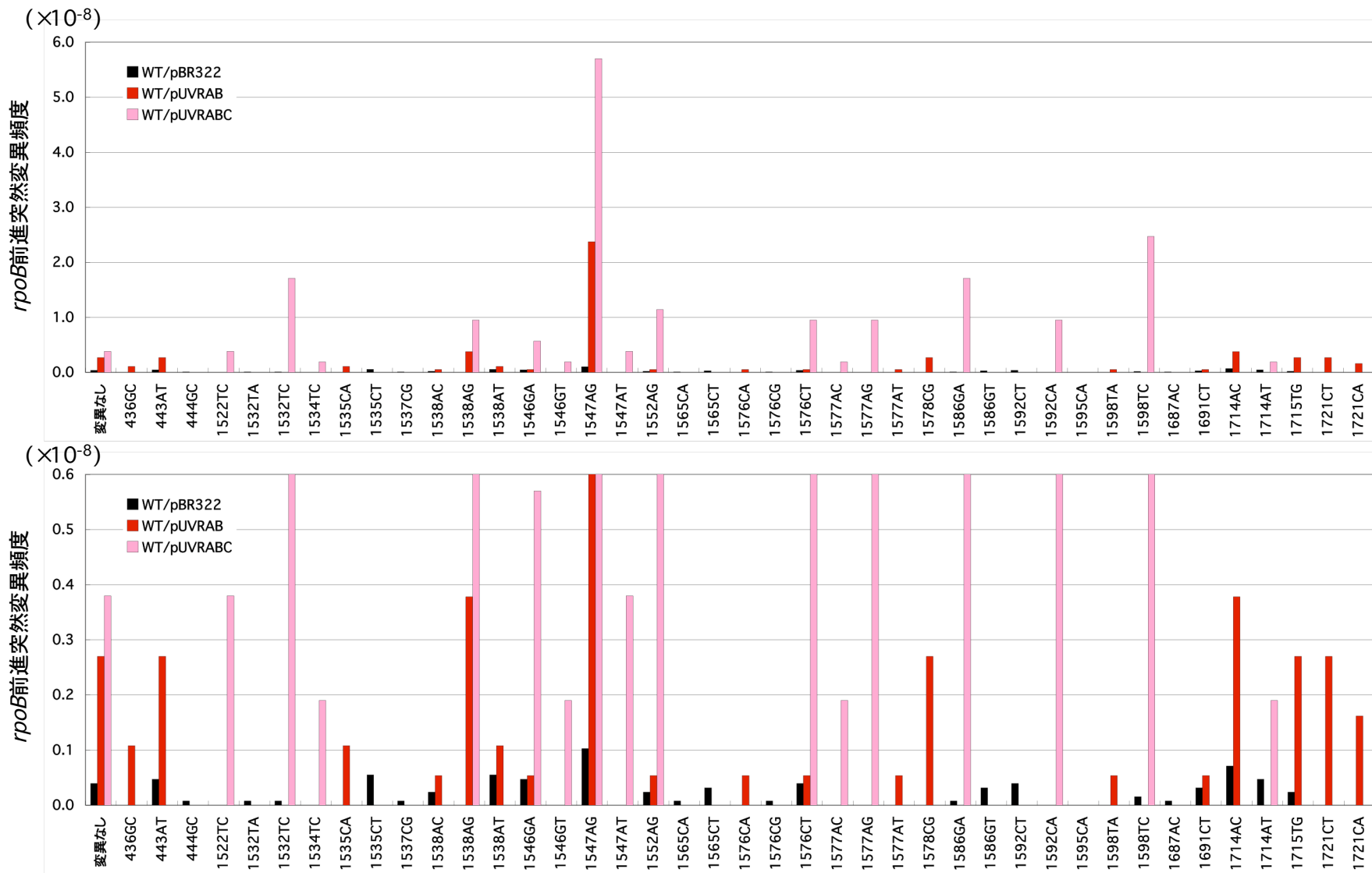


図12 NER過剰発現株における部位別種類別の変異頻度 (*rpoB*)

野生株/vector株 (100サンプル)、野生株/pUVRAB株 (100サンプル)、野生株/pUVRAB株(100サンプル) のスペクトラム解析結果から、部位別種類別変異頻度をそれぞれ算出し比較した。縦軸には*rpoB*前進突然変異頻度を、横軸には変異が検出された部位、元の塩基と置換後の塩基を示した。

顕著であった。このことから、*rpoB* 標的遺伝子上で生じる自然突然変異のうちの一部は、NER に強く依存して生じている変異であることが示唆された。

以上のような事実から、通常の生育条件下では、NER に依存した突然変異が生じていることが確実となった。

#### e) NER 過剰発現株における自然突然変異の発生頻度 (*rpsL*)

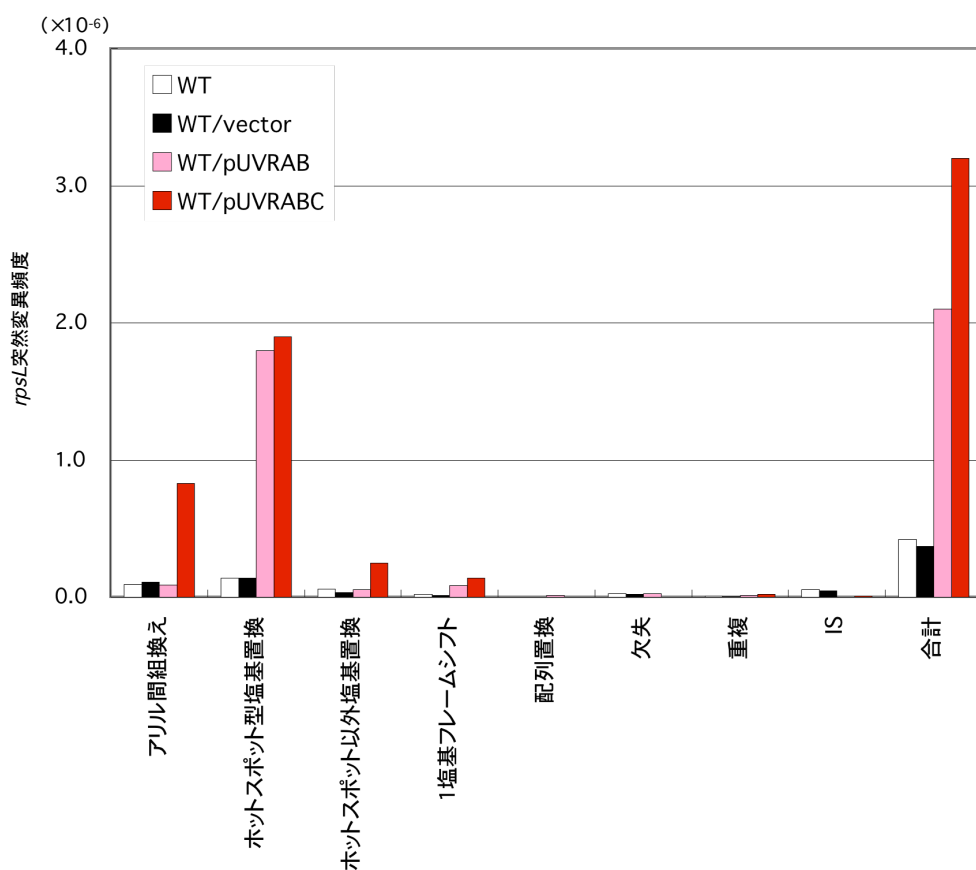
同様に、*rpsL* を標的遺伝子とした場合の、NER 過剰発現下における突然変異の発生頻度についても解析し、その結果を図 14-16、表 4-5-4-8 に示した。

コントロールとした WT/vector の変異頻度は  $0.37 \times 10^{-6}$  であるのに対して、NER 過剰発現株である WT/pUVRAB 株の変異頻度は  $2.1 \times 10^{-6}$ 、WT/pUVRABC 株の変異頻度は  $3.2 \times 10^{-6}$  であった。コントロールの変異頻度を比較するとそれぞれ、5.7 倍、8.6 倍に上昇していた (図 13)。

さらにスペクトラム解析の結果から、NER 過剰発現株で共通に認められた変異頻度の上昇の大部分が、ホットスポット型塩基置換の塩基置換変異の一つ、82C→A に依存することが明らかになった。82C→A だけの上昇率は、WT/pUVRAB 株、WT/pUVRABC 株ともに 44 倍であった (図 14)。

その他の変異のうち、WT/pUVRAB 株、WT/pUVRABC 株の両方で共通して認められた変化は、ホットスポット以外塩基置換、一塩基フレームシフトの上昇であった。まず、ホットスポット以外塩基置換の発生頻度については、コントロールと比較して、WT/pUVRAB 株、WT/pUVRABC 株でそれぞれ、2.5 倍、7.4 倍に上昇していた (図 14)。次に、一塩基フレームシフトの発生頻度については、コントロールと比較して、WT/pUVRAB 株、WT/pUVRABC 株でそれぞれ、6.1 倍、10 倍に上昇していた (図 15)。また WT/pUVRABC 株のみでは、アリル間組換えの発生頻度がコントロールと比較して、7.5 倍に上昇していた。配列置換、欠失、重複、IS については、検出数が少ないことや、実験区による偏りを考慮に入れると、NER に関わるタンパクの過剰発現による影響について議論するのは難しい。全体の検出数のうち、82C→A が検出された割合はそれぞれ、432/552 (75%)、96/192 (50%) であった (表 4-8、4-9)。このため、82C→A 以外の変異の検出数は少なく、議論しづらい面もあるが、NER 過剰発現株において *rpsL* 標的遺伝子上で生じた変異の特徴について、以下にまとめた。

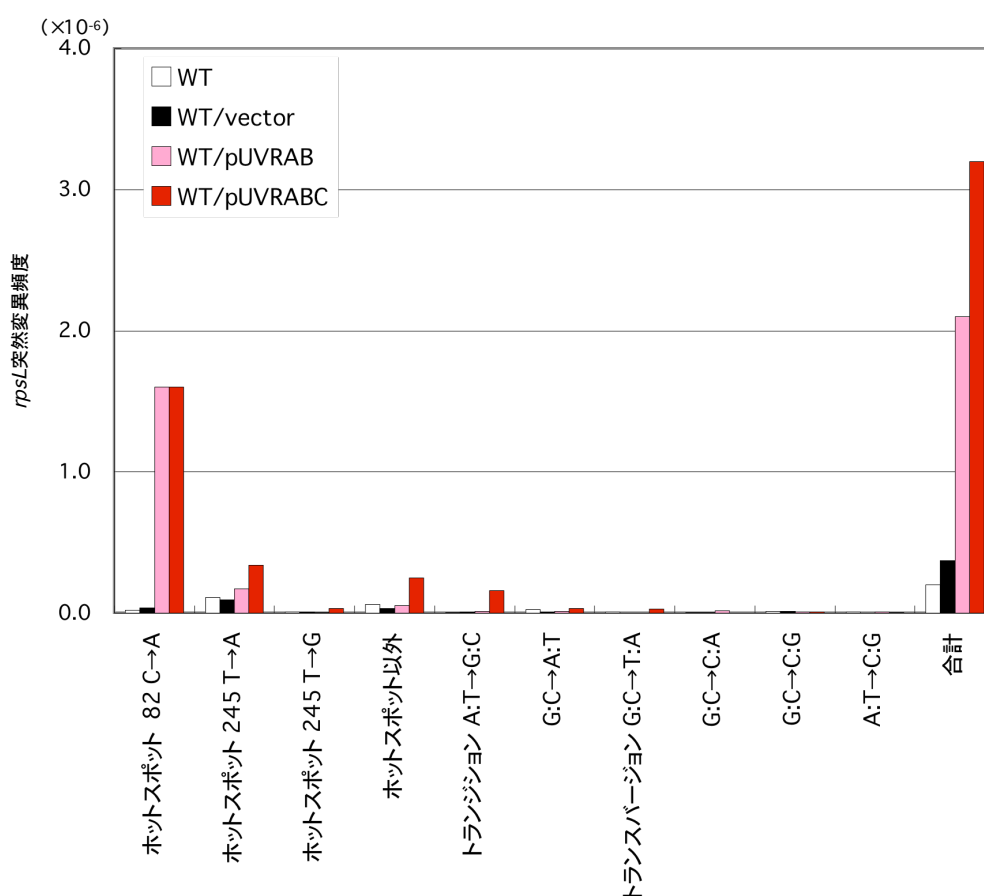
まず NER 過剰発現株では、全体の発生頻度が上昇しており、特に塩基置換、一塩基フレームシフトの発生頻度が上昇していた。このことから、*rpsL* 標的遺伝子上においても、突然変異が誘発されている可能性が示唆された。NER の過剰発現



	WT	WT /vector	WT /pUVRAB	WT /pUVRABC
実験区/サンプル数	240×5	48×2	96×6	48×4
アリル間組換え	0.11	0.11	0.087	0.83
<b>ホットスポット型塩基置換</b>	<b>0.14</b>	<b>0.14</b>	<b>1.8</b>	<b>1.9</b>
ホットスポット以外塩基置換	0.061	0.034	0.055	0.25
<b>1塩基フレームシフト</b>	<b>0.021</b>	<b>0.014</b>	<b>0.086</b>	<b>0.14</b>
配列置換	ND	ND	0.012	ND
欠失	0.027	0.019	0.025	ND
重複	0.0064	0.0043	0.011	0.023
IS	0.054	0.047	ND	0.0089
全体	0.42	0.37	2.1	3.2

図13 NER過剰発現株における突然変異スペクトラム(*rpsL*)

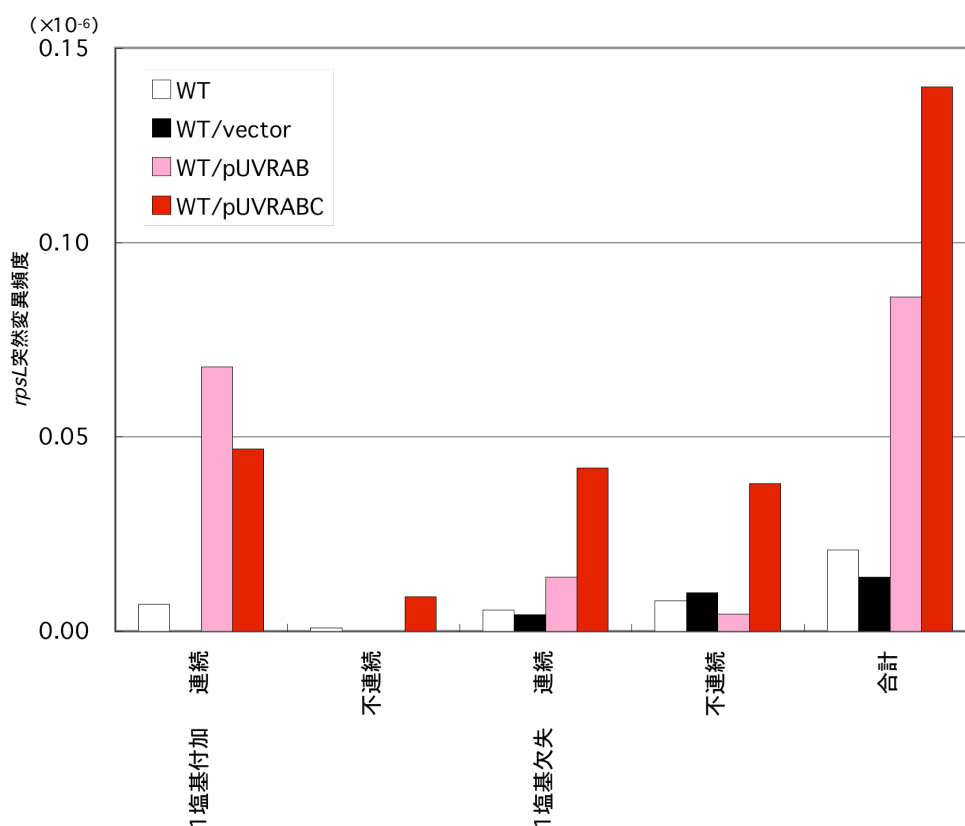
野生株とNER過剰発現株における変異スペクトラム解析の結果を示した。野生株では5実験区、野生株/vectorでは2実験区、野生株/pUVRABでは6実験区、野生株/pUVRABCでは4実験区、それぞれの平均値を算出した。



	WT	WT /vector	WT /pUVRAB	WT /pUVRABC
実験区 / サンプル数	240×5	48×2	96×6	48×4
<b>ホットスポット 82 C→A</b>	<b>0.022</b>	<b>0.037</b>	<b>1.6</b>	<b>1.6</b>
ホットスポット 245 T→A	0.11	0.093	0.17	0.34
ホットスポット 245 T→G	0.0064	0.0076	0.0043	0.034
ホットスポット以外	0.061	0.034	0.055	0.25
トランジション A:T→G:C	0.0044	0.0085	0.012	0.16
G:C→A:T	0.023	0.0067	0.011	0.031
トランスバージョン G:C→T:A	0.0087	ND	ND	0.028
G:C→C:A	0.0059	0.0043	0.017	ND
G:C→C:G	0.011	0.014	0.0075	0.0089
A:T→C:G	0.0081	ND	0.0069	0.0023
合計	0.20	0.37	2.1	3.2

図14 NER過剰発現株における塩基置換変異のスペクトラム (*rpsL*)

野生株とNER過剰発現株における変異スペクトラム解析の結果を示した。野生株では5実験区、野生株/vectorでは2実験区、野生株/pUVRABでは6実験区、野生株/pUVRABCでは4実験区、それぞれの平均値を算出した。



	WT	WT /vector	WT /pUVRAB	WT /pUVRABC
実験区 / サンプル数	240 × 5	48 × 2	96 × 6	48 × 4
<b>1塩基付加</b>				
連続	<b>0.0070</b>	<b>ND</b>	<b>0.068</b>	<b>0.047</b>
不連続	0.00087	ND	ND	0.0089
<b>1塩基欠失</b>				
連続	0.0055	0.0043	0.014	0.042
不連続	0.0078	0.010	0.0044	0.038
合計	0.021	0.014	0.086	0.14

図15 NER過剰発現株におけるフレームシフト変異のスペクトラム (*rpsL*)

野生株とNER過剰発現株における変異スペクトラム解析の結果を示した。野生株では5実験区、野生株/vectorでは2実験区、野生株/pUVRABでは6実験区、野生株/pUVRABCでは4実験区、それぞれの平均値を算出した。

によって過剰な NER 反応が生じた場合、同時に頻度が上昇する修復 DNA 合成時の複製エラーにより、塩基置換や一塩基フレームシフトが引き起こされる可能性が考えられる。しかし、下記に詳細に記載しているように、82C→A の発生に DNA pol I は関与していない可能性が高く、その発生原因に関しては、他の遺伝子の欠損または過剰発現を加えた株を用いた解析を加える必要がある。また WT/pUVRABC 株では、アリル間組換えの頻度が上昇していることから、NER に関わるタンパクの過剰発現によって生じたギャップをアリル間組換えにより修復している可能性も示唆された。

#### f) NER 過剰発現株における SOS 応答の確認

*rpoB* を標的遺伝子とした場合に、NER 欠損株では変異頻度が低下し、NER 過剰発現株では変異頻度が上昇した。また Sancar らは *in vitro* の実験系で、損傷がない DNA と精製した NER タンパクを反応させた場合に、NER の反応の過程で生じるのと同じ、12bp 程度の DNA 断片が観察されることを報告している (Branum *et al.*, 2001)。さらに、NER に関わるタンパクの多くは、複数のシステムによって、その発現量が制御されていることが示唆されており (Selby and Sancar, 1990; Courcelle *et al.*, 2001; Ogasawara *et al.*, 2005; Neher *et al.*, 2006)、過剰な NER 反応を抑制している可能性は十分に考えられる。

通常の生育条件下では、タンパクの発現量がコントロールされているが、低レベルの発現は保たれている。このことから、この一定量の発現が過剰な NER 反応を起こしている可能性が考えられた。この場合、NER を必要とする DNA 損傷がなくても、NER 反応が生じている可能性が考えられる。もしもこの考えが正しいとすれば、DNA 損傷を生じさせる外的な変異原を与えなくても、NER 反応の各段階に働くタンパクを過剰発現させるだけで、NER 反応も促進されると考えられる。大腸菌の NER 反応では、反応中間体として、12bp 程度の一本鎖領域が生じる (Sancar, 1996; Van Houten *et al.*, 2005)。また、一本鎖 DNA 領域が生じることは SOS 応答のシグナルになることが知られている (Friedberg *et al.*, 1995)。これらのことから、もしも NER 反応の過程で生じる一本鎖 DNA 領域が、SOS 応答のシグナルになるとすれば、SOS 応答を検出することで、NER が生じているのか否かについて調べることができると考えた。そこで NER 過剰発現株では、通常の生育条件下でも、SOS 応答が生じるのかについて調べることにした。

NER 過剰発現株としては、pUVRAB、pUVRABC を野生株である MG1655 に形質転換した大腸菌株を用いた。pUVRAB は *uvrAB* 遺伝子、pUVRABC は *uvrABC*



遺伝子がそれぞれ、pBR322 に組み込まれたプラスミドである。またコントロールとして、pBR322 を形質転換した大腸菌株を用いた。

次に SOS 応答の確認には、SOS 応答によって発現量が上昇する UmuDC のプロモーターと遺伝子、またその発現量を調べることができる *lac* 遺伝子をクローニングしたプラスミド、pSK1002 (*umu-lac*) を用いた (Shinagawa *et al.*, 1983)。SOS 応答が起これば、pSK1002 にクローニングされた、*umuDC* プロモーターの発現抑制が外れ、その下流にクローニングされた *lac* 遺伝子の発現が生じる。発現量の変化は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性により確認できるので、この活性の変化から、NER の認識段階、切断段階に働くタンパク、UvrA、UvrB、UvrC を過剰発現することにより、SOS 応答に影響を与えるのかについて調べた。

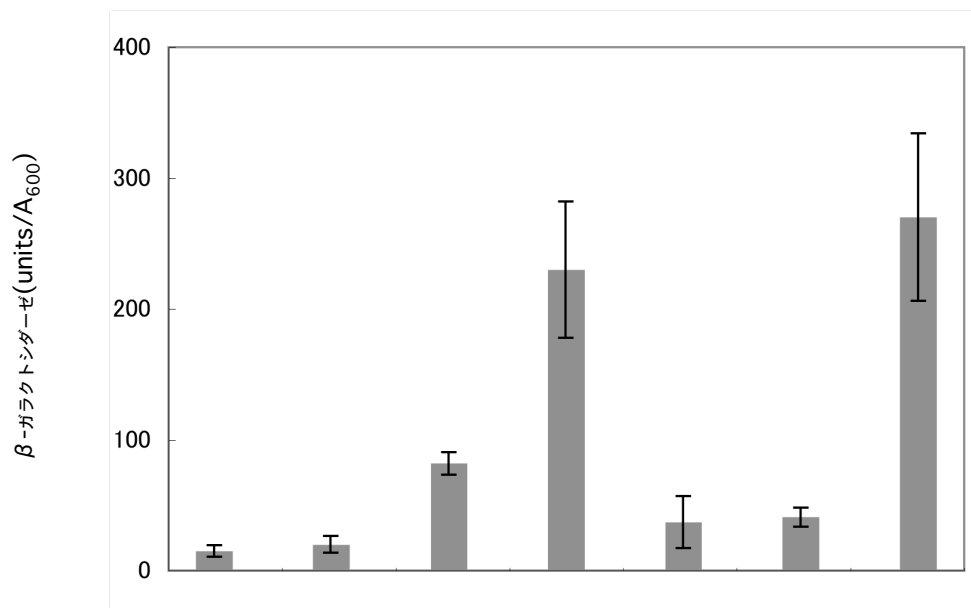
その結果、NER の過剰発現株である、WT /pUVRAB 株、WT /pUVRABC 株では、WT/vector 株と比較してそれぞれ、4.1 倍、12 倍に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が上昇した (図 16)。

NER 反応のうち、DNA 鎖切断に働く UvrC、転写と共役して働く Mfd をそれぞれ、さらに欠損させた場合には、1 本鎖 DNA 領域を作られなくなると考えられる。そこで次に、SOS 応答が誘導されなくなるのか否かについて調べた。その結果、WT/pUVRAB 株と比較して、 $\Delta uvrC$ /pUVRAB 株、 $\Delta mfd$ /pUVRAB 株ではそれぞれ、0.45 倍、0.50 倍に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が低下した (図 16)。また、大腸菌では UV 照射により SOS 応答が誘導されることが知られているので、UV 照射した場合に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が上昇することでこの系が正常に動いていることを確認した (図 16)。

以上のような結果から、NER 過剰発現株では、SOS 誘導が誘発されることが明らかになった。つまり、UvrAB、UvrABC の過剰発現のみで、DNA 損傷を増やさなくても、過剰な NER 反応が促進されることと、この反応過程には、TCR 特異的に働く Mfd が大きく寄与していることが示唆された。

#### g) NER 過剰発現下で生じる SOS 応答に依存した突然変異の有無

NER の過剰発現株では SOS 応答が生じており、これと同時に突然変異の発生頻度が上昇することが明らかになった。このことから、NER の経路のなかで、自然突然変異の一部が生じている可能性が強く示唆されたが、NER の過剰発現により、SOS 応答が生じ、NER の反応経路を介さずに、SOS mutagenesis が生じている可能性が残されている。そこで、SOS 応答を起こすことができない *lexA1(ind<sup>-</sup>)* 株をバックグラウンドとした場合でも、NER の過剰発現により、塩基置換の発生頻度



菌株	WT	WT /vector	WT /pUVRAB	WT /pUVRABC	ΔuvrC /pUVRAB	Δmfd /pUVRAB	WT +UV
β-ガラクトシダーゼ (units/A <sub>600</sub> )	15	20	82	230	37	41	270
-比	(1.0)	1.3					18
-比		(1.0)	4.1	12			
-比			(1.0)		0.45	0.50	

図16 NER過剰発現株におけるSOS応答の確認

大腸菌野生株、NER過剰発現株とさらにNERの欠損を加えた株を用いて、SOS応答への影響（SOS応答によって発現量が上昇する遺伝子の発現量の変化）を調べた。4回の独立した実験を行い、その平均値を棒グラフで示した。また、SD値はエラーバーで示した。

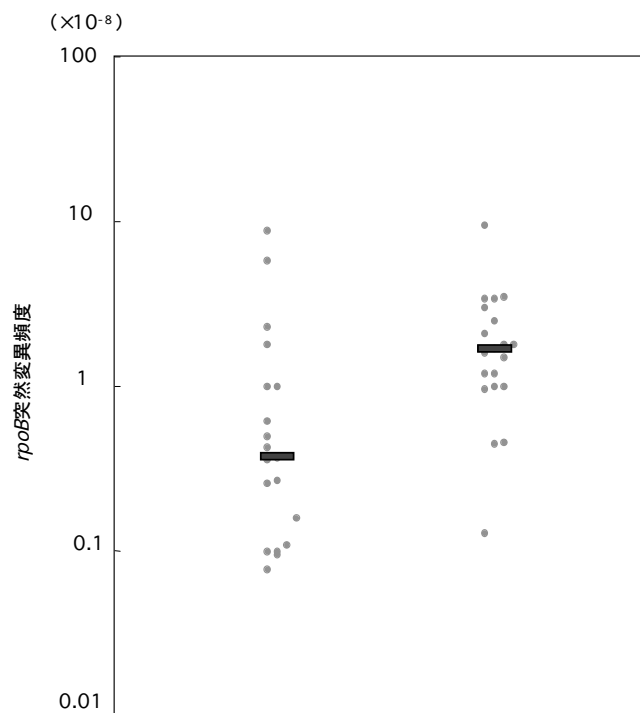
が上昇するののかについて調べた。その結果、*lexA1(ind<sup>-</sup>)/vector* 株の変異頻度は、 $0.38 \times 10^{-8}$  であるのに対し、*lexA1(ind<sup>-</sup>)/pUVRAB* 株の変異頻度は  $1.7 \times 10^{-8}$  であり、*lexA1(ind<sup>-</sup>)/vector* 株と比較して 4.5 倍に上昇していた (図 17)。

このことから、NER過剰発現株において認められた変異頻度の上昇は、SOS mutagenesisには依存せずに生じることが明らかになった。

しかしWT/vector株の変異頻度である $0.79 \times 10^{-8}$ と比較して、*lexA1(ind<sup>-</sup>)/vector*株の変異頻度は、 $0.38 \times 10^{-8}$ と0.48倍まで低下している点を考えると (図17)、通常の生育条件下においても、SOS応答により変異頻度が上昇している可能性が考えられる。また、NER過剰発現株ではSOS応答が生じていることを確認しているが、NERの反応過程で働くUvrA、UvrBは、SOS応答によりその発現量が上昇させることが知られている。これらのことを考慮に入れると、通常の生育条件下、NER過剰発現条件下でSOS応答が生じれば、UvrA、UvrBの発現量が、通常よりも上昇することでさらに塩基置換の発生頻度を上昇させている可能性も考えられる。

#### h) NER 過剰発現による修復 DNA 合成への影響

NERの各段階で働くUvrA、UvrB、UvrC、Cho、UvrD、DNA pol I、DNA リガーゼのうち、UvrA、UvrB、Cho、UvrDはSOS誘導により発現が上昇することが知られているが、UvrCやDNA pol Iの発現量は変わらない。本研究では、一般的にNERにのみ働くとされているUvrA、BとUvrA、B、Cの過剰発現株のみを作製した。しかし、WT/pUVRAB株とWT/pUVRABC株の変異頻度の上昇を比較すると、WT/pUVRAB株では野生株と比較して6.8倍であったのに対し、WT/pUVRAB株では野生株と比較して、24倍まで上昇している (図 12)。NER 過剰発現株では、上記に示したように SOS 応答が生じていることが明らかになっている (図 11)。また、UvrCの発現量は SOS 応答によって変化しないが、UvrDの発現量は SOS 応答によってが上昇する。以上のような点から、WT/pUVRAB株ではUvrABの発現量が増えてもUvrCの発現の部分である程度の抑制がかかるが、WT/pUVRABC株ではUvrCの発現量を上昇させている上に、SOS 応答によりUvrDの発現量も上昇していることが予想される。NERの修復DNA合成に働くとされているDNA pol Iの発現量は、SOS 応答に依存して変動することはない。このためNER 過剰発現下では、DNA pol Iによる修復DNA合成の頻度が上昇する以外に、修復DNA合成時にDNA pol Iが不足することで、その代替経路に進み、ここでも突然変異が誘発されている可能性が考えられる。そこで、DNA pol Iの過剰発現下、非過剰発現下における、NER 過剰発現の影響を *rpoB* 標的遺伝子上で生じる突然変異の発



菌株	<i>lexA1(ind-)/vector</i>	<i>lexA1(ind-)/pUVRAB</i>
実験区数	20	20
変異頻度 ( $\times 10^{-8}$ )	0.38	1.7
-比	(1.0)	4.5

図17 *lexA1(ind-)*株においてNERを過剰発現した場合の自然突然変異の発生頻度(*rpoB*)

大腸菌*lexA1(ind-)/vector*株と*lexA1(ind-)/pUVRAB*株の自然突然変異の発生頻度を示した。20実験区の各実験区の変異頻度を灰色のドット、各実験区の変異頻度から算出した中央値を黒のバーで示した。

生頻度から調べた。

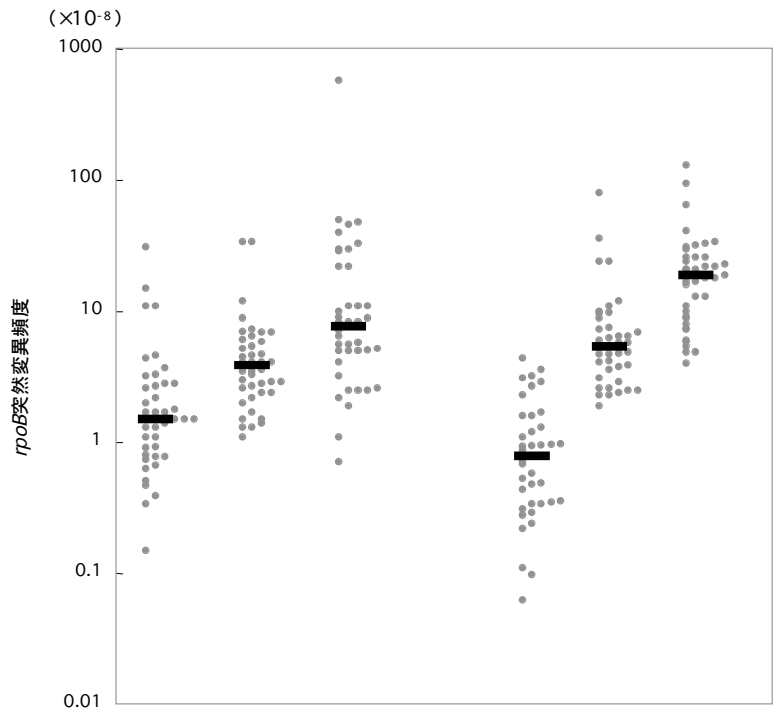
その結果、野生型の DNA pol I を過剰発現した大腸菌株、WT/pPOLA1 株の変異頻度は  $1.5 \times 10^{-8}$  であるのに対し、NER の過剰発現を加えた WT/pPOLA1/pUVRAB 株、WT/pPOLA1/pUVRABC 株の変異頻度は、それぞれ、 $3.9 \times 10^{-8}$ 、 $7.7 \times 10^{-8}$  であり、コントロールと比較してそれぞれ、2.6 倍、5.1 倍に上昇した。このことから、NER 過剰発現株における変異頻度の上昇は、DNA pol I が過剰にある条件下においても認められることが示された 図 18。

しかし一方で、DNA pol I の非過剰発現下における NER 過剰発現株、WT/pUVRAB、WT/pUVRABC と比較して、DNA pol I の過剰発現下における NER 過剰発現株の、WT/pPOLA1/pUVRAB 株、WT/pPOLA1/pUVRABC 株の変異頻度はそれぞれ、0.72 倍、0.41 倍まで低下していた 図 18。このことから、DNA pol I の過剰発現下では塩基置換の発生が抑制されることが示唆され、NER 過剰発現下で DNA pol I が不足した場合には、さらに突然変異を生じやすい機構が働いていることが示唆された。

同様に、*rpsL* を標的遺伝子とした場合の DNA pol I の過剰発現下、非過剰発現下における NER 過剰発現の影響も調べた。上記に記載したように、WT/pUVRAB 株、WT/pUVRABC 株では、全体の変異頻度がコントロールに比べてそれぞれ、5.7 倍、8.6 倍に上昇していた 図 13。また、スペクトラム解析の結果から、この上昇のほとんどがホットスポット型の塩基置換変異の一つ、82C→A に依存することが示唆されている 図 14。しかし、DNA pol I の過剰発現下において、NER を過剰発現した場合には変異頻度の上昇は認められず、82C→A での変異頻度の上昇も確認できなかった 図 19、20。以上のように、*rpsL* を標的遺伝子とした場合の結果からも、NER 過剰発現下では、修復 DNA 合成時に DNA pol I が不足し、何らかの代替経路が働いていることが示唆された。*rpsL* を標的遺伝子とした場合の、突然変異の詳細については、表 4-10 に示した。

#### i) NER 過剰発現による修復 DNA 合成への TLS ポリメラーゼの関与

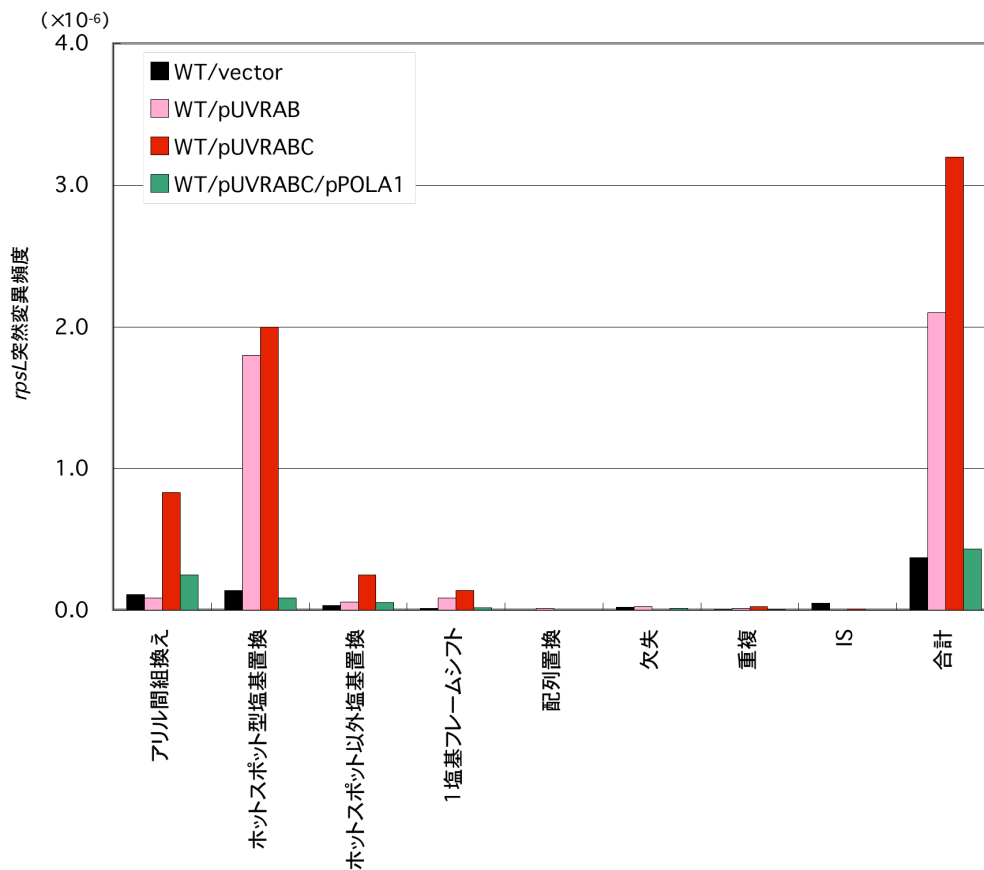
上記に示したように、NER 過剰発現下では、修復 DNA 合成時に DNA pol I が不足し、何らかの代替経路が働いていることが示唆された。この時に働く可能性が考えられる代替経路として、TLS ポリメラーゼである DNA pol II、DNA pol IV、DNA pol V が考えられた。そこで、NER の過剰発現株である WT/pUVRABC 株に、TLS ポリメラーゼの欠損を加えた、 $\Delta polB$ /pUVRABC 株、 $\Delta dinB$ /pUVRABC 株、 $\Delta umuDC$ /pUVRABC 株、 $\Delta polB \Delta dinB \Delta umuDC$ /pUVRABC 株を作製し、同様に変



菌株	WT /pPOLA1 /vector	WT /pPOLA1 /pUVRAB	WT /pPOLA1 /pUVRABC	WT /vector	WT /pUVRAB	WT /pUVRABC
実験区数	40	40	40	40	40	40
変異頻度 (×10 <sup>-8</sup> )	1.5	3.9	7.7	0.79	5.4	19
-比	(1.0)	2.6	5.1			
-比				(1.0)	6.8	24
-比		(1.0)			1.7	
-比			(1.0)			2.5

図18 NER過剰発現株におけるDNA Pol I過剰発現の影響(*rpoB*)

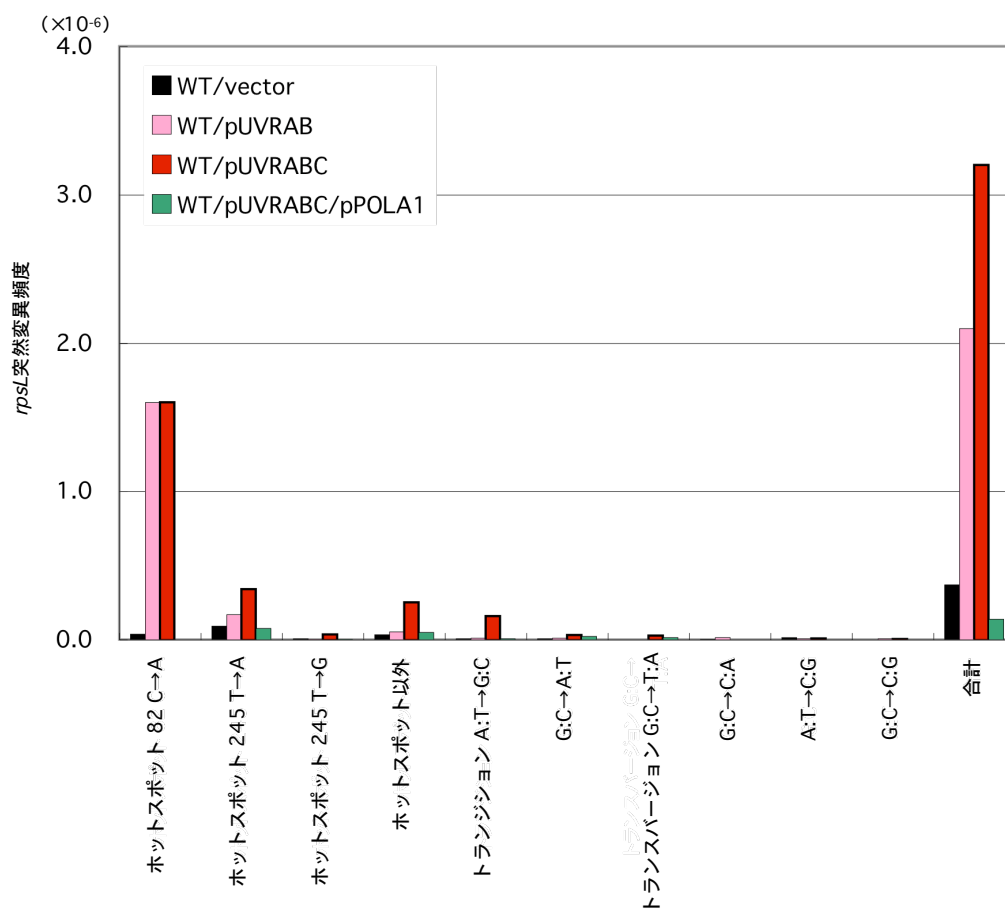
*polA*過剰発現下でのNER過剰発現株の変異頻度の上昇と*polA*非過剰発現下でのNER過剰発現株の変異頻度の上昇について比較した。  
40実験区の各実験区の変異頻度を灰色のドット、各実験区の変異頻度から算出した中央値を黒のバーで示した。



	WT /vector	WT /pUVRAB	WT /pUVRABC	WT /pUVRABC /pPOLA1
実験区	48×2	96×6	48×4	48×4
アリル間組換え	0.11	0.087	0.83	0.25
<b>ホットスポット型塩基置換</b>	<b>0.14</b>	<b>1.8</b>	<b>2.0</b>	<b>0.084</b>
ホットスポット以外塩基置換	0.034	0.055	0.25	0.051
1塩基フレームシフト	0.014	<b>0.086</b>	0.14	0.015
配列置換	ND	0.012	ND	ND
欠失	0.019	0.025	ND	0.011
重複	0.0043	0.011	0.023	0.0045
IS	0.047	ND	0.0089	ND
全体	0.37	2.1	3.2	0.43

図19 NER過剰発現株におけるDNA Pol I過剰発現の影響(*rpsL*)

*polA*過剰発現下での非NER過剰発現株の変異頻度の上昇と*polA*過剰発現下でのNER過剰発現株の変異頻度の上昇について比較した。野生株/vectorでは2実験区、野生株/pUVRABでは6実験区、野生株/pUVRABCでは4実験区、野生株/pUVRABC/pPOLA1では4実験区、それぞれの平均値を算出した。



		WT /vector	WT /pUVRAB	WT /pUVRABC	WT /pUVRABC /pPOLA1
実験区		48×2	96×6	48×4	48×4
<b>ホットスポット</b>	<b>82 C→A</b>	<b>0.037</b>	<b>1.6</b>	<b>1.6</b>	<b>ND</b>
ホットスポット	245 T→A	0.093	0.17	0.34	0.079
ホットスポット	245 T→G	0.0076	0.0043	0.034	0.0045
ホットスポット以外		0.034	0.055	0.25	0.051
トランジション	A:T→G:C	0.0085	0.012	0.16	0.0088
	G:C→A:T	0.0067	0.011	0.031	0.025
トランスバージョン	G:C→T:A	ND	ND	0.028	0.017
	G:C→C:A	0.0043	0.017	ND	ND
	G:C→C:G	0.014	0.0075	0.0089	ND
	A:T→C:G	ND	0.0069	0.0023	ND
合計		0.37	2.1	3.2	0.14

図20 NER過剰発現株におけるDNA Pol I過剰発現の塩基置換変異への影響(*rpsL*)

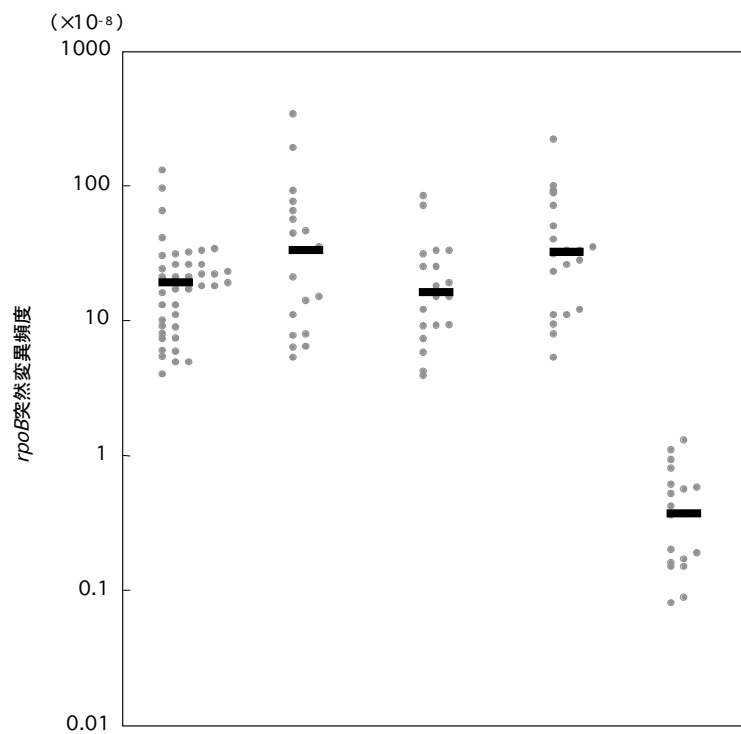
*polA*過剰発現下での非NER過剰発現株の変異頻度の上昇と*polA*過剰発現下でのNER過剰発現株の変異頻度の上昇について比較した。野生株/vectorでは2実験区、野生株/pUVRABでは6実験区、野生株/pUVRABCでは4実験区、野生株/pUVRABC/pPOLA1では4実験区の、それぞれの平均値を算出した。



異頻度測定を行った。その結果、WT/pUVRABC 株の変異頻度が  $19 \times 10^{-8}$  であるのに対して、 $\Delta polB/pUVRABC$  では  $33 \times 10^{-8}$ 、 $\Delta dinB/pUVRABC$  では  $16 \times 10^{-8}$ 、 $\Delta umuDC/pUVRABC$  では  $32 \times 10^{-8}$  であり、コントロールと比較してそれぞれ 1.7 倍、0.84 倍、1.7 倍になった。このことから、DNA pol IV を欠損した株では、若干の変異頻度の低下が認められたが、他の 2 つについては若干上昇が認められ、NER 過剰発現時の TLS ポリメラーゼの単独欠損の影響はほとんど示されなかった。しかし、TLS ポリメラーゼの三重欠損株である  $\Delta polB \Delta dinB \Delta umuDC/pUVRABC$  を用いて変異頻度測定をしたところ、 $0.37 \times 10^{-8}$  になり、WT/pUVRABC と比較して 0.0019 倍までその頻度が低下した。このことから、NER 過剰発現下においては、修復 DNA 合成時に 3 つの TLS ポリメラーゼが協調的に働いている可能性が示唆された (図 21)。

上記に示したように、NER 過剰発現株では SOS 応答が生じていることが示唆されている (図 11)。また TLS ポリメラーゼの発現量は、SOS 応答が生じることにより上昇することが報告されている。この条件下では、DNA pol I よりも TLS ポリメラーゼの細胞内分子数をはるかに多くなっており、より働きやすい状態にあることが予想される。通常条件下での、大腸菌 1 細胞あたりの DNA ポリメラーゼの個数はそれぞれ、DNA pol I が 400、DNA pol II が 50、DNA pol III が 20、DNA pol IV が 250、DNA pol V が 15 であるが、SOS 応答時には DNA pol II が 350、DNA pol IV が 2500、DNA pol V が 500 まで上昇する。また、TLS ポリメラーゼではない DNA pol I、DNA Pol III の個数は変化しない。さらにマウスにおいて、これらの TLS ポリメラーゼのうち、大腸菌の DNA pol IV のホモログにあたる DNA pol  $\kappa$  が、NER の修復 DNA 合成時に働いていることを示唆するデータも報告されている (Ogi and Lehmann, 2006)。以上のような点を考えると、SOS 応答が生じるような条件下では、NER の修復合成時に、TLS ポリメラーゼが使われることで、さらに変異頻度が上昇している可能性も考えられる。

これらの事実から、過剰な NER 反応は SOS 応答を介さなくても生じるが、過剰な NER により SOS 応答が生じることで、NER の反応経路を通じ、様々な因子が働くことで、さらに変異頻度が上昇している可能性が考えられる。



菌株	WT /pUVRABC	$\Delta polB$ /pUVRABC	$\Delta dinB$ /pUVRABC	$\Delta umuDC$ /pUVRABC	$\Delta polB$ $\Delta dinB$ $\Delta umuDC$ /pUVRABC
実験区数	40	20	20	20	20
変異頻度 ( $\times 10^{-8}$ )	19	33	16	32	0.37
-比	(1.0)	1.7	0.84	1.7	0.0019

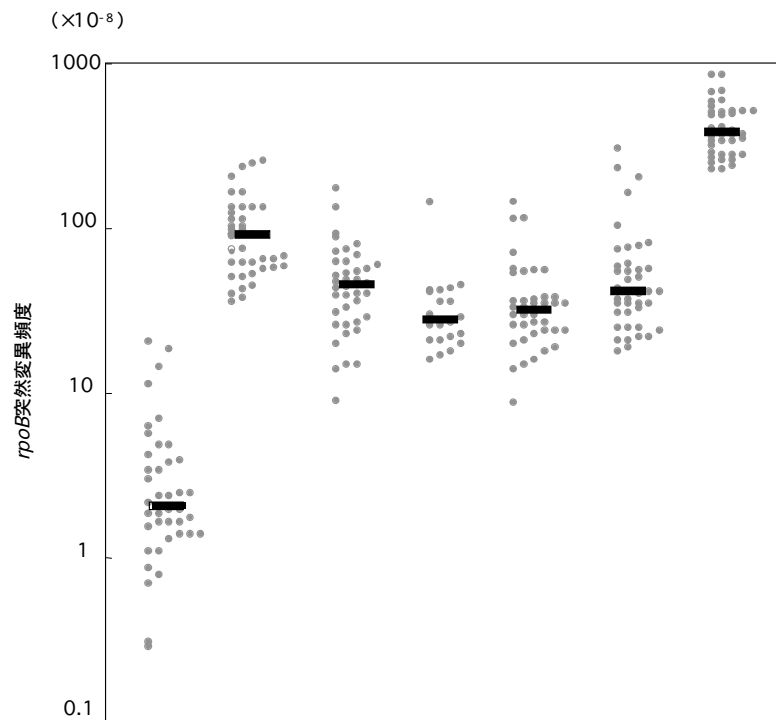
図21 NER過剰発現株における TLSポリメラーゼ欠損の影響(*rpoB*)

大腸菌野生株及びNER欠損株における自然突然変異の発生頻度を示した。  
20-40実験区の各実験区の変異頻度を灰色のドット、各実験区の変異頻度から算出した  
中央値を黒のバーで示した。

## 2 NERによって生じる自然突然変異の一部は修復 DNA 合成時の DNA pol I の複製エラーによって生じていた

### a) DNA pol I の校正機能の欠損株において NER の欠損あるいは過剰発現を加えた場合の自然突然変異の発生頻度 (*rpoB*)

通常の生育条件下においては、過剰な NER が生じているとしても、修復合成の際に DNA pol I が全く複製エラーを起こさなければ、突然変異として DNA 鎖上に固定されることはない。そこで、NER の働きによって生じる突然変異は、DNA pol I の修復 DNA 合成時の複製エラーによって生じている可能性が考えられた。このため、複製エラーを固定しやすい大腸菌株を作製し、NER の修復 DNA 合成時に生じる複製エラーが、通常の生育条件下における自然突然変異の一部の原因になっているのか否かについて調べることにした。具体的には、まず DNA pol I をコードする *polA* を pACYC184 にクローニングしたプラスミド (pPOLA1) と DNA pol I の校正機能である、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の活性部位をアミノ酸置換することで、その活性を失わせたプラスミド (pPOLA2) を作製した (図 3-1、3-2)。次にいずれかのプラスミド保持し、染色体の DNA pol I を欠損した大腸菌株とさらに *uvrA*、*uvrB*、*uvrC*、*mfd* の欠損を加えた大腸菌株を作製した。pPOLA1 を保持している大腸菌株をコントロールとし、pPOLA2 を保持している大腸菌株を DNA pol I の 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の欠損株として用いた。DNA pol I の校正機能である、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の欠損株では、複製エラーを校正できないことから、修復 DNA 合成時の複製エラーも固定されやすくなると考えられる。このため上記のような大腸菌株を用いて、*rpoB* を標的遺伝子とし、通常の生育条件下における変異頻度を調べた。変異頻度は、20 から 40 の独立した実験を行い、その中央値を求めることで決定した。その結果、コントロールとした WT/pPOLA1 株の変異頻度が  $2.0 \times 10^{-8}$  であるのに対し、WT/pPOLA2 株では、 $8.8 \times 10^{-7}$  となり、44 倍に変異頻度が大きく上昇した。さらに *uvrA* の欠損を加えた  $\Delta uvrA$ /pPOLA2 株では  $4.4 \times 10^{-7}$ 、*uvrB* の欠損を加えた  $\Delta uvrB$ /pPOLA2 株では  $2.7 \times 10^{-7}$ 、*uvrC* の欠損を加えた  $\Delta uvrC$ /pPOLA2 株では  $3.1 \times 10^{-7}$ 、*mfd* の欠損を加えた  $\Delta mfd$ /pPOLA2 株では  $4.0 \times 10^{-7}$  であった。WT/pPOLA2 株と比較すると、それぞれ、 $\Delta uvrA$ /pPOLA2 株では 0.50 倍、 $\Delta uvrB$ /pPOLA2 株では 0.31 倍、 $\Delta uvrC$ /pPOLA2 株では 0.35 倍、 $\Delta mfd$ /pPOLA2 株では 0.45 倍となり、NER の欠損を加えることで変異頻度が低下していた (図 22)。以上のような結果から、DNA pol I の校正機能の欠損により上昇した塩基置換のうち半分以上は、NER の修復 DNA 合成の際に



菌株	WT /pPOLA1	WT /pPOLA2	$\Delta uvrA$ /pPOLA2	$\Delta uvrB$ /pPOLA2	$\Delta uvrC$ /pPOLA2	$\Delta mfd$ /pPOLA2	WT /pPOLA2 /pUVRAB
実験区数	40	40	40	20	40	40	40
変異頻度 ( $\times 10^{-8}$ )	2.0	88	44	27	31	40	370
-比	(1.0)	44					
-比		(1.0)	0.50	0.31	0.35	0.45	4.2

図22 *polA3'*→*5'exo*株においてNERを欠損、過剰発現した場合の自然突然変異の発生頻度(*rpoB*)

*polA3'*→*5'exo*株とさらにNERを欠損あるいは過剰発現を加えた株における自然突然変異の発生頻度を示した。40実験区の各実験区の変異頻度を灰色のドット、各実験区の変異頻度から算出した中央値を黒のバーで示した。

生じていることが示唆された。また、*mfd* の欠損株で認められた変異頻度の低下は、NER の経路を通じてのものと考えられるので、NER によって生じる突然変異の多くは TCR の経路を通して生じていることが示唆された。

次に、DNA pol I の校正機能の欠損に UvrAB の過剰発現を加えた株を用いて変異頻度を調べた結果、WT/pPOLA2/pUVRAB 株の変異頻度は  $3.7 \times 10^{-6}$  であり、WT/pPOLA2 株と比較すると変異頻度は 4.2 倍に上昇した。以上のような結果から、NER を過剰発現すると、DNA pol I の校正機能の欠損により上昇した変異頻度よりもさらに、その変異頻度が上昇することが明らかになった。

以上のような結果から、通常の生育条件下においては、過剰な NER 反応が生じており、このことが修復 DNA 合成の頻度を上昇させたと考えられる。DNA pol I の複製エラーは一定の頻度で生じることから、修復 DNA 合成の頻度が上昇すれば、その複製エラーが生じる頻度も上昇することが示唆される。つまり通常の生育条件下では、過剰な NER 反応と、その反応過程で生じる複製エラーが自然突然変異の一部を誘発していることが示唆された。

同様にそれぞれの大腸菌株について、20 実験区から、合計 100 サンプルのスペクトラム解析を行い、部位別種類別に分類した結果を、図 23～25、表 4-3、4-4 に示した。このうち、WT/pPOLA2 株において 2 実験区以上で検出されたもののみで考えると、1525A→C、1532T→C、1532T→G、1534T→C、1538A→C、1538A→G、1538A→T、1546G→A、1547A→G、1552A→G、1577A→T、1592C→T、1598T→C、1601G→A、1714A→T のような 15 タイプの塩基置換の発生頻度が、さらに *uvrC*、*mfd* の欠損を加えることで低下していた（図 23）。また、*uvrA*、*uvrB* の欠損を加えた場合にもほぼ同様の結果が得られており、上記に示した 15 タイプのうち 13 の塩基置換の発生頻度が低下していた（図 24）。同様に、UvrABC の過剰発現を加えた場合にも、NER の欠損を加えることで低下した部位のうち、1532T→C、1538A→G、1546G→A、1547A→G、1552A→G、1598T→C、1714A→T のような 7 タイプの塩基置換の発生頻度が、WT/pPOLA2 株よりも上昇した（図 25）。

#### b) DNA pol I の校正機能の欠損株において NER の欠損あるいは過剰発現を加えた場合の自然突然変異の発生頻度 (*rpsL*)

次に、*rpsL* 前進突然変異検出系を用いて同様の実験を行った。*rpsL* 前進突然変異検出系を用いた場合に、野生株では、全体の突然変異の 6 割弱をアリル間組換えとホットスポット型塩基置換が占め（図 9）、その他塩基置換や一塩基フレームシフトの占める割合は非常に低い。このため、野生株と NER 欠損株における変異

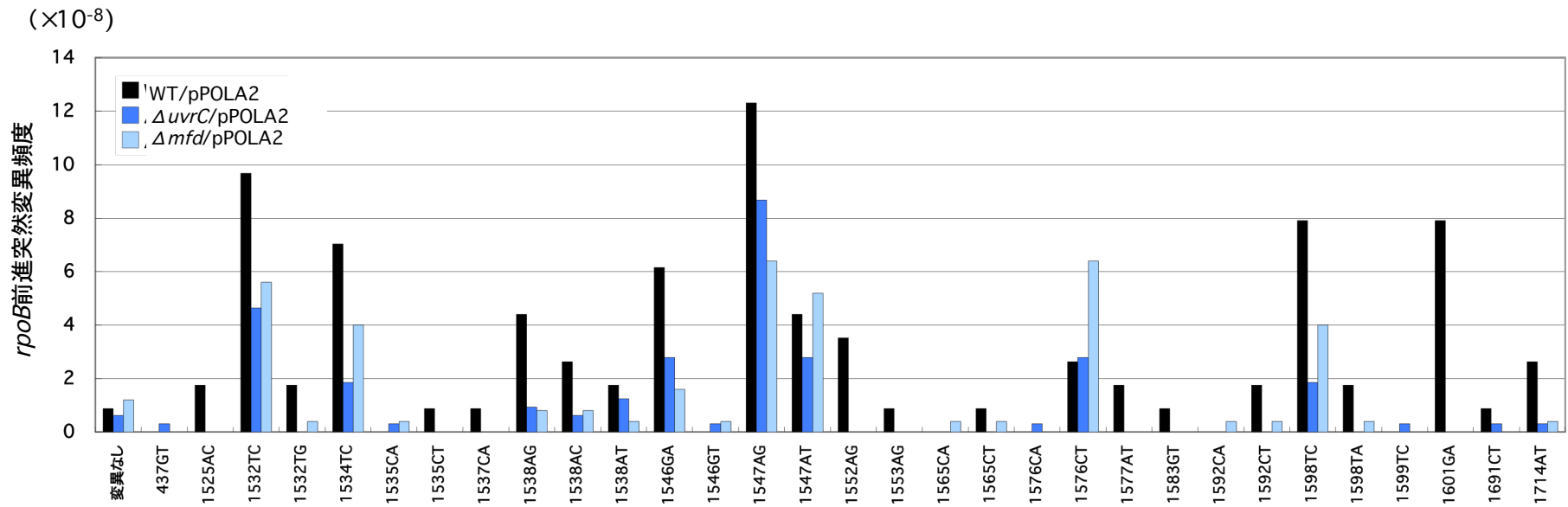


図23 *polA3'*→5' *exo*株においてNERを欠損させた場合の自然突然変異の発生頻度 (*rpoB*)

野生株/pPOLA2株 (100サンプル)、 $\Delta uvrC$ /pPOLA2株 (100サンプル)、 $\Delta mfd$ /pPOLA2株 (100サンプル) のスペクトラム解析結果から、部位別種類別変異頻度をそれぞれ算出し比較した。横軸には、変異が検出された部位、元の塩基と置換後の塩基を示した。

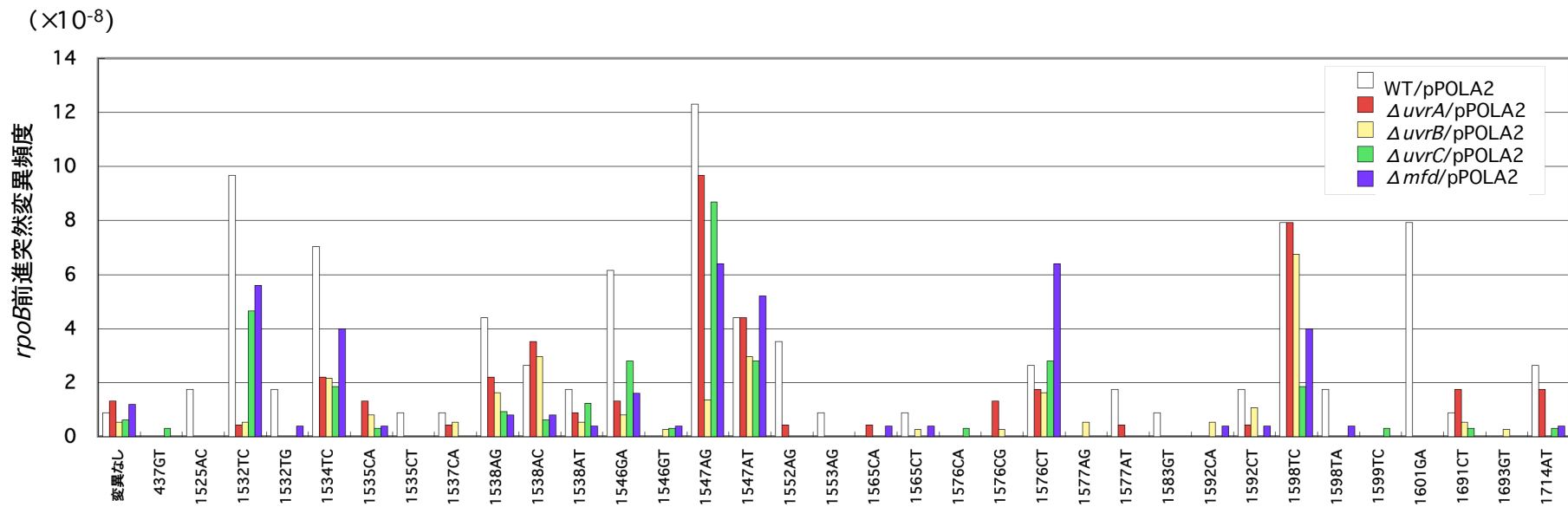


図24 *polA3'*→5' *exo*株においてNERを欠損させた場合の自然突然変異の発生頻度 (*rpoB*)

野生株/pPOLA2株 (100サンプル)、 $\Delta uvrA$ /pPOLA2株 (100サンプル)、 $\Delta uvrB$ /pPOLA2株 (100サンプル)、 $\Delta uvrC$ /pPOLA2株 (100サンプル)、 $\Delta mfd$ /pPOLA2株 (100サンプル) のスペクトラム解析結果から、部位別種別変異頻度をそれぞれ算出し比較した。横軸には、変異が検出された部位、元の塩基と置換後の塩基を示した

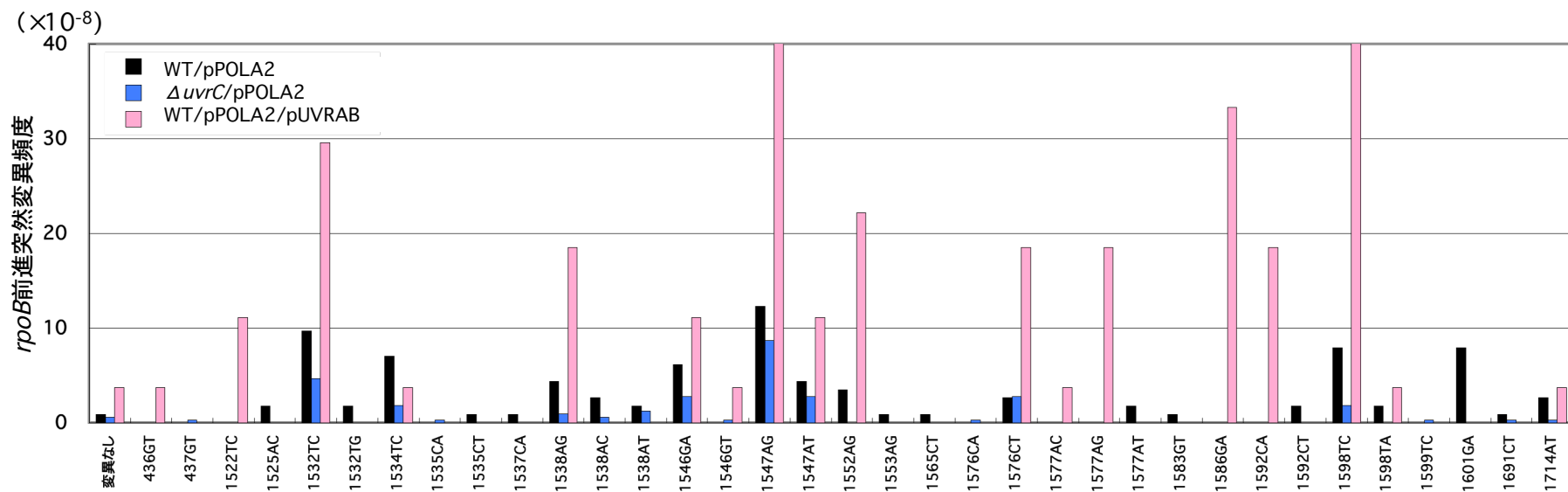
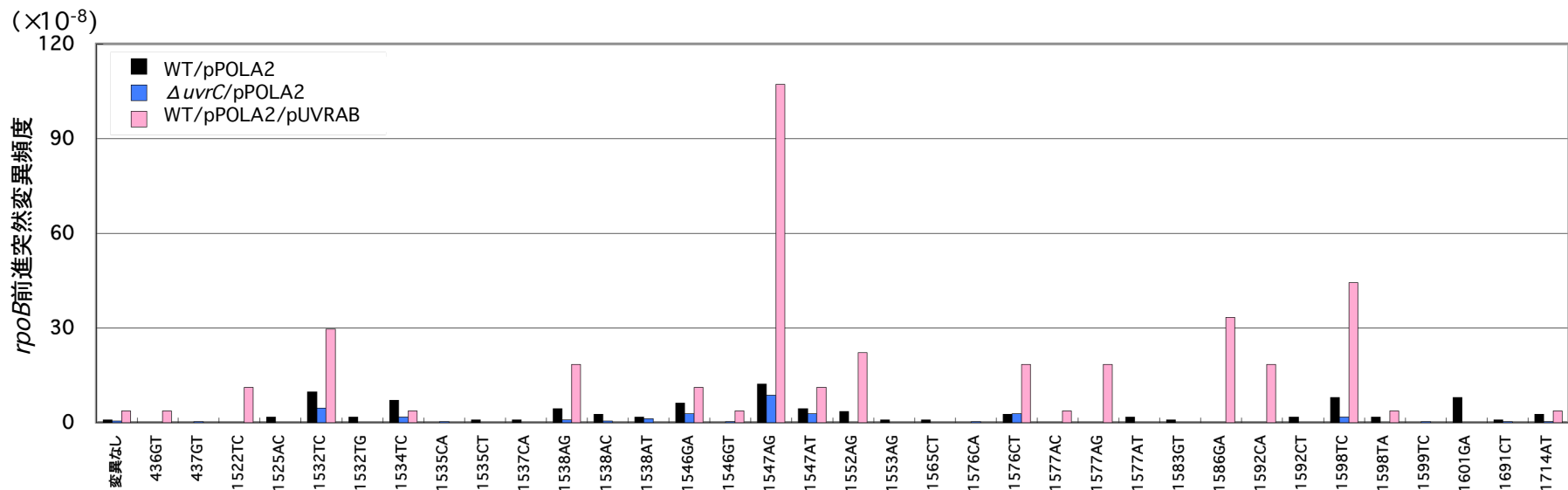


図23 *polA3'→5'exo*株においてNERを欠損させた場合の自然突然変異の発生頻度 (*rpoB*)

野生株/pPOLA2株 (100サンプル)、 $\Delta uvrC$ /pPOLA2株 (100サンプル)、 $\Delta mfd$ /pPOLA2株 (100サンプル) のスペクトラム解析結果から、部位別種別変異頻度をそれぞれ算出し比較した。横軸には、変異が検出された部位、元の塩基と置換後の塩基を示した。



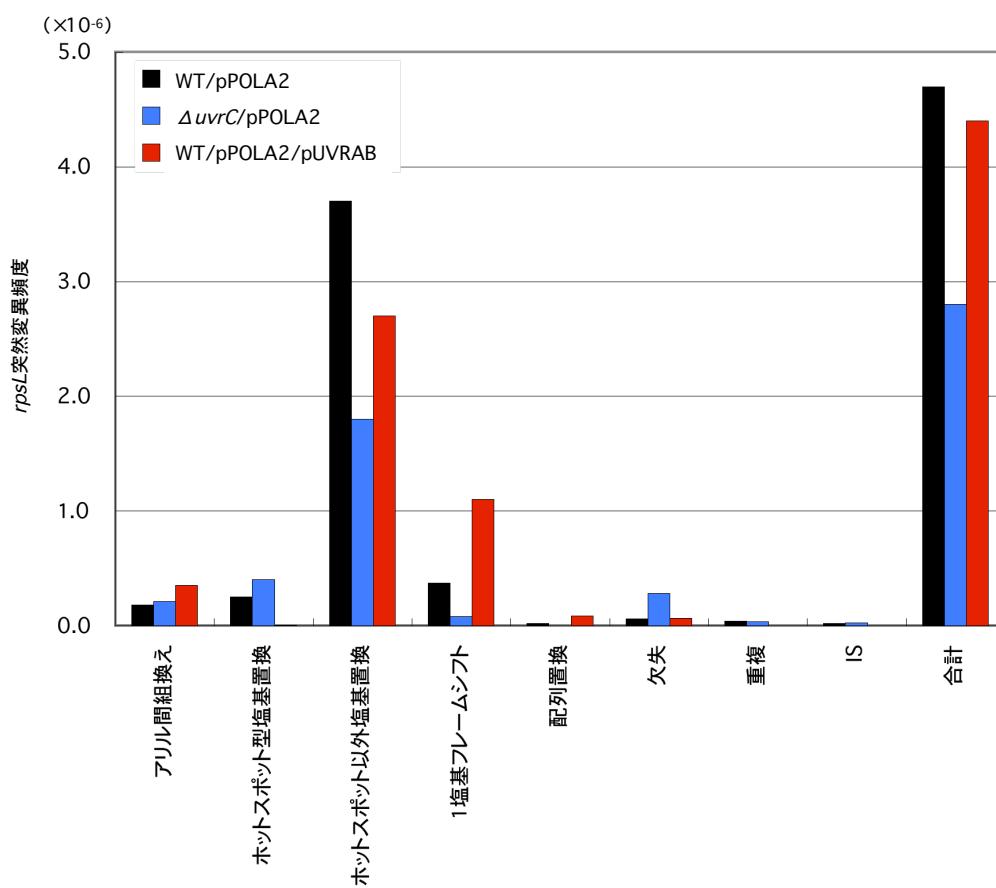
チ感の発生頻度について、*rpsL* 前進突然変異検出系を用いて比較することは難しい。しかし、DNA pol I の 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を欠損した大腸菌株では、複製エラーを起こしやすいことから、ホットスポット型以外の塩基置換や一塩基フレームシフトの発生頻度が上昇する。このため、*rpsL* 前進突然変異検出系を用いた比較が可能となり、NER に起因する突然変異に関して、*rpoB* 以外の標的遺伝子を用いた場合の情報を得ることができる。

全体の変異頻度は、WT/pPOLA2 株で  $4.7 \times 10^{-6}$ 、 $\Delta uvrC$ /pPOLA2 株で  $2.2 \times 10^{-6}$  であり、*uvrC* を欠損させることで 0.60 倍に低下していた (図 26)。また、変異の種類ごとに分類すると、ホットスポット以外の塩基置換が全体の変異の大部分を占めていた。NER が原因となり生じる突然変異は、ホットスポット以外の塩基置換と一塩基フレームシフトであると考えられる。そこでこの二つに特に着目すると、WT/pPOLA2 株と比較して、*uvrC* を欠損させることでホットスポット以外の塩基置換は 0.49 倍に、一塩基フレームシフトは 0.22 倍に低下していた。ホットスポット以外の塩基置換については、A:T→G:C を除くすべての種類の変異頻度が低下しており、特に A:T→G:C の低下の程度は大きい (図 27)。また、一塩基フレームシフトについては、塩基が連続した配列での一塩基付加、一塩基欠失の発生が低下していた (図 28)。さらに、ホットスポット以外の塩基置換について部位別種類別に分類すると、*rpoB* を標的とした場合と同様に部位依存的に塩基置換の発生頻度が低下する部位が認められた (data not shown)。

次に、DNA pol I の 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の欠損株で、さらに UvrAB の過剰発現させた WT/pPOLA2/pUVRAB 株を用いて、同様の解析を行った。その結果、WT/pPOLA2/pUVRABC 株の全体の変異頻度は  $4.4 \times 10^{-6}$  であり、WT/pPOLA2 株と比較して 0.94 倍と同程度の値であった (図 26)。また、ホットスポット以外の塩基置換についても  $2.7 \times 10^{-6}$  であり、WT/pPOLA2 株と比較して 0.73 倍と同程度の値であった (図 26)。ただし、ホットスポット以外の塩基置換について部位別種類別に分類すると、*uvrC* の欠損を加えることで変異頻度が低下していた部位の中に、UvrABC の過剰発現を加えることで変異頻度が上昇する部位が存在した (data not shown)。また一塩基フレームシフトについては、 $1.1 \times 10^{-6}$  であり、WT/pPOLA2 株と比較して 3.0 倍に上昇していた。特に、塩基が連続した配列での一塩基付加の上昇は大きい (図 28)。結果の詳細は表 4-11~13 に示した。

以上のような結果から、DNA pol I の校正機能の欠損により上昇した突然変異のうち、一部のホットスポット以外の塩基置換と大部分の一塩基フレームシフトは NER の働きに依存することが示唆された。これらのことから、NER によって誘発

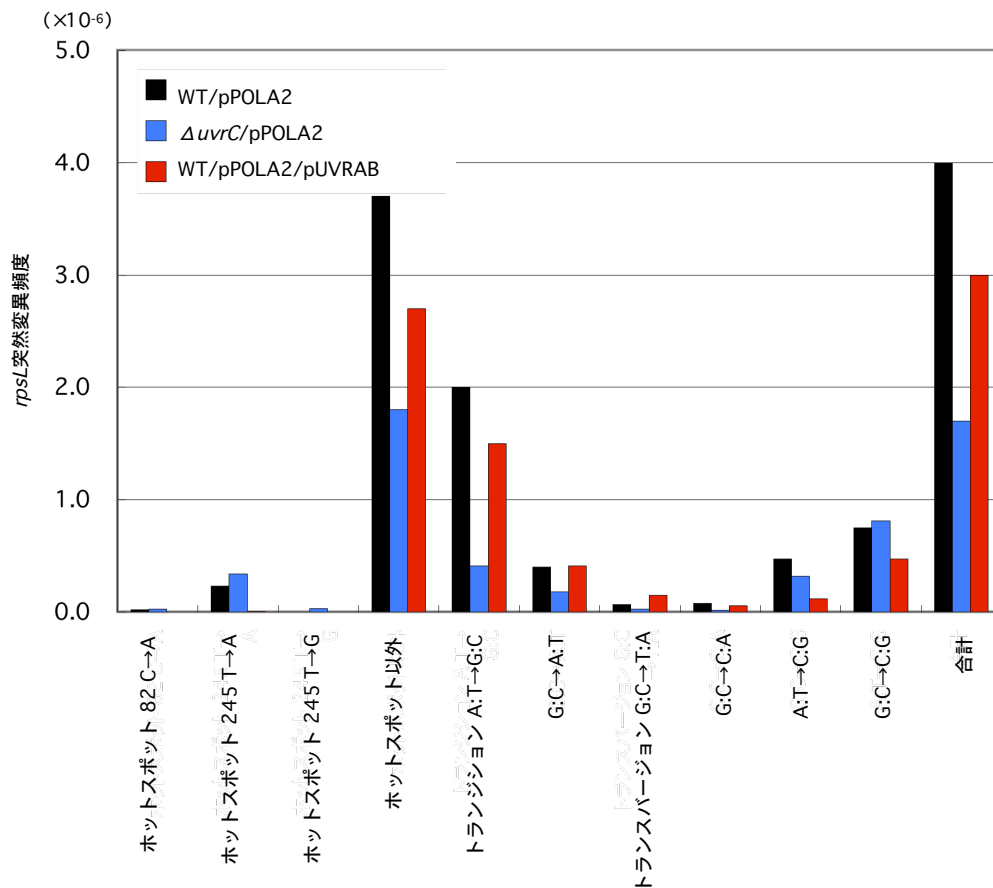
される自然突然変異は *rpoB* 遺伝子を標的とした場合以外にも、*rpsL* 遺伝子を標的とした場合に、一部の条件ではあるが観察することができた。このことから、このような変異はゲノム上のいくつかの場所で生じていること可能性が示唆された。



	WT /pPOLA2	$\Delta uvrC$ /pPOLA2	WT /pPOLA2 /pUVRAB
実験区	96×6	96×6	96×6
アリル間組換え	0.18	0.21	0.35
ホットスポット型塩基置換	0.25	0.40	0.0049
<b>ホットスポット以外塩基置換</b>	<b>3.7</b>	<b>1.8</b>	2.7
<b>1塩基フレームシフト</b>	<b>0.37</b>	<b>0.081</b>	<b>1.1</b>
配列置換	0.021	ND	0.083
欠失	0.059	0.28	0.066
重複	0.039	0.035	ND
IS	0.021	0.025	ND
全体	4.7	2.8	4.4

図26 *polA3'*→5' *exo* 株にNERの欠損あるいは過剰発現を加えた場合の突然変異スペクトラム (*rpsL*)

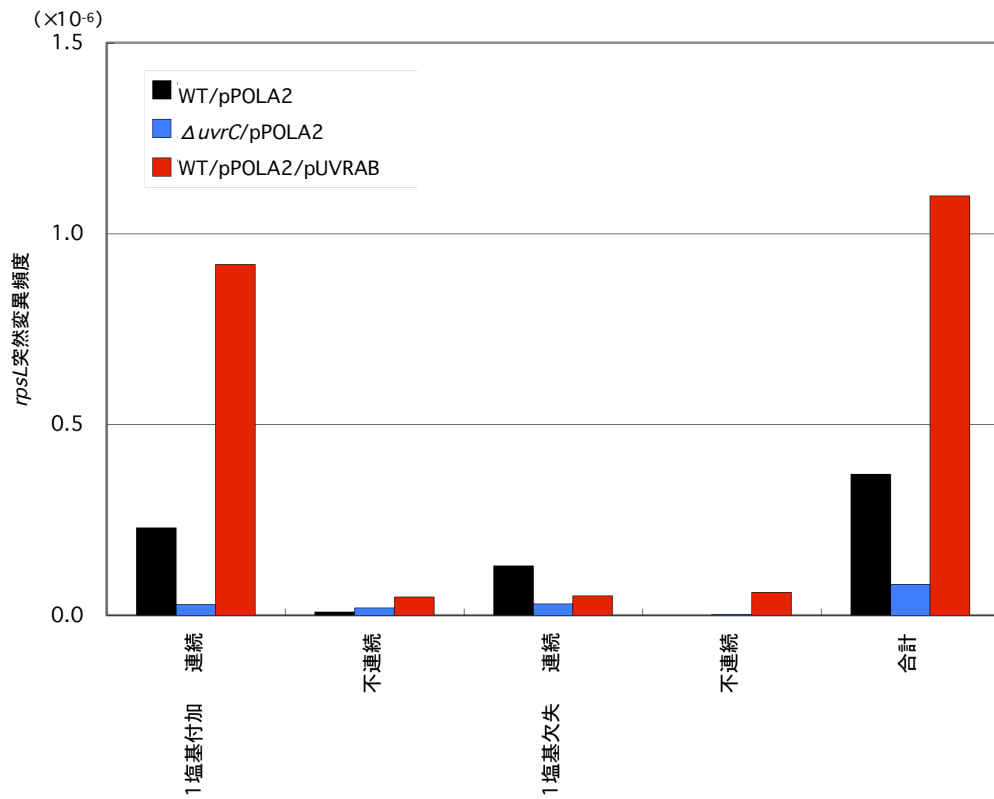
*polA3'*→5' *exo* 株とさらにNERの欠損あるいは過剰発現を加えた場合の変異スペクトラム解析の結果を示した。いずれも、6実験区の平均値を算出した。



	WT /pPOLA2	ΔuvrC /pPOLA2	WT /pPOLA2 /pUVRAB
実験区	96×6	96×6	48×6
ホットスポット 82 C→A	0.018	0.024	ND
ホットスポット 245 T→A	0.23	0.34	0.0049
ホットスポット 245 T→G	ND	0.033	ND
ホットスポット以外	3.7	1.8	2.7
<b>トランジション A:T→G:C</b>	<b>2.0</b>	<b>0.41</b>	1.5
G:C→A:T	0.40	0.18	0.41
トランスバージョン G:C→T:A	0.065	0.024	0.15
G:C→C:A	0.075	0.013	0.056
G:C→C:G	0.47	0.32	0.12
A:T→C:G	0.75	0.81	0.47
合計	4.0	2.2	2.7

図27 *polA3*'→5' *exo*株にNERの欠損あるいは過剰発現を加えた場合の塩基置換変異のスペクトラム (*rpsL*)

*polA3*'→5' *exo*株とさらにNERの欠損あるいは過剰発現を加えた場合の変異スペクトラム解析の結果を示した。いずれも、6実験区の平均値を算出した。



		WT /pPOLA2	ΔuvrC /pPOLA2	WT /pPOLA2 /pUVRAB
実験区		96×6	96×6	96×6
<b>1塩基付加</b>	<b>連続</b>	<b>0.23</b>	<b>0.029</b>	<b>0.92</b>
	不連続	0.0093	0.020	0.048
<b>1塩基欠失</b>	<b>連続</b>	<b>0.13</b>	<b>0.030</b>	0.052
	不連続	ND	0.0026	0.060
合計		0.37	0.081	1.1

図28 *polA3*'→5' *exo*-株にNERの欠損あるいは過剰発現を加えた場合のフレームシフト変異のスペクトラム (*rpsL*)

*polA3*'→5' *exo*-株とさらにNERの欠損あるいは過剰発現を加えた場合の変異スペクトラム解析の結果を示した。いずれも、6実験区の平均値を算出した。

## 第 4 章 考察

### 1 自然突然変異における NER の関与

NER の認識システムでは、損傷自体を認識するのではなく、損傷によって生じたゆがみを認識する。このため、紫外線損傷をはじめとした、比較的多種類の DNA 損傷に働くことが、各種変異原を用いた研究から示されている (Selby and Sancar, 1990; Sancar, 1996; Van Houten *et al.*, 2005)。通常の生育条件下では、変異原の除去機構や DNA 損傷の修復機構が働いている。しかし DNA 鎖上には、これを逃れた未知の損傷が存在することが予想される。また、このような未知の損傷に対しては、特定の損傷に特化したシステムよりも、基質範囲の広いシステムの方が有効であると考えられる。このことから、NER は通常の生育条件下においても、自然 DNA 損傷を修復することで、自然突然変異の抑制に関わっている可能性が考えられた。

しかし本研究により、NER は自然突然変異を抑制するよりもむしろ、誘発していることを示唆するデータが得られた。NER 欠損株では、野生株と比較して自然突然変異の発生頻度が低下し、NER 過剰発現株ではその頻度が上昇した。さらに NER 過剰発現株では、DNA 鎖上に新たに損傷を形成するような変異原を与えない条件下、つまり損傷を増やすような処理をしなくても、NER の反応中間体であるギャップが増える事を示唆するデータが得られた。このことから、通常の生育条件下において NER は、必要以上に働いていることが示唆された。

次に、DNA pol I の校正機能の欠損株に NER の欠損を加えると、校正機能の欠損により上昇した自然突然変異の発生頻度は部分的に低下し、さらに NER の過剰発現を加えると、校正機能の欠損により上昇した変異頻度よりもさらにその変異頻度が上昇した。このことから、NER による突然変異は、修復 DNA 合成時に生じた複製エラーに起因することが示唆された。

以上のような結果から、通常の生育条件下において NER は必要以上に働き、自然突然変異を抑制するよりもむしろ誘発している可能性が示唆された。また大腸菌では、TCR にのみ働くと考えられている Mfd の欠損株を用いた場合の結果から、NER によって生じる自然突然変異の発生には、TCR の経路も大きく関与している事が示唆された。特に、NER 過剰発現株におけるギャップ形成に関しては、Mfd の寄与が大きく、TCR がかなりの部分を占めることが示唆される。

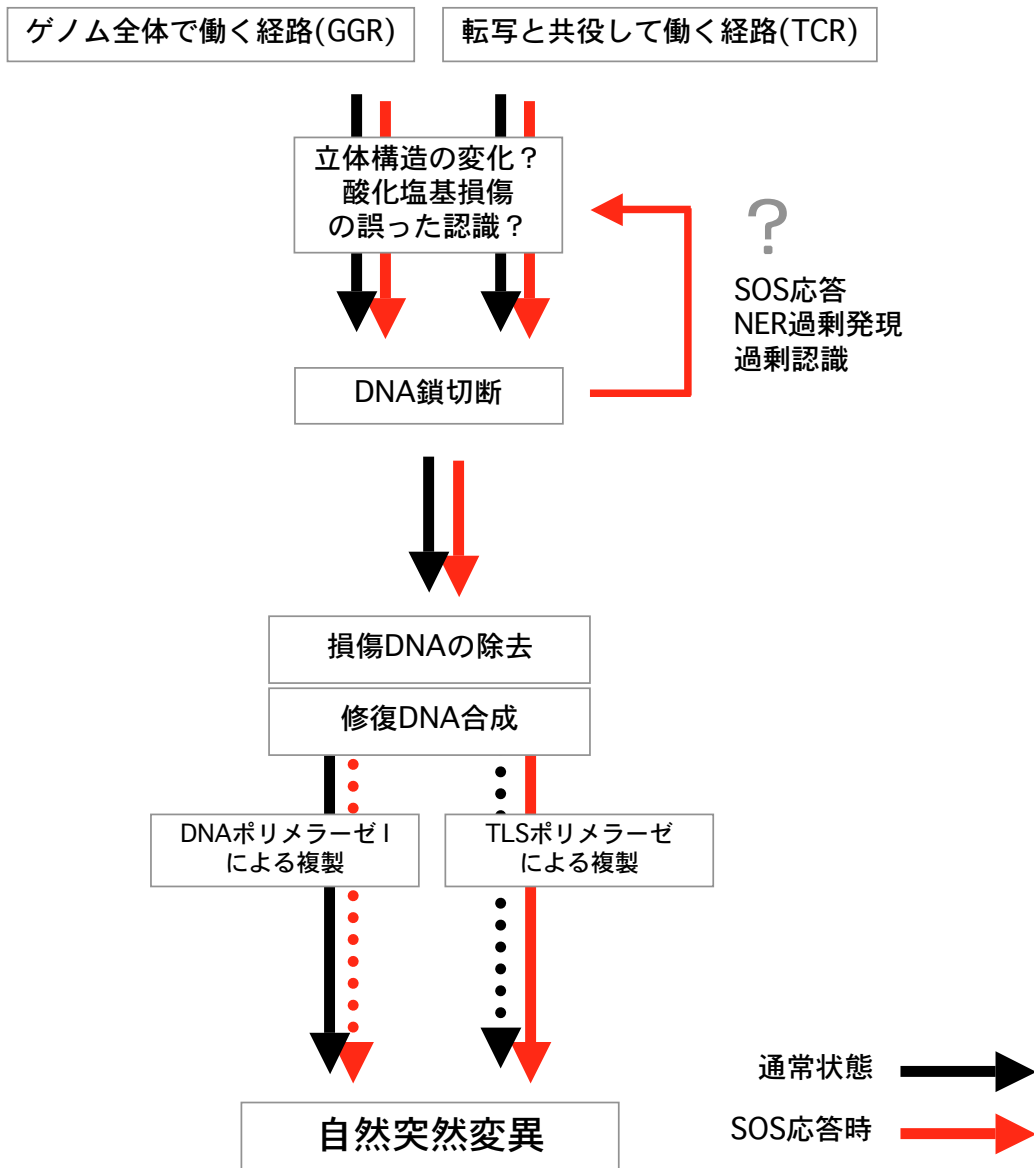


図29 NERによる自然突然変異の誘発経路

本研究から明らかになった、NERに依存した自然突然変異が引き起こされる可能性について示した。認識段階の誤りによりNER反応が進んだ場合に、通常条件ではDNA Pol Iの複製エラーの頻度に依存して、自然突然変異が誘発されることが予想される。また、NER反応の中間体である、一本鎖DNA状態は、SOS応答を促進し、さらなるNER反応につながる可能性が考えられる。そしてこのような場合には、SOS応答によって発現量が上昇するTLSポリメラーゼの働きによって、より複製エラーが生じ、自然突然変異として固定されやすくなることが示唆される。

## 2 NERによる自然突然変異の誘発経路

### a) NERによって突然変異が固定されるメカニズム

上記に示した結果に加え、*in vitro*の実験系において、損傷のないDNA鎖上からも、NERによってDNA断片が切り出されることが報告されている(Branum *et al.*, 2001)。この報告は、通常の生育条件下において必要以上に生じているNER反応とその反応過程でDNA pol Iが起こす複製エラーが自然突然変異の一部の原因であるという考えと一致する(図29)。また染色体複製では、DNAポリメラーゼの校正機能をすり抜けて生じたミスペアを修復する、MMRが働くと考えられている(Friedberg *et al.*, 1995)。しかしNERの修復DNA合成の際には、ギャップサイズが短い為に、新生鎖と鋳型鎖をメチル化状態により判別する為のGATCサイトを合成部分に含まない場合が多く、MMRが働く事ができず、複製エラーが固定されやすい状態になっている可能性を考えている。これまで、NERを含む除去修復型の修復機構は、片側のDNA鎖を部分的に除去しても、反対側のDNA鎖は完全に保持されていることから、エラーフリーな修復機構であると考えられてきた。しかし、修復DNA合成時にDNAポリメラーゼを使うがぎり、その複製エラーの頻度に依存して突然変異が生じる危険性がある。また、本研究ではNERによって生じる自然突然変異に着目したが、損傷を含む側のDNA鎖を取り除き、ギャップをDNAポリメラーゼによって埋め戻すという同様のメカニズムを用いる修復系においても、複製エラーによる突然変異が生じている可能性が考えられる。NERとともに除去修復系に分類される塩基除去修復(Base excision repair; BER)において、APサイトを修復する際に、コントロールに比べて5倍程度の突然変異を起こすことが報告されており(Zhang and Dianov, 2005)、自然突然変異の一部は、様々な修復機構による損傷の修復過程あるいは、過剰な修復反応の際に生じていることが示唆される。

### b) NERの認識段階でのターゲットについて

通常の生育条件下において、何がターゲットになり、NER反応が開始されたのかについては未解明であるが、下記のような三つの可能性を考えている。

一つ目としては、DNA鎖上に損傷がなくても、ゆがみがある場合に、これを誤って認識する可能性である。NERは損傷特異的な認識をするのではなく、損傷によって生じたゆがみを認識することから、広範囲な損傷に対して働く事ができるが、逆に損傷がなくてもDNA鎖上にゆがみがあれば認識してしまう可能性が考



えられる。実際に、損傷にはあたらぬ糖-リン酸骨格修飾のみの変化や、バブル構造のみで、損傷がない場合においても、NERによるDNA鎖切断やUvrABのDNA鎖結合が生じることが報告されている(Branum *et al.*, 2001; Ahn and Grossman, 1996)。また本研究では、NERによって生じる突然変異の塩基配列レベルでの規則性までは示す事ができなかつたが、*in vivo*においては、配列依存的に異常なDNA構造をとる場合があり、NERでは、通常のDNA構造であるB型のDNA構造以外の構造に対しても、働くことが示唆されている(Bacolla *et al.*, 2001; Oussatcheva *et al.*, 2001)。さらに、RNAとDNAが二重らせんを組む、転写領域や複製開始点ではA型に似たDNA構造を取ることや、プリンとピリミジンが交互に並んだDNA配列ではZ型のDNA構造を取ることが報告されている(Voet *et al.*, 1995; Wang and Vasquez, 2006)。また、ヒトの多発性嚢胞腎遺伝子でイントロン21に位置する poly (purine・pyrimidine) 領域は、CとTに富み繰り返し配列を持つことから通常とは異なる構造をとるが、この配列をクローニングしたプラスミドを用いてNERによる切断活性を調べると、このような配列はNER反応の中で切断されやすいことが示唆されている(Bacolla *et al.*, 2001)。

2つ目として、通常の生育条件下において、特異的な修復機構をもつ小さな損傷、例えば酸化塩基損傷などにNERが働いているとすれば、これが自然突然変異の発生に寄与している可能性が考えられる。その理由は、多くの突然変異はDNA複製の際の複製エラーが原因になって生じていると考えられるので、除去修復では、ギャップサイズが長くなれば、新たに複製されるDNAの長さは伸び、複製エラーが形成される可能性も高くなることが予想されるためである。Kuipersらによって、酸化塩基損傷の原因になるとされている $\gamma$ 線を照射したプラスミドを、酸化塩基損傷を修復する機構の一つであるBERの欠損株とさらにNERの欠損を加えた株に形質転換し変異頻度を調べた場合に、BERの単独欠損株と比較して、さらにNERの欠損を加えた株において変異頻度が低下する事が報告されている(Kuipers *et al.*, 2000)。この結果から、 $\gamma$ 線によって形成されBERによって修復されていた損傷の一部は、NERによって修復することが可能であり、この場合に変異を固定しやすいことが示唆される。これは通常の生育条件下とは異なるが、他の修復系が修復すべき損傷をNERが修復し、このことが自然突然変異の発生頻度を上昇させている可能性は考えられる。

3つ目として考えられるのが、TCRも自然突然変異の発生に関わることが示唆されたため、一つ目に挙げたDNA鎖上の構造変化、二つ目に挙げた通常はNERのターゲットにならない損傷、あるいは別な理由によってRNAポリメラーゼが

停止し、これが Mfd を介して認識される可能性である。TCR は RNA ポリメラーゼの停止を認識するとされている。しかし、特異的な修復系が存在する酸化的 DNA 損傷の一つ、8-oxoG は RNA ポリメラーゼを停止させないが、8-oxoG は TCR によって修復されている事が示唆されている。また、酸化的 DNA 損傷に分類されるチミングリコールもまた TCR によって修復される。*in vivo* の実験系において、8-oxoG を含む DNA を鋳型として転写を行わせる場合に、TCR に働く Mfd を欠損させた大腸菌株では、転写された mRNA 上の 8-oxoG の位置に高頻度に塩基置換が生じる事が報告されている (Bregeon *et al.*, 2003)。このことから、転写鎖上に 8-oxoG が存在していても、RNA ポリメラーゼはこれ乗り越えて転写を続ける事ができるが、8-oxoG の特異的な修復機構として働く BER の存在下でさえ、8-oxoG が TCR によって修復されていることが示されている (Bregeon *et al.*, 2003)。DNA の構造に大きな変化を与えない損傷が RNA ポリメラーゼの進行に影響を与えるのかについては、*in vitro* の実験系で多数の研究がなされている。大腸菌の RNA ポリメラーゼは、8-oxoG を乗り越えて転写を続ける事ができるが、8-oxoG の位置がプロモーターに近い位置にある場合に転写効率の低下が認められることが報告されている (Viswanathan and Doetsch, 1998)。ウイルス由来の T7 RNA ポリメラーゼでは、低い効率ではあるが、8-oxoG の位置での一時的な停止が認められる (Tornaletti *et al.*, 2004)。また、ヒトの RNA ポリメラーゼにおいても、8-oxoG の位置での一時的な停止や転写効率の低下が示されている (Tornaletti *et al.*, 2004, Kuraoka *et al.*, 2003)。以上のような点から、RNA ポリメラーゼが完全に停止しなくても、転写の鋳型鎖上に 8-oxoG が含まれる場合には、TCR によって認識されることが予想されており、Mfd が BER の存在下においても高頻度に働くことで通常の生育条件下での自然突然変異の発生に寄与している可能性は十分に考えられる。

### 3 NER の自然突然変異発生への寄与は？

#### a) NER の制御について

上記のような結果からも予想されるように、NER に関わるタンパクの発現量については知られているだけで、3つのシステムの制御を受けている。

その中で最も一般的なものが、SOS 応答による制御である。細菌には、DNA 鎖上の傷害などがある場合に、DNA 修復に関与するタンパク等の発現量を上昇させる、SOS 応答と呼ばれる機構が存在する。DNA 鎖上に傷害が生じると、これが原

因になって複製阻害が起こったり、ニックやギャップの形成が促進され、最終的にできる一本鎖 DNA 領域は、RecA タンパクのフィラメント形成を促進し、これが LexA リプレッサーの自己消化反応を促進させる。結果として、LexA により抑制されていたタンパクの発現量が上昇する (Walker *et al.*, 2000)。NER の各段階で働くほとんどのタンパク、UvrA、UvrB、Cho (UvrC ホモログ)、UvrD の発現量は、SOS 応答の制御を受けているので、その発現量は、SOS 応答により上昇することが知られている。

次に、有酸素条件と無酸素条件の環境変化に応答して遺伝子発現制御を行う、ArcA/ArcB 二成分制御系によっても、UvrA の発現量が制御されることが報告されている (Ogasawara *et al.*, 2005)。つまり、酸化塩基損傷が生じる有酸素条件下において、NER の発現量が上昇していることが予想される。

さらに、NER の認識段階に働く UvrA は大腸菌の AAA<sup>+</sup>プロテアーゼに分類される ClpXP の制御を受けることも報告されている。Neher らの研究により、UvrA の発現が上昇した場合に、ClpXP によって一定レベルまで分解されることが示されている。このことから、SOS 応答などによって転写レベルが上昇した際には、シグナルがなくなり次第、速やかに一定レベルまで分解することで存在量が抑えられていることが示唆される (Neher *et al.*, 2006)。

上記に示した 3 つの例は、細菌類あるいは大腸菌の研究から明らかになった事実であるが、高等真核生物においても、これに似た結果が得られている。ヒトの急性骨髄性白血病の研究から得られた培養細胞株を用いた実験結果によれば、分化した細胞では NER のうち、GGR が低下することが示唆されている (Hsu *et al.*, 2007; Nospikel and Hanawalt, 2006)。つまり複製を行わない場合には、GGR の機能はむしろ有害であるために、抑制されている可能性が考えられ、この制御は保存されている可能性が考えられる。

## b) 自然突然変異における NER の寄与

本研究には対数増殖期の細胞を用いたが、修復機構の中で生じる突然変異は、染色体複製を介さずに DNA 鎖上に固定される。このため、細胞増殖を停止しても突然変異を誘発し続ける可能性が考えられる。さらに、転写と共役して働く Mfd もまた、自然突然変異の誘発に寄与していることが明らかになっており、これらの事実は、NER が対数増殖期、定常期を通じて自然突然変異を引き起こす原因になる可能性を示している。特に、定常期に生じる突然変異については、染色体複製による突然変異が生じない状態である点と、一つの染色体上に時間依存的

に突然変異が蓄積していくという点から、NER に依存して生じる突然変異の寄与が大きいものと予想される。実際、枯草菌の用いた最近の研究によれば、野生株における定常期の変異頻度の上昇率に比べ、*mfd* 欠損株の変異頻度の上昇率が低いことが示されており (Ross *et al.*, 2006)、これは上記の考えと一致する。

### c) NER によって生じる自然突然変異と NER の存在意義

損傷の効率的な修復と突然変異頻度の上昇は矛盾しているように思われるが、様々損傷に働くことができる鋭敏すぎるシステムは、損傷を介さない DNA 上の些細な変化や特異的な修復システムをもつ損傷にまで働いてしまう危険性をもつことが予想される。また、ポリメラーゼ反応は 100% 正確なシステムではないことから、修復反応の回数が増えれば、必ずある頻度で突然変異が生じる。

NER は、DNA 鎖上の構造変化や RNA ポリメラーゼの停止を認識して働くが、主として紫外線損傷のような、比較的大きな損傷に働くとされている。CPD は  $0.1 \text{ J/m}^2$  の UV 照射によって、大腸菌一ゲノムあたりに一個程度形成されるという報告がある。この値は DNA 鎖上に CPD が形成され、複製型の DNA ポリメラーゼが停止することを回避する主な機構である、NER と組換え修復を欠損した場合に致死に至る値である。大腸菌の生育環境は一定ではなく、瞬時に変化する場合があります、その際には特異的な修復機構を持たない損傷が生じる可能性がある。この時に、染色体上に複製を停止させる損傷が一つ残るだけで、細胞は致死に至る可能性を持つ。これらのことから、生育環境の変化によって生じた致死に至る DNA 損傷を除去するために、NER を必要としない条件下においても、NER に関わるタンパクはある程度発現させ、これによりある頻度で突然変異が引き起こされているものと考えられる。また、NER によって生じた突然変異が、致死に至る頻度は極めて低いことから、NER を必要としない条件下でも、様々な制御によって、定められた最低限の発現量を保ち続けていると予想される。

## 第4章 付録

### 1 各種スペクトラム解析による結果（付録表）

表 4-1 NER 欠損株における部位別種類別変異頻度 (*rpoB*)

	WT	$\Delta uvrA$	$\Delta uvrB$	$\Delta uvrC$	$\Delta uvrABC$	$\Delta mfd$
変異なし	0.13	0.0093	0.0051	0.033	0.015	0.090
436GT	ND	0.0093	ND	ND	ND	ND
443AT	<u>0.18</u>	ND	ND	ND	ND	0.15
437TG	0.014	ND	ND	ND	ND	0.015
1525AC	0.014	ND	ND	ND	ND	0.030
1527CA	0.014	ND	ND	ND	ND	ND
1527CG	<u>0.028</u>	ND	ND	ND	ND	0.030
1529AT	0.014	ND	ND	ND	ND	ND
1532TC	ND	ND	ND	0.022	ND	ND
1534TC	<u>0.15</u>	ND	ND	0.077	ND	0.030
1535CA	0.014	ND	0.0051	ND	ND	ND
1535CT	<u>0.069</u>	0.0046	ND	0.044	ND	0.030
1537CA	ND	0.014	0.020	ND	ND	ND
1538AC	ND	0.023	0.030	ND	ND	0.015
1538AG	<u>0.028</u>	0.046	0.020	0.033	ND	0.045
1538AT	<u>0.19</u>	0.084	0.051	0.066	0.13	0.015
1546GA	<u>0.11</u>	0.056	0.030	0.088	0.020	0.045
1546GT	0.014	0.0046	ND	ND	ND	ND
1547AG	<u>0.14</u>	0.028	ND	0.099	ND	0.045
1547AT	ND	ND	0.0051	ND	0.0051	0.030
1552AG	ND	ND	ND	ND	ND	0.015
1565CA	ND	0.0046	ND	ND	0.015	ND
1565CT	<u>0.083</u>	0.13	0.010	0.022	0.046	0.030
1574CG	0.028	ND	ND	ND	ND	ND
1576CA	<u>0.028</u>	0.028	0.0051	0.033	0.015	0.060
1576CG	0.056	0.028	ND	ND	ND	ND
1576CT	<u>0.19</u>	0.14	0.041	0.17	0.071	0.090
1577AT	0.028	ND	ND	0.011	ND	ND
1578CT	<u>0.028</u>	ND	ND	ND	ND	ND
1585CT	ND	ND	0.0051	ND	0.020	ND

1586GA	0.014	0.019	0.015	ND	ND	ND
1592CT	<u>0.028</u>	0.084	0.071	0.011	0.026	0.12
1592CA	ND	ND	0.0051	0.011	ND	0.060
1598TC	ND	ND	0.036	0.022	0.020	0.030
1600GA	0.042	ND	ND	ND	ND	0.030
1600GT	<u>0.028</u>	ND	ND	ND	ND	0.075
1601GA	ND	ND	ND	0.011	ND	0.075
1601GT	<u>0.056</u>	ND	ND	ND	ND	0.060
1681CT	ND	0.0046	ND	ND	ND	ND
1687AC	<u>0.42</u>	ND	ND	0.12	ND	0.11
1687AT	<u>0.014</u>	ND	ND	ND	ND	ND
1691CT	<u>0.056</u>	0.023	0.025	0.11	0.051	0.12
1708GT	0.014	ND	ND	ND	ND	ND
1714AC	<u>0.11</u>	ND	ND	0.022	ND	0.030
1714AT	<u>0.042</u>	0.033	ND	0.055	0.026	ND
1715TG	<u>0.083</u>	ND	ND	0.044	ND	ND
1721CT	0.014	ND	ND	ND	ND	0.015
1721CA	ND	ND	ND	ND	ND	0.015
欠失	0.028	0.019	ND	ND	0.010	ND
合計	2.5	0.79	0.38	1.1	0.48	1.5

WTにおいて、2 実験区以上で検出された変異に関しては下線で表示した。

表 4-2 NER 過剰発現株における部位別種類別変異頻度 (*rpoB*)

	WT/vector	WT/pUVRAB	WT/pUVRABC
変異なし	0.034	0.38	0.38
436GC	ND	0.11	ND
443AT	0.040	0.16	ND
444GC	0.0067	ND	ND
1522TC	ND	ND	0.38
1532TA	0.0067	ND	ND
1532TC	0.0067	ND	1.7
1534TC	ND	ND	0.19
1535CA	ND	0.11	ND
1535CT	0.047	ND	ND
1537CG	0.0067	ND	ND
1538AC	0.020	0.054	ND
1538AG	ND	0.38	0.95
1538AT	0.047	0.11	ND
1546GA	0.040	0.054	0.57
1546GT	ND	ND	0.19
1547AG	0.087	2.4	5.7
1547AT	ND	ND	0.38
1552AG	0.020	0.054	1.1
1565CA	0.0067	ND	ND
1565CT	0.027	ND	ND
1576CA	ND	0.054	ND
1576CG	0.0067	ND	ND
1576CT	0.034	0.054	0.95
1577AC	ND	ND	0.19
1577AG	ND	ND	0.95
1577AT	ND	0.054	ND
1578CG	ND	0.27	ND
1586GA	0.0067	ND	1.7
1586GT	0.027	ND	ND
1592CT	0.034	ND	ND
1592CA	ND	ND	0.95
1595CA	ND	ND	ND
1598TA	ND	0.054	ND
1598TC	0.013	ND	2.5
1687AC	0.0067	ND	ND
1691CT	0.027	0.054	ND
1714AC	0.060	0.38	ND

1714AT	0.040	ND	0.19
1715TG	0.020	0.27	ND
1721CT	ND	0.27	ND
1721CA	ND	0.16	ND
合計	0.67	5.4	19



表 4-3 *polA3'→5'exo*株において NER を欠損させた場合の部位別種別変異頻度 (*rpoB*)

	WT/pPOLA2	$\Delta uvrA$ /pPOLA2	$\Delta uvrB$ /pPOLA2	$\Delta uvrC$ /pPOLA2	$\Delta mfd$ /pPOLA2
変異なし	0.88	1.3	0.54	0.62	1.2
437GT	ND	ND	ND	0.31	ND
1525AC	<u>1.8</u>	ND	ND	ND	ND
1532TC	<u>9.7</u>	0.44	0.54	4.7	5.6
1532TG	<u>1.8</u>	ND	ND	ND	0.40
1534TC	<u>7.0</u>	2.2	2.2	1.9	4.0
1535CA	ND	1.3	0.81	0.31	0.40
1535CT	0.88	ND	ND	ND	ND
1537CA	0.88	0.44	0.54	ND	ND
1538AG	<u>4.4</u>	2.2	1.6	0.93	0.80
1538AC	<u>2.6</u>	3.5	3.0	0.62	0.80
1538AT	1.8	0.88	0.54	1.2	0.40
1546GA	<u>6.2</u>	1.3	0.81	2.8	1.6
1546GT	ND	ND	0.27	0.31	0.40
1547AG	<u>12</u>	9.7	1.4	8.7	6.4
1547AT	<u>4.4</u>	4.4	3.0	2.8	5.2
1552AG	<u>3.5</u>	0.44	ND	ND	ND
1553AG	0.88	ND	ND	ND	ND
1565CA	ND	0.44	ND	ND	0.40
1565CT	0.88	ND	0.27	ND	0.40
1576CA	ND	ND	ND	0.31	ND
1576CG	ND	1.3	0.27	ND	ND
1576CT	<u>2.6</u>	1.8	1.6	2.8	6.4
1577AG	ND	ND	0.54	ND	ND
1577AT	<u>1.8</u>	0.44	ND	ND	ND
1583GT	0.88	ND	ND	ND	ND
1592CA	ND	ND	0.54	ND	0.40
1592CT	<u>1.8</u>	0.44	1.1	ND	0.40
1598TC	<u>7.9</u>	7.9	6.8	1.9	4.0
1598TA	1.8	ND	ND	ND	0.40
1599TC	ND	ND	ND	0.31	ND
1601GA	<u>7.9</u>	ND	ND	ND	ND
1691CT	0.88	1.8	0.54	0.31	ND
1693GT	ND	ND	0.27	ND	ND
1714AT	<u>2.6</u>	1.8	ND	0.31	0.40
合計	88	44	27	31	40

WT/pPOLA2 において、2 実験区以上で検出された変異に関しては下線で表示した。

表 4-4 *polA3'→5'exo* 株において NER を過剰発現させた場合の部位別種類別変異頻度 (*rpoB*)

	WT/pPOLA2	$\Delta uvrC$ /pPOLA2	WT/pPOLA2/pUVRAB
変異なし	0.88	0.62	3.7
436GT	ND	ND	3.7
437GT	ND	0.31	ND
1522TC	ND	ND	11
1525AC	1.8	ND	ND
1532TC	9.7	4.7	30
1532TG	1.8	ND	ND
1534TC	7.0	1.9	3.7
1535CA	ND	0.31	ND
1535CT	0.88	ND	ND
1537CA	0.88	ND	ND
1538AG	4.4	0.93	19
1538AC	2.6	0.62	ND
1538AT	1.8	1.3	ND
1546GA	6.2	2.8	11
1546GT	0	0.31	3.7
1547AG	12	8.7	110
1547AT	4.4	2.8	11
1552AG	3.5	ND	22
1553AG	0.88	ND	ND
1565CT	0.88	ND	ND
1576CA	ND	0.31	ND
1576CT	2.6	2.79	19
1577AC	ND	ND	3.7
1577AG	ND	ND	19
1577AT	1.8	ND	ND
1583GT	0.88	ND	ND
1586GA	ND	ND	33
1592CA	ND	ND	19
1592CT	1.8	ND	ND
1598TC	7.9	1.9	44
1598TA	1.8	ND	3.7
1599TC	ND	0.31	ND
1601GA	7.9	ND	ND
1691CT	0.88	0.31	ND
1714AT	2.6	0.31	3.7
合計	88	31	370

表4-5 野生株における突然変異の検出数と変異頻度 (rpsL)

各実験区のrpsL前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	Ave
Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )	0.69	0.38	0.35	0.37	0.33	0.42

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave $\pm$ SD
組換え型												
1点型(128A→C)	8	16	7	8	0	39	0.039	0.038	0.011	0.015	ND	0.021 $\pm$ 0.015
2点型(-22G→A,128A→C)	36	23	57	44	30	190	0.17	0.055	0.092	0.081	0.059	0.092 $\pm$ 0.049
塩基置換												
ホットスポット1(82C→A)	6	8	14	16	6	50	0.029	0.019	0.023	0.030	0.012	0.022 $\pm$ 0.0075
ホットスポット2(245T→A)	46	53	39	35	42	215	0.22	0.13	0.063	0.065	0.082	0.11 $\pm$ 0.067
ホットスポット3(245T→G)	2	0	1	7	4	14	0.0097	ND	0.0016	0.013	0.0078	0.0064 $\pm$ 0.0048
上記以外	16	15	21	47	35	134	0.078	0.036	0.034	0.087	0.068	0.061 $\pm$ 0.024
1塩基フレームシフト	10	1	7	12	11	41	0.049	0.0024	0.011	0.022	0.021	0.021 $\pm$ 0.017
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
欠失												
タイプ1(dr)	11	0	11	7	12	41	0.053	ND	0.018	0.013	0.023	0.022 $\pm$ 0.018
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	1	0	0	0	1	ND	0.0024	ND	ND	ND	0.00048
未同定	1	2	2	5	4	14	0.0049	0.0048	0.0032	0.0093	0.0078	0.0060 $\pm$ 0.0025
重複												
クラス1	1	3	2	0	8	14	0.0049	0.0072	0.0032	ND	0.016	0.0062 $\pm$ 0.0055
クラス2	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.0016	ND	ND	0.00032
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	0.0000
IS												
IS1	3	33	36	8	7	87	0.015	0.079	0.058	0.015	0.014	0.036 $\pm$ 0.031
IS5	1	1	14	11	7	34	0.0049	0.0024	0.023	0.020	0.014	0.013 $\pm$ 0.0090
1.2kIS	1	3	5	0	3	12	0.0049	0.0072	0.0081	ND	0.0059	0.0052 $\pm$ 0.0014
その他	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
変異なし	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	142	159	217	200	169	887	0.69	0.38	0.35	0.37	0.33	0.42 $\pm$ 0.15

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave $\pm$ SD
Transition												
A:T→G:C	0	3	0	6	2	11	ND	0.0072	ND	0.011	0.0039	0.0044 $\pm$ 0.0036
G:C→A:T	11	4	7	16	5	43	0.053	0.010	0.011	0.030	0.0098	0.023 $\pm$ 0.019
total	11	7	7	22	7	54	0.053	0.017	0.011	0.041	0.014	0.027 $\pm$ 0.019
Transversion												
G:C→T:A	2	3	1	6	7	19	0.0097	0.0072	0.0016	0.011	0.014	0.0087 $\pm$ 0.0046
G:C→C:G	0	0	4	2	10	16	ND	ND	0.0065	0.0037	0.020	0.0059 $\pm$ 0.0085
T:A→A:T	1	1	3	13	9	27	0.0049	0.0024	0.0048	0.024	0.018	0.011 $\pm$ 0.0095
A:T→C:G	2	4	6	4	2	18	0.0097	0.0096	0.0097	0.0074	0.0039	0.0081 $\pm$ 0.0025
total	5	8	14	25	28	80	0.024	0.019	0.023	0.046	0.055	0.033 $\pm$ 0.016
Hot spot												
82C→A	6	8	14	16	6	50	0.029	0.019	0.023	0.030	0.012	0.022 $\pm$ 0.0075
245 T→A	46	53	39	35	42	215	0.22	0.13	0.063	0.065	0.082	0.11 $\pm$ 0.067
245 T→G	2	0	1	7	4	14	0.0097	ND	0.0016	0.013	0.0078	0.0064 $\pm$ 0.0048
total	54	61	54	58	52	279	0.26	0.15	0.087	0.11	0.10	0.14 $\pm$ 0.071
Total	70	76	75	105	87	413	0.34	0.18	0.12	0.19	0.17	0.20 $\pm$ 0.082

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave $\pm$ SD
Addition												
at run	3	0	2	4	5	14	0.015	ND	0.0032	0.0074	0.0098	0.0070 $\pm$ 0.0047
at non-run	0	1	0	0	1	2	ND	0.0024	ND	ND	0.0020	0.00087 $\pm$ 0.00031
total	3	1	2	4	6	16	0.015	0.0024	0.0032	0.0074	0.012	0.0079 $\pm$ 0.0053
Deletion												
at run	2	0	4	4	2	12	0.0097	ND	0.0065	0.0074	0.0039	0.0055 $\pm$ 0.0024
at non-run	5	0	1	4	3	13	0.024	ND	0.0016	0.0074	0.0059	0.0078 $\pm$ 0.010
total	7	0	5	8	5	25	0.034	ND	0.0081	0.015	0.0098	0.013 $\pm$ 0.012
Total	10	1	7	12	11	41	0.049	0.0024	0.011	0.022	0.021	0.021 $\pm$ 0.017

表4-6  $\Delta uvrC$ 株における突然変異の検出数と変異頻度 (*rpsL*)

各実験区の*rpsL*前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Ave
Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )	0.47	0.34	0.59	0.29	0.70	0.42	0.47

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	ave $\pm$ SD
<b>組換え型</b>														
1点型(128A→C)	28	7	2	5	7	3	52	0.27	0.068	0.027	0.030	0.16	0.026	0.098 $\pm$ 0.10
2点型(-22G→A, 128A→C)	5	2	9	4	6	5	31	0.049	0.019	0.12	0.024	0.14	0.044	0.067 $\pm$ 0.052
<b>塩基置換</b>														
ホットスポット1(82C→A)	2	4	0	1	0	6	13	0.020	0.039	ND	0.0060	ND	0.053	0.019 $\pm$ 0.021
ホットスポット2(245T→A)	2	7	10	11	4	17	51	0.020	0.068	0.14	0.066	0.093	0.15	0.089 $\pm$ 0.048
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	ND	0.0088	0.0015
上記以外	7	11	11	12	9	11	61	0.069	0.11	0.15	0.073	0.21	0.096	0.12 $\pm$ 0.054
1塩基フレームシフト	0	1	2	4	0	1	8	ND	0.0097	0.027	0.024	ND	0.0088	0.012 $\pm$ 0.010
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>欠失</b>														
タイプ1(dr)	0	0	1	1	0	0	2	ND	ND	0.014	0.0060	ND	ND	0.0033 $\pm$ 0.0054
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	1	1		1	1	1	5	0.0098	0.0097	ND	0.0060	0.023	0.0088	0.0096 $\pm$ 0.0068
<b>重複</b>														
クラス1	0	0	1	0	0	0	1	ND	ND	0.014	ND	ND	ND	0.0023
クラス2	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	1	0	1	0	0	2	ND	0.0097	ND	ND	ND	ND	0.0016
<b>IS</b>														
IS1	3	0	7	6	2	3	21	0.029	ND	0.096	0.036	0.047	0.026	0.039 $\pm$ 0.029
IS5	0	1	0	1	0	0	2	ND	0.0097	ND	0.0060	ND	ND	0.0026 $\pm$ 0.0026
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
変異なし	0	0	0	1	1	0	2	ND	ND	ND	0.0060	0.023	ND	0.0049 $\pm$ 0.012
Total	48	35	43	48	30	48	252	0.47	0.34	0.59	0.28	0.70	0.42	0.47 $\pm$ 0.16

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	ave $\pm$ SD
<b>Transition</b>														
A:T→G:C	2	0	1	2	2	0	7	0.020	ND	0.014	0.012	0.047	ND	0.015 $\pm$ 0.016
G:C→A:T	1	1	1	1	4	1	9	0.0098	0.0097	0.014	0.0060	0.093	0.0088	0.024 $\pm$ 0.034
total	3	1	2	3	6	1	16	0.029	0.0097	0.027	0.018	0.14	0.0088	0.039 $\pm$ 0.050
<b>Transversion</b>														
G:C→T:A	0	1	0	0	0	1	2	ND	0.0097	ND	ND	ND	0.0088	0.0031 $\pm$ 0.00068
G:C→C:G	1	6	3	3	2	1	16	0.0098	0.058	0.041	0.018	0.047	0.0088	0.030 $\pm$ 0.021
T:A→A:T	1	2	3	5	1	8	20	0.0098	0.019	0.041	0.030	0.023	0.070	0.032 $\pm$ 0.021
A:T→C:G	2	1	3	1	0	0	7	0.020	0.0097	0.041	0.0060	ND	ND	0.013 $\pm$ 0.016
total	4	10	9	9	3	10	45	0.039	0.097	0.12	0.054	0.070	0.088	0.079 $\pm$ 0.031
<b>Hot spot</b>														
82C→A	2	4	0	1	0	6	13	0.020	0.039	ND	0.0060	ND	0.053	0.019 $\pm$ 0.021
245 T→A	2	7	10	11	4	17	51	0.020	0.068	0.14	0.066	0.093	0.15	0.089 $\pm$ 0.048
245 T→G	0	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	ND	0.0088	0.0015
total	4	11	10	12	4	24	65	0.039	0.11	0.14	0.073	0.093	0.21	0.11 $\pm$ 0.059
Total	11	22	21	24	13	35	126	0.11	0.21	0.29	0.15	0.30	0.31	0.23 $\pm$ 0.086

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	ave $\pm$ SD
<b>Addition</b>														
at run	0	1	0	0	0	0	1	ND	0.0097	ND	ND	ND	ND	0.0016
at non-run	0	0	0	1	0	0	1	ND	ND	ND	0.0060	ND	ND	0.0010
total	0	1	0	1	0	0	2	ND	0.0097	ND	0.0060	ND	ND	0.0026 $\pm$ 0.0026
<b>Deletion</b>														
at run	0	0	1	1	0	0	2	ND	ND	0.014	0.0060	ND	ND	0.0033 $\pm$ 0.0054
at non-run	0	0	1	2	0	1	4	ND	ND	0.014	0.012	ND	0.0088	0.0058 $\pm$ 0.0025
total	0	0	2	3	0	1	6	ND	ND	0.027	0.018	ND	0.0088	0.0091 $\pm$ 0.0093
Total	0	1	2	4	0	1	8	ND	0.0097	0.027	0.024	ND	0.0088	0.012 $\pm$ 0.0097

表4-7 WT/vector株における突然変異の検出数と変異頻度 (*rpsL*)

各実験区の*rpsL*前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	Ave
Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )	0.41	0.32	0.37

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored			Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )		
	#1	#2	Total	#1	#2	ave $\pm$ SD
<b>組換え型</b>						
1点型(128A→C)	4	7	11	0.034	0.047	<b>0.040</b> $\pm$ 0.0088
2点型(-22G→A,128A→C)	11	6	17	0.094	0.040	<b>0.067</b> $\pm$ 0.038
<b>塩基置換</b>						
ホットスポット1(82C→A)	7	2	9	0.060	0.013	<b>0.037</b> $\pm$ 0.033
ホットスポット2(245T→A)	10	15	25	0.085	0.10	<b>0.093</b> $\pm$ 0.010
ホットスポット3(245T→G)	1	1	2	0.0085	0.0067	<b>0.0076</b> $\pm$ 0.0013
上記以外	4	5	9	0.034	0.033	<b>0.034</b> $\pm$ 0.00059
1塩基フレームシフト	1	3	4	0.0085	0.020	<b>0.014</b> $\pm$ 0.0081
2塩基フレームシフト	0	0	0	ND	ND	$\pm$
配列置換	0	0	0	ND	ND	$\pm$
<b>欠失</b>						
タイプ1(dr)	2	3	5	0.017	0.020	<b>0.019</b> $\pm$ 0.0021
タイプ2(ir)	0	0	0	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	ND	ND	ND
<b>重複</b>						
クラス1	1	0	1	0.0085	ND	<b>0.0043</b>
クラス2	0	0	0	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	ND	ND	ND
<b>IS</b>						
IS1	0	3	3	ND	0.020	<b>0.010</b>
IS5	7	2	9	0.060	0.013	<b>0.037</b> $\pm$ 0.033
1.2kIS	0	0	0	ND	ND	ND
その他	0	0	0	ND	ND	ND
変異なし	0	1	1	ND	0.0067	<b>0.0033</b>
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>96</b>	<b>0.41</b>	<b>0.32</b>	<b>0.37</b> $\pm$ 0.064

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored			Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )		
	#1	#2	Total	#1	#2	ave $\pm$ SD
<b>Transition</b>						
A:T→G:C	2	0	2	0.017	ND	<b>0.0085</b>
G:C→A:T	0	2	2	ND	0.013	<b>0.0067</b>
<b>total</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>0.017</b>	<b>0.013</b>	<b>0.015</b> $\pm$ 0.0027
<b>Transversion</b>						
G:C→T:A	0	0	0	ND	ND	ND
G:C→C:G	1	0	1	0.0085	ND	<b>0.0043</b>
T:A→A:T	1	3	4	0.0085	0.020	<b>0.014</b> $\pm$ 0.0081
A:T→C:G	0	0	0	ND	ND	ND
<b>total</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0.017</b>	<b>0.020</b>	<b>0.019</b> $\pm$ 0.0021
<b>Hot spot</b>						
82C→A	7	2	9	0.060	0.013	<b>0.037</b> $\pm$ 0.033
245 T→A	10	15	25	0.085	0.10	<b>0.093</b> $\pm$ 0.010
245 T→G	1	1	2	0.0085	0.0067	<b>0.0076</b> $\pm$ 0.0013
<b>total</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>36</b>	<b>0.15</b>	<b>0.12</b>	<b>0.14</b> $\pm$ 0.024
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>45</b>	<b>0.19</b>	<b>0.15</b>	<b>0.17</b> $\pm$ 0.024

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored			Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )		
	#1	#2	Total	#1	#2	ave $\pm$ SD
<b>Addition</b>						
at run	0	0	0	ND	ND	ND
at non-run	0	0	0	ND	ND	ND
<b>total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
<b>Deletion</b>						
at run	1	0	1	0.0085	ND	<b>0.0043</b>
at non-run	0	3	3	ND	0.020	<b>0.010</b>
<b>total</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>0.0085</b>	<b>0.020</b>	<b>0.014</b> $\pm$ 0.0081
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>0.0085</b>	<b>0.020</b>	<b>0.014</b> $\pm$ 0.0081

表4-8 WT/pUVRAB株における突然変異の検出数と変異頻度 (rpsL)

各実験区のrpsL前変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Ave
Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )	2.3	2.5	1.6	2.3	1.8	2.0	2.1

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Total	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6		#1	#2	#3	#4	#5	#6	
<b>組換え型</b>														
1点型(128A→C)	3	2	3	0	1	4	13	0.076	0.052	0.056	ND	0.019	0.083	0.048 $\pm$ 0.025
2点型(-22G→A,128A→C)	0	2	0	4	3	1	10	ND	0.052	ND	0.10	0.056	0.021	0.039 $\pm$ 0.035
<b>塩基置換</b>														
ホットスポット1(82C→A)	79	71	59	72	80	71	432	2.0	1.8	1.1	1.9	1.5	1.5	1.6 $\pm$ 0.33
ホットスポット2(245T→A)	5	6	14	4	7	11	47	0.13	0.16	0.26	0.10	0.13	0.23	0.17 $\pm$ 0.063
ホットスポット3(245T→G)	0	1	0	0	0	0	1	ND	0.026	ND	ND	ND	ND	0.0043
上記以外	0	7	1	1	2	3	14	ND	0.18	0.019	0.026	0.038	0.063	0.055 $\pm$ 0.067
1塩基フレームシフト	4	5	5	5	0	3	22	0.101	0.13	0.094	0.13	ND	0.063	0.086 $\pm$ 0.028
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	1	2	0	0	3	ND	ND	0.019	0.052	ND	ND	0.012 $\pm$ 0.024
<b>欠失</b>														
タイプ1(dr)	0	1	2	0	0	2	5	ND	0.026	0.038	ND	ND	0.042	0.018 $\pm$ 0.0081
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	1	1	2	ND	ND	ND	ND	0.019	0.021	0.0066 $\pm$ 0.0015
<b>重複</b>														
クラス1	0	1	0	0	2	0	3	ND	0.026	ND	ND	0.038	ND	0.011 $\pm$ 0.0081
クラス2	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>IS</b>														
IS1	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
変異なし	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	91	96	85	88	96	96	552	2.3	2.5	1.6	2.3	1.8	2.0	2.1 $\pm$ 0.34

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Total	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6		#1	#2	#3	#4	#5	#6	
<b>Transition</b>														
A:T→G:C	0	2	0	0	0	1	3	ND	0.052	ND	ND	ND	0.021	0.012 $\pm$ 0.022
G:C→A:T	0	1	1	0	1	0	3	ND	0.026	0.019	ND	0.019	ND	0.011 $\pm$ 0.0042
total	0	3	1	0	1	1	6	ND	0.078	0.019	ND	0.019	0.021	0.023 $\pm$ 0.029
<b>Transversion</b>														
G:C→T:A	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G:C→C:G	0	4	0	0	0	0	4	ND	0.10	ND	ND	ND	ND	0.017
T:A→A:T	0	0	0	1	1	0	2	ND	ND	ND	0.026	0.019	ND	0.0075 $\pm$ 0.0052
A:T→C:G	0	0	0	0	0	2	2	ND	ND	ND	ND	ND	0.042	0.0069
total	0	4	0	1	1	2	8	ND	0.10	ND	0.026	0.019	0.042	0.032 $\pm$ 0.039
<b>Hot spot</b>														
82C→A	79	71	59	72	80	71	432	2.0	1.8	1.1	1.9	1.5	1.5	1.6 $\pm$ 0.33
245 T→A	5	6	14	4	7	11	47	0.13	0.16	0.26	0.10	0.13	0.23	0.17 $\pm$ 0.063
245 T→G	0	1	0	0	0	0	1	ND	0.026	ND	ND	ND	ND	0.0043
total	84	78	73	76	87	82	480	2.1	2.0	1.4	2.0	1.6	1.7	1.8 $\pm$ 0.29
Total	84	85	74	77	89	85	494	2.1	2.2	1.4	2.0	1.7	1.8	1.9 $\pm$ 0.31

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Total	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6		#1	#2	#3	#4	#5	#6	
<b>Addition</b>														
at run	4	4	2	4	0	3	17	0.10	0.10	0.038	0.10	ND	0.063	0.068 $\pm$ 0.030
at non-run	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	4	4	2	4	0	3	17	0.10	0.10	0.038	0.10	ND	0.063	0.068 $\pm$ 0.030
<b>Deletion</b>														
at run	0	1	3	0	0	0	4	ND	0.026	0.056	ND	ND	ND	0.014 $\pm$ 0.022
at non-run	0	0	0	1	0	0	1	ND	ND	ND	0.026	ND	ND	0.0044
total	0	1	3	1	0	0	5	ND	0.026	0.056	0.026	ND	ND	0.018 $\pm$ 0.018
Total	4	5	5	5	0	3	22	0.10	0.13	0.094	0.13	ND	0.063	0.086 $\pm$ 0.028

表4-9 WT/pUVRABC株における突然変異の検出数と変異頻度 (rpsL)

各実験区のrpsL前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	Ave
Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )	3.0	4.4	3.6	1.7	3.2

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored					Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )				
	#1	#2	#3	#4	Total	#1	#2	#3	#4	ave $\pm$ SD
<b>粗換え型</b>										
1点型(128A→C)	15	2	12	1	30	0.94	0.18	0.90	0.035	0.51 $\pm$ 0.47
2点型(-22G→A,128A→C)	7	2	7	4	20	0.44	0.18	0.53	0.14	0.32 $\pm$ 0.19
<b>塩基置換</b>										
ホットスポット1(82C→A)	16	29	19	32	96	1.0	2.7	1.4	1.1	1.6 $\pm$ 0.76
ホットスポット2(245T→A)	1	10	2	6	19	0.063	0.92	0.15	0.21	0.34 $\pm$ 0.39
ホットスポット3(245T→G)	1	0	1	0	2	0.063	ND	0.075	ND	0.034 $\pm$ 0.0088
上記以外	7	2	4	2	15	0.44	0.18	0.30	0.071	0.25 $\pm$ 0.16
1塩基フレームシフト	1	2	3	2	8	0.063	0.18	0.23	0.071	0.14 $\pm$ 0.081
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
<b>欠失</b>										
タイプ1(dr)	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
<b>重複</b>										
クラス1	0	1	0	0	1	ND	0.092	ND	ND	0.023
クラス2	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
<b>IS</b>										
IS1	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	0.035	0.0089
IS5	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
変異なし	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>192</b>	<b>3.0</b>	<b>4.4</b>	<b>3.6</b>	<b>1.7</b>	<b>3.2 <math>\pm</math> 1.1</b>

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored					Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )				
	#1	#2	#3	#4	Total	#1	#2	#3	#4	ave $\pm$ SD
<b>Transition</b>										
A:T→G:C	5	1	3	0	9	0.31	0.092	0.23	ND	0.16 $\pm$ 0.11
G:C→A:T	2	0	0	0	2	0.13	ND	ND	ND	0.031
<b>total</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>0.44</b>	<b>0.092</b>	<b>0.23</b>	<b>ND</b>	<b>0.19 <math>\pm</math> 0.17</b>
<b>Transversion</b>										
G:C→T:A	0	0	1	1	2	ND	ND	0.075	0.035	0.028 $\pm$ 0.028
G:C→C:G	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
T:A→A:T	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	0.035	0.0089
A:T→C:G	0	1	0	0	1	ND	0.092	ND	ND	0.023
<b>total</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>ND</b>	<b>0.092</b>	<b>0.075</b>	<b>0.071</b>	<b>0.059 <math>\pm</math> 0.011</b>
<b>Hot spot</b>										
82C→A	16	28	19	32	95	1.0	2.6	1.4	1.1	1.5 $\pm$ 0.71
245 T→A	1	9	2	6	18	0.063	0.83	0.15	0.21	0.31 $\pm$ 0.35
245 T→G	1	0	1	0	2	0.063	ND	0.075	ND	0.034 $\pm$ 0.0088
<b>total</b>	<b>18</b>	<b>37</b>	<b>22</b>	<b>38</b>	<b>115</b>	<b>1.1</b>	<b>3.4</b>	<b>1.7</b>	<b>1.3</b>	<b>1.9 <math>\pm</math> 1.0</b>
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>39</b>	<b>26</b>	<b>40</b>	<b>130</b>	<b>1.6</b>	<b>3.6</b>	<b>2.0</b>	<b>1.4</b>	<b>2.1 <math>\pm</math> 0.99</b>

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored					Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )				
	#1	#2	#3	#4	Total	#1	#2	#3	#4	ave $\pm$ SD
<b>Addition</b>										
at run	1	1	0	1	3	0.063	0.092	ND	0.035	0.047 $\pm$ 0.028
at non-run	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	0.035	0.0089
<b>total</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>0.063</b>	<b>0.092</b>	<b>ND</b>	<b>0.071</b>	<b>0.056 <math>\pm</math> 0.015</b>
<b>Deletion</b>										
at run	0	1	1	0	2	ND	0.092	0.075	ND	0.042 $\pm$ 0.012
at non-run	0	0	2	0	2	ND	ND	0.15	ND	0.038
<b>total</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>ND</b>	<b>0.092</b>	<b>0.23</b>	<b>ND</b>	<b>0.079 <math>\pm</math> 0.094</b>
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>0.063</b>	<b>0.18</b>	<b>0.23</b>	<b>0.071</b>	<b>0.14 <math>\pm</math> 0.081</b>



表4-10 WT/pPOLA1 /pPUVRABC株における突然変異の検出数と変異頻度 (rpsL)

各実験区のrpsL前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	Ave
Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )	0.41	0.51	0.38	0.40	0.43

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored					Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )				
	#1	#2	#3	#4	Total	#1	#2	#3	#4	ave $\pm$ SD
<b>組換え型</b>										
1点型(128A→C)	16	6	29	17	68	0.19	0.11	0.26	0.19	0.19 $\pm$ 0.064
2点型(22G→A,128A→C)	6	7	2	5	20	0.072	0.12	0.018	0.057	0.068 $\pm$ 0.043
<b>塩基置換</b>										
ホットスポット1(82C→A)	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット2(245T→A)	3	9	1	10	23	0.036	0.16	0.0090	0.11	0.079 $\pm$ 0.069
ホットスポット3(245T→G)	0	0	2	0	2	ND	ND	0.018	ND	0.0045
上記以外	9	5	1	0	15	0.11	0.088	0.0090	ND	0.051 $\pm$ 0.053
1塩基フレームシフト	0	0	3	3	6	ND	ND	0.027	0.034	0.015 $\pm$ 0.0051
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
<b>欠失</b>										
タイプ1(dr)	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	0	2	1	0	3	ND	0.035	0.0090	ND	0.011 $\pm$ 0.018
<b>重複</b>										
クラス1	0	0	2	0	2	ND	ND	0.018	ND	0.0045
クラス2	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
<b>IS</b>										
IS1	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	1	0	1	ND	ND	0.0090	ND	0.0023
変異なし	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
Total	34	29	42	35	140	0.41	0.51	0.38	0.40	0.43 $\pm$ 0.058

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored					Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )				
	#1	#2	#3	#4	Total	#1	#2	#3	#4	ave $\pm$ SD
<b>Transition</b>										
A:T→G:C	0	2	0	0	2	ND	0.035	ND	ND	0.0088
G:C→A:T	7	1	0	0	8	0.084	0.018	ND	ND	0.025 $\pm$ 0.047
total	7	3	0	0	10	0.084	0.053	ND	0.00	0.034 $\pm$ 0.043
<b>Transversion</b>										
G:C→T:A	2	2	1	0	5	0.024	0.035	0.0090	ND	0.017 $\pm$ 0.013
G:C→C:G	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
T:A→A:T	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
A:T→C:G	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
total	2	2	1	0	5	0.024	0.035	0.0090	ND	0.017 $\pm$ 0.013
<b>Hot spot</b>										
82C→A	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
245 T→A	3	9	1	10	23	0.036	0.16	0.0090	0.11	0.079 $\pm$ 0.069
245 T→G	0	0	2	0	2	ND	ND	0.018	ND	0.0045
total	3	9	3	10	25	0.036	0.16	0.027	0.11	0.08 $\pm$ 0.063
Total	12	14	4	10	40	0.14	0.25	0.036	0.11	0.14 $\pm$ 0.087

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored					Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )				
	#1	#2	#3	#4	Total	#1	#2	#3	#4	ave $\pm$ SD
<b>Addition</b>										
at run	0	0	0	3	3	ND	ND	ND	0.034	0.0086
at non-run	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	0	0	3	3	ND	ND	ND	0.034	0.0086
<b>Deletion</b>										
at run	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
at non-run	0	0	3	0	3	ND	ND	0.027	ND	0.0068
total	0	0	3	0	3	ND	ND	0.027	ND	0.0068
Total	0	0	3	3	6	ND	ND	0.027	0.034	0.015 $\pm$ 0.0051



表4-11 WT/pPOLA2株における突然変異の検出数と変異頻度 (rpsL)

各実験区のrpsL前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Ave
Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )	4.4	4.1	4.9	5.2	4.7	5.0	4.7

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	ave $\pm$ SD
<b>組換え型</b>														
1点型(128A→C)	0	1	1	3	7	2	14	ND	0.043	0.058	0.19	0.39	0.11	0.13 $\pm$ 0.14
2点型(-22G→A,128A→C)	1	0	3	0	0	1	5	0.053	ND	0.18	ND	ND	0.056	0.047 $\pm$ 0.070
<b>塩基置換</b>														
ホットスポット1(82C→A)	0	1	0	1	0	0	2	ND	0.043	ND	0.064	ND	ND	0.018 $\pm$ 0.015
ホットスポット2(245T→A)	3	15	1	4	1	4	28	0.16	0.65	0.058	0.26	0.055	0.22	0.23 $\pm$ 0.22
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
上記以外	72	61	74	63	66	72	408	3.8	2.6	4.3	4.0	3.6	4.0	3.7 $\pm$ 0.59
1塩基フレームシフト	5	14	2	6	7	8	42	0.27	0.60	0.12	0.39	0.39	0.44	0.37 $\pm$ 0.16
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	2	0	0	2	ND	ND	ND	0.13	ND	ND	0.021
<b>欠失</b>														
タイプ1(dr)	1	0	1	0	1	0	3	0.058	ND	0.058	ND	0.055	ND	0.029 $\pm$ 0.0018
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	1	0	0	0	1	ND	ND	0.058	ND	ND	ND	0.0097
未同定	0	0	0	1	1	0	2	ND	ND	ND	0.064	0.055	ND	0.020 $\pm$ 0.0063
<b>重複</b>														
クラス1	0	0	1	0	0	1	2	ND	ND	0.058	ND	ND	0.056	0.019 $\pm$ 0.0020
クラス2	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	1	1	0	2	ND	ND	ND	0.064	0.055	ND	0.020 $\pm$ 0.0063
<b>IS</b>														
IS1	0	2	0	0	0	0	2	ND	0.086	ND	ND	ND	ND	0.014
IS5	0	1	0	0	0	0	1	ND	0.043	ND	ND	ND	ND	0.0072
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	ND	0.056	0.0093
変異なし	1	0	0	0	1	1	3	0.053	ND	ND	ND	0.055	0.056	0.027 $\pm$ 0.0014
Total	83	95	84	81	85	90	518	4.4	4.1	4.9	5.2	4.7	5.0	4.7 $\pm$ 0.41

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	ave $\pm$ SD
<b>Transition</b>														
A:T→G:C	53	27	45	25	32	35	217	2.8	1.2	2.6	1.6	1.8	1.9	2.0 $\pm$ 0.63
G:C→A:T	7	6	10	6	8	6	43	0.37	0.26	0.58	0.39	0.44	0.33	0.40 $\pm$ 0.11
total	60	33	55	31	40	41	260	3.2	1.4	3.2	2.0	2.2	2.3	2.4 $\pm$ 0.70
<b>Transversion</b>														
G:C→T:A	0	1	1	1	3	1	7	ND	0.043	0.058	0.064	0.17	0.056	0.065 $\pm$ 0.050
G:C→C:G	1	4	1	0	2	1	9	0.053	0.17	0.058	ND	0.11	0.056	0.075 $\pm$ 0.052
T:A→A:T	6	8	4	13	6	14	51	0.32	0.35	0.23	0.83	0.33	0.78	0.47 $\pm$ 0.26
A:T→C:G	5	15	13	18	15	15	81	0.27	0.65	0.76	1.2	0.83	0.83	0.75 $\pm$ 0.29
total	12	28	19	32	26	31	148	0.64	1.2	1.1	2.1	1.4	1.7	1.4 $\pm$ 0.50
<b>Hot spot</b>														
82C→A	0	1	0	1	0	0	2	ND	0.043	ND	0.064	ND	ND	0.018 $\pm$ 0.015
245 T→A	3	15	1	4	1	4	28	0.16	0.65	0.058	0.26	0.055	0.22	0.23 $\pm$ 0.22
245 T→G	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	3	16	1	5	1	4	30	0.16	0.69	0.058	0.32	0.055	0.22	0.25 $\pm$ 0.24
Total	75	77	75	68	67	76	438	4.0	3.3	4.4	4.4	3.7	4.2	4.0 $\pm$ 0.42

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	ave $\pm$ SD
<b>Addition</b>														
at run	5	7	1	1	6	6	26	0.27	0.30	0.058	0.064	0.33	0.33	0.23 $\pm$ 0.13
at non-run	0	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	ND	0.056	0.0093
total	5	7	1	1	6	7	27	0.27	0.30	0.058	0.064	0.33	0.39	0.24 $\pm$ 0.14
<b>Deletion</b>														
at run	0	7	1	5	1	1	15	ND	0.30	0.058	0.32	0.055	0.056	0.13 $\pm$ 0.14
at non-run	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	0	7	1	5	1	1	15	ND	0.30	0.058	0.32	0.055	0.056	0.13 $\pm$ 0.14
Total	5	14	2	6	7	8	42	0.27	0.60	0.12	0.39	0.39	0.44	0.37 $\pm$ 0.16

表4-12  $\Delta uvrC/pPOLA2$ 株における突然変異の検出数と変異頻度 (*rpsL*)

各実験区の *rpsL* 前準突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Ave
Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )	2.4	1.5	5.4	3.6	1.9	1.9	2.8

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored						Total	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6		#1	#2	#3	#4	#5	#6	
<b>組換え型</b>														
1点型(128A→C)	3	2	4	3	6	1	19	0.096	0.031	0.30	0.14	0.12	0.033	0.12 $\pm$ 0.10
2点型(-22G→A,128A→C)	2	2	4	1	1	2	12	0.064	0.031	0.30	0.046	0.019	0.067	0.089 $\pm$ 0.11
<b>塩基置換</b>														
ホットスポット1(82C→A)	0	2	1	0	2	0	5	ND	0.031	0.0761	ND	0.039	ND	0.024 $\pm$ 0.024
ホットスポット2(245T→A)	16	7	5	9	17	9	63	0.51	0.11	0.38	0.41	0.33	0.30	0.34 $\pm$ 0.13
ホットスポット3(245T→G)	1	2	0	1	3	1	8	0.032	0.031	ND	0.046	0.058	0.033	0.033 $\pm$ 0.012
上記以外	49	65	40	58	55	36	303	1.6	1.0	3.0	2.6	1.1	1.2	1.8 $\pm$ 0.87
1塩基フレームシフト	0	5	1	1	8	4	19	ND	0.078	0.076	0.046	0.16	0.13	0.081 $\pm$ 0.045
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>欠失</b>														
タイプ1(dr)	0	0	2	0	0	0	2	ND	ND	0.15	ND	ND	ND	0.025
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
未同定	1	8	13	4	3	3	32	0.032	0.13	0.99	0.18	0.058	0.10	0.25 $\pm$ 0.37
<b>重複</b>														
クラス1	1	1	0	1	0	0	3	0.032	0.016	ND	0.046	ND	ND	0.016 $\pm$ 0.015
クラス2	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	1	1	0	1	0	3	ND	0.016	0.076	ND	0.019	ND	0.019 $\pm$ 0.034
<b>IS</b>														
IS1	1	0	0	1	2	0	4	0.032	ND	ND	0.046	0.039	ND	0.019 $\pm$ 0.0068
IS5	0	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	ND	0.033	0.0056
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
変異なし	1	1	0	0	0	0	2	0.032	0.016	ND	ND	ND	ND	0.0079 $\pm$ 0.012
Total	75	96	71	79	98	57	476	2.4	1.5	5.4	3.6	1.9	1.9	2.8 $\pm$ 1.5

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Total	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6		#1	#2	#3	#4	#5	#6	
<b>Transition</b>														
A:T→G:C	20	17	5	7	19	14	82	0.64	0.27	0.38	0.32	0.37	0.47	0.41 $\pm$ 0.13
G:C→A:T	5	11	7	1	6	2	32	0.16	0.17	0.53	0.046	0.12	0.067	0.18 $\pm$ 0.18
total	25	28	12	8	25	16	114	0.8	0.44	0.91	0.36	0.48	0.53	0.59 $\pm$ 0.22
<b>Transversion</b>														
G:C→T:A	0	0	1	1	1	0	3	ND	ND	0.076	0.046	0.019	ND	0.024 $\pm$ 0.028
G:C→C:G	0	0	0	1	0	1	2	ND	ND	ND	0.046	ND	0.033	0.013 $\pm$ 0.0087
T:A→A:T	13	4	6	10	6	12	51	0.42	0.063	0.46	0.46	0.12	0.40	0.32 $\pm$ 0.18
A:T→C:G	11	33	21	38	23	7	133	0.35	0.52	1.6	1.7	0.45	0.23	0.81 $\pm$ 0.67
total	24	37	28	50	30	20	189	0.77	0.58	2.1	2.3	0.58	0.67	1.2 $\pm$ 0.81
<b>Hot spot</b>														
82C→A	0	2	1	0	2	0	5	ND	0.031	0.076	ND	0.039	ND	0.024 $\pm$ 0.024
245 T→A	16	7	5	9	17	9	63	0.51	0.11	0.38	0.41	0.33	0.30	0.34 $\pm$ 0.13
245 T→G	1	2	0	1	3	1	8	0.032	0.031	ND	0.046	0.058	0.033	0.033 $\pm$ 0.012
total	17	11	6	10	22	10	76	0.54	0.17	0.46	0.46	0.43	0.33	0.40 $\pm$ 0.13
Total	66	76	46	68	77	46	379	2.1	1.2	3.5	3.1	1.5	1.5	2.2 $\pm$ 0.9

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored						Total	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6		#1	#2	#3	#4	#5	#6	
<b>Addition</b>														
at run	0	1	0	0	3	3	7	ND	0.016	ND	ND	0.058	0.10	0.029 $\pm$ 0.042
at non-run	0	0	1	1	0	0	2	ND	ND	0.076	0.046	ND	ND	0.020 $\pm$ 0.022
total	0	1	1	1	3	3	9	ND	0.016	0.076	0.046	0.058	0.10	0.049 $\pm$ 0.032
<b>Deletion</b>														
at run	0	3	0	0	5	1	9	ND	0.047	ND	ND	0.097	0.033	0.030 $\pm$ 0.034
at non-run	0	1	0	0	0	0	1	ND	0.016	ND	ND	ND	ND	0.0026
total	0	4	0	0	5	1	10	ND	0.063	ND	ND	0.097	0.033	0.032 $\pm$ 0.032
Total	0	5	1	1	8	4	19	ND	0.078	0.076	0.046	0.16	0.13	0.081 $\pm$ 0.045

表4-13 WT/pPOLA2/pUVRAB株における突然変異の検出数と変異頻度 (rpsL)

各実験区のrpsL前進突然変異頻度

Section No.	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Ave
Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )	2.4	2.7	2.6	7.3	5.2	6.0	4.4

Table1 変異の種類別変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	ave $\pm$ SD
<b>組換え型</b>														
1点型(128A→C)	6	3	5	9	0	0	23	0.18	0.26	0.20	0.98	ND	ND	0.27 $\pm$ 0.39
2点型(-22G→A,128A→C)	4	3	0	0	1	0	8	0.12	0.26	ND	ND	0.078	ND	0.076 $\pm$ 0.096
<b>塩基置換</b>														
ホットスポット1(82C→A)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ホットスポット2(245T→A)	1	0	0	0	0	0	1	0.030	ND	ND	ND	ND	ND	0.0049
ホットスポット3(245T→G)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
上記以外	49	19	45	38	51	38	240	1.5	1.7	1.8	4.1	4.0	3.5	2.7 $\pm$ 1.2
1塩基フレームシフト	16	4	9	19	13	24	85	0.47	0.35	0.35	2.1	1.0	2.2	1.1 $\pm$ 0.86
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
配列置換	1	2	0	1	0	2	6	0.030	0.17	ND	0.11	ND	0.18	0.083 $\pm$ 0.071
<b>欠失</b>														
タイプ1(dr)	0	0	1	0	0	0	1	ND	ND	0.039	ND	ND	ND	0.0066
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
タイプ3(rなし)	0	0	1	0	0	0	1	ND	ND	0.039	ND	ND	ND	0.0066
未同定	4	0	5	0	0	0	9	0.12	ND	0.20	ND	ND	ND	0.053 $\pm$ 0.055
<b>重複</b>														
クラス1	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス2	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
クラス3	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>IS</b>														
IS1	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IS5	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
その他	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
変異なし	0	0	0	0	2	1	3	ND	ND	ND	ND	0.16	0.092	0.041 $\pm$ 0.044
Total	81	31	66	67	67	65	377	2.4	2.7	2.6	7.3	5.2	6.0	4.4 $\pm$ 2.1

Table2 塩基置換の種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	ave $\pm$ SD
<b>Transition</b>														
A:T→G:C	19	2	24	26	24	31	126	0.56	0.17	0.95	2.8	1.9	2.9	1.5 $\pm$ 1.2
G:C→A:T	9	1	2	10	6	5	33	0.27	0.087	0.079	1.1	0.47	0.46	0.41 $\pm$ 0.37
total	28	3	26	36	30	36	159	0.83	0.26	1.0	3.9	2.3	3.3	1.9 $\pm$ 1.5
<b>Transversion</b>														
G:C→T:A	0	5	4	1	1	1	12	ND	0.44	0.16	0.109	0.08	0.092	0.15 $\pm$ 0.15
G:C→C:G	0	3	0	0	1	0	4	ND	0.261	ND	ND	0.078	ND	0.056 $\pm$ 0.130
T:A→A:T	2	2	3	0	5	0	12	0.059	0.17	0.12	ND	0.39	ND	0.12 $\pm$ 0.14
A:T→C:G	19	6	12	1	14	1	53	0.56	0.52	0.47	0.11	1.1	0.092	0.47 $\pm$ 0.36
total	21	16	19	2	21	2	81	0.62	1.4	0.75	0.22	1.6	0.18	0.80 $\pm$ 0.60
<b>Hot spot</b>														
82C→A	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
245 T→A	1	0	0	0	0	0	1	0.030	ND	ND	ND	ND	ND	0.0049
245 T→G	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
total	1	0	0	0	0	0	1	0.030	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	50	19	45	38	51	38	241	1.5	1.7	1.8	4.1	4.0	3.5	2.7 $\pm$ 1.2

Table3 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度

Section No.	Mutation scored							Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Total	#1	#2	#3	#4	#5	#6	ave $\pm$ SD
<b>Addition</b>														
at run	9	1	6	18	12	22	68	0.27	0.087	0.24	2.0	0.93	2.0	0.92 $\pm$ 0.88
at non-run	1	3	0	0	0	0	4	0.030	0.26	ND	ND	ND	ND	0.048 $\pm$ 0.16
total	10	4	6	18	12	22	72	0.30	0.35	0.24	2.0	0.93	2.0	0.97 $\pm$ 0.84
<b>Deletion</b>														
at run	1	0	2	1	0	1	5	0.030	ND	0.079	0.11	ND	0.092	0.052 $\pm$ 0.034
at non-run	5	0	1	0	1	1	8	0.15	ND	0.039	ND	0.078	0.092	0.060 $\pm$ 0.045
total	6	0	3	1	1	2	13	0.18	ND	0.12	0.11	0.078	0.18	0.11 $\pm$ 0.046
Total	16	4	9	19	13	24	85	0.47	0.35	0.35	2.1	1.0	2.2	1.1 $\pm$ 0.86

## 2 NER 欠損株におけるリファンピシン感受性に関する確認

リファンピシンに対して耐性になったことを指標とする、*rpoB* 遺伝子上における変異頻度測定において、NER に関わる遺伝子の欠損株では野生株よりも変異頻度が低下することが明らかになった。しかし、NER に関わる遺伝子の欠損株では、リファンピシンに対する感受性が上昇し、突然変異頻度に影響を与えている可能性を考え、以下のような実験を行った。

### a) リファンピシンに対する感受性試験

NER 欠損株のリファンピシンに対する感受性を調べるためには、gradient plate 法を用いた。プレートは、縦 13.8cm、横 9.8cm、高さ 1.3cm のものを使用した。はじめに、プレートを斜めにして、LB 培地 50ml を流し込み、傾斜のある一層めを作製した。次にこれが完全に固まったら、プレートを平衡に戻して、薬剤を含む LB 培地 50 ml を流し込み、完全に固めた。このようにして、プレート上に濃度勾配を持つ gradient plate を作製した (Maki *et al.*, 1983)。

菌液は、37°C、160 rpm/min で一晩振とう培養したものを用いた。まず 1/100 希釈液を作製し、これを 2  $\mu$ l ずつ、1.5cm 間隔でスポットしていき、白金耳で均一にのぼした。しばらく乾かした後、アルミ箔で包み、37°C で一晩静置培養した。プレートを取り出し、生育が認められた領域の長さを測定した。薬剤の濃度は Rif: 0 – 10  $\mu$ g/ml とした。

リファンピシンに対する各大腸菌株の薬剤感受性を調べ、比較した結果、 $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株では、野生株に比べてリファンピシンに対して若干の感受性が認められた (表 5)。

表 5 リファンピシンに対する各種 NER 欠損株の感受性

菌株	生育可能な長さ(cm)	相対値
WT	7.8	1.0
$\Delta uvrA$	5.9	0.75
$\Delta uvrB$	5.9	0.75
$\Delta uvrC$	7.3	0.93
$\Delta uvrABC$	5.3	0.68

### b) NER 欠損株におけるリファンピシン感受性にいたる変異部位の特定と NER に

## 関わる遺伝子欠損の導入

$\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株では、野生株と比較してリファンピシンに対する感受性が高いことから、同じ部位に変異が生じても、野生株ではリファンピシン耐性となり、 $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株ではリファンピシン感受性になることがあるのか否かについて調べた。

はじめに、野生株においてリファンピシン耐性になった大腸菌株の変異部位をスペクトラム解析により確認し、このうち、 $\Delta uvrA$  株で検出されないもの、20 種類を選び出した。次に、各々の変異をもつ菌株に対して P1 transduction 法を用い、*uvrA*、*uvrB*、*uvrC*、*mfd* の欠損を導入することで、各々の欠損が生育に影響を与えるのか否かについて調べた。実験方法は、「第 2 章 材料と方法の 8 P1 フェージを用いた形質導入と 13 突然変異スペクトラム解析」の項に記載した。

各々の変異を持つ菌株に対して、*uvrA*、*uvrB*、*uvrC*、*mfd* の欠損を加えた結果、そのすべてが生育自体は可能であった。しかし  $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株において、生育速度に影響を与えるものが、13 種類確認でき、このうち深刻な影響を示すものが 3 種類であった。残りの 6 種類は、生育に影響は認められず、1 種類については確認作業ができなかった。 $\Delta uvrC$  株、 $\Delta mfd$  株についてはそのような変異部位は確認されなかった。

また、このうち 3 種類の変異部位に関しては、 $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株において、LB プレート上よりもリファンピシンプレート上でのコロニー形成率が低下していることが明らかになった。しかし  $\Delta uvrC$  株、 $\Delta mfd$  株においては、コロニー形成、生育速度の両方に関してリファンピシンに対する感受性は認められなかった。

以上のような結果から、 $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株で認められた変異頻度の低下の一部の原因は、リファンピシンに対する感受性にあることが示唆された。しかし  $\Delta uvrC$  株、 $\Delta mfd$  株では、リファンピシンに対する感受性が認められないことから、 $\Delta uvrC$  株、 $\Delta mfd$  株で認められた突然変異頻度の低下には、リファンピシンに対する感受性は関与していないと考えられる。UvrA、UvrB、UvrC は同一の経路で働いているにもかかわらず、 $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株、 $\Delta uvrC$  株の変異頻度をそれぞれ比較すると、 $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株の頻度は、 $\Delta uvrC$  株の頻度よりも低下していた点と、 $\Delta uvrA$  株、 $\Delta uvrB$  株のみがリファンピシンに対して感受性になるという結果は一致する。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、丁寧な御指導ならびに暖かい御助言をいただきました真木寿治教授に深く感謝いたします。本研究を通して、成長していくための機会、環境、多くのご指導を頂いたことにも深く感謝いたします。また、秋山昌広准教授、真木智子助教、梅津桂子助教には、御指導、御助言に加え、研究環境などへの御尽力に対して、深く感謝いたします。本研究を行うにあたり、環境整備に御尽力いただいた中島淑美秘書、安田倫子秘書に深く感謝いたします。さらに、愿山郁博士、坂井亜紀子博士には、大変有意義な議論、御助言、そして励ましの言葉を頂きました。そして、真木研究室の皆様にも、多くのご協力を頂いたことを深く感謝いたします。最後に、大学院に進むことを理解し、精神的に、経済的に、最後まで支えてくれた両親に深く感謝いたします。

皆様、本当にありがとうございました。

## 参考文献

- Ahn B., and Grossman L. (1996). The binding of UvrAB proteins to bubble and loop regions in duplex DNA. *J Biol Chem* 271, 21462-21470.
- Akasaka S., and Yamamoto K. (1991). Construction of *Escherichia coli* K-12 *phr* deletion and insertion mutants by gene replacement. *Mutation Res.* 254, 27–35.
- Ames B. N., and Gold L. S. (1991). Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res.* 250, 3-16.
- Bacolla A., Jaworski A., Connors T. D., and Wells R. D. (2001). Pkd1 unusual DNA conformations are recognized by nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 276, 18597-604.
- Bachmann B.J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* 36, 525–557.
- Bessman M. J., Muzyczka N, Goodman M. F., and Schnaar R.L. (1974). Studies on the biochemical basis of spontaneous mutation. II. The incorporation of a base and its analogue into DNA by wild-type, mutator and antimutator DNA polymerases. *J Mol Biol.* 15, 409-421.
- Branum M.E., Reardon J.T., and Sancar A. (2001). DNA repair excision nuclease attacks undamaged DNA. A potential source of spontaneous mutations. *J Biol Chem.* 276, 25421-25426.
- Bregeon D, Doddridge Z. A., You H. J., Weiss B., and Doetsch P. W. (2003). Transcriptional Mutagenesis Induced by Uracil and 8-Oxoguanine in *Escherichia coli*. *Mol Cell.* 12, 959-970.
- Brenowitz S., Kwack S., Goodman M. F., O'Donnell M., and Echols H., (1991). Specificity and enzymatic mechanism of the editing exonuclease of *Escherichia coli* DNA polymerase III. *J Biol Chem.* 25, 7888-7892.

- Cox E. C. (1976). Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation, *Annu. Rev. Genet.*, 10, 135-156.
- Demple B., Jacobsson A., Olsson M., Robins P., and Lindahl T. (1982). Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Physical properties of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *J Biol Chem.* 257, 13776-13780.
- Derbyshire V., Grindley N. D., and Joyce C. M. (1991). The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction. *EMBO J.* 10, 17-24.
- Duncan B. K., and Miller J. H. (1980). Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature.* 287, 560-561.
- Gifford C. M., Blaisdell J. O., and Wallace S. S., (2000). Multiprobe RNase protection assay analysis of mRNA levels for the *Escherichia coli* oxidative DNA glycosylase genes under conditions of oxidative stress. *J Bacteriol.* 182, 5416-5424.
- Friedberg E. C., Walker G. C., and Siede W. (1995). DNA repair and Mutagenesis, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Hsu P. H., Hanawalt P. C., and Nouspikel T. (2007). Nucleotide excision repair phenotype of human acute myeloid leukemia cell lines at various stages of differentiation. *Mutat Res.* 614, 3-15.
- Imlay J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 57, 395-418.
- Joyce C. M., and Grindley N.D. (1984). Method for determining whether a gene of *Escherichia coli* is essential: application to the *polA* gene. *J Bacteriol.* 158, 636-643.
- Kiyosawa K., Tanaka M, Matsunaga T., Nikaido O., and Yamamoto K., (2001). Amplified UvrA protein can ameliorate the ultraviolet sensitivity of an *Escherichia coli recA* mutant. *Mutation Research* 487, 149–156.



Kuraoka I., Endou M., Yamaguchi Y., Wada T., Handa H., and Tanaka K. (2003). Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. *J Biol Chem.* 28, 7294-7299.

Kuipers G. K., Slotman B. J., Poldervaart H. A., van Vilsteren I. M., Reitsma-Wijker C. A., and Lafleur M. V., (2000). The role of nucleotide excision repair of *Escherichia coli* in repair of spontaneous and gamma-radiation-induced DNA damage in the *lacZ*  $\alpha$  gene. *Mutat Res.* 460, 117-125.

Maki H. (2002). Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu Rev Genet.* 36, 279-303.

Maki H., Horiuchi T., and Sekiguchi M., (1983). Isolation of conditional Lethal Mutator Mutants of *Escherichia coli* by Localized Mutagenesis. *J. Bacteriol.* 153, 1361-1367.

Maki H. and Sekiguchi M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature.* 16, 273-275.

Michaels M. L., Cruz C., Grollman A. P., and Miller J. H. (1992). Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 7022-7025.

Neher S. B., Villen J., Oakes E. C., Bakalarski C. E., Sauer R. T., Gygi S. P., and Baker T. A. (2006). Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon. *Mol Cell.* 22, 193-204.

Nospikel T., and Hanawalt P. C. (2006). Impaired nucleotide excision repair upon macrophage differentiation is corrected by E1 ubiquitin-activating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 16188-16193.

- Ogi T., and Lehmann A. R. (2006). The Y-family DNA polymerase kappa (pol kappa) functions in mammalian nucleotide-excision repair. *Nat Cell Biol.* 8, 640-642.
- Oussatcheva E. A., Hashem V. I., Zou Y., Sinden R. R., and Potaman V. N. (2001). Involvement of the nucleotide excision repair protein UvrA in instability of CAG\*CTG repeat sequences in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276, 30878-10884.
- Parker B. O., and Marinus M.G. (1992). Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 1730-1734.
- Ogasawara H., Teramoto J., Yamamoto S., Hirao K., Yamamoto K., Ishihama A., and Utsumi R. (2005). Negative regulation of DNA repair gene (*uvrA*) expression by ArcA/ArcB two-component system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 251, 243–249.
- Ross C., Pybus C., Pedraza-Reyes M., Sung H., Yasbin R. E., and Robleto E. (2006). Novel role of *mfd* : Effects on stationary-phase Mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 7512-7520.
- Sancar A. (1996). DNA excision repair. *Annu Rev Biochem.* 65, 43-81.
- Sargentini Neil J., and Kendric C. Smith, (1981). Much of Spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli* is the due to error-prone DNA repair: implications for spontaneous carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2, 863-872.
- Sekiguchi M., Nakabeppu Y., Sakumi K., and Tuzuki T. (1996). DNA-repair methyltransferase as a molecular device for preventing mutation and cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 122, 199-206.
- Selby C. P., and Sancar A. (1990). Structure and function of the (A)BC excinuclease of *Escherichia coli*. *Mutat Res.* 236, 203-11.

- Selby C.P., Witkin E.M., and Sancar A. (1991) *Escherichia coli* mfd mutant deficient in "mutation frequency decline" lacks strand-specific repair: in vitro complementation with purified coupling factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11574-11578.
- Tornaletti S., Lauren S., Maeda A., Kolodner R. D., and Hanawalt P. C. (2004). Effect of 8-oxoguanine on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymeraseII. *DNA Repair* 3, 483–494
- Van Houten B., Croteau DL, Dellavecchia MJ, Wang H, Kisker C. (2005). 'Close-fitting sleeves': DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. *Mutat Res.* 577, 92-117.
- Viswanathan A., and Doetsch P. W. (1998). Effects of nonbulky DNA base damages on *Escherichia coli* RNA polymerase-mediated elongation and promoter clearance. *J Biol Chem.* 273, 21276-21281.
- Von Borstel R. C. (1969). On the origin of spontaneous mutations, *Jpn. J. Genet.* 44 Suppl. L, 102-105.
- van den Berg E., Zwetsloot J., Noordermeer I., Pannekoek H., Dekker B., Dijkema R. and van Ormondt H. (1981). The structure and function of the regulatory elements of the *Escherichia coli* *uvrB* gene. *Nucleic Acids Res.* 9, 5623–5643.
- Walker G. C., Smith B. T., and Sutton M. D.(2000). *Bacterial Stress Responses*, ASM Press, Washington, D. C.
- Wang G., and Vasquez K.M. (2006). Non-B DNA structure-induced genetic instability. *Mutat Res* 598, 103-119.
- Wu L. J., Randers-Pehrson G., Xu A., Waldren C. A., Geard C. R., Yu Z., and Hei T. K. (1999). Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 4959-4964.

Zhang Q. M., and Dianov G. L. (2005). DNA repair fidelity of base excision repair pathways in human cell extracts. *DNA Repair* 4, 263-270.