

DNA 損傷による DNA 複製フォーク進行阻害からの再開機構
～損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼを介した DNA 複製再開～

池田 美央
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研究室
(真木 壽治 教授)

平成 26 年 6 月 12 日提出

目次

第一章 序論 4

1. 大腸菌の DNA 複製機構
2. DNA 損傷による複製フォークの進行阻害
3. 損傷乗り越え DNA 合成 (TLS)
4. 大腸菌の DNA ポリメラーゼ IV (Pol IV)
 - 4-1 Pol IV の特徴
 - 4-2 Pol IV の生理的役割
5. 本研究の目的

第二章 材料と方法 15

1. 試薬
2. 培地
3. 菌株
4. プラスミド
5. オリゴ DNA
 - 5-1 鋳型プラスミド作製に用いたオリゴ DNA
 - 5-2 活性測定用一本鎖 DNA
 - 5-3 PCR プライマー
 - 5-4 サザンハイブリダイゼーションプローブ
6. 精製タンパク質
7. 基本操作
8. タンパク質の検出及び定量法
 - 8-1 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク質の分離と検出
 - 8-2 タンパク質の定量法
 - 8-2-1 Bradford 法を用いた定量
 - 8-2-2 ODYSSEY を用いた定量
9. Pol IV タンパク質の精製
10. SSB タンパク質の精製
11. *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応
 - 11-1 ベンツピレン損傷を含む pMOL7-BP(-)プラスミドの構築
 - 11-2 Gyrase 反応
 - 11-3 *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応
12. DNA 複製産物の定量及び観察法
 - 12-1 TCA 沈殿

- 12-2 アルカリアガロースゲル電気泳動
- 12-3 シークエンスゲル電気泳動
- 12-4 二次元ゲル電気泳動
- 12-5 サザンハイブリダイゼーション

第三章 結果 28

第一節 Pol IV による DNA 複製阻害効果についての検証

1. Pol IV による DNA 複製阻害の観察
2. *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応に添加する Pol IV 濃度の検討

第二節 停止した複製フォークにおける TLS を介した複製再開の可否の検証

1. 解析の概要と検出が予測される DNA 複製反応
2. TLS を介した DNA 複製再開の可否の検討
3. 複製フォークの動態解析
4. DNA 損傷の下流からの repriming を介した複製再開の有無の検証
5. DNA 複製再開時におけるラギング鎖伸張反応の検出
6. Pol IV 添加後の反応時間の Time course

第四章 考察 54

1. TLS における DNA ポリメラーゼのスイッチング機構
 - 1-1 TLS のための Pol III から Pol IV へのスイッチングについて
 - 1-2 TLS 後に行われる Pol IV から Pol III へのスイッチングについて
2. リーディング鎖上に DNA 損傷が存在した際のラギング鎖伸長反応の動態
 - 2-1 BP(-)損傷前後のリーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の uncoupling
 - 2-2 BP(-)損傷遭遇時における複製フォーク進行速度の変化
 - 2-3 リーディング鎖とラギング鎖の伸長反応の uncoupling から示唆されること
3. 細胞内における TLS の働き方

謝辞 65

参考文献 66

第一章 序論

1. 大腸菌の DNA 複製機構

生物は、細胞を複製して個体を維持し、次代へ遺伝情報を伝達するため、自己の遺伝情報である DNA の安定的な保存と正確な複製・伝達を行う必要がある。そのため、生物は、DNA を高度に正確に複製するための、精密な DNA 複製システムを有している。DNA の複製反応を触媒する酵素は DNA ポリメラーゼと呼ばれており、原核生物である大腸菌は I~V の 5 種類の DNA ポリメラーゼを保持している(Kornberg and Baker, 1992, Friedberg *et al.*, 2006)。そのうち、染色体 DNA 複製の大部分を複製型 DNA ポリメラーゼの 1 つである DNA ポリメラーゼ III (Pol III) が担っている(Kornberg and Baker, 1992)。Pol III は 10 種類のタンパク質による 17 のサブユニットからなるホロ酵素であり、その構造は、 α , ϵ , θ の各サブユニットより構成されるコア酵素、 τ , γ , δ , δ' , χ , ψ 各サブユニットより構成される DnaX complex、及び β サブユニットからなる大腸菌の滑る留め金タンパク質である β クランプの三つに大別される。一分子の DnaX complex につき二分子のコア酵素が、各々 τ サブユニットを介して結びつけられており、これに β クランプが加わることで Pol III ホロ酵素が構成される(図 1 A)。また、Pol III ホロ酵素から β クランプが解離した複合体は Pol III* と呼ばれる(Kornberg and Baker, 1992, McHenry, 2003, Johnson and O'Donnell, 2005)。

大腸菌は、複製起点を染色体上に一箇所のみ有しており、染色体 DNA の複製は複製起点から両方向に二本鎖 DNA を開きながら進行していく(Hiasa and Marians, 1994, Kim *et al.*, 1996, Hiasa and Marians, 1999)。複製の進行に伴い分離した二本の鋳型鎖と未複製の二本鎖 DNA が接合した Y 字構造は、複製フォークと呼ばれており、複製フォークで DNA 複製に働く酵素は、3 種の酵素(DnaB ヘリカーゼ、DnaG プライマーゼ、Pol III ホロ酵素)からなるレプリソームと呼ばれる複合体を形成している(O'Donnell, 2006)。複製開始に際しては、ATP と結合して活性型となった大腸菌のイニシエータータンパク質である DnaA が、複製起点となる *oriC* 最小配列(245 bp)内に反復して散在する 9 bp の DnaA 結合部位に結合する。更に、DnaA は *oriC* 領域内に存在する AT に富む 13 bp の反復配列にも結合し、二本鎖 DNA を 20 bp 以上に渡って開裂する(Kaguni, 2006, Ozaki and Katayama, 2009)。このようにして生じた一本鎖 DNA 上に、DNA ヘリカーゼである DnaB 六量体がヘリカーゼ装着タンパク質である DnaC 六量体と共に導入される(Masai & Arai 1996, Bárcena *et al.*, 2001)。DnaC はその後すぐにはずれ、残った DnaB ヘリカーゼは活性型となり、一本鎖 DNA 上を 5'→3' 方向に移動しながら二本鎖 DNA を開裂していく。DnaB ヘリカーゼは、プライマーゼである DnaG と結合するため、DnaB ヘリカーゼの働きにより露出した一本鎖 DNA にはプライマー RNA が効率よく形成されていく(Kornberg and Baker, 1992, Tougu *et al.*, 1994, Hiasa and Marians, 1999)。DnaB ヘリカーゼの移動に伴い反復領域に結合していた DnaA は取り除かれ、新しく合成されたプライマーが DnaX complex により識別され、一分子の鋳型上に、

時計回り・反時計回りそれぞれの複製フォークで働く二分子の複製装置が形成される(McHenry, 2003)。そして、DnaX complex により β クランプがそれぞれのプライマーRNA上に装着され、各 Pol III ホロ酵素に属する二分子のコア酵素のうち的一方が、まずリーディング鎖伸長反応を開始する(Johnson and O'Donnell, 2005)。DnaB ヘリカーゼと Pol III ホロ酵素は τ サブユニットを介して結合しており、Pol III が高速で DNA 合成を行いながら DnaB ヘリカーゼを後押しすることで、複製フォークの進行を押し進めている。これにより、DnaB ヘリカーゼの移動速度は、単独で存在する場合に比べ 10 倍にまで上昇する(Kim *et al.*, 1996)。一方、ラギング鎖には DnaB ヘリカーゼの進行に伴い一本鎖 DNA 結合タンパク質(SSB)が結合する(Johnson and O'Donnell, 2005)。そして、ある程度 DnaB ヘリカーゼが進行したところで鋳型上に次のプライマーRNA 合成と β クランプの装着が起こり、残るもう一方のコア酵素がラギング鎖伸長反応を開始する。ラギング鎖伸長反応はリーディング鎖伸長反応とは逆方向に進行し、不連続に新生鎖(Okazaki fragment)を合成していく(Tougu and Marians, 1996)。ラギング鎖側では Okazaki fragment の合成が完了するたびに Pol III*が β クランプから解離し、次の Okazaki fragment 合成のためのプライマーにセットされた別の β クランプと再結合することで、迅速な DNA 鎖伸長反応を可能にしている(Stukenberg *et al.*, 1994, Li and Marians, 2000, Leu *et al.*, 2003)。更に、トポイソメラーゼである GyraseA / GyraseB 複合体が、開裂反応により複製装置の前方にたまる超らせんの蓄積を解消することで、複製フォークの進行を助ける(Kornberg and Baker, 1992)。このようにして、大腸菌では *oriC* 配列中の複製起点から両方向に複製フォークが進行し、リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応が協調して DNA 複製が行われていく。

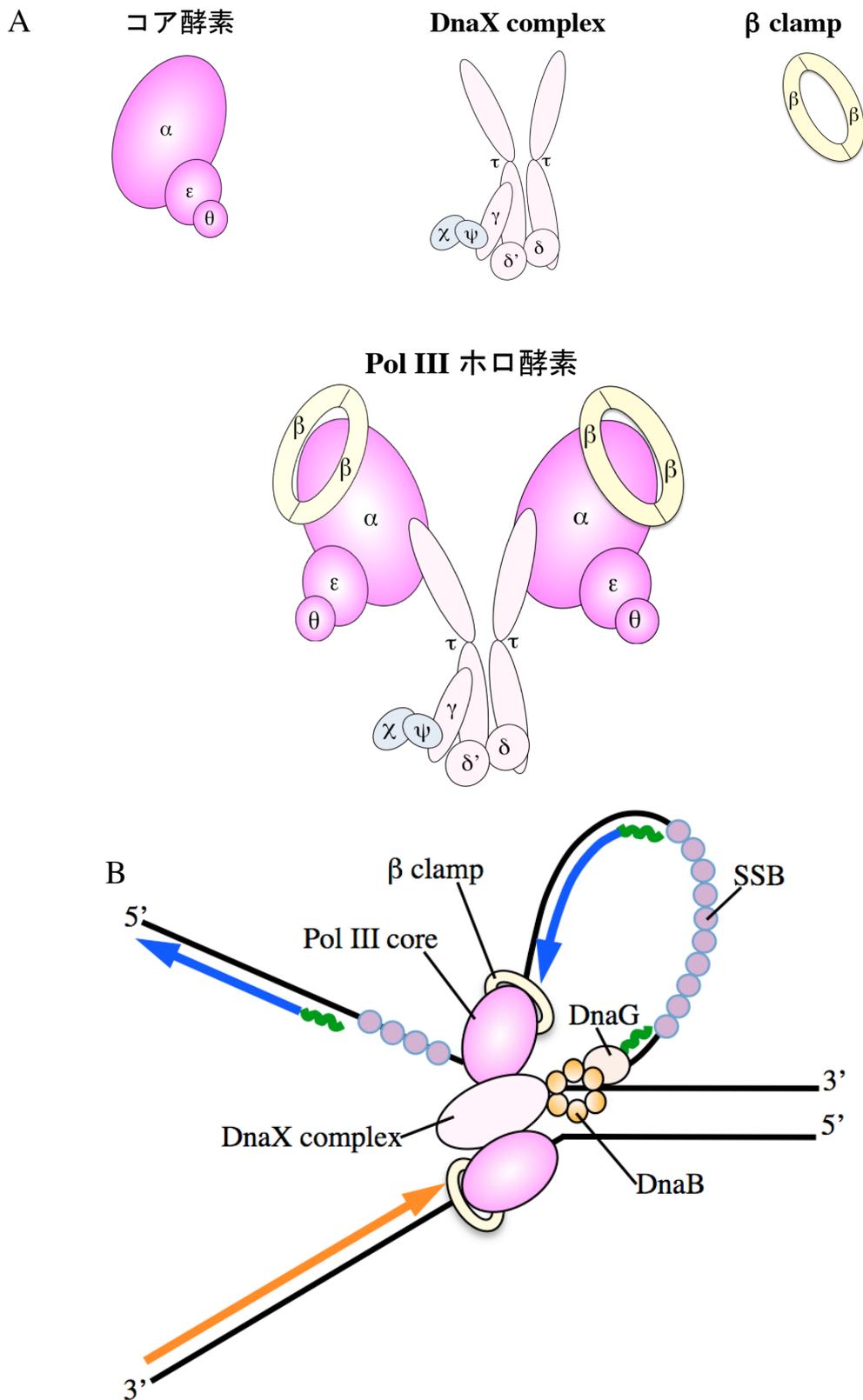


図1 Pol III ホロ酵素と大腸菌の複製フォーク

(A) Pol III ホロ酵素の構成を示す。(B) 大腸菌の複製フォーク構造を示す。黒実線は鋳型 DNA 鎖を、緑色の波線はプライマー-RNA を、橙色矢印はリーディング鎖新生鎖を、青色矢印はラギング鎖新生鎖を示す。

2. DNA 損傷による複製フォークの進行阻害

染色体 DNA 複製の大部分を担う Pol III は、誤った塩基対合を除去する校正機能を持ち、高い忠実度で複製を行うことができる(Kornberg and Baker, 1992)。しかし一方で、細胞内の DNA は紫外線や様々な化学変異原といった外的要因、活性酸素などの内的要因により高頻度に損傷を受けている(Friedberg *et al.*, 2006)。通常、これらのうち大半の DNA 損傷は、塩基除去修復やヌクレオチド除去修復などの細胞自身が持つ各種修復系により、元の遺伝情報に基づき修復される(Lusetti and Cox, 2002, Hanawalt *et al.*, 2003, Huffman *et al.*, 2005)。しかし、一部の DNA 損傷はそのまま DNA 上に残存する。この DNA 損傷部位に複製中の Pol III が遭遇すると、Pol III はその高い忠実性ゆえに基本的に損傷塩基を鋳型として DNA 鎖を伸長することができず、停止してしまう。そのため、特に連続的に複製が行われるリーディング鎖上に DNA 損傷が存在すると、複製の進行が阻害されて複製フォークは停止してしまうと考えられる。その結果、複製フォーク停止部位において、DNA の二本鎖切断が生じやすくなり、細胞の生存は強く脅かされる(Michel *et al.*, 1997) (図 2)。細胞は、この危機を回避するためのストレス応答機構を備えており、大腸菌ではそれは SOS 応答と呼ばれている。DNA 損傷により複製フォークが停止すると、細胞はそのストレスを感知して SOS 応答を誘導し、細胞分裂も一時的に停止して一連の修復因子を一過的に誘導することで、DNA 損傷の修復や複製の再開を図る(Friedberg *et al.*, 2006)。

停止した複製フォークを再開させる機構として、細胞は、組換え修復や損傷乗り越え DNA 合成(Translesion DNA synthesis, TLS)といった機構を保有していると考えられている(図 2)(Friedberg *et al.*, 2006)。がんなどの突然変異に起因する重篤な疾患の発生機構を明らかにするためには、DNA 損傷から突然変異や染色体再編がどのようにして生じるのかという全体像を、これらの複製再開機構の寄与を含めて明らかにすることが必要である。しかし、実際には、これらの多様な複製再開機構が細胞内で何を指標に使い分けられているのかや、複製停止後にどのような過程を経て複製フォークを回復させ複製再開に至るのか、といった重要な問題についてすら、その詳細はあまり明らかではない。

3. 損傷乗り越え DNA 合成 (TLS)

複製フォークの再開に働く機構の内、組換え修復では、停止した複製フォークがそのままの形で複製を再開する訳ではなく、RecA や RecFOR と呼ばれるタンパク質の作用を介して鎖交換反応や複製フォークの後退が引き起こされる。そして、損傷を受けていない DNA 鎖の相同配列領域を一時的な鋳型として複製を行うことで、DNA 損傷部位の複製をカバーする。そのため、基本的に、DNA 損傷が元の塩基配列に影響を及ぼすことなく(エラーフリー)、複製が再開されると考えられている(図 2) (Friedberg *et al.*, 2006、Lusetti & Cox, 2002、Cox, 2001)。

これに対し、TLS は、停止した複製フォークの再開を最優先とした複製再開機構ではないかと考えられている。TLS が行われる際は、TLS 型と呼ばれる DNA ポリメラーゼが用いられ、これは鋳型への忠実度の低い複製を行うが故に、DNA 損傷部位を鋳型として DNA 合成を行うことのできる能力を持つ(図 2)。しかし一方で、塩基対合の規則に従わずに無理に新生鎖に塩基を対合させやすいため、誤った塩基が取り込まれやすく(エラープローン)、突然変異の誘発に寄与していると考えられている。TLS の具体的な機構は、DNA 損傷部位で複製型の DNA ポリメラーゼが停止して複製が阻害された際に、TLS 型 DNA ポリメラーゼが複製型 DNA ポリメラーゼと交替して(ポリメラーゼスイッチ)、DNA 損傷部位の複製を一過的に行うと言うものであり、これが DNA 損傷に遭遇して停止した複製フォーク上で行われることで、複製フォークの進行を回復させるのではないかと考えられている(図 2) (Goodman, 2002、Nohmi, 2006、Fuchs and Fujii, 2007、Yang and Woodgate, 2007)。そのため、TLS を介した複製再開は、DNA ポリメラーゼの交換反応のみを介して、停止した複製フォークの構造変化を経ることなくそのままの形で進行を回復させ、突然変異誘発の危険を犯してでも迅速に複製を再開させる役割を持つのではないかと考えられる。大腸菌では、DNA ポリメラーゼ II, IV, V (Pol II, Pol IV, Pol V) の三種類が TLS に働くとされており、これらはそれぞれ特異的な損傷に対して TLS を実行できる(Bonner *et al.*, 1988, Wagner *et al.*, 1999, Bached-Reuven *et al.*, 1999, Tang *et al.*, 1999, Napolitano *et al.*, 2000, Goodman, 2002)。

しかし、TLS は複製再開機構の一つとして、組換えなどに見られる大掛かりな機構や DNA 複製に必要な因子以外のタンパク質の働きを介さずに正常な DNA 複製を再開させる、緊急避難的な役割を担っていると考えられてはいるものの、実際にどのようなことが細胞内で行われているのかは分かっていない。複製フォークが停止した際に、細胞がどのように損傷に応じて特定の TLS 型 DNA ポリメラーゼを損傷部位にリクルートするのか、どのような分子機構で複製型 DNA ポリメラーゼとスイッチするのかなど、その分子機構は殆ど解明されておらず、TLS 型 DNA ポリメラーゼが損傷により停止した複製フォークに入り込み、Pol III に代わって DNA 合成を行うことが可能であるのかすら未だ不明である。

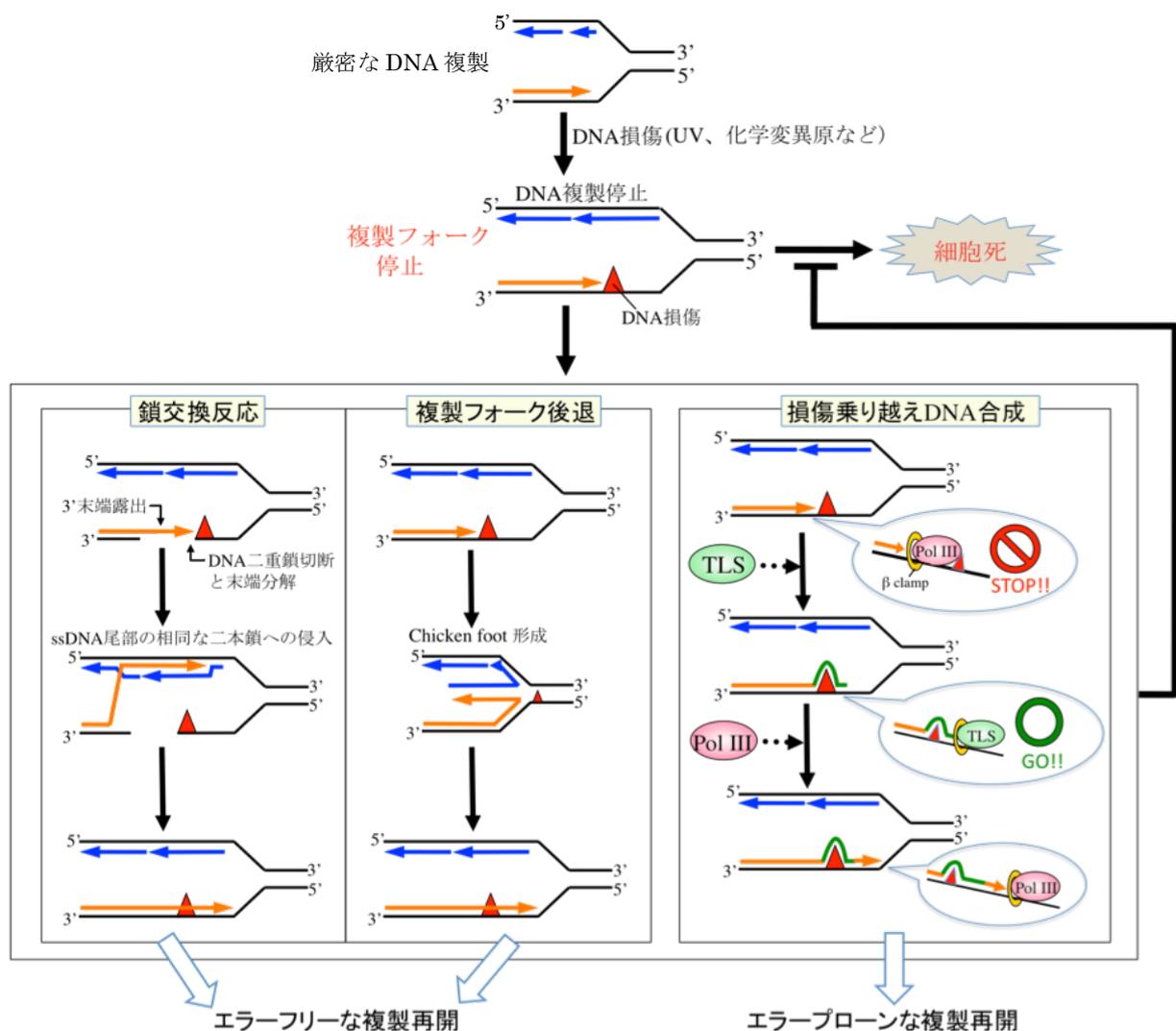


図 2 DNA 損傷により引き起こされる複製フォークの停止と再開機構のモデル
 DNA 損傷により引き起こされる複製フォークの停止から、複製再開に至る過程の概要を示す。黒実線は鋳型 DNA 鎖、赤矢印はリーディング鎖新生鎖、青矢印はラギング鎖新生鎖、赤三角は DNA 損傷を示す。鎖交換反応では複製停止部位で二本鎖切断が生じ、末端から分解を受けることで 3'末端が露出する(ssDNA 尾部)。これが、既に複製が行われた相同な DNA 二本鎖に侵入し、相補鎖を一時的な鋳型として損傷部位の複製を行う。分解により生じた鋳型 DNA 鎖の gap は、この新生鎖を鋳型として埋められると考えられる。複製フォーク後退は、リーディング鎖の鋳型 DNA に損傷が生じた場合に起こると考えられる。DNA 損傷に遭遇するとリーディング鎖の DNA 合成は停止するが、ラギング鎖側はある程度 DNA 合成が継続され、その後複製フォークが巻き戻されて Chicken foot と呼ばれる構造が形成される。そして、新たに合成された無傷のラギング鎖新生鎖を鋳型として損傷部位が複製される。TLS では、損傷部を合成できずに停止した Pol III と TLS 型の DNA ポリメラーゼが入れ替わり、TLS 型が損傷部の DNA 合成を行うと考えられている。その後、再度 Pol III と入れ替わることで複製フォークの構造変化を伴わずに複製が再開する。ピンク色の楕円は Pol III、緑色の楕円は TLS 型 DNA ポリメラーゼ、緑線は TLS 型 DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を示す。

4. 大腸菌の DNA ポリメラーゼ IV (Pol IV)

4-1 Pol IV の特徴

DNA ポリメラーゼ IV (Pol IV) は、*dinB* 遺伝子にコードされた、Y 型に分類される大腸菌の TLS 型 DNA ポリメラーゼである。大腸菌からヒトまでその種間を超えて幅広く保存されていることから、Y 型 DNA ポリメラーゼのプロトタイプであると考えられている(Wagner *et al.* 1999, Ohmori *et al.*, 2001)。また、その構造は、ポリメラーゼ活性を持つポリメラーゼドメイン、Y 型の DNA ポリメラーゼに特異的な構造であるリトルフィンガードメイン、 β クランプとの結合に必須の領域である β クランプ結合部位の 3 つから構成されている。Pol IV は、TLS 型の DNA ポリメラーゼとしては、脱塩基損傷や 8-オキシグアニンの他、ベンツピレンなど嵩高い DNA 付加体を伴う DNA 損傷に対して、TLS を行うことが可能であるとされている(Napolitano *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2001, Shen *et al.*, 2002, Jarosz *et al.*, 2006)。TLS 型 DNA ポリメラーゼは、大腸菌の生存が脅かされた際に誘導されるストレス応答機構である SOS 応答によって発現誘導されることが報告されており(Kim *et al.*, 1997)、非 SOS 応答時(正常時)には、一細胞あたり Pol V は 15 分子、Pol II は 50 分子程度しか存在していない。しかし、Pol IV は発現レベルが高く、正常時にも 250 分子程度存在している。更に、SOS 応答時には、Pol V が 200 分子、Pol II が 350 分子程度、発現するのに対し、Pol IV は 2500 分子もの発現が誘導され、細胞内で突出して多量に存在する DNA ポリメラーゼとなる(Kim *et al.*, 2001)。

4-2 Pol IV の生理的役割

Pol IV の機能については不明瞭な点が多い。Pol IV は TLS 型の DNA ポリメラーゼに分類されていることから、生体内での主要な役割は TLS であろうと考えられ、様々な解析がなされてきた。しかし、Pol IV が複製フォークにおいて TLS を行っている直接的な証拠は未だ得られていない。*In vitro* における生化学的な解析では、Pol IV が一本鎖 DNA 上において、ベンツピレンによる N²-B[a]P-dG や、N²-furfuryl-dG、脱塩基損傷、8-オキシグアニンなど数種類の DNA 損傷を乗り越えられる事が観察されている (Gruz *et al.*, 2001, Shen *et al.*, 2002, Jarosz *et al.*, 2006)。しかし、細胞内において実際に TLS が行われると考えられる複製フォークでは、多種多様な複製関連タンパク質が協調的に作用しあって機能している。DNA 複製が停止したとは言え、このような所に Pol IV が入り込んで、協調的に働く複製装置の一部を成す Pol III と一過的に入れ替わり、TLS を行うことができるかは全く別問題である。一方、*in vivo* においては、Pol IV を過剰に生産させると、細胞内に組み込まれた突然変異検出のためのプラスミド上で -1 フレームシフトの突然変異が増加することから、Pol IV が突然変異の誘発に関与する DNA ポリメラーゼであると考えられてきた(Wagner *et al.*, 1999)。更に、グアニンに付加体を付加する変異を引き起こす 4-NQO を含む培地において、この -1 フレームシフト変異の生じる頻度が、Pol IV の発現量によって左右され、DNA ポリメラーゼ

活性を欠損した変異体ではそれが観察されないこと(Kim *et al.*, 2001)、Pol IV の基質となると考えられる損傷を含んだプラスミドを組み込んだ株において、Pol IV の有無により、SOS 応答下でのプラスミド上の突然変異頻度が異なること(Napolitano *et al.*, 2000)、更には 4-NQO や NFZ を含む培地で Pol IV 欠損株を培養した際に、その生菌率が低下すること(Jarosz *et al.*, 2006、Heltzel *et al.*, 2009)などから、間接的に Pol IV が TLS を介した複製再開を行っているとは推測されている。しかし、Pol IV をはじめとする TLS 型 DNA ポリメラーゼは複製フォークにおける複製再開のためではなく、NER や組換え修復と言った修復機構において働いている可能性が存在する。実際に、本研究室の沙魚川らの解析からも、3つの TLS 型 DNA ポリメラーゼが協調して NER の反応経路を通じて働いている可能性が示唆されている(沙魚川 2008)。そのため、Pol IV の発現に操作を加え、突然変異頻度や生菌数の増減をどれだけ示したところで、細胞内で Pol IV が何らかの働きを示していることは分かっても、それは例えば NER の途中で発生する gap を埋めているのかもしれない、実際に Pol IV が複製フォークで TLS を行った結果であるかは断定できない。そのため、Pol IV による TLS が本当に複製再開に寄与しているかは、未だ不明なままであると考えられる。

一方で、既に述べたように、Pol IV は正常時ですら細胞内に 250 分子も存在しており、他の TLS 型 DNA ポリメラーゼと比較して高い発現量を示している。また、本研究室において、損傷の無い環状一本鎖 DNA を鋳型とする単純な *in vitro* DNA 複製系を用いた解析により、Pol IV と Pol III が生理的な濃度比で存在する実験条件下で、Pol IV が Pol III と強制的に入れ替わり Pol III による DNA 複製を阻害することや、複製反応を開始した Pol III に Pol IV が働き、その新生鎖伸長速度を著しく低下させる活性を持つことが明らかとなった(Furukohri *et al.*, 2008)。また、*in vivo* での解析においても、Pol IV を細胞内で過剰発現させることで、複製フォークの進行阻害が生じることが示されている(Uchida *et al.*, 2008)。これらの Pol IV の持つ複製阻害活性や種間での高い保存性から、Pol IV が TLS 以外に未知の重要な生理的役割を担っている可能性も考えられる。

これに対し、Pol IV と同じ Y 型の TLS 型 DNA ポリメラーゼである Pol V は、紫外線照射により生じるチミン二量体などの重篤な DNA 損傷に対して TLS を行うことが可能であり、大腸菌にとって重要性の高い TLS 型 DNA ポリメラーゼであると考えられている。しかし、正常時にはその発現は低く抑えられており、SOS 応答時に SOS 応答誘導に働く活性化 RecA による調節を受けることで、初めて TLS の機能を発揮することが可能となる(Bacher-Reuven *et al.*, 1999、Tang *et al.*, 1999、Goodman, 2002)。複製型である Pol III は常時 10~20 分子程度しか存在しないのに対し、SOS 応答時の Pol V の発現量は約 200 分子であることから、Pol III と入れ替わるためには、この程度の分子数の差は必要である可能性が高い。Pol IV の正常時の分子数は 250 分子程度と SOS 応答時の Pol V と近似している上、Pol V に見られるような制御機構の存在も知られていない。このことから、Pol IV は Pol V とは異なり、正常時でも TLS を行う能力を十分に保有している可能性が高いと考えられる。また、前述した Pol IV による Pol III の

阻害効果についても、単純な濃度比のみに依存せず、積極的に Pol III に作用して停止した Pol III と素早く入れ替わり、早期に複製を再開させるために必要な機能であるとも考えられる。構成因子の少ない *in vitro* での解析や、細胞内に Pol IV が大過剰に存在する条件下では、この機能が Pol III と Pol IV の頻繁なスイッチング(交換反応)を引き起こしてしまい、結果的に複製阻害と言う形で観察された可能性が考えられる。

これまで、大腸菌の TLS については Pol V を中心に解析が行われてきたため、SOS 応答下で行われる反応であると言う認識が強い。しかし、Pol IV は正常時でも TLS による複製再開を行える可能性を十分に有している。また、SOS 応答は損傷の修復と複製の再開を図る大腸菌にとって重要な機構であるが、同時に多数の突然変異を誘発するため、細胞にとって諸刃の剣でもある。例えば、UV のような外因性の原因により DNA に損傷が生じた場合には、それは DNA 上の 1 箇所にもみ生じるわけではなく、染色体上の広範囲に渡ってチミン二量体などの DNA に大きな歪みをもたらす損傷が多数発生すると考えられる。このような場合、複製だけでなく各所で転写の阻害も頻発し、細胞の生存が強く脅かされるため、SOS 応答を誘導して NER や Pol V の働きにより修復を促す必要がある。しかし、内因性の原因により僅か一つの塩基損傷によって複製が阻害されるたびに、SOS 応答が誘導されることは望ましくない。このような理由から、Pol IV は、正常時にも TLS を行って素早く複製を再開させることで SOS 応答の誘導を阻止し、染色体 DNA に生じる変異を最小限に抑えて複製停止の危機を切り抜けるため、高い細胞内濃度と Pol III に積極的に作用する機能を備えている可能性がある。ゆえに、少なくとも正常時の 250 分子と言う Pol IV の濃度は決して過剰ではなく、TLS による複製再開が Pol IV の主要な役割である可能性も高い。

5. 本研究の目的

既に述べたように、TLS は他の複製再開機構と異なり、DNA 複製停止後も複製フォークがその構造を保ったまま、そのままの形で複製を再開すると言った緊急回避的な分子機構を持つ、細胞にとって重要な複製再開機構の一つであると考えられる。しかし、それにも関わらず、本当に細胞内で、そのような機構が複製フォークの再開に寄与しているのかすら明らかではない。そこで本研究では、まず、TLS が、DNA 損傷により停止した染色体 DNA 複製の再開に働くことができる機構であるのかを、解析することとした。更に、TLS の複製再開への寄与が確認できた際には、TLS の分子機構についても解析を行い、複製停止から再開に至る一連の分子機構を明らかにしたいと考え研究を行った。

TLS が、実際に細胞内で停止した複製の再開に寄与できる機構であることを示すには、染色体 DNA の複製が行われる複製フォークにおいて、TLS とそれに伴った正常な複製の再開が可能であることを検証することが必要となる。しかし、*in vivo* の実験では、DNA 損傷による複製フォークの停止に引き続き、複製再開のために細胞内に備わっている複数の修復機構が働いてしまうため、これらの修復機構が働く以前の複製フォークの停止や再開の実態の解析は困難である (Cox, 2001)。そこで、試験管内で細胞内の染色体 DNA 複製を再現できる *in vitro* の実験系を用い、DNA 損傷に遭遇した複製フォークが、TLS 型 DNA ポリメラーゼの添加によりどのような動態や DNA 複製の状況を示すのか、直接的に解析することとした。解析には、大腸菌細胞内の染色体 DNA 複製を、精製タンパク質のみで完全に再構成可能な唯一の *in vitro* 実験系である、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応を用いた。この系は、大腸菌の複製起点である *oriC* を持つプラスミドを鋳型とし、18 種類の精製された複製関連タンパク質を添加することで、*oriC* 領域を起点として、生体内と同様に両方向に同時に DNA 複製反応を進行させることが出来る (Van Der Ende *et al.*, 1985、Funnell *et al.*, 1986、Marians, 1992、Katayama *et al.*, 1995)。*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製系は A.Kornberg らを中心として確立され、詳細な複製反応がよく研究されてきた。本研究室においても、単一の DNA 損傷が複製フォークに及ぼす影響を調査するため、この系を用いた解析が行われてきた(Higuchi *et al.*, 2003)。

TLS を介した複製再開の検証には、Pol IV を用いた。これは、大腸菌の主要な TLS 型 DNA ポリメラーゼであると考えられている Pol V では、TLS のために少なくとも RecA による活性化が必要とされ SOS 応答下でのみ働くなど、TLS 型 DNA ポリメラーゼとして機能するために複製停止後にいくつかの段階を経る必要があるためである。そのため、Pol V の添加により結果的に複製の再開が観察できたとしても、それが純粋に Pol V による TLS のみによって生じたものなのか、TLS 以外に修復機構は介在していないのかなど、様々な可能性が浮上し、解析が複雑になることが考えられる。また、Pol V は SOS 応答下においても率先して働く訳ではなく、SOS 応答の後期になってその発現

が誘導される(Courcelle *et al.*, 2001, Goodman, 2002)。本研究では、TLS の緊急避難的な役割に焦点を当て、DNA 複製停止後に停止した複製フォークがそのままの形で素早く再開するような複製再開機構が細胞内に存在し得るのかを検証することを最初の目的としている。そのため、細胞内で TLS を行うまでに相当の時間を要する Pol V は今回の解析には適さない。これに対し、Pol IV は現在のところ調節因子なども知られておらず、Pol V と異なり、あらかじめ複製フォークに存在する要素のみで TLS を行える可能性が高い。このことから、DNA 複製停止時における TLS の複製再開に対する寄与を素直に反映した事象が観察できると考えた。更に、TLS を介した迅速な DNA 複製の再開は、SOS 応答の誘導などを経ない正常時においてこそ必要とされる機構であると考えられるため、正常時にも TLS を行える可能性が高い Pol IV はこの解析に最適である。

加えて、Pol IV は種間での高い保存性を持つことから、TLS 型のプロトタイプとして、最も一般的に幅広い場面で用いられているのではないかと考えられる。そのため、本研究を通じて TLS による複製再開機構の詳細を解明することができれば、真核生物における TLS の分子機構の理解にも大きく寄与できる可能性がある。TLS などの複製再開機構をはじめとする修復機構については、細かな分子機構に違いはあるものの、原核生物・真核生物共に、損傷応答としての基本的な仕組みは同じものを持つであろうと考えられている。しかし、比較的単純な仕組みを持つと考えられる大腸菌においてすら、その詳細な分子機構は研究の困難さからまだ殆ど明らかにされておらず、これらを解明することの意義は非常に大きい。また、TLS は、複製再開機構であると同時に突然変異の誘発にも大きな関わりを持つと考えられることから、その詳細を明らかにすることで、がんや進化など生物に重大な影響をもたらす突然変異の発生機構の全貌についての理解もより進むと考えられる。

第二章 材料と方法

1. 試薬

本研究で用いた試薬は、特に記載がない限り、和光純薬社あるいはナカライテスク社の製品を使用した。%で表記した濃度については、特に記載の無い限りはW/Vとする。Tris (TRIZMA)、IPTG、bovine serum albumin (BSA)はSIGMA社、HEPES、EDTAは同仁化学株式会社の製品を用いた。各種溶液はMilliQ水(MILLIPORE社)に溶解して調製した。酵素類に関しては、東洋紡績社、New England Biolabs (NEB)社の製品を使用した。³²P放射性標識されたヌクレオシド三リン酸は、Perkin Elmer社の製品を使用した。抗生物質は、クロラムフェニコール(Cm)は25 mg/mlとなるよう100%エタノールに溶解し、アンピシリン(Amp)は50 mg/ml、カナマイシン(Km)は25 mg/mlとなるようMilliQ水に溶解して0.22 µmのSyringe Driven Filter Unit (Millex社)にて濾過滅菌し、-30°Cで保存した。抗生物質は、特に記載がない場合、Ampは50 µg/ml、Kmは50 µg/ml、Cmは10 µg/mlとなるよう培地に添加した。

2. 培地

培地作成のために用いたBacto Agar、Bacto Tryptone、Bacto Yeast ExtractはDifco社の製品を使用した。各種培地は脱イオン水に溶解して調製した。

一般の大腸菌の培養にはLB培地 [1.0% Bacto Tryptone、0.5% Bacto Yeast Extract、1.0% NaCl]を用いた。寒天培地として使用する際には、終濃度1.5%となるようBacto Agarを加えた。LB培地は、オートクレーブによる滅菌(121°C、20分)を行う前に10N NaOHを用いてpH 7.0に調整した。また、培地には必要に応じ、60°C以下に冷ました後に、適切な最終濃度になるよう抗生物質やグルコースを無菌的に添加した。

3. 菌株

本研究に用いた大腸菌株の遺伝子型と由来を表1に記載する。

BL21(DE3)pLysSは、タンパク質過剰発現用のベクターであるpET-15b、及びそのマルチクローニングサイトに*dinB*遺伝子全長が挿入されたpET15b His-*dinB*の宿主として用いた。JM109は精製SSBタンパク質の活性測定に用いた*in vitro* DNA合成系の一つであるBurst DNA複製反応(Furukohri *et al.*, 2008)の鋳型となるM13mp18ファージ単鎖DNA調製のための宿主として用いた。W3110 Tus::*Km^r*は*terB*配列を持つプラスミドを培養する際の宿主として用いた(Hidaka *et al.* 1988)。

表 1 菌株リスト

菌株名	遺伝子型	由来
BL21(DE3)pLysS	: F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pLysS, Cm	Novagen 社
JM 109	: <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻m_K⁺</i>), <i>e14</i> (<i>mcrA⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/F' [<i>traD36</i> , <i>proAB⁺</i> , <i>lac I^s</i> , <i>lacZΔM15</i>]	研究室ストック
W3110 Tus::Km ^r	: LAM ⁻ , <i>in(rrnD-rrnE)1</i> , <i>rph-1</i> , <i>r⁺m⁺</i> , Tus::Km ^r	Kobayashi <i>et al.</i> , 1989

4. プラスミド

本研究で使用したプラスミド DNA を表 2 に記載する。

pMOL7 は、大腸菌の複製起点である *oriC* と複製終結配列である *terB* を持つ約 4.4 kb のプラスミドであり、*in vitro* の DNA 合成系の一つである *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応に用いられる標準的な鋳型として、本研究室の樋口により作製された(Fujii *et al.*, 1999、Higuchi *et al.*, 2003)。P1、P2、ベンツピレンによる損傷である (-)-*trans-anti-benzo[a]pyrene-N²-dG* 損傷 (BP(-)損傷) を含む pMOL7-BP(-)、及びそのコントロールである pMOL7-control の各プラスミドについては、フランス国立科学センター(CNRS)の Fuchs 教授により、この pMOL7 を第二章 11-1 に記載したように改変することで作製され、その供与を受けた(図 3)。pMOL7-BP(-)には、単一の BP(-)が DNA 損傷として、リーディング鎖上の *oriC* から反時計回りに約 1.7 kb の距離に位置するグアニンに付加されている。

pET15b は、アンピシリン耐性遺伝子を持つ low copy プラスミドであり、T7 プロモーター下流にヒスチジン遺伝子配列とマルチクローニングサイトを持つ、タンパク質過剰発現用のベクターである。IPTG の添加により、目的遺伝子は N 末端側にヒスチジンタグを融合させたタンパク質として発現される。

表 2 プラスミドリスト

名称	特徴	由来
pMOL7	: <i>oriC</i> プラスミド	Higuchi <i>et al.</i> , 2003
P1	: pMOL7 に <i>EcoRV</i> 認識配列を含むオリゴ DNA を導入したもの	CNRS, Fuchs 教授より分与
P2	: pMOL7 に <i>BsrGI</i> 認識配列を含むオリゴ DNA を導入したもの	CNRS, Fuchs 教授より分与
pMOL7-BP(-)	: リーディング鎖上に単一の BP(-)損傷を導入した <i>oriC</i> プラスミド	CNRS, Fuchs 教授より分与
pMOL7-control	: pMOL7-BP(-)と同様に作製された損傷を含まない <i>oriC</i> プラスミド	CNRS, Fuchs 教授より分与
pET15b	: タンパク質過剰発現用ベクター	Novagen 社
pET15b-His- <i>dinB</i>	: pET15b のマルチクローニングサイトに <i>dinB</i> 遺伝子が全長挿入されたもの。	Furukohri <i>et al.</i> , 2008

5. オリゴ DNA

5-1 鋳型プラスミド作製に用いたオリゴ DNA

oriC プラスミド *in vitro* DNA 複製反応に供する鋳型プラスミド作製のために使用したオリゴ DNA を表 3 に記載する。

各プラスミドに導入したオリゴ DNA の種類とその導入方法は、第二章 11-1 及び図 3 に、より詳細に記載した。BP(-)損傷が付加されたグアニンは*G と記載する。

5-2 活性測定用一本鎖 DNA

精製タンパク質の活性測定のために利用した一本鎖オリゴ DNA を表 3 に記載する。

AF_hook-10 は 3'末端が 5'末端の 10 bp 下流に会合しており、一つの分子中にプライマーと鋳型が存在するため、アッセイ中のプライマー数がコントロールできる。uni25 は M13mp18 フェージ単鎖 DNA を複製反応の鋳型とする際のプライマーとして用いた。

5-3 PCR プライマー

塩基配列マーカー作製のために使用したプライマーを表 3 に記載する。

5-4 サザンハイブリダイゼーションプローブ

oriC プラスミド *in vitro* DNA 複製反応により得られた複製産物を、サザンハイブリダイゼーションにより解析するためのプローブとして使用したオリゴ DNA を、表 4 に記載する。プローブ A は *oriC* の 854 bp 下流に、プローブ B はベンツピレン損傷の 50 bp 上流に、プローブ C はベンツピレン損傷の 51 bp 下流に、プローブ D 及びプローブ D'は損傷から 461 bp 下流に設計されている。プローブ D'はリーディング鎖の新生鎖を、それ以外のプローブはラギング鎖の新生鎖(Okazaki fragment)を検出する。

表 3 オリゴ DNA リスト

名称	塩基配列 (5'→3')	用途・特徴
1) 鋳型プラスミド作製に用いたオリゴ DNA		
Cassette A	: ATTGA GATAT CCTTA	<i>EcoRV</i> 認識配列を含む
Cassette B	: ATTGA GATGA AGACC TGTAC AGGAT CCTTA	<i>BsrGI</i> 認識配列を含む
BP(-)-oligo	: ATTGA GATGA AGACC T*GCAG GATCC TTA	BP(-)損傷を含む
Control-oligo	: ATTGA GATGA AGACC TGCAG GATCC TTA	損傷のないコントロール
2) 活性測定用一本鎖 DNA		
AF_hook-10	: TTTGT TCTTT TGGCA CCAAC TATAT GTTGG TGCCA	精製した Pol IV の活性測定用鋳型
uni25	: CGACG TTGTA AAACG ACGGC CAGTG	primed template DNA 作製用
3) PCR プライマー		
ddM- <i>MscI</i>	: CCAGT TGAAC AAGTC TGGAA AG	塩基配列マーカー作製用

表 4 サザンハイブリダイゼーション用プローブ

名称	塩基配列 (5'→3')	相同領域
A	GCAGC AACAG TCTTC ATTCA AGCGG CGTCA CAATA GTGAG	3676-3717 bp
B	GAATA ACGGT TTGGT TGATG CGAGT GATTT TGATG ACGAG CG	2635-2677 bp
C	GTTGT ATTGA TGTTG GACGA GTCGG AATCG CAGAC CGATA C	2490-2531 bp
D	CGATT CAGGC CTGGT ATGAG TCAGC AACAC CTTCT TCACG	2050-2121 bp
D'	CGTGA AGAAG GTGTT GCTGA CTCAT ACCAG GCCTG AATCG	2050-2121 bp

uni25、サザンハイブリダイゼーション用プローブは研究室ストック。AF_fook-10、PCRプライマーはジーンデザイン社に合成を委託した。

6. 精製タンパク質

DnaA (160 ng/μl), Gyrase A subunit (GyrA) (920 ng/μl), Gyrase B subunit (GyrB) (460 ng/μl), HU (80 ng/μl)タンパク質は、九州大学の片山先生より分与して頂いた。Tus タンパク質(280 ng/μl)は、基礎生物学研究所の日高先生より分与して頂いた。β subunit (200 ng/μl), DnaB helicase (980 ng/μl), DnaC (333 ng/μl), DnaG primase (530 ng/μl), Pol III* (80 units/μl), Pol IV-D8A(1 mg/ml) タンパク質については、当研究室で精製されたストックを用いた。SSB タンパク質(570 ng/μl)については本研究で精製を行った。Pol IV タンパク質については、本研究で精製を行ったもの(1.39 μg/μl)、あるいは当研究室で精製されたストック(1 mg/ml)を用いた。

Pol III*の活性定義は、30℃、5分間の反応において、1分間に 1 pmol の dNTP を DNA に取込む活性を 1 unit とするものである。

7. 基本操作

基本的なDNA操作はMolecular Cloning (Sambrook *et al.*, 2001)に記載されている方法を用いた。

8. タンパク質の検出及び定量法

8-1 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク質の分離と検出

泳動装置は、Mini PROTEIN II Cell 電気泳動槽(BioRad 社)を用いて行った。ゲルや試薬の調製は定法に従い、Resolving gel : 15%アクリルアミド、Stacking gel : 8.0%アクリルアミドの条件で行った。100℃で3分間ボイルした SDS を含むタンパク質溶液をウェルにアプライし、1×SDS-PAGE Running Buffer [250 mM Tris、250 mM glycine、0.1%

SDS]を用いて、ゲル一枚あたり 10 mA で 1.5 時間泳動を行った。ゲルの染色には CBB を用い、定法に従い行った。

8-2 タンパク質の定量法

8-2-1 Bradford 法を用いた定量

BSA を標準タンパク質として、Protein Assay kit (BioRad 社)を用いて行った。実験操作は、添付された説明書に従った。

8-2-2 ODYSSEY を用いた定量

より正確な定量は、BSA を標準タンパク質として bioscience 社の ODYSSEY infrared imaging system (LI-COR)及び odyssey アプリケーションソフトウェアを用いて行った。シグナル検出は 700 nm で行った。定量の手順は、まず 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 μg の BSA、並びに数段階に希釈倍率を振った濃度未知のタンパク質について、SDS-PAGE 解析を行い、CBB 染色したゲルを odyssey によってスキャンした。解析ソフトにより、検出した各バンドのシグナルを数値化し、この数値を用いて BSA による検量線を作成して、濃度未知のタンパク質の定量を行った。

9. Pol IV タンパク質の精製

Pol IV の精製にはヒスチジンタグを利用し、ヒスチジンタグ融合 Pol IV として精製を行った。Pol IV の過剰生産には、第二章 4 に記載した pET15b ベクターを用いた。この系では、IPTG 添加により発現宿主である BL21(DE3)pLysS 株の *lac* プロモーター制御下にある T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の発現が誘導される。この RNA ポリメラーゼにより pET 発現ベクター内の T7 プロモーターの下流に挿入した目的遺伝子が転写される。得られた細胞は、40 ml の Buffer A (50 mM Sodium Phosphate pH 7.4, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole)で再懸濁し、懸濁液を液体窒素で凍結させて -80°C で保存した。

以降の精製の操作は特に記載がない限り全て 4°C で行った。また、精製過程において、適宜、溶出画分の SDS-PAGE 解析及び Bradford 法によるタンパク質定量を行った。得られた細胞を溶かし、終濃度 0.2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)、終濃度 20 mM 2-メルカプトエタノール、及び終濃度 0.5 mg/ml lysozyme となるように各試薬を加え、穏やかに攪拌した後、20 分間氷上で静置した。続いて、ULTRASONIC DISRUPTOR UD-201 (トミー工業社)を用いて細胞を破砕 (出力 5, 10 秒, 6 サイクル)し、細胞破砕液を得た。これに 50 unit の Benzonase を添加し、遠心分離(12000 rpm, 4°C , 15 分間, 2 サイクル)して上清を得た。上清を、0.45 μm Syringe Driven Filter Unit に通し、細胞抽出液を調製した。これを、1 ml HiTrap Chelating HP column (GE ヘルスケアバイオサイエンス社)にニッケルイオン(Ni^{2+})を結合させた Ni^{2+} カラムに供し、FPLC system (アマシャムバイオサイエンス社)を用いてカラムクロマトグラフィーによる精製を行

った。Wash buffer として、Buffer B (50 mM Sodium Phosphate pH 7.4, 1.5 M NaCl, 20 mM imidazole, 5 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% glycerol, 0.1 mM PMSF, 20 mM 2-メルカプトエタノール)を、elution buffer として Buffer C(50 mM Sodium Phosphate pH 7.4, 300 mM NaCl, 1 M imidazole, 5 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% glycerol, 0.1 mM PMSF, 20 mM 2-メルカプトエタノール)を用い、ヒスチジンアナログである imidazole 濃度勾配(20 mM–1.0 M)により溶出を行った。得られた溶出画分は、更なる精製のため 5ml HiTrap Heparin HP column (GE ヘルスケアバイオサイエンス社)に供し、FPLC system を用いてカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。Wash buffer として Buffer D (50 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1.0 mM dithiothreitol (DTT))を、elution buffer として Buffer E (50 mM HEPES-NaOH pH7.4, 1.0 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1.0 mM DTT)を用い、NaCl 濃度勾配(200 mM–1.0 M)により溶出を行った。得られた溶出画分は、CENTRICON YM10 (MILLIPORE 社)を用いて、添付された説明書に従い遠心法によりサンプル容量を約 1/10 に濃縮した後、ゲル濾過カラムを用いて更なる精製を行った。、ゲル濾過カラムとして Superose 12 HR10/30 column(GE ヘルスケアバイオサイエンス社) を用い、FPLC system を使用してカラムクロマトグラフィーにて精製を行った。Elution buffer には Buffer F (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.0 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1.0 mM DTT)を用いた。これにより得られた溶出画分を Pol IV 最終標品とし、-80°Cで保存した。

精製した Pol IV が適切な DNA ポリメラーゼ活性を保持していることを確認するため、高濃度の Pol IV が存在することが確認された溶出画分については DNA ポリメラーゼ活性の測定を行った。鋳型には、第二章 表 3 に示した短い hook DNA である AF_hook-10 を用い、これを基質として DNA 鎖伸長反応を行って経時的な dNTP 取り込み量を測定することで、Pol IV の活性を確認した。

10. SSB タンパク質の精製

精製の操作は特に記載がない限り全て 4°Cで行った。また、精製過程において適宜、溶出画分の SDS-PAGE 解析及び Bradford 法によるタンパク質定量を行った。SSB の精製には、Deoxyribonucleic acid-cellulose single-stranded prepared from calf thymus DNA (Sigma 社)を empty カラムに充填した ssDNA cellulose カラムを用い、FPLC system を使用して、カラムクロマトグラフィーにて ssDNA との強い親和性を利用して、精製を行った。精製は、以前、SSB 過剰発現大腸菌 RLM272(pKC16SSB)(TOYOBO 社)の細胞抽出液より、Polymin P 沈殿、及び硫酸沈殿により粗精製された、研究室ストックの SSB Fr III(AS)から開始した。Wash buffer として TGE buffer+0.3 M NaCl (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.3 M NaCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol)を、elution buffer として TGE buffer+0.6 M NaCl、および TGE buffer+2.0 M NaCl を用いた。得られた溶出画分は、その中に一定量混入する ssDNA Cellulose カラム由来の一本鎖 DNA(ssDNA)を除去するため、PBE94 Polybuffer exchanger (GE ヘルスケアバイオサイエンス社)を empty カラムに充填した

PBE94 カラムに供した。溶出は TGE buffer+2.0 M NaCl で行った。溶出された SSB サンプルは高塩濃度の buffer に溶解しているため、溶出画分を透析膜 Spectra/Por 2 (MWCO 12-14000)(Spectrum Laboratories 社)にパックし、SSB storage buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5、200 mM NaCl、20% glycerol)内で、2~4 時間、3 回透析を行った。その後、硫酸沈殿による濃縮を行い、SSB storage buffer に再懸濁した。このサンプルを再度、透析膜 Spectra/Por 2 (MWCO 12-14000)にパックし、SSB storage buffer 内で、2~4 時間、3 回透析を行い、これを SSB 最終標品として-80℃で保存した。精製した SSB の最終濃度については、ODYSSEY を用いて定量を行った。

精製した SSB の活性については、Burst DNA 複製反応を用いて確認を行った。Burst DNA 複製反応は、JM109 株を宿主として調製した M13mp18 ファージ単鎖 DNA を鋳型とし、同調的に DNA 鎖伸長反応を開始させることができる比較的単純な *in vitro* の DNA 複製反応である(Furukohri *et al.*, 2008)。M13mp18 ファージ単鎖 DNA を鋳型とした DNA 複製反応では SSB が必須であり、もしも SSB の活性が充分で無ければ、単鎖 DNA が高次構造を取ることで Pol III による複製が阻害されてしまう。そこで、Burst DNA 複製反応に新たに精製した SSB を添加し、Pol III による dNTP の取り込み量やポーリングサイトの有無を、旧来の SSB を添加した場合と比較することで、この SSB が妥当な活性を保持していることを間接的に確認した。

11. *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応

11-1 ベンツピレンによる損傷を含む pMOL7 -BP(-)プラスミドの構築

本研究では、DNA 複製停止後に TLS を介して正常な複製再開が行われるかを検証し、その分子機構を解析するため、単一の塩基損傷を含む鋳型 DNA が必要となる。*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応では、鋳型 DNA として、大腸菌の複製起点である *oriC* を持ち、染色体 DNA 複製と同様に *oriC* から双方向に複製が進行する *oriC* プラスミドを用いる。本研究室では、双方向の複製による複製産物がどちら側の DNA 鎖を鋳型としているのか特定を容易にし、解析を単純化するため、本研究室の樋口により作製された、*oriC* 近傍に大腸菌の複製終結配列の一つである *terB* 配列を持たせた pMOL7 プラスミドを標準の鋳型 DNA として用いてきた(Higuchi *et al.*, 2003)。そこで、この pMOL7 を利用し、化学合成した塩基損傷を含むオリゴヌクレオチドを挿入することで、目的とするプラスミドを作製することとした。本研究では、単一の損傷として、ベンツピレンがグアニンに共有結合した(-)-*trans-anti-benzo[a]pyrene-N²-dG* 損傷 (BP(-)損傷) を用いた(図 3 A)。ベンツピレンは有機物の不完全燃焼の過程で生成される多環芳香族炭化水素の一種であり、発がん性が認められている。また、比較的安定な化合物であり、扱いが容易である上、一般的な酸化損傷である 8-オキソグアニンに対する MutMYT のような、損傷に特異的な修復機構の存在も知られていない。加えて、ベンツピレンには光学異性体である BP(+)と BP(-)が存在し、BP(+)の効率的な TLS には Pol IV と Pol V の双方が必要とされるが、BP(-)は、単鎖 DNA 上であれば、Pol IV

が単独で効率的に乗り越えられることが示されている(Shen *et al.*, 2002)。これらのことから、BP(-)損傷は本研究の目的に適した塩基損傷であると判断し、用いることとした。実際のプラスミド作製は CNRS の Fuchs 教授により行われ、その供与を受けた。

BP(-)損傷を含む *oriC* プラスミドである pMOL7-BP(-)作製の概要は図 3B に記載した。作製にあたっては、Gapped duplex strategy (Koehl *et al.*, 1989, Lambert *et al.*, 1992, Napolitano *et al.*, 1997)が用いられた。まず、pMOL7 の *NsiI-ClaI* 領域を、第二章 表 3 に記載した、*EcoRV* の認識配列を含む Cassette A で置換したプラスミド P1、及び、同一領域を *BsrGI* の認識配列を含む Cassette B で置換したプラスミド P2 が作製された。次に、P1 は *EcoRV*、P2 は *ScaI* により各々制限酵素処理が施され、両者を buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM NaCl、1 mM EDTA)に等モル量ずつ混合して 95°C、4 分間処理することで変性反応が行われた後、急速に 0°Cまで冷却された。その後、この反応液の塩濃度を 150 mM NaCl に調整し、55°C、30 分間処理した後、室温に静置して冷却することでアニーリング反応が行われた。P1 と P2 は、挿入された Cassette A と Cassette B の他は配列に差が無いため、この一連の反応により、P1 と P2 それぞれに由来する直鎖状 DNA が互いに対合したものが、一定の割合で出現する。更に Cassette A は Cassette B に比べ 15 bp 短いものの、配列は Cassette B と完全に相補的である。このため、反応液中には、リーディング鎖側(P2 が内側に来た場合)、あるいはラギング鎖側(P2 が外側に来た場合)に 15 bp 分の gap が生じた二種類の Gapped duplex が、理論上同じ割合で存在する。これに、15 bp の gap と相補的なオリゴ DNA を添加することで、gap に目的の配列を挿入することが出来る。pMOL7-BP(-)作製にあたっては、最初の制限酵素処理で消化されずに残存した P2 を最終的に排除する目的で、表 3 に記載した 13-mer の BP(-)損傷を含む BP(-)-oligo がリーディング鎖側に挿入された。この挿入により、pMOL7-BP(-)では相補塩基の存在しない 2 つの塩基が突出するが、*BsrGI* 認識配列が消失するため制限酵素処理の影響を受けない。BP(-)-oligo を反応液中の鋳型に対し 2-5 倍モル過剰に添加し、この反応液を Ligation 反応液 (100 mM MgCl₂、100 mM DTT、1 mM ATP、T4 DNA ligase (60 U/μg DNA))に総液量の 1/10 量になるよう添加し、16°C、2 分間処理することで Ligation 反応が行われた。反応後、得られた DNA を *EcoRV* および *BsrGI* で処理し、最初の制限酵素処理で未消化のまま残存した P1 および P2 を切断した後、CsCl equilibrium sedimentation により、目的とする pMOL7-BP(-)のみが精製された。pMOL7-BP(-)には、BP(-)損傷が、リーディング鎖上の *oriC* から反時計回りに約 1.7 kb の距離に位置するグアニンに単一の損傷として付加されている。また、同様の手順を用いて、BP(-)と同一配列であるが損傷を含まない control-oligo を挿入したプラスミド pMOL7-control が作製された。

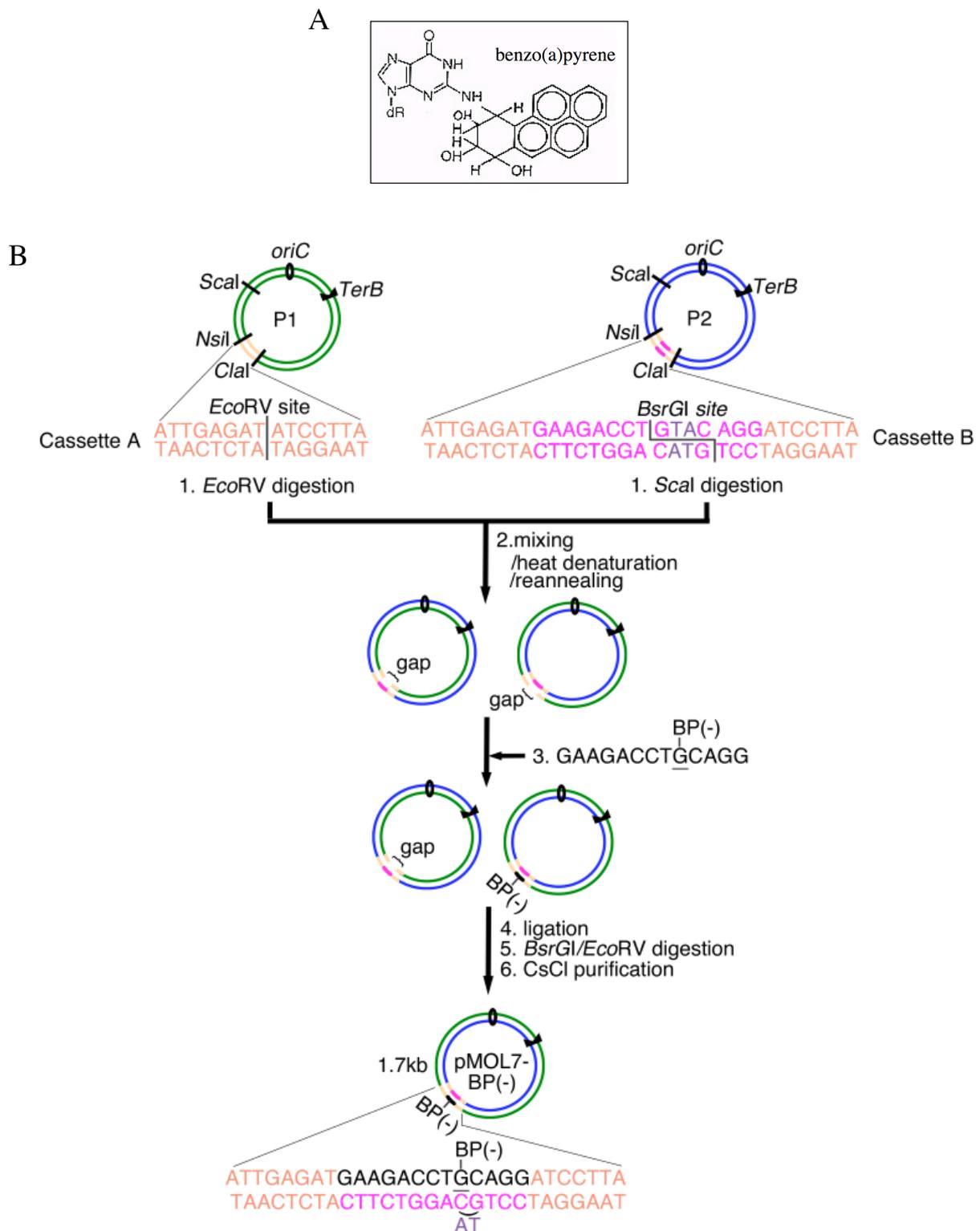


図3 ベンツピレンによる損傷を含むプラスミド pMOL7-BP(-)構築の概要

(A)ベンツピレンの化学式を示す。(B)pMOL7-BP(-)作製の概略を図示する。P1 と P2 は、pMOL7 の *NsiI*-*ClaI* 領域が各々、*EcoRV* 認識配列含む Cassette A、または *BsrGI* 配列を含む Cassette B に置換されたものである。この図では、P1 に由来する DNA 鎖を緑色、P2 に由来する DNA 鎖を青色で示した。また、Cassette A と B で同一となる塩基配列を橙色で、gap となる配列を桃色で示した。プラスミドの具体的な作製方法は 11-1 に記載した。

11-2 Gyrase 反応

上述の方法により精製した pMOL7-BP(-)及び pMOL7-control は、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応に用いる鋳型に適した高次構造である、負の超らせんが十分に導入された super coiled DNA の形状を保持していない。そのため、Gyrase を用いて巻き戻し反応を行う必要がある。反応液(全量 100 μ l) [1.2 μ g DNA、35 mM Tris-HCl pH 7.5、2 mM DTT、100 μ g/ml BSA、4 mM MgCl₂、24 mM KCl、5 mM Spermidine-HCl、1.75 mM ATP、6.4% glycerol、4.8 units Gyrase (NEB 社)] を 37°C、30 分間反応させ、フェノール/クロロホルム抽出、及びエタノール沈殿を行い、プラスミド DNA を回収した。

DNA 濃度は、濃度既知の super coiled DNA の形状を示す pMOL7 と同時にアガロースゲル電気泳動を行い、そのバンド強度を LAS2500 を用いて比較することで定量し、決定した。

11-3 *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応

oriC プラスミド *in vitro* DNA 複製反応は、大腸菌の複製起点である *oriC* を持つプラスミドを鋳型とし、10 種類の精製された複製関連タンパク質を用いて染色体 DNA 複製反応を再構成したものである。各構成要素を *in vitro* で混合することで、*oriC* 領域を起点として、細胞内と同様に両方向に同時に DNA 複製反応を進行させることができる。また、特定方向の複製フォークの動きに焦点を当てて解析を行うため、本研究で用いた *oriC* プラスミド (全長 4.4 kb) には、*oriC* から時計回りに 0.9 kb の位置に大腸菌の DNA 複製終結を示す *terB* 配列が組み込まれている。そのため、反応液中に *terB* 結合タンパク質である Tus を添加することで、時計回りの複製フォークの進行をブロックし、特定方向の複製フォークを可視化することが可能となる。また、Ligase を添加しないため、ラギング鎖複製産物である Okazaki fragment は、数百 bp 程度の短い断片として検出される(図 4)。

DNA 鎖伸長反応は、全量 15 μ l とし、あらかじめ 4°C で混合された反応液 [30 ng template DNA、40 mM HEPES-KOH pH 7.6、10 mM DTT、0.1 mg/ml BSA、10 mM Magnesium acetate、1 mM rGTP、1 mM rCTP、1 mM rUTP、2 mM rATP、4 mM creatine phosphate、0.6 μ g creatine kinase、50 μ M NAD、100 μ M dNTPs、174 ng SSB、30 ng β subunit、5 ng HU、108 ng Gyrase A subunit、216 ng Gyrase B subunit、90 ng DnaB helicase、55.2 ng DnaC、194 ng DnaG primase、67 ng Tus、14.4 units Pol III*、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP あるいは $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dTTP に 90 ng の DnaA を添加することで開始される。この DnaA 添加時を 0 分として、30°C で任意の時間反応を行い、等量の stop buffer [50 mM EDTA、0.15% SDS] を添加することで反応を停止させた。複製効率は、各時点における複製産物の一部を TCA 沈殿に供することで算出した。残りの複製産物は、第二章 12-2~12-5 に記載された解析に供するため、以下のように除タンパク処理を行った。複製産物に、0.15% SDS 条件下で 35 μ g/ml proteinaseK を添加し、55°C で 30 分間反応させた。その後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿により回収して適量の 1/10×TE 緩衝液に懸濁した。

12. DNA 複製産物の定量及び観察法

12-1 TCA 沈殿

複製効率の算出のため、複製産物の一部を、反応液(全量 1 ml)[5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、2.5 mM EDTA、5 $\mu\text{g/ml}$ BSA、9% TCA] に懸濁し、15 分間、氷上で静置した。反応液をガラスフィルターで濾過し、酸沈殿物の放射活性を液体シンチレーションカウンター (BECKMAN 社) で測定した。濃度既知の放射活性を持つ標識ヌクレオチドをガラスフィルターにスポットしたものを標準とし、dNTP 取り込み量を算出した。

12-2 アルカリアガロースゲル電気泳動

複製産物のリーディング鎖やラギング鎖の新生鎖を区別し、そのサイズや産物量を観察するため、複製産物のアルカリアガロースゲル電気泳動による展開を行った。アルカリアガロースゲル電気泳動は、アルカリ変性下で電気泳動を行うことにより、複製産物を鋳型プラスミドから解離させた一本鎖 DNA として泳動することができる。

除タンパク処理を行った複製産物の一部を buffer [30 mM NaOH、30 mM EDTA、10% Sucrose、0.1% Bromocresol green] に懸濁し、アルカリアガロースゲル [0.9% agarose、50 mM NaOH、1 mM EDTA] と泳動 buffer [30 mM NaOH、1 mM EDTA] を用いて 2V/cm、4 時間、泳動を行った。泳動後、ゲルを 7% TCA で中和し、RAPIDRY(アトー社) を用いて圧縮、乾燥させ、イメージングプレートに露光後、BAS2500 を用いて検出した。

分子量マーカーには、5'末端を ^{32}P 標識した $\lambda\text{EcoT14I}$ digest (TAKARA 社) を用いた。標識には T4 Polynucleotide Kinase (TOYOBO 社) を用い、反応液(全量 10 μl) [1.25 μg $\lambda\text{EcoT14I}$ digest、1 \times protruding end kinase buffer、10 units T4 Polynucleotide kinase、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP] を 37°C、30 分間反応させた後、40 μl の 1/10 \times TE 緩衝液を添加した。反応に利用されなかった標識ヌクレオチドと無機リン酸を取り除くため、illustra MicroSpin G-25 Columns (GEヘルスケアバイオサイエンス社) を用いて遠心分離(3000 rpm, 25°C, 2 分間)により精製したものをを用いた。

12-3 シークエンスゲル電気泳動

塩基損傷により複製阻害を受けた複製産物などについて、鋳型上の特定の範囲に焦点を当て、塩基配列レベルでより詳細に解析するため、シークエンスゲル電気泳動による展開を行った。

除タンパク処理を行った複製産物を制限酵素 *MscI* 及び *AseI* で切断し、フェノール/クロロホルム抽出、及びエタノール沈殿を行い、回収した沈殿をサンプル buffer (98% formamide、10 mM EDTA、0.05% bromophenol blue、0.05% xylene cyanol) に懸濁した。90°C、2 分間加温した後、氷上で急冷し、8%ポリアクリルアミドシークエンスゲル(8 M urea)、1 \times TBE buffer (89 mM Tris、89 mM Boric acid、2 mM EDTA) で 35W、90 分間、電気泳動を行った。泳動後、ゲルを乾燥させ、イメージングプレートに露光後、BAS2500 を用いて検出した。

塩基配列マーカーは、複製産物の制限酵素処理断片と 5'末端が一致するようプライマーを設計し(ddM-Msc I, 表 3 に記載)、その 5'末端を ^{32}P 標識して Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 2001) に記載された dideoxy 法に基づき作製した。プライマーは以下の反応組成(全量 20 μl) [75 pmol primer、1 \times protruding end kinase buffer、20 units T4 Polynucleotide kinase、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP] で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間反応させて標識し、第二章 12-2 に記載した分子量マーカーと同様に精製した。鋳型には *ScaI* で切断したプラスミド P2 を用い、AmpliTaq DNA Polymerase, Stoffel Fragment (Applied Biosystems 社)により合成した 4 種類の PCR 反応産物を、解析対象となる複製産物と共に各々泳動した。

12-4 二次元ゲル電気泳動

複製フォークが示す Y 型構造の形状をより直接的に観察するため、二次元ゲル電気泳動による複製中間体の二次構造解析を行った。

除タンパク処理を行った複製産物を制限酵素 *BglIII* で切断し、フェノール/クロロホルム抽出、及びエタノール沈殿を行った。回収した沈殿を 0.4%アガロース ME(岩井化学薬品社)、1 \times TBE buffer で 2 V/cm、14 時間、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件下で一次元目の電気泳動に供し、サイズ依存的に分離した。次に、一次元目のゲルが垂直方向となるようゲルメーカーにセットし、1%アガロース ME、0.3 $\mu\text{g/ml}$ EtBr のゲルを作製して、泳動 buffer [1 \times TBE、0.3 $\mu\text{g/ml}$ EtBr]で、4.2 V/cm、6 時間、4 $^{\circ}\text{C}$ の条件下で二次元目の電気泳動を行うことにより、複製産物の構造依存的に分離した。泳動後、ゲルを 7% TCA で固定し、乾燥させ、イメージングプレートに露光後、BAS2500 を用いて検出した。

12-5 サザンハイブリダイゼーション

表 4 に記載したオリゴ DNA プローブを用いて、鋳型上の特定の位置の複製産物の有無やサイズを解析した。プローブは、5'-末端を ^{32}P 標識したものを用いた。標識は以下の反応組成(全量 20 μl) [2 pmol primer、1 \times protruding end kinase buffer、20 units T4 Polynucleotide kinase、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP] で、37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間反応させて行い、第二章 12-2 に記載した分子量マーカーと同様に精製した。

DNA 複製産物の転写は、放射性標識していない複製産物をアルカリアガロースゲル電気泳動により展開した後、HybondN⁺ナイロンメンブレンに 10 \times SSC buffer (167 mM NaCl、167 mM $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)を用いてキャピラリー法で行った。転写後のメンブレンは 120 mJ UV でクロスリンクを行い、hybri buffer (5 \times denhalts' reagent、5 \times SSC、0.5% SDS、100 $\mu\text{g/ml}$ calf thymus DNA)中で 55 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。更に、プローブを加えて 55 $^{\circ}\text{C}$ 、12 時間ハイブリダイゼーションを行い、wash buffer (0.1 \times SSC、0.1% SDS)で 4 回洗浄後、イメージングプレートに露光させ、BAS2500 を用いて検出した。

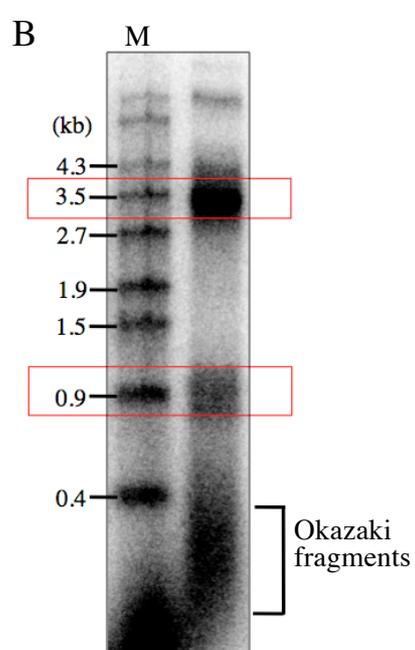
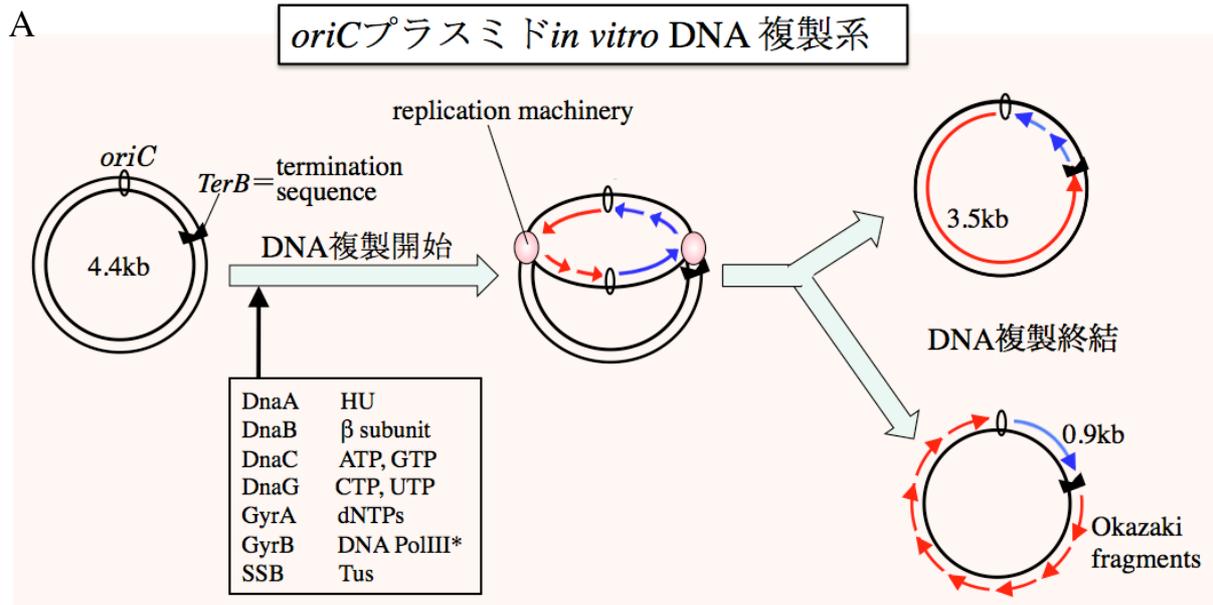


図 4 *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応の模式図と結果例

(A) *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応の模式図を示す。*oriC* プラスミドと複製関連因子を混合することで、複製起点から両方向に同時に複製が進行する。時計回りの複製フォークは、*terB*-Tus 複合体によりブロックされる。pMOL7 の複製様式については、黒細線は鋳型 DNA、赤色の長矢印は反時計回りのリーディング鎖新生鎖、短い連続的な赤矢印はラギング鎖新生鎖、青色の長矢印は時計回りのリーディング鎖新生鎖、短い連続的な青矢印はラギング鎖新生鎖を示す。(B) 損傷を含まない pMOL7 を鋳型とし、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応の複製産物をアルカリアガロースゲル電気泳動により解析した結果を示す。3.5 kb の反時計回りのリーディング鎖、0.9 kb のブロックされた時計回りの複製フォークのリーディング鎖、Okazaki fragments の複製産物が、分離して検出されている。Ligase を添加していないため、Okazaki fragments は各々が数百 bp の短い断片として検出される。M はサイズマーカーを示す。

三章 結果

第一節 Pol IV による DNA 複製阻害効果についての検証

Pol IV が Pol III による DNA 複製を阻害する機能を有していることは、これまで行われてきた *in vitro* 及び *in vivo* での研究により、既に示されている(Furukohri *et al.*, 2008, Uchida *et al.*, 2008)。しかし、Pol IV が複製フォークに直接的に作用し、複製に影響を与えているのかは未だ不明である。一方で、Pol IV が複製フォークにおける DNA 複製を直接阻害するのであれば、TLS を介した DNA 複製再開を調べるにあたり、その影響を出来る限り排除する必要がある。そこで、損傷の無い *oriC* プラスミドを鋳型とし、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応に様々な濃度の Pol IV を添加することで、その影響を観察した。

1. Pol IV による DNA 複製阻害効果の観察

Pol IV が、直接的に複製フォークにおける DNA 複製を阻害する能力を有しているのかを確認するため、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応を用いて解析を行った。鋳型には、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応の標準的な鋳型である損傷を含まない *oriC* プラスミド、pMOL7 を用いた。DNA 複製反応は複製開始因子である DnaA を添加することで開始される。この DnaA 添加時を 0 分とし、30°C で反応を行った。ただし、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応では、複製開始反応が同調しておらず、鋳型ごとに異なったタイミングで複製が開始される。鋳型となる pMOL7 プラスミドには、*oriC* から時計回りに 0.9 kb の位置に複製終結を示す *terB* 配列が組み込まれているため、正常に複製が完了した場合、反時計回りのリーディング鎖を鋳型とした 3.5 kb の複製産物、時計回りのリーディング鎖を鋳型とした 0.9 kb の複製産物とが分離して検出されるはずである。また、ラギング鎖を鋳型とした複製産物である Okazaki fragment は、反応系に Ligase は添加していないため 0.4 kb 以下の短い DNA 断片として検出されると考えられる(図 5A)。複製産物は、0.9% アルカリアガロースゲル電気泳動を用いて展開を行い、確認した。アルカリアガロースゲル電気泳動は、アルカリ変性下で電気泳動を行うことで、複製産物を鋳型プラスミドから解離させた一本鎖 DNA として泳動することが出来るため、反応物の長さを知ることができる。

添加する Pol IV の濃度は 30 nM、150 nM、450 nM の三段階とし、DnaA 添加による複製反応開始の 5 分後に反応液に添加した。これは、DnaA 添加の直前や直後に Pol IV を添加すると、大部分の鋳型において、複製開始反応そのものに対し Pol IV による強い阻害がかかってしまう可能性を考慮したためである。また、添加する Pol IV の濃度については、以前、Burst DNA 複製反応を用いて Pol IV による Pol III の DNA 合成阻害を検証した実験の結果を参考とした。過去の実験では、モル濃度にして Pol IV が Pol III の 80 倍程度存在する実験条件下において、Pol IV による阻害効果が観察されてい

る(Furukohri *et al.*, 2008)。そこで、本実験においても、Pol III に対し過去の実験と同程度の濃度比となる 150 nM を中心に、添加する Pol IV の濃度を決定した。反応は、30°C で、Pol IV 添加後 5 分間(DnaA 添加時から 10 分間)、あるいは 15 分間(DnaA 添加時から 20 分間)行い、複製産物をアルカリアガロースゲル電気泳動により展開した。

解析の結果、反応時間 10 分(図 5B, Lanes 3-6)、20 分(図 5B, Lanes 7-10)共に、反時計回りの複製フォークのリーディング鎖を鋳型とする 3.5 kb の複製産物について、Pol IV を 30 nM 添加した段階で(図 5B, Lane 4, 8)、Pol IV を添加しない場合(図 5B, Lane 3, 7)と比較して産物量が低下していた。このことは、Pol IV が DNA 複製に対し阻害効果を顕著に及ぼすことを示している。更に、いずれの反応時間についても、3.5 kb の複製産物は、Pol IV 濃度の増加に従って減少していくことが観察できた。

一方で、時計回りの複製フォークのリーディング鎖を鋳型とする 0.9 kb の複製産物や、ラギング鎖の複製産物である Okazaki fragemnt の減少は 3.5 kb のものほど顕著ではなく、Pol IV による阻害効果の影響は少ないように見受けられる。今回、3.5 kb の複製産物量の減少を筆頭に、Pol IV の添加量に応じて複製産物の減少が観察されたことから、Pol IV が DNA 複製に対し阻害効果を顕著に及ぼす能力を有していることが示された。中でも、3.5 kb の複製産物の減少は顕著であることから、時計回りの複製フォークに比べ、本研究で後の解析に用いる鋳型 pMOL7-BP(-)上で BP(-)損傷が存在する反時計回りの複製フォークは、Pol IV による影響をより受け易いと考えられる。

2. *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応に添加する Pol IV 濃度の検討

Pol IV を 30 nM 添加した場合でも、DNA 複製の阻害効果が顕著に観察されたため、再度、より低濃度で Pol IV の影響を観察することとした。10 nM、20 nM、30 nM の三段階の濃度で検証を行ったところ、反応時間 10 分の段階で、Pol IV を添加しない場合に比較して(図 6A, Lane 4)、Pol IV を添加した全ての濃度で(図 6A, Lanes 5-7)その影響が顕著に観察された。そこで、更に 1 nM、5 nM、10 nM の三段階での濃度で検証を行ったところ(図 6B)、全てのサンプルで、複製産物のプロファイルのピーク強度に大きな差は認められなかった。

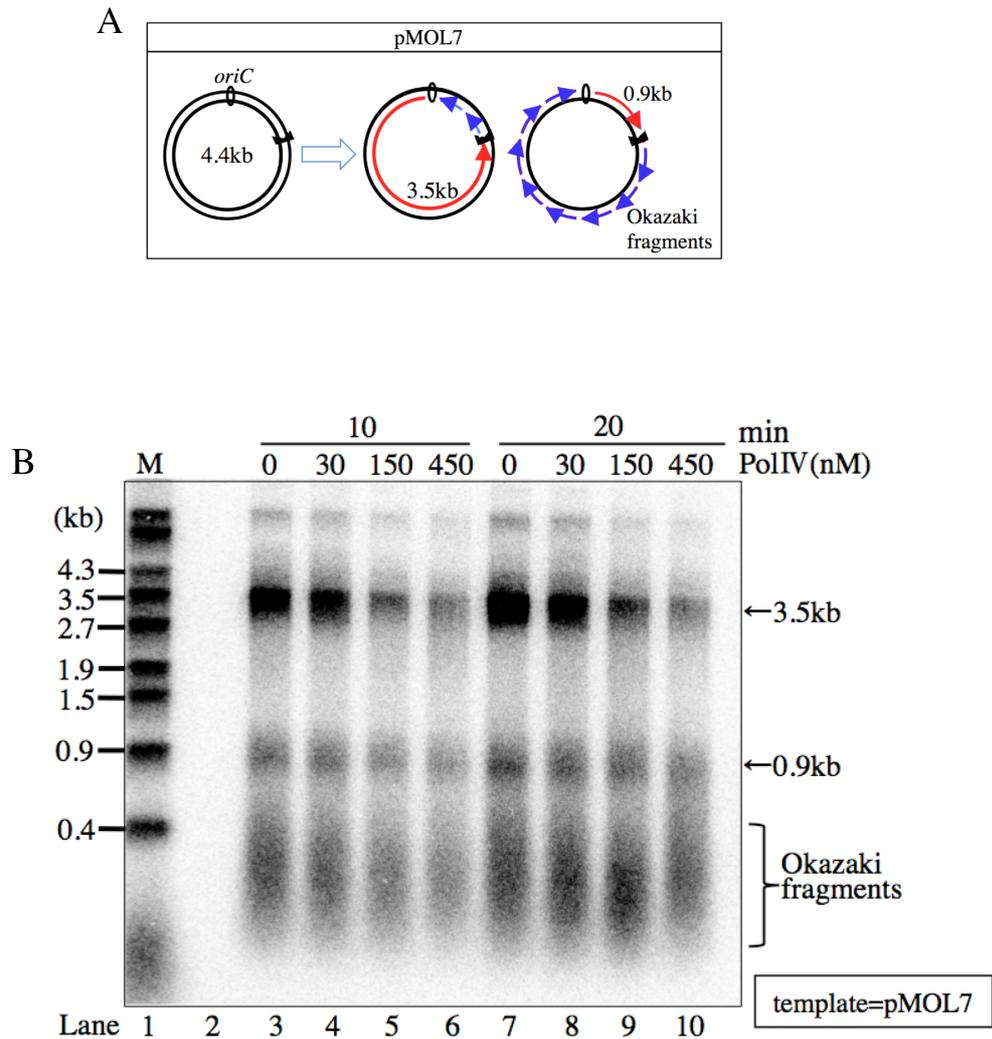


図5 Pol IV による DNA 複製阻害効果の観察

様々な濃度で添加した Pol IV の複製阻害効果を、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応を用いて解析した結果を示す。(A)pMOL7 の複製様式を示す。黒細線は鋳型 DNA を、赤色の長矢印は反時計回りのリーディング鎖新生鎖を、短い連続的な赤矢印はラギング鎖新生鎖を、青色の長矢印は時計回りのリーディング鎖新生鎖を、短い連続的な青矢印はラギング鎖新生鎖を示す。(B)複製産物を 0.9% アルカリアガロースゲル電気泳動で解析した結果を示す。M はサイズマーカーを示し、Lanes 3-6 は 10 分間、Lanes 7-10 は 20 分間反応を行い、各反応時間ともに、反応開始後 5 分の時点で、Lane 左から buffer, 30, 150, 450 nM の Pol IV を添加した。

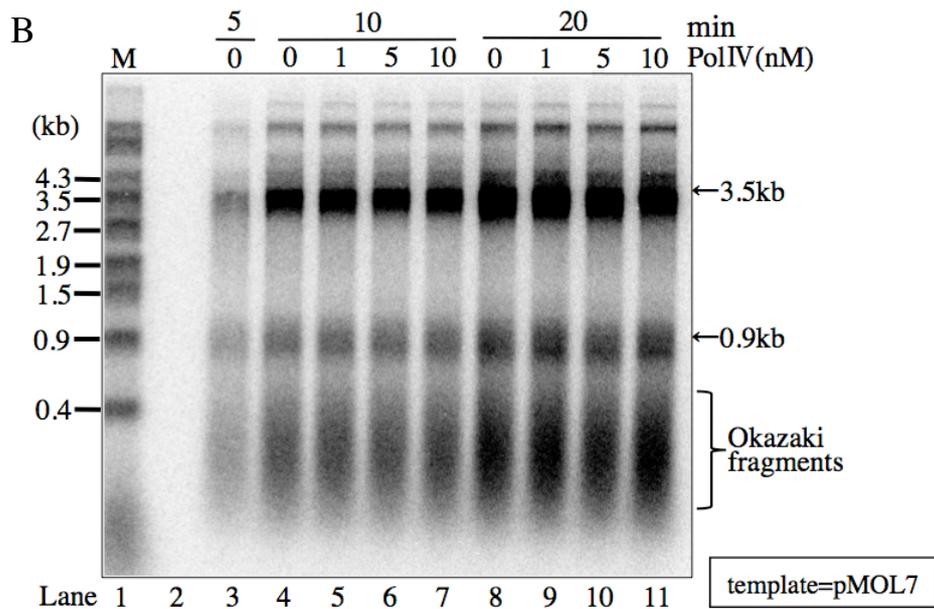
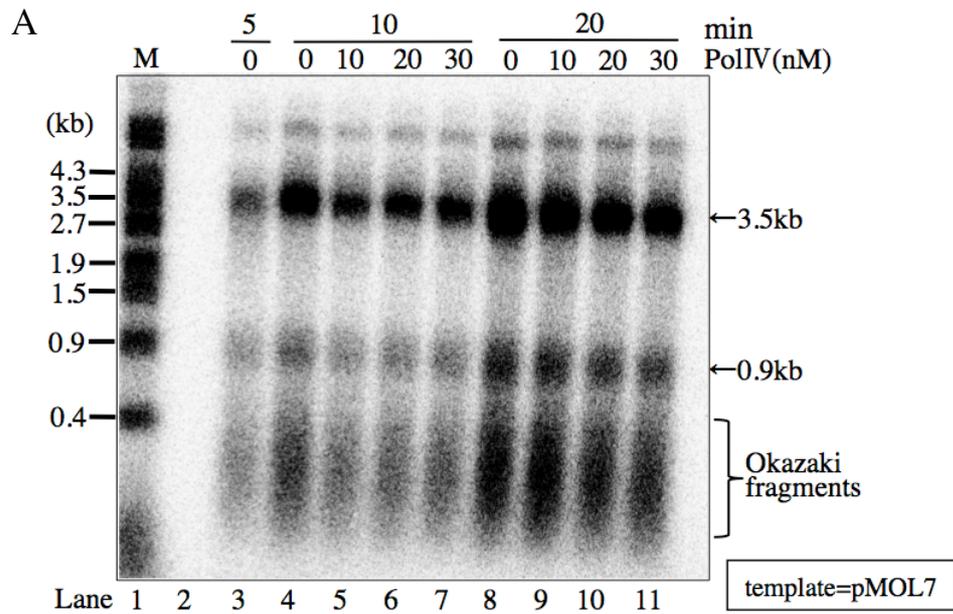


図 6 反応に添加する Pol IV 濃度の検討

解析に用いる反応条件下において、Pol IV がどの程度の濃度まで DNA 複製に影響を及ぼすか、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応を用いて検討した結果を示す。(A) 複製産物を 0.9% アルカリアガロースゲル電気泳動で解析した結果を示す。M はサイズマーカーを示す。Lane 3 は Pol IV 添加前にあたる反応開始後 5 分の時点で反応を停止した。Lanes 4-7 は 10 分間、Lanes 8-11 は 20 分間反応を行い、各反応時間ともに、反応開始後 5 分の時点で、Lane 左から buffer, 10, 20, 30 nM の Pol IV を添加した。(B) Lane 3 は Pol IV 添加前にあたる反応開始後 5 分の時点で反応を停止した。Lanes 4-7 は 10 分間、Lanes 8-11 は 20 分間反応を行い、Pol IV は各反応時間ともに、反応開始後 5 分の時点で、Lane 左から buffer, 1, 5, 10 nM の Pol IV を添加した。

第二節 停止した複製フォークにおける TLS を介した複製再開の可否の検証

1. 解析の概要と検出が予測される DNA 複製反応産物

DNA 複製停止後に、TLS を介した複製フォークにおける正常な複製再開が可能であるかを調べるため、放射性標識された ^{32}P ヌクレオチドの取り込みを指標に、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応を用いた検証を行った。解析には、単一の損傷としてベンツピレンによる(-)-*trans-anti-benzo[a]pyrene-N²-dG* 損傷 (BP(-)損傷)をリーディング鎖上に組み込んだ *oriC* プラスミド、pMOL7-BP(-)を鋳型として用いた(図 3)。ベンツピレンは、DNA 上のグアニンに共有結合して付加体を形成することで Pol III による DNA 合成を阻害し、複製フォークを停止させる DNA 損傷であり、8-オキシグアニンで知られているような損傷に特異的な修復機構の存在は確認されていない。また、ベンツピレンには光学異性体である BP(+)と BP(-)が存在するが、このうち本研究で用いた BP(-)については、単鎖 DNA 上に存在する場合であれば、Pol IV が単独で乗り越えられることが既に明らかとなっている(Shen *et al.*, 2002)。解析では、DnaA 添加により DNA 複製を開始させてから 5 分後に Pol IV を添加し、15 分(計 20 分)間、30°C で反応を行うことで、Pol IV が行う TLS の寄与により、実際に複製フォークで複製再開が行われるのかを検証した。加える Pol IV の濃度は、第三章 第一節における Pol IV 濃度の検討の結果、複製反応に対し阻害の影響が薄いと考えられた 10 nM とした。また、複製再開が観察された場合、それが確かに Pol IV の行う TLS の寄与によるものであることを示すため、DNA ポリメラーゼ活性を欠損させた変異型の DNA ポリメラーゼ IV (Pol IV(D8A))を用いて同様の解析を行った。Pol IV(D8A)は、ポリメラーゼ・ドメインの触媒活性に重要なアミノ酸であるアスパラギン酸をアラニンに置換する塩基置換により、DNA ポリメラーゼ活性を欠損させた変異型の Pol IV である。TLS は、Pol III が複製できない損傷塩基鋳型に対し、損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼが適当に塩基を取り込んで無理矢理対合させ、損傷を通過して複製を再開させる。そのため、DNA ポリメラーゼ活性を欠損させた Pol IV(D8A)は、TLS を行うことはできない。しかし、複製阻害については野生型の Pol IV と同様の阻害効果を示すことが分かっている(Furukori *et al.*, 2008)。従って、この Pol IV(D8A)をコントロールとして用いることで、もし、どちらを添加しても複製再開が観察できた場合には、阻害効果を含む何らかの Pol IV の機能的作用により、Pol III が損傷を乗り越えたことが示唆される。一方で、Pol IV を添加した場合にのみ複製再開が観察できた場合には、複製再開が確かに Pol IV による TLS の結果生じたものであると示すことができる。

鋳型となる pMOL7-BP(-)には、単一の BP(-)損傷が、反時計回りの複製フォーク(全長 3.5 kb)のリーディング鎖上に、*oriC* から 1.7 kb 離れた位置に組み込まれている。これを用いて Pol IV と共に DNA 複製反応を行わせることで生じる反応として、図 7 にも示したように、以下の 4 種類が予測される。

(i) Pausing : Pol IV 添加の有無に関わらず、反時計回りのリーディング鎖伸長反応は

BP(-)損傷により停止する。また、ラギング鎖伸長反応も共役して停止するため、複製フォークの進行そのものが停止する。Pol IV 添加前の 5 分間は、殆どの鋳型における DNA 複製が、同様の反応を示していると予想される。

(ii) Uncoupling : Pol IV 添加の有無に関わらず、反時計回りのリーディング鎖伸長反応は BP(-)損傷により停止する。しかし、複製フォークは進行し続け、ラギング鎖伸長反応のみが継続する。Pol IV 添加前の 5 分間においても、このような反応が起こっている可能性はある。

(iii) TLS (正常な複製再開) : Pol IV の添加により、BP(-)損傷により停止していた反時計回りの複製フォークにおけるリーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応が共に再開し、複製を完了する。この反応が観察できれば、Pol IV が行う TLS により、一度停止した DNA 複製がそのままの形で複製を再開したと示すことになると考えられる。

(iv) TLS (片鎖のみの複製再開) : Pol IV の添加により、BP(-)損傷により停止していた反時計回りのリーディング鎖伸長反応が再開する。それにより、複製フォークの進行も再開するが、ラギング鎖伸長反応は再開されず、両鎖が協調した正常な DNA 複製再開には至らない。

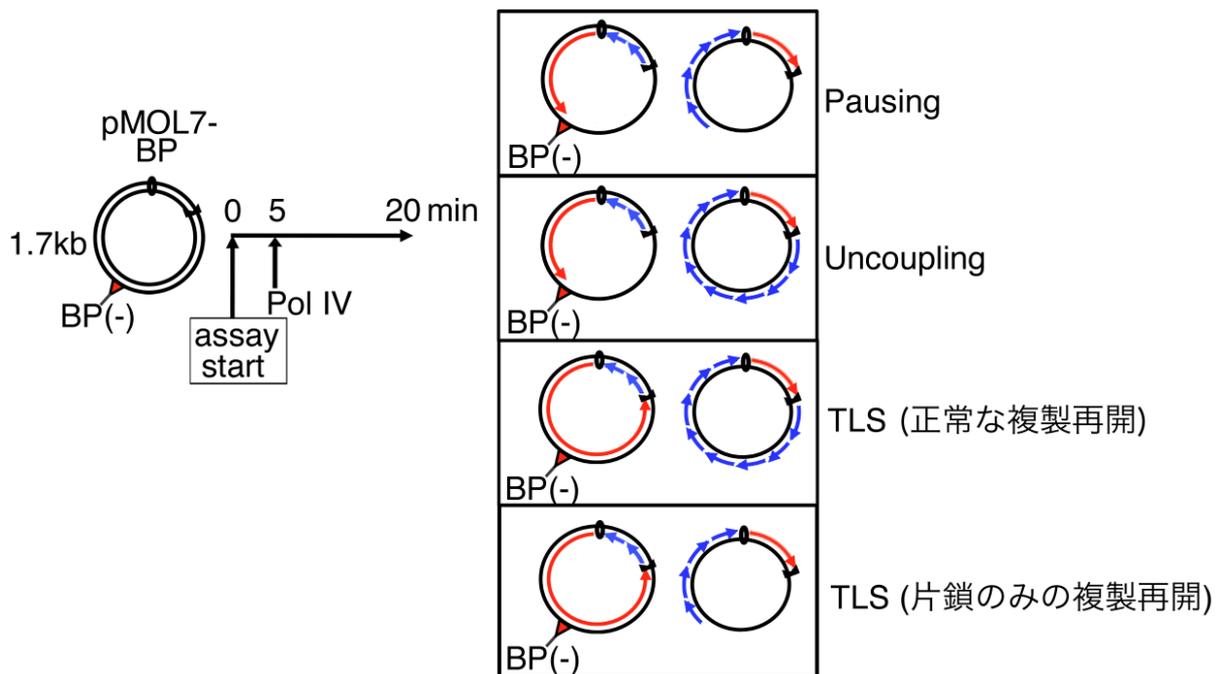


図 7 pMOL7-BP(-)を用いた解析において予想される複製反応

BP(-)損傷を含む *oriC* プラスミドである pMOL7-BP(-)を鋳型とし、Pol IV と共に *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応を行った際に観察されると予想される、複製様式の模式図を示す。Pausing 及び Uncoupling については、Pol IV 添加の有無に関わらず起こりうる反応であると考えられる。黒細線は鋳型 DNA、赤色の長矢印はリーディング鎖新生鎖、短い連続的な青矢印はラギング鎖新生鎖を示す。BP(-)損傷は赤色の三角で示されており、反時計回りの複製フォークのリーディング鎖上に存在する。

2. TLS を介した DNA 複製再開の可否の検討

pMOL7-BP(-)及び損傷を含まない pMOL7-control を鋳型として、Pol IV と共に *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応を行わせ、反応により得られた複製産物の一部をアルカリアガロースゲル電気泳動により展開した(図 8)。pMOL7-BP(-)の構造からは、BP(-)損傷により複製が停止していれば、反時計回りの複製フォークのリーディング鎖を鋳型とする 3.5 kb の複製産物が消失し、新たに損傷によって停止したことを示す 1.7 kb の複製産物が出現すると考えられる。そして、Pol IV を添加することで TLS により少なくともリーディング鎖伸長反応が再開すれば、1.7 kb の複製産物量は減少し、リーディング鎖の複製完了を示す 3.5 kb の複製産物が出現すると考えられる。解析の結果、損傷なしの pMOL7-control を用いた反応では、0.9 kb の時計回りの複製フォークのリーディング鎖、3.5 kb の反時計回りのリーディング鎖、及び Okazaki fragment の複製産物が正常に検出された(図 8B, Lane 3)。また、Pol IV および Pol IV(D8A)の添加による DNA 複製阻害は殆ど観察されなかった(図 8B, Lane 3, 5, 7)。一方、損傷を含む pMOL7-BP(-)を用いた反応では、Pol IV を添加しない場合、反時計回りのリーディング鎖の複製が完了したことを示す 3.5 kb の複製産物はほぼ検出されず、1.7 kb 付近に pMOL7-control を用いた場合には検出されなかった複製産物が、明瞭に検出された(図 8B, Lane 2)。BP(-)損傷は、反時計回りのリーディング鎖上に *oriC* から約 1.7 kb の位置に存在することから(図 8A)、この結果は複製反応が開始された全ての鋳型において、BP(-)損傷により少なくともリーディング鎖の複製が停止したことを示している。また、この時点でわずかに検出される 3.5kb の複製産物については、Pol III が損傷を乗り越えたわけではなく、pMOL7-BP(-)鋳型作製時に使用した元となる無傷のプラスミドが pMOL7-BP(-)鋳型溶液中に僅かながら混入しており、これを鋳型として複製が行われた産物が検出されたものであろうと考えられる。これに対し、10 nM の Pol IV を添加することで、Lane 2 ではほぼ検出されない、反時計回りの複製フォークのリーディング鎖の完全長にあたる 3.5 kb の複製産物が明確に出現した(図 8B, Lane 4)。一方で、複製停止を示す 1.7 kb の複製産物は、Pol IV を添加せずに同一の時間反応させた場合と比較して顕著に少なかった(図 8B, lane 2, 4)。加えて、Pol IV 添加前に 5 分で反応を停止させたサンプルと比較しても、その量は減少していた(図 8B, lane 4, 8)。一方、ポリメラーゼ活性を欠損させた変異体である Pol IV(D8A)を添加した反応で観察された複製産物は、Lane 2 と同一であった(図 8B, lane 6)。これらの結果は、BP(-)損傷により停止した反時計回りのリーディング鎖が、Pol IV を添加することで、伸長反応を再開・完了できることを示していると考えられる。更に、Pol IV(D8A)を添加してもリーディング鎖の複製再開を示唆する結果は得られないことから、リーディング鎖伸長反応の再開には Pol IV による TLS が必須であることが示される。

次に、更なる解析として、ベンツピレン損傷領域近傍に特化して複製産物をより詳細に観察するため、複製産物の一部を用いてシーケンスゲル電気泳動による展開を行い、塩基配列レベルで詳細に解析した(図 9)。得られた複製産物を、損傷の直前及び

直後を切断する制限酵素 *MscI*、*AseI* で消化した(図 9A)。これにより、損傷近傍を含む領域は、リーディング鎖とラギング鎖の両鎖の DNA 合成が停止することなく進行した場合、リーディング鎖の合成産物は 86 mer、ラギング鎖の合成産物は 90 mer の DNA 断片として検出される(図 9 A)。また、リーディング鎖において、複製が BP(-)損傷により停止した場合には、40 mer の DNA 断片として検出される(図 9A)。解析の結果、損傷の無い pMOL7-control を鋳型として 20 分間反応を行った複製産物では、90 mer のラギング鎖複製産物と 86 mer のリーディング鎖複製産物を示す DNA 断片が、全ての反応において同程度の強度で検出された(図 9 B, Lane 6, 8, 10)。また、リーディング鎖複製産物に比べてラギング鎖複製産物が幾分少なく検出されているが、これは Okazaki fragment の一部に、90 mer の切断断片内で新たにプライマーからの複製を開始したものや、逆に断片内の途中で Okazaki fragment 合成を終了したため制限酵素処理によりサイズが 90-mer より短くなってしまい、検出に至らないものが存在するためであると考えられる。

これに対し、損傷を持つ pMOL7-BP(-)を用いて損傷領域近傍の複製阻害点の解析を行ったところ、Pol IV を添加しない反応、及び Pol IV(D8A)を添加した反応では 86 mer の DNA 断片は全く検出されず(図 9 B, Lane 5, 9)、Pol IV を添加した反応でのみ明瞭に観察された(図 9 B, Lane 7)。また、全ての反応で、BP(-)損傷により停止した 40 mer の複製産物を示すと考えられる、コントロールでは検出されない DNA 断片の存在を確認した(図 9B, Lane 5, 7, 9, 11)。このことから、BP(-)損傷により少なくともリーディング鎖の複製は強く阻害され、全ての鋳型において損傷の一塩基手前で停止することが示された。これらの複製産物をバンド強度から定量した結果(図 9C)、Pol IV を添加した場合、1.7 kb の停止産物の量は Pol IV を添加しなかった場合の約 50%に減少していた。これらの結果は、アルカリアガロースゲル電気泳動による解析と同様に、Pol IV が行う TLS により、少なくとも一度停止したリーディング鎖伸長反応が再開可能であることを示していると考えられる。

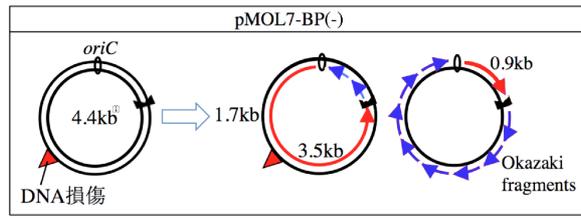
一方で、定量の結果、pMOL7-BP(-)を用いた反応では、pMOL7-control を用いた場合と比較して、ラギング鎖複製産物の量も大幅に低下していた。このことは、損傷によるリーディング鎖伸長反応の停止が、協調して複製反応を行うラギング鎖伸長反応にも影響を及ぼし、図 7 に Pausing として示したように、複製フォークの進行そのものが停止している可能性を示唆している。しかし、この結果からだけでは、図 7 で Uncoupling として示したように、リーディング鎖における複製が BP(-)損傷により停止した後も、複製フォークの進行やラギング鎖伸長反応は継続している可能性の否定にまでは至らない。そのため、Pol IV が停止した複製フォークに入り込んで TLS を行うことで、本当に両鎖が協調した正常な複製の再開が行われるのかは不明であった。

また、pMOL7-BP(-)を用いた反応におけるラギング鎖複製産物の量については、Pol IV 添加の有無による差が殆ど観察されなかった。この結果は、仮に複製フォークの停止によりラギング鎖伸長反応もリーディング鎖伸長反応と同時に停止しているとした場合、TLS によるリーディング鎖伸長反応再開後も、ラギング鎖の DNA 合成は再開

していない可能性を浮上させる(図7: TLS(片鎖のみの複製再開))。実際には、ラギング鎖伸長反応が再開したとしても、それはプライマーの位置により、鋳型ごとに90 merの切断断片内の様々な位置から開始されると考えられるため、シーケンスゲル電気泳動による解析では、pMOL7-control を用いた結果でリーディング鎖複製産物よりラギング鎖複製産物の量が少ないのと同様に、検出されない可能性が高い。しかし、この解析からだけでは、ラギング鎖伸長反応が再開している証拠も得られなかったことから、TLSが正常な複製再開に寄与していることを証明するためには、更なる解析が必要となった。

更に、再開したと考えられるリーディング鎖のDNA複製についても、Pol IVがTLS後も引き続きDNA合成を行っているのか、あるいは再度Pol IIIとスイッチングすることでPol IIIがDNA合成を行っているのかは、不明である。Pol IVのprocessivityはPol IIIに比べると格段に低い(Wagner *et al.*, 2000)、鋳型に対してPol IVは多量に存在しているため、次々とPol IVが入れ替わることで、複製が継続されている可能性もある。一方で、Pol IVによるDNA合成は停止しがちであるにも関わらず(Shen *et al.*, 2002)、pMOL7-BP(-)を鋳型としPol IVを添加した反応において、損傷部近傍には、41 merや42 merといったような損傷から数塩基のみ進行した複製産物の存在は、確認されなかった(図9B, Lane 7)。このことは、Pol IVによるTLSが起こった後、Pol IVとPol IIIの再度のスイッチングとその後のDNA合成、あるいはTLSに引き続くPol IVによるDNA合成が円滑に行われていることを示唆する。もし、Pol IVによるTLSの後、Pol IIIとのスイッチングもしくはDNA鎖の伸長に時間がかかるのであれば、その間待機するTLS直後の複製産物が、40 merから数塩基以内に蓄積し、観察されるはずである。

A



B

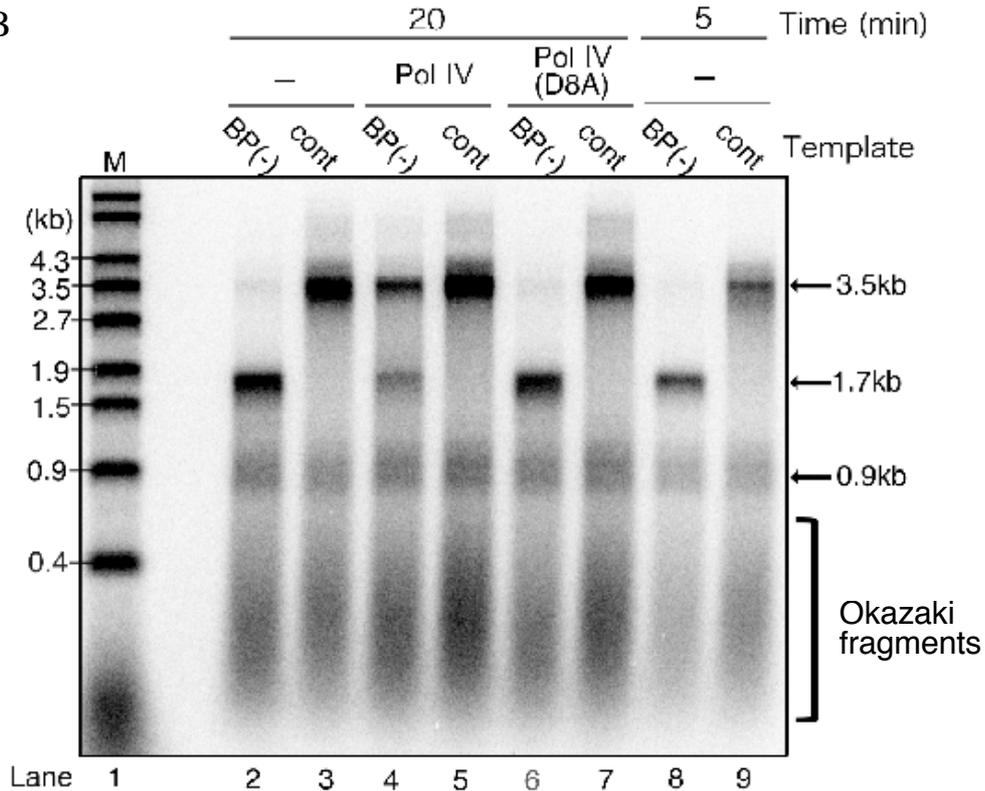


図 8 BP(-)損傷により停止したリーディング鎖伸長反応の TLS を介した再開の検証

pMOL7-BP(-)を用いた DNA 複製反応において、Pol IV による TLS を介して、少なくとも停止したリーディング鎖伸長反応が再開するか解析した結果を示す。(A)BP(-)損傷を含む鋳型である pMOL7-BP(-)の複製様式を示す。黒細線は鋳型 DNA、赤色の長矢印はリーディング鎖新生鎖、短い連続的な青矢印はラギング鎖新生鎖を示す。BP(-)損傷は赤色の三角で示されており、反時計回りの複製フォークのリーディング鎖上の *oriC* から 1.7 kb の位置に存在する。(B)複製産物を 0.9%アルカリアガロースゲル電気泳動で解析した結果を示す。M はサイズマーカーを示し、BP(-)は pMOL7-BP(-)を、cont は pMOL7-control を鋳型として用いた反応であることを示す。Lanes 2-7 は 20 分間反応を行い、反応開始後 5 分の時点で、buffer、10 nM の Pol IV、あるいは 10 nM の Pol IV(D8A)を添加した。Lane 8,9 は、Pol IV 添加前にあたる反応開始後 5 分の時点で反応を停止した。

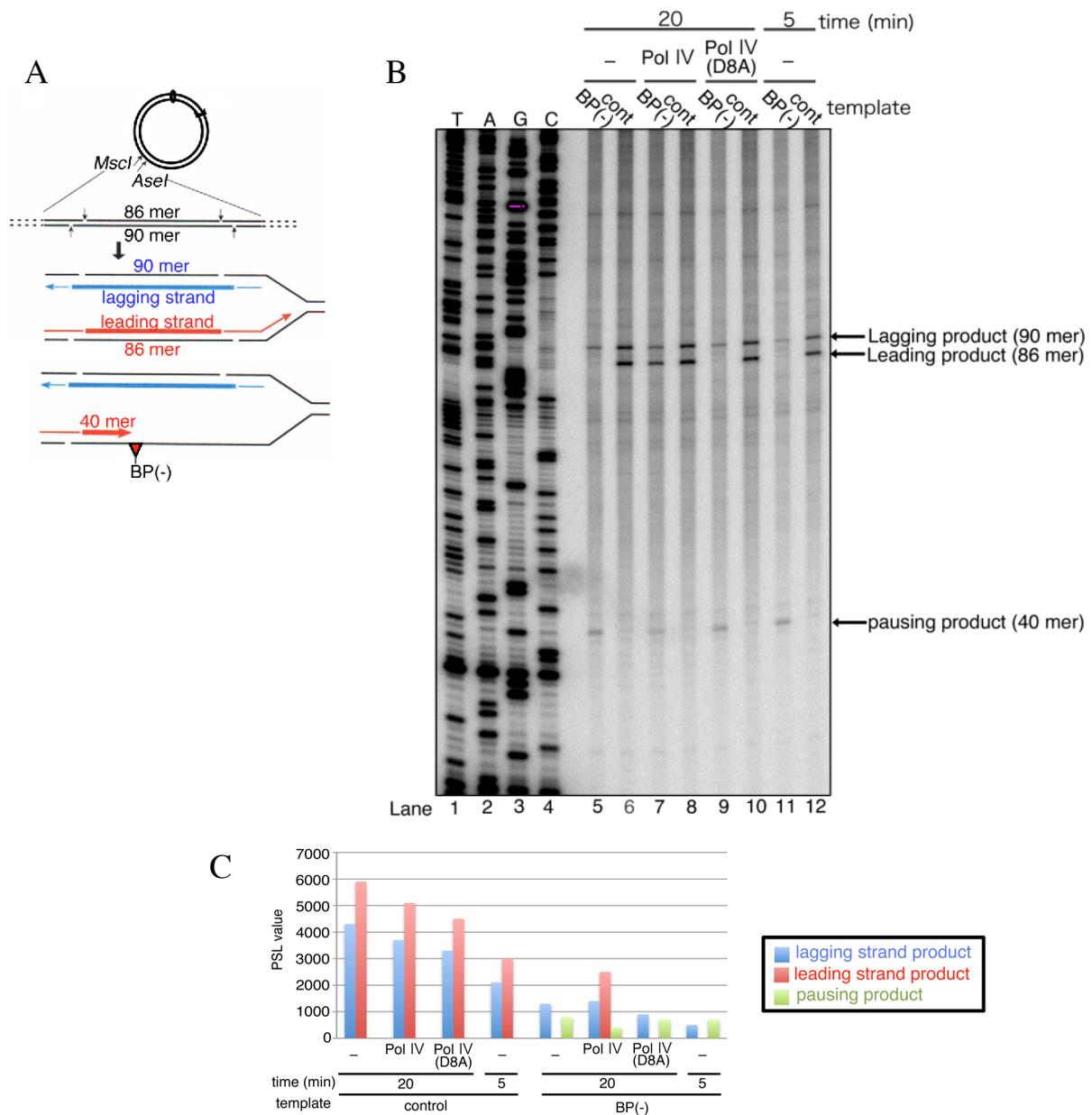


図 9 損傷近傍領域に焦点を当てた DNA 複製再開についての詳細な解析

(A)複製産物を、損傷部位を挟む二種の制限酵素(*MscI*、*AseI*)で消化することで、リーディング鎖複製産物は完全長 86-mer、ラギング鎖複製産物は 90-mer の DNA 断片として切り出される。一方、BP(-)損傷によりリーディング鎖伸長反応が停止した場合、その複製産物は 40-mer となる。(B)複製産物を 8%シーケンスゲル電気泳動で解析した結果を示す。T, A, G, C は各塩基による塩基配列マーカを示す。BP(-)は pMOL7-BP(-)を、cont は pMOL7-control を鋳型とした反応であることを示す。Lanes 5-10 は 20 分間反応を行い、反応開始後 5 分の時点で、buffer、10 nM の Pol IV、または 10n M の Pol IV(D8A)を添加した。Lane 11 と 12 は Pol IV 添加前にあたる反応開始後 5 分の時点で反応を停止した。(c)各 Lane の複製産物を、そのバンド強度から定量した結果をグラフとして示す。縦軸の PSL value がバンド強度を示しており、青はラギング鎖複製産物、赤はリーディング鎖複製産物、緑は損傷により停止したリーディング鎖複製産物の強度を示す。

3. 複製フォークの動態解析

アルカリアガロースゲル電気泳動、及びシークエンスゲル電気泳動による複製産物の解析から、BP(-)損傷により停止したリーディング鎖における DNA 合成が、Pol IV の行う TLS を介して再開することを示すと考えられる結果が得られた。しかしながら、この解析だけでは、本当に損傷により複製フォークそのものが停止しているのか、あるいは、リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応のアンカップリングが起こり、複製フォーク自体は進行し続けているのかは不明である。序論でも述べたように、大腸菌の DNA 複製装置において、Pol III のコア酵素と DnaB ヘリカーゼは τ サブユニットを介して結合している。そして、DNA 合成を行う Pol III の後押しにより、DnaB ヘリカーゼが高速でラギング鎖鋳型上を移動して二本鎖 DNA を開裂することで、複製フォークの進行が押し進められていく(Kim *et al.*, 1996)。この際、リーディング鎖とラギング鎖における複製は協調して進行していくが、BP(-)損傷によりリーディング鎖合成が停止した直後にラギング鎖合成も停止するのことは不明である。そして、DnaB ヘリカーゼは、効率が 1/10 程度に低下するものの、Pol III の後押しがなくても DNA 鎖の開裂を行うことは可能であると考えられることから、リーディング鎖合成停止後も DnaB ヘリカーゼが複製フォークの開裂を続けることで、複製フォークの進行が継続し、ラギング鎖合成のみ引き続き行われている可能性も考えられる。よって、損傷により停止した複製フォークがそのままの形で正常に DNA 複製を再開できるか否かを検証するためには、BP(-)損傷遭遇後の複製フォークの状態を知る必要がある。

そこで、複製産物を制限酵素 *Bgl*III で切断し、二次元ゲル電気泳動により展開することで複製フォークが示す Y 型構造の形状を直接的に観察することとした。二次元ゲル電気泳動による解析では、複製中間体をそのサイズと構造の両方に依存してスポットとして細かく分離することができる。そのため、損傷遭遇から複製再開にかけての複製フォークの動態を検出することが可能となる。従って、この解析を行うことで、BP(-)損傷により複製フォークの進行そのものが停止しているのかを示すことができ、ひいては、Pol IV を添加することで TLS の寄与により複製フォークの進行が再開したのかを示すことができると考えられた。

図 10A に、本実験で検出される主なスポットを模式的に示した。これまでに、複製産物のうち、直鎖状の分子は起点である spot 1 に、時計回りの複製フォークのみが進行し *terB* まで複製フォークの開裂が継続した Y 字構造を示す分子は spot 2 に、反時計回りの複製フォークのみが進行し *terB* まで複製フォークの開裂が継続した Y 字構造を示す分子を spot 3 に、そして両方向の複製フォークが共に進行し *terB* まで複製フォークの開裂が継続した X 構造を示す分子は spot 4 の位置に検出されることが、既に知られている(Friedman *et al.*, 1995, Higuchi *et al.*, 2003)。更に、spot 2 から spot 4 までの間には、両方向の複製フォークが共に進行を開始するものの反時計回りの複製フォークの開裂が停止したダブル Y 構造を示す分子が、反時計回りの複製フォークの進行度に応じた移動度で出現すると考えられる。図にはその一例として spot 5 を記載した。

解析には、第三章 第二節 2 と同一の実験により得られた複製産物の一部を用いた。pMOL7-control を用いた反応では、Pol IV 添加の有無による結果の差異は殆ど観察されず、spot 2 や spot 3 が僅かに検出されるものの、大部分の複製産物は spot 1 あるいは spot 4 の位置に検出された(図 10B)。これまでの解析の結果、損傷のないプラスミドを鋳型とした場合、時計回り/反時計回りどちらの複製フォークについても完全長の複製産物が強い強度で検出されていることから、spot 1 及び spot 4 に見られる複製産物は正常に複製を完了したものであると考えられる。このうち spot 1 については、*terB* 領域を含む鋳型全体が完全に複製され、制限酵素 *Bgl*III による処理の結果、複製産物同士が結合が解消される(デカテネートする)ことで直鎖状となった分子の存在を示していると考えられる。これに対し、spot 4 は、同じく鋳型のほぼ全体が複製されているものの、*terB* 領域の一部の複製のみが不完全であるため、制限酵素処理後も複製産物同士が一部結合しており、X 構造を示す分子の存在を示していると考えられる。これについては、Tus タンパク質を除いて *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応を行わせ、同様の解析を行った場合、spot 4 は殆ど検出されず、複製産物の大部分が spot 1 の位置に検出されることから、時計回りの複製フォークをブロックするための Tus-*terB* 複合体の存在が、*terB* 領域の複製完了を難しくしているために起こると考えられる(Higuchi *et al.*, 2003)。この結果から、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応では、複製が開始された殆どの鋳型において、両方向の複製フォークが共に DNA 合成を開始し、終端である *terB* まで DNA 複製を継続することが改めて確認できた。

一方で、pMOL7-BP(-)を用いた反応では、Pol IV を添加しない場合、両側の複製フォークの進行が共に正常に *terB* まで至ったことを示す spot 1 及び spot 4 の強度はコントロールに比べて減少し、spot 2 と spot 4 の間に新たな spot が強い強度で出現した(図 10C, 左)。この spot は、その位置から、サイズが 7.0~7.5kb 程度の DNA 分子であると見積もることができ、実際に鋳型上の BP(-)損傷で複製が停止した場合の複製産物のサイズである 7.0kb と一致する。このことから、この新たな spot は、図 10A に spot 5 として示したように反時計回りの複製フォークの開裂が途中で停止した、ダブル Y 構造を示す分子を検出したものと考えられる。また、損傷のない pMOL7-control を用いた結果と比較して、新たに検出される spot は spot 5 のみであった。このことから、この新たな spot 5 は、BP(-)損傷の影響により、複製途中で停止した複製フォークの存在を示していると考えられる。更に、spot 5 の前後にも特にスメアに濃くなったような箇所は存在しないことから、反時計回りの複製フォークのうち損傷により停止したものについては、ほぼ同一の部位で、リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の大幅な uncoupling を伴うことなくその進行を停止したものと考えられる。しかし一方で、コントロールと比較して強度は弱まっているものの、spot 1、あるいは spot 4 とほぼ同一の箇所(spot 4')にも、spot が検出された(図 10C, 左)。このことは、BP(-)損傷遭遇後に反時計回りの複製フォークが *terB* 近傍まで進行し続けたものも、一定の割合で存在することを示している。Spot 1, 4', 5 の強度を定量したところ、その比率は各々 50%、20%、30%であった。今回、解析に用いた BP(-)損傷は、Pol III が乗り越えることは不

可能な塩基損傷であり、事実、第三章 第二節 2 の結果から、Pol IV を添加しなければ反時計回りのリーディング鎖の完全長複製産物は検出されないことが既に示されている。このことから、一部の鋳型においては、第三章 第二節 4 で後述する repriming を介した複製再開が生じている可能性や、複製フォークの開裂が継続し続け、通常は協調して複製が行われるリーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の大幅な uncoupling が起こり、リーディング鎖合成停止後にラギング鎖のみ DNA 合成が *terB* 近傍まで継続している可能性が考えられた(図 7: Uncoupling)。これらの結果に対し、Pol IV を添加することで、spot 5 が顕著に薄くなり、spot 4 と同一箇所に強い強度を持った spot (spot 4^{''}) が出現した(図 10C, 中央)。また、spot 1 の強度も幾分か増加した。Spot 1, 4^{''}, 5 の強度を定量したところ、その比率は各々 55%、40%、5%であった。一方、Pol IV(D8A)を添加した場合には、このような変化は観察されなかった(図 10C, 右)。このことは、Pol IV を添加することで、損傷により停止していた複製フォークの進行が再開し、*terB* にまで至ったことを示していると考えられる。また、第三章 第二節 2 の結果に示された通り、Pol IV を添加することで、反時計回りのリーディング鎖の完全長複製産物が出現することから、BP(-)損傷により進行が停止した複製フォークの大部分では、Pol IV の行う TLS を介して少なくともリーディング鎖の DNA 合成が再開し、複製フォークの進行も再開して *terB* にまで至ったと考えられる。しかし、この二次元ゲル電気泳動を用いた解析では、BP(-)損傷による複製フォークの停止、並びに TLS を介したリーディング鎖伸長反応と複製フォーク進行の再開が生じたことは示せても、リーディング鎖伸長反応と協調してラギング鎖における DNA 合成も再開したかは不明である。そのため、TLS の寄与により正常な形での複製再開が行われているのかはまだ不明であった。

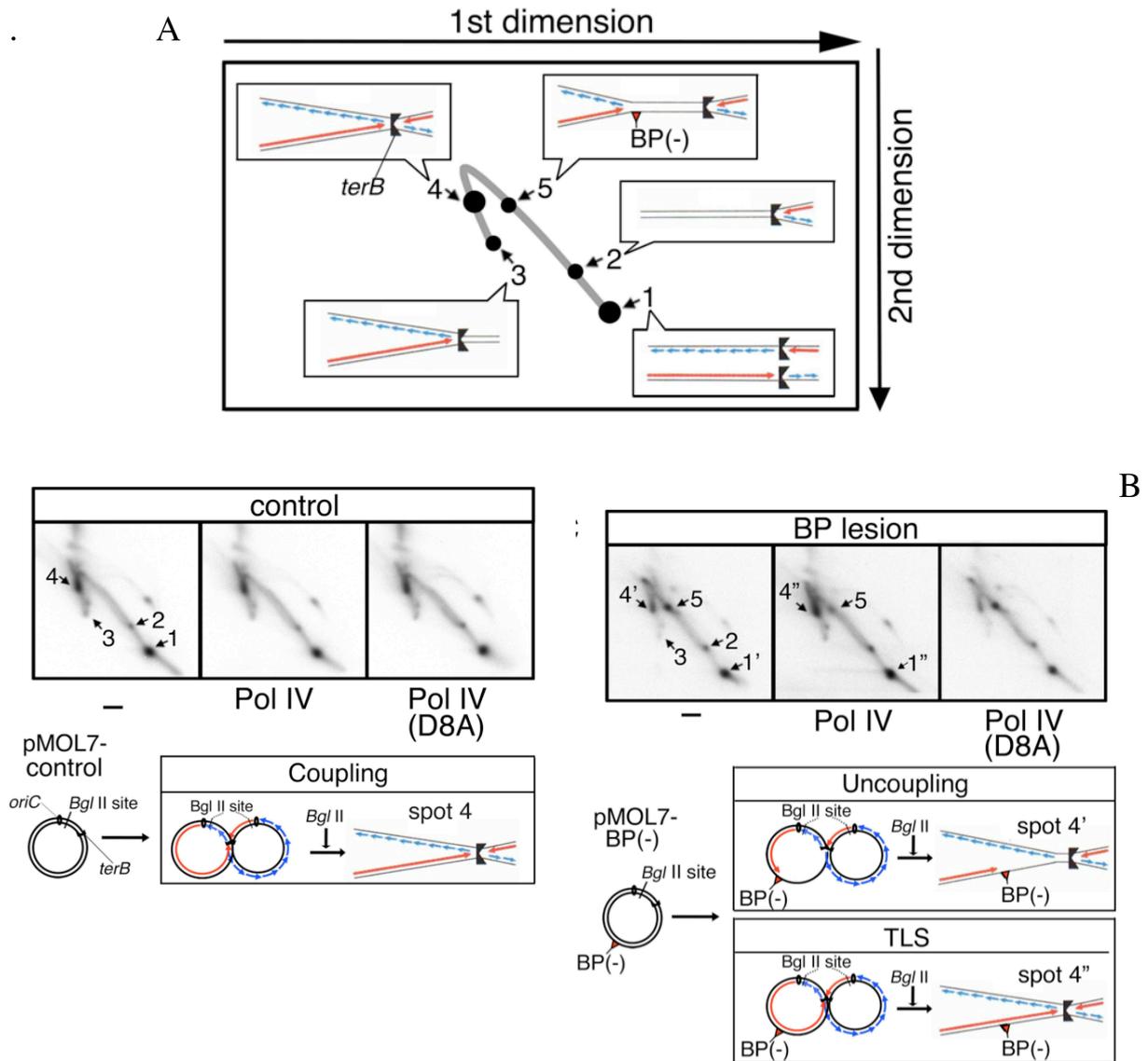


図 10 BP(-)損傷に遭遇した複製フォークの動態の解析

各複製産物の複製フォークの構造を二次元ゲル電気泳動により解析した結果を示す。(A)検出が予測された主な複製産物のスポットを示す。spot 1 は起点であり直鎖状分子の、spot 2 は時計回りの複製フォークのみが *terB* まで進行した Y 字構造を示す分子の、spot 3 は反時計回りの複製フォークのみが *terB* まで進行した Y 字構造を示す分子の、spot 4 は両方向の複製フォークが *terB* まで進行した X 構造を示す分子の、spot 5 は反時計回りのフォークの開裂が途中で停止したダブル Y 構造を示す分子の検出位置を示す。(B)損傷を含まない pMOL7-control を用いた複製反応の産物を解析した結果を示す。矢印で示された数字は spot の種類を示す。反応にはそれぞれ、反応開始から 5 分の時点で buffer、10 nM の Pol IV、あるいは 10 nM の Pol IV(D8A)を添加した。(C)BP(-)損傷を含む pMOL7-BP(-)を用いた複製反応の産物を解析した結果を示す。矢印で示された数字は spot の種類を示す。反応にはそれぞれ、反応開始から 5 分の時点で buffer、10 nM の Pol IV、あるいは 10 nM の Pol IV(D8A)を添加した。各 spot における複製様式を示す模式図については、黒細線は鋳型 DNA、赤色の長矢印はリーディング鎖新生鎖、短い連続的な青矢印はラギング鎖新生鎖を示す。BP(-)損傷は赤色の三角で示している。

4. DNA 損傷の下流からの repriming を介した複製再開の有無の検証

二次元ゲル電気泳動による複製産物解析の結果、損傷を含むプラスミドを鋳型として用いた際に、Pol IV 添加の有無に関わらず、過半数の鋳型については、複製フォークの進行が損傷を超えて *terB* まで継続していることが示された(図 10C, 左, spot 1, spot 4')。近年、Yeels and Mariani は、紫外線により誘発される DNA 損傷である CPD 損傷を挿入した *oriC* プラスミドを鋳型とし、本研究と類似した *in vitro* の複製系を用いた解析から、損傷により停止したリーディング鎖が TLS を介さずに再開することを示している(Yeels and Mariani, 2011)。彼らの解析によると、この現象は、DNA 複製停止により DNA 損傷領域の下流に露出した一本鎖 DNA 上に、DnaG プライマーゼを介して新しくプライマーが合成され、再度新たに複製が開始されるために起こる(repriming)。もし、同様の現象が本研究においても生じているのであれば、これが、複製フォークの進行が Pol IV 添加なしに BP(-)損傷を超えて *terB* まで継続した産物として、観察されている可能性がある。

そこで、repriming を介した複製再開が実際に生じているのかを確認するため、サザンハイブリダイゼーションによるリーディング鎖複製産物の検出を行った。解析では、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応時には ^{32}P による標識を行わず、損傷から 461 bp 下流に設計された 40 bp の一本鎖 DNA(表 4, プロブ D')の 5'末端を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ でリン酸化して標識し、検出を行った。プローブをラベルしたことにより、検出されたラベル量は複製産物の長さに関わらず、単純に分子数に比例する。解析に際しては、まず複製産物を *Bgl*I で切断し、その後アルカリアガロースゲル電気泳動による展開を行い、標識したプローブを用いて検出を行った。

図 11A に示したように、TLS による複製再開後のリーディング鎖複製産物は、制限酵素の標的部から一続きの約 2.4 kb の DNA 断片として検出される。これに対し、repriming による複製再開を介した複製産物が存在していた場合、これは BP(-)損傷の前後で複製産物が一度分断されるため、1.7 kb 以下の DNA 断片として検出される。解析の結果、BP(-)損傷を含むプラスミドを鋳型として用いた場合、Pol IV 添加の有無に関わらず、同程度の強度を持つ 1.5 kb 程度のブロードになったバンドの出現を確認した(図 11 B, Lane 1-3)。このことは、BP(-)損傷の下流で、TLS を介さないリーディング鎖合成再開が一定の割合で起こっていることを示唆している。更に、ゲルのバンド強度をヒストグラム化したプロファイルを用いてそのピーク強度を比較したところ、Pol IV 添加の有無では、repriming を介したと考えられる複製産物のピーク強度はほぼ変化しなかった(図 11C)。このことは、少なくとも本実験条件下では、repriming を介した複製再開と TLS を介した複製再開は各々独立して生じていることを示している。

加えて、プロファイルのピーク強度を定量した結果、TLS を介して複製再開したと考えられる複製産物の量と、repriming を介して複製再開したと考えられる複製産物の量の比率は、およそ 1:0.4 であった(図 11C)。このことは、TLS が BP(-)損傷による複製停止後、repriming に比べてかなり効率的に複製再開に働いていることを示唆してい

る。一方で、*repriming* を介した複製再開による複製産物の量は、*TLS* を介した複製再開産物の 1/3 程度と、決して多くは無い。そのため、二次元ゲル電気泳動の結果観察された、複製フォークの進行が *Pol IV* 添加なしに *BP(-)* 損傷を超えて *terB* まで継続したと考えられる産物(図 10C, 左, spot 1, spot 4')の全てが *repriming* による複製再開の結果であるとは考えられず、*BP(-)* 損傷遭遇後、リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の大幅な *uncoupling* が起こっている鋳型が相当の割合で存在する可能性を払拭することはできなかった。

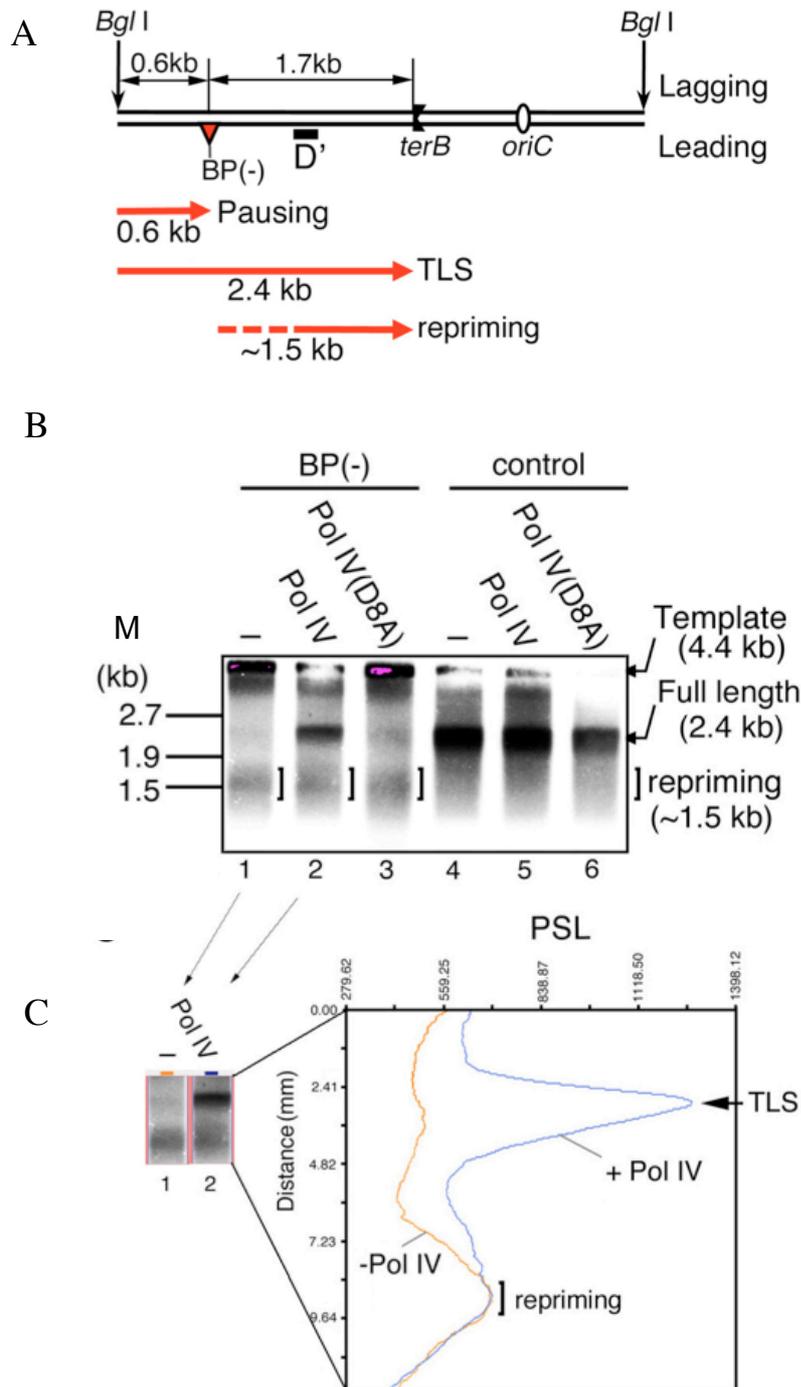


図 11 Repriming を介した複製再開の有無の検証

Repriming を介した複製再開が生じているか否かをサザンブロッティングにより解析した結果を示す。(A)TLS あるいは repriming により複製が再開した際に検出される DNA 断片サイズの予測を模式的に示す。(B)各複製産物を 0.9%アルカリアガロースゲル電気泳動で展開し、プローブ D'を用いてサザンハイブリダイゼーションによりリーディング鎖複製産物を検出した結果を示す。M はサイズマーカーを示す。BP(-)は pMOL7-BP(-)を、control は pMOL7-control を鋳型とした反応であることを示す。各反応には、反応開始後 5 分の時点で、buffer、10 nM の Pol IV、あるいは 10 nM の Pol IV(D8A)を添加した。(C)Lane 1 および Lane 2 のバンド強度をヒストグラム化したプロファイルを示す。Lane 1 は黄色、Lane 2 は青色の線で示されている。

5. DNA複製再開時におけるラギング鎖伸長反応の検出

ここまでの解析により、BP(-)損傷により停止したリーディング鎖伸長反応が TLS を介して再開すること、並びに全ての鋳型についてではないものの、複製フォーク自体の進行も BP(-)損傷により、リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の大幅な uncoupling を起こすことなく停止しており、TLS を介してそれが再開・完了することを示すと考えられる結果を得た。しかし、損傷により停止した DNA 複製が TLS により正常に再開することを証明するためには、複製フォーク自体の進行が BP(-)損傷により停止した鋳型において、TLS に伴ってラギング鎖における DNA 合成も再開し、リーディング鎖伸長反応と協調して複製が行われか調べる必要がある。そこで、TLS を介して、停止したリーディング鎖伸長反応と同時にラギング鎖伸長反応も再開しているのかを調べるため、サザンハイブリダイゼーションによる Okazaki fragment の検出を行った。解析では、リーディング鎖複製産物検出の際と同様に、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応時には ^{32}P による標識を行わず、損傷の前後に設計された各プローブを標識して検出を行った。これにより、複数の異なるプローブを用いることで、損傷通過前後の特定の領域におけるラギング鎖新生鎖合成のみを個別に検出し、その相対的な変化を捉えることが可能となる。また、プローブをラベルしたことにより、検出されたラベル量は複製産物の長さに関わらず、単純に分子数に比例する。

Okazaki fragment 検出のためのプローブには、表 4 に示した約 40 bp の 4 種の一本鎖 DNA(プローブ A, B, C, D)を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で 5'末端をリン酸化して使用した。図 12A に示したように、プローブ A は損傷より前の比較的離れた位置に、プローブ B は損傷直前に、プローブ C は損傷直後に、プローブ D は損傷通過後の比較的離れた位置に、それぞれ設計されている。実験では、リーディング鎖伸長反応についても検出を行う可能性を考えて、まず複製産物を *Bgl*II で切断し、その後アルカリアガロースゲル電気泳動による展開を行い、短い一本鎖 DNA 断片として分離された Okazaki fragment をこれら 4 つのプローブを用いてそれぞれ検出した(図 12B)。また、損傷を持たないコントロールの鋳型として、この実験では pMOL7-BP(-)を構築する際に用いた parental plasmid である、P2 を用いた。

損傷のないプラスミドである P2 を鋳型として用いた場合には、検出プローブ間による結果の差異は殆ど確認されなかった(図 12B, Probes A, B, C, D, 各 Lanes 5-7)。ただし、Pol IV や Pol IV(D8A)を添加した反応では Okazaki fragment のサイズが、それらを添加しない場合に比べて幾分短くなっている。ラギング鎖伸長反応において Okazaki fragment のサイズを決定する要因の一つに、複製フォーク進行のスピードが関わることが知られている (Marians, 1992, Tougu *et al.*, 1996)。プライミングの効率は DnaG プライマーゼの濃度に規定されるため、その濃度が一定であった場合、複製フォークの進行速度が低下すると単位時間あたりのプライミング効率が上昇する。そのため、複製フォークの進行速度が低下すると、Okazaki fragment のサイズも減少すると考えられている(図 13)。このことから、Pol IV や Pol IV(D8A)を添加した反応では、その添加に

より僅かながら複製阻害が引き起こされ、DNA の合成速度が低下したために Okazaki fragment サイズが減少したと考えられる。

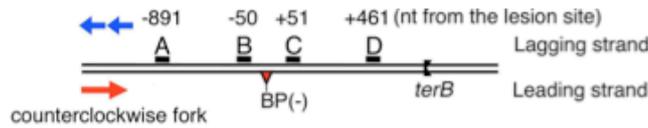
一方、損傷を含む pMOL7-BP(-)を鋳型として用いた場合、oriC 近傍にあるプローブ A を用いて検出を行ったところ、損傷を含まない鋳型である P2 を用いた場合と差異のない結果が得られた(図 12B, Probe A, Lanes 2-4)。このことから、損傷より手前の十分離れた位置であれば、ラギング鎖伸長反応は特に損傷の影響を受けないことが確認できた。これに対し、損傷直前にあたるプローブ B を用いて検出を行ったところ、損傷を含まない鋳型を用いた場合と比べ、顕著にサイズの短い Okazaki fragment が検出された(図 12B, Probe B, Lanes 2-4)。この結果には、Pol IV 添加の有無による差異は観察されなかった。また、0.6 kb 付近に強度の強い、損傷を含まない鋳型を用いた場合には観察されないバンドが検出された。これについては、そのサイズが BglII による切断部位から損傷を含むオリゴ DNA の挿入位置までの距離と同一であることから、複製産物ではなく、鋳型作製時に用いた gap を含むプラスミドが複製産物内に混入しており、これが切断されたものが検出されたと考えている。そのため、このバンドが P2 で検出されないことは当然であり特に問題とならない。次に、損傷直後にあたるプローブ C を用いて Okazaki fragment の検出を行ったところ、プローブ B と同一の結果を得た(図 12B, Probe C, Lanes 2-4)。更に、プローブ D を用いて Okazaki fragment を検出したところ(図 12B, Probe D, Lanes 2-4)、Pol IV を添加した反応においてのみ、損傷を含まない鋳型を用いた場合とほぼ同じ長さの okasaki fragment が、検出された(図 12B, Probe D, Lane 3)。確認のため、ゲルのバンド強度をヒストグラム化したプロファイルを用いてそのピーク強度を比較したところ、プローブ B 及び C を用いた場合には、Lanes 2-4 のバンド強度が Pol IV 添加の有無に関らずほぼ同一であった(図 12, Probes B, C, 右)。これに対し、プローブ D を用いた反応では、Pol IV を添加しなかった反応(図 12B, Probe D, 右, 緑色線)や Pol IV(D8A)を添加した反応(図 12B, Probe D, 右, 桃色線)については、プローブ B 及び C で得られた結果と同様、複製産物のピークを中心にその強度がなだらかに減少している結果が得られた。しかしながら、Pol IV を添加した反応(図 12B, Probe D, 右, 青色線)では、ピークの位置は Pol IV を添加しない反応と同一であるものの、それよりも左側に明らかにサイズの長い okasaki fragment を検出したと考えられるもう一つのピークが、明確に検出された。

前述したように、Okazaki fragment のサイズは複製フォークの進行速度に左右される。また、複製フォークは DnaB ヘリカーゼが二本鎖を開裂することで進行していくが、 τ サブユニットを介した Pol III の後押しが無ければ、その速度は 1/10 に低下する(Kim *et al.*, 1996)。そのため、損傷直前直後の probe B, C で検出された Okazaki fragment が Pol IV 添加の有無に関わらず短いもののみであったことは、全ての鋳型において BP(-)損傷によりリーディング鎖伸長反応が停止したことに伴い、Pol III による後押しを失ったために DnaB ヘリカーゼによる複製フォークの開裂速度も低下し、結果的に複製フォークの進行速度が低下して、Okazaki fragment のサイズが短くなったことを示していると考えられる(図 12B, Probes B, C, Lanes 2-4)。そしてその後、二次元ゲル電気泳動の

結果が示すように、何割かの鋳型においては複製フォークの進行そのものが、リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の大幅な **uncoupling** を起こすことなく一度停止したと考えられる。これは、DnaB は Pol III と結合しているため、Pol III が停止することで、DnaB も Pol III から解離することなく損傷部位からそう遠くない位置で開裂反応を停止したためではないかと考えられる(図 12C)。そして、これらの結果に対し、損傷から十分に離れた Probe D で、Pol IV を添加した反応においてのみ、損傷を持たない鋳型を用いて複製反応を行った場合とほぼ同じ正常な長さの Okazaki fragment が検出された。検出された Okazaki fragment うち Pol IV を添加していない(図 12B, Probe D, Lane 2)、または Pol IV(D8A)を添加した(図 12B, Probe D, Lane 4)反応で検出される、短いサイズの Okazaki fragment については、二次元ゲル電気泳動による解析によりその存在が示唆された、BP(-)損傷遭遇後、リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の大幅な **uncoupling** が起こった鋳型において合成された Okazaki fragment であると考えられる。これに対し、Pol IV を添加した反応では(図 12B, Probe D, Lane 3)、Pol IV を添加しない場合と同程度の量の Okazaki fragment が観察され、これに加えて正常な長さの Okazaki fragment が検出されている。このことから、大幅な **uncoupling** の結果合成された Okazaki fragment に上乗せされる形で、正常な長さの Okazaki fragment が出現しているのではないかと考えられる。そしてこのことは、Pol IV の添加により、大幅な **uncoupling** の結果合成された Okazaki fragment とは別に、新たに行なわれたラギング鎖伸長反応による産物であり、しかもそれは正常な速度の複製フォークの進行を伴うものであることが示唆される。

以上の結果は、BP(-)損傷によりリーディング鎖伸長反応が停止すると複製フォークの進行速度も低下し、そのうち少なくとも図 10C において spot 5 として示された、損傷遭遇後に複製フォークの進行そのものが停止した鋳型の中には、TLS を介してラギング鎖伸長反応を伴う正常な速度での複製フォーク進行が再開したものが存在することを示している。また、Pol IV の DNA 鎖伸長速度は Pol III に比べて格段に遅いため (Lenne-Samuel *et al.*, 2002)、複製フォークの進行が正常な速度で再開したと言うことは、少なくともそれが観察されたプローブ D の時点では、TLS 後のリーディング鎖伸張反応が Pol III によって行われていることを示唆する。すなわち、この結果を以て、BP(-)損傷により停止した DNA 複製が、Pol IV を介した TLS により、Pol III による正常な複製を再開できることが強く示唆された。

A



B

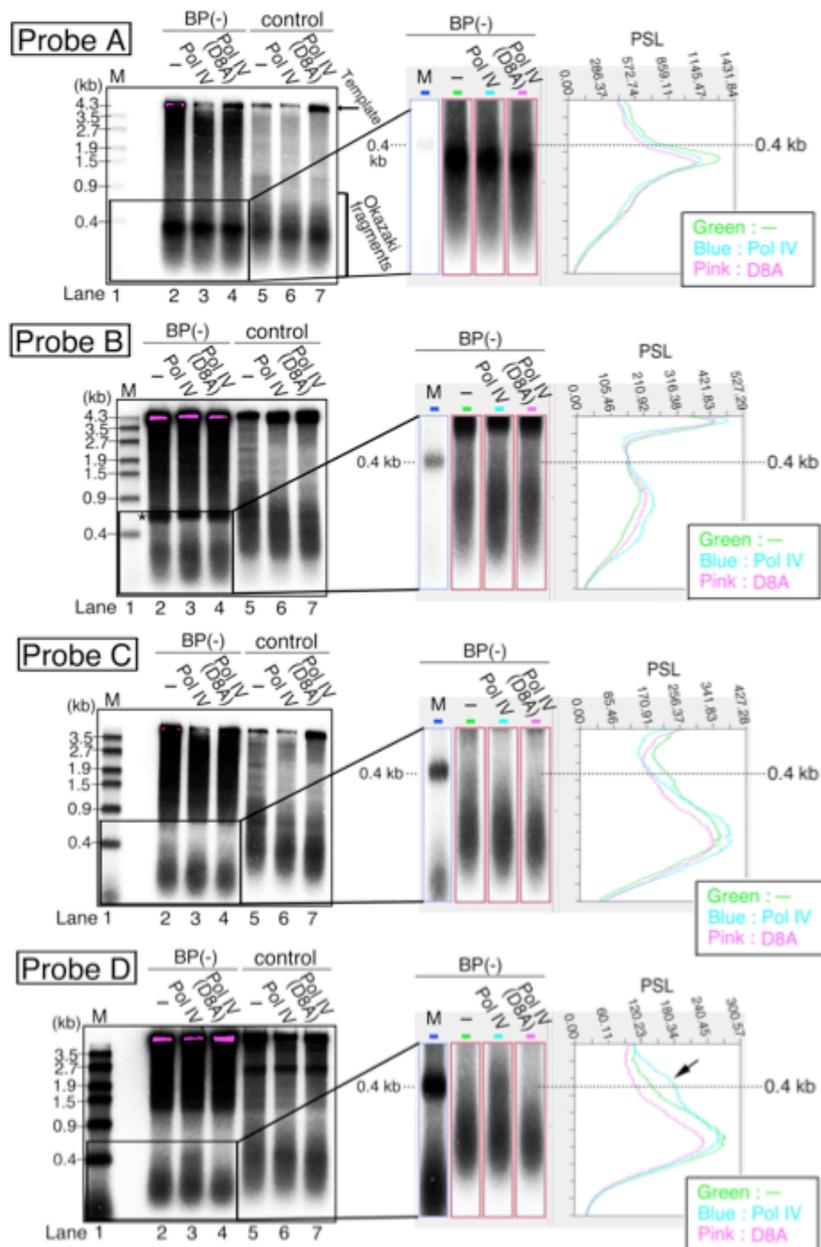


図 12 損傷前後の Okazaki fragment 合成の変化

TLS を介した DNA 複製再開に際し、ラギング鎖の DNA 合成も再開しているかをサザンブロッティングにより解析した結果を示す。(A)特定領域の Okazaki fragment 検出のために用いられた各プローブの *oriC* プラスミド上における位置を示す。(B)各複製産物を 0.9% アルカリアガロースゲル電気泳動で展開し、サザンハイブリダイゼーションにより、プローブ A, B, C, D を用いて Okazaki fragment を検出した結果(左側)と、ゲルの Lanes 1-4 のバンド強度をヒストグラム化したプロファイル(右側)を示す。M はサイズマーカーを示す。BP(-)は pMOL7-BP(-)を、control はプラスミド P2 を鋳型とする反応であることを示す。各反応には、反応開始後 5 分の時点で、buffer、10 nM の Pol IV、あるいは 10 nM の Pol IV(D8A)を添加した。ヒストグラムは pMOL7-BP(-)を鋳型として用いた反応の Okazaki fragment を示すバンドの周辺のみを示しており、緑色の線が buffer、青色の線が 10 nM の Pol IV、桃色の線が 10 nM の Pol IV(D8A)を添加した複製産物を解析した結果を示している。横軸はグラフに示された Okazaki fragment のバンドと一致した profile の位置を示しており、縦軸はバンドの強度を示している。

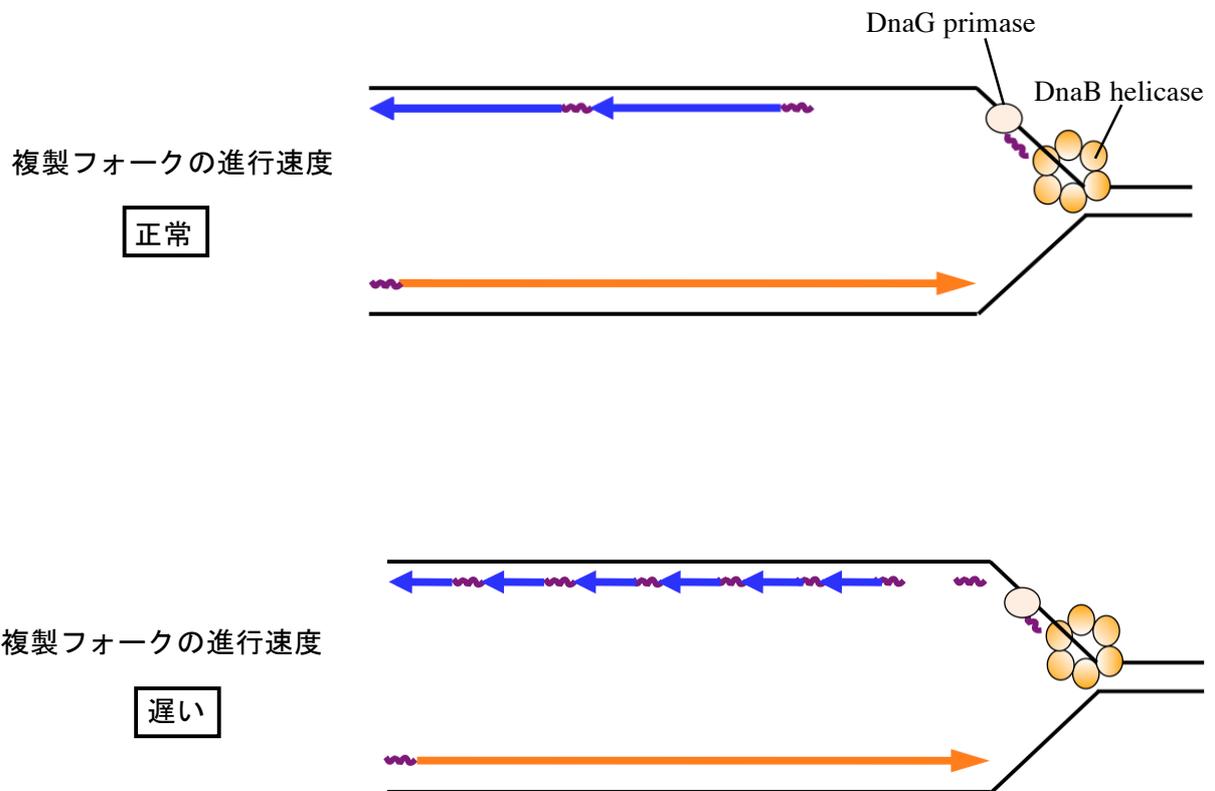


図 13 複製フォークの進行速度がもたらす Okazaki fragment サイズへの影響

各 Okazaki fragment 合成の端緒となるプライマーの合成効率は、プライマーゼの濃度に規定される。そのため、プライマーゼ濃度が一定であれば、プライマーの合成は時間に依存して一定の頻度で行なわれることとなり、結果的に、図に示したように距離辺りのプライマー数が増加することで Okazaki fragment のサイズが相対的に短くなる。ゆえに、Okazaki fragment の長さは複製フォークの進行速度の指標ともなる。

6. Pol IV 添加後の反応時間の Time course

これまでの解析から、リーディング鎖上に存在する BP(-)損傷により複製阻害が起こり進行が停止した複製フォーク n において、TLS を介することで、リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の協調した正常な DNA 複製が再開する、と考えられる結果が得られた。また、前項の Okazaki fragment を検出した結果から、少なくとも損傷部位から約 500 bp 下流では、Pol III が TLS を行った Pol IV と入れ替わって DNA 合成を担っていることが示唆された。しかし、TLS 後に Pol IV と Pol III のスイッチングが行われ、Pol III が複製再開後の DNA 合成を担っていることを示す直接的な証拠は得られていない。そこで、Pol IV 添加後の反応時間について Time course 実験を行い、更なる検証を試みた。

複製再開後のリーディング鎖における DNA 合成が Pol III によるものか、あるいは TLS により入れ替わった Pol IV が損傷を乗り越えた後にそのまま複製を継続したものを明らかにするため、pMOL7-BP(-)を鋳型とする *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応におけるリーディング鎖完全長複製産物の出現を、Pol IV 添加後の時間経過に従って観察した(図 14)。複製型である Pol III は 1 秒あたり約 1 kb の DNA 合成を行うことができるが、Pol IV は 1 秒あたり 6 bp 程度の DNA 合成しか行えないことが既に分かっている(Lenne-samuel *et al.*, 2002)。複製反応に用いている鋳型の損傷部から複製終結点までの距離は約 1.8 kb であるため、Pol IV のみでその全長を複製しようとするれば、複製終結までには、計算上少なくとも 5 分は必要となる。そのため、Pol IV 添加後 5 分が経過する以前にリーディング鎖の完全長複製産物が観察できれば、損傷を乗り越えた後のリーディング鎖伸長反応の少なくとも一部は、Pol III が担っていると考えられることができる。解析に加える Pol IV の濃度は 10 nM とし、DnaA 添加による複製開始後 5 分で Pol IV を添加し、その後、Pol IV を加えずに反応を停止させた 0 分(合計反応時間 5 分)、及び Pol IV 添加後 1 分、3 分、15 分(各々、合計反応時間 6 分、8 分、20 分)間反応させた複製産物の、完全長リーディング鎖複製産物の出現を観察した。損傷を含まないコントロールの鋳型には、pMOL7-control を使用した。

解析の結果、0 分では、完全長のリーディング鎖複製産物は観察されなかった(図 14, Lane 2)。これに対し、Pol IV の添加後 1 分で僅かながら完全長のリーディング鎖複製産物が観察され(図 14, Lane 3)、3 分でその量は更に増加した(図 14, Lane 4)。このことから、BP(-)損傷により一度停止したリーディング鎖においては、TLS 後に再度 Pol IV から Pol III へのスイッチングが起こり、TLS 後の複製を一部なりとも Pol III が担っていると考えられる。また、Pol IV 添加後 1 分でも完全長複製産物が検出されたことは、DNA ポリメラーゼの交換反応がかなり迅速に行われている可能性を支持する。

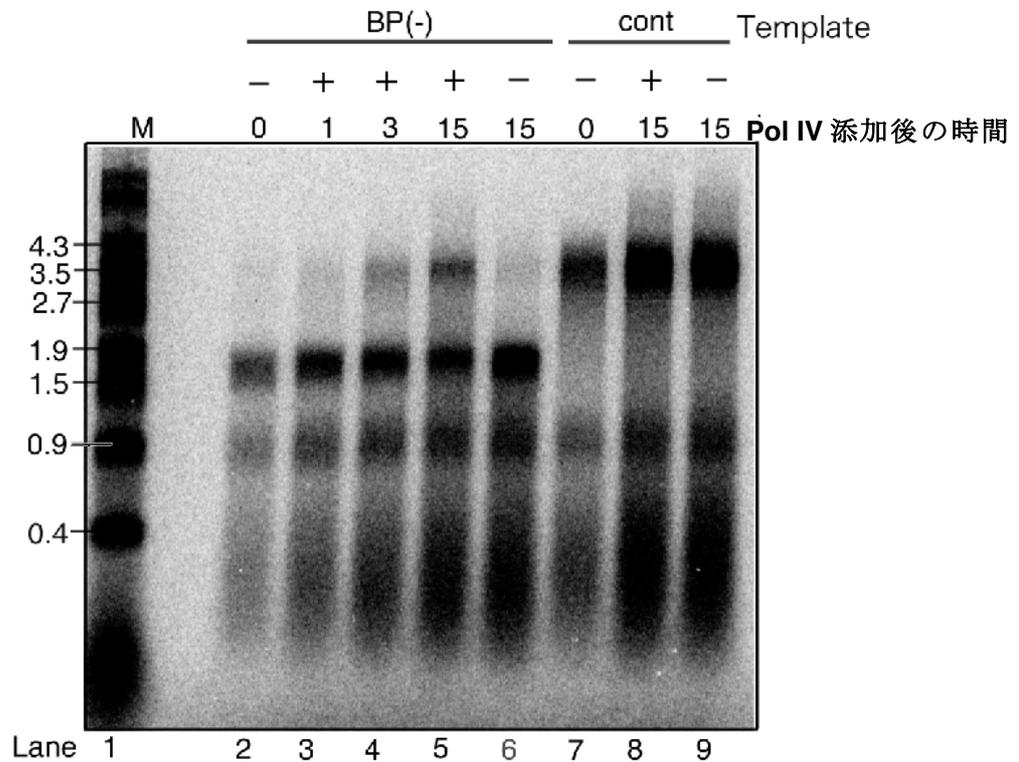


図 14 Pol IV 添加後の時間経過に従った完全長リーディング鎖複製産物の蓄積
 Pol IV 添加後の反応時間を変化させることで、pMOL7-BP(-)を用いた DNA 複製反応において、TLS 後に再開した DNA 合成を Pol III と Pol IV のどちらが担っているのかを解析した結果を示す。複製産物を 0.9% アルカリアガロースゲル電気泳動で解析した結果を示す。M はサイズマーカーを示し、BP(-)は pMOL7-BP(-)を、cont は pMOL7-control を鋳型として用いた反応であることを示す。Lanes 2-6 は pMOL7-BP(-)を用いて反応を行い、反応開始後 5 分の時点で、Lanes 3-5 には 10 nM の Pol IV を、Lane 6 には buffer を添加した。反応時間は Lane 左から、5, 6, 8, 20, 20 分間である。Lane 8 及び 9 は、Pol IV 添加前にあたる反応開始後 5 分の時点で反応を停止した。Lanes 7-9 は pMOL7-control を用いて反応を行い、Lane 8 には反応開始後 5 分の時点で 10 nM の Pol IV を、Lane 9 には buffer を添加した。反応時間は Lane 7 が 5 分、Lane 8 と 9 は 20 分間である。Lane 7 は、Pol IV 添加前にあたる反応開始後 5 分の時点で反応を停止した。

第四章 考察

本研究により、複製フォークにおける、Pol IV を介した TLS による複製再開の全過程を再構成することができた。そしてこの解析を通じ、複製フォークにおいて、リーディング鎖上に存在する DNA 損傷に遭遇して停止した DNA 複製に対し、TLS を介した正常な複製再開が可能であることを初めて直接的に示すことができたのではないかと考えている。今回、複製再開に対する TLS の寄与を検証するために *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製系に添加した Pol IV のモル濃度は、反応に添加する Pol III に対し約 6 倍であった。一方、大腸菌の細胞内では、正常時(非 SOS 応答時)であっても Pol IV は Pol III の 20 倍前後存在している(Kim *et al.*, 2001)。更に、Pol IV による TLS を介した複製再開では、Pol IV 以外の新たな因子は反応系に必要とされなかった。このことから、Pol IV は細胞内において、正常時にも TLS を介した複製再開を行うことが十分に可能であると考えられる。

1 TLS における DNA ポリメラーゼのスイッチング機構

本研究では、単一の BP(-)損傷をリーディング鎖上に含む鋳型を用いた反応において、リーディング鎖の完全長複製産物が Pol IV 添加の 1 分後から観察された(図 14, Lane 3)。更に、サザンブロットによりラギング鎖複製産物を検出した結果、BP(-)損傷から 461 bp 下流のプロブ D において正常な長さの Okazaki fragment が検出された(図 12B, Probe D, Lane 3)。複製フォークの進行速度、すなわち DnaB ヘリカーゼが二本鎖を開裂していく速度は、DNA 合成を行う Pol III の後押しがない場合でも、一秒あたり 35 bp 程度であることが実験的に示されている(Kim *et al.*, 1996)。ゆえに、プロブ D 近傍で既に複製速度が正常に戻っているということは、BP(-)損傷により停止した Pol III が Pol IV と入れ替わり、損傷を乗り越えて再度 Pol IV から Pol III にスイッチングするまでの一連の過程が、複製フォークの速度の低下を示す Okazaki fragment の長さが短くなった損傷近傍から、正常な速度を速度に戻ったことが示されるプロブ D 近傍に至るまでの約 500 bp の間、すなわち 20 秒もかからないうちに完了し、リーディング鎖とラギング鎖が coupling した正常な複製が再開したと考えられる。このように、得られた結果は、TLS による複製再開が非常に素早い反応であり、複製の停止時間を最小限にとどめて、スムーズに複製フォークを再開させることのできる機構であることを示唆している。そしてそれは、停止した複製フォークにおいて Pol IV と Pol III が非常に素早く二度のスイッチングを行い、Pol IV による TLS と、それに引き続く Pol III による DNA 鎖伸長反応再開が途切れること無く円滑に行われているためであり、これらの 2 回の交換反応は、単に DNA ポリメラーゼと β クランプとの親和性や濃度比にのみ依存した交換ではなく、交換を促進する何らかの分子機構を介していると考えられる。以下に、そう考察に至った理由を論述する。

1-1 TLSのための Pol III から Pol IV へのスイッチングについて

Pol III と Pol IV のスイッチングには、Pol III と β クランプの親和性が重要となるが、 β クランプに結合した Pol III がそこから自発的に解離するには、数分~20 分程度必要であることが既に示されている(Indiani *et al.*, 2005)。しかし、本研究では、Pol IV が添加後 1 分も経過しないうちに TLS を行い、更に再度 Pol III とスイッチングして複製を完了させることが可能であると言う結果を得た。このことは、Pol IV が Pol III を積極的に素早く、DNA 鎖末端から解離させる機能を持つことを示している。実際に、TLS の主要なモデルである toolbelt model を提唱した Indiani らの解析からは、停止した Pol III と Pol IV が β クランプに同時に結合して三者複合体を形成し、どのような機構を経るのかは不明であるものの、Pol IV が Pol III の β クランプからの自然な解離を待つことなく迅速に DNA 鎖末端を奪取することが示されている(Indiani *et al.*, 2005)(図 15A)。また、古郡らの解析からは、Pol IV が Pol III を積極的に β クランプからも解離させ、Pol III から Pol IV へのスイッチングが行われていることが示されている(Furukohri *et al.*, 2008)。更に、その Pol III から Pol IV へのスイッチングの効率は、Pol IV の β クランプ結合部位を欠損させた変異体である Pol IV Δ C5 を用いた場合に大幅に減少するものの、スイッチング自体は可能であることから、Pol IV は Pol III に直接的に作用することで β クランプからの解離を促し、Pol IV と β クランプとの結合はそれをさらに促進していると考えられた(Furukohri *et al.*, 2008)(図 15B)。これらの結果は、両者ともに環状の一本鎖 DNA を鋳型とし、 β クランプと SSB のみを用いた単純な DNA 複製系を用いた解析により得られたものであるが、本研究の結果から、複製フォークにおいても Pol IV が停止した複製フォークに作用して、迅速に Pol III から DNA 鎖末端を奪取していることが改めて示された。また、Pol III は Okazaki fragment 合成において、 β クランプから積極的に外れる機構を有していることから(Stukenberg *et al.*, 1994, Li *et al.*, 2000, Leu *et al.*, 2003)、この機構が Pol IV が Pol III を DNA 鎖末端から積極的に追い出すために利用されている可能性がある。

1-2 TLS 後に行われる Pol IV から Pol III へのスイッチングについて

Pol IV による TLS が行われた後の、Pol III による正常な DNA 合成再開のための Pol IV から Pol III へのスイッチングについても、何らかの反応により交換が促進されている可能性は高い。Pol IV の processivity は低いですが、それでも β クランプと結合している状況下では、平均 300~400 bp、長ければ 1300 bp 程度 DNA 鎖を伸長できる (Wagner *et al.*, 2000)。Pol IV の DNA 複製速度は 6 bp/秒であるため(Lenne-samuel *et al.*, 2002)、Pol IV は Pol III とのスイッチング後 1 分以上、DNA 鎖上に留まる能力を持つと考えられる。しかし、本研究で得られたラギング鎖複製産物の検出結果からは、TLS 後の Pol IV から Pol III へのスイッチングが、20 秒も経たずに行われていることを示唆する結果が得られた。更に、Indiani らの解析から、少なくとも Pol III より Pol IV が 3 倍程度過剰に存在する状況下では、Pol III が DNA 鎖伸長中の Pol IV から、Pol IV の自然な解離を待たずに DNA 鎖末端を奪取できることが示されている(Indiani *et al.*, 2005)。

また、今回の解析では、シーケンスゲル電気泳動により TLS が行われた複製産物を解析した結果、損傷部近傍に複製産物の蓄積は観察されなかった(図 9B, Lane 7)。単鎖 DNA 上の解析であるが、BP 損傷を含む一本鎖環状 DNA を鋳型として Pol IV に複製を行わせ、その複製産物をシーケンスゲル電気泳動で解析すると、損傷部位から複製終結まで 50 bp 程度であったとしても、複製産物が一塩基ごとにラダーとなって観察されることが報告されている(Shen *et al.*, 2002)。このことは、Pol IV による DNA 複製が、損傷から複製終結点までの間の各所で停止しがちであることを示している。この報告が正しければ、本研究においても、Pol IV が損傷部を複製した後に Pol III との二度目のスイッチングに時間がかかった場合、Pol IV が複製を継続するものと考えられるため、損傷部以降に複製産物がラダー状に蓄積したものが観察されるはずである。しかし、今回の解析では、BP(-)損傷による複製停止部位より後にそのような複製産物の蓄積は観察されなかったことから、Pol IV が停止すると、迅速に Pol III とのスイッチングが行われ、Pol III による DNA 鎖伸長が再開された可能性が高いと考えられる。仮に、Pol IV が TLS 後すぐに停止した場合にも、そのまま一定時間βクランプ上に留まることは十分考えられる。しかし、そのような状況下では、Pol IV はβクランプには結合しているものの、DNA 鎖末端からは解離しがちとなる可能性が高い。そのため、Pol III が DNA 鎖末端を奪取して容易に Pol IV とスイッチングできるのではないかと考えられる(図 15C)。

しかし、いずれにしても、反応系中に Pol IV は Pol III の 6 倍程度存在しており、濃度依存的な交換反応では Pol IV に分がある。にもかかわらず、Pol III が迅速に Pol IV とスイッチング可能であるということは、Pol IV による TLS 完了後に Pol III が積極的に Pol IV を解離させてスイッチングするのか、停止した Pol IV が DNA 鎖末端から解離した際に Pol III が入り込むのかは不明であるものの、濃度比のみに依存せず Pol III が優先的に DNA 鎖末端にアクセスできる仕組みが存在する可能性は高い。Toolbelt モデルでは、Pol IV による TLS 時にも Pol III がβクランプに三者複合体として残存しているため、Pol III による DNA 鎖末端の奪取は容易であるとされている(Indiani *et al.*, 2005) (図 15A)。しかしこれに対し、Pol III はβクランプからも解離すると言う結果も存在しており(Furukohri *et al.*, 2008)、実際のところ、複製フォークにおいてはどのような反応が起こっているか不明である。それでも、仮に Pol III がβクランプから解離していたとしても、DnaB との結合を介して複製フォーク上に残存している可能性は高い。もし、このような複製フォークの構成因子との結合を介して Pol III が複製フォーク上に留まるのであれば、それによって局所的に Pol III の濃度が高まり、TLS 後の DNA 鎖末端に Pol III がアクセスし易くなるのではないかと考えられる。

この、「Pol III は複製停止後も複製フォーク上に留まるのか否か」と言う問題を明らかにするためにも、TLS 後に DNA 複製を担う Pol III が、反応液中から複製のために新たにリクルートされた Pol III なのか、複製停止以前から複製フォークを構成していた Pol III なのかを明らかにすることは重要である。今後は、ゲル濾過や複製装置に含まれるタンパク質にタグを付加する等の手段を用いて、BP(-)損傷により複製が停止し

た複製装置を鋳型 DNA と共に、フリーの Pol III を含む反応液から分離し、これを Pol IV や DNA 鎖伸長反応を継続できない変異型 Pol III を溶液中に含む反応系に戻して反応を再開させ、完全長の複製産物が観察できるか否か解析するなどして、この疑問を明らかにしたいと考えている。また、この手法を用いることで、Pol IV による TLS 後は、全ての複製フォークにおいて Pol III が DNA 合成を担うのか、あるいは濃度依存的にある程度競合が起こり、一部の複製フォークでは Pol IV がそのまま DNA 合成をある程度継続するのかについても示すことができるかもしれない。Fujii らの一本鎖 DNA を鋳型とした解析によると、Pol IV は BP(-)を乗り越えた後に 4~5 bp は DNA 鎖伸長を継続すること、及び Pol III が引き続いて DNA 合成を継続するためには、最低でもこの 4 bp の Pol IV による伸長部(TLS patch)が必要であることが示されている (Fuchs 教授との personal communication)。このことから、複製フォークにおいて、TLS 後に Pol IV が DNA 鎖合成を多少なりとも継続しているのか否かを知ることは非常に重要である。

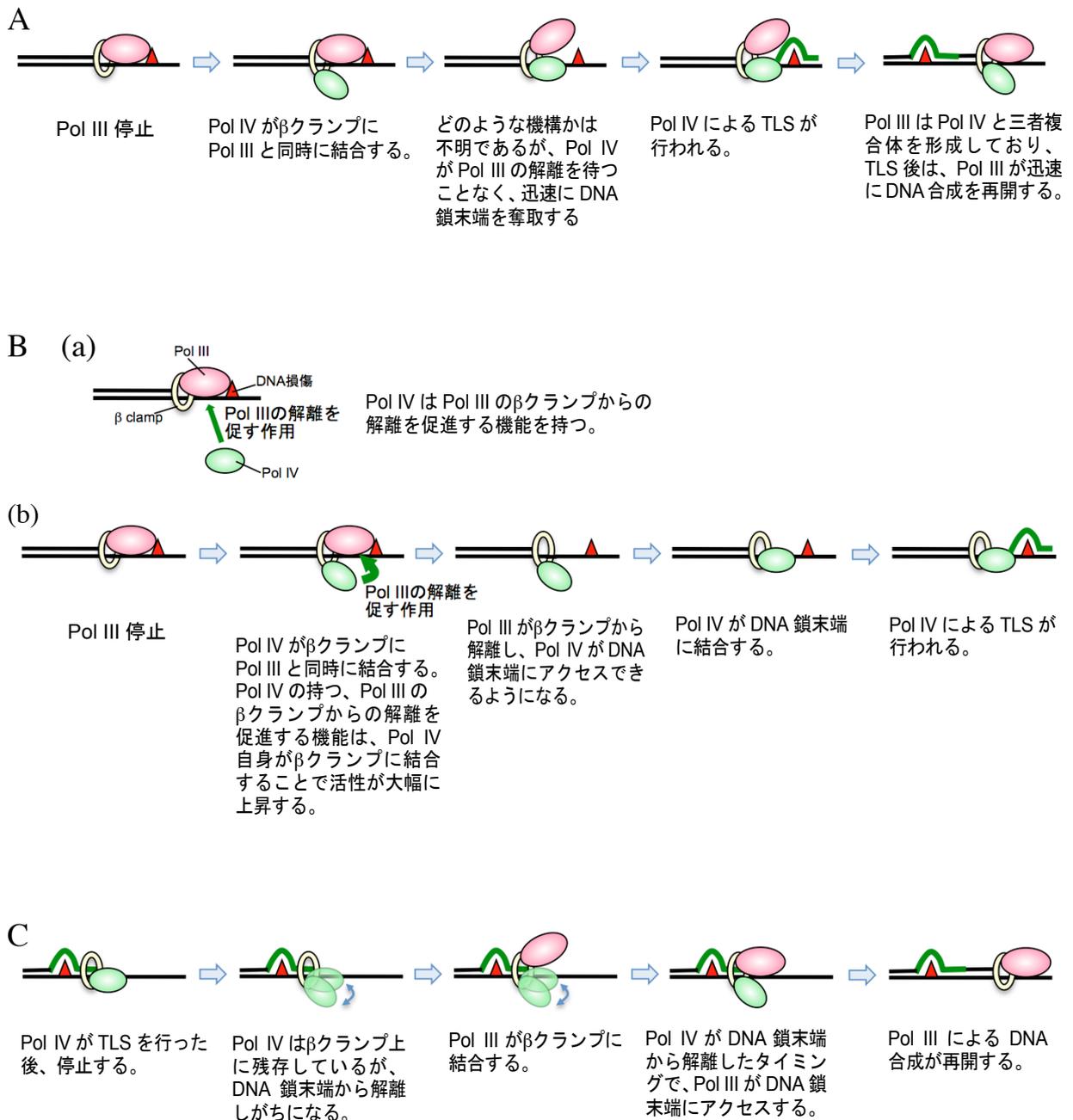


図 15 Pol III と Pol IV の間の迅速なスイッチングを可能にする機構のモデル

(A) Toolbelt model の概要を示す。(B) Toolbelt model と異なり、Pol IV の作用により Pol III がβクランプからも解離するとした場合の、Pol III から Pol IV へのスイッチング機構のモデルを示す。この場合、(a)に示したように、Pol IV はβクランプと結合していない状態でも、Pol III をβクランプから解離させる機能を有していると考えられている。しかし、βクランプとの結合を介することでその作用は大幅に増強されることから、実際には(b)のような過程を経ると考えられる。(C) TLS 後に Pol IV と Pol III がスイッチングする過程のモデルを示す。Toolbelt model に示されるように、TLS 中でも Pol III がβクランプと結合したままである可能性も存在する。黒線は鋳型 DNA 及び Pol III により合成された新生鎖、緑線は Pol IV により合成された新生鎖を示す。

2. リーディング鎖上に DNA 損傷が存在した際のラギング鎖伸長反応の動態

本研究では、リーディング鎖上に BP(-)損傷が存在する状況下でのラギング鎖伸長反応を、サザンブロッティングにより特定領域ごとに Okazaki fragment を検出することで観察した(図 12B, Probes A, B, C, D, Lanes 2-4)。その結果、Pol IV を添加することで、損傷近傍では短くなったものしか観察されなかった Okazaki fragment が、損傷通過後約 500 bp の位置では正常なサイズに復帰したのも存在していたことから、少なくとも一部の鋳型においてはラギング鎖伸長反応を伴う正常な複製再開が起こったと結論づけた。更に、この解析により、両鎖の uncoupling の状況や複製フォークの進行速度といった、損傷遭遇時の DNA 複製の状況を明確に知ることができた。

DNA 損傷に遭遇して複製が阻害された場合に、それまで協調して複製を進行してきたリーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応が各々どのような挙動を示すのかを知ることは、DNA 損傷と複製再開に働く修復機構の関係性の全貌を明らかにするために非常に重要である。リーディング鎖伸長反応は開始から終結まで一続きに行われるため、リーディング鎖上に DNA 損傷が存在すると複製は一時的に停止を余儀なくされる。そのため、複製再開のための修復機構が必要となるわけであるが、損傷に遭遇した際のリーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の uncoupling の度合いにより、用いられる修復機構も異なってくる可能性がある。例えば、TLS であれば uncoupling は生じていないことが望ましいと思われる。これに対し、鎖交換反応や複製フォーク後退を起こすためには、ラギング鎖伸長反応がある程度先行している必要がある。このように、損傷に遭遇した複製フォークの構造を知ることが、その後、複製フォークがどのような変化を経て正常複製再開に至るのかを知るための第一歩となる。

2-1 BP(-)損傷前後のリーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の uncoupling

本研究では、BP(-)損傷に遭遇して停止した複製フォークの形状を知るため、二次元ゲル電気泳動による観察を行った。その結果、BP(-)損傷の存在する複製フォークは全く進行していないことを示す spot 2 と、複製フォークが *terB* にまで至ったことを示す spot 4 との間に、単一の spot (spot 5)が検出された。この結果は、複製フォークがほぼ同一の場所で停止した鋳型が一定の割合で存在することを示すと考えている (図 10C,) 左)。ただし、BP(-)損傷を含む鋳型を用いた場合でも、spot 1'、spot 4'、spot 5 の強度を比較すると、全鋳型の 50%以上は spot 1'あるいは spot 4'の位置に検出されていると見積もられる。そのため、図 11 で示した repriming を介した複製再開や両鎖の uncoupling のために、BP(-)損傷遭遇後に複製フォークの進行が *terB* 近傍にまで至ったものの方が多数を占めるのではないかと考えられる。また、spot 5 で示されたように複製フォークが停止したものについても、これがリーディング鎖伸長反応が停止した瞬間にラギング鎖伸長反応も停止したものなのか、あるいは多少なりともリーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の uncoupling が起こり、ラギング鎖伸長反応のみがいくらか進行した状態で停止したものなのかは、この結果からだけでは判別できな

い。一方で、サザンブロットニングにより、損傷の 50 bp 上流に存在するプローブ B や損傷から 51 bp 下流に存在するプローブ C 領域の Okazaki fragment を検出した結果、Pol IV の添加の有無に関わらず、同程度に短くなった Okazaki fragment が検出された (図 12, Probes B, C, Lanes 2-4)。DNA 合成における主要なモデルとして trombone model が良く知られており (Alberts *et al.*, 1983)、このモデルでは鋳型ラギング鎖が DNA ループを形成して、それに沿ってリーディング鎖側と逆向きに DNA 合成が行われるため、ラギング鎖の新生鎖合成はリーディング鎖よりも多少遅れて進むと考えられている。そのため、当初の予測では、複製フォークの進行が全く uncoupling を起こさずに停止すると仮定した場合、BP(-)損傷によってリーディング鎖伸長反応が停止した段階で、ラギング鎖のプローブ B 領域はまだ複製されていないものと考えた。そしてプローブ C では、Pol IV を添加していない反応では Okazaki fragment は検出されず、Pol IV を添加した反応でのみ正常なサイズの Okazaki fragment が検出されると考えた。しかし、実際には、どちらのプローブについても、全ての反応において短いサイズの Okazaki fragment のみが検出されており、この結果は、プローブ C までに検出される範囲の Okazaki fragment は全て、少なくとも TLS 後に Pol IV が Pol III とスイッチングして複製の速度が正常化する以前に複製されたものであることを示していると考えられる。ゆえに、リーディング鎖伸長反応が BP(-)損傷に遭遇して停止してもラギング鎖伸長反応はすぐに停止せずに DNA 合成を継続し、両鎖の uncoupling が少なくともプローブ C 近傍にまで進んだ後に、複製フォークが停止した可能性が高い。

2-2 BP(-)損傷遭遇時における複製フォーク進行速度の変化

前述のように、プローブ B 及び C で短い Okazaki fragment が検出された理由は、複製フォークの進行速度と関連づけて論じることができる。すなわち、ラギング鎖の新生鎖合成はリーディング鎖よりも多少遅れて進行することから、リーディング鎖伸長反応停止時にはラギング鎖のプローブ B 領域はまだ複製されていないものと考えられる。そして、リーディング鎖伸長反応停止後にこの領域の複製が行われることとなるが、この時には既に、リーディング鎖伸長反応停止と共に複製フォークの進行速度も低下している。そのため、その速度低下が新たに合成された Okazaki fragment のサイズに反映され、プローブ B、C 領域の Okazaki fragment が短くなったと考えられる (図 16)。この短いサイズの Okazaki fragment 合成は Pol IV による TLS よりも前に起こるため、Pol IV 添加の有無に関らず、そのサイズは変化しない。そして、第三章、第二節、5 でも述べたように、プローブ D では Pol IV を添加した反応でのみ正常なサイズの Okazaki fragment が検出されていることから (図 12B, Probe D, Lane 3)、TLS の寄与により両鎖が協調した正常な進行速度での DNA 複製が再開した鋳型が一定の割合で存在することが分かる。よってここに、Okazaki fragment の解析の結果から、BP(-)損傷に遭遇した複製フォークが示す、「正常な速度での進行→損傷遭遇による進行速度低下→停止→正常な速度での進行再開」という複製の停止から回復に至るまでの一連の過程を、可視化することができたと言える。

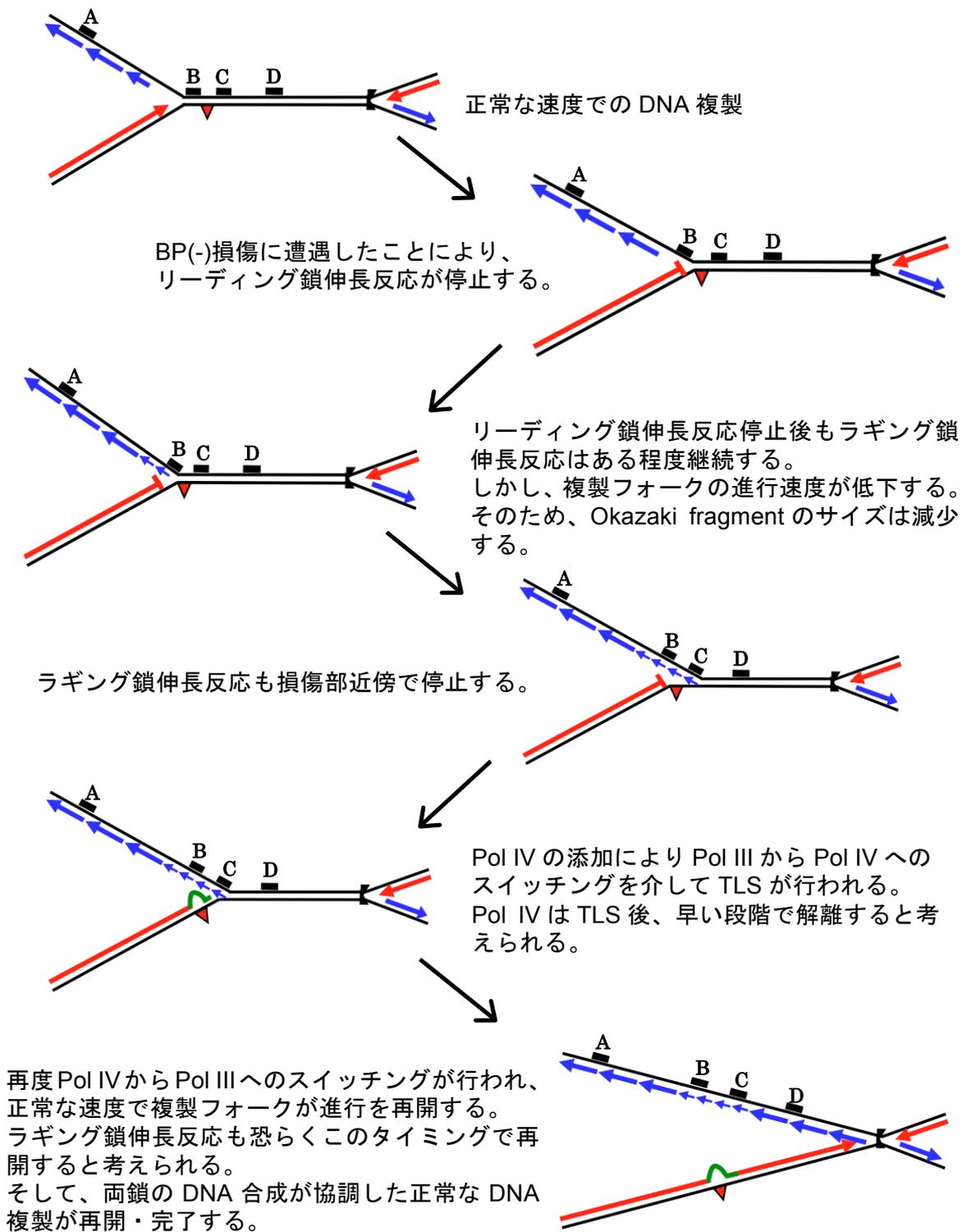


図 16 BP(-)損傷遭遇時の複製停止から再開に至る過程のモデル

リーディング鎖上の BP(-)損傷に遭遇した複製フォークにおいて、DNA 複製停止から TLS を介した複製再開に至るまでの複製フォークの挙動を示す。黒細線は鋳型 DNA、赤色の矢印はリーディング鎖新生鎖、連続的な青矢印はラギング鎖新生鎖を示す。青矢印の長さの差は Okazaki fragment のサイズを反映している。また、赤色三角は BP(-)損傷、緑線は Pol IV による DNA 合成箇所、短い黒太線はラギング鎖新生鎖検出に用いた各プローブの位置を示す。

2-3 リーディング鎖とラギング鎖の伸長反応の **uncoupling** から示唆されること

本研究により得られた、複製フォークがリーディング鎖上に存在する BP(-)損傷に遭遇することで、少なくとも 50 bp 以上リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応が **uncoupling** すると言う結果は、複製フォークにおいては、リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応が多少 **uncouple** した程度であれば、TLS により両鎖の複製が協調した正常な複製再開が可能であることを示している。一方で、二次元ゲル電気泳動の結果、BP(-)損傷を含む鋳型を用いた場合、Pol IV を添加していなくても少なくとも半数以上の鋳型は *terB* 近傍までフォークの開裂が進んでいることが示された。そのうちの一部は **repriming** により複製再開したものであると考えられるが、図 11 の結果が示すように **repriming** の割合は決して高く無いことから、**uncoupling** をきっかけとして、ラギング鎖合成がどこまで継続したかは不明であるものの、複製フォークの開裂が *terB* 近傍まで至ったものはかなりの割合で存在すると考えられる。また、サザンブロットィングによる解析からも、**uncoupling** が少なくともプローブ D より下流にまで至った複製フォークの存在が観察された。こうした **uncoupling** が起こってしまったものについては、例えば **uncoupling** した複製フォークが複製終結点である *terB* にまで到達していない状況で TLS が行なわれたとして、その後正常な DNA 合成は再開し得るのか、あるいはそもそも、TLS によるリーディング鎖伸長反応再開すら行えるのか不明である。本研究で鋳型として用いたプラスミドは損傷から *terB* までが約 1.8 kb と長くは無いため、**uncoupling** した複製フォークの多くが複製終結にまで至っているように見えるが、これに比べて染色体はサイズが巨大であることから、実際の細胞内では、**uncoupling** したラギング鎖伸長反応はいずれ停止すると考えられる。また以前、樋口らが、脱塩基損傷を含む鋳型を用いて *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製系による解析を行ったところ、両鎖の DNA 合成が **uncoupling** した場合、複製フォークの進行が *terB* にまで至ることは殆どなく、損傷部位から 1 kb 程度進行したところで停止すると言う結果が示されている(Higuchi *et al.*, 2003)。仮に、このように 1 kb 以上にわたる **uncoupling** が起こった後に複製フォークの進行が停止した鋳型で、TLS を介したリーディング鎖伸長反応再開が起こったとしても、複製を完了させるためには後にラギング鎖での DNA 合成も再開する必要がある。しかし、こうした大きな **uncoupling** を起こした鋳型であってもラギング鎖伸長反応の再開は可能であるのか、また、仮にラギング鎖伸長反応が再開したとしても、両鎖の協調までもが回復するのかは不明である。もし、今後の解析により、どの程度の **uncoupling** であれば TLS による両鎖の協調した正常な複製再開が可能かを知ることができれば、細胞内で TLS が他の複製再開機構と比較してどこまで有用な機構であるのか、あるいはどのように使い分けられているのかを考察する一つの材料になると考えられる。

また、二次元ゲル電気泳動による解析において、複製フォークの進行が一度完全に停止したと考えられる spot 5 の強度が Pol IV 添加により減少し、TLS により複製が再開・終結したと考えられる spot 1”及び spot 4”の強度が増加していたことは、複製が一度完全に停止した複製フォークではすぐに複製装置の崩壊や再構築が起こる訳ではな

く、TLS を介した DNA 複製再開が可能な状態で保たれていることが示唆される。また、リーディング鎖合成についてのみの結果であるが、Pol IV 添加後 15 分間反応させた複製産物から検出された複製停止産物の量が、Pol IV 添加前の 5 分間に蓄積した複製停止産物量より減少していたと言う結果も得られている(図 9B, Lane 7, 11)。今後、複製フォーク停止後の経過時間がどの程度までであれば、TLS による正常な複製再開が可能であるのかを調べることで、複製停止後の複製フォーク構造の持続時間なども明らかにしたいと考えている。

一方で、先に少し述べた、以前本研究室の樋口によって行われた、リーディング鎖上に脱塩基損傷を付加した鋳型を用いて DNA 複製停止時の複製フォークの形状を観察した研究では、二次元ゲル電気泳動による複製フォーク形状の解析の結果、脱塩基損傷に遭遇したことで大きな uncoupling を伴わずに複製フォークが停止したものを示すと考えられるスポットの先に、隣接して複数のスポットが断続的に検出された。一方で複製フォークが *terB* にまで到達したことを示す spot 1' や spot 4' にあたるスポットはあまり強く検出されなかった(Higuchi *et al.*, 2003)。この結果は、多くの複製フォークが損傷遭遇後すぐには停止せず、ある程度進行を続けた後、一定の範囲内で幾つかのポイントに分かれて停止したことを示すと考えられる。また、殆どの進行を継続した複製フォークは *terB* にまで至ることなく停止している。一方、本研究では、spot 1'、spot 4'、spot 5 が共に強く検出され、それ以外の spot は殆ど検出されなかった。この結果は、損傷に遭遇した複製フォークのうち停止するものは比較的すぐにほぼ同一の場所で停止し、停止しなかったものは *terB* 近傍にまで達したことを示唆する。この先行研究と本研究における結果の差異は、同じ一塩基の DNA 損傷と言う点では同じであっても、その損傷の種類によって複製フォークの動態に差が生じる可能性を提示している。そして、これが細胞内に存在する多様な修復機構の使い分けに影響を与えている可能性が考えられる。

3. 細胞内における TLS の働き方

実際の細胞内において、TLS はどの程度、どのような形で複製再開に寄与しているのでしょうか。序論でも述べたように、*in vivo* において TLS が複製再開機構として機能している直接的な証拠を得ることは難しい。しかし、TLS の働き方についての示唆を得ることができる研究も存在している。*in vivo* における単一の損傷に対し、エラープロンな損傷回避機構である TLS と、損傷のない姉妹染色体を利用したエラーフリーな損傷回避機構の総称である damage avoidance (DA) (Courcelle and Hanawalt, 2003, Zhang and Lawrence, 2005, Rudolph *et al.*, 2007, Karras and Jentsch, 2010, Daigaku *et al.*, 2010)が、どれ位の割合で使い分けられているかの検証が行われた解析では、用いられる TLS 型 DNA ポリメラーゼは Pol II あるいは Pol V となるものの、細胞内で行われた損傷回避のうち約 3.2% が TLS を介していると判断された(Pages *et al.*, 2012)。更に、TLS で回復しきれなかった細胞の DA による回復はあり得るが、その逆は起こらない

ことも示唆されている。これらのことから、*in vivo*において TLS は、他の修復機構に先立って、複製フォークの構造が保たれているうちに損傷を回避して DNA 複製を継続するために、最初に用いられる機構であるのかもしれない。ただし、その効率は必ずしも高くはないのかもしれない。また、DA と TLS が同時期に細胞内で行われているのであれば、DA と TLS がどのように使い分けられているのかも不明である。更に、この解析において、DA とは突然変異を生じさせない損傷回避機構の総称として用いられているが、その中には様々な形の修復機構が含まれると考えられ、そのメカニズムはまだ殆ど分かっていない。更に、使い分けと言う点では、本研究における *in vitro* の反応系の中ですら、TLS と repriming という二つの複製再開経路が存在していることが示された。この二つがどのように使い分けられたのかについても不明であるが、このことから、複製フォークの状態により多様な複製再開機構や修復機構が細かく使い分けられているのではないかと考えられる。

一方で、単一の BP(-)損傷をプラスミド上に挿入し、これを大腸菌に組み込んでこの損傷が細胞に及ぼす影響を観察した実験から、BP(-)損傷により SOS 応答は誘導されず、損傷に遭遇した複製フォークの多くはエラーフリーに複製が再開されるものの、約 3%は Pol IV 依存的に、おそらく TLS を介した複製再開が行われたことを示す結果が得られている(Fuchs 教授との personal communication)。このことは、実際に細胞内で Pol IV による TLS が正常時に行われ、TLS が複製再開に寄与することを強く示唆している。

細胞内では、DNA 損傷によりリーディング鎖伸長反応が停止すると、損傷の種類や細胞内の状況により、様々な複製再開機構が使い分けられていると考えられる。リーディング鎖伸長反応とラギング鎖伸長反応の大幅な uncoupling が生じることは既に示されており(Higuchi *et al.*, 2003, Pagès and Fuchs, 2003)、このような場合には鎖交換反応や複製フォーク後退といった機構を用いた複製再開が図られると考えられる。あるいは、ラギング鎖が先行することでリーディング鎖側に 1 kb を超える一本鎖 DNA 領域が露出することとなり、これは RecA を活性化するために十分な長さであることから(Sutton *et al.*, 2000, Friedberg *et al.*, 2006)、SOS 応答が誘導される場合もあると考えられる。また、リーディング鎖伸長反応が DNA 損傷により阻害されたとしても、ラギング鎖伸長反応が先行した後、損傷より先に PriC を初めとする一連のタンパク質が損傷複製装置の再構築を行うことで、小さい一本鎖 DNA の gap を残して複製フォークは正常に進行し続ける場合や(Langston and O'Donnell, 2006, Lehmann and Fuchs, 2006, Heller and Marians, 2006)、その過程すら経ずに repriming より複製フォークの進行が再開する場合も存在する。TLS は、このような多種多様な複製再開機構が存在する細胞内において、DNA 損傷により進行を阻害された複製フォークが損傷の種類や細胞内環境に依存して特定の構造をとった際に使い分けられる複製再開機構の一つなのであろう。

謝辞

本研究を行うにあたり、原核生物分子遺伝学研究室、真木寿治教授には有意義な議論や適切な御助言を賜ったのみならず、科学者として取り組む姿勢や考え方を丁寧に御指導頂きました。ここに心より御礼申し上げます。また、真木寿治教授との議論を通じ、研究の楽しさを知ることができました。更には、研究のみでなく、今後の進路などにつきましても適切なお助言を頂いておりますこと、深く感謝致します。

同研究室の真木智子助教、諸先輩方、並びに府川奈美秘書、安田倫子前秘書には、本研究に関する有意義な議論に加え、研究環境の設備等への御尽力に対し、御礼申し上げます

同研究室の秋山昌広准教授には、研究室への所属以来、基礎的な実験手法から、研究を行う上での基本的な姿勢、考え方をご指導頂きました。更に、有意義な議論やお助言を頂きましたこと、深く感謝致します。

同研究室の古郡麻子助教には、生化学実験の手法ならびに研究に対する考え方や姿勢等についての細やかで丁寧なお指導、有意義な議論、並びに適切なお助言を頂きました。いつも励まし、温かく、そして忍耐強く見守って下さったことで、研究者としての力を身につけることができました。公私にわたり常に気にかけて頂き、様々な温かいお言葉や叱咤激励を頂いたこと、心から感謝致します。

本研究を進めるにあたり、*oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応に必須な、DnaA、HU、GyraseA、GyraseB タンパク質を分与して下さった九州大学の片山勉教授、TLS 解析のためのプラスミドである pMOL7-BP(-)ならびに pMOL7-control を作製・分与して下さったフランス国立科学センター(CNRS)の Robert. P. Fuchs 教授に、深く感謝致します。Robert. P. Fuchs 教授には、本研究室滞在時に複数回に渡り、有意義な議論や適切なお助言を頂きましたことにつきましても、深く感謝致します。

また、本研究に関する有意義な議論に加え、暖かい励ましの言葉を頂いた原核生物分子遺伝学研究室内の学生の皆様に感謝致します。特に、同期として博士後期課程在籍中苦楽を共にし、大変お世話になった Lai Pey Jiun 氏、及び既に卒業しておりますが、修士課程の2年間を同期として苦楽を共にし、卒業された後も、現在に至るまで私を励まし、温かく見守って下さった栃尾綾子氏、中島崇皓氏、西川義人氏、妻鹿香奈絵氏、森哲也氏には深く感謝致します。

最後に、今日に至るまで、経済面でも精神面でも私を支えてくれた家族に深く感謝致します。

池田 美央

参考文献

Alberts, B.M., Barry, J., and Bedinger, P., Formosa, T., Jongeneil., C.V., and Kreuzer, K.N. (1983) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 655-668

Bárcena, M., Ruiz, T., Donate, L.E., Brown, S.E., Dixon, N.E., Radermacher, M., and Carazo, J.M. (2001) The DnaB. DnaC complex: a structure based on dimers assembled around an occluded channel. *EMBO J.* 20(6), 1462-1468

Bacher-Reuven, N., Arad, G., Maor-Shoshani A., and Livneh, Z. (1999) The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J Biol Chem.* 74, 31763-6

Bonner, C.A., Randall, S.K., Rayssiguler, C., Radman, M., Eritja, R., Kaplan, B.E., McEntee, K., and Goodman, M.F. (1988) Purification and characterization of an inducible *Escherichia coli* DNA polymerase capable of insertion and bypass at abasic lesions in DNA. *J. Biol. Chem.* 263, 18946-18952

Courcelle, J., and Hanawalt, P.C. (2001) Participation of recombination proteins in rescue of arrested replication forks in UV-irradiated *Escherichia coli* need not involve recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8196-8202

Courcelle, J., and Hanawalt, P.C. (2003) RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks. *Annu. Rev. Genet.* 37, 611-646.

COX, M.M. (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu. Rev. Genet.* 35, 53-82

Daigaku, Y., Davies, A.A., and Ulrich, H.D. (2010) Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. *Nature* 465, 951-955.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., and Ellenberg er, T. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd edition, ASM Press. Washington, DC.

Fuchs, R.P., and Fujii, S. (2007) Translesion synthesis in *Escherichia coli*: lessons from the NarI mutation hot spot. *DNA Repair* 6, 1032-1041

Fujii, S., Akiyama, M., Aoki, K., Sugaya, Y., Higuchi, K., Hiraoka, M., Saitoh, N., Yoshiyama, K., Ihara, K., Seki, M., Ohtsubo, E., and Maki, H. (1999) DNA replication errors produced by the replicative apparatus of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 289, 835-850

Funnell, B.E., Baker, T.A., and Kornberg, A. (1986) Complete enzymatic replication of plasmid containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* 261, 5616-5624

Furukohri, A., Goodman, M.F., and Maki, H. (2008) A dynamic polymerase exchange with *Escherichia coli* DNA polymerase IV replacing DNA polymerase III on the sliding clamp. *J. Biol. Chem.* 283, 11260-11269

Goodman, M.F. (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 17-50

Gruz, P., Pisani, F.M., Shimizu, M., Yamada, M., Hayashi, I., Morikawa, K., and Nohmi, T. (2001) Synthetic activity of Sso DNA polymerase Y1, an archeal DinB-like DNA polymerase, is stimulated by processivity factors proliferating cell nuclear antigen and replication factor C. *J. Biol. Chem.* 276, 47394-47401

Hanawalt, P.C., Ford, J.M., and Lloyd, D.R. (2003) Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancers. *Mutat. Res.* 544, 107-114

Heller, R.C., and Marians, K.J. (2006) Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature* 439, 557-562

Heltzel, J.M., Maul, R.W., Scouten Ponticelli, S.K., and Sutton, M.D. (2009) A model for DNA polymerase switching involving a single cleft and rim of the sliding clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12664-12669

Huffman, J.L., Sundheim, O., and Tainer, J.A. (2005) DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. *Mutat. Res.* 577, 55-76

Hiasa, H., and Marians, K.J. (1994) Primase couples leading- and lagging-strand DNA synthesis from *oriC*. *J. Biol. Chem.* 269, 6058-6063

Hiasa, H., and Marians, K.J. (1999) Initiation of bidirectional replication at the chromosome origin is directed by the interaction between helicase and primase. *J. Biol. Chem.* 274,

27244-27248

Higuchi, K., Katayama, T., Iwai, S., Hidaka, M., Horiuchi, T., and Maki, H. (2003) Fate of DNA replication fork encountering a single DNA lesion during *oriC* plasmid DNA replication in vitro. *Genes to cells* 8, 437-449

Indiani, C., McInerney, P., Georgescu, R., Goodman, M.F., and O'Donnell, M. (2005) A sliding-clamp toolbelt binds high- and low- fidelity DNA polymerase simultaneously. *Mol. Cell* 19, 805-815

Jarosz, D.F., Godoy, V.G., Delaney, J.C., Essigmann, J.M., and Walker, G.C. (2006) A single amino acid governs enhanced activity of DinB DNA polymerases on damaged templates. *Nature* 439, 225-228

Johnson, A., and O'Donnell, M. (2005) Cellular DNA replicases : components and dynamics at the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 283-315

Kaguni, J.M. (2006) DnaA: controlling the initiation of bacterial DNA replication and more. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 351-375

Karras, G.I., and Jentsch, S. (2010) The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell* 141, 255–267.

Katayama, T., Crooke, E., and Sekimizu, K. (1995) Characterization of *Escherichia coli* DnaAcos protein in replication systems reconstituted with highly purified proteins. *Mol. Microbiol.* 18, 813-820

Kim, S., Dallmann, H.G., McHenry, C.S., and Marians, K.J. (1996) Tau couples the leading- and lagging-strand polymerases at the *Escherichia coli* DNA replication fork. *J. Biol. Chem.* 271, 21406–21412

Kim, S.R., Maenhaut-Michel, G., Yamada, M., Yamamoto, Y., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T., and Ohmori, H. (1997) Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13792-13797

Kim, S.R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P., and Nohmi, T. (2001) Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encode DNA PolIV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics* 266, 207-215

- Kobayashi, T., Hidaka, M. and Horiuchi, T. (1989) Evidence of a *ter* specific binding protein essential for the termination reaction of DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 8, 2435–2441
- Koehl, P., Burnouf, D., and Fuchs, R.P. (1989) Construction of plasmids containing a unique acetylaminofluorene adduct located within a mutation hot spot. *J. Mol. Biol.* 207, 355-364
- Kornberg, A., and Baker, T.A. (1992) *DNA Replication*, 2nd edition Freeman, New York, NY.
- Lambert, I.B., Napolitano, R.L., and Fuchs, R.P. (1992) Carcinogen-induced frameshift mutagenesis in repetitive sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1310-1314
- Langston, L.D., and O'Donnell, M. (2006) DNA replication: keep moving and don't mind the gap. *Mol. Cell* 23, 155-160
- Lehmann, A.R., and Fuchs, R.P. (2006) Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. *DNA repair (Amst)* 5, 1495-1498
- Lenne-Samuel, N., Wagner, J., Etienne, H., and Fuchs, R.P. (2002) The processivity factor beta controls DNA polymerase IV traffic during spontaneous mutagenesis and translesion synthesis *in vivo*. *EMBO Rep.* 3, 45-49
- Li, X., and Marians, K. J. (2000) Two distinct triggers for cycling of the lagging strand polymerase at the replication fork. *J. Biol. Chem.* 275, 34757-34765
- Leu, F.P., Georgescu, R., and O'Donnell, M. (1994) Mechanism of the *E.coli* tau processivity switch during lagging-strand synthesis. *Mol. Cell* 11, 315-327
- Lusetti, S.L., and COX M.M. (2002) The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 71-100
- Marians, K.J. (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 673-719
- Masai, H., and Arai, K. (1996) Mechanism of primer RNA synthesis and D-loop/Rloop dependent DNA replication in *Escherichia coli*. *Biochimie.* 78, 1109-1117
- McHenry, C.S. (2003) Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit

arrangement and functional consequences. *Mol. Microbiol.* 49, 1157-1165

Michel, B., Ehrlich, S.D., and Uzest, M. (1997) DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J.* 16, 430–438

Napolitano, R.L., Fuchs, R.P. (1997) New strategy for the construction of single stranded plasmids with single mutagenic lesions. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 667-671

Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., and Fuchs, R.P. (2000) All three SOS-inducible DNA polymerase (PolIII, PolIV and PolV) are involved in induced mutagenesis *EMBO J.* 19, 6259-6265

Nohmi, T. (2006) Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 231-253

O'Donnell, M. (2006) Replisome architecture and dynamics in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 281, 10653-10656

Ogi, T., Kato, T.Jr., Kato, T., and Ohmori, H. (1999) Mutation enhancement by DINB1, a mammalian homologue of the *Escherichia coli* mutagenesis protein dinB. *Genes Cells.* 4, 607-618

Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R. P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C. W., Livneh, Z. Nohmi T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G.C., Wang, Z., and Woodgate, R. (2001) The Y-Family of DNA Polymerases. *Mol Cell* 8, 7-8

Ozaki, S., and Katayama, T. (2009) DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin. *Plasmid.* 62, 71-82

Pagès, V., and Fuchs, R.P. (2003) Uncoupling of leading- and Lagging-strand DNA replication during lesion bypass *in vivo*. *Science* 300, 1300-1303

Pagès, V., Mazón, G., Naiman, K., Philippin, G., and Fuchs, R.P. (2012) Monitoring bypass of single replication-blocking lesions by damage avoidance in the *Escherichia coli* chromosome. *Nucleic Acids Research* 40, 9036-9043

Rudolph, C.J., Upton, A.L., and Lloyd, R.G. (2007) Replication fork stalling and cell cycle arrest in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 21, 668–681.

- Shen, X., Sayer, J.M., Kroth, H., O'Donnell, M., Woodgate, R., Jerina, D.M., Goodman, M.F. (2002) Efficiency and accuracy of SOS-induced DNA polymerases replicating benzo [a] pyrene-7, 8-diol 9, 10-epoxide A and G adducts. *J. Biol. Chem.* 277, 5265-5274
- Stukenberg, P.T., Turner, J., and O'Donnell, M. (1994) An explanation for lagging strand replication: polymerase hopping among DNA sliding clamps. *Cell* 78, 877-887
- Sutton, M.D., Smith, B.T., Godoby, V.G., and Walker G.C. (2000) The SOS response: recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance, *Annu Rev. Genet.* 34, 479-497
- Tang, M.J., Shen, X., Frank, E.G., O'Donnell, M., Woodgate, R., and Goodman, M.F. (1999) UmuD ' C-2 is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8919-8924
- Tougu, K., Peng, H., and Marians, K.J. (1994) Identification of a domain of *Escherichia coli* primase required for functional interaction with the DnaB helicase at the replication fork. *J. Biol. Chem.* 269, 4675-4682
- Tougu, K., and Marians, K.J. (1996) The interaction between helicase and primase sets the replication fork clock. *J. Biol. Chem.* 271, 21398-21405
- Uchida, K., Furukohri, A., Shinozaki, Y., Mori, T., Ogawara, D., Kanaya, S., Nohmi, T., Maki, H., and Akiyama, M. (2008) Overproduction of *Escherichia coli* DNA polymerase DinB (PolIV) inhibits replication fork progression and is lethal. *Mol Microbiol.* 70, 608-622
- Van Der Ende, A., Baker, T.A. Ogawa, T. and Kornberg, A. (1985) Initiation of enzymatic replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome: primase as the sole priming enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3954-3958
- Wagner, J., Gruz, P., Nohmi, T., and Fuchs, R.P. (1999) The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA PolIV, involved in mutagenesis. *Mol. Cell* 4, 281-286
- Wagner, J., Fujii, S., Gruz, P., Nohmi, T., and Fuchs, R.P. (2000) *EMBO Rep.* 1, 484-488
- Yang, W., and Woodgate, R. (2007) What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15591-15598

Yeels, J.T., and Mariani, K.J. (2011) The *Escherichia coli* replisome is inherently DNA damage tolerant. *Science* 334, 235-238

Zhang, H. and Lawrence, C.W. (2005) The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15954–15959.

沙魚川公子 (2008) ヌクレオチド除去修復による自然突然変異の誘発経路 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 博士論文