

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	原核生物分子遺伝学講座 (真木寿治 教授)		
氏 名	菅谷 豊	提 出	平成14年 1月 8日
題 目	大腸菌 <i>dnaE173</i> ミューテーター変異型DNA ポリメラーゼIII ホロ酵素のDNA鎖伸長反応における運動特異性		
要旨 大腸菌の染色体複製を担うDNAポリメラーゼIII (PolIII) ホロ酵素は、1) 極めて高いプロセッシビティー、2) 速いDNA鎖伸長反応、3) 高い複製の忠実度、などの複製酵素としての特徴を有しており、これらの特徴はこの酵素を構成している10種のサブユニットの協調的な作用によると考えられている。その忠実度は酵素に内在の校正機能により非常に高く保たれているが、ごく稀に生じた複製エラーがミスマッチ修復等により修正されない場合、突然変異として固定される。自然突然変異の発生部位が塩基配列に強く依存する当研究室の観察結果等から、複製エラーの起こり易さは鋳型配列の構造に大きく影響を受けると考えられる。また校正機能を欠損した変異型PolIIIは配列特異的に極めて高頻度に突然変異を誘発することが明らかになっている。 著者らは、PolIIIホロ酵素の鋳型DNA上での運動特異性が複製エラーの発生に深く関与している可能性を検証し、PolIIIホロ酵素の運動性に対する校正機能の関与を明らかにする目的で、野生型及び校正機能を欠損した<i>dnaE173</i>及び<i>dnaQ32</i>の両ミューテーター変異型の精製PolIIIホロ酵素を用いて、PolIIIホロ酵素の鎖伸長反応における運動特異性の解析を行った。 DNAポリメラーゼ活性を担うαサブユニットに欠損を生じた<i>dnaE173</i>変異型PolIIIホロ酵素は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は正常であるにも関わらず校正機能をほぼ完全に失っていることが明らかになっている。この変異型酵素が複製開始複合体からの同調的DNA鎖伸長反応で野生型酵素と顕著に異なる運動特異性を示すことを見出した。変異型酵素は野生型に比較してDNA鎖伸長速度が約1/3に低下し、DNA合成のポージングに強い抵抗性を獲得していた。さらにこの変異型酵素は、クランプとして働くβサブユニットが存			

在しない場合でも極めて高いプロセッシビティーを示した。一方、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を担うεサブユニット内の活性中心における点突然変異により校正機能を欠損した*dnaQ32*変異型PolIIIホロ酵素は、配列依存的にポーピングする傾向が強く、著しいプロセッシビティーの低下が示唆されたが、酵素学的性質は野生型PolIIIホロ酵素に類似していた。これらのことから、校正機能の働きがDNA合成のポーピングおよびプロセッシビティーに大きく影響を与えていることが示唆され、DNA合成機構の新たなモデルを構築するに至った。

また、DNA鎖伸長反応におけるPolIIIホロ酵素の鋳型上での動態と複製エラーの発生の相関を検証するために、これまで前進突然変異検出に用いてきた大腸菌*rpsL*遺伝子上でのPolIIIホロ酵素の挙動の解析を試みた。*rpsL*遺伝子のいずれか一方の鎖を含むM13ファージ由来のssDNAを鋳型とした開始複合体からの同調的DNA鎖伸長反応産物を、変性ゲル電気泳動及びサザンハイブリダイゼーション法を用いて観察する系を構築した。野生型及び*dnaE173*変異型PolIIIホロ酵素を用いた解析において、高速度のDNA合成過程においてもDNA合成中間産物の蓄積量には塩基配列ごとに有意な差が観察され、鋳型塩基配列がDNA鎖伸長反応の速度やPolIIIの挙動に影響を与えていることが明らかになった。両酵素間において若干の差異も観察されたが、突然変異発生との明らかな相関は観察されなかった。

博士学位論文

大腸菌 *dnaE173* ミューテーター変異型DNA ポリメラーゼIIIホロ酵素の
DNA鎖伸長反応における運動特異性

菅谷 豊

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14年1月8日提出

目次

第一章 序論

1. 自然突然変異とミューテーター	1
2. 大腸菌 Pol III ホロ酵素	3
3. 校正機能のメカニズムと意義	10
4. <i>dnaE173</i> ミューテーター	14
5. 本研究の目的	18

第二章 結果

1. <i>dnaE173</i> Pol III*の精製	19
2. 校正機能の欠損について	20
3. Pol III ホロ酵素による burst DNA synthesis	21
4. SSB 濃度による影響	22
5. イオン強度による影響	24
6. 基質 dNTP 濃度による影響	25
7. Pol III*におけるプロセッシビティの観察	29
8. <i>dnaQ32</i> Pol III ホロ酵素による burst DNA synthesis	31
9. サザンハイブリダイゼーションによるポージング配列解析	33

第三章	考察	37
第四章	材料と方法	
試薬、機器		44
<i>dnaE173</i> 変異型 Pol III*の精製、その他大腸菌酵素		45
Pol III*標準 DNA ポリメラーゼアッセイ (M13 ssDNA)		47
Pol III ホ口酵素 burst DNA 合成		48
Pol III* DNA ポリメラーゼアッセイ (poly(dA)/oligo(dT))		49
サザンハイブリダイゼーションによるポーシング配列解析		50
引用文献		53
和文献		58
謝辞		59
図表		60

第一章 序論

1. 自然突然変異とミューテーター

生命現象の基礎である遺伝情報の維持は、あらゆる生物に普遍的に最も重要な命題である。突然変異による遺伝子産物の機能欠損は、形態異常や疾病の原因であり、生命活動にとって最も回避が必要な障壁である。一方で、環境や生活様式の変化への適応に必要な多様性を進化としてもたらしてきたのも突然変異であり、その意味で不可欠な事象であるとも言える。その突然変異制御の絶妙なバランスこそが生命を根幹から支えて来たものであり、また非常に興味深い生命現象である。普遍的に生物が抱えるこの一見矛盾した現象について分子レベルでの理解を深めることは、単に医学の発展や進化のメカニズムの解明に寄与するだけでなく、生命の本質の理解に直結するものとして重要だと考える。

一般的に突然変異といえば紫外線や放射線、変異原化合物など、外的な要素によりもたらされる DNA の傷害に起因するものとの認識が強いが、細胞は内在的にも非常に高い突然変異形成の危険性を抱えている。このような、生物が通常生命活動を行う中で主に内在性の要因により生じる突然変異を自然突然変異と称し、これこそが進化や疾病の主たる原因ではないかとする考えも一般化してきた。自然突然変異の発生は通常 $10^{-10} \sim 10^{-9}$ /塩基対/細胞分裂という極めて低い頻度に抑えられているが(Drake 1969)、これが細胞自身にやはり内在の様々な機能によるものであることが、1950 年代に端を発したミューテーターと総称される自然突然変異を高頻度に誘発する変異体の解析によって明

らかにされてきた。このミューテーター研究は大腸菌において最も多くの知見が得られており、そこから細胞の自然突然変異抑制機構の全体像が描かれてきた。表1にこれまで大腸菌において見いだされた主なミューテーター遺伝子を示すが、DNA複製に直接あるいは間接的に関与するものに占められている事が分かる(Kornberg and Baker 1992)。遺伝情報に変化が生じる危険度が最も高い過程の一つと言えるDNA複製は、非常に忠実度の高い複製酵素DNAポリメラーゼIII (Pol III) によって主に遂行されているが、このポリメラーゼを構成する α 触媒サブユニットをコードする *dnaE* 遺伝子や校正機能を担う ϵ 3'→5'エキソヌクレアーゼサブユニットをコードする *dnaQ* 遺伝子は、それぞれの変異体における自然突然変異頻度の高さからも顕著な重要性が分かる。 α サブユニットがPol IIIとして行うDNA合成が高い忠実度で行われ、そこで生じたエラーも殆どがPol IIIに内在の校正機能により修正されている事を示している。この段階までに修正されずに残った複製エラーも、複製後直ちにミスマッチ修復系により修正され、実際の突然変異頻度はさらに低く抑えられている。また、基質ヌクレオチドやDNA上の塩基の酸化損傷として生じる8-オキシグアニンやウラシルなど自然DNA損傷と呼ばれるものも、正常なワトソン・クリック型塩基対とは異なる塩基対を形成する事により複製エラーをもたらすが、細胞はそれらに対しても分解酵素やミスマッチ特異的修復酵素などを備え突然変異発生を未然に防いでいる。その他ミューテーターとして変異株が分離された遺伝子群についても、いずれもがDNA複製と深い関わりを持つものである。当然の事であるが、細胞が遺伝情報を維持する上で最も重要なス

トップがDNA複製であるという事である。

2. 大腸菌 Pol III ホロ酵素

当研究室では自然突然変異形成及び抑制のメカニズムを理解する目的で、遺伝学的にも生化学的にも最も有用な材料といえる大腸菌において、上記のようなミューテーターを用いた解析を行い多くの知見を得てきた。中でもPol IIIを構成する*dnaE*及び*dnaQ*遺伝子変異型ミューテーターについて、これらの遺伝子産物の機能が極めて重要であるとの認識のもと研究が進められてきた(Horiuchi *et al.* 1978; Maki *et al.* 1983; Maruyama *et al.* 1983; Takano *et al.* 1986; Maki *et al.* 1991; Mo *et al.* 1991)。Pol IIIはDNA複製のメカニズム研究という意味においても最も理解の進んだ酵素の一つであり、その機能の多くはあらゆる生物に普遍的なものである。ここでこの酵素について簡単にまとめる。

DNAポリメラーゼの発見以降、現在までに幅広い生物種より多数のDNAポリメラーゼが分離同定され、その構造、機能、作用機序などが研究対象とされてきたが、それらの存在意義は多岐に渡り、ゲノム複製やDNA修復など新規DNA合成が必要とされる局面においてそれぞれの特性に応じて合理的に機能していることが明らかにされている。大腸菌においては現在までにPol IからVまで5種類のDNAポリメラーゼが分離されているが(Kornberg and Baker 1992)、そのうち連続DNA合成能力（プロセッシビティ）や忠実度が極めて高いPol IIIホロ酵素が主にDNA複製の大部分を行っており、唯一生存に必須で

ある。片や *polA* 遺伝子にコードされる Pol I は酵素として単一サブユニットで存在しプロセッシビティや忠実度が Pol III 程高くなく、除去修復やラギング鎖合成時などに生じる小さいギャップ部分の DNA 合成を担当する。残る Pol II、IV、V の 3 種の DNA ポリメラーゼはそれぞれ *polB*、*dinB*、*umuC* と *umuD* の各遺伝子にコードされ、いずれも LexA タンパクによる転写制御下にありいわゆる ‘SOS’ 応答により発現が誘導される。そしてそれぞれが、通常 DNA 鎖伸長反応を止めてしまうような鋳型 DNA 上の損傷を乗り越えて DNA 合成をするバイパス DNA 合成活性を損傷特異的に有しており (Napolitano *et al.* 2000; Tang *et al.* 2000)、そのような損傷 DNA 存在下における複製フォークの崩壊にによる細胞死の回避手段として機能していると考えられている。また Pol II はそのアミノ酸配列から真核生物の複製酵素などに多い Pol α ファミリー DNA ポリメラーゼに分類され、Pol III と同等の高い忠実度で通常の DNA 合成を遂行することが可能であり (Kornberg and Baker 1992)、さらに Pol III ホロ酵素の補助サブユニットとの相互作用により Pol III ホロ酵素と同様の非常に高いプロセッシビティを獲得することが報告されており (Bonner, Stukenberg *et al.* 1992)、Pol III のバックアップとして機能しているのかもしれない。

複製酵素である Pol III ホロ酵素は 10 種類のポリペプチドから構成される大きな複合体であり、 α 、 ϵ 、 θ 各 1 分子より構成されるコア、 τ 2 量体、 γ 3 分子と δ 、 δ' 、 χ 、 ψ 各一分子より構成される γ コンプレックス、 β 2 量体の各機能単位に分類できる (表 2) (Maki *et al.* 1988; Kornberg and Baker 1992; Kelman and O'Donnell 1995)。

このうちコアが通常 DNA ポリメラーゼといわれるものに相当するものであり、DNA ポリメラーゼ活性のみを有する α サブユニット(Maki and Kornberg 1985)と 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性 (3'→5'exo 活性) を担う ϵ サブユニット(Scheuermann *et al.* 1983)が複合体を形成することで互いの活性を促進し(Maki and Kornberg 1987)、協調しながら高い忠実度で DNA 合成を行う。 θ サブユニットは ϵ サブユニットと複合体を形成することで 3'→5'exo 活性を促進するのではないかと考えられている(Studwell-Vaughan and O'Donnell 1993)。このように複製酵素においてポリメラーゼ活性と 3'→5'exo 活性が独立したサブユニットに存在するのはグラム陰性菌に特異的であり、またアミノ酸配列も他のポリメラーゼと一線を画した特徴的なものであるが、元来は他のポリメラーゼ同様単一ポリペプチドにコードされていたものが進化の過程で分離したものであるとの説もある(Huang *et al.* 1997)。

τ サブユニットは α サブユニットと相互作用し、自身も2量体化することによってコア2分子を2量体化した Pol III' と呼ばれる複合体 (サブアッセンブリー) を形成するが(Stukenberg and O'Donnell 1995)、この2量体構造は複製フォークにおけるリーディング鎖合成とラギング鎖合成の協調に極めて重要である(Kim *et al.* 1996)。同時に τ 2量体は後述の γ コンプレックス1分子と相互作用し Pol III*を形成し、これが γ コンプレックスの非対称性により全体としての非対称構造をもたらす(Yuzhakov *et al.* 1996)。さらに τ は複製フォーク中で DnaB ヘリカーゼとも相互作用しこのヘリカーゼ活性を促進するなど(Kim *et al.* 1996)、複製装置中で極めて重要な働きを担っている。

γ コンプレックスは β 2 量体により形成されるリング状の β クランプをATP 依存的にプライマー末端付近にロードさせるクランプローダーとして機能する (Kelman and O'Donnell 1995)。この機能の中核となる γ サブユニットは τ サブユニットと同じ *dnaX* 遺伝子にコードされ、同一の mRNA を鋳型とした翻訳の過程で高頻度に起こるリボソームのフレームシフトにより短く合成されるタンパクである。両タンパクは AAA+ATP アーゼファミリーに保存されたアミノ酸モチーフを有し DNA 依存的 ATP アーゼ活性も有している。 δ 、 δ' の両サブユニットも AAA+ファミリーに属するが、ATP アーゼ活性は見いだされていない。また、 δ サブユニットが β サブユニットの 2 量体化面に対して結合することが明らかになっており、2 量体化面の 1 つを塞ぐことでリング状構造を開環する (Leu and O'Donnell 2001)。最近不完全ではあるが $\gamma_3 \delta \delta'$ からなる複合体の結晶構造がクランプローダーとして初めて発表され、併せて報告された δ - β 複合体の結晶構造と併せクランプローディングのメカニズムの理解が大きく前進した (Jeruzalmi *et al.* 2001; Jeruzalmi *et al.* 2001)。概略すると、ATP が γ サブユニットに結合することにより γ コンプレックス全体に構造変化をもたらし、 δ サブユニットが β サブユニットに結合可能な状態となってクランプが開環するのが第一段階である。その後鋳型/プライマー構造を認識した γ サブユニットにより ATP が加水分解され、元の構造に戻ることで δ - β 複合体が解消され DNA 上にて再びリング状クランプが形成される。

また、 τ サブユニットが γ サブユニットの機能を相補すること、部分的に γ サブユニットが置換された DnaX コンプレックスがクランプローダーとして機

能し得ることが報告されており(Maki and Kornberg 1988; Blinkova *et al.* 1993; Pritchard *et al.* 2000)、実際の細胞中の Pol III*の複合体組成は一定ではなく、数種類の Pol III*の混合である可能性が考えられる。

χ 、 ψ 各サブユニットはクランプローディングに直接関与はしないが、 χ サブユニットは SSB (single-stranded DNA binding protein) と相互作用することで、プライマー合成後プライマー上に留まっている DnaG プライマーゼを解離させる働きを担っている(Yuzhakov *et al.* 1999)。またこの χ -SSB 相互作用は γ サブユニットの ssDNA 上のプライマー末端認識に補助的な役割を果たし、また Pol III*としてのプロセッシビティの向上にも寄与していると考えられている(Kelman *et al.* 1998)。

β クランプは、自身は DNA に対する親和性を持たないものの、二本鎖 (ds、double-stranded) DNA を取り囲むリング構造をとり、 α サブユニットと結合することで Pol III*を DNA 上に繋ぎ止め、ホロ酵素としての著しく高いプロセッシビティをもたらすプロセッシビティ因子として機能する(Kelman and O'Donnell 1995)。2 量体で6 角形構造をとり、これは3 量体で同様に機能する PCNA など他種のプロセッシビティ因子と共通の構造である。Pol III*以外にも Pol I、II の両 DNA ポリメラーゼや、DNA リガーゼ、複製エラーによるミスマッチを認識する MutS といったタンパクとも相互作用し、これらのタンパクの DNA 上の足場として機能することが明らかになっている(Lopez de Saro and O'Donnell 2001)。

以上の構成により Pol III ホロ酵素が形成され、複製装置 (レプリソーム)

中においてリーディング鎖合成とラギング鎖合成が共役され、二つの複製装置だけで約 4.6Mbp もの長大な大腸菌ゲノムを途切れることなくわずか 30 分あまりの時間内に複製することが可能になっている。単純に考えても Pol III ホロ酵素は 2.3 メガヌクレオチド (Mnt) 以上のプロセッシビティと 700 nt/s 程度の鎖伸長速度を有していることになる。このような高速の DNA 複製において、リーディング鎖合成と協調しながら不連続に行われるラギング鎖合成が速やかに行われることは非常に重要である。各岡崎フラグメントごとに一度ずつプライマー合成、 β クランプのローディング、Pol III による DNA 合成といったステップを速やかに行われなければならない。ここでポイントとなるのは DNA 上における酵素の転換反応であるが、これが非常に精巧かつ理にかなったメカニズムにより遂行されている。前述のように DnaG プライマーゼは RNA プライマー合成後もプライマー上に留まり SSB と結合した状態にあるが、 γ コンプレックス中の χ サブユニットが SSB に結合することによって間接的に解離が促がされ、RNA プライマーが使用可能な状態となる。この段階で既に ATP 依存的に開環した状態の β クランプと結合している γ コンプレックスは、プライマー末端を認識、結合次第 ATP 加水分解により β クランプをロードする。 γ サブユニットは α サブユニットと同じ β クランプの結合面に結合しているが (Naktinis *et al.* 1996)、 δ サブユニットによる β クランプ結合の手を失った γ コンプレックスは1つ前の岡崎フラグメント合成を終えたコアに取って代わられる。 α サブユニットは広い ssDNA ギャップが存在する場合には β クランプに強く結合するが、dsDNA 上の β クランプに対しては極端に結合能が低く、岡

崎フラグメント上のギャップを合成次第、速やかに解離し次のプライマー末端に移行する(Naktinis *et al.* 1996)。このように各酵素の DNA や他のタンパクへの結合能の状況特異的な変化が、迅速かつ無駄のないラギング鎖合成を可能にしているのである。

コアを形成する各サブユニットの研究は構造生物学的には立ち後れているのが現状である。アミノ酸配列レベルでも、活性中心付近の一部を除いて他の構造解析が進んでいる DNA ポリメラーゼと一線を描くため、独自の研究が必要である。わずかながら、DNA フットプリンティング実験により Pol III ホロ酵素によって二重らせん 3 回転分 30nt の DNA が覆われていること(Reems and McHenry 1994)、塩基アナログを用いたクロスリンク実験から、 α 、 γ 、 β の各サブユニットが同時にプライマー末端付近に結合あるいは近接しているという二次元的空間配置などが報告されている(Reems *et al.* 1995) (図 1 A)。またアミノ酸相同配列解析と点突然変異体を用いた実験から、 α サブユニット内活性中心において DNA 合成反応に必須の二価金属イオンをキレートする 3 つのアスパラギン酸残基が同定されており(Pritchard and McHenry 1999)、さらに欠失変異体を用いた解析から、 α サブユニットが相互作用するタンパクのうち β 及び γ サブユニットに対するおよそその結合ドメインが明らかになっている(Kim and McHenry 1996) (図 1 B)。いずれも Pol III の作用メカニズムを知る上では不十分であるが、将来的に Pol III や構成サブユニットの立体構造が明らかにされた時、Pol III の総合的理解に有用な情報であることは間違いない。

3. 校正機能のメカニズムと意義

上で Pol III の校正機能は α と ϵ の両サブユニットの協調によりもたらされていると述べたが、この機能は多くの DNA ポリメラーゼが有する極めて有効な複製エラー修正機構である。DNA ポリメラーゼとして最初に分離された大腸菌 Pol I に代表される Pol I (タイプ A) ファミリーや、真核生物において DNA 複製に必須な Pol α 、 δ 、 ϵ の 3 つの DNA ポリメラーゼに代表される Pol α (タイプ B) ファミリーなどにおいては、3'→5'exo 活性は DNA ポリメラーゼと同じポリペプチド内の一つの機能ドメインに担われている。この 3'→5'exo 活性が複製エラーの修正に機能すると認知されたのは、Pol I におけるこの活性が、塩基対のミスペアなど新生鎖末端が鋳型 DNA と密接に対合しにくい条件下においてより強く見出されたことによる。単鎖 (ss, single-stranded) DNA、dsDNA 共に基質となり得るが、実際に基質となるのは ss 状態にある DNA 3' 末端である。またこの活性が DNA ポリメラーゼの基質 dNTP によって抑制されることから、この切除活性が DNA ポリメラーゼ活性と協調した一定のバランスの中で発揮されるものであることが明らかとなった (Maki *et al.* 1991)。

機構的に全く異なる二つの活性の上に成り立つこの協調関係は、複製エラーによるミスペア末端が DNA ポリメラーゼ反応の遅延をもたらす代わって 3'→5'exo 活性を促進するため複製エラーの修正に有効であるが、切除対象となる新生 DNA 鎖末端が ssDNA としての解離を伴いながら物理的に隔てられた 2 活性中心の間を移動するという何らかの構造変化を必要とする。この構造変化 (新生 DNA 末端の解離、メルティング) が DNA ポリメラーゼとしての

一連の反応の中に当然の如く組み入れられていることが、Pol III を用いた観察によって明らかにされた(Fersht *et al.* 1982)。単一ヌクレオチドの繰り返し配列を鋳型に適正な基質ヌクレオチドのみの存在下において行われる DNA 合成反応においても、約 10 % のヌクレオチドは一度 DNA として取り込まれた後に切除されたのである。これは DNA ポリメラーゼが常に新生鎖末端の切除可能な状態に近い状態を保ちながら DNA 合成を行っていることを示唆するものであり、これによって正しく取り込まれたヌクレオチドをも切り出してしまうという一定の犠牲を払いながらより効率よくミスペア末端を切除している DNA ポリメラーゼのメカニズムが想定された。また初めて X 線結晶構造解析がなされた Pol I において、3'→5'exo 活性中心に配向した DNA 3'末端の構造が明らかにされ、末端 4 ヌクレオチドが鋳型鎖より解離したメルティング構造をとっていることが判明した(Freemont *et al.* 1988)。この構造は基質ヌクレオチドの非存在下で形成された結晶によって得られたものであり、基質ヌクレオチドの存在下で形成されたポリメラーゼ活性反応の中間体構造と併せ考えると、この二つの大きく異なる構造が機構的にはさほど隔てられた状態ではないことが伺える。

大腸菌において最初に分離されたミューテーターは *dnaQ* 遺伝子に変異を生じた *mutD5* 変異株であった(Fowler *et al.* 1974)。非常に強力なミューテーター活性を示しながら条件致死性は示さなかったため、当初は DNA 複製に関与する遺伝子の変異だとは認識されなかったが、同じ遺伝子座上に後に分離された *dnaQ49* 変異株が条件致死性であったため DNA 複製に関与する事が示され

(Horiuchi *et al.* 1978)、やがて精製されたMutD5及びDnaQ49タンパクにおいて野生型では観察される3'→5'exo活性が欠損している事が示され(Echols *et al.* 1983)、Pol IIIを構成するサブユニットであることも明らかとなった(Scheuermann *et al.* 1983)。複製酵素であるPol IIIの校正機能を担うことで突然変異抑制機構において極めて重要な働きを担うことは理解できるが、*dnaQ49*で観察された条件致死性は謎である。他の*dna*遺伝子群では温度感受性変異株における制限温度下での即時DNA複製停止によるが観察され複製装置もしくはそれを支える因子として必須であると理解できるが、 ϵ サブユニットはDNAポリメラーゼ活性そのものをコードしているわけではないので、変異体における致死性は構成サブユニットとして、あるいは校正機能自身がDNA複製反応に必須であることを示している。校正機能自身がDNA複製、生存に必須であるとするならば、3'→5'exo活性が細胞にとっての必須機能であるということになる。しかしDnaQ49タンパクにおいては僅かながらに3'→5'exo活性が残存していると考えられ、この点を追求するには不十分である。以前当研究室において3'→5'exo活性を完全に欠損した変異体を得る目的で、*dnaQ*遺伝子内に高度に保存された3つのアミノ酸モチーフのうち、Exo IIと呼ばれるモチーフ内で3'→5'エキソヌクレアーゼの活性中心として機能する103番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換した*dnaQ32*変異株が作成された(井原, 1993)。この*dnaQ32*変異遺伝子は野生型*dnaQ*遺伝子に対して優性なミューテーター変異であり、非常に強力なミューテーターであるだけでなく細胞内で過剰発現すると細胞に顕著な生育阻害をもたらした。このことは3'→5'exo

活性が細胞の生育にも重要な役割を担っていることを示し、DNA複製反応機構の中の必須機能である可能性を高めるものである。誤ったDNA合成によって取り込まれたミスペア末端においてはさらなる鎖伸長のためのDNA合成活性が低下してしまうが、3'→5'exo活性が効率よくこれを除去することによって再び正しく対合した末端からのスムーズなDNA合成が可能になる。もしこのようなミスペア末端が失われた3'→5'exo活性のために除かれられない場合、DNA鎖伸長は遅延し、さらにこのような事態が頻発すれば細胞死をも引き起こすかもしれない。この仮説は校正機能の新たな役割といえるものであるが、この仮説を否定する結果も報告されている。*dnaQ*遺伝子内に保存されたアミノ酸モチーフのうちExo I内でやはり高度に保存され3'→5'exo活性中心と考えられる二つの酸性アミノ酸残基を同時に置換した*dnaQ926*という変異体を作成され、*dnaQ32*同様に著しい生育阻害を示し染色体上に単一の*dnaQ*遺伝子として存在し得ないことが明らかにされたが、同じ染色体上に突然変異頻度を低下させるアンチミューテーター変異型*dnaE*遺伝子が共存する場合やミスマッチ修復に機能する*mutL*遺伝子が多コピープラスミド上に存在する場合には、この*dnaQ*変異株は生育できるというのである(Fijalkowska and Schaaper 1996)。このことは、サプレッサーのない状態で*dnaQ926*変異によってもたらされる細胞死が、DNA複製の障害によってもたらされるというよりも校正機能欠損による著しい突然変異頻度の上昇によってもたらされているという事を示唆するものである。*mutL*遺伝子産物がDNA複製反応に何らかの補助的な役割を担っている可能性は否定し得ないが、ミューテーター活性の相殺と考える

のがより自然である。細胞死の実体解明及び各遺伝子産物の完全な機能解明が必要とされる。

4. *dnaE173* ミューテーター

dnaE173 ミューテーター株は、Pol III ホロ酵素の極めて高い忠実度に α サブユニットがどのように貢献しているのかを知る目的で、ヒドロキシルアミン処理による突然変異誘発によって作成、分離された変異株である(Maki *et al.* 1991)。この変異株は *dnaE* 遺伝子内での一つの塩基置換変異により 612 番目のグルタミン酸がリシンに置換された変異型 α サブユニットをコードする。自然突然変異を高頻度に誘発する株として分離されたのであるが、同時に NaCl 抜き培地上 44.5°C という条件下で致死性も示した。この株より精製された Pol III コアは正常な 1 : 1 比の α 、 ϵ 両サブユニットを有しており、野生型コアと同様なレベルの 3'→5'exo 活性を示したが、校正機能の指標となる DNA 合成と共益した 3'→5'exo 活性は殆ど観察されなかった。さらに DNA 合成における基質ヌクレオチドに対する K_m 値は野生型に対して 1/6 の値を示し、基質に対する親和性がより高い事が明らかとなった。これらの事から α サブユニットも校正機能において重要な機能を担う事が初めて示唆され、 α サブユニットの忠実度制御に関連した何らかの機構が細胞の生育に重要である事が示された。続いてこの変異株において誘発される突然変異の内容について、プラスミド上の *rpsL* 遺伝子を標的遺伝子とした前進変異検出系を用いた解析がなされたが、その際この変異株は野生型の実に 3 万 2 千倍もの高い頻度で突然変異

を誘発した(Mo *et al.* 1991)。変異の内容としても殆どあらゆる種類の複製エラーに起因した突然変異を高頻度に誘発することが判明し、特に1塩基フレームシフト変異と非常に特徴的な配列置換変異(図2)を複数の特定の部位において高頻度に誘発する事が明らかにされた。配列置換変異は数塩基分の配列が全く異なる配列に取って代わられる突然変異で、変異配列長は正常な配列と必ずしも一致しない。塩基配列解析の結果、変異部位のごく近傍の相補(反対)鎖上に変異配列と全く同じ配列が存在することが分かり、さらにその配列の両側には変異箇所の両側の配列と共通の短い相同配列が存在していることが分かった。つまり、正常な配列上において両配列は逆方向偽反復配列(pseudo inverted repeat)ともいえる関係にあり、配列置換変異は一方の配列が他方へコピーされた結果、完全な逆方向反復配列が形成されたという変異でなのである。そのような観点で配列置換変異以外の1塩基フレームシフトや塩基置換変異の一部も説明可能であることが判明し、*dnaE173* ミューテーター株において何らかの異常な変異形成プロセスが存在することが示された。またこの突然変異形成にはDNA複製方向に関連した極性があり、リーディング鎖合成過程においてより高頻度に誘発されていることが示唆されている。この異常な突然変異形成のメカニズムを説明するものとして、“テンプレート・スイッチング”モデルが提唱された(図3)。このモデルでは、偽反復配列の一方を鋳型に合成されている新生鎖末端が、相同配列aまで合成されたところで何らかの理由により鋳型鎖から解離し、他方の偽反復配列上のaと相補な配列に対する誤ったアニーリングを起こした上に、DNAポリメラーゼによって変異型配列

として合成され、再び元の鋳型上に戻ることによって配列置換変異の前変異体が形成される。このモデルの真偽の程は定かではないが、配列置換変異が偽反復配列という特殊な配列においてのみ観察されることと、*dnaE173* 変異型 Pol III の生化学的に異常な性質と考え合わせ、何らかの極めて特殊な状況が生まれ引き起こされていることは間違いない。Pol III ホロ酵素が行う DNA 複製の過程で、一体どのような事態が起こり変異形成へとつながるのか、非常に興味深い。

このような配列特異的に大きく配列が突然変異として、順あるいは逆方向反復配列を介した欠失変異や重複変異などが数多く報告されており、*dnaE173* 株においても一部の重複変異が高頻度に観察された。またヒト染色体上の 3 塩基繰返し配列（トリプレット・リピート）において起こるリピート長の伸長現象が様々な疾病の原因として報告されている。このトリプレット・リピートの伸長メカニズムを探る目的で、大腸菌 Pol I を用いて *in vitro* において CTG あるいは CGG リピート DNA を合成させると、際立った DNA 鎖伸長の一時停止（ポーシング）が観察されることが報告されている(Kang *et al.* 1995)。こうした DNA ポリメラーゼの配列特異的なポーシング現象は、様々な生物種の DNA ポリメラーゼについて報告されている(Weaver and DePamphilis 1982; LaDuca *et al.* 1983; Weaver and DePamphilis 1984; Klarmann *et al.* 1993; Suo and Johnson 1998)。特に HIV-1 逆転写酵素による DNA 鎖伸長反応において観察されるポーシング部位は、フレームシフトなどの点突然変異の発生部位と相関が観察され(Bebenek *et al.* 1989)、大きな配列変化を伴わ

ないような突然変異についても DNA 合成を行う DNA ポリメラーゼの挙動が変異形成に関与していることが示された。大腸菌では逆方向反復配列を介して発生した欠失変異が、ラギング鎖合成過程においてより高頻度に起こり、この過程において Pol III ホロ酵素が重要な役割を果たすとの報告がある (Trinh and Sinden 1991)。また Pol III ホロ酵素を用いて強固なヘアピン構造を持った ssDNA を鋳型とした *in vitro* DNA 合成を行うと、ヘアピン部分における顕著なポーズが観察され、ポリメラーゼを過剰に加えた場合にはヘアピン部分を合成せずにスリッページを起こした欠失変異の中間体が形成されることが報告されている (Canceill and Ehrlich 1996)。現実的な条件下ではないということ差し引いても、Pol III 単独でもそのような突然変異が形成され得ることが示されたことは何らかの意味を持つものであり、反復配列において形成される突然変異に Pol III ホロ酵素が少なくとも間接的には影響を及ぼしていることは明らかである。

5. 本研究の目的

大腸菌における複製エラーの発生メカニズムを理解する上で、Pol III ホロ酵素による DNA 鎖伸長反応時の配列特異的な運動性を知ることは一つの有用な情報になり得る。さらに Pol III α サブユニット内の *dnaE173* 変異によるミューター活性の上昇、特に配列特異的な配列置換変異等の特殊な突然変異が、変異型 Pol III ホロ酵素による DNA 鎖伸長時の異常な挙動に起因する可能性が考えられ、これを検証したいと考えた。またこの変異型 Pol III における校正機能の欠損が、DNA 鎖伸長反応における配列特異的あるいは非特異的な運動性の変化をもたらすのか否かを検証し、校正機能の鎖伸長反応における役割、配列特異性への影響を知り、最終的に DNA ポリメラーゼの挙動と複製エラー発生の相関を検証する目的で、*dnaE173* 変異型 Pol III* を精製し、野生型 Pol III* と比較対照しながらその生化学的解析を行った。

第二章 結果

1. *dnaE173* Pol III* の精製

これまで *dnaE173* ミューテーターの研究に用いられてきた大腸菌 MK425 株について、富栄養培地 MMB 中 30℃ という条件下での大量培養により得られた 220g の菌体より *dnaE173* 変異型 α サブユニットを含む Pol III* の精製を行った。Maki *et al.* (1988) の野生型 Pol III* の精製法に従い 5 段階の精製ステップを経たが、野生型 Pol III* とほぼ同様に精製することが出来た (表 3)。このことは、*dnaE173* 変異体において Pol III* の形状、表面電荷、親水性などがほとんど変化していないことを示している。最終精製ステップである Superose 6 カラムによるゲルろ過による分離画分のうち、約 700kDa 付近にタンパク量と活性の両面で最も大きなピークが現れ、この周辺のフラクションをプールし最終精製標品とした。これは 724.1kDa と計算できる野生型 Pol III* の分子量とほぼ同じ分子量である。各精製ステップで得られた標品について、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分離の後、銀染色によって α サブユニットから ϵ サブユニットまでの範囲の分子量のタンパクを観察したが、 α 、 ϵ 両サブユニットをはじめとした 6 種の Pol III* サブユニットが野生型と同様の存在比率で含まれていることを確認し、この変異型 α サブユニットを含む Pol III* 標品の構成が正常であると考えた。しかしプールしたピークフラクション中には、ゲルろ過で完全に分離することができなかったホロ酵素の混入によるものと思われる微量の β サブユニットや、他の不明なタンパクの僅かな混入が

見られた。この混入タンパクに留意しつつ、得られた最終精製標品を以下の諸実験に使用した。また、以下に行った実験は長期にわたる順不同なものであるため、凍結融解などによる活性低下のため、酵素の比活性を均一に維持するのは困難であった。

2. 校正機能の欠損について

上記の精製 *dnaE173* 変異型 Pol III* を用いて、ssDNA (poly(dA)) を基質とした 3'→5'exo 活性を観察したところ、野生型と同等のレベルで活性が観察できた (図 5 A)。しかし、poly(dA)/oligo(dT)₁₅ を鋳型/プライマーとして DNA 合成と供益したヌクレオチドの切除活性を観察する“ターンオーバーアッセイ”においては、野生型 Pol III* で観察されるような DNA 合成量の増加に伴った 3-4% 程度の dTMP の切り出しは殆ど観察することが出来なかつた (図 5 BC)。Pol III* においてもコアと同様に校正機能の欠損が示されたことになる。

3. Pol III ホロ酵素による burst DNA synthesis

次に *dnaE173* 変異型 Pol III のホロ酵素としての振る舞いを調べるために、M13 ファージ ss 環状 DNA を鋳型に単一プライマーをアニールさせたものを鋳型/プライマーとして、予めこのプライマー末端において ATP 依存的に Pol III* と β サブユニットによる開始複合体 (initiation complex) を形成させ (Burgers and Kornberg 1982)、同調的に DNA 鎖伸長反応を開始させるという “burst DNA 合成” 反応を行った。

両酵素共に、高速の初期反応とそれに続く緩やかな二相目の反応からなる二相性の DNA 合成パターンを示したが (図 6 A)、変異型ホロ酵素は野生型酵素に比して一相目の反応がより緩やかで二相目への移行が遅れていた。アルカリアガロースゲル電気泳動による反応産物解析の結果、これは *dnaE173* ホロ酵素における著しい鎖伸長速度の低下によるものであることが判明し、その伸長速度は野生型約 900 nt/s に対し 1/3 の約 300 nt/s であった (図 6 B)。この伸長速度の遅さが *dnaE173* 変異型酵素に内在的な性質であり酵素標品中に含まれる他の因子によってもたらされるものでないことを確かめるために、野生型と変異型酵素でそれぞれ形成させた開始複合体を混合し、同調して burst DNA 合成を行わせたところ、両酵素に由来する二種類の産物を観察できた (図 6 CD)。両酵素標品中に含まれる他の因子が伸長速度に影響を与えないことは確かである。

また野生型ホロ酵素では緩やかではあるが二相目においても取り込みの上昇が見られたが、これは RF DNA 形成後 Pol III* が余剰の鋳型/ β クランプ複合

体に対し転位するリサイクル反応により開始する新規の DNA 合成によるものであると考えられる。この性質は特にラギング鎖上での不連続合成において重要な機能となると考えられるが、一方で *dnaE173* ホロ酵素でも観察された二相目における緩やかな DNA 合成は、前方の DNA を 5'末端から解離しながら新規の DNA 合成をする strand displacement DNA 合成によるものであることが反応産物解析から明らかになった (図 6 B)。野生型ホロ酵素でもわずかに完全長以上の産物が観察されたが、*dnaE173* では非常に効率よい strand displacement DNA 合成への移行が見られる。これは *dnaE173* 型 Pol III の高いプロセッシビティーを示唆すると共に、リサイクル能力の低さを示すものであり、ラギング鎖合成における深刻な障害となる可能性を示唆する。

4. SSB 濃度による影響

ホロ酵素のプロセッシビティーに大きく関与するプロセッシビティーファクターである SSB 非存在下においては、ポージングなどの配列依存的な挙動の変化のが期待できるため、野生型及び *dnaE173* 変異型ホロ酵素について 4 段階の SSB 濃度下で burst DNA 合成反応を行った (図 7)。

低 SSB 濃度下では、両 Pol III ホロ酵素共に鋳型上の数ヶ所の特定の場所で伸長が停止した産物が観察されたが、SSB 量増加に伴いこのようなポーズは解消された (図 7 BD)。しかし低 SSB 濃度下で野生型ではこのような産物が蓄積したままであり特に SSB 非存在下では全体としての見かけの伸長速度が遅いのに対し、*dnaE173* では時間経過に伴いポーズは解消され、SSB 非存在

下でも全体としての伸長速度の低下は見られなかった。これは DNA 合成量にも反映され、野生型では低 SSB 濃度下で取り込みが著しく減少するが、*dnaE173*ではそれほどの低下は見られない(図 7 CD)。低 SSB 濃度下での DNA 鎖伸長阻害は SSB が鋳型 ssDNA による二次構造の形成を抑制し鎖伸長を補助するという従来の考え方と合う結果であり、また野生型での結果は SSB が χ サブユニットと直接相互作用することにより Pol III ホロ酵素のプロセッシビティーを向上させるとの考え方も支持する。しかし *dnaE173* は SSB 非存在下において、ポーズはするが効率良く再開始していると考えられ、SSB に依存しない高いプロセッシビティーを有している可能性が考えられる。SSB が両酵素標品中にコンタミとして予め存在している可能性は否定できないが、ポーズした産物の動向の違いは歴然としており、変異型 Pol III はより SSB 非依存的であると言える。

また strand displacement DNA 合成に対しても SSB は大きく関与し、両酵素とも strand displacement DNA 合成には一定量の SSB (238ng ssDNA に対し 13.3pmol の SSB 四量体程度)が必要である。SSB 量増加に伴い strand displacement DNA 合成が促進されるという結果は、SSB が displace された DNA に結合することにより鋳型鎖への再会合を妨げ新規の DNA 合成に有利に働いているためと考えられる。但し必要量以上の SSB 存在下における displace 効率には両酵素間で大きな違いがあり、両者の根本的な違いを反映している。つまり SSB は必要条件ではあるが効率良い strand displacement には十分条件ではないのである。また *dnaE173* の特質の一つとして考えられる

高いプロセッシビティだけでも strand displacement DNA 合成を行えないということでもある。*dnaE173*における校正機能の欠損も新生の DNA を切除しないという点から strand displacement DNA 合成に好都合であると考えられるが、やはり十分条件とはなり得ない。よってむしろ *dnaE173* ではプライマー5'末端に出会った時に速やかに DNA 合成を停止し解離するという能力が欠損しているという考え方もできる。

5. イオン強度による影響

高イオン強度条件下においては鋳型 DNA やタンパク自身の構造変化、因子間の親和性などにも変化が生じることが予想される。burst DNA 合成反応におけるホロ酵素のイオン強度変化による影響を調べるために、KCl タイトレーション実験を行った。

野生型ホロ酵素では KCl 添加により 80mM まで DNA 合成活性の向上が観察された (図 8A)。反応産物解析結果から、80mM まで鎖伸長速度がわずかに向上し続けており、80mM では塩を加えない場合の 1.25 倍の速度であった (図 8B)。この伸長速度の亢進は塩によるタンパク自身の構造変化、あるいは DNA とのアフィニティーの低下により移動が容易になったことなどが原因として考えられるが定かではない。また二相目における DNA 合成量に向上が見られ、これは Pol III* のリサイクルが促進されていることを示している。高イオン強度下において α - β サブユニット間の結合あるいは DNA との親和性が

弱められ、RF 形成後の解離が促進されているためであると考えられる。一方でイオン強度が増すにつれ部位特異的にポーズした産物の蓄積が目立つようになり、160mM においては DNA 合成量が一転低下し完全長の産物も殆ど観察されなくなる。高イオン強度による鋳型二次構造の安定化及び Pol III* の解離の促進が原因として考えられる。

一方 *dnaE173* では初期の取り込みにおいてのみイオン強度上昇による促進効果が観察された (図 8C)。野生型同様 80mM において伸長速度は最大となり、塩を加えない場合の 1.31 倍であった (図 8D)。高イオン強度下でも野生型のような著しい中間産物の蓄積は見られずより塩耐性であるといえるものの、促進効果も頭打ちになっており、何らかの阻害効果を受けている可能性を示している。野生型と比較して最も対照的なのが二相目の取り込みであり、高イオン強度下において促進ではなく抑制が観察された。相補鎖間の安定度が増すことにより strand displacement が困難になり新規の DNA 合成が出来ないためであると考えられるが、今回試した最大のイオン強度下においてもリサイクルが殆ど起こっていないということでもある。

6. 基質 dNTP 濃度による影響

校正機能と協調し進行する DNA 合成反応において、基質ヌクレオチド濃度は合成速度そのものを律速しさらに結果としてポリメラーゼ (Pol) : 3'→5'エキソヌクレアーゼ (exo) 活性比にも影響を与え、校正機能の効率にも影響を及ぼす事が示されている (Maki *et al.* 1991)。校正機能がほぼ完全に失われて

いると考えられる *dnaE173* 型 Pol III において観察された低い伸長速度や高いプロセッシビティーが、基質濃度にどのように依存しているのかは興味深い点である。Maki et al. (1991 JBC) において poly(dA)/Oligo(dT) を鋳型/プライマーとして Pol III コアの dTTP に対する K_m 値が測定された際には、野生型 $67\ \mu\text{M}$ に対し *dnaE173* 型では $11\ \mu\text{M}$ と約 $1/6$ の値を示し、この変異型 Pol III の高基質親和性が示された。野生型酵素を含めホロ酵素としての DNA 鎖伸長反応においての基質依存性あるいは親和性を調べる目的で、burst DNA 合成反応において基質 dNTP タイトレーション実験を行った (図 9)。

その結果両酵素において基質濃度上昇に伴う鎖伸長速度の向上が観察され、反応そのものの基質濃度依存性が確認出来たが、各濃度条件下で観察された伸長速度をもとに dNTP に対する K_m に相当する値を求めたところ、野生型 $29.7\ \mu\text{M}$ に対し変異型では $13.3\ \mu\text{M}$ と約 2.23 倍の差が観察された (表 4)。やはり変異型酵素において低い K_m 値が示された事になるが、Pol III コアで観察された差よりは小さいものである。推測であるが、基質そのものが四種類のランダムなヌクレオチドであることという理由以上に、酵素そのもののプロセッシビティーの向上に原因があるのではないかと思われる。野生型 Pol III* のプロセッシビティーは約 100nt とされているが、ホロ酵素としては 10 万 nt 以上ともいわれている (Kornberg and Baker 1992)。この高いプロセッシビティー、すなわち安定に完全長まで伸長できる能力と、プライマー末端に会合するまでの過程を無視することが出来る burst DNA 合成という反応系が、ある意味で純粋な伸長反応の基質濃度依存性の観察を可能にしているのではないかと考えら

れる。Poly(dA)/oligo(dT)を用いてプロセッシビティーの低い酵素で DNA 合成量を測定する場合、基質に対する親和性のみならずプライマー末端の認識、結合といったステップも反応の律速段階となってしまうのである。野生型ホロ酵素におけるコアに比した K_m 値の低下はそのためであると考えられるが、一方で *dnaE173* ではコアでの値とほぼ同様な値を示しており、これはこの変異型酵素が β サブユニットに依存しない高いプロセッシビティを有しているためではないかという仮説を導くものである。また同時に算出した両ホロ酵素の V_{max} 値は野生型 1065 nt/s に対し *dnaE173* 変異型では 349 nt/s となり、鎖伸長速度の遅さが DNA 合成反応そのものの遅さに由来していることが示された。また意外なことに鎖伸長速度が向上しているのにも関わらず、高基質濃度下では全体の DNA 合成量が増加せずに停滞あるいはかえって低下する現象が観察された。目立ったポージングなども観察されないのも、一定量の開始複合体からの伸長反応の開始効率あるいは開始直後における安定性に問題があるのではないかと考えられるが、原因は定かではない。

また、基質濃度変化によって野生型ホロ酵素における strand displacement DNA 合成能力の向上がわずかに観察された。ポリメラーゼ活性 (Pol 活性) の亢進によってプライマー5'末端において停止するはずの伸長反応が促進されるためではないかと思われるが、pol/exo 活性比が pol 側に偏ることによって strand displacement DNA 合成が可能になることを示唆している。しかし一方で *dnaE173* では基質濃度に依存しない非常に効率良い strand displacement DNA 合成が観察され、これはこの変異型酵素の特質といえる

であろう。T7 DNA ポリメラーゼあるいは大腸菌 DNA ポリメラーゼ II において、3'-5'exo 活性欠損変異型酵素における *dnaE173* と同様な strand displacement DNA 合成活性の向上が観察され、理由として displace 後合成された新生 DNA 末端を切除できないためとの推測がなされている(Tabor and Richardson 1989; Canceill *et al.* 1999)。逆に元来高い strand displacement DNA 合成能力を有している ϕ 29 DNA ポリメラーゼにおいては、3'-5'エキソヌクレアーゼに高度に保存されている三つのモチーフのうちの ExoIII と呼ばれるモチーフに変異を導入した変異型ポリメラーゼで 3'-5'exo 活性の消失と共に strand displacement DNA 合成能力の低下も観察され、この領域に存在するであろう ssDNA 結合溝の strand displacement DNA 合成への関与が提唱されている(Soengas *et al.* 1992)。*dnaE173* は前者に近い性質を示しており、3'-5'exo 活性ではなく校正機能の欠損そのものが strand displacement DNA 合成能力の要因の一つとなりうることが考えられる。

7. Pol III*におけるプロセッシビティの観察

上記の結果より *dnaE173* PolIII*の高いプロセッシビティが示唆されたため、PolIII*単独での β サブユニットに依存しない DNA 合成を観察することにした。鋳型/プライマーとして poly(dA)/oligo(dT)₁₅ を用いたが、oligo(dT)₁₅ 量を調節し poly(dA)上の ssDNA ギャップサイズの異なる 2 種類の鋳型を用いることで、二つの酵素の違いを観察することが出来た (図 10)。用いたのは(dA):(dT)比が 2:1 と 20:1 のもので、計算上のそれぞれのギャップサイズは 15nt、300nt となる。それぞれの鋳型を用いて二種類の Pol III*による DNA 合成反応を行ったところ、2:1 のものを用いた場合両酵素は殆ど同様な DNA 合成パターンを示したが、よりギャップサイズが大きい 20:1 の鋳型を用いた場合は野生型 Pol III*で著しく DNA 合成量が低下したのに対し、*dnaE173* 変異型 Pol III*では DNA 合成量にわずかな増加が観察されたのである (図 10 AB)。これはギャップサイズが大きい場合でも問題なく合成できる *dnaE173* Pol III*のプロセッシビティの高さを反映した結果である。また(dA):(dT)比 2:1 の鋳型においてそれぞれの Pol III*の塩耐性を調べたところ、野生型がわずかな塩の存在下でも活性が低下するのに対し *dnaE173* 変異型ではある程度の活性の促進が観察された (図 10 CD)。これは *dnaE173* Pol III*の高い DNA への親和性を示している。

より直接的にプロセッシビティを観察するために、5'標識した oligo(dT)₁₅ を用いてこの反応産物を変性ポリアクリルアミド電気泳動により分離し観察した (図 11)。その結果、*dnaE173* では約 1kb の鋳型に対し 800nt 程度の非

常に長い産物が観察され、殆ど 100nt 以下の長さしか合成しなかった野生型に比べて圧倒的に高いプロセッシビティを示した。Oligo(dT)プライマーのアニーリング部位がランダムであることを考えると、少なくとも鋳型長である 1kb 以上のプロセッシビティを有しているのではないかと考えられる。また野生型 Pol III*での結果は定量的ではないもののこれまで定説とされてきた 100nt という数字に疑問を投げかける結果であった。また野生型 PolIII*では 20mM KCl の添加により極端に産物長が短小化し代わりに PolIII*のリサイクルによって使用されるプライマーが増加するのが観察された。*dnaE173* は 40mM KCl でやや産物長の短小化が観察され始めるものの取り込み量は塩を加えない場合の約 1.25 倍程度まで向上しており、明らかに塩に対して高い耐性を示した。一般的に高イオン強度下ではプロセッシビティが低下し代わりにリサイクルが促進されと考えられるが、*dnaE173* では野生型ほどプロセッシビティの低下は劇的ではなく、少なくとも合成途上の DNA 3'末端からの解離しにくく DNA に対するアフィニティーが高いと言える。

8. *dnaQ32* Pol III ホロ酵素 による burst DNA synthesis

dnaE173 変異型 Pol III* で得られた結果から校正機能の欠損と Pol III ホロ酵素の挙動の相関を考える上で、適当なコントロールとなるのが 3'→5'exo 活性を持たない変異型酵素である。以前当研究室において作成された *dnaQ32* 変異体は、過剰発現系を用いてごく短時間に増幅する方法で Pol III* 内に組み込まれた形で変異蛋白質として精製されたが、その精製 Pol III* には全く 3'→5'exo 活性が観察されなかったため、3'→5'エキソヌクレアーゼ完全欠損型 Pol III* といえるものである。

この *dnaQ32* 変異型ポリメラーゼを用いて6段階の基質濃度下での burst DNA 合成反応を行った (図12)。この変異型酵素はユニットあたりの burst サイズが著しく小さく、プロセッシブな DNA 鎖伸長に難があることが示されたが、アルカリアガロースゲルによる産物解析から、野生型 Pol III ホロ酵素で高イオン強度下に観察されたような強いポージングサイトが観察された。そのポージング傾向は低基質濃度下で大きく、基質濃度の上昇と共に少しずつ解消された。基質濃度上昇による Pol 活性の亢進が部位特異的なポージングに対しての耐性効果をもたらし、全体としての DNA 合成量も増加させており、基質濃度上昇がプロセッシビティの向上をもたらしていると言える。鎖伸長速度は低基質濃度下ほどポージングの影響が大きいため全体として遅く見えるが、わずかにポージング部位をすり抜けた先頭の産物における鎖伸長速度は野生型酵素のそれとさほど変わらないものであり、dNTP に対する K_m は $20\mu\text{M}$ 前後、 V_{max} は 790nt/s という中間的な値を示し、どちらかといえば野生型に

近い性質を保持していた（表4）。この *dnaQ32* 型酵素における異常は、 ϵ 、 θ サブユニット抜きでホロ酵素を再構成した実験の結果に類似している（Studwell and O'Donnell 1990）。*dnaQ32* 型変異によってプロセッシビティの低下がもたらされているが、その分リサイクリング反応が活発に起こり、再伸長の繰り返すことによって RF DNA の形成を完遂していると思われる。またこの酵素では strand displacement 活性が非常に低く、250 μ M 以上の高基質濃度下においてのみわずかに観察された。

9 サザンハイブリダイゼーションによるポージング配列解析

ここまでの実験により *dnaE173* 変異型 Pol III*あるいはホロ酵素の極めて特徴的な生化学的性質が明らかとなったが、直接的に配列特異的な突然変異形成メカニズムの理解に繋がる知見が得られた訳ではない。本研究の出発点の1つである *rpsL* 遺伝子上で観察された特徴的な突然変異形成のメカニズムを探るための最もシンプルな手段の1つは、この *rpsL* 遺伝子上での Pol III ホロ酵素の動態を直接観察することだと考え、新たな実験系の構築に取り組んだ。

実際の突然変異形成はリーディング鎖とラギング鎖が協調した複製フォーク上で起こっているわけであるから、当然再構成した複製フォーク中の Pol III の動態を探るのが望ましく、また最終的なメカニズムの解明には必要である。しかし本研究で行ってきたような鋳型 ssDNA 上におけるホロ酵素単独の鎖伸長反応における動態も、ホロ酵素だけの性質を反映するということでメカニズム解明の一步となるはずである。そのような考えから、ssDNA 上の *rpsL* 遺伝子における Pol III ホロ酵素の動態を探ることにした。

Pol III ホロ酵素による合成途上にある新生 DNA の分布を指標にホロ酵素の動きをモニターするのだが、高速でプロセッシブな DNA 合成を行う状態にあるホロ酵素の状態を観察したいので、伸長反応開始部位を観察対象となる *rpsL* 遺伝子から離れた場所に設定することにした。しかし塩基配列レベルでの解析のためには解析対象となる DNA の長さが制限されるため、合成された DNA 産物の長さを制限酵素によって調節し、これを塩基配列レベルで分離した後にサザンハイブリダイゼーションによって検出するという方法を考えた (図 1 3

C)。観察用の鋳型として、*rpsL* 遺伝子の相補鎖のいずれか一方を含む2種類の M13 ベクター由来の DNA を用意し（図 1 3 A-M13MOL18d、B-M13MOL19d）、この ssDNA に対して任意の位置に伸長反応開始用のプライマーをアニールさせて鋳型として用いた。また *rpsL* 遺伝子の長さも 372 nt あるので、全体をくまなく観察するために上流側、下流側の二つに分け、計4通りの検出システムを構築した（図 1 4）。その際その4つの領域は制限酵素部位で決定し、上流側と下流側を若干重複させた。検出用プローブとしては最も効率や感度がよかった RNA プローブを用いたが、これは各検出領域の上流側末端付近の一部の配列を T7 プロモータータグ付きのプライマーで PCR し、得られた産物を鋳型とした鎖特異的な *in vitro* 転写によって調製した。また本システムでは DNA 鎖伸長産物を上流側だけでなく下流側と合わせた2カ所で切断しているが、これは定量性を得るための工夫として内部標準（internal control）DNA を全ての産物と独立したバンドとして検出するためである（図 1 3 C）。内部標準 DNA はプローブに相補的な配列を持ち、二つの制限酵素間の距離よりも長く、かつこれらの制限酵素では切除されないような *rpsL* 変異体配列であり、DNA 鎖伸長反応後速やかに反応産物と混合するため以降のプロセスにおける産物のロスをモニターすることが出来る。制限酵素処理後のサンプルは変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離したが、このゲル中からナイロンメンブレンへの転写の際には、Genesweep なる装置が有用であった。

かくして構築した検出系によって、図 1 5 に示すような DNA 鎖伸長産物が

観察できたが、問題点も多く露呈した。最終的に観察される像は感度が高い分バックグラウンドノイズも高い事と、電氣的転写においてゲル一枚分の広さの中ではどうしても不均一な転写が起こってしまう事により、定量性がかなり失われてしまうのである。そこで定量性については諦め、視覚的に観察可能なバンドパターンから *rpsL* 遺伝子内での DNA 合成産物が蓄積しやすい配列（ポーピング配列）の分布を定性的に調べる事にした。野生型と *dnaE173* 型のそれぞれの Pol III ホロ酵素を実験には用いたが、両者においてポーピングの見られる配列は基本的に共通であった。*dnaE173* 型ホロ酵素は、少なくともポーピングという現象を指標として見た場合、通常条件下において *rpsL* 遺伝子上で異常な挙動は示さないのである。ポーピング自体は野生型の方がより多くの場所で起こしているようにも見え、これが *dnaE173* の特徴的な性質からもたらされる‘異常さ’かもしれない。

このようなあくまで主観に基づいた定性的塩基配列解析の結果、両鎖状で強く合わせて 109 か所のポーピング部位を認め、この分布をこれまで *rpsL* 遺伝子上で観察された複製エラーに起因するであろう突然変異の分布と重ね合わせてみた。ORF 内全 109 カ所（18d : 33, 19d : 76）のポーピングサイトのうち、26 カ所（18d : 7, 19d : 19）が欠失型フレームシフト変異部位に一致し、13 カ所（18d : 5, 19d : 8）がその上流側に隣接していた。挿入型フレームシフトについては、6 カ所（18d : 4, 19d : 2）が下流側に隣接していた。配列置換変異のホットスポット周辺にもポーピング配列が多く分布していたが、明確な相関があるとは言い切れない。

この検出系では、少なくとも塩基配列レベルで DNA 鎖伸長産物の蓄積部位が観察できる事が分かった。定量性のある絶対評価には難があるが、周辺配列あるいは反応条件の違いによる相対評価は可能である。今後、より信頼度の増したものに発展させ、様々な条件下での観察を行う事により、何らかの複製エラー形成メカニズムに迫る事は可能ではないかと思われる。

第三章 考察

本研究は、大腸菌の複製酵素 Pol III ホロ酵素中の触媒サブユニットである α サブユニットをコードする *dnaE* 遺伝子の変異型として種々の特徴的な性質を呈してきた *dnaE173* 変異について、さらに解析を進めたものである。この変異は細胞中で極高頻度に自然突然変異を誘発するという強力なミューテーターとしての性質を示しただけでなく、そこで誘発する突然変異も配列置換変異など非常に特徴的なものであった。またこの変異型酵素により構成される Pol III においては校正機能の欠損や高い基質親和性など生化学的にも顕著な特性が観察されていた。私はそのような酵素としての異常性と突然変異誘発のメカニズムに相関を見いだす目的で本研究を進めてきた。

当初、配列置換変異形成を説明するテンプレートスイッチングモデルから予想された *dnaE173* 変異型 Pol III の性質は、その運動性において鋳型構造に非常に影響を受けやすいものであったように思う。また、校正機能を欠損している事により DNA 鎖伸長反応に何らかの障害を抱えているのではないかとの推測もあった。そういった予測は、本研究における生化学的解析により見事に裏切られた。しかしながら新たに見出したこの変異型酵素の性質は、DNA ポリメラーゼという酵素の作用機序、機能を再考させてくれた。

表5に本研究で観察されたこの変異型酵素の特質についてまとめた。特筆すべきはこの酵素において著しく低下していた鎖伸長速度と、大きく向上してい

たプロセッシビティである。複製酵素として Pol III ホロ酵素に要求されるのは正確に DNA を複製する高い忠実度と迅速かつ安定な DNA 合成能である。安定といってもラギング鎖合成に必要とされる状況に応じた迅速な DNA からの解離能もこの酵素には不可欠である。この酵素においてはそれらの全てが失われていたと言え、そのような性質の変化が一つのアミノ酸置換により引き起こされているというのは非常に興味深い。また今回比較の対象として野生型と共に用いた *dnaQ32* 変異型酵素は 3'→5'exo 活性を完全欠損する事で *dnaE173* 変異型と同様に校正機能を失ったものであったが、その他示した性質は *dnaE173* 型と全く対照的なものであった。特に著しく低下したプロセッシビティは、3'→5'exo 活性の校正機能にとどまらない DNA 鎖伸長反応における役割を示すものかもしれない。また *dnaQ32* 変異型酵素が DNA ポリメラーゼとして野生型により近い性質を示した事は、*dnaE173* 変異型酵素において失われている機能が校正機能に必須のものだけでない事を証明している。*dnaE173* 変異によって失われている機能は DNA ポリメラーゼの様々な機能を結ぶものである可能性があり、その理解は普遍的な新しい知見をもたらすものかもしれない。

これまで分離された DNA ポリメラーゼはそのアミノ酸配列の類似性から 6 つのポリメラーゼファミリーに分類されているが、いずれの場合でも酸性アミノ酸 3 残基を含む 3 つのアミノ酸配列モチーフがファミリー間の枠を越えて高度に保存されている。さらに近年進境著しい X 線結晶構造解析により、現在までに 4 つのポリメラーゼファミリーに属する代表的な DNA ポリメラーゼに

ついてそれぞれの構造が決定され、ファミリー間で細部の構造は多様化しているものの、3つの大ドメインにより形成される‘右手’様の基本構造は保存されていることが分かっている(Steitz 1999)。特に DNA 合成の活性中心を担う palm (手の平) ドメイン内には前述の保存されたアミノ酸配列モチーフが配置され、3つの酸性アミノ酸とその周辺アミノ酸残基が合成に必須の二価金属イオンや DNA 及び基質ヌクレオチドを適切に配位するという周辺立体構造がほぼ同様であり、現時点では未だ結晶解析がなされていないファミリーも含め DNA 合成のメカニズムは普遍的であるというのが有力な考え方である。

また、画期的と言える前定常期 (pre-steady state) 反応の速度論的解析法の開発は DNA 合成の反応機序を細部まで明らかにし、構造学的解析なデータと共に DNA 合成のメカニズムの飛躍的な理解をもたらした(Johnson 1993)@。そこで明らかにされ描かれた DNA 合成反応における作用機序の模式図を図 1 7A に示す。DNA 結合に始まる各ステップの中で、最大の律速過程は基質ヌクレオチドとの結合後に起こるポリメラーゼの構造変化であるとされている。この構造変化を経てポリメラーゼは“closed”コンフォメーションを取り実際の合成反応が起こる。またその状態から再び“open”な状態に戻る際の構造変化も前者同様の律速過程である。*dnaE173*において見られる校正機能欠損は、この模式図の中ではメルティングのステップにおける異常と考えれば 3'→5'exo 活性をの保持とは無関係な機能欠損が説明出来る。それでは低い反応速度や高いプロセッシビティはどのようなステップにおける機能欠損、あるいは獲得なのか。

*dnaE173*で見られるさまざまな機能欠損を説明するモデルの一つとして、“メルティング・トランスロケーション”モデルが考えられる(図18)。このモデルは、校正機能に際し形成されるメルティング中間体が、校正機能のみならず、ポリメラーゼが次の合成反応のために前方へ塩基分移動するトランスロケーションのステップやDNAからの解離の際にも中間体として介在するというモデルである。*dnaE173*における機能欠損がこのような中間体が形成されない事だと仮定すると、校正機能欠損や速やかなトランスロケーションが起らない事による伸長反応の遅延、あるいは解離が起きにくくなる事によるプロセッシビティの向上として説明可能である。また上記のモデル以外にも、アミノ酸置換によって然るべき構造変化に異常を来している可能性や、新生DNA鎖末端に対する親和性が単純に高くなっている可能性なども考えられるが、これらによってある特定の共通中間体の形成が妨げられていると考えれば、*dnaE173*における多面的な機能欠損が説明可能である。メルティングの有無は別としても、これらの諸機能が同じ中間体を経ているとすると一つの機能欠損による全ての説明が可能になる。これに対する仮説として、1残基のアミノ酸置換がそれぞれ独立に各機能欠損をもたらしたとも考えられるが、1アミノ酸が巨大なポリペプチドの中で占める空間的あるいは機能的比重を想像すると、ある1つの機能欠損が多面的な変化をもたらしたと考えるのがより妥当ではないだろうか。

近年になって新たに結晶構造が明らかにされたポリメラーゼの1つとして、T4ファージに近縁のRB69ファージのDNAポリメラーゼが挙げられる。この

酵素は大腸菌Pol IIや真核生物の複製酵素などと同じ α ファミリーのDNAポリメラーゼとして初めてX線結晶解析がなされた酵素である。ポリメラーゼ単独での結晶構造に加えて(Wang *et al.* 1997)、通常の鋳型／プライマー構造を持ったDNAとのbinary複合体(Shamoo and Steitz 1999)、ここに基質ヌクレオチドとしてddNTPを加えることで形成されたternary複合体も解析され(Steitz 1999)、さらにはクランプ構造を持ったプロセッシビティ因子の結晶構造とのコンピューターモデリングによりプロセッシブなホロ酵素用の複合体構造までもが解析されている(Shamoo and Steitz 1999)。ternary複合体において酵素は全体として‘close’した構造をとり、プライマー末端はddNTPと共にポリメラーゼ活性中心に対して適正に配向しているのに対して、DNAのみとのbinary複合体においてはthumb、finger両ドメインが外側に開いた‘open’な構造で、プライマー末端は3ヌクレオチドがメルティングした状態で3'→5'exo活性中心に向かう構造をとっている。このbinary複合体は酵素本来の構造から校正機能のために大きく構造変化した‘editing’複合体として紹介されているのだが、実はプライマー末端が3'→5'exo活性中心まで到達していない中間体的な構造であり、3'→5'exo活性が機能するにはさらにもう一段階の構造変化を要する状態にあるのである。この構造が結晶化に伴う現実的には存在し得ない副産物である可能性は拭い去れないが、DNAと結合した際のもっとも自然な構造だとも考えられる。‘open’な構造はDNAとの結合、解離に必要な構造であると予想され、トランスロケーションにも有利である。この構造において鋳型鎖から解離した状態にあるプライマー末端も3'→5'exo活性に容易

に移行できる校正機能に有利な状態にある。序論で述べた Pol I における ‘editing’ 複合体は実はこのような鋳型／プライマー構造の DNA では形成されず、平滑末端もしくは 3' 末端が張り出した DNA のみにおいて形成されるということである (Freemont *et al.* 1988)。鋳型／プライマー構造において形成されるこの構造が実際の DNA 合成反応機構を反映したものであるならば、この構造が比較的安定に保たれることはポリメラーゼのプロセッシビティの高さを示すものと考えられ、よりプロセッシビティの低い Pol I においてこの結晶構造が得られない理由の説明となり得る。上で述べた仮説に基づいた場合 *dnaE173* の場合はこのような構造の形成に難があるという事になる。いずれにしても、最終的なメカニズムの解明のためには構造生物学的理解が必要であり、一日でも早い α サブユニットの結晶構造解析結果が待たれる。

本研究の目的であった *dnaE173* 変異型 Pol III の鋳型 DNA 上での挙動と突然変異形成の相関を探る事は、意外な形で発展し、さらに新たな謎を生む形となった。特に偽反復配列などの特徴的な配列において高頻度に突然変異を誘発していた *dnaE173* の Pol III ホロ酵素は野生型酵素が鎖伸長を阻害されるような ssDNA 鋳型上の配列に対して強い耐性を持っていた。今回新たに構築した系でも、*rpsL* 遺伝子上で特に異常な挙動を示した訳でもない。今回観察したのはいわばリーディング鎖合成に相当する反応であり、ラギング鎖合成様の反応や複製フォークとしての反応においてこの変異型酵素がどのように振る舞うのか興味深い。今回観察された *dnaE173* 変異型ホロ酵素の DNA 鎖伸長速度は野生型のわずか 1/3 程度であったが、*dnaE173* 株において増殖遅延は全く

観察されない。複製フォークとして劇的にこの酵素の性質が変化する事も否定は出来ない。

第四章 材料と方法

試薬、機器

Poly(dA)、oligo(dT)₁₅、100 bp ladder DNA、各種 DNA プライマー、ヌクレオシド三リン酸 ([α -³²P]dTTP、[γ -³²P]ATP 含む)、HiTrap Heparin カラム、Mono Q HR 5/5 カラム、Superose 6 PC 3.2/30、分子量マーカータンパク質 (aldolase、catalase、ferritin、thyroglobulin)、HyBond N⁺メンブレンは Amersham Pharmacia 製のものを用了。M13mp18、M13mp19 DNA は TaKaRa より購入し、各種環状 ssDNA は宿主菌 DH10B もしくは MV1184 に対する DNA の直接導入もしくはファージ溶液による感染後、回収した上清に 1/5 量の M1 緩衝液 (30% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG 6000)、3M NaCl) を加え水中に 15 分間静置し、遠心回収した沈殿を上記 M1 量と同量の M2 緩衝液 (1% Triton X-100、500 mM グアニジン塩酸塩、10 mM MOPS (pH 6.5)) に懸濁し、80℃で 20 分間処理後室温まで放置冷却したものを、Qiagen Q-tip カラム (Qiagen) により同カラムの標準精製法に則り精製した。Bradford protein assay 試薬、silver staining kit、アクリルアミド溶液は Bio-Rad、 λ / EcoT14I digest DNA アガロースは TaKaRa、DE81 paper は Whatman、Polyethylenimine (PEI)-cellulose プレートは Merck 製のものを用了。T4 polynucleotide kinase は New England Biolabs、各種制限酵素は東洋紡製のものを用了。一般的な試薬は特に記載のない限り、SIGMA もしくは和光純薬工業から購入したものを使用した。

Pol III*精製における各種液体クロマトグラフィーには FPLC 及び SMART system (Amersham Pharmacia) を使用した。³²P 標識 DNA の観察には BAS2000 (富士フイルム) を用いた。

***dnaE173* 変異型 Pol III*の精製、その他大腸菌酵素**

大腸菌 *dnaE173* 変異型 Pol III*は、Maki et al. (Maki et al. 1988)の野生型 Pol III*の精製方法に基づき、*dnaE173* 変異型大腸菌 MK425 株(Maki et al. 1991)より精製した (表 3)。大腸菌大量培養は東洋紡に依頼し、MMB 培地 (1.2 % Bacto trypton, 2.4 % Bacto yeast extract, 0.85 % NaCl, 0.4 % glycerol, 20 mM Tris-HCl pH 7.5) 中で対数増殖下 OD₆₆₀=8 にて回収された 220g の細胞塊として入手した。

Fraction I は lysozyme (SIGMA) による細胞溶解、Fraction II は硫酸アンモニウムによるタンパク質部分沈殿によって得た(McHenry and Crow 1979)。

Fraction III は HiTrap Heparin カラム (5 ml) によるイオン交換クロマトグラフィーにより得た。FPLC を用いて buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 % glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 20 mM NaCl) 環境において Fraction II をカラムに導入し、5 カラム容積分 (25 ml) の洗浄後、10 カラム容積分 (50 ml) の 20 mM~350 mM NaCl 勾配による溶出分画を得た。各分画について Pol III*標準アッセイにおける DNA ポリメラーゼ活性、及び Bradford 法によるタンパク量を測定し、算出された比活性 (units/mg) の

ピーク画分を混合し過剰量の bufferA 20 mM NaCl に対して透析したものを Fraction III とした。

Fraction IV は Mono Q HR5/5 カラム (1 ml) によるイオン交換クロマトグラフィーにより得た。FPLC、buffer A 環境下 Fraction III をカラムに導入し、5 カラム容積分 (5 ml) の洗浄後、10 カラム容積分 (10 ml) の 20 mM~400 mM NaCl 勾配による溶出分画を回収し、各分画について Fraction III 同様比活性を測定しピーク画分を混合し Fraction IV とした。

最終画分 Fraction V は Superose 6 PC3.2/30 カラムによるゲルろ過クロマトグラフィーによって得た。Centricon-30 (Millipore) により Fraction IV を約 20 倍濃縮し、SMART system、buffer B* (50 mM Tris-HCl, 10 % glycerol, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 100 mM NaCl) 環境において濃縮 Fraction IV をカラムに導入し、OD₂₈₀ 値をモニターしながら分離画分を回収した。各分画について Pol III*標準アッセイにおける DNA ポリメラーゼ活性及び OD₂₈₀ 値より算出したタンパク濃度から比活性を測定し、さらに予め同様に分画したマーカートンパク質により得られた標準曲線上で約 700 kDa に相当するピーク画分を混合し Fraction V とした (図 4)。

Fraction I から V までの各精製画分は、野生型 Pol III*及び野生型 α サブユニットと共に 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離後銀染色し、 α から ϵ までの 6 種の構成サブユニットを確認した。さらに野生型 α サブユニットを標準として *dnaE173* 標品中の α サブユニットを定量し Pol III*の分子数を積算した。

野生型 Pol III*は当研究室藤井慎吾氏により同様の精製法にて精製された精製標品を用い、野生型 α サブユニットは当研究室真木寿治教授による精製標品 (Maki and Kornberg 1985)を用いた。

dnaQ32 Pol III*は、東京大学分子細胞生物学研究所にて井原啓一氏によって部位特異的変位導入及び発現ベクターpET22b (Novagen) へのクローニングにより作成された *dnaQ32* 変異型 ϵ サブユニット過剰発現プラスミド pWQ3 をもとに、この変異型 ϵ サブユニットが野生型に対して優性であることを利用して大腸菌 HMS174 (DE3)株における強制発現により野生型 ϵ サブユニットが変異型 ϵ サブユニットに置換された Pol III*として得た。精製法は上記各 Pol III*の精製法と同様であり、井原氏及び当研究室増田雄司氏による比活性 1.3×10^6 units/mg の精製標品を用いた。

β サブユニット及びSSBはそれぞれ(Johanson *et al.* 1986; Griep and McHenry 1989)に従い精製した。

Pol III*標準DNAポリメラーゼアッセイ (M13 ssDNA)

Pol III*としての標準的な活性は、M13mp18 ssDNAを鋳型に単一プライマー PolIII2 (5'-GGGCG AAAAA CCGTC TATCA GGGCG ATGG-3')からのホロ酵素としての鎖伸長反応における、単位時間あたりのDNA合成量を測定し求めた。反応液 (25 μ l, 20 mM Tris-HCl, 4% glycerol, 8 mM DTT, 80 μ g/ml BSA, 1 mM ATP, 8 mM MgCl₂, 86 ng 鋳型/プライマー, 0.6 μ g SSB, 200 units β サブユニット, 各100 μ M dATP, dCTP, dGTP, [α -³²P]dTTP (~400

Ci/mol)) に対しPol III*を加え反応開始し、30°C、5分の反応後25 μ lの50 mM EDTA (pH 8.0)を混合することで反応停止した。そのうち5 μ lをDE81にスポットし50 mlの0.5 M Na_2HPO_4 で3回洗浄後、濃度既知の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ 標品を標準としてBAS 2000により新規にDNAとして取り込まれたdTTP量を定量し、全体としてのDNA合成量に換算した。1 unitは1分間に1 pmolのdNMPをDNAに取り込む活性と定義した。

Pol IIIホロ酵素burst DNA合成 (M13 ssDNA)

Pol III*と β サブユニットからなる再構成ホロ酵素による同調的DNA鎖伸長反応burst DNA合成は、M13mp18もしくはM13mp18、M13mp19に対し大腸菌*rpsL*遺伝子ORFを含む547 bpの断片をそれぞれクローニングしたM13MOL18d、M13MOL19d (各7764 bp) のssDNAを鋳型に、単一プライマーuni25 (5'-CGACG TTGTA AAACG ACGGC CAGTG-3')、F1271 (5'-CGTAA TGCCA CTACG AAGGC ACCAA CC-3')、F2914 (5'-GTTAC CAGAA GGAAA CCGAG GAAAC GC-3') のいずれかをプライマーとして行った。まず12.5 μ lのbuffer 1 (20 mM Tris-HCl, 4% glycerol, 8 mM DTT, 80 μ g/ml BSA, 1 mM ATP, 8 mM MgCl_2 , 0.1 pmol 鋳型/プライマー、400 units β subunit, 2.0 μ g SSB、各100 μ MのdATP、dCTP、dGTP) に対しPolIII*を加え30°C、3分間保温することで開始複合体 (initiation complex) を形成し、続いて37.5 μ lのbuffer 2 (20 mM Tris-HCl, 4% glycerol, 8mM DTT, 80 μ g/ml BSA、各100 μ MのdATP、dCTP、dGTP、133 μ M dTTPもしくは

[α - 32 P]dTTP (~400 Ci/mol) を加えDNA鎖伸長反応を開始した。30°Cにおける反応後、適時において全体もしくは一部の反応液を等量の50 mM EDTA (pH 8.0)と混合し反応停止した。DNA合成量は各時点における50 μ l反応分の値として上記同様に換算定量した。

また合成産物解析に当たっては反応停止液をフェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により精製し、アルカリアガロースゲル電気泳動の際には少量のloading buffer (60 mM NaOH, 60 mM EDTA, 20 % sucrose, 0.08 % bromocresol green) に懸濁し、アルカリアガロースゲル (0.7 %もしくは1.0 % アガロース、50 mM NaOH) にて50 V定電圧で約4~6時間電気泳動した。電気泳動後、中和、乾燥したゲルをBAS 2000で観察した。サイズマーカーには5'-[32 P] 標識した λ / EcoT14I digest DNAを用いた。

Pol III*DNAポリメラーゼアッセイ (poly(dA)/oligo(dT))

Pol III*の校正機能活性及びプロセッシビティは、poly(dA)/oligo(dT)₁₅ を鋳型とした DNA ポリメラーゼ反応において観察した。

反応液 (25 μ l, 20 mM Tris-HCl, 4% glycerol, 8 mM DTT, 80 μ g/ml BSA, 8 mM MgCl₂, 100 μ M dTTP もしくは[α - 32 P]dTTP (~400 Ci/mol), 21.6 μ M (ヌクレオチド換算、dA:dT=2:1 または 20:1) poly(dA)/oligo(dT)₁₅) に対し、野生型 5~10 unit 、*dnaE173* 型 2.5~5 unit の Pol III*を加え反応開始し、30°C にて反応した。適時において全体もしくは一部の反応液を等量の 50 mM EDTA (pH 8.0)と混合し反応停止した。DNA 合成量は各時点における 50 μ l

反応分の値として上記同様に換算定量し、ターンオーバーアッセイ時には1~2 ml の反応停止産物を PEI-cellulose プレート下部にスポットしたものを、薄層クロマトグラフィー用展開層にて1 M LiCl、1 M ギ酸、50 mM NaH₂PO₄ により展開し、乾燥後 BAS 2000 で観察した。

プロセッシビティ観察の際には5'-[³²P]標識した oligo(dT)₁₅ を用い、反応停止産物をフェノール/クロロフォルム抽出及びエタノール沈殿により精製した後フォルムアミドに懸濁し、4% ポリアクリルアミドシークエンス用ゲル (5 %C、8.3 M Urea、1x TBE) にて30 W 定電力で1~2 時間電気泳動後 BAS 2000 で観察した。分子量マーカーとして5'-[³²P]標識した100 bp ladder DNA を用いた。

サザンハイブリダイゼーションによるポージング配列解析

ssDNA 上の *rpsL* 遺伝子における Pol III ホロ酵素の動態を探るためのサザンハイブリダイゼーションによる反応産物検出法 (図13C) においては、まず上記の burst DNA 合成法に則した DNA 鎖伸長反応を行った。M13MOL18d、M13MOL19d ssDNA を鋳型に、*rpsL* 遺伝子から離れた場所にアニールする F1271 もしくは F2914 プライマーを用いた。RI 標識化合物を用いない burst DNA 合成産物に対し検出領域に合わせた適当な内部標準 DNA を加え、これをフェノール/クロロフォルム抽出及びエタノール沈殿により精製し、各鋳型について2通りずつ計4通り設定した検出領域に合わせて適当に制限酵素を組み合わせ、それらによる制限処理によって産物の長さを検出可能な長さに調節

した (図 1 4)。M13MOL18d の上流側を解析する際には *NspV* と *HindIII*、下流側には *EcoRI* と *SmaI* を用い、M13MOL19d の上流側には *SmaI* と *PvuII*、下流側には *SphI* によって 2 カ所で切断し、それぞれ 357 nt、296 nt、388 nt、455 nt の、もしくはそれ以下の長さの検出断片を含む DNA 集団を得た。各内部標準 DNA は各検出用プローブに相補な配列を持ち、上記の制限断片よりも長くかつこれらの制限酵素では切断されないような *rpsL* 変異体配列を用いている。M13MOL18d の上流側には *NspV* 部位に変位を持つ 455 nt 長の *SphI* 二重制限断片、下流側には *SmaI* 部位に変位を持つ 356 nt 長の *NspV-HindIII* 断片を用い、M13MOL19d の上流側には *SmaI* 部位に変位を持つ 448 nt 長の *NspV-PvuII* 断片、下流側には *SphI* 部位に変位を持つ 500 nt 長の *EcoRI-SmaI* 断片を用いている。各制限反応産物はエタノール沈殿後フォルムアミドに懸濁し、45 cm 長の 4% Long Ranger™ゲル (8.3 M Urea、1× TBE) にて 35 W 定電力で 2 時間~2 時間 30 分の電気泳動により分離した。塩基配列マーカーは各解析領域に合わせ制限断片と 5'末端が一致するようなプライマーをそれぞれ設計し、dideoxy 法に基づき標識化合物抜き条件下で Klenow fragment により合成した 4 種類の鎖伸長反応産物を、上記の解析対象 DNA 断片と共に電気泳動し、サザンハイブリダイゼーションによって同時に検出した。使用したプライマーはそれぞれ M13MOL18d 上流側 d18SeqM (5'-AGCTT GCATG CCTGC AGGTC-3')、下流側 d18SeqM2 (5'-GGGAG GTCTT TAACA CGACC-3')、M13MOL19d 上流側 d19SeqM1 (5'-CTGGC GAAAG GGGGA T-3')、下流側 d19SeqM2 (5'-CCCGC AAAAA CGTGG CGTAT-3')

である。DNA 産物の HyBond N⁺ ナイロンメンブレンへの転写には GenesweepTM (Hoefer) を用い、転写 buffer (1 x TBE、20%メタノール) 中で 1.5~2.0 A の通電により転写した。転写後のメンブレンは 120000 μ J の UV クロスリンクの後、5 x Denhard's reagent を含むハイブリダイゼーション buffer (6 x SSC、0.5 % SDS、100 mg Salmon sperm DNA) 中にて 68°C、15 分間のプレハイブリダイゼーションを行い、プローブを加えたハイブリダイゼーション buffer 中にて 68°C、12 時間のハイブリダイゼーションを行った。2 x SSC 0.1 % SDS による室温、5 分間の洗浄 4 回後、BAS 2000 で観察した。検出用プローブとして用いた RNA プローブは、各検出領域の上流側末端付近の一部の配列を T7 プロモータータグ付きのプライマーで PCR し、得られた産物を鋳型とした T7 RNA ポリメラーゼによる鎖特異的な *in vitro* 転写における [α -³²P]UMP の取り込みにより標識、調製した。プローブの鋳型 DNA 合成の PCR に用いたプライマーは、M13MOL18d の上流側が d18SeqM と DwnstrmT7P (5'-TAATA CGACT CACTA TAGGG CGA CCGTT AAGTA AGGCC AAACG-3')、下流側が d18SeqM2 と 18d5'T7P (5'-TAATA CGACT CACTA TAGGG CGA AGTGA CTTCC TACAT CGG-3')、M13MOL19d の上流側が d19SeqM1 と 19d3'T7P (5'-TAATA CGACT CACTA TAGGG CGA AAATA GCTCC TGGTT TTAGC TTG-3') 下流側が d19SeqM2 と 19d5'T7P (5'-TAATA CGACT CACTA TAGGG CGA ACCGT TAGTC AGACG AACAC GGC-3') の各対であり、それぞれをもとに 182 nt、89 nt、115 nt、100 nt のプローブを得、これを使用した。

引用文献

- Bebenek, K., Abbotts, J., Roberts, J. D., Wilson, S. H. and Kunkel, T. A. (1989). "Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase." J Biol Chem 264(28): 16948-56.
- Blinkova, A., Hervas, C., Stukenberg, P. T., Onrust, R., O'Donnell, M. E. and Walker, J. R. (1993). "The *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme contains both products of the *dnaX* gene, tau and gamma, but only tau is essential." J Bacteriol 175(18): 6018-27.
- Burgers, P. M. and Kornberg, A. (1982). "ATP activation of DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. I. ATP-dependent formation of an initiation complex with a primed template." J Biol Chem 257(19): 11468-73.
- Canceill, D. and Ehrlich, S. D. (1996). "Copy-choice recombination mediated by DNA polymerase III holoenzyme from *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A 93(13): 6647-52.
- Canceill, D., Viguera, E. and Ehrlich, S. D. (1999). "Replication Slippage of Different DNA Polymerases Is Inversely Related to Their Strand Displacement Efficiency." J Biol Chem 274(39): 27481-27490.
- Drake, J. W. (1969). "Comparative rates of spontaneous mutation." Nature 221(5186): 1132.
- Echols, H., Lu, C. and Burgers, P. M. (1983). "Mutator strains of *Escherichia coli*, *mutD* and *dnaQ*, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme." Proc Natl Acad Sci U S A 80(8): 2189-92.
- Fersht, A. R., Knill-Jones, J. W. and Tsui, W. C. (1982). "Kinetic basis of spontaneous mutation. Misinsertion frequencies, proofreading specificities and cost of proofreading by DNA polymerases of *Escherichia coli*." J Mol Biol 156(1): 37-51.
- Fijalkowska, I. J. and Schaaper, R. M. (1996). "Mutants in the Exo I motif of *Escherichia coli dnaQ*: defective proofreading and inviability due to error catastrophe." Proc Natl Acad Sci U S A 93(7): 2856-61.
- Fowler, R. G., Degnen, G. E. and Cox, E. C. (1974). "Mutational specificity of a conditional *Escherichia coli* mutator, *mutD5*." Mol Gen Genet 133(3): 179-91.
- Freemont, P. S., Friedman, J. M., Beese, L. S., Sanderson, M. R. and Steitz, T. A. (1988). "Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA." Proc Natl Acad Sci U S A 85(23):

8924-8.

- Griep, M. A. and McHenry, C. S. (1989). "Glutamate overcomes the salt inhibition of DNA polymerase III holoenzyme." J Biol Chem 264(19): 11294-301.
- Horiuchi, T., Maki, H. and Sekiguchi, M. (1978). "A new conditional lethal mutator (*dnaQ49*) in *Escherichia coli* K12." Mol Gen Genet 163(3): 277-83.
- Huang, Y., Braithwaite, D. K. and Ito, J. (1997). "Evolution of *dnaQ*, the gene encoding the editing 3' to 5' exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme in Gram-negative bacteria." FEBS Lett 400(1): 94-8.
- Jeruzalmi, D., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2001). "Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III." Cell 106(4): 429-41.
- Jeruzalmi, D., Yurieva, O., Zhao, Y., Young, M., Stewart, J., Hingorani, M., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2001). "Mechanism of processivity clamp opening by the delta subunit wrench of the clamp loader complex of *E. coli* DNA polymerase III." Cell 106(4): 417-28.
- Johanson, K. O., Haynes, T. E. and McHenry, C. S. (1986). "Chemical characterization and purification of the beta subunit of the DNA polymerase III holoenzyme from an overproducing strain." J Biol Chem 261(25): 11460-5.
- Johnson, K. A. (1993). "Conformational coupling in DNA polymerase fidelity." Annu Rev Biochem 62: 685-713.
- Kang, S., Ohshima, K., Shimizu, M., Amirhaeri, S. and Wells, R. D. (1995). "Pausing of DNA synthesis in vitro at specific loci in CTG and CGG triplet repeats from human hereditary disease genes." J Biol Chem 270(45): 27014-27021.
- Kelman, Z. and O'Donnell, M. (1995). "DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine." Annu Rev Biochem 64: 171-200.
- Kelman, Z., Yuzhakov, A., Andjelkovic, J. and O'Donnell, M. (1998). "Devoted to the lagging strand_the subunit of DNA polymerase III holoenzyme contacts SSB to promote processive elongation and sliding clamp assembly." Embo J 17(8): 2436-49.
- Kim, D. R. and McHenry, C. S. (1996). "Identification of the beta-binding domain of the alpha subunit of *Escherichia coli* polymerase III holoenzyme." J Biol Chem 271(34): 20699-704.
- Kim, S., Dallmann, H. G., McHenry, C. S. and Marians, K. J. (1996). "Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB

- interaction mediates rapid replication fork movement." Cell 84(4): 643-50.
- 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(35): 21406-12.
- Klarmann, G. J., Schaubert, C. A. and Preston, B. D. (1993). "Template-directed pausing of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase during polymerization of HIV-1 sequences in vitro [published erratum appears in J Biol Chem 1993 Jun 25;268(18):13764]." J Biol Chem 268(13): 9793-802.
- Kornberg, A. and Baker, T. A. (1992). DNA replication, Second Edition, W. H. Freeman and Company.
- LaDuca, R. J., Fay, P. J., Chuang, C., McHenry, C. S. and Bambara, R. A. (1983). "Site-specific pausing of deoxyribonucleic acid synthesis catalyzed by four forms of *Escherichia coli* DNA polymerase III." Biochemistry 22(22): 5177-88.
- Leu, F. P. and O'Donnell, M. (2001). "Interplay of clamp loader subunits in opening the beta sliding clamp of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme." J Biol Chem 276(50): 47185-94.
- Lopez de Saro, F. J. and O'Donnell, M. (2001). "Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I." Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8376-80.
- Maki, H., Horiuchi, T. and Sekiguchi, M. (1983). "Isolation of conditional lethal mutator mutants of *Escherichia coli* by localized mutagenesis." J Bacteriol 153(3): 1361-7.
- Maki, H. and Kornberg, A. (1985). "The polymerase subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. II. Purification of the alpha subunit, devoid of nuclease activities." J Biol Chem 260(24): 12987-92.
- Maki, H. and Kornberg, A. (1987). "Proofreading by DNA polymerase III of *Escherichia coli* depends on cooperative interaction of the polymerase and exonuclease subunits." Proc Natl Acad Sci U S A 84(13): 4389-92.
- Maki, H., Maki, S. and Kornberg, A. (1988). "DNA Polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. IV. The holoenzyme is an asymmetric dimer with twin active sites." J Biol Chem 263(14): 6570-8.
- Maki, H., Mo, J. Y. and Sekiguchi, M. (1991). "A strong mutator effect caused by an amino acid change in the alpha subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*." J Biol Chem 266(8): 5055-61.

- Maki, S. and Kornberg, A. (1988). "DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. I. Purification and distinctive functions of subunits tau and gamma, the *dnaZX* gene products." J Biol Chem 263(14): 6547-54.
- Maruyama, M., Horiuchi, T., Maki, H. and Sekiguchi, M. (1983). "A dominant (*mutD5*) and a recessive (*dnaQ49*) mutator of *Escherichia coli*." J Mol Biol 167(4): 757-71.
- McHenry, C. S. and Crow, W. (1979). "DNA polymerase III of *Escherichia coli*. Purification and identification of subunits." J Biol Chem 254(5): 1748-53.
- Mo, J. Y., Maki, H. and Sekiguchi, M. (1991). "Mutational specificity of the *dnaE173* mutator associated with a defect in the catalytic subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*." J Mol Biol 222(4): 925-36.
- Naktinis, V., Turner, J. and O'Donnell, M. (1996). "A molecular switch in a replication machine defined by an internal competition for protein rings." Cell 84(1): 137-45.
- Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J. and Fuchs, R. P. (2000). "All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis." Embo J 19(22): 6259-65.
- Pritchard, A. E., Dallmann, H. G., Glover, B. P. and McHenry, C. S. (2000). "A novel assembly mechanism for the DNA polymerase III holoenzyme DnaX complex: association of delta' with DnaX(4) forms DnaX(3)delta'." Embo J 19(23): 6536-45.
- Pritchard, A. E. and McHenry, C. S. (1999). "Identification of the acidic residues in the active site of DNA polymerase III." J Mol Biol 285(3): 1067-80.
- Reems, J. A. and McHenry, C. S. (1994). "*Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme footprints three helical turns of its primer." J Biol Chem 269(52): 33091-6.
- Reems, J. A., Wood, S. and McHenry, C. S. (1995). "*Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme subunits alpha, beta, and gamma directly contact the primer-template." J Biol Chem 270(10): 5606-13.
- Scheuermann, R., Tam, S., Burgers, P. M., Lu, C. and Echols, H. (1983). "Identification of the epsilon-subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: a fidelity subunit for DNA replication." Proc Natl Acad Sci U S A 80(23): 7085-9.
- Shamoo, Y. and Steitz, T. A. (1999). "Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA

- polymerase and a polymerase editing complex." Cell 99(2): 155-66.
- Soengas, M. S., Esteban, J. A., Lazaro, J. M., Bernad, A., Blasco, M. A., Salas, M. and Blanco, L. (1992). "Site-directed mutagenesis at the Exo III motif of phi 29 DNA polymerase; overlapping structural domains for the 3'-5' exonuclease and strand-displacement activities." Embo J 11(11): 4227-37.
- Steitz, T. A. (1999). "DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms." J Biol Chem 274(25): 17395-8.
- Studwell, P. S. and O'Donnell, M. (1990). "Processive replication is contingent on the exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme." J Biol Chem 265(2): 1171-8.
- Studwell-Vaughan, P. S. and O'Donnell, M. (1993). "DNA polymerase III accessory proteins. V. Theta encoded by *holE*." J Biol Chem 268(16): 11785-91.
- Stukenberg, P. T. and O'Donnell, M. (1995). "Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. V. Four different polymerase-clamp complexes on DNA." J Biol Chem 270(22): 13384-13391.
- Suo, Z. and Johnson, K. A. (1998). "DNA secondary structure effects on DNA synthesis catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase." J Biol Chem 273(42): 27259-67.
- Tabor, S. and Richardson, C. C. (1989). "Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7 DNA polymerase by in vitro mutagenesis." J Biol Chem 264(11): 6447-58.
- Takano, K., Nakabeppu, Y., Maki, H., Horiuchi, T. and Sekiguchi, M. (1986). "Structure and function of *dnaQ* and *mutD* mutators of *Escherichia coli*." Mol Gen Genet 205(1): 9-13.
- Tang, M., Pham, P., Shen, X., Taylor, J. S., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M. F. (2000). "Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis." Nature 404(6781): 1014-8.
- Trinh, T. Q. and Sinden, R. R. (1991). "Preferential DNA secondary structure mutagenesis in the lagging strand of replication in *E. coli*." Nature 352(6335): 544-7.
- Wang, J., Sattar, A. K., Wang, C. C., Karam, J. D., Konigsberg, W. H. and Steitz, T. A. (1997). "Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69." Cell 89(7): 1087-99.
- Weaver, D. T. and DePamphilis, M. L. (1982). "Specific sequences in native DNA that arrest synthesis by DNA polymerase alpha." J Biol

Chem 257(4): 2075-86.

Weaver, D. T. and DePamphilis, M. L. (1984). "The role of palindromic and non-palindromic sequences in arresting DNA synthesis *in vitro* and *in vivo*." J Mol Biol 180(4): 961-86.

Yuzhakov, A., Kelman, Z. and O'Donnell, M. (1999). "Trading places on DNA--a three-point switch underlies primer handoff from primase to the replicative DNA polymerase." Cell 96(1): 153-63.

Yuzhakov, A., Turner, J. and O'Donnell, M. (1996). "Replisome assembly reveals the basis for asymmetric function in leading and lagging strand replication." Cell 86(6): 877-86.

和文献

井原啓一 (1993). "大腸菌 *dnaQ* 遺伝子の 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性完全欠損株の分離と解析" 東京大学大学院農学系研究科修士論文

真木寿治 (1994). "自然突然変異と修復機構" 細胞工学 13(8):663-72

秋山昌広, 青木和博, 真木寿治 (1996). "DNA複製エラーの発生と抑制のメカニズム" 実験医学 14(11):1533-40

謝辞

本研究を行うに当たり御指導を頂いた原核生物分子遺伝学講座 真木寿治教授には、博士前期課程からの長きにわたり、研究に際しての細かく有意義な御指導のみならず、科学の基礎から論理的考え方、学生生活に至るまで終始温かい御助言、御尽力を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

また、同講座の秋山昌広助教授、真木智子助手、梅津桂子助手、増田雄司博士、並びに学生の皆様には、本研究に関する有意義な議論に加え研究環境の整備等への御尽力に対し、深く感謝いたします。

また、細胞遺伝学講座 小笠原直毅教授を初めとして守家成紀助教授、朝井計前助手、小林和夫助手には非常に有意義な助言、議論を賜り、ここに深く感謝の念を表します。

表1 大腸菌のミューテーター遺伝子

機能	遺伝子	遺伝子産物の機能	ミューテーターの強さ
DNAポリメラーゼ (校正機能)	<i>dnaE</i>	DNAポリメラーゼIII α サブユニット	1,000~100,000倍
	<i>polA</i>	DNAポリメラーゼI	—
	<i>dnaQ, mutD</i>	DNAポリメラーゼIII ϵ サブユニット 3'→5'エキソヌクレアーゼ	1,000~100,000倍
ミスマッチ修復	<i>mutH</i>	エンドヌクレアーゼ	100倍
	<i>mutS</i>	ミスマッチ認識、ATPase	
	<i>mutL</i>	MutSとの相互作用	
	<i>uvrD</i>	ヘリカーゼII	
	<i>vsr</i>	G:T特異的エンドヌクレアーゼ	10倍
	<i>mutY</i>	8-oxoG:A特異的Aグリコシラーゼ	100倍
	<i>mutM</i>	8-oxoG:C特異的8-oxoGグリコシラーゼ	10倍
	<i>ung</i>	ウラシルDNAグリコシラーゼ	10倍
ヌクレオチドプール の浄化	<i>mutT</i>	8-oxo dGTPase	1,000倍
	<i>dut</i>	dUTPase	—
その他	<i>ssb</i>	単鎖DNA結合タンパク	—
	<i>recA</i>	鎖交換反応、SOSの制御	—
	<i>LexA</i>	SOSリプレッサー	—
	<i>mutA</i>	tRNA (ϵ サブユニットの偽翻訳?)	10倍
	<i>mutC</i>	tRNA (ϵ サブユニットの偽翻訳?)	10倍

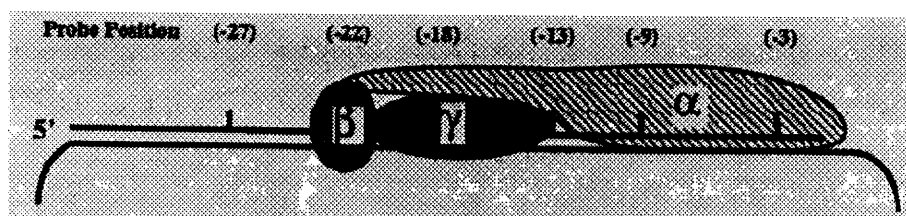
(Kornberg and Baker, 1992; 真木, 1994; 真木, 1996より改変)

表2 大腸菌DNAポリメラーゼIIIホロ酵素

サブユニット	遺伝子	分子量 (KDa)	機能	相互作用
α	<i>dnaE</i>	129.9	DNAポリメラーゼ	ϵ, τ, β
ϵ	<i>dnaQ</i>	27.5	3'→5'エキソヌクレアーゼ	α, θ
θ	<i>holE</i>	8.6	3'→5'エキソヌクレアーゼ促進	ϵ
τ	<i>dnaX</i>	71.1	コア2量体の形成、ATPアーゼ、 DnaBヘリカーゼ促進	$\tau, \alpha, \gamma, \delta, \delta', \chi, \psi, \beta?,$ DnaB
γ	<i>dnaX</i>	47.5	AAA ⁺ ATPアーゼ	$\tau, \gamma, \delta, \delta', \chi, \psi, \beta$
δ	<i>holA</i>	38.7	AAA ⁺ ファミリー、 β クランプ開環	$\tau, \gamma, \delta', \beta$
δ'	<i>holB</i>	36.9	AAA ⁺ ファミリー、 δ - β 相互作用調節	$\tau, \gamma, \delta, \beta$
χ	<i>holC</i>	16.6	SSBを介したプライマーゼの解離	$\gamma, \psi, \tau?, \beta, \text{SSB}$
ψ	<i>holD</i>	15.2		$\gamma, \chi, \tau?, \beta,$
β	<i>dnaN</i>	40.6	スライディングクランプ	$\alpha, \gamma, \delta, \delta', \chi, \psi, \beta, \tau?,$ Pol I, II, IV, V, DNAリガーゼ, MutS

構成	複合体
$\alpha\epsilon\theta$	コア (Pol III)
$(\alpha\epsilon\theta)_2\tau_2$	Pol III'
$\gamma_3\delta\delta'\chi\psi$	γ コンプレックス (クランプローター)
$\gamma_2\tau\delta\delta'\chi\psi$	DnaXコンプレックス (クランプローター)
$\gamma_2\delta\delta'\chi\psi$	
$(\alpha\epsilon\theta)_2\tau_2\gamma_3\delta\delta'\chi\psi$	Pol III* (Pol III'+ γ コンプレックス)
$(\alpha\epsilon\theta)_2\tau_2\gamma_2\tau\delta\delta'\chi\psi$	Pol III* (Pol III'+DnaXコンプレックス)
$(\alpha\epsilon\theta)_2\tau_2\gamma\tau_2\delta\delta'\chi\psi$	
$(\alpha\epsilon\theta)_2\tau_2\gamma_3\delta\delta'\chi\psi\beta_2(+\beta_2)$	Pol IIIホロ酵素 (Pol III*+スライディングクランプ)
$(\alpha\epsilon\theta)_2\tau_2\gamma_2\tau\delta\delta'\chi\psi\beta_2(+\beta_2)$	
$(\alpha\epsilon\theta)_2\tau_2\gamma\tau_2\delta\delta'\chi\psi\beta_2(+\beta_2)$	

A



B

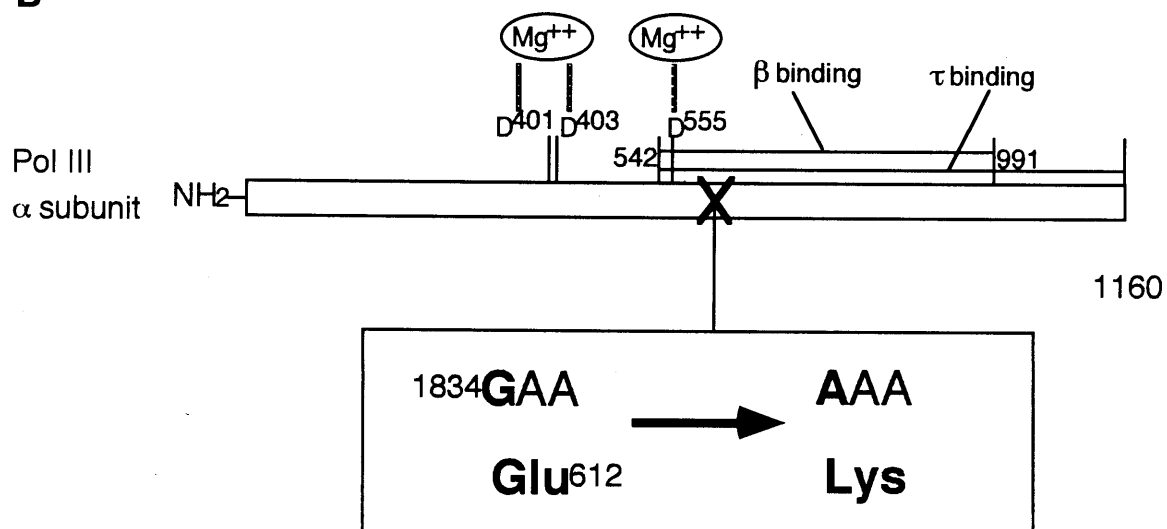


図1 Pol III αサブユニットの構造と *dnaE173* 変異

- A. クロスリンク実験により明らかになったプライマー末端付近におけるα, β, γ各サブユニットのDNA相互作用
- B. αサブユニット上にマップされた機能部位と *dnaE173* 変異の位置

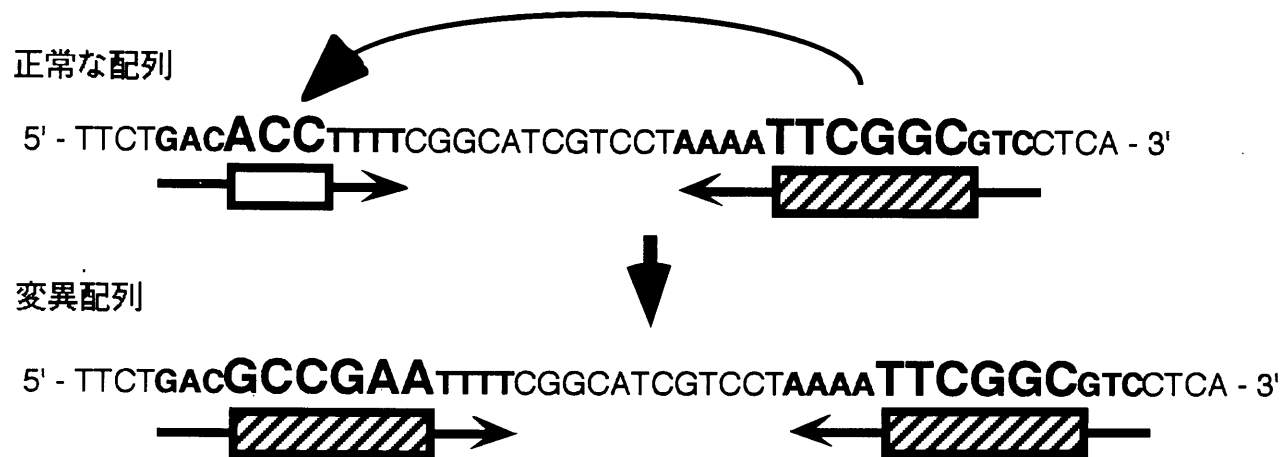
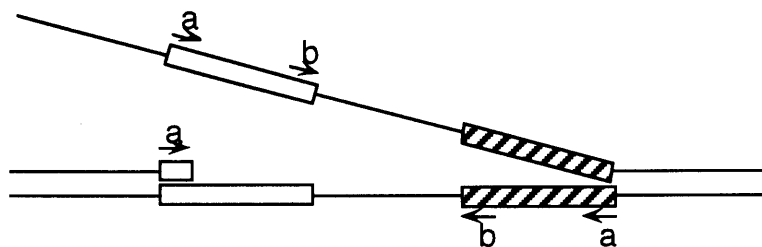
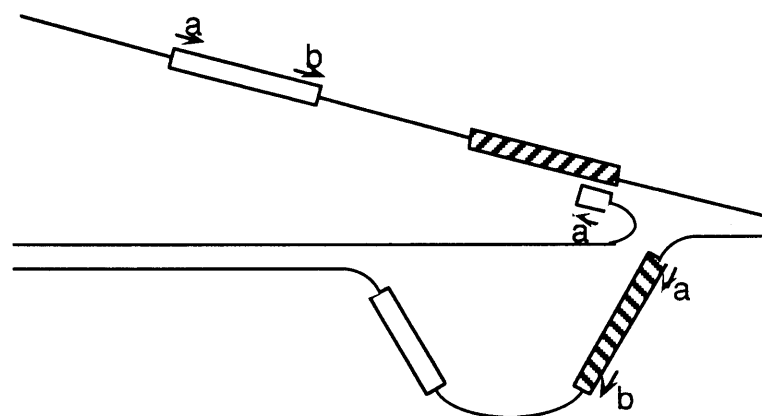


図2 配列置換変異の一例

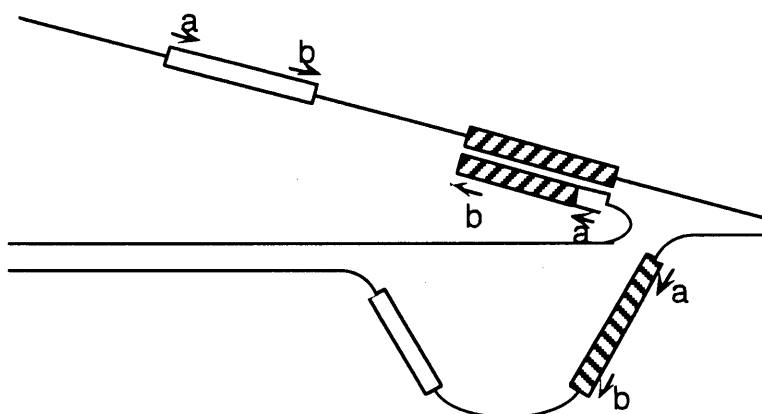
1. リーディング鎖合成



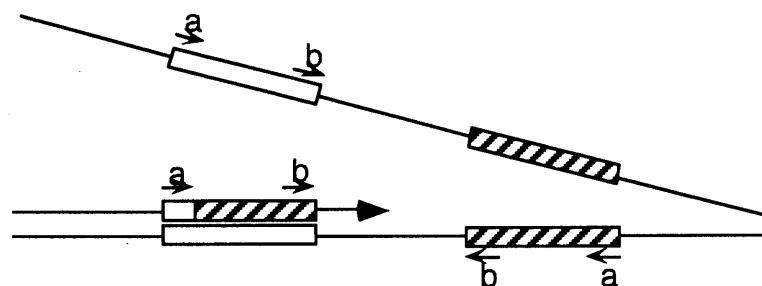
2. 相同配列aを介したラギング鎖鎖型DNAへのミスアラインメント



3. 偽反復配列の合成



4. リーディング鎖鎖型への再アラインメント (ミスマッチ変位中間体の形成)



5. 次回のDNA複製による配列置換変異の固定

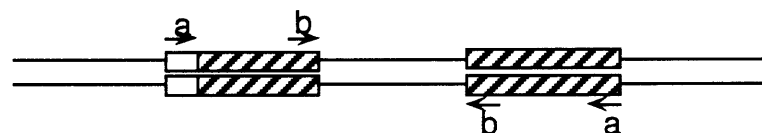
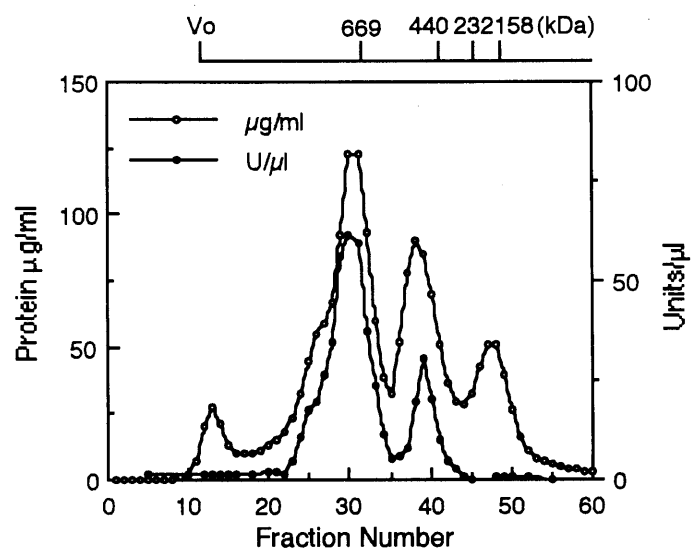


図3 "テンプレート・スイッチング" モデル

表 3 *dnaE173*変異型Pol III*精製表

フラクション	総活性 $\times 10^3$ units	比活性 $\times 10^3$ units/mg protein	収率 %
II. Ammonium sulfate	1374	24.4	100
III. HiTrap Heparin	193	223	14.0
IV. Mono Q	58.6	416	4.26
V. Superose 6	17.5	956	1.27

A



B

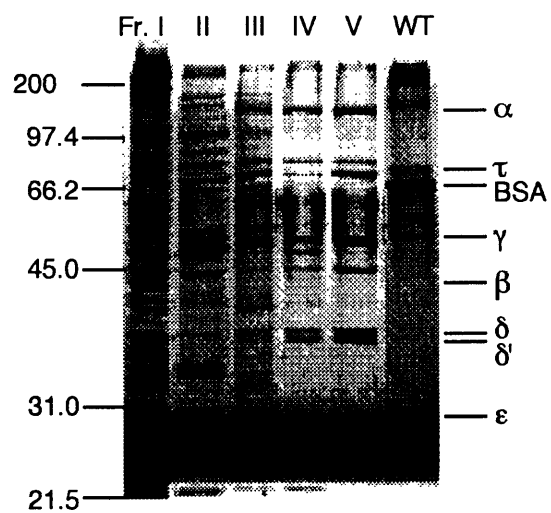
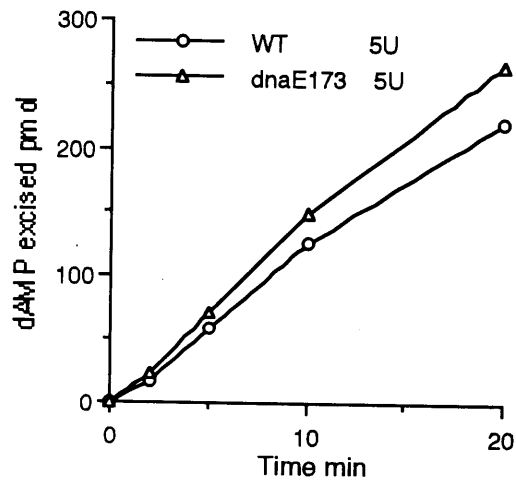


図 4 *dnaE173*型Pol III*の精製

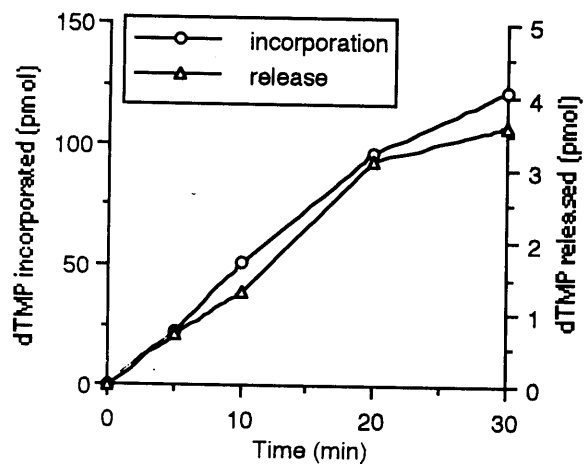
A Superose 6カラムクロマトグラフィーにおける各フラクションのタンパク濃度及び活性

B *dnaE173*Pol III*各精製ステップにおける標品の銀染色パターン

A



B Wild type



C *dnaE173*

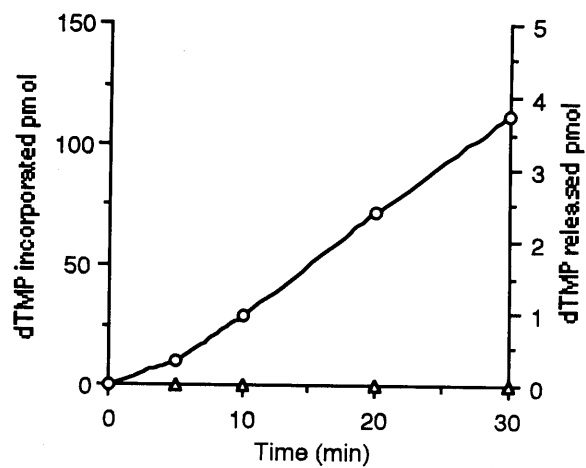


図5. *dnaE173*変異型Pol III*における校正機能の欠損

A poly(dA)を基質とした3' → 5'エキソヌクレアーゼアッセイ

B、C poly(dA)/oligo(dT)₁₅を基質としたターンオーバーアッセイ

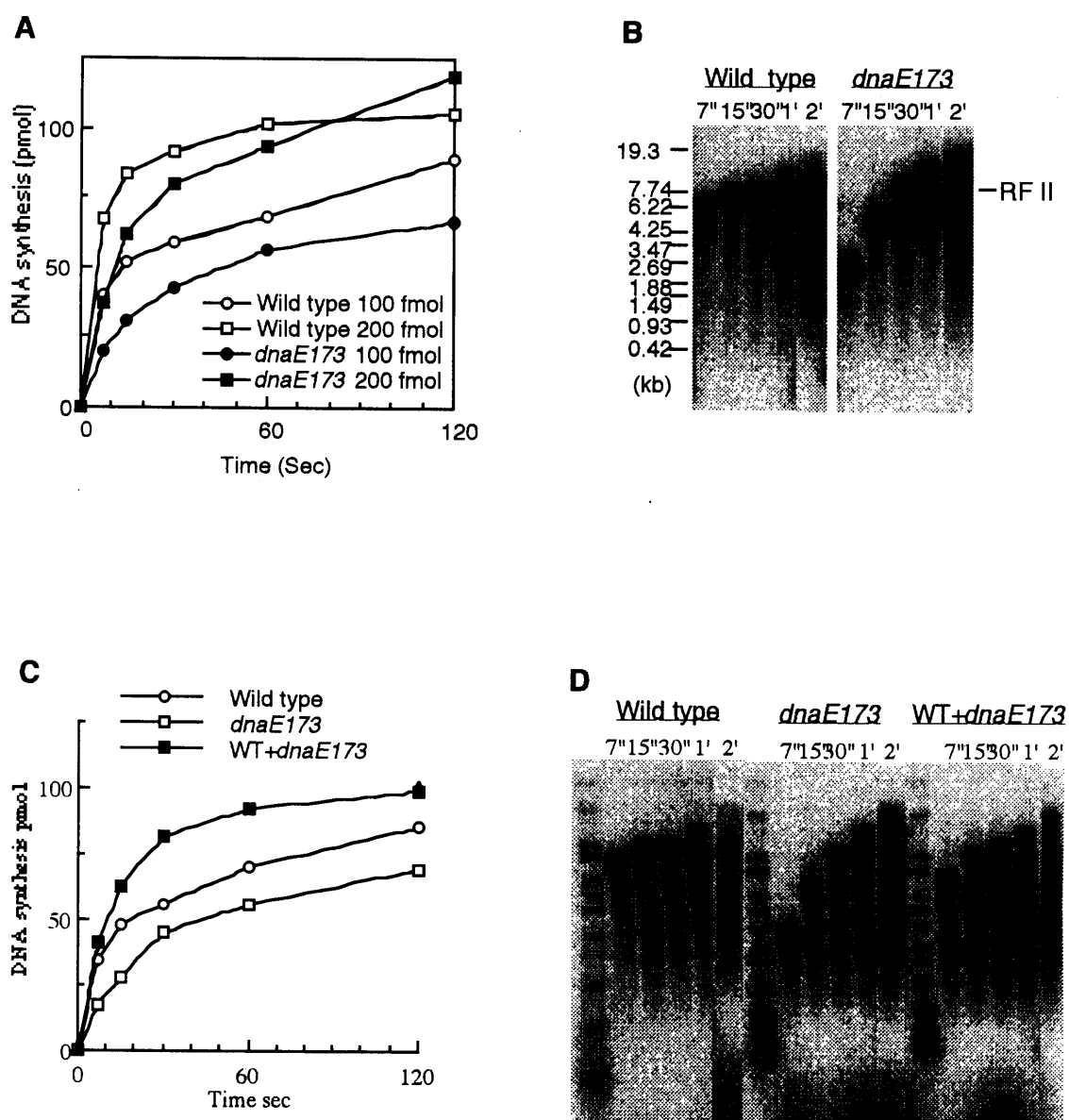
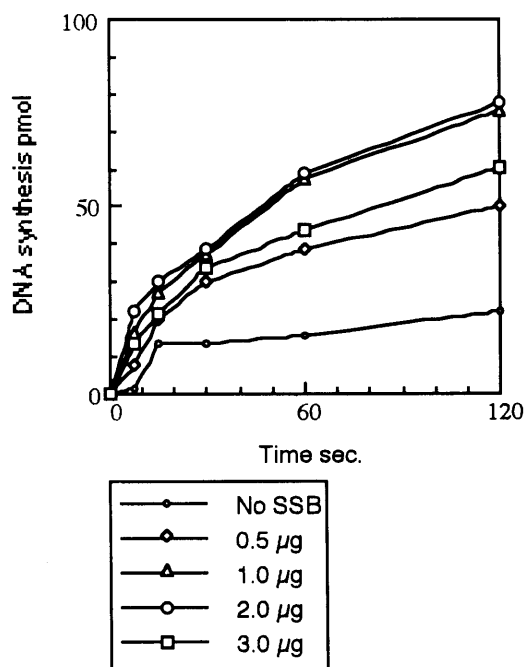


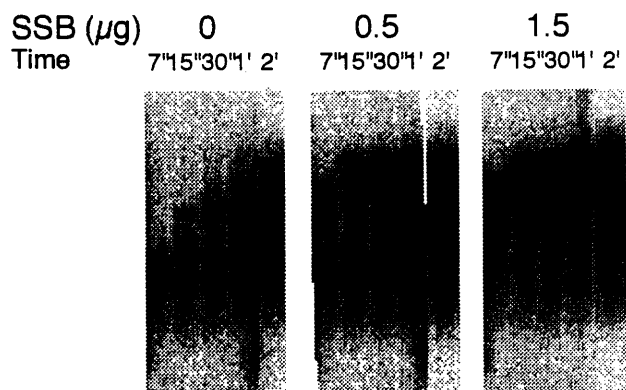
図6 野生型および*dnaE173*型Pol IIIホロ酵素によるburst DNA合成

- A DNA合成量の経時変化
- B 伸長DNA産物のアルカリアガロースゲル電気泳動パターン
- C 両Pol IIIホロ酵素開始複合体混合時のburst DNA合成における合成量の経時変化
- D 両Pol IIIホロ酵素開始複合体混合時のアルカリアガロースゲル電気泳動パターン

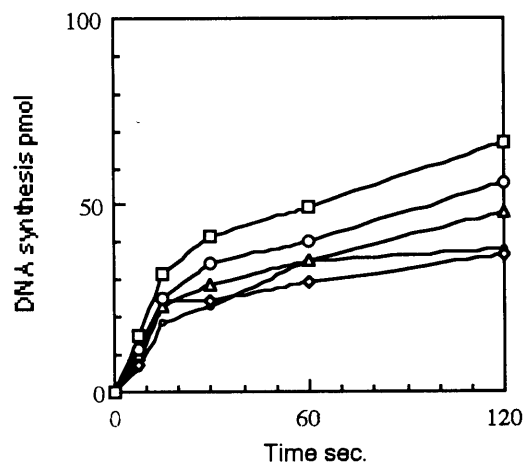
A Wild type



B Wild type



C *dnaE173*



D *dnaE173*

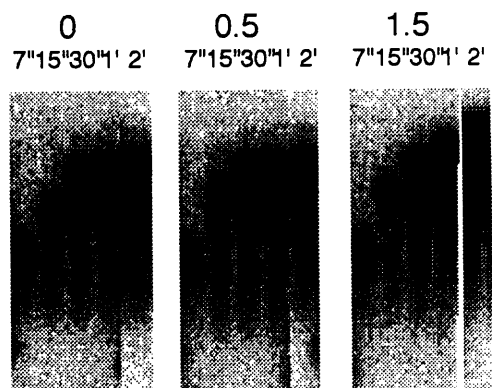
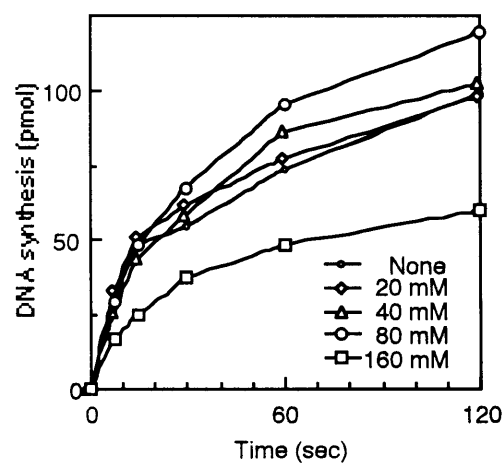


図7 SSB濃度による影響

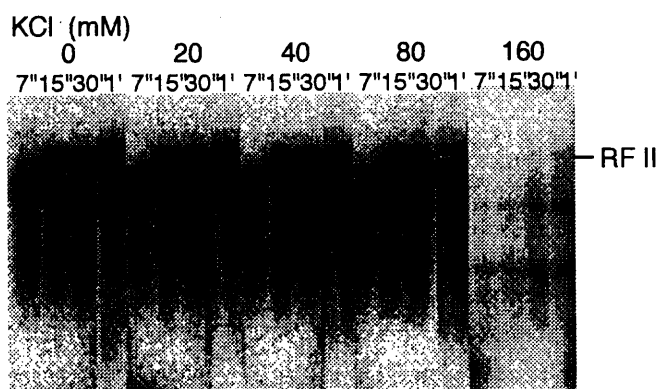
A、C 各SSB条件下におけるDNA合成量の経時変化

B、D 各SSB条件下burst DNA合成のアルカリアガロースゲル電気泳動パターン

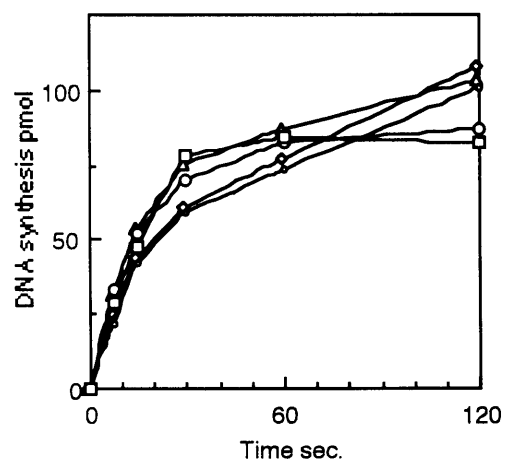
A Wild type



B Wild type



C *dnaE173*



D *dnaE173*

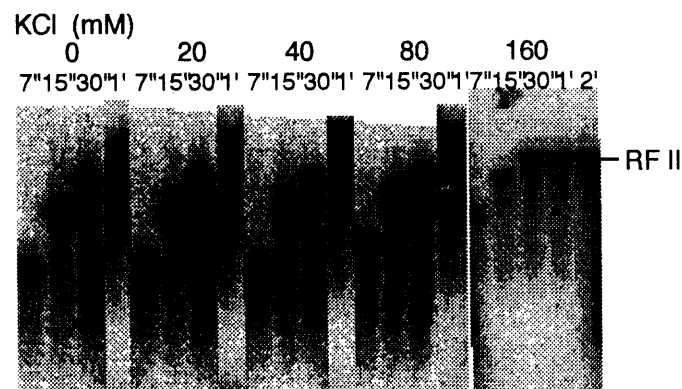
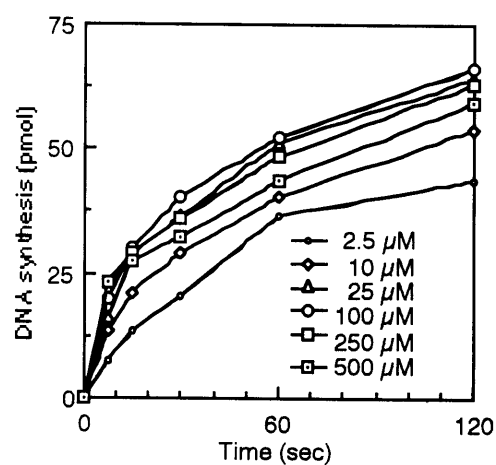


図8 KCl濃度による影響

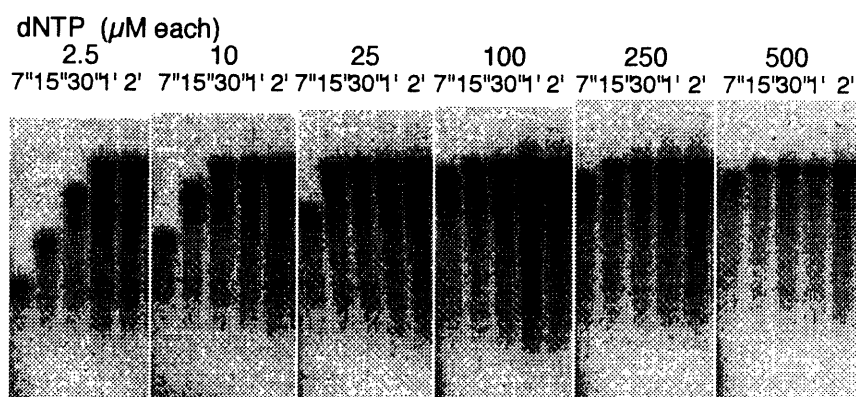
A、C 各KCl条件下におけるDNA合成量の経時変化

B、D 各KCl条件下burst DNA合成のアルカリアガロースゲル電気泳動パターン

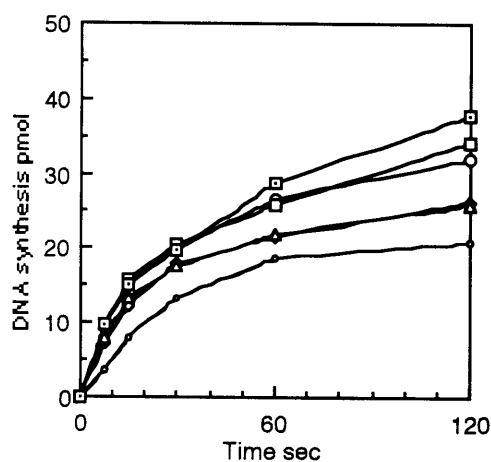
A Wild type



B Wild type



C *dnaE173*



D *dnaE173*

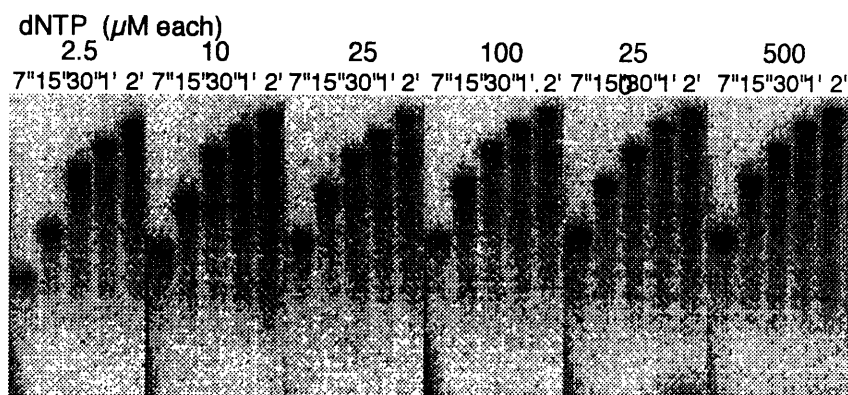
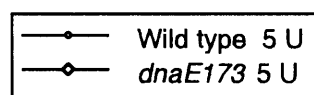
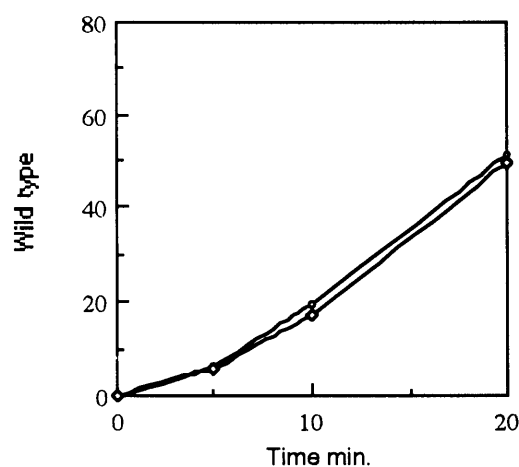


図9 dNTP濃度による影響

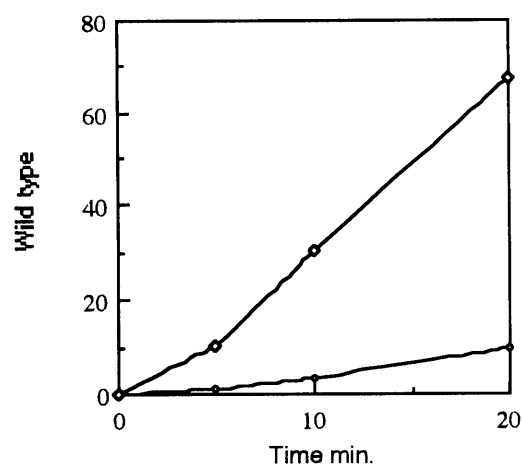
A、C 各dNTP条件下におけるburst DNA合成の経時変化

B、D 各dNTP条件下burst DNA合成のアルカリアガロースゲル電気泳動パターン

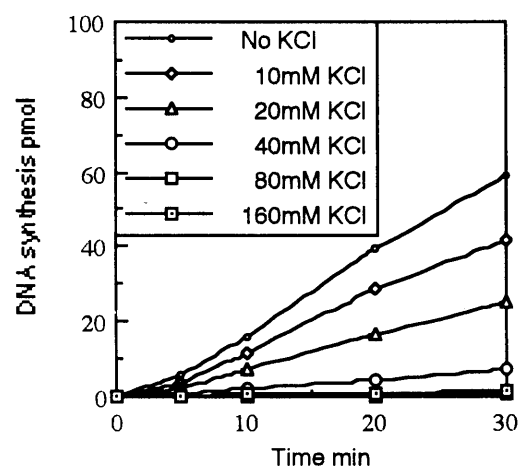
A (dA):(dT) = 2:1



B (dA):(dT) = 20:1



C Wild type 5 units



D *dnaE173* 5 units

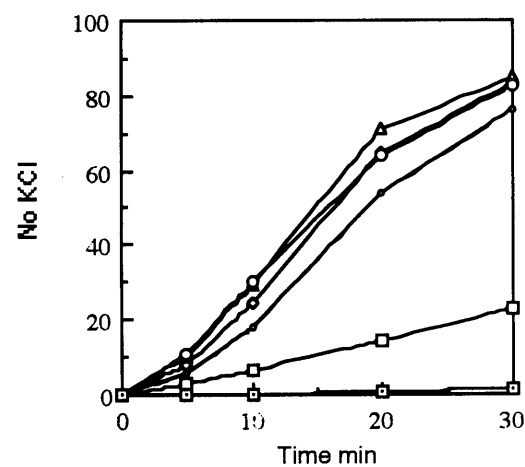


図 10 poly(dA)/oligo(dT)15におけるPol III*アッセイ

A (dA):(dT)=2:1 条件下におけるDNA合成量

B (dA):(dT)=20:1 条件下におけるDNA合成量

C 野生型Pol III*、(dA):(dT) = 2:1 鋳型使用 KClタイトレーション

D *dnaE173*Pol III*、(dA):(dT) = 2:1 鋳型使用 KClタイトレーション

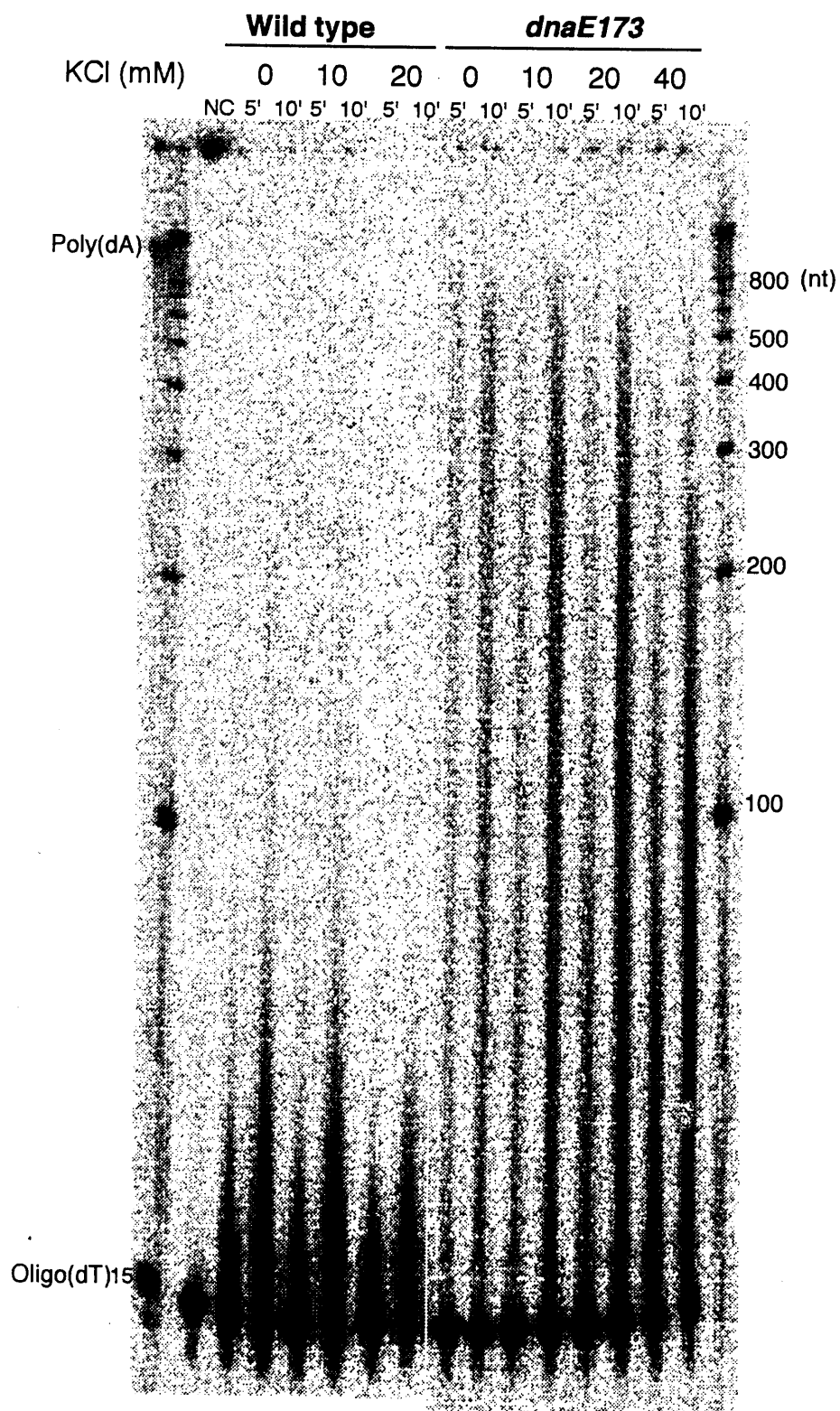


図 1 1 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動による
Pol III*のプロセッシビティの観察

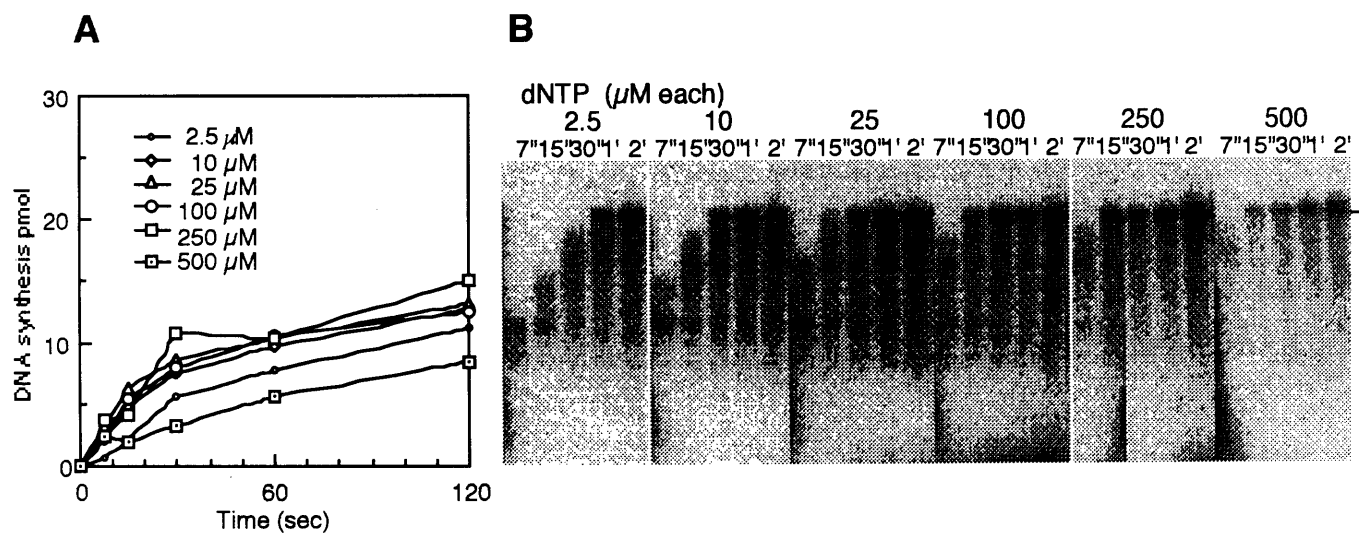


図 1 2 *dnaQ32*型Pol IIIホロ酵素によるburst DNA合成におけるdNTP濃度による影響

A 各dNTP条件下におけるDNA合成量の経時変化

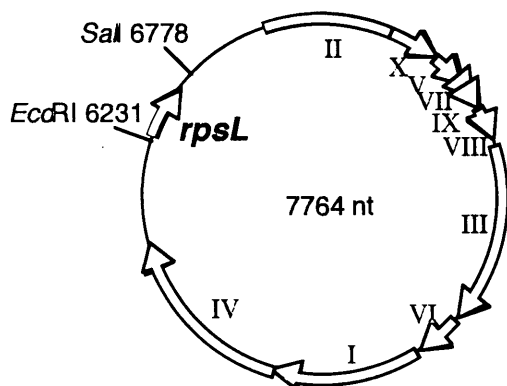
B 各dNTP条件下burst DNA合成のアルカリアガロースゲル電気泳動パターン

表4 3種Pol IIIホロ酵素による鎖伸長速度の基質濃度依存性

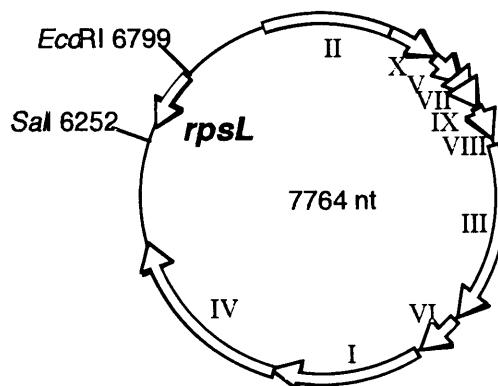
Allele	dNTP μM	Elongation rate nt/s	K_m μM	V_{max} nt/s	K_m (μM) PolIII core	[poly(dA)/oligo(dT)] PolIII*
Wild type	2.5	82.37				
	10	281.2				
	25	493.3	29.7	1065	67	166
	100	844.3	(1.0)	(1.0)	(1.0)	(1.0)
	250	860.6				
	500	934.2				
<i>dnaE173</i>	2.5	55.32				
	10	143.1				
	25	246.4	13.3	349	11	22.8
	100	316.9	(0.448)	(0.328)	(0.16)	(0.137)
	250	321.0				
	500	333.5				
<i>dnaQexo-</i>	2.5	88.67				
	10	250.2				
	100	699.1	19.9	790		
	250	727.3	(0.67)	(0.741)		
	500	810.5				

*各条件下における鎖伸長速度は、アルカリアガロースゲル電気泳動で観察されたDNA産物長から算出した。 K_m 及び V_{max} 値は鎖伸長速度をもとにLineweaver-Burk plot解析により算出した。Poly(dA)/Oligo(dT)における K_m 値はコアについては(Maki, 1995)より引用し、Pol III*については低濃度のpoly(dA)/oligo(dT)条件下で測定したDNA合成量をもとに算出したものであるため参考までに掲載した。

A M13MOL18d

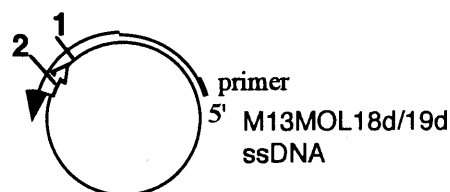


B M13MOL19d

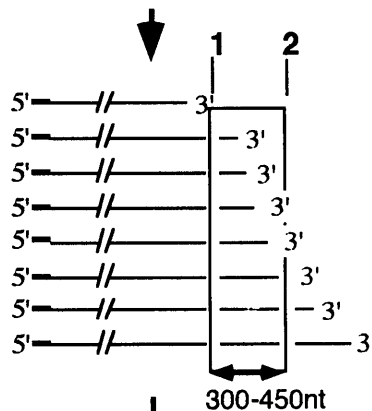


C 解析の流れ

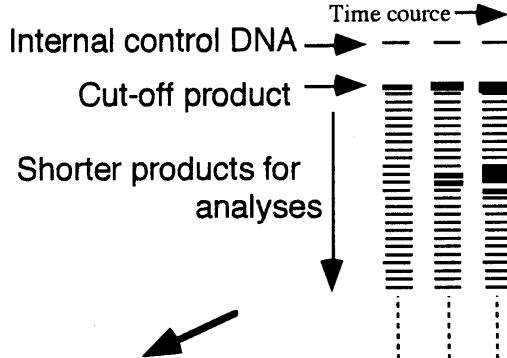
burst DNA合成



制限酵素によるDNA鎖伸長反応産物の切断



シーケンシングゲルによる分離

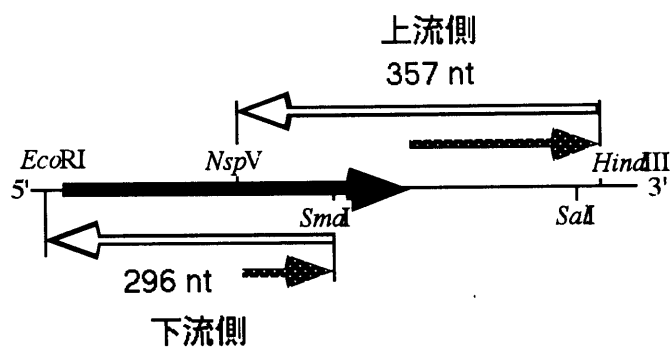


ナイロンメンブレンへのGeneSweep™による電氣的転写

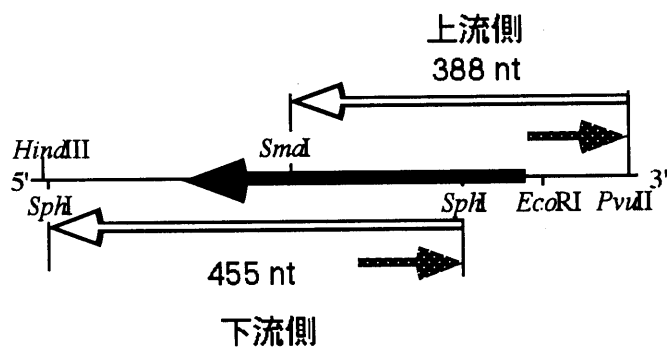
鎖特異的RNAプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション

図13 サザンハイブリダイゼーションによる特定領域DNA鎖伸長産物の塩基配列レベル解析

A M13MOL18d



B M13MOL19d



-  *rpsL*遺伝子領域
-  制限断片 (cut-off)
-  鎖特異的RNAプローブ

図14 サザンハイブリダイゼーションによる解析対象領域の構造

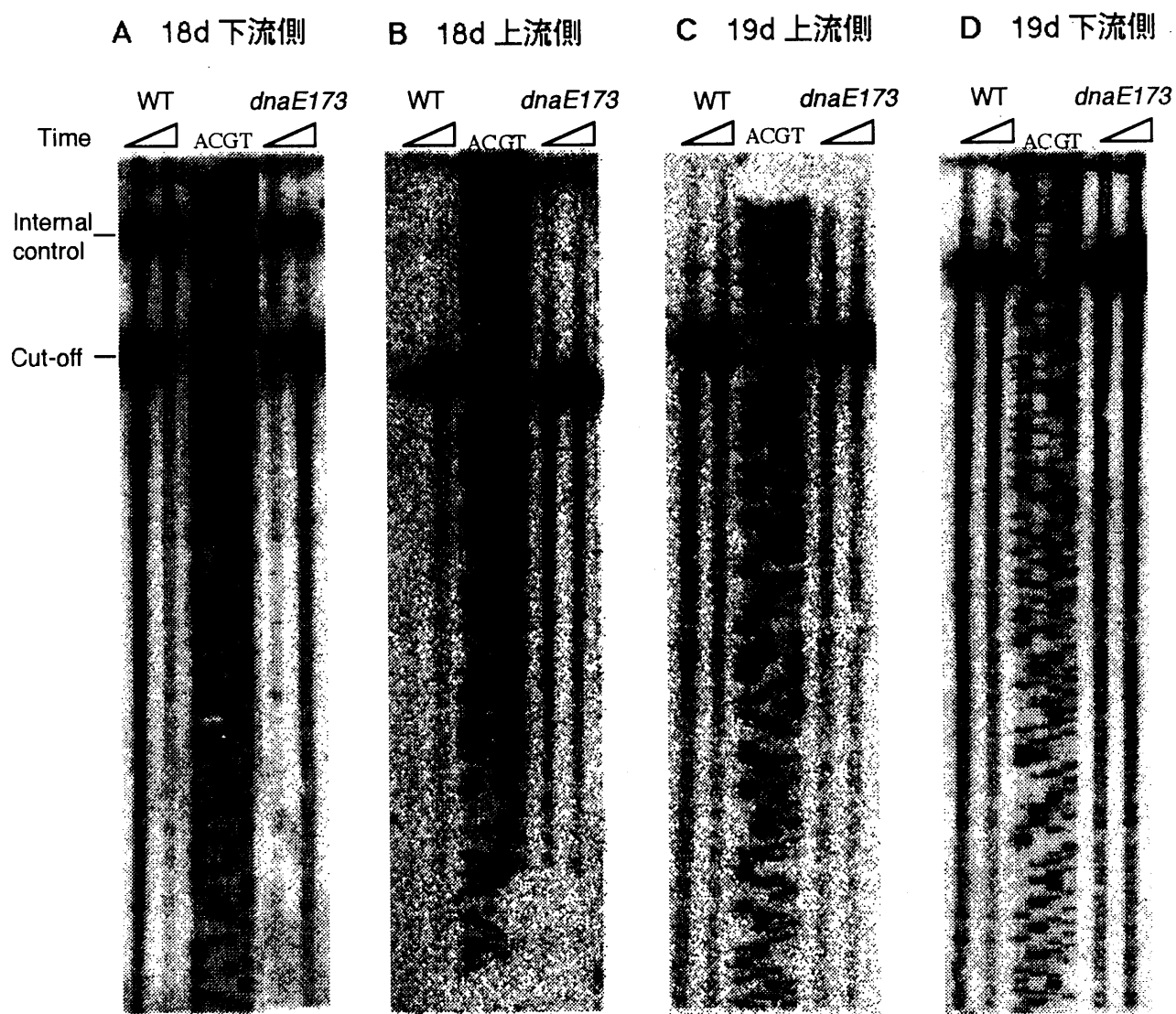


図 1 5 サザンハイブリダイゼーションによる鎖伸長反応産物の観察

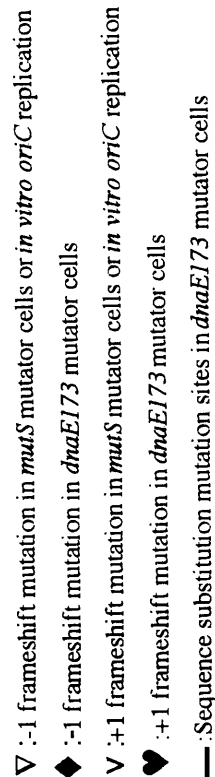
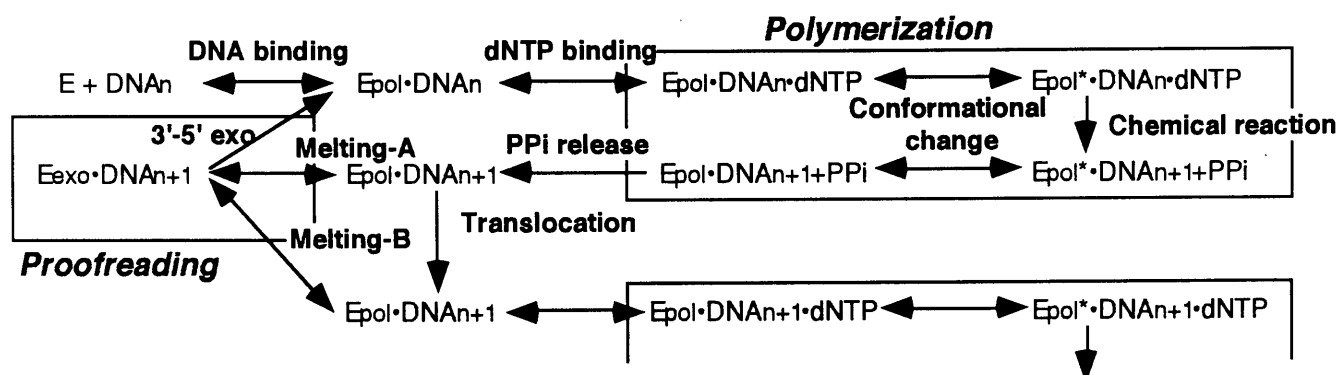


図16 ポーピング部位及び突然変異発生部位の分布

表5 各種DNAポリメラーゼIIIにおける性質の違い

Pol III	Proofreading		Polymerization		
	Melting	Exo	Elongation rate	Pausing	Processivity
Wild type	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
<i>dnaQ32</i>	Normal	Low	Normal	Sensitive	Low
<i>dnaE173</i>	Low?	Normal	Low	Resistant	High

A



B

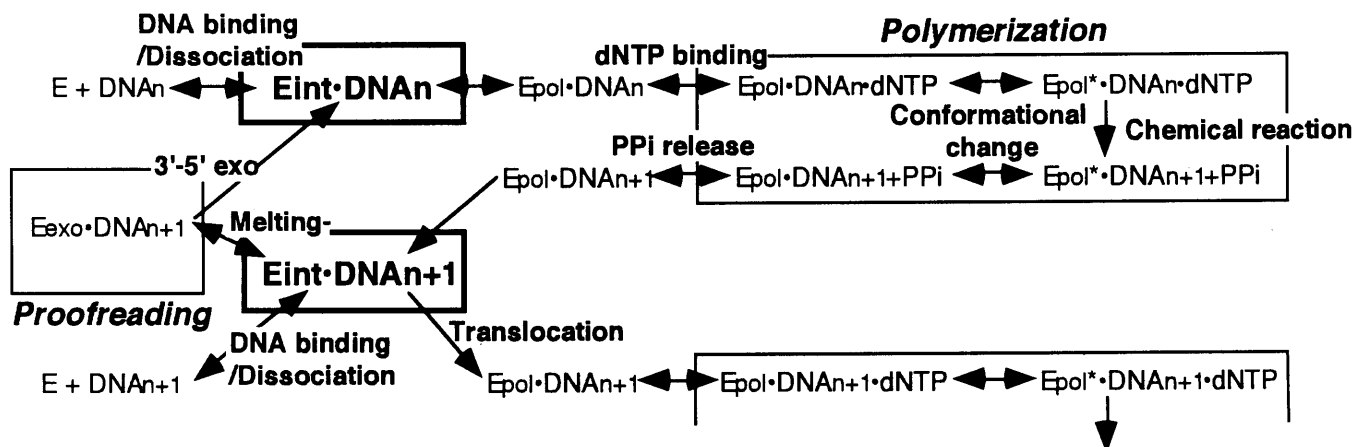


図 1 7 DNA合成反応における諸ステップの概略図

A 一般的モデル

B 共通中間体モデル

Epol : ポリメラーゼ活性中心、Eexo : 3'→5'exo活性中心、Eint : 共通中間体

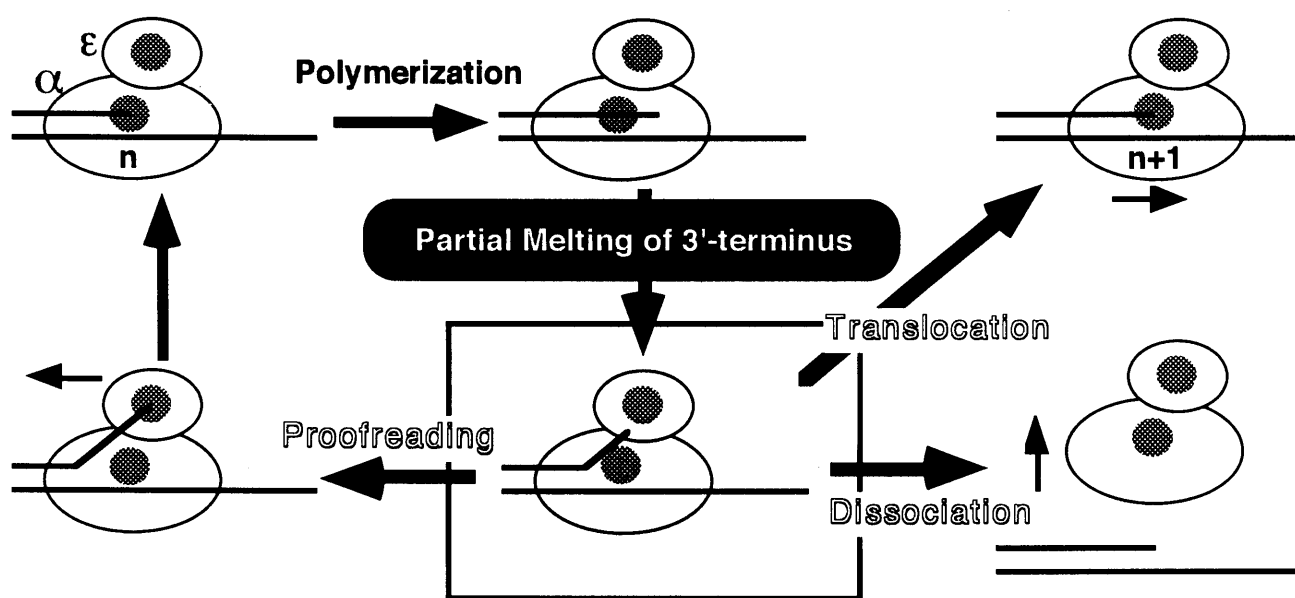


図18 "メルティング・トランスロケーション" モデル