

大腸菌 DNA polymerase I の  
細胞内機能における  $\beta$ -clamp の役割

山本崇史

奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 原核生物分子遺伝学講座  
( 真木 寿治 教授 )

平成 28 年 8 月 10 日 提出

所属 (主指導教員)	原核生物分子遺伝学研究室 (真木寿治 教授)		
氏名	山本崇史	提出	平成 28 年 8 月 4 日
題目	大腸菌 DNA polymerase I の細胞内機能における $\beta$ -clamp の役割		

生物は、遺伝情報の複製を繰り返し、種としての繁栄を目的としている。しかし、遺伝情報を伝達する物質である DNA は、常に DNA 損傷の危機にさらされている。生物にとって、自然突然変異による遺伝的变化は、進化の過程で必要であり、種の多様性をもたらす一方で、生存に不利な致命的な欠陥を引き起こすことがある。これらのことから、自然突然変異を抑制する DNA ポリメラーゼの校正機能や DNA 修復機能を明らかにすることは、生物の恒常性の解明につながる重要な意義があり、本研究では、DNA 複製や DNA 修復に関わる DNA ポリメラーゼ I (Pol I) の自然突然変異に対する役割について着目した。

Pol I は 3 つのドメインから構成され、それぞれ、ポリメラーゼ活性による DNA 合成、3'-5' エキソヌクレアーゼ活性による校正機能、5'-3' エキソヌクレアーゼ活性による岡崎断片のプライマー除去の働きを担っている。Pol I の生理機能としては、DNA 複製では、岡崎断片のプロセッシングやプラスミド複製の開始機構に働き、DNA 修復では、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復において修復 DNA 合成を行うことが知られている。Pol I は岡崎断片のプロセッシングにおいて、プライマー除去と同時に約 10 塩基の DNA 合成を行う。これは、染色体 DNA 複製全体から見ると約 0.5% の DNA 合成に相当し、Pol I が DNA 複製で担当する部分は極めて小さく限定されている。しかし、当研究室において、校正機能を欠損した Pol I を発現する大腸菌 *polA* 変異株では著しく自然突然変異頻度が上昇するという現象が見いだされた。染色体 DNA 複製に対しては貢献度の低い Pol I が、なぜこのような著しい変異頻度の上昇を引き起こすことができるのか、非常に興味深い。それに対して、ポーランドの研究グループが、校正機能欠損 Pol I 株は変異頻度を上昇させるが、その上昇は極めて小さいことを報告した。そこで、本研究では、当研究室で観察された校正機能欠損 Pol I 株が変異頻度を著しく上昇させた原因の解明を目的として研究を開始した。

当研究室とポーランドのグループの大腸菌株の違いは、当研究室の校正機能欠損 Pol I 株が変異型 *polA* 遺伝子を多コピー数プラスミド上に持つことに対し、ポーランドグループの株は染色体上の *polA* 遺伝子の変異株ということである。本研究で新たに染色体上の *polA* が校正機能欠損変異を持つ大腸菌を作成し、当研究室の校正機能欠損 Pol I 株と詳細な比較を行った。その結果、変異型 Pol I の過剰発現が、著しい変異頻度の上昇を起こしていたことが明らかになった。さらに、複製エラーを特異的に修復するミスマッチ修復が欠損した *mutS* 変異株との二重変異株の解析から、校正機能欠損 Pol I 株の変異頻度の上昇は、染色体 DNA 全体の複製エラーの発生頻度の増加に起因することが分かった。Pol I が働く DNA 合成領域は染色体 DNA の極く一部であることから、このような変異頻度の上昇を引き起こすには、発現レベルが高い場合には染色体 DNA 複製に働く Pol III に替わって、Pol I が染

染色体 DNA 複製の広範な領域を合成することが可能となるのではないかと考えた。DNA 複製では、Pol III は  $\beta$ -clamp と結合して DNA 複製を行う。Pol I は  $\beta$ -clamp と結合することは明らかにされていないが、Pol I は  $\beta$ -clamp と結合して DNA 複製に参画する可能性が考えられる。そこで、Pol I の中に  $\beta$ -clamp と結合する部位に共通の配列(QL(S or D)LF)の探索を行った。その結果、587 QTILF 591 を候補として見だし、この配列が原核生物の広範な種の Pol I をコードする遺伝子に保存されていることを明らかにした。さらに、Yeast two-hybrid を用いて、Pol I の QTILF が  $\beta$ -clamp と相互作用することを確認した。また、590、591 番の LF を AA に置換すると、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が消失することを利用して、過剰発現した LF $\rightarrow$ AA 置換型の校正機能欠損 Pol I 株の変異頻度を測定したところ、野生株と同程度のレベルにまで低下していることがわかった。以上の結果から、校正機能欠損 Pol I 株の変異頻度の上昇は、Pol I の細胞内濃度が野生株の 2-4 倍程度に上昇した場合に、Pol I が  $\beta$ -clamp を介して Pol III と置き換わることにより、染色体 DNA の広範な部分が校正機能を欠損した Pol I により複製されることによると結論した。

今回の研究により、Pol I が  $\beta$ -clamp と相互作用することが判明したので、自然突然変異に影響を与える人為的な過剰発現ではなく、通常の発現レベルでの Pol I と  $\beta$ -clamp との相互作用の生理的意義について調べることにした。染色体上の *polA* の LF $\rightarrow$ AA 置換型変異株を作成して、解析を進めた。その結果、LF $\rightarrow$ AA 置換型変異株の培養では、*polA1* 株と同程度に細胞増殖速度が低下することがわかり、*polA1* 株は岡崎断片の蓄積が報告されていることから (Okazaki *et al.*, 1971)、岡崎断片のプロセシングの遅延が、細胞増殖速度の低下につながることを示唆された。このことは、岡崎断片のプロセシングに Pol I が働く際には  $\beta$ -clamp との相互作用が重要な役割を果たしている可能性を示唆する。また、ColE1 型プラスミドの形質転換実験の結果より、ColE1 型プラスミドの複製開始に必要な Pol I による DNA 鎖伸張には  $\beta$ -clamp との相互作用は必要ではないことが明らかになった。また、LF $\rightarrow$ AA 変異導入により、Pol I のポリメラーゼ活性が失活していないかを確認するため、精製した変異型 Pol I のポリメラーゼ活性を測定したところ、野生型 Pol I と同程度の活性が見られた。さらに、紫外線や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の感受性試験の結果から、ヌクレオチド除去修復と塩基除去修復の両方に Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

原核生物、真核生物を問わず、細胞は複数の DNA ポリメラーゼを有することにより、DNA 複製や DNA の維持の様々なプロセスで多様なやり方での DNA 合成を可能にしている。原核生物の  $\beta$ -clamp と、それと同様の働きをする真核生物の PCNA は、複数種の DNA ポリメラーゼの DNA 合成の様態を多様化する上で重要である。これまで、真核生物では Pol  $\delta$  と FEN1 が PCNA との相互作用を介して岡崎断片のプロセシングが進行するのに対して、原核生物では、Pol I が単独で行うとされてきた。また、ヌクレオチド除去修復と塩基除去修復の修復合成でも、真核生物では PCNA が関与するが、原核生物では Pol I が単独で行い、 $\beta$ -clamp は関与しないと考えられてきた。本研究により、原核生物での岡崎断片のプロセシングおよびヌクレオチド除去修復と塩基除去修復の修復合成には Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が重要な役割を果たしていることが示され、DNA ポリメラーゼの特異性は異なっても、これらの生理機能には、原核生物と真核生物の両方に共通の仕組みとして、DNA ポリメラーゼと  $\beta$ -clamp/PCNA の相互作用が不可欠であることが示唆された。

## 目次

### 第 1 章 序論 . . . . . 7-18

- 1 自然突然変異の発生と抑制のしくみ
- 2 大腸菌の DNA ポリメラーゼ
- 3 大腸菌 DNA ポリメラーゼの機能による分類
- 4 DNA clamp
- 5 原核生物と真核生物の DNA ポリメラーゼの比較
- 6  $\beta$ -clamp と相互作用する DNA ポリメラーゼの結合配列
- 7 Pol I が  $\beta$ -clamp と相互作用しないと考えられていた理由
- 8 Pol I の構造と機能
- 9 校正機能欠損 Pol I 変異株の自然突然変異頻度
- 10 本研究の目的

### 第 2 章 材料と方法 . . . . . 19-34

- 1 菌株
- 2 プラスミド
- 3 P1 ファージ
- 4 試薬・酵素・培地
- 5 プラスミド DNA の調製
- 6 アガロースゲル電気泳動
- 7 プラスミドによる形質転換
- 8 P1 ファージを用いた形質導入
- 9 In-fusion プラスミドクローニング
- 10 One-step gene disruption
- 11 部位特異的変異導入法

- 12 Pol I と  $\beta$ -clamp の相互作用を阻害した LF $\rightarrow$ AA 変異株の作製
- 13 DNA ligation
- 14 遺伝子解析
- 15 突然変異頻度測定
- 16 SDS-PAGE
- 17 ウェスタンブロッティングによるタンパク質の検出
- 18 ODYSSEY イメージングシステムを用いた Pol I の定量
- 19 Pol I の精製
- 20 Pol I の DNA ポリメラーゼ活性の測定
- 21 Yeast two-hybrid システムによる  $\beta$ -clamp 結合部位の解析
- 22 紫外線感受性試験
- 23 ディスクアッセイを用いた過酸化水素感受性試験

### 第 3 章 結果 . . . . . 35-57

- 1 2 種類の校正機能欠損 Pol I 株の変異頻度の違いの原因
- 2 ウェスタンブロットによる Pol I の定量
- 3 ミスマッチ修復欠損株を用いたエラー発生源の探索
- 4 DNA 複製における Pol I による Pol III の置き換え
- 5 Pol I アミノ酸配列中の  $\beta$ -clamp 結合部位配列候補の探索
- 6 Yeast two-hybrid による  $\beta$ -clamp と Pol I の相互作用の確認
- 7  $\beta$ -clamp 結合阻害校の正機能欠損 Pol I 大量発現は変異頻度を著しく上昇させるのか？
- 8 Pol I の機能における Pol I と  $\beta$ -clamp の結合の重要性
- 9 Pol I と  $\beta$ -clamp の結合阻害による岡崎フラグメントプロセッシングへの影響
- 10 ColE1 型プラスミドの DNA 複製開始制御での Pol I の働きにおける  $\beta$ -clamp の役割
- 11 LF $\rightarrow$ AA 変異型 Pol I の DNA ポリメラーゼ活性測定

- 12 ヌクレオチド除去修復における Pol I と  $\beta$ -clamp の相互作用の役割
- 13 塩基除去修復における Pol I と  $\beta$ -clamp の相互作用の役割

## 第 4 章 考察 . . . . . 58-62

- 1 校正機能欠損 Pol I 過剰発現による突然変異頻度の著しい上昇の原因解明
- 2 真核生物、原核生物における岡崎フラグメントのプロセッシングでの DNA clamp の役割
- 3 真核生物、原核生物におけるヌクレオチド除去修復と塩基除去修復での DNA clamp の役割
- 4 大腸菌 DNA ポリメラーゼの  $\beta$ -clamp 結合阻害による影響
- 5 DNA ポリメラーゼ I と  $\beta$ -clamp の結合の重要性

## 謝辞 . . . . . 63

## 参考文献 . . . . . 64-66

# 第1章 序論

## 1. 自然突然変異の発生と抑制のしくみ

生物は、遺伝情報の複製を繰り返し、安定に自己の遺伝情報を維持し、子孫に正確に継承することが重要となる。しかし、遺伝情報を伝達する物質である DNA は、内的や外的の様々な要因による DNA 損傷の危機にさらされている。増殖する細胞では DNA 複製のエラーは避けることが不可能であり、正常な DNA 構造とは異なることから、DNA 複製エラーも DNA 損傷の一つに数えられている。これらの DNA 損傷は次の回の DNA 複製において突然変異に固定されるが、細胞は DNA ポリメラーゼの校正機能や各種の DNA 修復経路により、突然変異の発生を低いレベルに抑制している (図 1)。生物にとって、自然突然変異による変化は、進化につながり、種の多様性をもたらす一方で、生存に不利な致命的な欠陥を引き起こすことがある。これらのことから、自然突然変異を抑制する DNA ポリメラーゼの校正機能や DNA 修復機能の働きを明らかにすることは、生物の恒常性の解明につながる重要な意義があり、本研究では、DNA 複製や DNA 修復に関わる DNA ポリメラーゼ I (Pol I) の自然突然変異に対する役割について着目した。

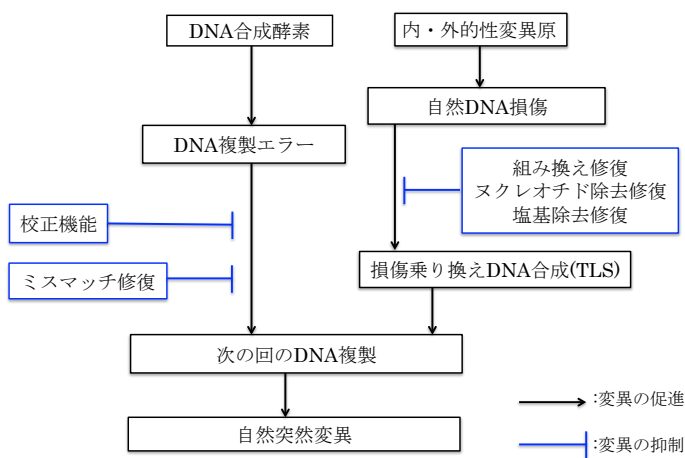


図1 自然突然変異の発生と抑制の分子機構

突然変異は、複製エラーもしくは内的・外的要因による DNA 損傷が修正されずに DNA 上に残り、次の複製にむかうことで DNA 上に固定され起こる。これら損傷に対して、DNA 修復機能が備わっている。

## 2. 大腸菌の DNA ポリメラーゼ

大腸菌には Pol I から Pol V までの 5 種類の DNA ポリメラーゼが存在している (表 1)。Pol III は DNA 複製を行うポリメラーゼで、一秒間に 1000 ヌクレオチドの DNA 合成を行うほど、非常に合成速度が早く、また DNA 合成の忠実度が最も高いポリメラーゼである。一度複製が始まると、Pol III が DNA 鎖から脱落せず、複製を続けるため、1 細胞当たりの分子数は

最も少ない 10 分子となる。Pol I は、岡崎フラグメントのプロセッシングや DNA 修復に働く。岡崎フラグメントのプロセッシングや DNA 修復では、Pol I は最大で 20 ヌクレオチドの合成しかおこさず、DNA 複製全体からみて、非常に小さな合成領域に働く。そのこともあり、Pol I の合成速度は一秒間に 10 ヌクレオチドと、Pol III に比べると、非常に合成速度の遅いポリメラーゼである。その代わりに、岡崎フラグメントのプロセッシングや DNA 修復など、働く機会が非常に多いため、1 細胞あたりの分子数は、全てのポリメラーゼの中で 1 番多い 400 分子もある。Pol II、Pol IV、Pol V は TLS ポリメラーゼと呼ばれ、損傷乗り越え合成に働く。損傷乗り越え合成は、DNA の損傷により複製がとまったとき、TLS Pol の Pol II、Pol IV、Pol V がポリメラーゼスイッチング反応により、Pol III を置き換えて DNA 複製を再開する (図 2)。また、これら TLS ポリメラーゼは、SOS 応答が起こることで発現レベルが上昇する DNA ポリメラーゼである。SOS 応答では、Pol I や Pol III の発現レベルは変化しない。

	遺伝子	役割	分子数/細胞 (平常時)	分子数/細胞 (SOS応答時)	活性中心の構造による分類
Pol I	<i>polA</i>	DNA修復 岡崎フラグメントのプロセッシング	400	400	A型
Pol II	<i>polB</i>	TLS	50	350	B型
Pol III	<i>dnaE</i> ( <i>dnaQ</i> etc)	DNA複製	10	10	C型
Pol IV	<i>dinB</i>	TLS	250	2500	Y型
Pol V	<i>umuC</i> <i>umuD</i>	TLS	15	200	Y型

表 1 大腸菌で働く DNA ポリメラーゼの特徴

大腸菌では Pol I から Pol V までの 5 種類の DNA ポリメラーゼが働いている。Pol I は岡崎フラグメントのプロセッシングやヌクレオチド除去修復や塩基除去修復などの DNA 修復に働き、Pol III は DNA 複製に働く。

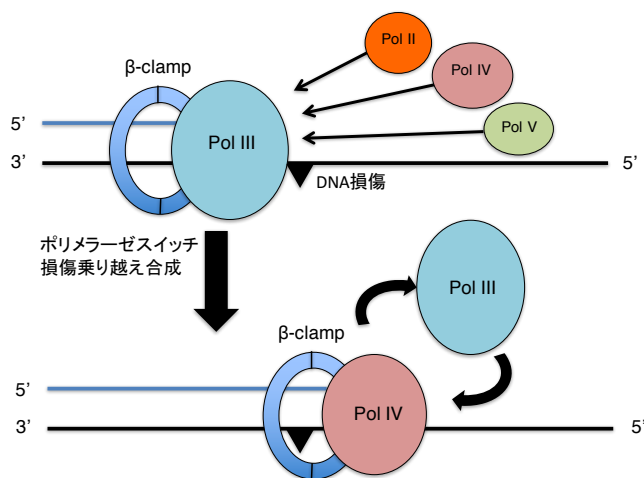


図 2 ポリメラーゼスイッチング反応



損傷乗り越え合成により、TLS ポリメラーゼが Pol III を置き換えるときに起こる反応である。ポリメラーゼスイッチング反応は、Pol II、Pol IV、Pol V が  $\beta$ -clamp を介して、Pol III と置き換わり、DNA 複製に参加する。

### 3. 大腸菌 DNA ポリメラーゼの機能による分類

これら特徴ある大腸菌の5つのポリメラーゼを細胞内での機能により分類すると、3種類にわけられる(表2)。複製型である Pol III は非常に大きな DNA 合成領域を合成しなくてはならないため、Pol III は非常に速い合成速度と高い忠実度に特化したポリメラーゼになっている。TLS 型である Pol II、Pol IV、Pol V は、複製が止まってしまったときに、Pol III を置き換えて損傷乗り越え合成を行う。そのため、複製が停滞し SOS 応答が起こった時に、これらの DNA ポリメラーゼは大量発現することで、Pol III を置き換えて役目を果たす。修復型の Pol I は、DNA 合成領域は小さいが、DNA 修復や岡崎フラグメントのプロセッシングでは多数の箇所働く必要があるため、ポリメラーゼの中では最も多く発現している。また、Pol I は1秒に10ヌクレオチドという遅い合成速度で働き、高い忠実度を持ったポリメラーゼとなっている。

#### 複製型 Pol III

DNA 合成速度は早い。(長大な染色体を短時間に複製する)  
発現量は低い。(限られた数の複製フォークでだけ働く)  
DNA 合成の忠実度は高い。(正確な遺伝情報を伝達する)

#### TLS 型 Pol II、Pol IV、Pol V

DNA 合成速度は遅い。(塩基対に依存しない合成が可能)  
SOS 応答時に大量発現する。(DNA 損傷応答としての一時的機能)  
一般に DNA 合成の忠実度は低い。(塩基対に依存しない合成が可能)

#### 修復型 Pol I

DNA 合成速度は遅い。(12塩基対あるいは1塩基対の修復合成)  
発現量は常に高い。(迅速な修復に対応する)  
DNA 合成の忠実度は高い。(正確な修復合成)

表2 大腸菌 DNA ポリメラーゼの機能による分類

複製型の Pol III は、合成速度が非常に早く、DNA 複製の大部分で機能する。TLS 型の Pol II、Pol IV、Pol V は、SOS 応答時に大量発現し、損傷乗り越え合成において Pol III を置き換えて DNA 複製の再開に関与する。修復型の Pol I は、岡崎フラグメントのプロセッシングや DNA 修復に働く。

## 4. DNA clamp

DNA clamp は、DNA 複製に関わるタンパク質であり、DNA ポリメラーゼを鋳型 DNA 鎖に固定し、DNA ポリメラーゼが鋳型となる DNA 鎖から脱落することなく連続合成を行うことを可能にする。他にも、DNA clamp は、DNA ポリメラーゼが鋳型 DNA やプライマーDNA に結合する際の見印となることや、複製型ポリメラーゼと TLS ポリメラーゼのポリメラーゼスイッチングの足場としても働く。また、DNA ポリメラーゼが DNA clamp と結合することで、DNA ポリメラーゼの活性が高まるといった効果が知られている。DNA clamp は、原核生物では  $\beta$ -clamp、真核生物では PCNA と呼ばれ、アミノ酸配列は原核生物と真核生物で異なっているが、構造的にはよく保存されており、二本鎖 DNA を取り囲むリング様構造を持つ。ただし、 $\beta$ -clamp は二量体、PCNA は三量体を形成している。DNA clamp は DNA 複製に必須のタンパク質であり、原核生物では、 $\beta$ -clamp が欠損すると、DNA 複製が行うことができず細胞死を引き起こす。また、真核生物では、細胞周期の S 期に PCNA が大量に発現することが知られており、分裂している細胞の核マーカーとして PCNA が用いられることが多い。

## 5. 原核生物と真核生物の DNA ポリメラーゼの比較

DNA ポリメラーゼは、大腸菌 Pol I が最初に発見され、その後、さまざまな DNA ポリメラーゼが発見されてきた。原核生物と真核生物では、異なった DNA ポリメラーゼが様々な役割を持って働いている。DNA 複製では、原核生物では Pol III がリーディング鎖、ラギング鎖の合成を行う。一方で、真核生物では、リーディング鎖を Pol  $\epsilon$  が、ラギング鎖を Pol  $\delta$  が DNA 複製を行う。DNA 複製では、原核生物、真核生物の両方ともに複製型 DNA ポリメラーゼが DNA clamp を必要としている。損傷乗り越え合成についても、原核生物では、Pol II、Pol IV、Pol V が行うことに対して、真核生物では、Pol  $\eta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ 、Pol  $\zeta$  が行う。損傷乗り越え合成においても、働く TLS ポリメラーゼは、原核生物、真核生物の両方で DNA clamp を必要としている。DNA 修復では、原核生物では、Pol I がヌクレオチド除去修復や塩基除去修復を行うことに対して、真核生物では、ヌクレオチド除去修復では Pol  $\epsilon$  もしくは Pol  $\delta$  が行い、塩基除去修復では Pol  $\epsilon$  もしくは Pol  $\delta$  が行う系と Pol  $\beta$  が行う系の 2 通りがある。DNA 修復では、原核生物で働く Pol I は DNA clamp を必要としないと考えられており、真核生物では、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復で、Pol  $\epsilon$  もしくは Pol  $\delta$  が働くときは、DNA clamp が必要であるが、塩基除去修復において Pol  $\beta$  が働くときは、DNA clamp が必要ではないということが知られている。岡崎フラグメントのプロセッシングでは、原核生物では、Pol I がニックトランスレーションすることに対して、真核生物では、Pol  $\delta$  がラギング鎖合成を行い、隣り合った岡崎フラグメントを掘り起こして合成をつづけ、飛び出した部分を Fen 1 が切り取ることで、岡崎フラグメントのプロセッシングが行われる。岡崎フラグメントのプロセッシングでは、原核生物では、Pol I は DNA clamp を必要とせず、DNA 合成すると考えられており、真核生物では、Pol  $\delta$  が DNA clamp と結合して DNA 合成していることが知られている。

(Georgescu *et al.*, 2014)。このように、原核生物と真核生物で、異なった働きや DNA clamp の必要性の違いが見られる DNA polymerase が存在している (表 3)。

原核生物		$\beta$ -clampの必要性	真核生物		PCNAの必要性
DNA複製	Pol III	あり	リーディング鎖 Pol $\epsilon$	あり	
			ラギング鎖 Pol $\delta$	あり	
TLS(損傷乗り越え合成)	Pol II, Pol IV, Pol V	あり	Pol $\eta$ , Pol $\iota$ , Pol $\kappa$ , Pol $\zeta$	あり	
DNA修復					
ヌクレオチド除去修復	Pol I	なし	Pol $\delta$ or Pol $\epsilon$	あり	
塩基除去修復	Pol I	なし	Pol $\delta$ or Pol $\epsilon$	あり	Pol $\beta$ なし
岡崎フラグメントのプロセッシング	Pol I	なし	Pol $\delta$ とFen1	あり	

表 3 原核生物と真核生物の DNA ポリメラーゼの比較

原核生物と真核生物では、異なった DNA ポリメラーゼが働いている。特徴的なことは、真核生物では、ほとんどの場合において DNA clamp が必要であることに対して、原核生物では、Pol I が働くときは、DNA clamp を必要としない。

## 6. $\beta$ -clamp と相互作用する DNA ポリメラーゼの結合配列

$\beta$ -clamp 結合部位の共通配列 (QL (S or D) LF) が明らかとなってから (Dalrymple *et al.*, 2001)、タンパク質の  $\beta$ -clamp 結合部位配列の探索研究が盛んとなった。 $\beta$ -clamp と相互作用する DNA ポリメラーゼは、Pol I を除いた Pol II、Pol III、Pol IV、Pol V で確認されている。それぞれの結合配列は、Pol II は 779 番から 783 番の QLGLF、Pol III は 920 番から 924 番の QADMF、Pol IV は 346 番から 351 番の QLVLGL、Pol V は 357 番から 361 番の QLNLFF である (Georgescu *et al.*, 2008, Dalrymple *et al.*, 2001, Bunting *et al.*, 2003, Patoli *et al.*, 2013)。他にも、DNA ポリメラーゼ以外では、DNA リガーゼやミスマッチ修復で働く MutS、MutL などでも  $\beta$ -clamp と相互作用することが知られている (Pandey *et al.*, 2016, Pillon *et al.*, 2011, Lopez *et al.*, 2006)。このように、 $\beta$ -clamp と相互作用するタンパク質は、DNA ポリメラーゼのみならず多くのタンパク質で確認されているが、Pol I は  $\beta$ -clamp と相互作用することが明らかになっていない。

## 7. Pol I が $\beta$ -clamp と相互作用しないと考えられていた理由

Pol I は  $\beta$ -clamp と相互作用することはないと考えられていた。それは、DNA clamp の役割

が、sliding clamp と言われているように「連続的な DNA 合成を補助する役割」として知られてきたからである。Pol I は DNA 合成において、12 塩基もしくは 1 塩基の合成しか行わないため、Pol III が行うような「連続的な合成」を行うことがないことから、 $\beta$ -clamp と相互作用することはないと考えられていた。また、Pol I は ColE1 型プラスミドの DNA 複製で必須な DNA 合成を行うが、そのとき Pol I は  $\beta$ -clamp と相互作用せず約 100 塩基の DNA 合成を行うことが知られていた (Wang *et al.*,2004)。このように、「連続的な合成」を行うために必要であると考えられていた  $\beta$ -clamp にとって、Pol I は  $\beta$ -clamp と相互作用することなく単独で働いていると考えられていた。しかし、本研究では、 $\beta$ -clamp の役割を「連続的な合成」とだけに捉えず、「足場としての利用」、「作用箇所への迅速なアクセスに利用」に着目し、Pol I は  $\beta$ -clamp と相互作用することを明らかとした。

## 8. Pol I の構造と機能

Pol I は 3 つのドメインから構成され、それぞれ、ポリメラーゼ活性による DNA 合成、3'-5' エキソヌクレアーゼ活性による校正機能、5'-3' エキソヌクレアーゼ活性による岡崎断片のプライマー除去の働きを担っている (図 3)。Pol I の生理機能としては、DNA 複製では、岡崎断片のプロセッシングや ColE1 型プラスミド複製の開始機構に働き、DNA 修復では、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復において修復 DNA 合成を行うことが知られている。

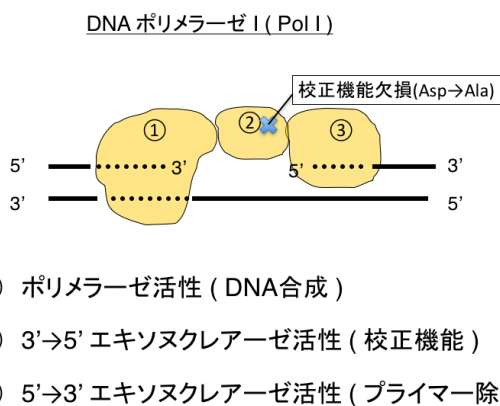


図 3 Pol I の構造と機能について

Pol I は、最も発現しているポリメラーゼであり、1 細胞当たり約 400 分子ある。ポリメラーゼ活性部位、3' -5' エキソヌクレアーゼ活性部位、5' -3' エキソヌクレアーゼ活性部位の 3 つのドメインから構成されている。

### 8A 岡崎フラグメントのプロセッシング

Pol I は岡崎フラグメントのプロセッシングにおいて、プライマー除去と同時に約 10 塩基の DNA 合成を行う。これは、染色体 DNA 複製全体から見ると約 0.5 %の DNA 合成に相当し、Pol I が DNA 複製で担当する部分は極めて小さく限定されている (図 4)。また、過去の研究

から、大腸菌では Pol I 欠損株は生育することができないが、*polA1* 株 (Pol I のポリメラーゼ活性欠損、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性欠損) は、生育することが報告されている。大腸菌の生育には、Pol I による 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が必須であることが知られており、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を保持している DNA ポリメラーゼは Pol I のみであり、岡崎フラグメントのプロセッシングにおいて、Pol I は特異的に働いている。

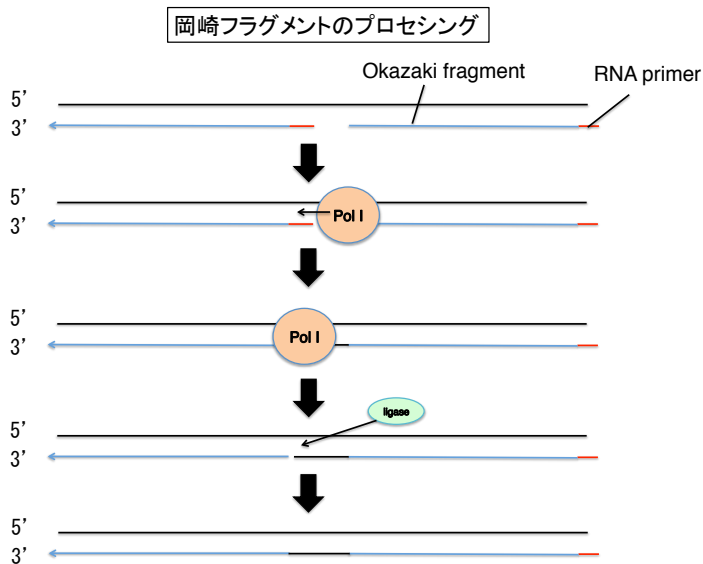


図 4 岡崎フラグメントのプロセッシング

Pol III が合成した岡崎フラグメントに Pol I が近づき、Pol I の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性を利用して、5' → 3' 方向に RNA プライマーの除去と DNA 合成を同時に行い、ニックトランスレーションを行う。Pol I が合成を終えた後に、DNA リガーゼが DNA 鎖をつなぎ合わせることで、ラギング鎖が合成される。

## 8B ColE1 型プラスミドの DNA 複製開始

ColE1 型プラスミドの複製開始には、Pol I による DNA 合成が必須である。まず、RNA ポリメラーゼが 555 bp 上流から RNA2 プライマーを転写し、RNaseH により RNA2 プライマーは切断され、Pol I が結合できる状態が作られる。この状態は R ループ構造と呼ばれ、そのままでは不安定であるが、Pol I が約 100 塩基の DNA 鎖伸長を行うことにより安定な D ループ構造が形成される。これにより 2 本鎖 DNA の一部が開裂した複製バブルができあがり、複製型 DNA ポリメラーゼである Pol III が Pol I を置き換えて、DNA 鎖伸長を続けていくことでリーディング鎖が合成される (Sambrook *et al.*, 2001) (図 5)。また、ラギング鎖には DNA ヘリカーゼが導入されて、Pol III とともに一方向の複製フォークが形成される。Pol I が欠損した変異株では ColE1 型プラスミドは複製することができない。

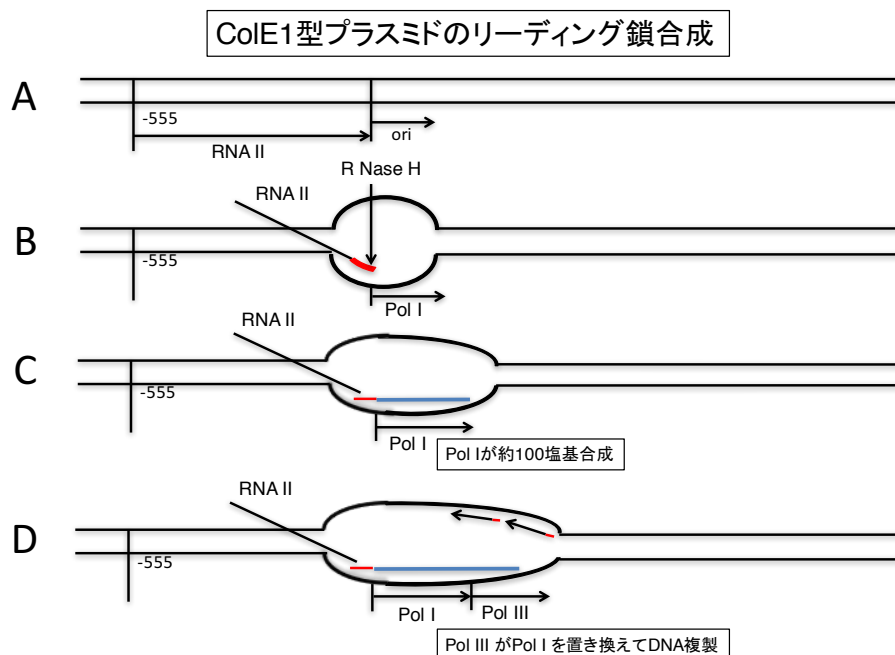


図5 ColE1型プラスミド複製について

- A RNAポリメラーゼが、複製起点の555 bp上流からRNA IIプライマーを転写する。
- B R Nase Hにより、RNA IIが認識、切断され、RNA IIプライマーにPol Iが結合できる。
- C RNA IIプライマーをもとに、Pol Iが約100塩基のDNA合成を行い、D-loopを形成される。
- D ラギング鎖上にヘリカーゼが装着されると、Pol IIIがPol Iを置き換え、Pol IIIがリーディング鎖合成を開始する (Wang *et al.*, 2004)。

## 8C ヌクレオチド除去修復

紫外線により、DNAは隣り合ったチミンなどがダイマーを形成する。このような比較的大きな損傷を取り除き、修復するシステムがヌクレオチド除去修復である。ヌクレオチド除去修復は、大腸菌、酵母、ヒトまで高度に保存された重要なDNA修復機構である。ヌクレオチド除去修復では、UvrA、UvrB、UvrC、UvrDにより損傷箇所の認識、除去が行われる。まず、UvrA-B複合体がDNA鎖上の損傷を認識して結合する。次に、UvrBにより損傷を含む二本鎖DNAが部分的に開裂される。UvrAが外れた後に、UvrB-DNA複合体に親和性のあるUvrCが結合し、損傷の5'側と3'側のDNA鎖を切断する。切断が行われると、UvrDがヘリカーゼ活性により、損傷を含んだ約12塩基のDNA鎖がはがされ、生じたギャップをPol Iが修復DNA合成することで埋め直され、DNAリガーゼがニックの連結を行うことでDNA修復が行われる (Sancar *et al.*, 1983) (図6)。大腸菌では、Pol Iのポリメラーゼ活性が欠損し

ている *polA1* 株は、紫外線感受性が著しく上昇することが知られており、ヌクレオチド除去修復の修復 DNA 合成において、Pol I が特異的に働くことが知られている。

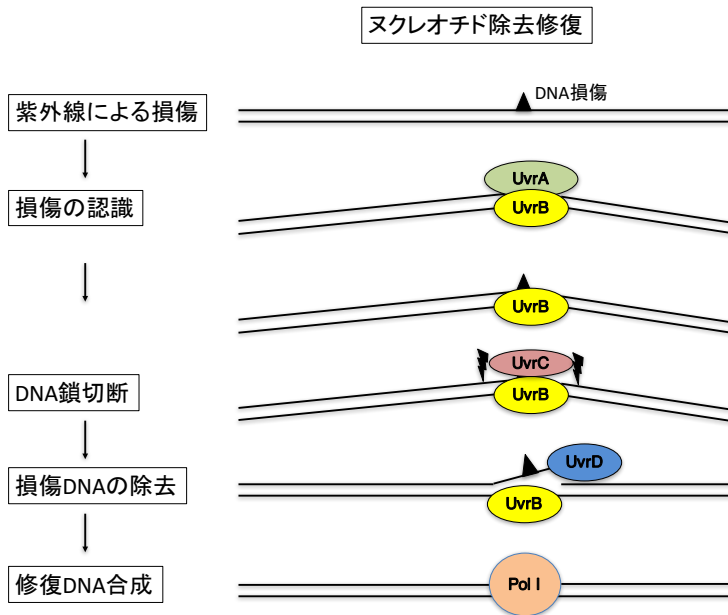


図6 ヌクレオチド除去修復

ヌクレオチド除去修復は、①UvrA-B 複合体が損傷を認識して結合する。②UvrA が外れた後、UvrC が UvrB と結合し、DNA 鎖切断を行う。③DNA 鎖が切断されると、UvrD が近づき、ヘリケース活性により損傷を含む約 12 塩基の DNA 鎖を引き剥がす。④生じたギャップを Pol I が修復 DNA 合成により埋め直し、DNA リガーゼが DNA 鎖をつなぎ合わせることで修復が行われる。

## 8D 塩基除去修復

活性酸素種、化学物質などにより DNA では、一塩基 DNA 損傷が生じる。一塩基 DNA 損傷を除去、修復するシステムが塩基除去修復である。塩基除去修復もヌクレオチド除去修復と同様に、大腸菌、酵母、ヒトまで高度に保存された重要な DNA 修復機構である。異常塩基は DNA グリコシラーゼにより取り除かれ、AP サイトが生じる。次に、AP エンドヌクレアーゼにより、DNA 鎖に切れ込みが入れられ、エキソヌクレアーゼにより切れ込みが入れられた DNA 鎖が取り除かれ、AP サイトは除去される。除去され生じた 1 塩基のギャップを Pol I が DNA 合成し DNA リガーゼがニックを連結することで DNA 修復が行われる (Lindahl *et al.*,2013) (図7)。大腸菌では、Pol I のポリメラーゼ活性が欠損している *polA1* 株は、一塩基の DNA 損傷を多発させる過酸化水素やアルキル化剤の感受性が著しく上昇することが知られており、塩基除去修復の修復 DNA 合成において、Pol I が特異的に働くことが知られている。

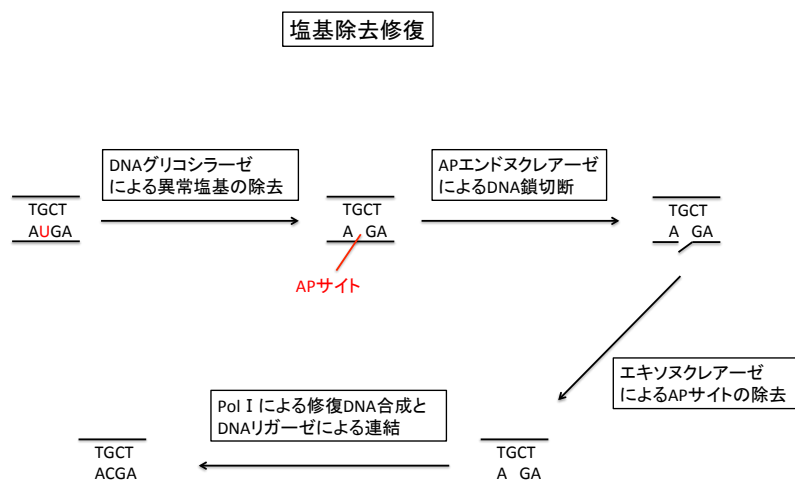


図7 塩基除去修復

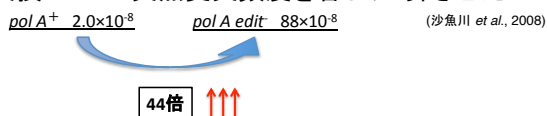
塩基除去修復は、①異常塩基をDNAグリコシラーゼが認識して除去を行う。②APサイトが生じ、APエンドヌクラーゼによりDNA鎖に切れ込みが入られる。③エキソヌクラーゼによりAPサイトは除去され、一塩基のギャップが生じる。④ギャップをPol Iが修復DNA合成し、DNAリガーゼがDNA鎖をつなぐことで行われる。

## 9. 校正機能欠損 Pol I 変異株の自然突然変異頻度

Pol IはDNA複製やDNA修復に働くポリメラーゼであり、ポリメラーゼ活性によるDNA合成、3'-5'エキソヌクラーゼ活性による校正機能、5'-3'エキソヌクラーゼ活性による岡崎断片のプライマー除去の働きを担っている3つのドメインから構成されている。Pol Iは1956年にArthur Kornbergに発見されて以来、久しく研究され続けてきた。当研究室においてもPol Iは、長年研究し続けられているDNAポリメラーゼであり、DNA複製でPol Iが担当する合成領域が極めて小さく限定されているにもかかわらず、当研究室において、校正機能を欠損したPol Iを発現する大腸菌*polA*変異株(*polA edit*)では著しく自然突然変異頻度が上昇するという現象が見いだされた(Hasegawa *et al.*,2008)。染色体DNA複製の約0.5%しか担当しないPol Iが、なぜこのような著しい変異頻度の上昇を引き起こすことができるのか、非常に興味深い。それに対して、ポーランドの研究グループが、校正機能欠損Pol I株は変異頻度を上昇させるが、その上昇は極めて小さいことを報告した(Makiela-Dzvenska *et al.*,2009, Makiela-Dzvenska *et al.*,2011)(表4)。



校正機能欠損Pol Iが突然変異頻度を著しく上昇させた



校正機能欠損Pol Iは突然変異頻度を上昇させたが、  
上昇は小さい

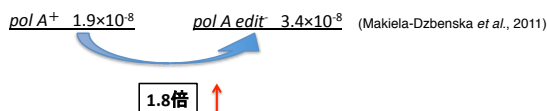
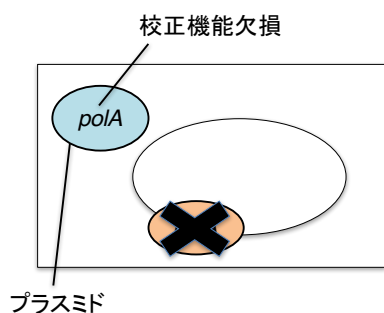


表 4 当研究室の結果とポーランドグループの結果の違い

当研究室において、校正機能欠損 Pol I が突然変異頻度を著しく上昇させた。しかし、ポーランドグループは、校正機能欠損 Pol I は変異頻度を上昇させるが、変異頻度の上昇は小さいと報告があった。

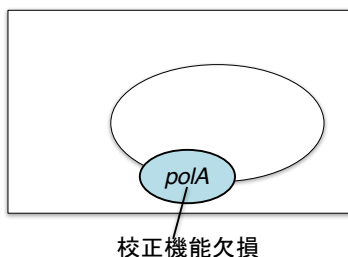
このふたつの *polA* 変異株の違いは、当研究室株では、校正機能欠損 Pol I 変異を持つ *polA* 遺伝子を高コピー数のプラスミドにクローン化したものを染色体上 *polA* 遺伝子全領域を欠失した大腸菌に導入しているのに対し、ポーランドグループの株では、染色体上の *polA* 遺伝子の変異による校正機能欠損 Pol I 変異株であることの違いである。したがって、校正機能欠損 Pol I の発現量に違いがあると思われる (図 8)。

(沙魚川 *et al.*, 2008)



$polA \ edit \ 88 \times 10^{-8}$

(Makiela-Dzbenka *et al.*, 2011)



$polA \ edit \ 3.4 \times 10^{-8}$

図 8 当研究室とポーランドグループの大腸菌株の違い

当研究室株は、染色体上 *polA* 欠損であり、プラスミドに *polA* 校正機能欠損 (*polA edit*<sup>-</sup>) があり、校正機能欠損 Pol I が過剰発現している。ポーランドグループの株は、染色体上 *polA* 校正機能欠損 (*polA edit*<sup>-</sup>) である。

## 10. 本研究の目的

博士前期課程に修士論文研究として行った研究において、校正機能欠損 Pol I は通常の発現レベルでは自然突然変異頻度に影響を与えないが、校正機能欠損 Pol I の発現レベルが上昇した場合には自然突然変異頻度を顕著に上昇させる。また、この校正機能欠損 Pol I 過剰発現による自然突然変異頻度の上昇は、染色体 DNA 複製の際の複製エラーが高頻度に発生することが原因であることを明らかにした。通常の DNA 複製で Pol I が DNA 合成を行う領域は染色体全体の約 0.5% であるが、その部分だけでの複製エラーの発生頻度上昇だけではこのような変異頻度の著しい上昇は起こせないことから、複製型 DNA ポリメラーゼである Pol III のかわりに Pol I が置き換わってより大きな領域での DNA 合成に参加していると考えられる。

損傷乗り越え合成では、TLS ポリメラーゼが Pol III を置き換えて DNA 複製に参加する。このポリメラーゼの置き換えは、 $\beta$ -clamp を介したポリメラーゼスイッチング反応で生じると考えられている。Pol I が Pol III を置き換えて DNA 複製に参加するのであれば、Pol I も  $\beta$ -clamp を介したポリメラーゼスイッチング反応で Pol III と置き換わることが可能ではないかと考えた (図 9)。しかし、Pol I が  $\beta$ -clamp と結合するかについての報告はない。そこで、博士論文研究の目的として、Pol I が  $\beta$ -clamp を介したポリメラーゼスイッチング反応を起こすことが可能かどうかを検証し、もしこの仮説が正しければ、Pol I の  $\beta$ -clamp 結合部位を見つけ出して、分子遺伝学的解析により Pol I と  $\beta$ -clamp の相互作用の生物学的意義を解明することとした。

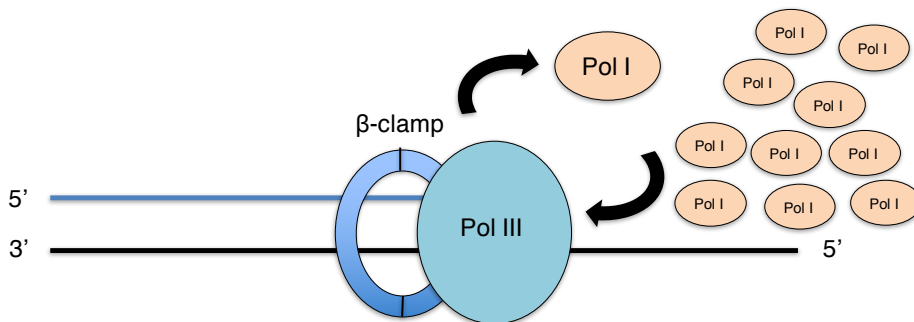


図 9 Pol I が Pol III を置き換えるモデル

Pol I が Pol III を置き換えるとき、 $\beta$ -clamp を介して置き換わり、DNA 複製に参加すると考えた。

## 第 2 章 材料と方法

### 1. 菌株

本研究に用いた菌株は全て大腸菌 K-12 株由来であり、それらの遺伝子型などについては、表 5 に記載した。

表 5 菌株リスト

株	遺伝子型	入手方法など
MK811	LAM- <i>rph-1</i> , <i>rpsL</i> (Sm <sup>r</sup> ), $\Delta$ <i>cysJ1H::rpsL</i>	当研究室のストック
MG1655	LAM- <i>rph-1</i>	当研究室のストック
MK7145	MK811, <i>polA</i> edit <sup>r</sup>	Hasegawa <i>et al.</i> , 2008
MK811(LF→AA)	MK811, <i>polA590,591</i>	本研究により作製
MK6302	MK811, <i>polA1</i>	平成 16 年修了 当研究室 安藤作製
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	当研究室のストック
PJ69-4a	MATa <i>trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4<math>\Delta</math> Gal80<math>\Delta</math></i> <i>LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	Clontech
PJ69-4 $\alpha$	MATa <i>trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4<math>\Delta</math> Gal80<math>\Delta</math></i> <i>LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	Clontech

DH5 $\alpha$  は新しく構築したプラスミドを修飾させる際の宿主菌として用いた。MK811、MG1655、MK7145 は突然変異頻度測定のために用いた。MK6302 は紫外線処理実験、過酸化水素処理実験におけるポジティブコントロールとして用いた。MK7145 (*polA* edit<sup>r</sup>) は *polA* 遺伝子の 424 番目の Asp を Ala に置換している株で校正機能ドメインは存在しているが、校正機能が働いていない株である。MK6302 は、*polA1* 変異株であり、ナンセンス変異により途中で終止コドンが導入されたところで、ポリメラーゼ活性と 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が欠損しており、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性のみが働いている株である。PJ69-4a、PJ69-4 $\alpha$  は、Yeast two-hybrid における宿主酵母菌とした。

### 2. プラスミド

自然突然変異の解析に用いたプラスミドは、pACYC184 由来の pPOLA1、pPOLA2 を用いた。pACYC184 はおよそ 20-30 コピーのプラスミドであり、pPOLA1 は正常 Pol I を、pPOLA2 は校正機能欠損 Pol I を発現する (図 10)。pACYC184 は一方向性複製起点である p15A レプリコンを持つ。pPOLA1 (LF→AA)、pPOLA2 (LF→AA) は、Prime Star mutagenesis Basal kit を用いて作製した。Pol I 遺伝子の 590 番目の Leu と 591 番目の Phe をそれぞれ Ala に置換したもので、その詳細は、「部位特異的変異導入法」の項に記載した (図 11)。pKD13、pKD46 は、One-step gene disruption 法、プラスミドクローニングにおいて用いた。pCP20 は、TS の

レプリコンも保持していることを利用して、組換え体選択後の Km 耐性遺伝子を除去するため、Km 耐性遺伝子をポップアウトさせることに用いた。

表 6 プラスミドリスト

プラスミド	遺伝子型	入手方法など
pKD46	$\lambda$ Red recombinase, <i>araC-P<sub>araB</sub></i> , AP <sup>r</sup>	当研究室のストック
pKD13	Km <sup>r</sup> (FRT)	当研究室のストック
pCP20	FLP, Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	当研究室のストック
pACYC184	Cm <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , p15Aori	当研究室のストック
pPOLA1	<i>polA</i> gene, Cm <sup>r</sup> , p15Aori	Hasegawa <i>et al.</i> ,2008
pPOLA2	<i>polA</i> edit <sup>r</sup> gene, Cm <sup>r</sup> , p15Aori	Hasegawa <i>et al.</i> ,2008
pBR322	Tet <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , <i>rop</i> gene, pMB1ori	当研究室のストック
pGEX6P-1	Amp <sup>r</sup> , glutathione S-transferase	当研究室のストック
pGEX6P-1- <i>polA</i>	<i>polA</i> gene, Amp <sup>r</sup> , glutathione S-transferase	本研究により作製
pGEX6P-1- <i>polA</i> 590,591	<i>polA</i> 590,591 gene Amp <sup>r</sup> , glutathione S-transferase	本研究により作製
pCC1BAC	Cm <sup>r</sup> , F-factor ori	当研究室のストック
pPOLA1(LF→AA)	<i>polA</i> gene, Cm <sup>r</sup> , p15Aori	本研究により作製
pPOLA2(LF→AA)	<i>polA</i> edit <sup>r</sup> gene, Cm <sup>r</sup> , p15Aori	本研究により作製

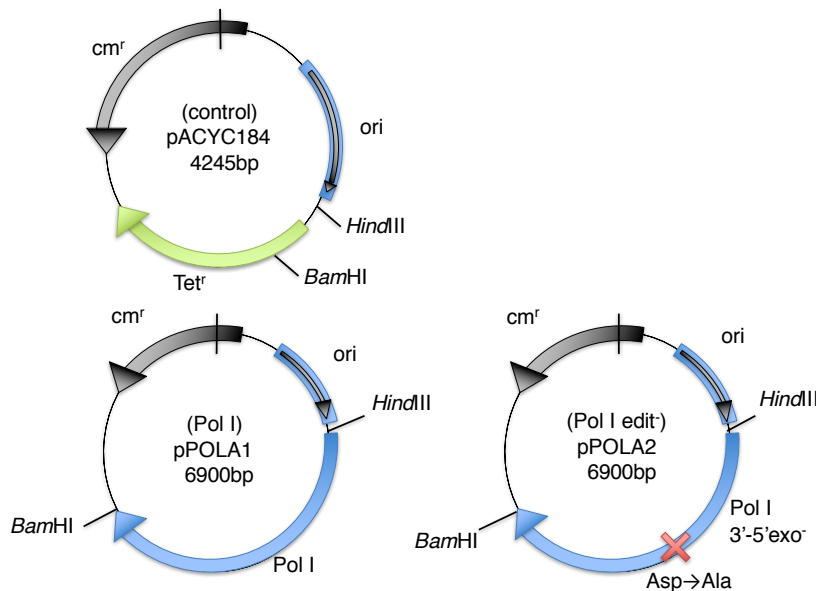


図 10 正常 Pol I と校正機能欠損 Pol I を発現するプラスミド

*ori* の矢印は複製の方向、黒い矢印は各遺伝子の転写方向を表している。pPOLA1 と pPOLA2 は pACYC184 の *Hind* III と *Bam*HI の位置に *polA* 遺伝子及びプロモーター領域と転写集結シグナルを含む DNA 断片をクローニングしたもので、pPOLA2 は *polA* の 424 番目の Asp を Ala に置換している。pPOLA1 は正常な Pol I を発現し、pPOLA2 は校正機能欠損 Pol I を発現する。

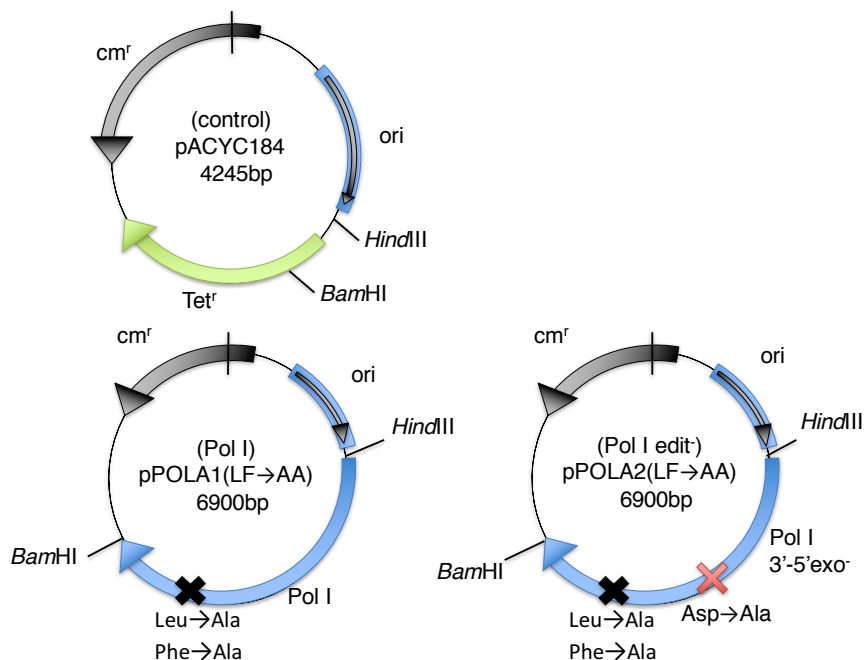


図 11 Pol I と  $\beta$ -clamp の結合阻害した *poIA* 遺伝子を持つプラスミド

ori の矢印は複製の方向、黒い矢印は各遺伝子の転写方向を表している。pPOLA1 と pPOLA2 はともに、590 番の Leu と 591 番の Phe を Ala に置換したことで、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合を阻害した Pol I を発現している。

### 3. P1 ファージ

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

### 4. 試薬・酵素・培地

一般的な試薬は特に記載がない限り、NaCl、KCl 等の塩類や HCl、NaOH 等の酸・アルカリ、抗生物質等は和光純薬工業および Sigma 社から、それ以外の試薬は Sigma 社から購入したものを使用した。本研究で使用した TaqDNA ポリメラーゼ、ExTaq ポリメラーゼ、Prime Star Max Premix は、TAKARA 社製のものを、制限酵素は、TAKARA、NEB または TOYOBO 社製のものを購入し、製造元の指示に従って使用した。一般的な大腸菌の培養には LB 培地を用いた。培地組成は以下のとおりである。LB 培地 [1.0 % Bacto trypton (Difco 社製)、0.5 % Bacto yeast extract (Difco 社製)、1.0 % NaCl]；寒天培地として用いる場合は特に記載がない限り、1.5%(w/v)の濃度で Bacto agar (Difco 社) を加えて用いた。

培地に加える抗生物質の最終濃度は、特に記載がない限り、アンピシリン (Ap)、ストレプトマイシン (Sm)、リファンピシン (Rif) は 100  $\mu$ g/ml、クロラムフェニコール (Cm) は 25  $\mu$ g/ml、カナマイシン (Km) は 50  $\mu$ g/ml、テトラサイクリン (Tet) は 5  $\mu$ g/ml とした。アンピシリン、テトラサイクリンは滅菌水に溶解し 100 mg/ml、50 mg/ml とした。リファンピシンは 100 %メタノールに、クロラムフェニコールは 100 %エタノール、テトラサイクリンは

50%エタノールに溶解し、それぞれ 10 mg/ml、50 mg/ml、5 mg/ml とした。これら溶液は、-30 °C で保存し、使用時は室温にて溶解した。

## 5. プラスミド DNA の調製

必要なプラスミドを回収するために行った。プラスミドの精製には、QIA filter Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) を用いた。適当な抗生物質を含む LB 培地 5 ml に、シングルコロニーを接種し、適当な温度で一晩回転培養した。LB 培地 100 ml に、一晩培養液 100 µl 加え、適当な温度で 250 rpm/min で O.D.600 = 0.3 になるまで培養した。この培養液を 4 °C、2700 G で約 15 分間遠心することにより集菌した (BECKMAN 社製 Rotor JA14)。集菌した菌体を、P1 緩衝液(50 mM Tris-Cl (pH 8.0)、10 mM EDTA、100 µg/ml RNaseA) 4 ml に懸濁した。これに P2 緩衝液 (200 mM NaOH、1 % SDS (w/v)) を 4 ml 加え、QIA filter に流し込み、約 10 分間質問で静置した。次に、QIAGEN-tip100 へ、QBT 緩衝液 (750 mM NaCl、50 mM MOPS (pH 7.0)、15 %イソプロパノール (v/v)、0.15 %TritonX-100 (v/v)) を 4 ml 流し入れ、平衡化した。この QIAGEN-tip100 に QIA filter を通した溶出液を流し入れた。プラスミド DNA が吸着した QIAGEN-tip100 を Buffer QC (1.0 M NaCl、50 mM MOPS (pH 7.0)、15 %イソプロパノール (v/v)) 10 ml で 2 回洗浄し、Buffer QF (1.25 M NaCl、50 mM Tris-Cl (pH 8.5)、15 %イソプロパノール (v/v)) 5 ml でプラスミド DNA を溶出した。溶出液にイソプロパノール 3.5 ml を加え、4 °C14000 rpm で 30 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA25.5)、プラスミド DNA を沈殿させた。上清を取り除き、風乾後、TE (10 mM Tris-Cl (pH 8.0)、1mM EDTA) を 20 µl 加え、プラスミド DNA を溶出した。

## 6. アガロースゲル電気泳動

アガロースは Agarose S (ニッポンジーン社) を用い、ゲル濃度は分子量に応じて 0.7 %~1.5 % (w/v) で使用した。緩衝液は TAE 緩衝液 (40mM Tris-acetate、2 mM EDTA (pH8.0)) を用いた。基本的な操作はすべて Molecular Cloning (Sambrook et al., 2001) に従った。泳動はすべてミューピッド泳動槽 (コスモ・バイオ社) を用い、電圧 100 V あるいは 50 V で 20~60 分通電した。泳動後、0.5 µg/ml のエチジウムブロマイド水溶液に 30 分間浸透して DNA を染色し、UV トランスイルミネーター (ATT 社) を用いてゲルに紫外線を照射し、DNA を観察した。

## 7. プラスミドによる形質転換

大腸菌にプラスミドを形質転換導入する際には、塩化カルシウム法 (Cohen et al., 1972) を用い、組み換えプラスミド DNA の作製や one-step gene disruption の際の DNA 断片の導入には、より効率のよい電気穿孔法 (エレクトロポレーション法 Dower et al., 1988) を用いた。

## 7A. 塩化カルシウム法

### 7A-1. コンピテントセル作製

-80 °C保存の大腸菌株ストックから、LB 培地に画線培養を行った。得られたシングルコロニーを LB 培地 5 ml に接種し、一晩回転培養した。この培養液 1.0 ml を、500 ml 三角フラスコに入った 100 ml の LB 培地に接種し、37 °C、200 rpm で約 2 時間培養した。O.D.600 = 0.3~0.4 ( $1 \times 10^8$  cell/ml) に達した時点で、培養液を冷却しておいた 50 ml 遠心管 2 本に移し、表情で 10 分間静置させた。4 °C、2700 G、10 分間遠心した後、上清を取り除き、菌体を回収した。菌体に冷却した  $\text{MgCl}_2\text{-CaCl}_2$  (80 mM  $\text{MgCl}_2$ 、20 mM  $\text{CaCl}_2$ ) を 30 ml 加えて、5 分間懸濁させた。4°C、2700G、10 分間遠心した後、上清を取り除いた。次に、冷却しておいた 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  を 2 ml 加え、再懸濁させた。これを 1.5 ml の滅菌マイクロチューブに 200  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。

### 7A-2 プラスミド DNA の導入

コンピテントセル 200  $\mu\text{l}$  にプラスミド DNA 100 ng 程度加え、よく混合した後、30 分間氷上で静置させた。静置後、42 °C、90 秒間のヒートショックを与え、すぐに氷上で 2 分間静置させた。静置後、SOC 培地 800  $\mu\text{l}$  を加え、30 °C、45 分、回転培養させた。培養後は適当な抗生物質含有 LB プレート上に、100  $\mu\text{l}$  塗布し 37 °C で一晩培養させ、形質転換体を選択した。得られた形質転換体をその後 2 回 Cm 含有 LB プレート上で画線培養し、そこで得られたシングルコロニーを液体培養させ、培養液に最終濃度が 15 % になるようにグリセロールを加え、液体窒素を用いて急冷させた後 -80 °C に保存した。

## 7B. 電気穿孔法 (エレクトロポレーション法)

### 7B-1. コンピテントセル作製

適当な抗生物質の入った 5 ml の LB 培地に適当な菌体のシングルコロニーを接種し、適当な温度で一晩回転培養した。塩濃度を下げた LB 培地 (1.0 % Bacto trypton (Difco 社)、0.5 % Bacto yeast extract (Difco 社)、0.5 % NaCl) 500 ml に、この培養液を接種した。適当な温度で、250 rpm で O.D.600 = 0.3 に達するまで回転培養した。OD が 0.3 にまで達したら、培養液を冷却した 250 ml の滅菌遠心管 2 本に写した。2 °C、5200 rpm で 15 分間遠心して上清を取り除き、菌体を回収した (BECKMAN 社製 Rotor JA14)。菌体に冷却した 10 % グリセロール 250 ml を加え、穏やかに懸濁した。2 °C、5200 rpm で 20 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA14)、上清を捨てた。再度、菌体に冷却した 10 % グリセロール 250 ml を加え、穏やかに懸濁した。2 °C、5200 rpm で 20 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA14)、上清を捨てた。さらに、冷却した 10 % グリセロール 40 ml を菌体に加え、穏やかに懸濁した。2 °C、5200 rpm で 20 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA14)、上清を捨てた。全量が 1 ml になるように冷却した GYT 培地を加え、菌体を懸濁した。これを 1.5 ml の滅菌マイクロチューブに 40  $\mu\text{l}$  ずつ分注

し、液体窒素を用いて急激に凍結させた後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。保存したコンピテントセルは、使用時は表情で融解した。

## 7B-2. プラスミド DNA の導入

エレクトロポレーションは、Bio-Rad 社製の *E.coli* Gene Pulser を用いて行った。コンピテントセル  $40\ \mu\text{l}$  に、プラスミド DNA を  $100\ \text{ng}$  加えよく混合した後、冷却した  $0.2\ \text{cm}$  間隔のジーンパルサーキューベット (Bio-Rad 社製) に移し、キューベットをジーンパルサーにセットし、電圧  $2.5\ \text{kV}$  で通電した。通電後は、すぐに SOC 培地  $5\ \text{ml}$  が入った試験管に移し、適当な温度で  $160\ \text{rpm/min}$  で約 1 時間回復培養を行った。培養後は、適当な濃度に希釈し、適当な抗生物質を含む LB 培地に塗布し、適当な温度で静置培養して、形質転換体を選択した。

## 8. P1 フェージを用いた形質導入

目的の遺伝形質を持つ菌株を作成するために、P1 フェージによる大腸菌の形質導入を行った。

### 8A P1 溶菌液の調製

目的の形質とその導入の選択ができる薬剤マーカーを保持した菌株を  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存したグリセロールストックから、LB プレートに画線培養した。シングルコロニーを適当な薬剤を含む LB 培地  $5\ \text{ml}$  に接種し、適当な温度で一晩回転培養した。  $5\ \text{mM}\ \text{CaCl}_2$  を含む LB 培地  $5\ \text{ml}$  に培養液  $50\ \mu\text{l}$  を加え、適当な温度で  $160\ \text{rpm/min}$  で、 $\text{O.D.600} = 0.4$  に達するまで振盪培養した。この培養液  $1\ \text{ml}$  を小試験管に取り、ここに P1 フェージ  $1.0 \times 10^7$  程度を加えた後、 $37^{\circ}\text{C}$  20 分間静置し、P1 フェージの感染を行った。この混合液と  $55^{\circ}\text{C}$  で保温しておいた R-top agar  $2.5\ \text{ml}$  を混合し、すばやく R-plate に流し込んだ。プレート表面を上に向けて、 $37^{\circ}\text{C}$  約 12 時間培養した。培養後、R-プレート表面の R-top agar をスプレッターでかきとり、滅菌遠心チューブに入れた。次に、クロロホルム  $100\ \mu\text{l}$  加え、30 秒間、vortex により懸濁した。 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $9000\ \text{rpm}$  で 20 分間遠心し、上清を  $1.5\ \text{ml}$  の滅菌マイクロチューブに回収し、 $40\ \mu\text{l}$  のクロロホルムを加え懸濁し、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 8B. 溶菌液による形質導入

目的の形質を導入したい菌株を  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存したグリセロールストックより、LB プレートに画線培養した。得られたシングルコロニーを LB 培地  $5\ \text{ml}$  に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  で回転培養した。この培養液を  $1\ \text{ml}$ 、 $1.5\ \text{ml}$  の滅菌マイクロチューブに移し、 $20^{\circ}\text{C}$ 、 $3000\ \text{rpm}$  で 5 分間遠心した。上清を取り除き、MC buffer ( $100\ \text{mM}\ \text{MgSO}_4$ 、 $5\ \text{mM}\ \text{CaCl}_2$ ) を  $1\ \text{ml}$  加え、再懸濁した。この懸濁液を P1 フェージ  $1.0 \times 10^9\ \text{pfu}$ 、 $1.0 \times 10^8\ \text{pfu}$ 、 $1.0 \times 10^7\ \text{pfu}$  程度をそれぞれ混合した後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 20 分間静置培養して、需要菌に P1 フェージを感染させた。P1 フェージのさらなる感染を防ぐために、 $1\ \text{M}$  クエン酸溶液を  $200\ \mu\text{l}$  加えた。次に、薬剤耐性遺伝子を発現させるために、



適当な温度で1時間振盪培養した。培養後は、適当な薬剤を含むLB培地に培養液を100 µl ずつ塗布し、適当な温度で一晩培養を行った。得られたコロニーをさらに2回の画線培養で選択をかけることで純化を行った。純化後のシングルコロニーを液体培養し、培養液にグリセロール (終濃度 15%) を加えて、液体窒素を用いて急激に凍結させた後、-80 °Cで保存した。

## 9. In-fusion プラスミドクローニング

プラスミド作製には、In-fusion クローニングを用いた。本実験は、TAKARA 社の In-fusion HD Cloning Kit を用いた。PCR を用いて、インサート断片とベクター断片の増幅を行った。2つの断片には 20 bp の相同配列を 5'側と 3'側に作成している。増幅した断片を、Cloning Enhancer を用いて鋳型 DNA を除去した。その後、In-fusion Enzyme premix を加え、Infusion 反応を行った。反応液を、滅菌水 50 µl で調整した後、0.5 µl グリコーゲン、6.25 µl 3 M sodium acetate、125 µl 100 %エタノールを加え、-30 °Cで15分静置した。その後、15000 rpm、4 °C、20分の遠心を行い、上清を除いた後、70 %エタノールを100 µl 加え、再度遠心し、上清を除いて風乾後、TE buffer 5 µl に懸濁した。エタノール沈殿後、DH5α に形質転換し、適当な薬剤で選択後、コロニーからプラスミドを抽出し、シークエンスを確認することで、目的の変異が導入されたか確認した。

表 7 プライマーリスト

名称	標的遺伝子	プライマー配列
pPOLA1 or 2/214-234-F	<i>polA</i>	CTCCATTTTAGCTTCCTTAGC
pPOLA1 or 2/2750-2770-R	<i>polA</i>	CAGGTCGAGGTGGCCCGGCTC
<i>polA</i> 2756- / pKD13 11-F	<i>polA</i>	GGCCACCTCGACCTGATTACACGTCTTGAGCGATTG
<i>polA</i> 214- / pKD13 1359-R	<i>polA</i>	GAAGCTAAAATGGAGCATTAACTCACTGATCAGTG

## 10. One-step gene disruption

目的遺伝子の染色体上への導入を行うために行った。導入を行う部位と相同な配列を 5'側と 3'側にそれぞれ持つ DNA 断片を PCR で増幅する。DNA 断片の導入を考えている宿主菌には、あらかじめ pKD46 の導入を行っておく。pKD46 はアラビノース添加により発現する λ red recombinase をコードする領域を保持しており、組み換え能を高める工夫がされている。

pKD46 を導入した宿主菌を、終濃度 10 mM になるようにアラビノースを添加し、30°C培養することでアラビノースプロモーターにより λ red recombinase を発現させておき、エレクトロポレーション用コンピテントセルを調製する、増幅した DNA 断片の導入は、基本的なエレクトロポレーション法と変わらない。適当な薬剤を含んだ LB 培地に塗布し、適当な温度で一晩培養した。得られたコロニーをもう一度画線培養し、シングルコロニーからストックを作製した (Datsenko *et al.*,2000)。

表 8 One-step gene disruption プライマーリスト

名称	標的遺伝子	プライマー配列
Kt	Km 耐性遺伝子	CGGCCACAGTCGATGAATCC
K1	Km 耐性遺伝子	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
K2	Km 耐性遺伝子	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
<i>polA</i> 1707-F	<i>polA</i>	AGCGCATGAAATTGCAGGTGAG
pKD13/1349-1373/ <i>polA</i> -R	<i>polA</i>	TTCAGTTGTTGCATAGGAATTTCTAA TAGCCATCACAAAACGTGACAGCA ATCACTGATCAGTGATAAGCTGTC

## 11. 部位特異的変異導入法

pPOLA1、pPOLA2 の中に挿入されている *polA* 遺伝子の 1770 番目の C を G に、1771 番目の T を C に、1773 番目の T を G に、1774 番目の T を C に変化させる方法として、部位特異的変異導入法を用いた。1770 番目の C と 1771 番目の T は CTC の 1 番目の C と 2 番目の T であり、これらを変化させると Ala にアミノ酸置換される。同様に、1773 番目の T と 1774 番目の T は TTT の 1 番目と 2 番目であり、これらを変化させると Ala にアミノ酸置換される。590 番と 591 番の LF を AA に置換することで、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合を阻害できるようになる。

変異導入方法は、Prime Star Mutagenesis Basal Kit (TAKARA 社) で用いられている方法である。まず、変異部位を含む箇所を中央に持ち、その両側に正しい配列を伸ばしたプライマーを設計した。PCR は、Prime Star Max Premix、プライマー、鋳型となるプラスミド DNA を用いて行った。反応液は、Prime Star Max Premix 12.5  $\mu$ l、Primer ForR 0.5  $\mu$ l ずつ、鋳型プラスミド 0.5  $\mu$ l、MilliQ 11  $\mu$ l の計 25  $\mu$ l で調製している。反応条件は、denature 98 °C 10 秒、annealing 55 °C 15 秒、elongation 72 °C 2 分を 30 サイクル行った。PCR 反応液は、アガロースゲル電気泳動により目的の位置のバンドを確認した。DH5 $\alpha$  に PCR 反応液を形質転換し、適当な薬剤で選択後、コロニーからプラスミドを抽出し、シーケンスを確認することで、目的の変異が導入されたか確認した。

表 9 部位特異的変異導入用プライマーリスト

名称	標的遺伝子	プライマー配列
<i>polA</i> -QL585/586AA-F	<i>polA</i>	ACCAAGGCGGCACAAACCATTCTCTTTGAA
<i>polA</i> -QL585/586AA-R	<i>polA</i>	TTGTGCCGCCTTGGTGGAAAGAAAGGTT
<i>polA</i> -LF590/591AA-F	<i>polA</i>	ACCATTGCCGCTGAAAAACAGGGCATTAAA
<i>polA</i> -LF590/591AA-R	<i>polA</i>	TTCAGCGGCAATGGTTTGTGCCGCCTT

## 12. Pol I と $\beta$ -clamp の相互作用を阻害した LF→AA 変異株の作製

部位特異的変異導入法を用いて、pPOLA1、pPOLA2 の中に挿入されている *polA* 遺伝子の 590 番の Leu と 591 番の Phe をそれぞれ Ala に置換変異を導入した。作製方法は、11. 部位特異的変異導入法に準じる。次に、pKD13 の 11 番から 1373 番の遺伝子にある FRT 配列を含んだ Km 耐性遺伝子を持つ DNA 断片と宿主として pPOLA1 または pPOLA2 の *polA* プロモーター配列を含んだ 214 番から *polA* 遺伝子の 2770 番の DNA 断片を In-fusion クローニングを行うことでプラスミドを作製した。作製方法は、9. In-fusion プラスミドクローニングに準じる。そして、染色体上の目的遺伝子への変異導入を行うために、作製したプラスミドから *polA* 遺伝子 1707 番から pKD13 の 1373 番までの DNA 断片を作製し、One-step gene disruption を行った。One-step gene disruption では、DNA 断片の導入を考えている宿主菌には、あらかじめ pKD46 の導入を行っておく。pKD46 はアラビノース添加により発現する  $\lambda$  red recombinase をコードする領域を保持しており、組み換え反応により目的の置換変異導入した *polA* 遺伝子 1707 番から pKD13 の 1373 番までの DNA 断片を導入した。カナマイシン (Km) 50  $\mu$ g/ml で選択後、シーケンスを確認することで、目的の変異が導入されたか確認した。作製方法は、10. One-step gene disruption に準じる。

表 10 LF→AA 変異株の作製プライマーリスト

名称	標的遺伝子	プライマー配列
<i>polA</i> -LF590/591AA-F	<i>polA</i>	ACCATTGCCGCTGAAAAACAGGGCATTAAA
<i>polA</i> -LF590/591AA-R	<i>polA</i>	TTCAGCGGCAATGGTTTGTGCCGCCTT
pPOLA1 or 2/214-234-F	<i>polA</i>	CTCCATTTTAGCTTCCTTAGC
pPOLA1 or 2/2750-2770-R	<i>polA</i>	CAGGTCGAGGTGGCCCGGCTC
<i>polA</i> 2756- / pKD13 11-F	<i>polA</i>	GGCCACCTCGACCTGATTACACGTCTTGAGCGATTG
<i>polA</i> 214- / pKD13 1359-R	<i>polA</i>	GAAGCTAAAATGGAGCATTAATTCAGTATCAGTG
<i>polA</i> 1707-F	<i>polA</i>	AGCGCATGAAATTGCAGGTGAG
pKD13/1349-1373/ <i>polA</i> -R	<i>polA</i>	TTCAGTTGTTGCATAGGAATTTCTAA TAGCCATCACAAAACGTGACAGCA ATTCAGTATCAGTGATAAGCTGTC

## 13. DNA ligation

野生型 Pol I、変異型 Pol I の精製のため、pPOLA1、pPOLA1 (LF→AA) のそれぞれの *polA* 遺伝子を PCR で増幅後、*EcoR*1 と *Sal*1 で制限酵素処理を行い、pGEX6P-1 のマルチクローニングサイトにライゲーションした。*polA* 遺伝子を含んだインサートでは、5'側に *EcoR*1 を 3'側に *Sal*1 を持たせるようにプライマーを設計し、インサートを増幅した。インサート約 3  $\mu$ g そしてベクターの pGEX6P-1 約 4  $\mu$ g を、60 units の *Sal*1 (TOYOBO 社) で 37 °C 2 時間、制限酵素処理を行い、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製し、TE (pH8.0)

100  $\mu$ l に溶かした。次に、60 units の *Eco*R1 (TOYOBO 社) で 37 °C 2 時間、制限酵素処理を行い、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製し、TE (pH 8.0) 100  $\mu$ l に溶かした。回収した DNA は、1.2 %アガロースゲルにロードした。1×TAE バッファーで電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、ゲルに 380 nm の紫外線を照射して目的 DNA を含んだゲルを切り出した。切り出したゲルは、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。回収した DNA は、その濃度をエチジウムブロマイドを用いたスポットテスト法により定量した (Molecular Cloning、第三版、A8.19 項)。10  $\mu$ l のライゲーション反応液にインサート 300 ng、ベクター 100 ng、350 units の T4 DNA ligase (TAKARA 社)、1  $\mu$ l の 10×ligation buffer (TAKARA 社) を加えた。16 °C で 12 時間反応させた後、反応液をフェノール-クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製し、TE (pH 8.0) 100  $\mu$ l に溶かした。このうち 4  $\mu$ l をエレクトロポレーションにより DH5 $\alpha$  に形質転換した。形質転換体の選択は、アンピシリンを含む LB 培地を用いて 37 °C で行った。選択され検出された大腸菌は、pGEX6P-1 のマルチクローニングサイトを囲むプライマーを用いてコロニー PCR 法 (Molecular Cloning、第三版、A8.72 項) でスクリーニングした。この際に用いたプライマーでは、pGEX6P-1 のマルチクローニングサイトを囲む断片が得られるため、本来のマルチクローニングサイトを囲む断片約 200 bp に対し、ライゲーションにより *polA* 遺伝子約 2700 bp が挿入されると、2900 bp の断片が検出される。コロニー PCR 法により 2900 bp の断片が検出された大腸菌株から、QIA filter Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) を用いてプラスミドを精製し、シーケンス解析により *polA* 遺伝子の配列を確認した。

表 11 DNA Ligation 用プライマーリスト

名称	標的遺伝子	プライマー配列
<i>polA</i> -pGEX6P-1-F	<i>polA</i>	GGGATCCCCGGAATTCATGGTTCAGATCCCCCAAATC
<i>polA</i> -pGEX6P-1-F	<i>polA</i>	GCTCGAGTCGACCCGGTTAGTGCGCCTGATCCCAGTTG
pGEX-F	pGEX6P-1	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGT
pGEX-R	pGEX6P-1	GGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC

## 14. 遺伝子解析

株作製、プラスミド作製や DNA 断片の遺伝子確認のため遺伝子解析を行った。

### 14A. PCR による標的遺伝子の増幅

PCR 反応は、ExTaq ポリメラーゼ (TAKARA 社)、10×buffer、dNTPmix、適当な 2 種類のプライマー、鋳型 DNA を用いた。最終濃度は (10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、各 200  $\mu$ M dNTP、1.5×10<sup>-2</sup> U/ $\mu$ l Extaq DNA polymerase、各 4 pmol/ $\mu$ l プライマー) とし、反応液を 10  $\mu$ l とした。反応条件は、denature : 98 °C 10 秒、annealing : 55 °C 15 秒、elongation : 72 °C 2 分を 30 サイクル繰り返して行った。

表 12 シークエンス解析用プライマーリスト

名称	標的遺伝子	プライマー配列
dPOLA3F	<i>polA</i>	CCACCAAGCAGTTACAAACC
dPOLA5F	<i>polA</i>	GGACTGGATACGCTGTATGC
dPOLA2R	<i>polA</i>	TTCAACGTCGGTTTTAATCG

## 14B. プライマーの除去

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

## 14C. DNA 塩基配列決定

DNA 塩基配列決定のための蛍光ラベルの検出および解析に用いるシーケンサーは、3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) のいずれかを用いた。また、サンプル調製には、鋳型 DNA、適当なプライマー、Big dye terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社)、BigDye XTerminator 精製キット (Applied Biosystems 社) を用いた。反応液は 1 サンプルあたり 5  $\mu$ l (5 $\times$ buffer 1 $\mu$ l、Big dye terminator mixture 0.5  $\mu$ l、プライマー (2 pmol/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、dH<sub>2</sub>O 2.5  $\mu$ l、鋳型 DNA 0.5  $\mu$ l) で作製し、反応には、Gene Amp PCR System9600 (PERKIN ELMER 社) を用いた。反応条件は、96  $^{\circ}$ C 1 分、96  $^{\circ}$ C 10 秒、50  $^{\circ}$ C 5 秒、60  $^{\circ}$ C 4 分を 30 サイクル行った。反応後は、未反応の dye terminator の除去のために、BigDye XTerminator により精製した。BigDye XTerminator には、各サンプルに SAM 溶液 10  $\mu$ l、BigDye XTerminator 溶液 5  $\mu$ l、MilliQ 15  $\mu$ l 加え、遮光し 20 分間 2000 rpm でボルテックスした。その後、各サンプルに MilliQ 40  $\mu$ l 加え、微量遠心機で遠心 (3000 rpm 1 分 室温) し、上清を 96 well プレートに移した。サンプルの塩基配列決定には、3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) または 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いた。使用方法は、仕様説明書にある 3100 Sequencing 簡易操作ガイドまたは 3130 Sequencing 簡易操作ガイドに従った。

## 15. 突然変異頻度測定

-80  $^{\circ}$ C に保存したグリセロールストックから、LB プレート上に 30  $^{\circ}$ C、24 時間で線画培養した。このとき得られたシングルコロニーを試験管内 LB 培地 5 ml に接種し、ロータリーシ

エーカーで 30 °C 24 時間培養した。この培養液を LB 溶液で  $10^{-6}$  希釈したのち、この希釈液を 5 ml LB 溶液に 100  $\mu$ l 加えた。このとき試験管内 LB 培地 5 ml に対し、目的とする菌体は約 100-200 cell 程度存在する。次に、この希釈液を O.D.600 = 1.0 まで 160 rpm/min 37 °C 振盪培養した。この培養液を 1 枚の LB プレート上あるいは抗生物質であるリファンピシン含有 LB プレート上でコロニー数のカウントに適する程度になる濃度に希釈した。生菌数測定には LB プレートを、変異体測定にはリファンピシン含有 LB プレートをを用いて、それぞれの菌液をプレート上に塗布した。このとき、菌液を 5 倍もしくは 10 倍濃縮したのち、生菌数測定について希釈系列を独立に 3 系列作成し、各 2 枚のプレートに塗布した。変異体数測定については、3 枚のリファンピシン含有 LB プレートに培養液を希釈せずに原液で塗布した。なお、突然変異体測定に用いた培養プレート中リファンピシン濃度は、100  $\mu$ g/ml で用いている。培養液を塗布した各プレートは 37 °C で一晩培養した。このとき LB プレートに出現したコロニー数から振盪培養 1 ml 中に存在する生菌数を、またリファンピシン含有 LB プレートに出現したコロニー数から振盪培養した培養液 1 ml 中に存在する *rpoB* 領域上に突然変異を生じた変異体菌数を算出した。以上のようにして求めた培養液 1 ml あたりの変異体数を、同じく培養液 1 ml あたりの生菌数で乗じた値を突然変異頻度とした。この一連の過程を 1 実験区として、目的とする各菌株に対して各 20 実験区行い、各実験区で求めた突然変異頻度の中央値を、その菌株の突然変異頻度とした。

## 16. SDS-PAGE

ゲルや試薬の調製は Molecular Cloning に従った。ゲルは 12.5 % 分離ゲルを作製し、分子量マーカーは Precision Plus Protein (Bio-Rad 社) を用いた。泳動装置の操作は説明書に従った。SDS-PAGE に用いるサンプル調製は以下のように行った。サンプリングした大腸菌を 14000 rpm、4 °C、5 分遠心し、集菌した細胞に 1×SDS-PAGE サンプル・バッファー [40 mM Tris-HCl (pH 6.8)、100 mM dithiothreitol (DTT)、1.6 % SDS、0.08 % ブロモフェノールブルー、8 % グリセロール] を加えて懸濁し、99 °C で 5 分間加熱処理を行った。その後、14000 rpm、4 °C、5 分遠心し、SDS ポリアクリルアミドゲルに上清を 10  $\mu$ l アプライした。または、精製を行った Pol I を 5  $\mu$ l もしくは 7  $\mu$ l を 2×SDS-PAGE サンプル・バッファーを等量加えアプライした。サンプルをアプライした後、泳動バッファー [25 mM Trizma base、250 mM glycine、0.1 % SDS] を用いて 200 V で 1 時間程度泳動を行った。

## 17. ウェスタンブロッティングによるタンパク質の検出

SDS-PAGE 後、トランスファー・バッファー (泳動バッファー、20 % メタノール) を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher&Schuell 社) へタンパク質を転写した 100 V、1.5 時間。転写後のニトロセルロース膜を 5 % スキムミルク (Becton-Dickinson 社) を含む TBST 溶液 [0.1 % Tween20、140 mM NaCl、5 mM KCl、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)] 10 ml 加えてブロッキング処理した。ニトロセルロース膜と抗体との反応は 1 % スキムミルクを含む TBST 溶液を用いた。一次抗体は Pol I 抗体もしくは RecA 抗体を 1  $\mu$ l、二次抗体液は抗ウサギ IgG 抗体 (GE

ヘルスケア) を 1  $\mu$ l 用いた。抗体と反応したタンパク質は ECL 検出キット (GE ヘルスケア) によりシグナルを Huperfilm ECL (GE ヘルスケア) に感光させて検出した。

## 18. ODYSSEY イメージングシステムを用いた Pol I の定量

BSA を標準タンパク質として ODYSSEY infrared imaging systems (LI-COR 社) 及び odyssey アプリケーションソフトウェアを用いて Pol I の定量を行った。ゲル染色には、Colloidal Blue を用いており、Colloidal Blue は Colloidal Coomassie G-250 を使用しており、これはタンパク質を非特異的に強い青色に染め、タンパク質によって染色の偏りがないため、定量に最適である。また、odyssey は赤外光を励起光としたイメージングシステムで、適当な光源で蛍光分子を励起して反射された光子を捕捉する CCD カメラまたはその他の光学検出器を通して蛍光標識を目で見るのが可能な装置であるが、Coomassie 色素など赤色蛍光を発する色素の高感度検出・定量も行うことができる。この odyssey を用いた定量では、極めて高い精度で比較的微量のタンパク質の定量を行うことが可能であるとされている。なお、検出で用いたシグナルは 700 nm で行った。

定量の手順は、BSA を 20 ng、40 ng、80 ng、120 ng と野生型 Pol I、変異型 Pol I を 5  $\mu$ l または 7  $\mu$ l を SDS-PAGE で流し、Colloidal Blue で 12 時間染色を行った。milliQ で室温 4 時間の脱色を行った後、ODYSSEY infrared imaging systems (LI-COR 社) 及び odyssey アプリケーションソフトウェアを用いた。解析ソフトにより検出されたバンド強度のシグナルを数値化した。この数値を用いて標準タンパクとして用いた BSA から標準曲線を作成し、野生型 Pol I、変異型 Pol I の定量を行った。野生型 Pol I、変異型 Pol I それぞれの 5  $\mu$ l または 7  $\mu$ l のバンド強度のシグナルの数値を用いて、検量線に当てはまる数値の範囲から定量した。

## 19. Pol I の精製

野生型 Pol I、変異型 Pol I の精製を行った。MG1655 に野生型 Pol I を発現する遺伝子を組み込んだ pGEX6P-1 (pGEX6P-1-*polA*) と変異型 Pol I を発現する遺伝子を組み込んだ pGEX6P-1 (pGEX6P-1-*polA590,591*) を導入した。また、コントロール株として pGEX6P-1 を MG1655 に導入した。pGEX6P-1 に野生型 Pol I、変異型 Pol I を発現する遺伝子を組み込んだことで、発現した Pol I は GST タグが付いた融合タンパクとなる。野生型 Pol I 発現株、変異型 Pol I 発現株、コントロール株の一晩培養液 5 ml を 37  $^{\circ}$ C で培養した。それを 200 ml LB 溶液 (500 ml 三角フラスコ) に 1 ml の一晩培養液を加え、37  $^{\circ}$ C 200 rpm で O.D.600 = 0.4 まで培養した。そして、O.D.600 = 0.4 で培養液を 4  $^{\circ}$ C で 30 分静置した後、終濃度 0.1 mM になるように 100 mM IPTG を 200  $\mu$ l 加え、20  $^{\circ}$ C 17 時間 200 rpm で培養した。培養液は 4  $^{\circ}$ C、5000 rpm で 10 分間遠心し (BECKMAN 社製 Rotor JA14)、回収したペレットにバッファー A (25 mM Na Phosphate buffer pH 7.4、150 mM NaCl、10 % Glycerol、1 mM DTT) を 10 ml と終濃度 0.2 mg/ml となるようにリゾチームを加え、20 分氷上で静置した。その後、溶液を ULTRASONIC DISRUPTOR UD-201 (TOMY) で細胞破碎 (output 5 10 秒、interval 30 秒、6 サイクル) し、得られた細胞破碎液を、14000 rpm 4  $^{\circ}$ C 10 分で遠心した。上清を取り、0.45  $\mu$ m のフィルターで

フィルトレーション後、0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターでフィルトレーションを行った。精製用の GSTrap (GEヘルスケア社) GST 融合タンパク質精製カラム (1 ml) にバッファーA 5 mlを流速 0.5 ml/min で通してカラムを平衡後、精製した上清をカラムに流速 0.5 ml/min で通した。そして、流速 0.5 ml/min でバッファーA 5ml、引き続きバッファーC (25 mM Tris-HCL pH 7.4, 50 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 mM DTT) 5 ml を加えた後、PreScission Protease (GE ヘルスケア社) を 50  $\mu\text{l}$  加えたバッファーC 1 ml をシリンジでカラムに加え、4  $^{\circ}\text{C}$  14 時間反応させた。そして、バッファーC で溶出させ、フラクション 1 から 10 (それぞれ 500  $\mu\text{l}$ ) を取得した。野生型 Pol I 発現株、変異型 Pol I 発現株、コントロール株を同条件で破碎した上清を用いて一連の実験を行った。精製した Pol I の定量は ODYSSEY infrared imaging systems (LI-COR 社) 及び odyssey アプリケーションソフトウェアを用いた。野生型 Pol I は 10.5 ng/ $\mu\text{l}$ 、変異型 Pol I 10.1 ng/ $\mu\text{l}$  であった。コントロール株からの精製標品では、Pol I の検出限界以下であった。

## 20. Pol I の DNA ポリメラーゼ活性測定

精製した野生型 Pol I、変異型 Pol I そしてコントロール株から精製した上清の精製画分の Pol I のポリメラーゼ活性測定を行った。活性測定では、DNA 合成によりアデニン残基が 8 個、グアニン残基が 1 個、シトシン残基が 1 個ずつ取り込まれる hook DNA (5'-TTTGTTCTTTTGGCACCAACTATATGTTGGTGGTCCA) を用いて、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP の取り込み量を定量することで、野生型 Pol I、変異型 Pol I の Pol I のポリメラーゼ活性を測定した。反応溶液 (10  $\mu\text{M}$  hook DNA、1 $\times$ EDBG (20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 、4 % Glycerol、8 mM DTT、80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bovine serum albumin) 、1 mM ATP、8 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100  $\mu\text{M}$  (dATP、dCTP、dGTP) 、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP) 20  $\mu\text{l}$  を 30  $^{\circ}\text{C}$  で約 30 秒前もって保温し、コントロール株精製画分、野生型 Pol I、変異型 Pol I を 1  $\mu\text{l}$  または 2  $\mu\text{l}$  を加え、30  $^{\circ}\text{C}$  で反応させた。3 分後または 6 分後の反応溶液 5  $\mu\text{l}$  をサンプリングし、それぞれに 50 mM EDTA 5  $\mu\text{l}$  を加え、反応を停止させた。3 分後または 6 分後で反応を停止させた溶液 5  $\mu\text{l}$  を DE81 ペーパーにスポットし乾燥させた後、取込まれなかった dNTP を除去するために 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 ml によって 3 回洗浄した。そして、乾燥させた後、DE81 ペーパーを BAS イメージングプレートに 30 分間密着暴露させたあと、BAS2500 を用いて BAS イメージングプレート上の 放射線感光強度の分布イメージを解析して、DNA に取り込まれた  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP を検出した。

## 21. Yeast two-hybrid システムによる $\beta$ -clamp 結合部位の解析

Donor vector の pDONR201 (Clontech) は Entry clone の作製に、Destination vector の pADGW 及び pBDGW は Expression clone の作製に用いた。pBDGW と pADGW は、BD 融合タンパク質あるいは AD 融合タンパク質を発現する。目的断片作製のため、まず Gateway の組み換え配列である attB1 配列と 25 bp からなるプライマーと、attB2 配列と終始コドンと 25 bp からなるプライマーを作製し、目的遺伝子に特異的なプライマーをデザインした。PCR による増幅は、95  $^{\circ}\text{C}$  1 分加熱した後、95  $^{\circ}\text{C}$  15 秒、55  $^{\circ}\text{C}$  15 秒、72  $^{\circ}\text{C}$  2 分を 30 サイクルである。PCR により増幅した DNA 断片を BP clonase enzyme mix (Invitrogen) を用いて pDONR201 vector に組み換え、Entry



cloneを得た。BP clonaseによる組み換え反応は25°C 2時間行い、protease K (Invitrogen) により酵素を失活させた。次に、BP clonase反応液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$ に形質転換し、LB 寒天培地 (50  $\mu$ g/ml kanamycin) 、37 °Cで一晩培養し、形質転換体を選択した。Entry clone内の必須遺伝子はPCRによる変異が入っている可能性があるため、全ての塩基配列を確認した。sequencingの鋳型はプラスミドの組み換え領域の外側にアニーリングするpDONR-F及びpDONR-Rプライマーを用いてPCR により増幅した産物を用いた。塩基配列は、これら2つのプライマーを用いて、目的断片の挿入と塩基配列に変異が入っていないことを確認した。Entry cloneの必須遺伝子をLR clonase enzyme mix (Invitrogen) によってDestination vector (pBDGW 及びpADGW) に組み換え、Expression cloneを得た。LR clonase による組み換え反応は25 °C 2時間行い、protease K (Invitrogen) により酵素を失活させた。反応停止後、大腸菌 DH5 $\alpha$ に形質転換した。Expression cloneを導入した形質転換体はLB培地 (100  $\mu$ g/ml アンピシリン) で選択した。そして、形質転換からプラスミドを抽出し、それぞれGAL4のactivation domain、GAL4のDNA binding domainと翻訳レベルで目的の遺伝子が融合しているExpression cloneを取得した。本研究で使用した Expression cloneは組み込まれた遺伝子産物がそれぞれ GAL4 activation domain及びGAL4 DNA binding domainとの融合タンパク質として発現するように設計されている。これら2つのdomainは元々同一のタンパク質を構成しており、特異的なオペレーター配列を認識し、転写を活性化する。これらのdomain と融合している遺伝子産物同士が相互作用すれば、各domain間の距離が極めて近くなり転写 活性能が回復する。そうすると、レポーター遺伝子HIS3が発現し、酵母はHistidineを合成できるようになるため、Histidineを含まない培地で生育できるようになる。一方、各domainと融合している遺伝子産物同士が相互作用しなければ、転写活性能は回復しない。よって、この酵母はHistidineを合成することが出来ず、Histidineを含まない培地で生育することが出来ない。このようにSD (-His,-Leu,-Trp) 寒天培地におけるコロニーの生育状況を観察することで相互作用を検出した。Expression cloneの酵母への形質転換は、CLONTECHのYeast protocols handbookに従い行った。Expression cloneは酵母 PJ69-4 $\alpha$ 株、酵母 PJ69-4a株にそれぞれ導入した。まず、PJ69-4 $\alpha$ とPJ69-4aをYPDA 寒天培地で30 °C一晩培養し、50 ml のYPDA液体培地にO.D.600 = 0.2 となるよう植菌した後、30 °C でO.D.600 = 0.8になるまで培養した。この培養液を5 ml 2000 rpm 5分間、室温で遠心して集菌し、上澄みを捨てた後、5 ml滅菌水でさらに2000 rpmで5分間、室温で遠心して洗浄した。上澄みを捨てたのち、このとき得られたペレットに100 mM LiAc 溶液を1 ml加えて、14000 rpm 10分室温で遠心した。次に、50 % PEG240  $\mu$ l、1.0 M LiAc溶液36  $\mu$ l、Carrier DNA25  $\mu$ l (2.0  $\mu$ g/ $\mu$ l) 、200 ngのプラスミドを順に加えて、ボルテックスにより混和した。これを 30 °C 30分、42 °C 20分インキュベートし、氷上で2分間放置した後、14000 rpm 1分遠心し、上澄みを捨てたあと、1 mlのYPDA溶液を加えて1時間30 °C培養した。その培養液を14000 rpm 1分で集菌し、上澄みを捨てたあと、TEを50  $\mu$ lで懸濁し、Drop out solutionを用いて、特定のアミノ酸を除いた寒天培地で、形質転換体を選択した。pADGWに組み換え、Expression cloneを取得したプラスミドを導入した酵母はSD (-Leu) 培地で、pBDGWに組み換え、Expression cloneを取得したプラスミドを導入した酵母はSD (-Trp) 培地で培養することでそれぞれ選択した。相互作用を観察するそれぞれの Expression cloneを持つ酵母の接合は、CLONTECHのYeast protocols handbookに従い行った。まず、Expression cloneを持つそれぞれ

の酵母を、同一のYPDA溶液5 mlで培養し、接合させる。このとき、接合が起こったかを確認するために、この培養液をSD (-Leu -Trp) 培地にスポットして確認する。コロニーが確認できれば、SD (-Leu -Trp) 液体培地で30 °C一夜培養培養し、この培養液を SD (-His,-Leu,-Trp) 寒天培地にスポットすることで相互作用の有無を判定した。前述したように、酵母内で BD融合タンパク質とAD融合タンパク質が相互作用すれば、レポーター遺伝子HIS3が発現し、Histidineを合成できるようになるため、2 倍体酵母がHistidine を含まない培地で生育できるようになる。相互作用の判別方法はSD (-His,-Leu,-Trp) 寒天培地でコロニーができれば、BD融合タンパク質とAD融合タンパク質が相互作用していることが確認できる。

表 13 Yeast two-hybrid 用プライマーリスト

名称	標的遺伝子	プライマー配列
Pol I 541-F	<i>polA</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGGAACGTAACGGTGTGAAGATCGATC
Pol I 584-R	<i>polA</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTCCTACTTGGTGGGAAGAAAAGTTAAATTCC
Pol I 601-R	<i>polA</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTCCTAATTTCTTCAGCGGTTAATGCCCTG
Pol I 740-R	<i>polA</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTCCTATTCTGCCGCCGTTGCCCGGTGGATAATC
β-clamp-F	β-clamp	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGAAATTTACCGTAGAACGTGAGC
β-clamp-R	β-clamp	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTCCTACAGTCTCATTGGCATGA CAACATAAG

## 22. 紫外線感受性試験

各菌株を LB 培地で一晚培養したのち、LB 培地で  $10^{-2}$ ~ $10^{-5}$  に段階希釈を行い、5 μl ずつ 2 枚の LB プレートにスポットをおこなった。溶液が LB プレートにしみこんだのを確認したあと、1 枚は control としてアルミホイルでくるみ 37°C で培養し、もう 1 枚は暗室で UV Stratlinker 1800 (STRATAGENE 社) を用いて UV 6000 μJ もしくは 2000 μJ を照射し、すぐにアルミホイルでくるみ 37 °C で一晚培養した。

## 23. ディスクアッセイを用いた過酸化水素感受性試験

各菌株の一晚培養を作製し、5 ml LB 培地に一晚培養液 50 μl を入れて、O.D.600 = 0.3 になるまで培養する。この培養液を 500 μl と 0.8 % ソフトアガー 4.5 ml を混ぜて、LB プレートに注ぐ。ソフトアガーが固まり次第、プレートの中央に丸いろ紙 (d = 0.8 cm) をおき、8.8 M 過酸化水素水 (WAKO 社) を 20 μl ろ紙にふくませ、37 °C 12-24 時間培養した。阻止円の測定方法は、3 つの異なった直径を測定し、その平均を阻止円の直径とした (Zhang *et al.*, 2014) 。これを 1 実験区とし、1 株につき 6 実験区の直径の平均を測定した。

### 第3章 結果

#### 1. 2種類の校正機能欠損 Pol I 株の変異頻度の違いの原因

私は、博士前期課程の修士論文研究の課題として、当研究室で発見された校正機能欠損 Pol I 変異株の高い自然突然変異頻度の理由を解明することとし、最初に、当研究室の沙魚川が報告した結果とポーランドグループの結果の再現性を調べた。

沙魚川が作成した菌株を用いて *rpoB* 変異検出系での自然突然変異頻度を測定した結果、沙魚川の菌株ではコントロールとして用いた野生型の Pol I をプラスミドから発現している菌株の13倍に *rpoB* 変異頻度が上昇することが確認された (図12)。

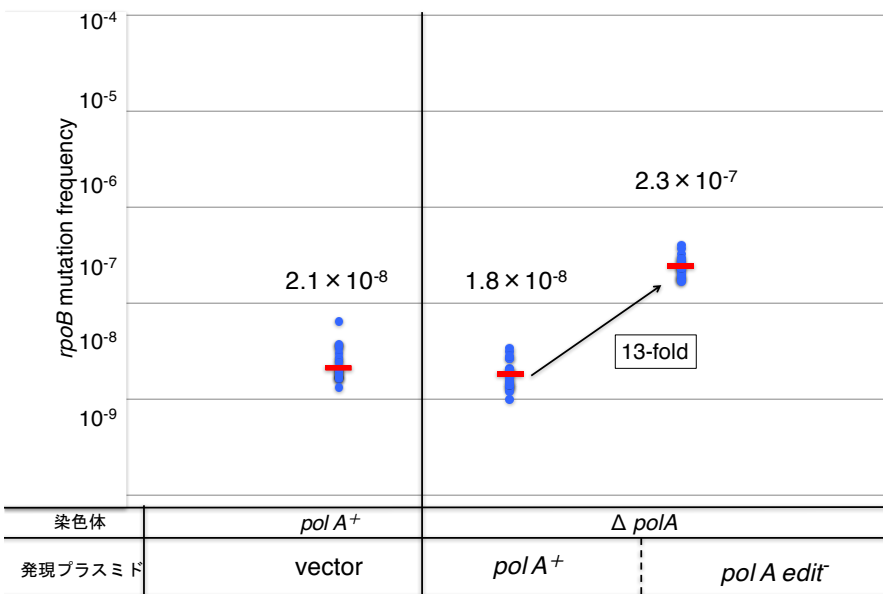


図12 当研究室の校正機能欠損 Pol I (*pol A edit*) 株が示す高い自然突然変異頻度

コントロールベクター保持野生株、野生型 Pol I 発現プラスミド保持染色体 *pol A* 欠損株、校正機能欠損 Pol I 発現プラスミド (*pol A edit*) 保持染色体 *pol A* 欠損株の変異頻度比較。当研究室が報告した校正機能欠損 Pol I による変異頻度の著しい上昇の再現を確認した。変異頻度の測定は、一晚培養液をおよそ 100 cell になるように希釈し、O.D. 600 = 1.0 になるまで 37°C 160rpm で液体培養を行い、O.D. 600 = 1.0 になった培養液を LB プレートと LB+薬剤プレートにそれぞれ添加、塗布し、培養後のコロニー数を数え、LB プレートの生菌数分の LB+薬剤プレートの生菌数から、O.D. 600 = 1.0 までの培養中でどれだけ突然変異が起こったか突然変異頻度を算出している。これを1実験区とし、20実験区行った。青い点は、20実験区分の突然変異頻度を示し、赤いバーは中央値を示している。

続いて、校正機能欠損 Pol I を発現するプラスミド (*pol A edit*) を染色体上 *pol A* が野生型の宿主に導入して、*rpoB* 変異頻度の測定を行った (図13)。この場合も、校正機能欠損の Pol I を発現するプラスミドを持つ株はコントロールの野生型の Pol I を発現するプラスミドを持つ株の12倍に上昇した *rpoB* 変異頻度を示した。このことから、染色体 *pol A* から発現される正常な Pol I が存在していても校正機能欠損 Pol I は優性に働くことが明らかになった。

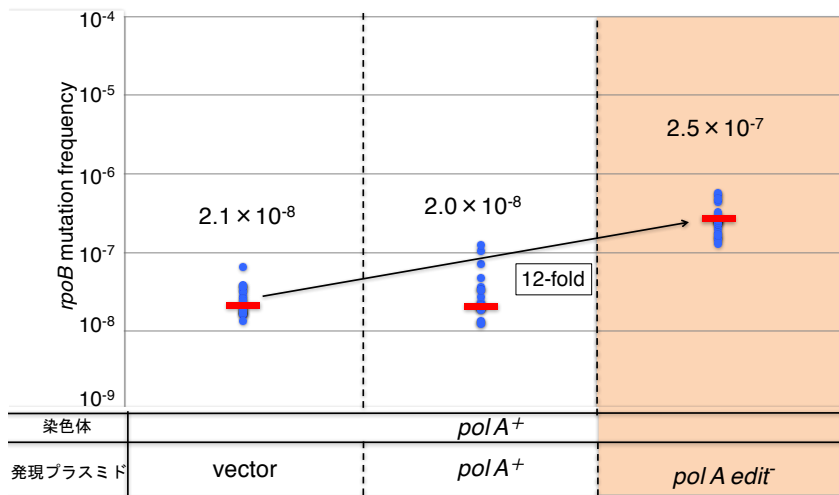


図 13 染色体上の *polA* を野生型にした場合の変異頻度

コントロールベクター保持野生株、野生型 *Pol I* 発現プラスミド保持野生株、校正機能欠損 *Pol I* 発現プラスミド保持野生株の変異頻度測定を行った。実験方法・表記は図 15 に準じる。

次に、ポーランドグループの実験結果の再現性を調べるために、染色体上の *polA* の 424 番目の Asp を Ala に置換変異導入することで、*polA* の校正機能を欠損した株を新たに作成し、その変異頻度を測定した。その結果、ポーランドの研究グループが報告しているとおりに、*rpoB* 変異頻度の上昇は 2 倍以下の小さいものであった。当研究室の報告と同様に、ポーランドグループの実験結果も再現性が高いものであることが確認された (図 14)。

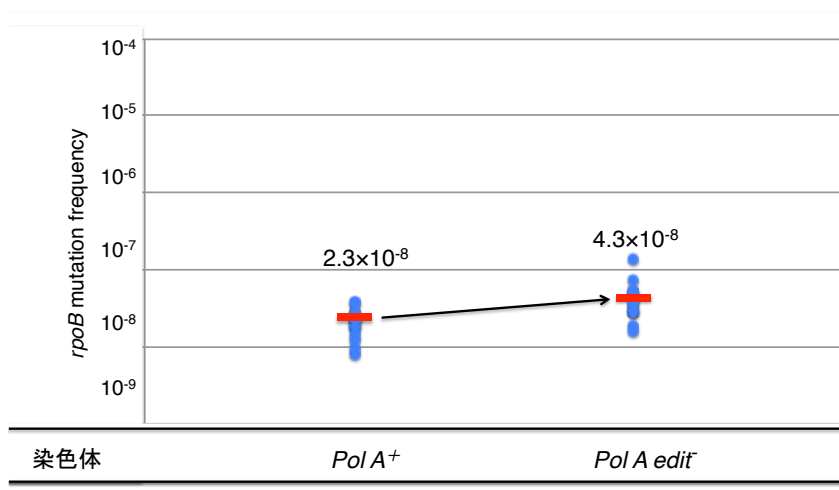


図 14 ポーランドグループの研究結果の再現性確認

野生株、校正機能欠損 *polA* 株の変異頻度測定を行った。実験方法・表記は図 13 に準じる。

## 2. ウェスタンブロットによる Pol I の定量

実験で用いたプラスミドは 20-30 コピーのマルチコピープラスミドであったため、Pol I の発現量が上昇していることが考えられる。そこで、野生株と *polA* プラスミド保持株の Pol I の発現量をウェスタンブロットにより調べた (図 15)。精製した Pol I を標準として用いた検量線を作成して、Pol I の量を正確に定量した。野生株と Pol I 過剰発現株の生菌数は同程度であり、検量線から、野生株は O.D.600 = 0.2 において約 0.00224  $\mu\text{g}$  発現しており、Pol I 過剰発現株は O.D.600 = 0.1 において約 0.027  $\mu\text{g}$  を発現していることから、Pol I 過剰発現株は野生株の約 24 倍の Pol I を発現している。沙魚川の菌株は染色体 *polA* 遺伝子が欠失しているが、20-30 コピーのプラスミド上に *polA* 遺伝子がクローン化されていることに対応して、沙魚川株では野生株の約 24 倍多い Pol I が発現していることが明らかになった。

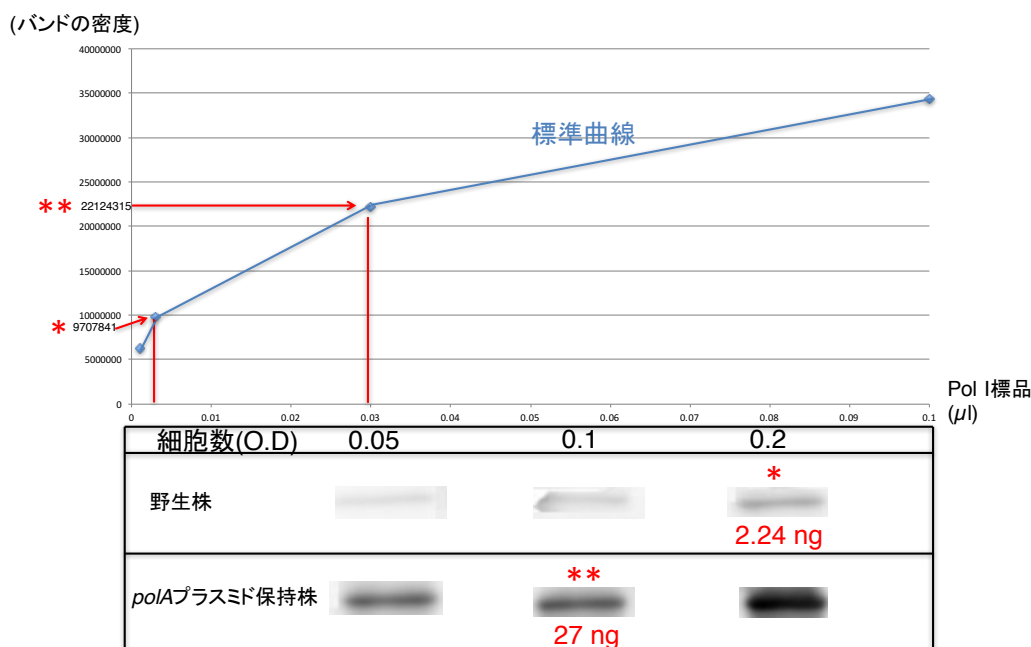


図 15 Pol I の発現量の定量

野生株と Pol I 過剰発現株の一晩培養液を OD を揃えて、Pol I 量をウェスタンブロットによって測定を行った。また、精製した Pol I (0.9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) を 0.001  $\mu\text{l}$ 、0.003  $\mu\text{l}$ 、0.03  $\mu\text{l}$ 、0.1  $\mu\text{l}$  を SDS-PAGE に流し、ウェスタンブロットによって定量し、標準曲線を作成した。実験方法は、材料と方法の 16 SDS-PAGE、17 ウェスタンブロットに準じる。

## 3. ミスマッチ修復欠損株を用いたエラー発生源の探索

校正機能欠損 Pol I 過剰発現はなぜ突然変異頻度を著しく上昇させるのか。原因として、2 つ考えられる。1 つ目は、修復 DNA 合成が Pol I 過剰発現によって、大量に起こるため、校正機能欠損 Pol I がエラーを頻発する。しかし、DNA 修復反応は DNA 損傷に依存して生じる

ので、Pol I の発現量が増えても DNA 修復反応の頻度が上昇することは考えにくい。二つ目は、Pol III が行う DNA 複製に Pol I が参加することでエラーを頻発する。このような可能性はこれまで考えられてこなかったが、突然変異頻度の上昇を最もよく説明できるのは DNA 複製に Pol I が参加してエラーを頻発しているのではないかと推測して、以降の実験を行った。

ミスマッチ修復は DNA 複製で起こったエラーを校正する DNA 修復システムの 1 つである。DNA 複製では、校正機能を持った DNA ポリメラーゼが、エラーを校正しながら DNA 複製を行っているが、それでも  $10^7$  に 1 つの割合でエラーを起こしてしまう。ミスマッチ修復機能は、こうした DNA 複製で生じたエラーの修復を行うことで、100 倍の DNA 複製の忠実性の向上に寄与している。ミスマッチ修復が機能する際、新生鎖と鋳型鎖を区別する仕組みが存在しており、原核生物では、鋳型鎖はメチル化を受けているため、メチル化されていない新生鎖を区別して修復を行う (Lahue *et al.*, 1989)。もし、校正機能欠損 Pol I が過剰発現している細胞で染色体 DNA の複製の際のエラーがより多く発生しているのであれば、ミスマッチ修復機能が欠損した場合には、さらに突然変異頻度が上昇することになると考えられる。

沙魚川の菌株に *mutS* 欠失変異を導入し、ミスマッチ修復機能を欠損させた状況での校正機能欠損 Pol I 変異株の *rpoB* 突然変異頻度を測定した。ミスマッチ修復機能が欠損している状況で校正機能欠損 Pol I を過剰発現させた株は空ベクターだけを持つ株と比べて、非常に高い変異頻度を示した (図 16)。ミスマッチ修復機能は、DNA 複製で生じたエラーだけを修復する。ミスマッチ修復機能を欠損したことで変異頻度が著しく上昇したということは、沙魚川の校正機能欠損 Pol I 変異株ではミスマッチ修復機能による修復を多数受けていたということになる。このことから、校正機能欠損 Pol I の過剰発現は、染色体 DNA の複製において複製エラーを高頻度に発生させ、そのために突然変異頻度が上昇すると結論した。

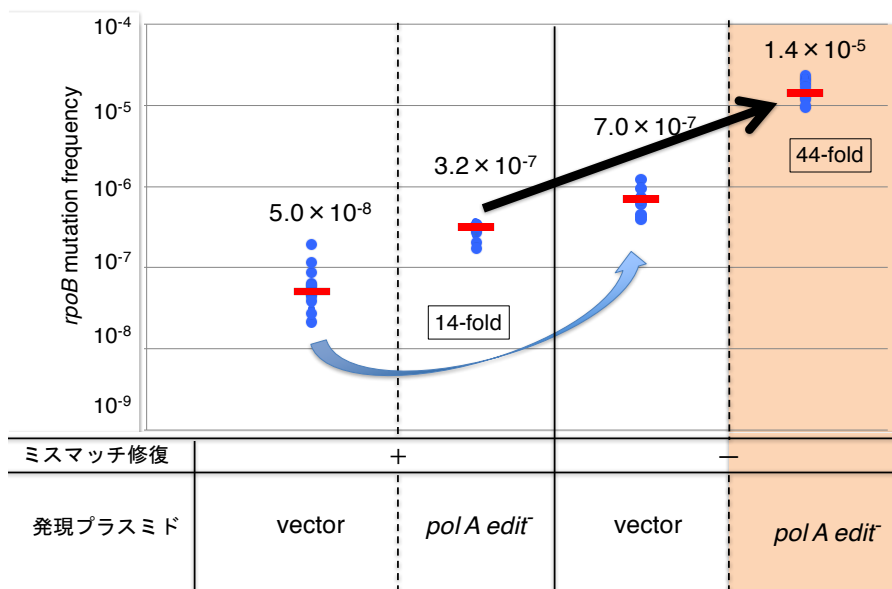


図 16 ミスマッチ修復機能欠損株を用いた変異頻度の比較

コントロールベクター保持野生株、校正機能欠損 Pol I 発現プラスミド (*polA edit*) 保持野生株、コントロールベクター保持ミスマッチ修復欠損株、校正機能欠損 Pol I 発現プラスミド (*polA edit*) 保持ミスマッチ修復欠損株の変異頻度測定を行った。実験方法・表記は図 15 に準じる。

#### 4. DNA 複製における Pol I による Pol III の置き換え

校正機能欠損 Pol I は通常の発現レベルでは自然突然変異頻度に影響を与えないが、通常の 24 倍に発現レベルが上昇した場合には自然突然変異頻度を顕著に上昇させること、この校正機能欠損 Pol I 過剰発現による自然突然変異頻度の上昇は、染色体 DNA 複製の際の複製エラーが高頻度に発生することが原因であることを明らかにした。通常の DNA 複製で Pol I が DNA 合成を行う領域は染色体全体の約 0.5 % であるが、その部分だけでの複製エラーの発生頻度上昇だけではこのような変異頻度の著しい上昇は起こせない。細胞内の Pol I の濃度が 24 倍に上昇した場合には、ミスマッチ修復欠損の状況で極めて高い複製エラーの発生頻度が観察されたことから、複製型 DNA ポリメラーゼである Pol III のかわりに Pol I が置き換わってより大きな領域での DNA 合成に参加していると考えられる。

損傷乗り越え合成では、TLS ポリメラーゼが Pol III を置き換えて DNA 複製に参加する。このポリメラーゼの置き換えは、 $\beta$ -clamp を介したポリメラーゼスイッチング反応で生じると考えられている。Pol I が Pol III を置き換えて DNA 複製に参加するのであれば、Pol I も  $\beta$ -clamp を介したポリメラーゼスイッチング反応で Pol III と置き換わることが可能ではないかと考えた (図 17)。

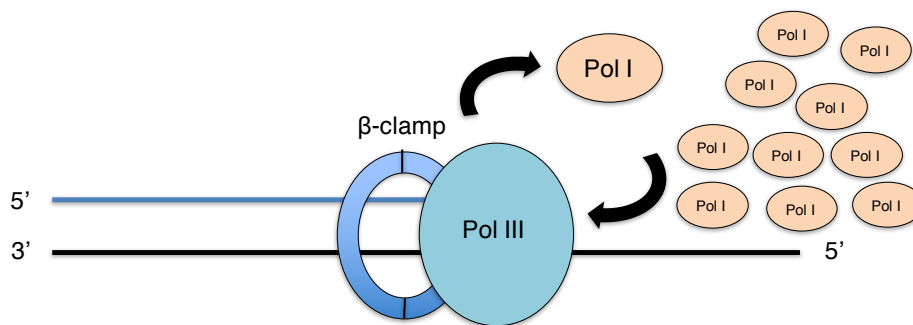


図 17 Pol I が Pol III を置き換えるモデル

Pol I が Pol III を置き換えるとき、 $\beta$ -clamp を介して置き換わり、DNA 複製に参加すると考えた。

## 5. Pol I アミノ酸配列中の $\beta$ -clamp 結合部位配列候補の探索

大腸菌細胞中で Pol I が  $\beta$ -clamp との結合を介して Pol III と置き換わる可能性を検証するために、Pol I のアミノ酸配列中に  $\beta$ -clamp 結合部位の共通配列 (QL(S or D)LF ;  $\beta$ -clamp 結合配列は 5~7 アミノ酸で構成されている可能性が高い) が存在するかどうかを調べた。種々の原核生物で保存されている  $\beta$ -clamp 結合共通配列を参考にして (Dalrymple *et al.*, 2001)、Pol I のアミノ酸配列を調べたところ、 $\beta$ -clamp 結合共通配列によく似た配列を複数見つけることが出来た (図 18)。そこで、これまでに知られている DNA ポリメラーゼと  $\beta$ -clamp の結合は重要な細胞機能に関わっていることから、Pol I に機能的な  $\beta$ -clamp 結合部位が存在するのであれば、原核生物の Pol I にそのアミノ酸配列が広範に保存されていると考え、様々な細菌の Pol I のアミノ酸配列を調べた。大腸菌とは近縁でない細菌も含めて 4 種類の細菌の Pol I アミノ酸配列を解析したところ、8 種類の候補配列の内、一つだけが全ての Pol I に保存されていることが判明した。その配列は大腸菌 Pol I では 587 QTILF 591 である (表 14)。この配列は大腸菌だけではなく、様々な細菌の Pol I においても全配列中のほぼ同様の位置に存在している。このことから、587 QTILF 591 を  $\beta$ -clamp 結合部位の有力候補と判断し、それが実際に  $\beta$ -clamp と結合する機能を持つかどうかを Yeast two-hybrid (Y2H) を用いて検討することにした。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
MVQIQPNPLI LVDGSSYLVR AYHAFPLPTN SAGEPTGAMY GVLNMLRSLI MQYKPTHAHV VFDAKGTFR DELFEHYKSH RPPMPDDLRA QIEPLHAMVK

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AMGLPLLAVS GVEADDVIGT LAREAEKAGR PVLISTGDKD MAQLVTPNIT LINTMTNTIL GPPEVVNKYG VPPELIIDFL ALMGDSSDNI PGVPGVGEKT

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
AQALLQGLGG LDTLYAEPEK IAGLSFRGAK TMAAKLEQNK EVAYLSYQLA TIKTDVELEL TCEQLEVQQP AAEBLLGLFK KYEFKRWTAD VEAGKWLQAK

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
GAKPAAPQPE TSVADAEPEV TATVISYDNY VTILDEETLK AWIAKLEKAP VFAPDTETDS LDNISANLVG LSFALPEGVA AYIPVAHDYL DAPDQISRER

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
ALELLKPLLE DEKALKVQGN LKYDRGILAN YGIELRGIAP DTMLESYILN SVAGRHDMS LAERWLKHKI ITFEEIAGKG KNQLTFNQIA LEEAGRYAAE

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
DADVTLQLHL KMWPDLQKHK GPLNVFENIE MPLVPLSRI ERNGVKIDPK VLHNHSEELT LRLAELEKKA HEIAGEEFNL SSTKQLQTIL FEKQGIKPLK

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
KTPGGAPSTS EEVLEELALD YPLPKVILEY RGLAKLKSTY TDKPLPLMIN KTGRVHTSYH QAVTATGRLS STDPNLQNPV VRNEGRRRIR QAFIAPEDYV

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
IVSADYSQIE LRIMAHLSRD KGLLTAFPAEG KDIHRATAAE VFGLPLETIVT SEQRSSAKAI NFGLIYGMSA FGLARQLNIP RKEAQKYMDL YFERYPGVLE

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
YMERTRAQAK EQGYVETLDG RRLYLDPDIKS SNGARRAAAE RAAINAPMQG TAADIKRAM IAVDAWLQAE QPRVRMIMQV HDELVFEVHK DDVDAVAKQI

910     920     928
HQLMENCTRL DVPLLVVGVG GENWDQAH

```

図 18 Pol I  $\beta$ -clamp 結合部位の候補

$\beta$ -clamp 結合共通配列と論文を参考に (Dalrymple *et al.*, 2001)、8 種類の Pol I  $\beta$ -clamp 結合部位の候補を見つけ出した (赤、青字)。赤字は特に  $\beta$ -clamp 結合共通配列によく似た配列である。



## 6. Yeast two-hybridによるβ-clampとPol Iの相互作用の確認

Pol I β-clamp 結合部位の有力候補を見つけ出すことができたが、この配列がβ-clampとの結合部位であるか検証するために、Yeast two-hybridを用いてPol I断片とβ-clampの相互作用を調べた(図19)。DNAポリメラーゼとβ-clampとの結合は、DNAポリメラーゼのβ-clamp結合部位であるLFの疎水性ポケットにより強く結合することが知られているため、実験では、Pol I β-clamp結合部位の一部である、590、591番のLFをAAに置き換えて、Pol I β-clamp結合部位を不活性化させて行った(Dalrymple *et al.*, 2001)。実験で用いた断片は、540-584番までのPol I断片は、今回発見したPol I β-clamp結合部位を含んでいない。540-601番までのPol I断片はPol I β-clamp結合部位を含んでいる。540-601番(LF→AA)はPol I β-clamp結合部位を含んでいるが、Pol I β-clamp結合部位の590、591番のLFをAAに置換して、Pol I β-clamp結合部位を不活性化している。結果は、baitとpreyを入れ替えても同じ結果となった。540-584番までのPol I断片では、β-clampとの相互作用が見られなかったことに対して、540-601番までのPol I断片では、β-clampとの相互作用が見られた。このことから、Pol I β-clamp結合部位は585から591番の配列であることが示唆される。また、540-601番(LF→AA)のPol I断片では、β-clampとの相互作用が見られなかった。540-601番のPol I断片では、β-clampとの相互作用が見られたことから、590、591番のLFをAAに置き換えるとPol Iとβ-clampの相互作用が見られなくなるということがわかった。よって、590、591番のLFをAAに置換することで、Pol Iとβ-clampの結合が特異的に阻害することができることがわかった(図19)。

β-clamp 結合部位の共通配列 Q<sup>76%</sup>L<sup>41%</sup>(S<sup>34%</sup> or D<sup>22%</sup>)L<sup>77%</sup>F<sup>82%</sup> ※右上の数字は配置頻度  
(Dalrymple *et al.*, 2001)

Pol I sequence	Putative site	Length	Organism
581 SSTKQLQTILFEKQGIKPLK 600	587 QTILF 591	928	<i>Escherichia coli</i>
571 FNIGSLKQLGEILFEKMQLP 590	580 GEILF 584	921	<i>Rickettsia helvetica</i>
561 SPKQLQVVLFEEELGMPKTKR 580	566 QVVL 570	911	<i>Mycobacterium leprae</i>
651 IGSPKQLQTVLQELHLP 670	658 QTVLF 662	997	<i>Treponema pallidum</i>
491 PFNLNSRDQLERVLFDLGL 510	501 ERVL 505	832	<i>Thermus aquaticus</i>

表 14 Pol I β-clamp 結合部位の有力候補

Pol I β-clamp 結合部位の可能性が高い配列を発見することができた。この配列は、大腸菌のみならず、様々な細菌のPol I シークエンスにおいても高い確率で保存されている。

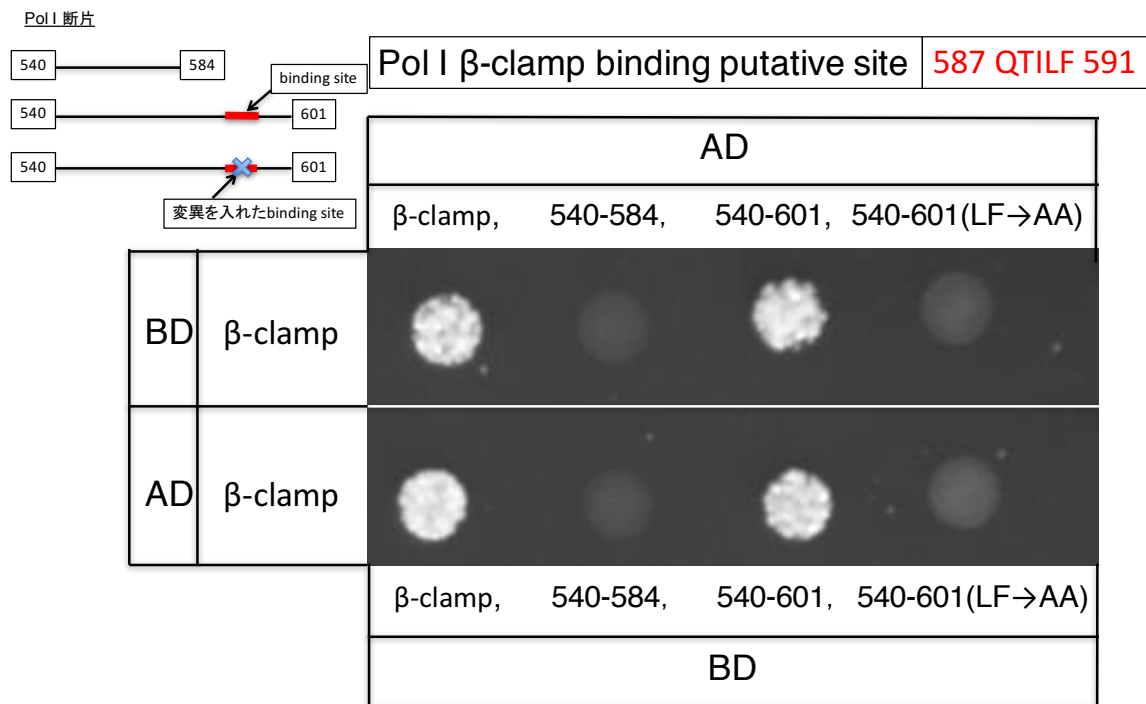


図 19 Yeast two-hybridによる  $\beta$ -clamp と Pol I の相互作用の確認

Yeast two-hybrid により、540-584 Pol I 断片、540-601 Pol I 断片、540-601 (LF→AA) Pol I 断片と  $\beta$ -clamp の相互作用を確認した。実験方法は、材料と方法の 21 Yeast two-hybrid に準じる

## 7. $\beta$ -clamp 結合阻害校正機能欠損 Pol I 過剰発現は変異頻度を著しく上昇させるのか？

これまでの結果から、590、591 番の LF を AA に置換することで、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合を阻害することができることがわかった。過剰発現した Pol I は  $\beta$ -clamp を介して、Pol III を置き換えて DNA 複製に参加することが、私の仮説である。そこで、 $\beta$ -clamp と結合できなくなった校正機能欠損 Pol I を過剰発現させても、Pol III を置き換えて DNA 複製に参加することで、突然変異頻度を著しく上昇させるのか確認した (図 20)。結果は、Pol I  $\beta$ -clamp 結合部位を不活性化させたことにより、校正機能欠損 Pol I を過剰発現しても、変異頻度の上昇は見られなかった。変異頻度の値は、コントロールベクターを持っている野生株と同程度になり、これは  $\beta$ -clamp と結合できなくなった Pol I が  $\beta$ -clamp を介して Pol III を置き換えることができなくなり、DNA 複製に参加することがなくなったため、変異頻度を上げることができなくなったことが示唆された (図 20)。よって、私の仮説である過剰発現した Pol I が  $\beta$ -clamp を介して Pol III を置き換えて DNA 複製に参加することが支持される結果となった。

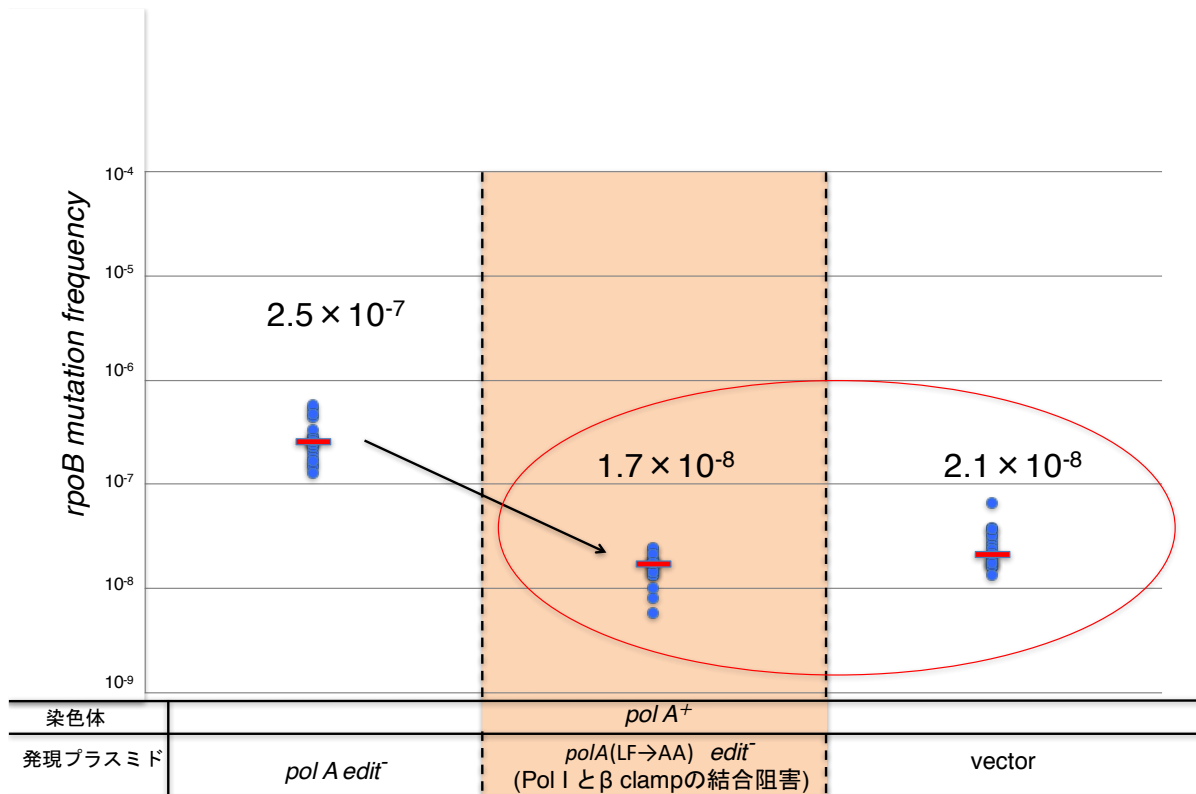


図 20 β-clamp 結合阻害校正機能欠損 Pol I 過剰発現株の突然変異頻度測定

校正機能欠損 Pol I 発現プラスミド保持野生株、校正機能欠損 Pol I (LF→AA) 発現プラスミド保持野生株、コントロールベクター保持野生株の変異頻度測定を行った。実験方法・表記は図 15 に準じる。

## 8. Pol I の機能における Pol I と β-clamp の結合の重要性

本研究により明らかとなった Pol I β-clamp 結合部位は大腸菌のみならず、様々な細菌においても配列が保存されていた。DNA ポリメラーゼと β-clamp の結合は細胞にとって重要な働きがある。Pol III、Pol IV、Pol V などでは、これら DNA ポリメラーゼが β-clamp と結合阻害が生じたときに、細胞にどのような影響が起こるか調べられ、報告されている (Sutton *et al.*, 2005, Lenne-Samuel *et al.*, 2002)。これまで、Pol I は β-clamp と結合せず、単独で働いていると考えられていた。本研究により、初めて Pol I と β-clamp の結合が明らかとなった。そこで、Pol I の生理機能について、いままで解明されていなかった Pol I と β-clamp の結合阻害が生じたときに細胞にどのような影響を及ぼすかについて調べた。

生理機能の観点からは、Pol I は、DNA 複製と DNA 修復に働く DNA ポリメラーゼである。DNA 複製では、岡崎フラグメントのプロセッシングや、ColE1 型プラスミドの DNA 複製の開始に機能する。DNA 修復ではヌクレオチド除去修復や塩基除去修復において修復 DNA 合成を行う。実験では、野生株、*polA1* 株、*polA(LF→AA)* 株を用いた (図 21)。*polA1* 株はこれまで多くの研究者により研究されてきた株で、ポリメラーゼ活性欠損により ColE1 型プラスミドの複製ができないこと、ヌクレオチド除去修復、延期除去修復で修復 DNA 合成ができな

いこと、岡崎フラグメントの蓄積による岡崎フラグメントのプロセシングの遅延が報告されている (Okazaki *et al.*, 1971)。また、DNA リガーゼの温度感受性変異と *polA1* 変異は合成致死を示すことから、*polA1* 株の増殖遅延は岡崎フラグメントのプロセシングの遅延が原因と考えられている。それでは、*polA* (LF→AA) 株ではどうだろうか。*polA* (LF→AA) 株について検証を行った。まずは、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合阻害による影響について、DNA 複製の岡崎フラグメントのプロセシングに着目して調べた。

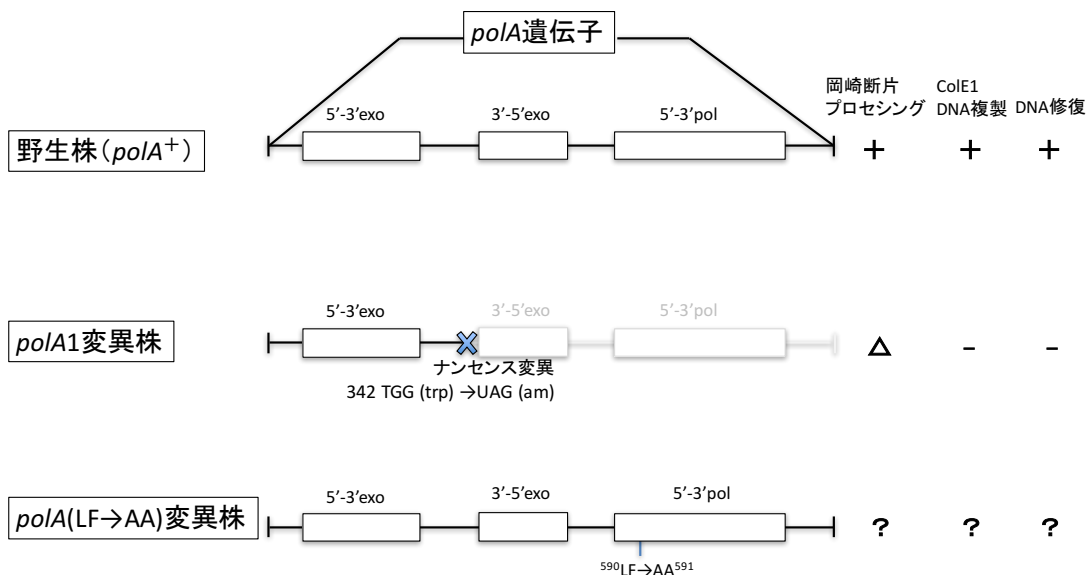


図 21 実験で用いた大腸菌株

Pol I と  $\beta$ -clamp の結合の重要性について、岡崎フラグメントのプロセシング、ColE1 型プラスミド複製、ヌクレオチド除去修復、塩基除去修復において実験に使用した大腸菌株。*polA1* 株は、*polA* 遺伝子にナンセンス変異が生じたことによって、3' -5' エキソヌクレアーゼ活性やポリメラーゼ活性が欠損しており、5' -3' エキソヌクレアーゼ活性のみが働くことができる株である。*polA* (LF→AA) 株は、Pol I と  $\beta$ -clamp の相互作用を阻害した株である。

## 9. Pol I と $\beta$ -clamp の結合阻害による岡崎フラグメントのプロセッシングへの影響

Pol I と  $\beta$ -clamp の結合阻害は、大腸菌の細胞増殖に関わっていると考え、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合阻害による細胞への影響について調べた (図 22)。左は 37 °C 12 h 培養、右が 16 h 培養である。*polA* (LF→AA) 株は、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が阻害された株となっており、*polA1* 株は Pol I の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性を欠損している株であり、ポリメラーゼ活性欠損により修復 DNA 合成をすることができなくなっている。それぞれ、12 h と 16 h の培養結果において、どちらも野生株と比べると *polA* (LF→AA) 株や *polA1* 株では同程度の増殖遅延が見られる (図 22)。また、野生型 Pol I を発現させ相補性試験を行ったところ、野生株では、野生型 Pol I を発現させても生育に影響を与えなかったが、*polA* (LF→AA) 株では野生型 Pol I を発現させたことで、増殖遅延が回復した (図 23)。このことから、*polA* (LF→AA) 株の増殖遅延は Pol I 依存であったことが考えられる。そして、*polA* (LF→AA) 株、*polA1* 株ともに野生型 Pol I を発現させてコロニー形成の比較を行った。すると、野生型 Pol I を発現させたことで、*polA* (LF→AA) 株、*polA1* 株では、増殖遅延が同程度ほど回復した (図 24)。前述した通り、*polA1* 株では岡崎フラグメントの蓄積による岡崎フラグメントのプロセッシングの遅延が報告されている (Okazaki *et al.*, 1971)。また、DNA リガーゼの温度感受性変異と *polA1* 変異は合成致死を示すことから、*polA1* 株の増殖遅延は岡崎フラグメントのプロセッシングの遅延が原因と考えられている。*polA* (LF→AA) 株は *polA1* 株と同程度の増殖遅延が見られていることから、*polA* (LF→AA) 株は岡崎フラグメントのプロセッシングが遅延している可能性が考えられ、岡崎フラグメントのプロセッシングに Pol I と  $\beta$ -clamp の相互作用が関与することが示唆される。

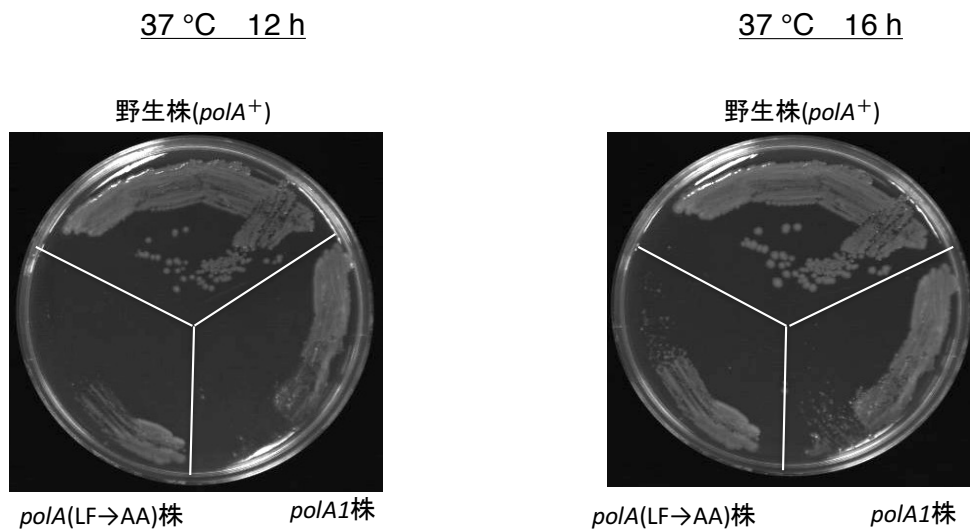


図 22 画線培養によるコロニー形成速度比較

野生株、*polA* (LF→AA) 株、*polA1* 株の LB 培地における 37 °C 12 h、16 h の画線培養を行った。

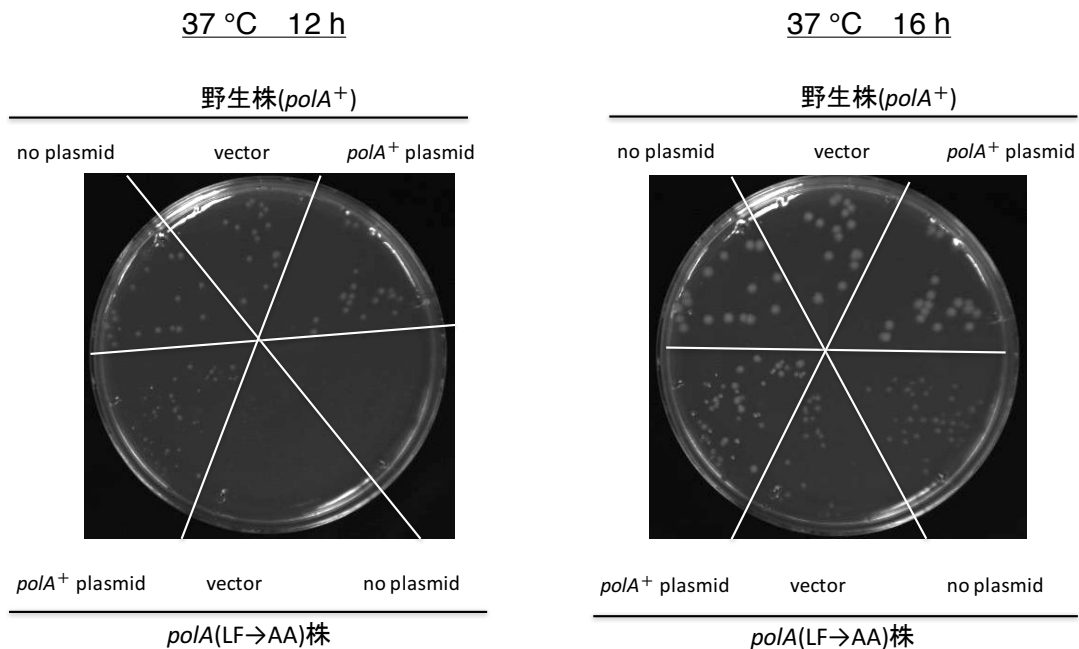


図 23 コロニー形成比較による *polA*(LF→AA) 変異株の相補性試験

野生株、*polA* (LF→AA) 株に pPOLA1 プラスミドを導入して野生型 Pol I を発現させ、LB 培地で 37 °C 12 h 培養、16 h 培養を行った。

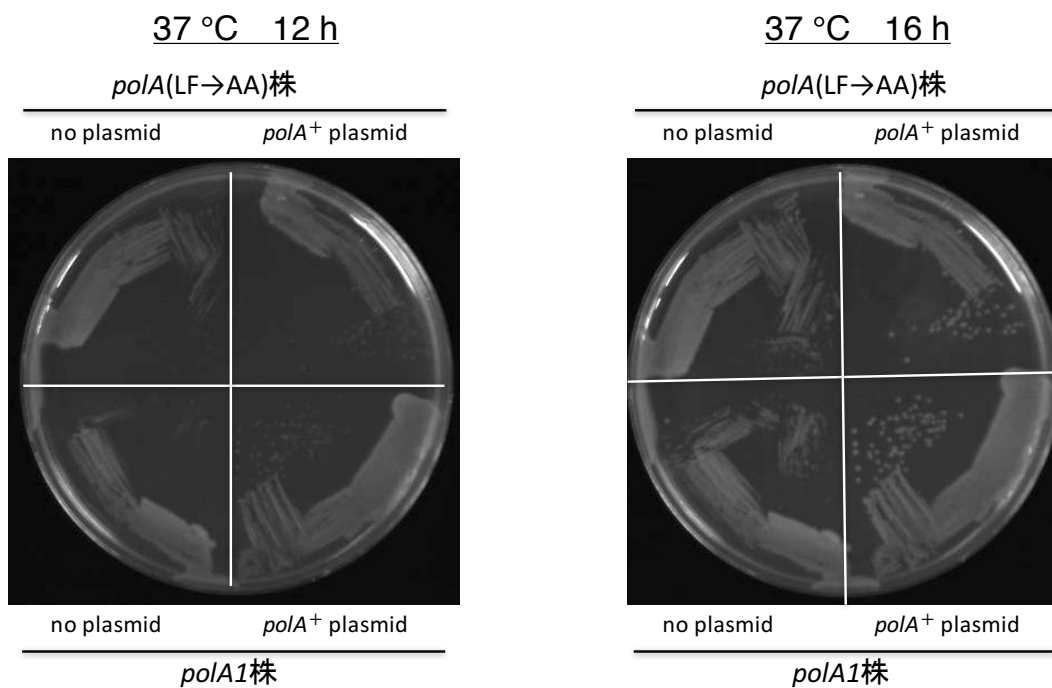


図 24 コロニー形成比較における Pol I の相補性試験

*polA* (LF→AA) 株、*polA1* 株に pPOLA1 プラスミドを導入して野生型 Pol I を発現させ、LB 培地で 37 °C 12 h、16 h の画線培養を行った。

## 10. ColE1 型プラスミドの DNA 複製開始制御での Pol I の働き における $\beta$ -clamp の役割

次に、Pol I の DNA 複製においてのもう一つの役割である ColE1 型プラスミドの DNA 複製について調べた。ColE1 型プラスミドの DNA 複製のリーディング鎖合成では、Pol I が約 100 塩基 DNA 合成を行った後、Pol III が Pol I を置き換えて DNA 複製を行うため、リーディング鎖合成初期段階において Pol I による DNA 合成が必須である。ColE1 型プラスミドを形質転換することで、宿主細胞の Pol I が正常に働くことができるかを確認した。結果は、*polA1* 株では、コロニーを得ることができなかった。これは、Pol I のポリメラーゼ活性が欠損していることで、Pol I による DNA 合成ができないため、プラスミド複製ができないことが示される。しかし、野生株や *polA* (LF→AA) 株では、コロニーを得ることができた。それぞれの形質転換効率は、野生株は  $2.0 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ g、*polA* (LF→AA) 株は  $2.2 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ g と形質転換効率は同程度である (図 25)。

次に、Pol I 非依存性のプラスミド複製を行う F-factor レプリコンを持つ pCC1BAC の形質転換実験を行った (図 26)。pCC1BAC のプラスミド複製には Pol I は必要ではない。よって、Pol I 非依存性のプラスミド複製を行うプラスミドの形質転換を行うことで、ColE1 型プラスミドの形質転換で使用してコロニーが生えてこなかった *polA1* 株のコンピテントセルを確認した。結果は、野生株や *polA1* 株や *polA* (LF→AA) 株の全てにおいてコロニーが検出された。また、形質転換効率も同程度である (野生株 :  $1.2 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ g、*polA1* 株 :  $1.0 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ g、*polA* (LF→AA) 株 :  $1.1 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ g)。これは、Pol I 非依存性のプラスミド複製を行うため、*polA1* 株でもプラスミド複製ができたことが考えられる。よって、今回、形質転換実験に用いた野生株や *polA1* 株や *polA* (LF→AA) 株のコンピテントセルが保証された。これらのことから、ColE1 型プラスミド複製には、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合がなくても正常に行われることや、今回 Pol I に導入した変異により、Pol I のポリメラーゼ活性が失われていないことが明らかとなった (図 25)。



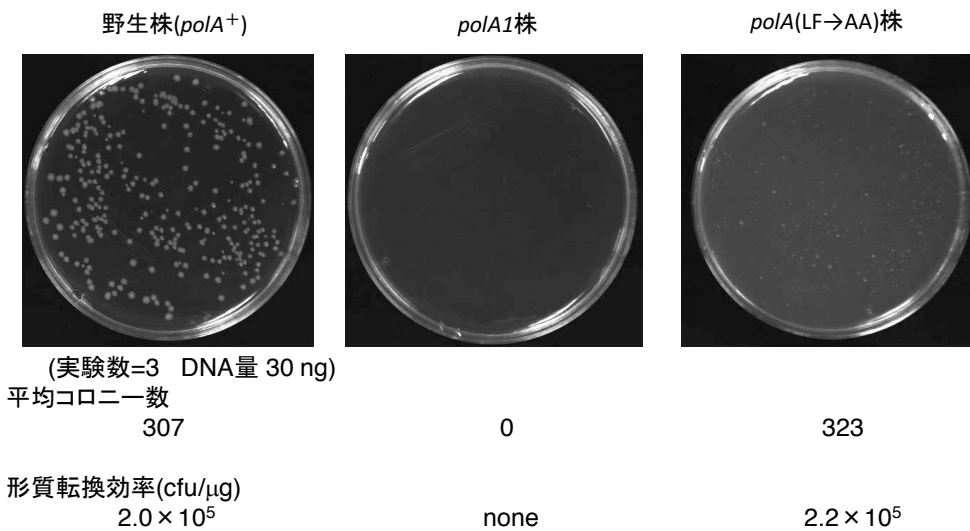


図 25 CoIE1 型プラスミドの形質転換実験

CoIE1 型プラスミド (30 ng) を野生株や *polA1* 株や *polA* (LF→AA) 株へ形質転換を行い、37 °Cで 14 時間培養した。1 株につき 3 実験区行い、そのコロニー数の平均を求め、形質転換効率を算出した。

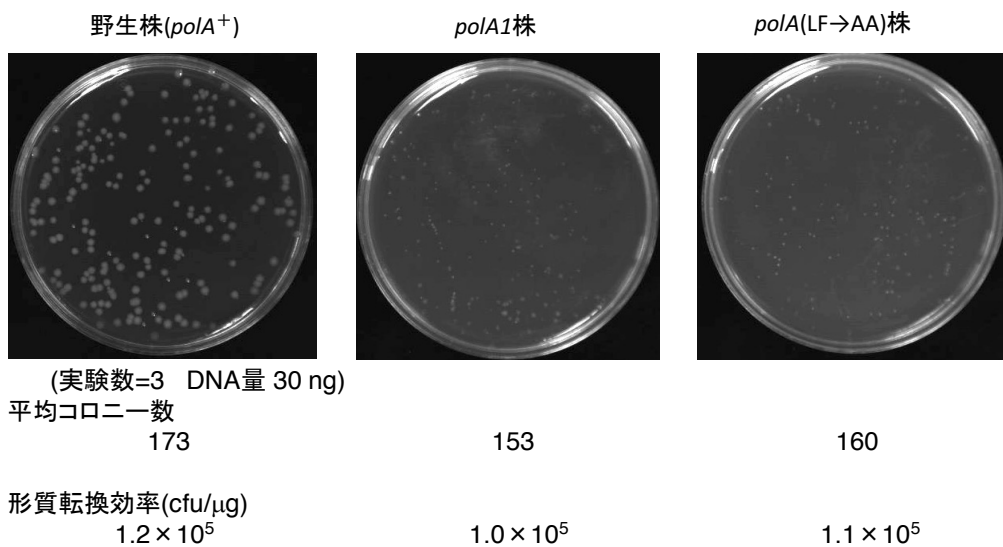


図 26 F-factor レプリコンプラスミドの形質転換実験

F-factor レプリコンプラスミド (30 ng) を野生株、*polA1* 株や *polA* (LF→AA) 株へ形質転換を行い、37 °Cで 14 時間培養した。1 株につき 3 実験区行い、そのコロニー数の平均を求め、形質転換効率を算出した。

## 11. LF-AA 変異型 Pol I の DNA ポリメラーゼ活性測定

変異導入を行ったことで、Pol I のポリメラーゼ活性が失われていないか確認するために、野生型 Pol I と変異型 Pol I のポリメラーゼ活性測定を行った。Pol I の精製には、pGEX6P-1 に野生型 *polA* 遺伝子または変異型 *polA* 遺伝子を導入したプラスミドを作製した (図 27)。作製した pGEX6P-1-*polA* プラスミドと pGEX6P-1-*polA* (LF→AA) プラスミドをそれぞれ MG1655 へ導入し、終濃度 0.1 mM IPTG で誘導を行い、GSTrap (GE ヘルスケア社) を用いて Pol I を精製した。一連の操作は、アフィニティー精製なので、検出はできない残存しているタンパク質のポリメラーゼ活性を調べる必要がある。よって、コントロール標品として、pGEX6P-1 を MG1655 に導入し、同様の操作を行った (図 28)。ODYSSEY infrared imaging systems (LI-COR 社) 及び odyssey アプリケーションソフトウェアを用いて Pol I を定量したところ、野生型 Pol I は 10.5 ng/μl、変異型 Pol I は 10.1 ng/μl であった (図 29)。そして、野生型 Pol I、変異型 Pol I、コントロール標品を用いて Pol I のポリメラーゼ活性を BAS2500 を用いて [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP の取り込み量から測定したところ、コントロール標品は時間経過による放射線感光強度の増加やサンプル量増加による放射線感光強度の増加は見られず、DNA 合成による hook DNA への [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP の取り込みは見られなかった。一方で、野生型 Pol I や変異型 Pol I は両方とも時間経過による放射線感光強度の増加やサンプル量増加による放射線感光強度の増加が見られ、DNA 合成による hook DNA への [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP の取り込みが見られた。その結果、コントロール標品からは、[ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP の取り込みは見られなかったことから残存タンパク質によるポリメラーゼ活性は見られず、野生型 Pol I や変異型 Pol I で [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP の取り込みが見られたのは、Pol I のポリメラーゼ活性によるものであるということが明らかとなった。放射線感光強度による hook DNA への [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP の取り込み量から、野生型 Pol I や変異型 Pol I の質量あたりのポリメラーゼ活性に違いは見られなかった。よって、Pol I (LF→AA) のポリメラーゼ活性は、LF→AA 変異の影響を受けないことが考えられる (図 30)。

**pGEX-6P-1 (28-9546-48)**

PreScission Protease  
 Leu Glu Val Leu Phe Glu<sup>+</sup>Gly Pro<sup>1</sup> Leu Gly Ser Pro Glu Phe Pro Glu Arg Leu Glu Arg Pro His  
 CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT  
 Arg Asp  
 CGT GAC TGA CTG ACC  
 Stop codons  
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I

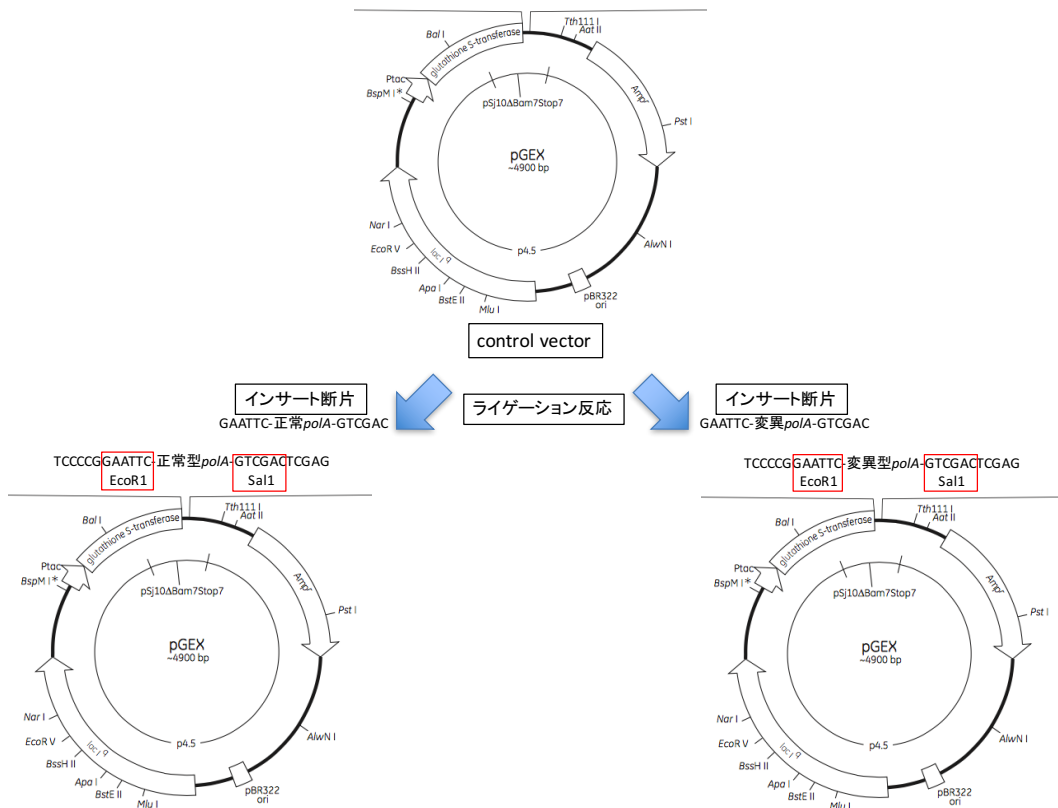


図 27 DNA Ligation によるプラスミドクローニング

Pol I 精製のため、pGEX6P-1 をベクターとして *polA* 遺伝子を挿入した。完成したプラスミドは IPTG 誘導により GST 融合 Pol I を発現する。



マーカー      コントロール標品 (ベクターのみ)      野生型 Pol I      変異型 Pol I      マーカー

図 28 GSTrap を用いたタンパク質精製により取得した Pol I の SDS-PAGE

pGEX6P-1-*polA* プラスミドと pGEX6P-1-*polA* (LF→AA) プラスミドをそれぞれ MG1655 へ導入し、終濃度 0.1 mM IPTG で誘導を行い、GSTrap (GE ヘルスケア社) を用いて Pol I を精製した。SDS-PAGE では、コントロール標品、野生型 Pol I、変異型 Pol I をそれぞれ 7 μl アプライした。実験方法は、採用と方法の 16 SDS-PAGE に準じる。

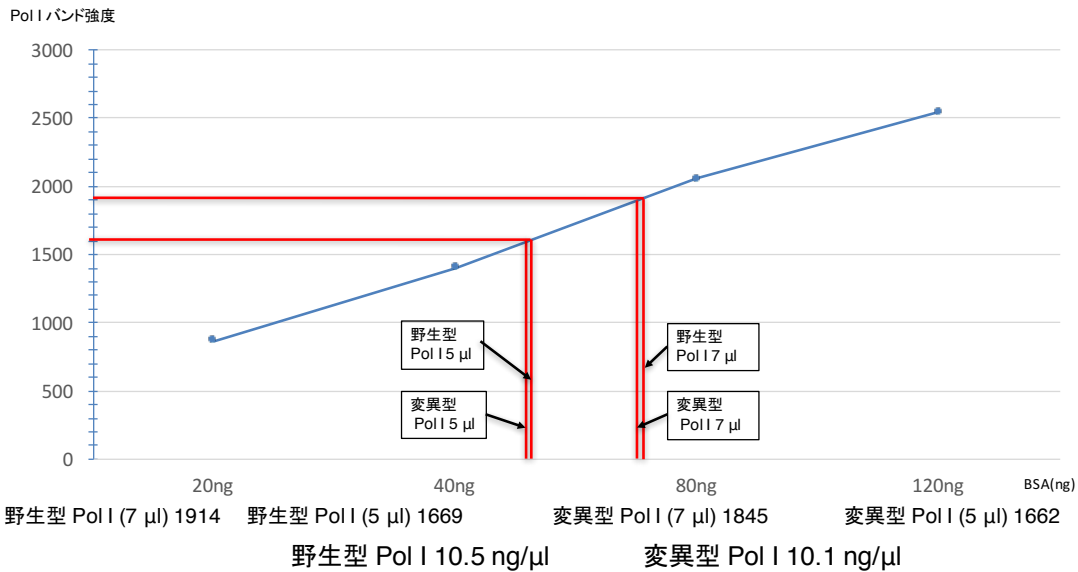
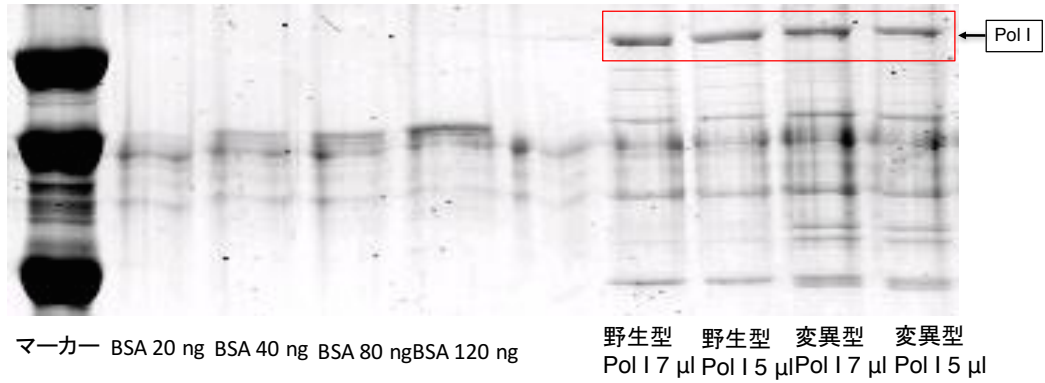


図 29 ODYSSEY infrared imaging systems による精製 Pol I の定量

精製した野生型、変異型 Pol I の定量を ODYSSEY infrared imaging systems (LI-COR 社) 及び odyssey アプリケーションソフトウェアを用いて行った。野生型 Pol I、変異型 Pol I を 5 μl または 7 μl アプライし SDS-PAGE を行い、Colloidal Blue で 12 時間染色を行った。milliQ 水で室温 4 時間の脱色を行った後、ODYSSEY infrared imaging systems (LI-COR 社) 及び odyssey アプリケーションソフトウェアを用いて、Pol I のバンド強度を測定し、定量を行った。標準タンパクとして BSA を用いて標準曲線を作製し、野生型 Pol I、変異型 Pol I それぞれの 5 μl または 7 μl のバンド強度から定量を行った。実験方法は、材料と方法の 18 ODYSSEY infrared imaging systems (LI-COR 社) 及び odyssey アプリケーションソフトウェアを用いた Pol I の定量に準じる。

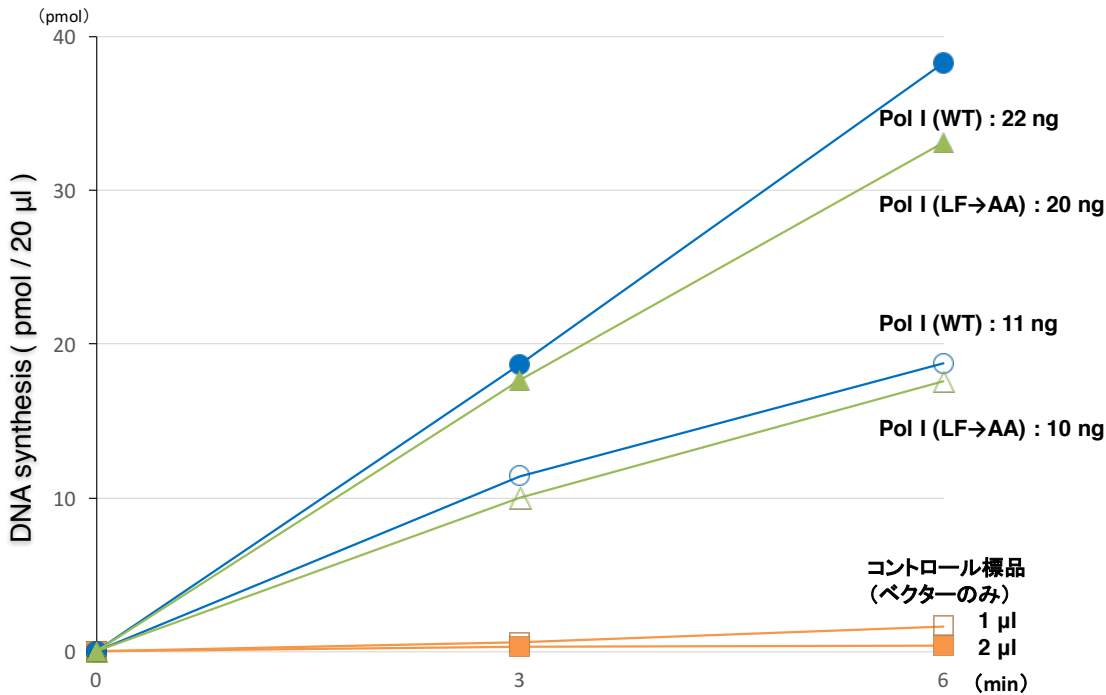


図 30 Pol I ポリメラーゼ活性測定

hook DNA、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP の反応液にコントロール標品、野生型 Pol I、変異型 Pol I をそれぞれ加え、BAS2500 を用いて放射線感光強度を測定し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP の取り込み量から、Pol I ポリメラーゼ活性を測定した。実験方法は、実験と方法の 20 Pol I のポリメラーゼ活性測定に準じる。

## 12. ヌクレオチド除去修復における Pol I と $\beta$ -clamp の相互作用の役割

Pol I は岡崎フラグメントのプロセッシング以外にも、DNA 修復において、修復 DNA 合成を行う。修復 DNA 合成を行うとき、Pol I は  $\beta$ -clamp を頼りに働いていると考え実験を行った。まずは、Pol I が働く DNA 修復であるヌクレオチド除去修復について調べた。紫外線により DNA では隣り合ったチミンがチミンダイマーを形成する。この DNA 損傷を修復するためにヌクレオチド除去修復が働く。Pol I は除去酵素が損傷を取り除いた後、修復 DNA 合成を行っている。Pol I の働きである修復 DNA 合成において、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が阻害されたときに、どのような障害が生じるかについて調べた。実験では、コントロールとして *polA1* 株を用いた。*polA1* 株は、Pol I のポリメラーゼ活性を失っており、修復 DNA 合成が全くできない株として知られている。結果は、UV 2000  $\mu\text{J}$  処理では、野生株、*polA1* 株、*polA* (LF→AA) 株でコロニー形成が見られた。しかし、*polA1* 株は野生株に比べるとコロニーが少なくなっており紫外線感受性が高まっていることが考えられる。*polA* (LF→AA) 株においても、野生株と比べコロニー形成が悪くなっており、紫外線感受性が高まっていることが考えられる。UV 6000  $\mu\text{J}$  処理では、野生株株はコロニーが確認でき、紫外線に対して一定の抵抗を見せた

が、*polA1* 株では、コロニーはほとんど確認できなかった。Pol I のポリメラーゼ活性欠損により、Pol I による修復 DNA 合成ができず、ヌクレオチド除去修復が働くことができず、紫外線感受性が著しく高くなっていることが考えられる。*polA* (LF→AA) 株は野生株に比べるとコロニーが見られず、紫外線感受性が高くなっていることがわかった (図 31)。次に、野生型 Pol I を発現させて、相補性試験を行った (図 32)。結果は、野生株では、野生型 Pol I を発現させても、紫外線照射によるコロニー形成に違いは見られなかったが、*polA1* 株、*polA* (LF→AA) 株では野生型 Pol I を発現させたことで、紫外線照射によるコロニー形成が回復した。このことから、*polA1* 株、*polA* (LF→AA) 株の紫外線照射によるコロニー形成の悪化は Pol I 依存であったということがわかった。*polA1* 株は Pol I のポリメラーゼ活性が欠損していることから、ヌクレオチド除去修復において修復 DNA 合成を行うことができず、紫外線による影響を大いに受けてしまうことが考えられる。*polA* (LF→AA) 株では、*polA1* 株と比べるとコロニー形成が見られたが、野生株と比べると著しくコロニー形成が悪化していることから、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合の阻害がヌクレオチド除去修復の機能に障害を生じさせ、修復 DNA 合成に支障をきたし、コロニー形成の悪さにつながっていることが考えられる。また、*polA1* 株は、*polA* (LF→AA) 株は紫外線感受性が高くなっているが、*polA1* 株に比較して *polA* (LF→AA) 株は少なからずコロニー形成が見られることから、Pol I は  $\beta$ -clamp と結合できなくとも、修復 DNA 合成に参加する可能性が考えられる。これらのことから、*polA* (LF→AA) 株は Pol I が  $\beta$ -clamp との結合阻害により、ヌクレオチド除去修復の修復 DNA 合成において、十分な機能ができていないと示唆され、ヌクレオチド除去修復の働きにおいて Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が重要な働きをしていることが示唆された。

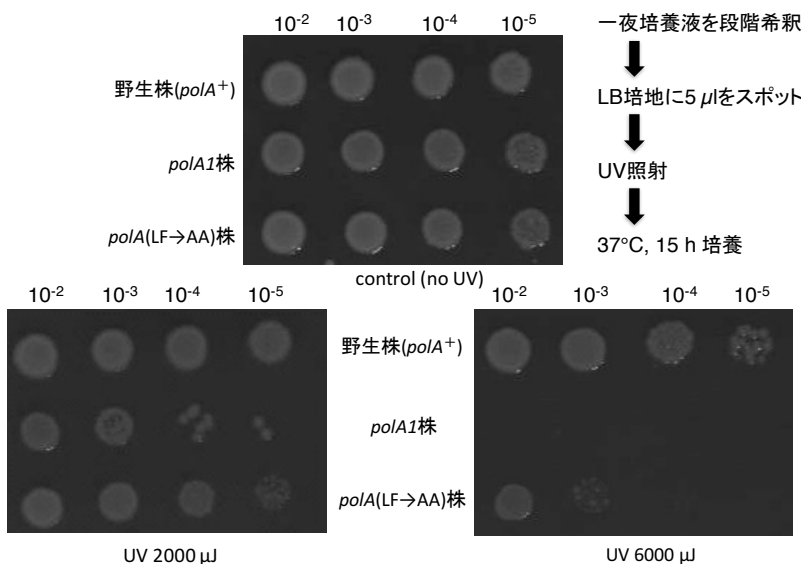


図 31 紫外線処理によるヌクレオチド除去修復の Pol I と  $\beta$ -clamp の関係

一晚培養液を 10<sup>-2</sup>~10<sup>-5</sup>に希釈を行い、5 μl ずつ LB プレートにスポットした。風乾後、2000 μJ、6000 μJ の紫外線処理を行い、野生株、*polA* (LF→AA) 株、*polA1* 株を 37 °C15 時間培養し、コロニー形成を確認した。実験方法は、材料と方法 22 紫外線感受性試験に準じる。

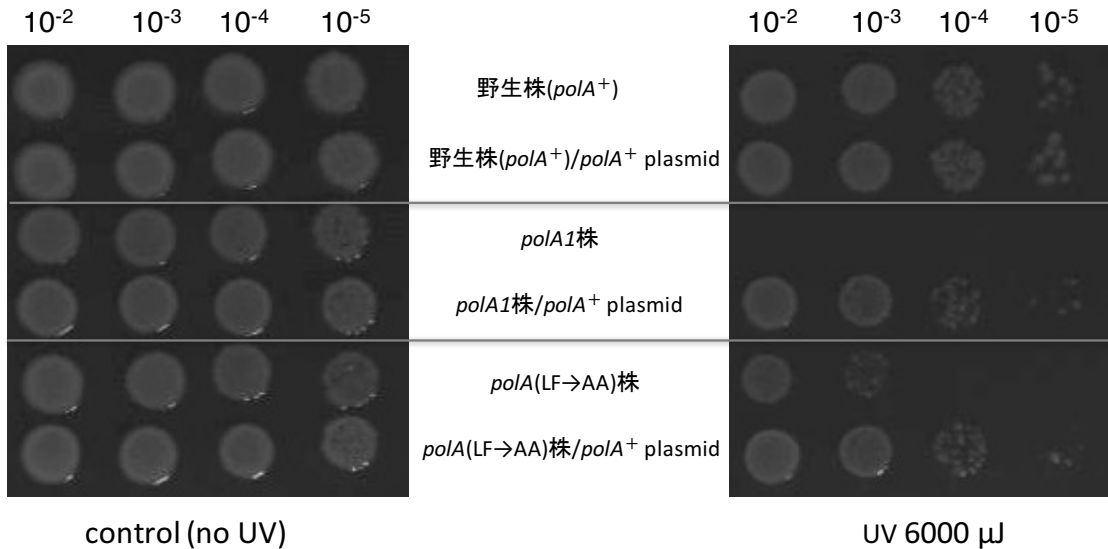


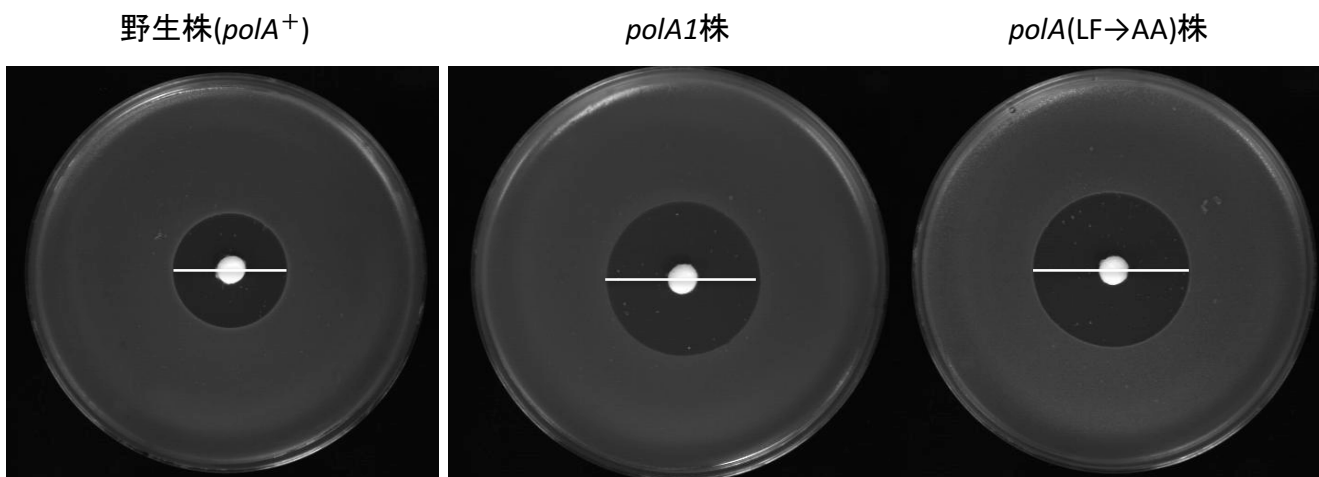
図 32 紫外線感受性を指標にした野生型 Pol I 発現による相補性試験

一晚培養液を  $10^{-2} \sim 10^{-5}$  に希釈を行い、5  $\mu$ l ずつ LB プレートにスポットした。風乾後、6000  $\mu$ J の紫外線処理を行い、野生株、*polA* (LF→AA) 株、*polA1* 株とそれらに pPOLA1 を導入し Pol I を発現させた株を 37 °C 15 時間培養し、コロニー形成を確認した。実験方法は、材料と方法 22 紫外線感受性試験に準じる。

### 13. 塩基除去修復における Pol I と $\beta$ -clamp の相互作用の役割

次に、塩基除去修復について Pol I と  $\beta$ -clamp の結合の重要性について調べた。過酸化水素による、多数の一塩基の酸化 DNA 損傷は塩基除去修復により修復される。塩基除去修復により、これら酸化 DNA 損傷が修復されないと、DNA 複製の停止など、増殖に関わる重大な障害を生じる。塩基除去修復では、Pol I が修復 DNA 合成することで修復が行われる。塩基除去修復において、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が阻害されたときに、どのような障害が生じるかについて調べた。実験はディスクアッセイを行った。中心に置いたろ紙に過酸化水素<sub>2</sub>を含ませることで、過酸化水素感受性に応じて阻止円の大きさが変化することを利用して実験を行った。結果は、野生株と比べると *polA* (LF→AA) 株や *polA1* 株は阻止円が拡大していることがわかり、過酸化水素感受性が高くなっていることがわかった。阻止円の大きさは、*polA* (LF→AA) 株や *polA1* 株が同程度であった (図 33)。次に、野生型 Pol I を発現させて、相補性試験を行った (図 34)。結果は、野生株では、野生型 Pol I を発現させても、阻止円の大きさに影響はなかった。しかし、*polA1* 株、*polA* (LF→AA) 株では、野生型 Pol I を発現させたことで阻止円が縮小することが確認された。阻止円の大きさは、野生株と同程度になってい

る。これらのことから、*polA* (LF→AA) 株や *polA1* 株において、阻止円が拡大した原因は、Pol I 依存であったということがわかり、*polA1* 株は Pol I のポリメラーゼ活性を欠損していることから、塩基除去修復において修復 DNA 合成を行うことができないため、阻止円が拡大したと考えられる。また、*polA* (LF→AA) 株では、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合の阻害が塩基除去修復の機能に障害を生じさせ、修復 DNA 合成に支障をきたし、阻止円の拡大につながったことが考えられる。よって、*polA* (LF→AA) 株は Pol I が  $\beta$ -clamp と結合ができなくなったことにより、塩基除去修復の修復 DNA 合成において、十分な機能ができていないと示唆され、塩基除去修復の働きにおいて Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が重要な働きをしていることが示唆された。



阻止円の直径

2.53 cm

3.31 cm

3.38 cm

(実験数=6の平均値)

図 33 ディスクアッセイを用いた過酸化水素感受性試験

過酸化水素による野生株、*polA* (LF→AA) 株、*polA1* 株の阻止円を測定した。一晚培養液をを希釈し、O. D. 600 = 0.3 になるまで培養を行う。この培養液と 0.8 % ソフトアガーを混合し、LB 培地に流し込む。培養液を風乾後、プレート中央に 0.8 cm 丸ろ紙を置き、そこに 8.8 M 過酸化水素水 (Wako 社) を 20  $\mu$ l 加える。37  $^{\circ}$ C 12 時間培養を行い、阻止円の測定方法は、3つの異なった直径を測定し、その平均を阻止円の直径とした。これを 1 実験区とし、1株につき 6 実験区の直径の平均を測定した。



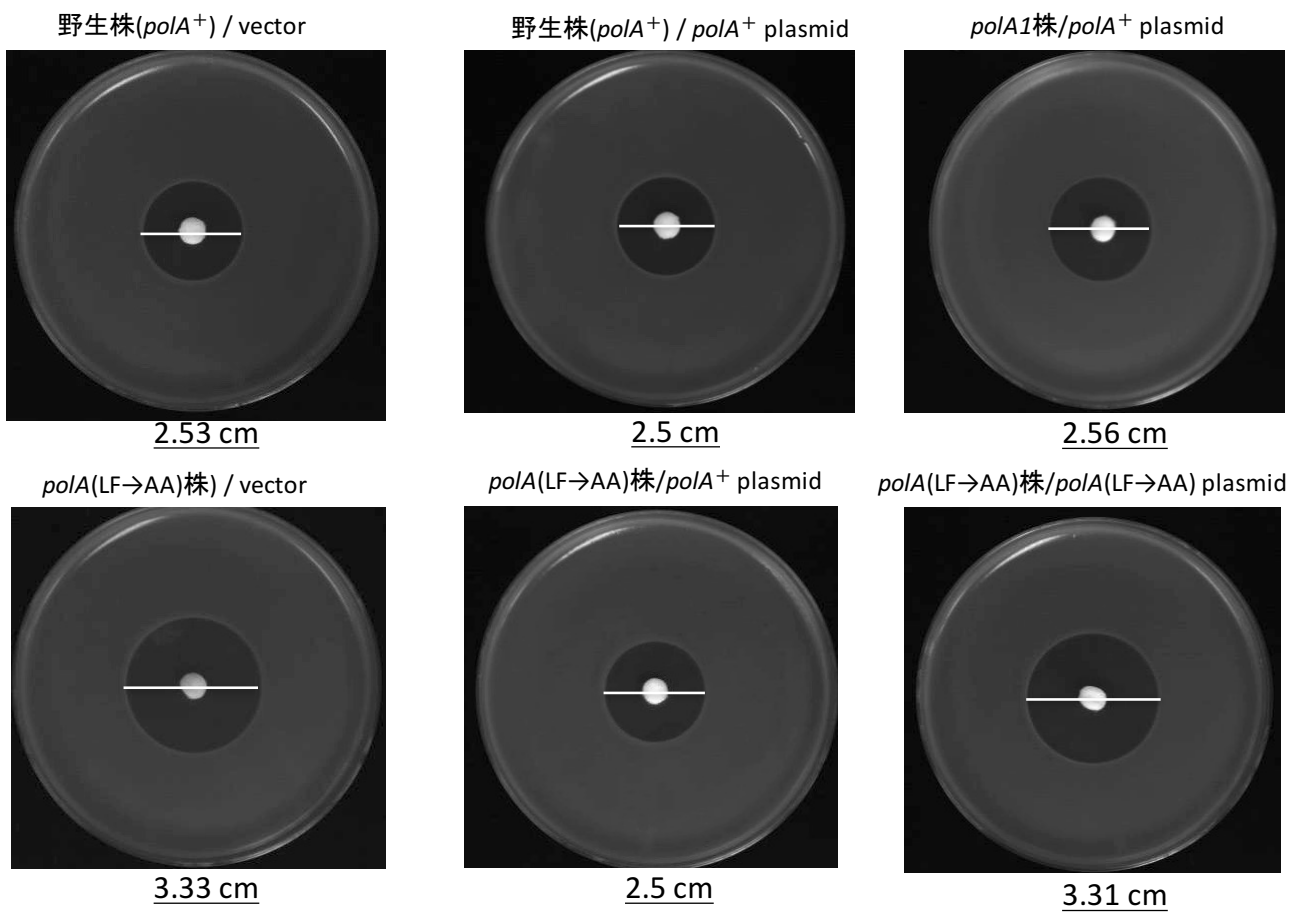


図 34 過酸化水素感受性を指標にした野生型 Pol I 発現による相補性試験  
 過酸化水素処理による、野生株、*polA* (LF→AA) 株、*polA1* 株とそれらに pPOLA1 を導入し Pol I を発現させた株の阻止円を測定した。実験方法は、図 36 に準じる。

## 第4章 考察

### 1. 校正機能欠損 Pol I 過剰発現による突然変異頻度の著しい上昇の原因説明

Pol I は DNA 複製において岡崎フラグメントのプロセッシングを行っている。岡崎フラグメントのプロセッシングにおいて、Pol I は約 10 塩基の DNA 合成を行い、DNA 複製全体の約 0.5 % の小さい DNA 合成を行う。したがって、校正機能欠損 Pol I 株では、突然変異頻度は上昇するが、その上昇値は小さいものとなった。しかし、校正機能欠損 Pol I を過剰発現させると著しく突然変異頻度を上昇させることが確認された。本研究により、この校正機能欠損 Pol I 過剰発現による突然変異頻度の著しい上昇は、DNA 複製における複製エラーにより起こされていることが明らかとなった。しかし、Pol I が働く岡崎フラグメントのプロセッシングだけでは、このような著しい突然変異頻度の上昇を起こすことができない。よって、Pol I は過剰発現すると、Pol III を置き換えて DNA 複製に参加することが示唆された。Pol III は、DNA 複製において  $\beta$ -clamp と結合して DNA 合成を行っている。Pol I が Pol III を置き換えるポリメラーゼスイッチング反応を起こす場合、Pol I は  $\beta$ -clamp を介して、Pol III を置き換えると考えた。そこで、 $\beta$ -clamp 結合阻害の校正機能欠損 Pol I を過剰発現させたところ、突然変異頻度の著しい上昇は見られなくなった。この結果は、過剰発現した Pol I は  $\beta$ -clamp と結合できないためにポリメラーゼスイッチング反応が起こらず、染色体の DNA 複製に参加することができなかつたため、突然変異頻度の上昇は見られなかつたと考えられ、過剰発現した Pol I が Pol III を置き換えて DNA 複製に参加する仮説を裏付ける結果となった。また、通常発現レベルの Pol I では、Pol III を置き換える現象は確認することはできなかつたので、Pol I が Pol III とスイッチする現象は濃度依存であることが考えられる。DNA 上での Pol III と  $\beta$ -clamp との結合は極めて安定で、少なくとも 6 分以内では全く乖離しないことが報告されている (Furukohri *et al.*, 2008)。その報告では、このように安定な複合体に対して、TLS ポリメラーゼである Pol IV は通常細胞内濃度でも Pol III とポリメラーゼスイッチを起こすことが示されている。さらに、生化学的な解析から、Pol IV は Pol III を  $\beta$ -clamp から切り離す能力を有していることが示唆されている。通常の大腸菌細胞内では、Pol I の濃度は Pol IV の 2 倍ほど高い。したがって、Pol I は Pol IV のように積極的に Pol III と  $\beta$ -clamp を乖離させる能力は持っていないか、あるいは持っても Pol IV よりはかなり弱い能力であろうと考えられる。また、 $\beta$ -clamp と相互作用するタンパク質は、 $\beta$ -clamp との複合体の解離定数が小さなものから大きなものまで各種報告されているが、その意味では Pol I と  $\beta$ -clamp の解離定数は大きな部類であろうと想像される。

本研究で見いだされた Pol I と Pol III のポリメラーゼスイッチは、人為的に Pol I の細胞内濃度を上昇させた時に生じるものであり、通常細胞内では起こらないものと考えられる。一方、本研究で明らかになった Pol I の主な生理機能での Pol I と  $\beta$ -clamp の相互作用の役割については、Pol III が結合していない  $\beta$ -clamp との相互作用に意味があると思われる。このことから、Pol I と  $\beta$ -clamp の相互作用の詳細な解析は今後の重要な課題と考えられる。

## 2. 真核生物、原核生物における岡崎フラグメントのプロセッシングでの DNA clamp の役割

原核生物と真核生物の岡崎フラグメントのプロセッシングについて DNA clamp に着目して比較すると、真核生物では、岡崎フラグメントのプロセッシングにおいては、PCNA と Pol  $\delta$  が結合して DNA 複製を行うことが知られている。PCNA と Pol  $\delta$  が結合して DNA 合成を行い、FEN 1 が PCNA と結合して RNA プライマーを除去し、DNA リガーゼ I が PCNA と結合して DNA 鎖をつなげるように、PCNA がキータンパクとして働いている。このように、数々の酵素と結合して重要な役割を果たしている PCNA だが、そもそも DNA clamp の役割としては、sliding clamp と言われているように「連続的な DNA 合成を補助する役割」として知られてきた。そのような PCNA が近年、酵素が働く際の「足場」として、迅速なアクセスに働いていると考えられるようになった (Beattie *et al.*, 2011)。これまで、大腸菌などの原核生物において、岡崎フラグメントのプロセッシングやヌクレオチド除去修復や塩基除去修復における Pol I と  $\beta$ -clamp との関係性については、DNA 合成領域が小さい (約 12 塩基程度) ため、連続的な DNA 合成を補助する役割として  $\beta$ -clamp は必要ではないと考えられていた。しかし、本研究から、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合を阻害することで、細胞増殖の遅延が見られ、*polA1* 株との比較の結果から、岡崎フラグメントのプロセッシングの遅延の可能性が示唆された。これは、 $\beta$ -clamp の連続的な DNA 合成を補助する役割としての側面より、Pol I がニックに対して迅速なアクセスに働いていると考えられる。

## 3. 真核生物、原核生物におけるヌクレオチド除去修復と塩基除去修復での DNA clamp の役割

原核生物と真核生物のヌクレオチド除去修復や塩基除去修復について、DNA clamp に着目して比較を行った。ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復ともに、真核生物では Pol  $\delta$ 、or、Pol  $\epsilon$  が PCNA と結合して修復 DNA 合成することで DNA 修復が行われていることが知られている。このとき、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復で働いている除去酵素が PCNA と結合して働いており、DNA 鎖状に残された PCNA と結合して Pol  $\delta$ 、or、Pol  $\epsilon$  が修復 DNA 合成を行う (Karin *et al.*,2012, Matsumoto *et al.*,2001, Moolenaar *et al.*,2000)。

一方、原核生物においては、これまで  $\beta$ -clamp はヌクレオチド除去修復や塩基除去修復においての Pol I 修復 DNA 合成の働きに関与しないと考えられていた。それは、原核生物のヌクレオチド除去修復や塩基除去修復で働く除去酵素が  $\beta$ -clamp と結合するということがいまだ明らかになっていないためである。しかし、本研究により、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復の十分な機能にとって、Pol I と  $\beta$ -clamp が結合することが重要であることがわかった (図 35)。Pol I は、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復において、 $\beta$ -clamp と結合することで修復 DNA 合成を行うことが示唆された。このことから、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復で働く除去酵素の  $\beta$ -clamp との関連も示唆され、除去酵素の  $\beta$ -clamp との相互作用の解析は今後の重要な課題と考えられる。

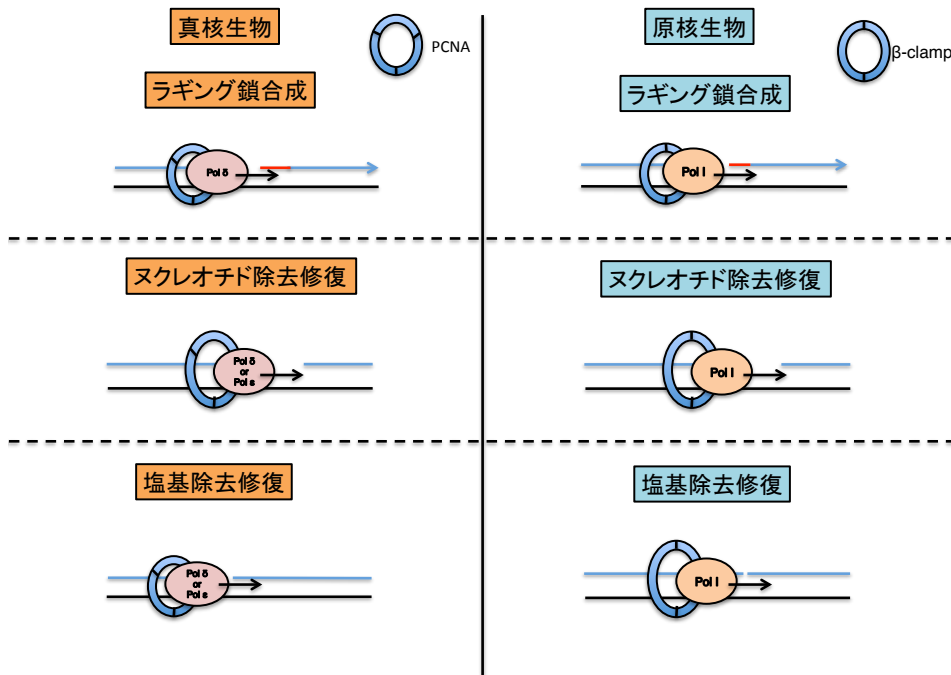


図 35 真核生物、原核生物における、岡崎フラグメントのプロセッシングや DNA 修復の比較

真核生物と原核生物の岡崎フラグメントのプロセッシングや DNA 修復の比較を行った。真核生物では、岡崎フラグメントのプロセッシングや DNA 修復において、DNA ポリメラーゼが DNA clamp と結合して働くということが周知の事実であった。一方で、Pol I が働く DNA 合成では、Pol I は  $\beta$ -clamp と結合せず、単独で働くものとこれまで考えられていた。本研究により、Pol I が DNA 合成を行うためには、 $\beta$ -clamp との結合が重要な役割があったことが明らかとなり、特に、DNA 修復のヌクレオチド除去修復や塩基除去修復において、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復の十分な機能に必要なことがわかった。

#### 4. 大腸菌 DNA ポリメラーゼの $\beta$ -clamp 結合阻害による影響

大腸菌には Pol I から Pol V までの 5 つのポリメラーゼが存在している。DNA ポリメラーゼと  $\beta$ -clamp の結合は Pol I を除いた、Pol II、Pol III、Pol IV、Pol V で確認されていたが、Pol I が  $\beta$ -clamp と結合することに関しては、いまだ明らかになっていない。DNA ポリメラーゼと  $\beta$ -clamp の結合が阻害された場合、大腸菌に生じる影響についてまとめた。Pol III と  $\beta$ -clamp の結合が阻害されると、DNA 複製を行うことができなくなり細胞死が起こる。Pol III と  $\beta$ -clamp の結合阻害で DNA 複製が起こらず、細胞死が起こる理由は、Pol III は DNA 合成領域が非常に大きい DNA ポリメラーゼであるため、 $\beta$ -clamp と結合できないと、Pol III が DNA 鎖から脱落してしまうことで、DNA 複製を正常に行うことができなくなると考えられる。Pol IV、Pol V と  $\beta$ -clamp の結合が阻害されると、損傷乗り越え合成が起こらなくなることが報告されている (Sutton *et al.*, 2005, Lenne-Samuel *et al.*, 2002)。Pol IV、Pol V と  $\beta$ -clamp の結合阻害により、損傷乗り越え合成が起こらない理由は、Pol IV、Pol V は  $\beta$ -clamp を介して Pol III を置き換えようとするポリメラーゼスイッチング反応を起こすが、Pol IV、Pol V が  $\beta$ -clamp と結合できないと、 $\beta$ -clamp を介したポリメラーゼスイッチング反応を起こすことができず、Pol III を置き換えることができなくなるため、損傷乗り越え合成ができなくなったと報告さ

れている(Sutton *et al.*, 2005, Lenne-Samuel *et al.*, 2002)。そして、Pol I と  $\beta$ -clamp の結合が阻害されると、細胞は増殖遅延を引き起こし、DNA 修復が十分に行えないことがわかった。細胞の増殖遅延が生じる理由は、Pol I が  $\beta$ -clamp と結合できないため、岡崎フラグメントのプロセシングの遅延が生じることで、それが DNA 複製の負担になり、細胞の増殖遅延につながっている可能性が示唆される。また、DNA 修復では、Pol I は、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復において、修復 DNA 合成を行っている。 $\beta$ -clamp と結合できなくなった Pol I は、修復 DNA 合成に阻害が生じることで、DNA 修復が十分に行うことができなくなると示唆される (表 17)。

	遺伝子	役割	$\beta$ -clamp 結合阻害による影響 (in vivo)
Pol I	<i>polA</i>	DNA 修復 DNA 複製	・岡崎フラグメントのプロセシングの遅延 ・修復 DNA 合成の阻害
Pol II	<i>polB</i>	TLS	不明
Pol III	<i>dnaE</i> ( <i>dnaQ</i> etc)	DNA 複製	DNA 複製が起こらない
Pol IV	<i>dinB</i>	TLS	TLS が起こらない
Pol V	<i>umuC</i> <i>umuD</i>	TLS	TLS が起こらない

(Sutton *et al.*, 2005)  
(Lenne-Samuel *et al.*, 2002)

表 15 大腸菌 DNA ポリメラーゼの  $\beta$ -clamp 結合阻害による影響

in vivo における大腸菌 DNA ポリメラーゼの  $\beta$ -clamp 結合阻害における影響についてまとめた。

## 5. DNA ポリメラーゼ I と $\beta$ -clamp の結合の重要性

DNA ポリメラーゼと  $\beta$ -clamp の結合の重要性については 3 点考えられる。1 点目は、「DNA ポリメラーゼが  $\beta$ -clamp と結合することで、鋳型 DNA 鎖から DNA ポリメラーゼが脱落せず、長い領域の DNA 合成を安定的に早い速度で行うことができること」が考えられる。2 点目は、「複数の DNA ポリメラーゼの間で、DNA 鎖上の  $\beta$ -clamp を足場にしたポリメラーゼスイッチを可能にすること」が考えられる。3 点目は、「DNA 鎖上の  $\beta$ -clamp を標的として、各種のタンパク質が DNA 鎖上の特定の部位に迅速にアクセスすることを可能にすること」が考えられる。このように、DNA ポリメラーゼと  $\beta$ -clamp の結合は、DNA ポリメラーゼの DNA 合成の効率化に寄与し、DNA 複製や DNA 修復をスムーズに行うために重要であることが示唆される。これらの考えの中でも、3 点目の DNA 鎖上の  $\beta$ -clamp を標的として、各種のタンパク質が DNA 鎖上の特定の部位に迅速にアクセスすることが、Pol I にとっての  $\beta$ -clamp の必要性であると考えられる。Pol I は、岡崎フラグメント末端部位や、除去修復での修復合成

が必要な部位を認識して結合するために、 $\beta$ -clamp を標的とした迅速なアクセスに利用している可能性が考えられる。Pol I は二本鎖 DNA に対する親和性は弱い、二本鎖 DNA 中のニック部位には安定に結合することが知られている。しかし、4.2 Mbp の染色体 DNA に対して、次々と Pol I がニックトランスレーションを行なっていく中で、1、2カ所しか存在しないニック部位を Pol I が見つけ出すには長い時間がかかると思われる。岡崎フラグメント末端部位の付近に  $\beta$ -clamp が存在していれば、Pol I はニックよりも大きな構造である  $\beta$ -clamp との相互作用を利用して、迅速にニック部位にアクセスすることが可能になる。損傷修復の場合においても、染色体 DNA に対して、損傷箇所をピンポイントに見つけ出すには長い時間がかかると思われる。Pol I は、除去酵素が  $\beta$ -clamp を利用して損傷を除いた後、DNA 鎖上に残った  $\beta$ -clamp を標的とすることで、迅速にギャップ部位にアクセスすることが可能になる。または、二本鎖 DNA を移動することができる  $\beta$ -clamp が、損傷箇所付近を物理的に越えられず  $\beta$ -clamp が一時的に滞留することで、除去酵素に損傷が除かれたギャップを、Pol I が  $\beta$ -clamp との相互作用を利用して、迅速にギャップ部位にアクセスすることが可能になる。このように、Pol I が DNA 合成を行うに際し、迅速にアクセスできることが、Pol I にとっての  $\beta$ -clamp との結合の重要性であると考えられる (図 36)。Pol I が迅速にアクセスするには Pol I がどこに存在しているかということが重要になる。Pol I の局在については、repetitive DNA sequences (REP 配列) に Pol I が結合することが知られている (Gilson *et al.*,1990)。しかし、現在は REP 配列については研究されておらず、Pol I と  $\beta$ -clamp の相互作用によって、Pol I の局在探索のための REP 配列の解析は、今後の重要な課題と考えられる。

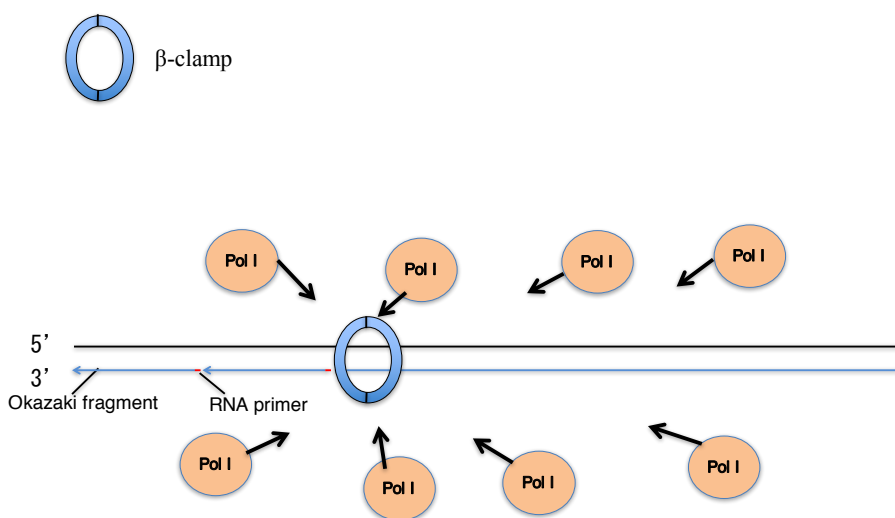


図 36 DNA ポリメラーゼ I と  $\beta$ -clamp の結合の重要性

岡崎フラグメントのプロセッシングにおける Pol I の  $\beta$ -clamp との結合の重要性については、Pol I が約 12 塩基までの DNA 合成を行うことから、長い領域の連続的な DNA 合成のために  $\beta$ -clamp が必要であるとは考えにくく、4.2 Mbp の染色体の中から、岡崎フラグメントのプロセッシングでの 1、2 箇所のニックや DNA 修復での合成領域を見つけるために  $\beta$ -clamp を標的とすることで、迅速にアクセスできることが重要であると考えられる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導ならびに御助言をいただきました皆様には深く感謝申し上げます。本研究において、全般的に懇切丁寧な御指導、御助言をしてくださいました真木寿治教授、Pol I の精製・活性測定において懇切丁寧な御指導、御助言をしてくださいました秋山昌広准教授、古郡麻子助教には深く感謝申し上げます。また、本研究を通して、成長する機会や環境を与えてくださったことにも深く感謝申し上げます。そして、アドバイザー教員であります高木博史教授、木俣行雄准教授には、非常に有意義な助言、議論を賜り、ときには温かな御言葉をかけていただきましたことに深く感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたり、環境整備に御尽力くださいました府川奈美秘書には深く感謝申し上げます。そして、真木研究室の皆様には、多くのご協力を頂いたことに深く感謝申し上げます。最後に、大学院進学のことを理解していただき、今日に至るまで精神的、経済的に私を支えていただいた両親に感謝申し上げます。

## 参考文献

- Beattie TR, Bell SD (2011) The role of the DNA sliding clamp in Okazaki fragment maturation in archaea and eukaryotes. *Biochem Soc Trans.* 39:70-76
- Bunting KA, Roe SM, and Pearl LH (2003) Structural basis for recruitment of translesion DNA polymerase Pol IV/DinB to the beta-clamp. *EMBO J.* 22: 5883-5892
- Dalrymple BP, Kongsuwan K, Wijffels G, Dixon NE, and Jennings PA (2001) A universal protein-protein interaction motif in the eubacterial DNA replication and repair systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 11627-11632
- Datsenko KA, Wanner BL. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6640-664
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-6145
- Downey CD and McHenry CS (2010) Chaperoning of a replicative polymerase onto a newly assembled DNA-bound sliding clamp by the clamp loader. *Mol Cell.* 4: 481-491
- E Gilson, D Perrin, and M Hofnung (1990) DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to E. coli palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. *Nucleic Acids Res.* 18: 3941-3952
- Francisco J. López de Saro and Mike O'Donnell (2001) Interaction of the  $\beta$  sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 8376-8380.
- Furukohri A, Goodman MF, 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
- Georgescu RE, Yurieva O, Kim SS, Kuriyan J, Kong XP, and O'Donnell M (2008) Structure of a small-molecule inhibitor of a DNA polymerase sliding clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 11116-11121
- Georgescu RE, Langston L, Yao NY, Yurieva O, Zhang D, Finkelstein J, Agarwal T, O'Donnell ME.



(2014) Mechanism of asymmetric polymerase assembly at the eukaryotic replication fork. *Nat Struct Mol Biol.* 21:664-670

Hasegawa K, Yoshiyama K, Maki H (2008) Spontaneous mutagenesis associated with nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Genes Cells.* 13:459-469

Karin M. Gilljam, Rebekka Müller, Nina B. Liabakk, and Marit Otterlei (2012) Nucleotide Excision Repair Is Associated with the Replisome and Its Efficiency Depends on a Direct Interaction between XPA and PCNA. *PLoS One.* 7: e49199

Lahue RS, Au KG, Modrich P (1989) DNA mismatch correction in a defined system. *Science.* 245:160-164

Lindahl T (2013) My journey to DNA repair. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 11:2-7

López de Saro FJ, Marinus MG, Modrich P, and O'Donnell M (2006) The beta sliding clamp binds to multiple sites within MutL and MutS. *J Biol Chem.* 281: 14340–14349

Lu Zhang, James R Alfano, and Donald F Becker (2014) Proline metabolism increased katG expression and oxidative stress resistance *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 197:431-440

Makiela-Dzbencka K, Jaszczur M, Banach-Orlowska M, Jonczyk P, Schaaper RM, and Fijalkowska IJ (2009) Role of *Escherichia coli* DNA polymerase I in chromosomal DNA replication fidelity. *Mol Microbiol* 74: 1114-1127

Makiela-Dzbencka K, Jonczyk P, Schaaper RM, Fijalkowska IJ. (2011) Proofreading deficiency of Pol I increases the levels of spontaneous rpoB mutations in *E. coli*. *Mutat Res.* 712: 28-32

Matsumoto Y (2001) Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. *Nucleic Acid Res.* 68:129-138

Moolenaar GF, Moorman C, and Goosen N (2000) Role of the *Escherichia coli* nucleotide excision repair proteins in DNA replication. *J Bacteriol.* 20: 5706-5714

Nathalie Lenne-Samuel, Jerome Wagner, Helene Etienne and Robert P P Fuchs (2002) The processivity factor  $\beta$  controls DNA polymerase IV traffic during spontaneous mutagenesis and translesion synthesis in vivo. *EMBO reports.* 3:45-49

- Pandey P, Tarique KF, Mazumder M, Rehman SA, Kumari N, and Gourinath S (2016) Structural insight into  $\beta$ -Clamp and its interaction with DNA Ligase in *Helicobacter pylori*. *Sci Rep*. 10.1038/srep31181.
- Patoli AA, Winter JA, and Bunting KA (2013) The UmuC subunit of the *E. coli* DNA polymerase V shows a unique interaction with the  $\beta$ -clamp processivity factor. *BMC Struct Biol*. 10.1186/1472-6807-13-12.
- Pillon MC, Miller JH, and Guarné A (2011) The endonuclease domain of MutL interacts with the  $\beta$  sliding clamp. *DNA Repair*. 10: 87-93
- Reiji Okazaki, Mikio Arisawa, and Akio Sugino (1971) Slow Joining of Newly Replicated DNA Chains in DNA Polymerase I-Deficient *Escherichia coli* Mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68: 2954-2957
- Sambrook J and Russell D. W (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.
- Sancar A, Rupp WD (1983) A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*. 33:249-260
- Stanley N. Cohen, Annie C. Y. Chang, and Leslie Hsu (1972) Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69: 2110-2114
- Sutton MD, Duzen JM, and Maul RW (2005) Mutant forms of the *Escherichia coli* beta sliding clamp that distinguish between its roles in replication and DNA polymerase V-dependent translesion DNA synthesis. *Mol Microbiol*. 55: 1751-1766
- Wang Z, Yuan Z, and Hengge UR (2004) Processing of plasmid DNA with ColE1-like replication origin. *Plasmid*. 51: 149-161