

大腸菌の複製酵素によって試験管内で誘発される複製エラー：
試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系と二連続 ssDNA → dsDNA 複製系
で誘発された複製エラーの解析

藤井 慎吾
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12年 1月 6日提出

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	藤井 慎吾	提 出	平成12年 1月 6日
題 目	大腸菌の複製酵素によって試験管内で誘発される複製エラー : 試験管内 <i>oriC</i> プラスミド DNA 複製系と二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で誘発された複製エラーの解析		
要旨 原核および真核細胞の DNA 複製酵素による複製エラーについては、それらの高い忠実度およびバックグラウンド変異の低い鋳型 DNA の調製が困難なために、試験管内 DNA 複製系での解析がほとんど進んでいない。言い換えると、バックグラウンド変異の十分に低い鋳型 DNA の調製ができれば、複製エラーの検出が可能となる。従来のファージミドを用いた鋳型となる一本鎖環状 DNA (ssDNA) を生物学的に調製する方法では、バックグラウンドの変異頻度を十分に下げることができない。しかし、細胞内で増幅した二本鎖のプラスミド DNA (dsDNA) の状態なら、バックグラウンドの変異頻度を十分に下げることができる。そこで、dsDNA を鋳型とする試験管内 <i>oriC</i> プラスミド DNA 複製系 (<i>oriC</i> 系) と <i>rpsL</i> 前進突然変異検出系とを組み合わせ、大腸菌の複製酵素である DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素 (DNA pol III HE) によって誘発される複製エラーの検出を試みた。この産物 DNA の変異頻度は 1.9×10^4 であり、鋳型 DNA のバックグラウンド変異と比較して 50 倍の変異頻度の上昇が観察された。このように、<i>oriC</i> 系を用いれば複製エラーを検出できることが明らかになった。試験管内で DNA pol III HE によって誘発された変異の内容を塩基配列レベルで決定したところ、一塩基フレームシフトが最も高頻度に検出された。特に同じ塩基の並んだラン配列上で多数検出され、主要な複製エラーはスリッページエラーであることが明らかになった。次いで、塩基置換が高頻度に検出されたが、その変異の検出傾向から大部分は鋳型上の損傷塩基に起因して誘発されたものと思われた。その他に二塩基フレームシフト、大きな欠失、重複、配列置換が検出され、鋳型 DNA との比較からこれらの変異は複製反応中に誘発された変異であると思われた。 <i>oriC</i> 系を用いて複製エラーが検出されたのだが、それらの複製エラーが dsDNA のどちらの配列を鋳型にして生じたのかは不明である。そこで、ssDNA を鋳型にした新しい複製エラー検出系を開発した。バックグラウンド変異の低い鋳型 DNA を得るために、dsDNA を試験管内で酵素学的に ssDNA に変換した。DNA pol III HE を用いて特定のプライマーから ssDNA → dsDNA 複製を行い、その産物の新生鎖だけの			

ssDNA を前述の方法で調製し、もう一度 ssDNA → dsDNA 複製を行って 1 回目の複製で生じた複製エラーを変異に固定した（二連続 ssDNA → dsDNA 複製系）。この実験系で検出された変異を調べたところ、 1.5×10^{-4} の変異頻度で鋳型 DNA に比べて 5 ～ 6 倍の変異頻度の上昇が観察された。しかし、検出した塩基置換と一塩基フレームシフトは、詳細な解析から、その大半は鋳型上の損傷塩基に起因して誘発されたものであると示唆された。一方、二塩基フレームシフトや大きな欠失は、主には正常な塩基間に由来した複製エラーを反映していると思われ、強力なホットスポットが観察されることから、その発生には鋳型の塩基配列特異性が重要であることが示唆された。この試験管内でプライマー伸長反応中（二連続 ssDNA → dsDNA 複製系）に誘発された変異と試験管内で複製フォークを形成した反応中（oriC 系）に誘発された変異とを比較すると、少なくとも一塩基フレームシフトの忠実度は複製フォークの方が低かった。特に、ラン配列での +1 フレームシフトは、プライマー伸長反応に比べて複製フォークでは 23 倍も忠実度が低下していた。この結果から、同じ複製酵素を用いても複製様式の違いが複製酵素の忠実度に影響を与えることが示唆された。

複製酵素により誘発される複製エラーは、校正機能によって除ききれなかった塩基選択の誤りを反映して変異として検出できる。よって、校正機能によって取り除かれる前の塩基選択の誤りの実体を調べることは、塩基選択の忠実度と校正機能の役割を理解する上で重要なことである。そこで、校正機能を欠損させた大腸菌の DNA pol III HE によって誘発される複製エラーを二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で調べたところ、検出された変異の大部分は正常な塩基間に由来した複製エラーを反映していることが示唆された。この酵素によって誘発された複製エラーの頻度は $2.2 \sim 3.3 \times 10^{-4}$ で鋳型 DNA に比べて 44 ～ 57 倍の変異頻度の上昇が観察された。変異頻度の上昇に最も寄与していたのが一塩基フレームシフトで、ラン配列上でのスリッページエラーが多数観察された。次に変異頻度の上昇に寄与していたのが塩基置換で、鋳型が T のときに dGMP が誤って取り込まれる型が最も高頻度に検出された。しかし、その相補的な関係になる鋳型が A のときに dCMP が誤って取り込まれる型はほとんど検出されず、校正機能が働かない場合は、恐らく T:dGMP の方が A:dCMP よりも 150 倍ぐらい伸長反応が起こりやすいと推定された。野生型 DNA pol III HE を用いた場合と比べて、校正機能欠損型 DNA Pol III HE を用いて検出した塩基置換と一塩基フレームシフトは、それぞれ 5.7 ～ 7.3 倍と 22 ～ 45 倍の変異頻度の上昇が観察されたが、その他のクラスの変異頻度の上昇は観察されなかった。よって、二塩基フレームシフトや大きな欠失は、一度誘発されたら校正機能によって修復を受けないことが示唆され、誤った塩基の取り込みが引き金となってこれらの変異が誘発されるのではないと推定された。

目次

頁

要旨

目次

第一章 序論

2

1. 自然突然変異の研究の流れ
2. 本研究の背景

第二章 材料と方法

6

第三章 試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系で大腸菌の複製酵素により誘発される複製エラー

13

I. 序

14

II. 結果と考察

14

1. 試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系を用いた *rpsL* 前進突然変異検出系
2. 試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系で検出された *rpsL*⁻ 変異
3. 試験管内 DNA 複製で生じた *rpsL*⁻ 変異のスペクトラム解析
 - i) 全体像
 - ii) 塩基置換
 - iii) 1 塩基フレームシフト
 - iv) 2 塩基フレームシフト
 - v) 欠失、重複、配列置換

第四章 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で大腸菌の複製酵素により誘発される複製エラー

28

I. 序

29

II. 結果

29

1. 試験管内で酵素学的に二本鎖環状 DNA から一本鎖環状 DNA への変換法
2. 試験管内 DNA 複製反応以外で検出されるバックグラウンド変異の検出傾向
3. SS DNA→ヘテロ二重鎖→新生鎖 SS DNA により複製エラーを検出する際の問題点
4. 新生鎖 SS DNA→OC DNA により複製エラーを検出する
二連続 ssDNA → dsDNA 複製系
5. 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出した変異の発生傾向
6. 高頻度に検出された塩基置換は損傷塩基に起因している
7. 一塩基フレームシフトの発生傾向
8. 複製エラーに依存して検出された 2 塩基以上の欠失の発生傾向
9. 3(TA) → 2(TA) の誘発は鋳型鎖によって由来が異なる
10. 大きな欠失になるミスペアーを持ったヘテロ二重鎖は形質転換後、
鋳型鎖によって変異として固定される割合が異なる

III. 考察

49

1. 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系の特徴と問題点
2. 正常な塩基間に由来する複製エラーと損傷塩基に由来する変異は
区別できる
3. 前変異を固定した標品で検出された変異の発生傾向
4. 前変異を固定した標品で検出された正常な塩基間に由来する複製エラー
5. プライマー伸長反応よりも複製フォークの方が忠実度が低い
6. 試験管内で誘発された複製エラーから推定される生物学的意義

第五章 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で大腸菌の校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発される複製エラー

57

I. 序

58

II. 結果

58

1. 校正機能欠損型 DNA pol III HE の構築
2. 変異の発生傾向
3. 塩基置換
4. 一塩基フレームシフト
5. 二塩基フレームシフトと欠失

III. 考察

69

1. 検出した変異は正常な塩基間で誘発された複製エラーを反映している
2. 校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発される複製エラーの変異率
3. ミスマッチ末端からの伸長反応の効率が変異誘発の重要な要素である
4. 一塩基フレームシフトの発生要因
5. 2 塩基以上の欠失の誘発は校正機能で抑制されない

第六章 総論と展望

77

参考文献

80

謝辞

88

第一章

序論

1. 自然突然変異の研究の流れ

突然変異が誘発されることによって遺伝情報が変化し、生命は長い時間の中で進化して今日に至ったことは明白である。生物全体にとって突然変異の生成が有益であることは疑いない。しかし、個々の生物にとっては同時に、突然変異によって癌や遺伝病などが引き起こされる危険性を伴うことになる。

突然変異という概念は、1901年にDe Vriesの「突然変異説」の中で最初に提唱された。しかし、当時はまだ遺伝子の物質的基盤が不明のため、突然変異の概念は表現型として形質の変化を伴い、かつ遺伝的に安定であることを指していた。遺伝子の物質的基盤に候補が挙げられたのは、1928年のGriffithによる肺炎菌を使った実験からで(Griffith, 1928)、その後1944年のAveryらの実験によって遺伝を司るのは、DNAであることが明らかになってきた(Avery *et al.*, 1944)。また、1930年代から突然変異の研究に微生物が用いられるようになり、それまでの植物や蠅などを用いた形態的変異を中心とした解析に比べ、生化学的変異を利用することが可能になった。そして微生物を使うことによって、巨大な集団を短期間で扱えるようになり、1943年に突然変異の発生はランダムな確率事象であるという、LuriaとDelbrückのT1ファージ耐性変異の実験にいきついた(Luria & Delbrück, 1943)。

このように1940年代には、遺伝子の物質的基盤と突然変異の発生について大分明らかになってきたが、遺伝子にはどの様に突然変異が生じるのかという根本的な問題は未解決であった。この問題の突破口となったのは、1953年のWatsonとCrickのDNAは二重らせんより構成されるという研究結果(Watson & Crick, 1953)で、この研究から複製の機構はもちろん、突然変異の発生に関しても生化学的に類推することが可能になった。

突然変異には、人為的突然変異と自然突然変異がある。初期の突然変異の研究は、主に放射線や紫外線などの各種の変異原で処理することによって変異体を得る人為的突然変異によって研究が進められた。一方、自然突然変異は、細胞や個体が通常的环境下で生育しているときに稀に生じる変異のことを指し、その現象が稀にしか生じない為に、自然突然変異の研究は非常に困難であった。その為、自然突然変異は、自然界に存在する各種の環境変異原(紫外線、自然放射線等)によって引き起こされると考えられてきた時期もあった。しかし、自然界に存在する環境変異原(人間の産業活動に伴うものは除く)のレベルは極めて低く、自然突然変異頻度の上昇にはほとんど寄与しないと思われ、むしろ自然突然変異の原因は、細胞活動中に内在するものであると現在では考えられている。自然突然変異の生じる原因を研究するうえで最も大きな転期となったのは、1954年にTreffersらによって大腸菌で自然突然変異頻度が野性株より高い変異株であるミューテーター変異株が分離されたことである(Treffers *et al.*, 1954)。このことは、突然変異の発生や抑制に関与する遺伝子が、細胞内に存在していることを意味している。つまり、ミューテーター変異株が分離されること自体が、自然突然変異の原因が内在性のものであることを

示唆する。その後、大腸菌では精力的にミューテーター変異株の分離が試みられ、野生株からミューテーター変異株に形質が転換した原因遺伝子の同定と、その遺伝子産物の生化学的解析が行われた。その結果、ミューテーター遺伝子として複製装置や前変異損傷の修復に関わる遺伝子、及びヌクレオチドプールの浄化に関わる遺伝子が同定され、自然突然変異の分子機構の理解が大きく前進した (Horiuchi *et al.*, 1989; Schaaper, 1993; Miller, 1996)。

2. 本研究の背景

自然突然変異の主要な発生原因の一つは、複製酵素により誘発される複製エラーに起因して生じることが遺伝学的にも生化学的にも示唆されている。遺伝学的な研究から、自然突然変異率は $\sim 10^{-10}$ /塩基/複製であると推定されており (Drake, 1991)、主に大腸菌を用いた研究からこのような高い忠実度を実現するために以下に述べる主に4つの因子が関わっていると考えられている (Horiuchi *et al.*, 1989; Schaaper, 1993; Miller, 1996)。1) 鋳型 DNA 中と dNTP プール中に内在する損傷塩基の除去、2) 複製酵素による塩基選択、3) 複製酵素に内在する校正機能、4) 複製後修復系 (Echols & Goodman, 1991; Modrich, 1991; Tajiri *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998)。これら個々の因子の研究は精力的に行われてきたのだが、まだ不明な点が多く特に染色体の複製を行う複製酵素により誘発される複製エラーの実体に関しては、ほとんど理解されていないのが実状である。複製エラーに起因する自然突然変異の生成には、まず DNA 上に前変異損傷が生じ、次の回の複製でその前変異が変異として固定されることが必要である。よって、自然突然変異の生成機構を理解するためには、前変異損傷の分子機構を理解することが不可欠である。しかし、細胞にはこの種の損傷に対する修復系路や防御機構が備わっているので、複製エラーを研究するには、遺伝学的手法を用いた実験は不向きである。

これ迄の試験管内 DNA 複製による複製エラーの研究では、その解析系として一本鎖 DNA 上に、その DNA に相補的なプライマーをアニリングさせて伸長反応を行わせる (プライマーエクステンション) 系 (Weymouth & Loeb, 1978) や、プラスミド上の標的遺伝子の領域のみを一本鎖にしておき、試験管内合成によってその領域を埋める (ギャップフィリング) 系 (Bebenek & Kunkel, 1990) が用いられてきた。これらの系では、試験管内 DNA 複製を行う前の鋳型 DNA 標品中に内在する標的遺伝子のバックグラウンド変異の頻度が極めて高く、また、試験管内 DNA 複製で生じた変異は変異として固定 (ホモ二重鎖) されていない、つまり前変異 (ヘテロ二重鎖) の状態にある。この DNA 標品を細胞に導入した時、ある確率で前変異が変異として固定される為、変異の生じる頻度を過小に評価することになる。このように、突然変異の検出感度が極めて低い為、校正機能のある DNA ポリメラーゼを用いての実験では、復帰変異 (特定の点変異のみを検出の対象とする) を検出するか、変異

原を添加するか、ヌクレオチドプールを不均衡にしないと複製エラーを検出できなかった (Pavlov *et al.*, 1994; Kroutil *et al.*, 1996; Kroutil *et al.*, 1998; Pham *et al.*, 1998)。

第二章

材料と方法

1. 菌株

試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系で用いる鋳型 DNA を調製する際、野生型の *rpsL* 遺伝子をもつ pUC 系のプラスミドが、宿主に導入されるとプラスミドをもたない株に比べて若干、増殖を阻害することが分かった。これを改善するためにプラスミド上の *rpsL* 遺伝子上流にアンバー変異を導入したプラスミド (pMOL3) を鋳型 DNA として用いることにした。その為、変異を検出する宿主には、Sm^r でありアンバーサプレッサーをもつ HB101 (Boyer & Roulland-Dussiox, 1969) を用いた。しかし、この変異検出用宿主として用いた HB101 細胞集団には、*supE*⁺ から *supE*⁻ へ変異した細胞が 10⁻⁵ ~ 10⁻⁶ の頻度で内在していることが実験的に判ったことから (data not shown)、*rpsL*⁻ 変異の検出限界が宿主によって制限されることが明らかになった。そこで、HB101 に *supE* 遺伝子を持つプラスミド (pFSE101) を導入した株 (MF101) を *rpsL*⁻ プラスミドを選択するための宿主として用いることにより解決した。また、大腸菌内で増幅した鋳型 DNA (pMOL3) を調製し、そのバックグラウンド変異を解析するとその 50 % 前後にインサーションシーケンス (IS) が検出された。この IS の影響を排除するために、ほとんど IS がとばないサルモネラ菌 SL7284 (Stanford 大学の Bruce Stocker 博士より供与) を鋳型 DNA を回収するための宿主とした。

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系では、*rpsL* 遺伝子上に誘発されるアンバー変異も検出することで、塩基置換の検出感度を高くするために標的遺伝子として野生型の *rpsL* 遺伝子をクローニングしたプラスミド (pFS4) を鋳型 DNA として用いた。その為、試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系とは異なり、アンバーサプレッサーをもたない大腸菌 MC1061 (Wertman *et al.*, 1986) が *rpsL*⁻ プラスミドを選択するための宿主として用いた。この菌株は E.coli Genetic Stock Center (Yale 大学) より供与された。また、鋳型 DNA を大腸菌内で増幅した際にバックグラウンド変異として検出される IS は、複製エラーの検出には重大な影響を及ぼさないと考えられたので、大腸菌 NM554 (Raleigh *et al.*, 1988) を鋳型 DNA を調製するための宿主として用いた。

2. プラスミドと DNA 標品

変異検出用宿主である MF101 を構築するために、pSC101 (Cohen & Chang, 1977) をベクターとした pFSE101 を構築した。pFSE101 は、*supE* 遺伝子をテトラサイクリン耐性 (Tc^r) 遺伝子を持つ pSC101 にクローニングしたプラスミドである。この時、*supE* 遺伝子断片を得る方法として、HB101 上の *supE* 遺伝子を含む tRNA 遺伝子 (Nakajima *et al.*, 1981) で、最初に転写される塩基を 1 として -81 ~ 900 の領域を PCR 反応により増幅した。この時使用した上流側と下流側の両方のプライマーの端には *EcoR* I により切断される部位をもたせた。この *EcoR* I 部位を両端にもつ

tRNA 遺伝子断片を pSC101 の *EcoR* I 部位にクローニングし、pFSE101 と名づけた。

pMOL3 は、pHSG664 (Hashimoto-Gotoh *et al.*, 1986) に由来する *Km^r* の pUC 系プラスミドであり、*rpsL* 遺伝子がクローニングされている。pMOL3 は、試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製における鋳型 DNA 標品として用いた。また、pMOL3 の調製方法は以下の通りである。

pMOL3 を導入した SL7284 をカナマイシンを含む L broth で飽和状態になるまで 30 °C で培養する。この培養液を菌体が 50 個前後になるように希釈し、OD₆₀₀ が 0.4 になるまでカナマイシンを含む L - rich broth で 30 °C で培養する。10 ml の培養液を 2 l のカナマイシンを含む L - rich broth に接種し、OD₆₀₀ が 3 になるまで 30 °C で培養し、菌体を回収する。7000 x G、10 分、4 °C の遠心により菌体を集菌した後に、アルカリ - SDS 法 (Sambrook *et al.*, 1989) により菌体から DNA を調製する。この時、約 100 μg の鋳型 DNA 標品を回収できる。次に、この回収された DNA を FPLC (Pharmacia Biotech 社) クロマトグラムにより CC DNA と OC DNA に分離し、CC DNA を試験管内 DNA 複製での鋳型 DNA 標品とした。また、鋳型 DNA 標品は、使用する直前まで - 80 °C で保存しておく。

変異検出用プラスミド pFS4 は以下に記述する方法で構築した pACYC177 (Chang & Cohen, 1978) 誘導体である。pTrc100 (Pharmacia Biotech 社) に挿入されている転写終結シグナル (*rrnBT1T2*) の全長を PCR 法により増幅する。その際、*rrnBT1T2* を増幅するためのプライマーは *rrnBT1T2* の 5' 側に *BstE* II - *BstX* I - *BamH* I 切断領域をもたせ、3' 側には *Dra* I 切断領域をもたせた。この断片を pACYC177 の *BstE* II - *Dra* I 領域に挿入し pFS1 を構築した。次に pFS1 に *rpsL* 領域をクローニングするために、pHSG664 の *rpsL* 領域全長を *BstX* I と *BamH* I 切断し、この断片をゲルから切り出し pFS1 に挿入した (pFS2)。pFS2 にある *BamH* I 部位は不要であり、この部位を潰すために pFS2 を *BamH* I 切断し Klenow 断片でその突出末端部を平滑末端に変換した後、自己環状化することにより *BamH* I 切断領域を潰した (pFS3)。最後に鎖特異的なニックの導入を可能にするために pFS3 の *Nhe* I - *Dra* III 領域に *Nhe* I - *Sty* I - *BamH* I - *Bgl* II - *Xba* I - *Dra* III 切断領域よりなる人工的に合成したニックカセットを挿入した (pFS4)。pFS4 の塩基の数え方は *rpsL* をクローニングした際に使用した *BstE* II 部位の G を一番目とし *rpsL* の転写方向と同じ向きで数える。

pFS4 を菌体より回収するときには、pFS4 で形質転換した NM554 からアルカリ法 (Sambrook *et al.*, 1989) により pFS4 を回収した後キアゲンカラム (QIAGEN GmbH 社) を通して精製した。

Treated CC は以下のように構築した。pFS4 を *BamH* I 切断、CIP 処理、*Bgl* II 切断し T4 DNA リガーゼによる自己環状化反応を行い OC DNA を調製する。次にこの OC DNA を *Dam* メチラーゼで処理し、*Sty* I 切断、*Xba* I 切断し T4 DNA リガーゼによる自己環状化反応を行い CC DNA を調製する。

プライマー伸長反応時に用いたプライマーは 1 回目の複製では、SS+ を鋳型としたとき 1941 ~ 1960bp に、SS- を鋳型としたとき 1966 ~ 1985bp に、2 回目の複製

では SS+ を鋳型としたとき 1921 ~ 1940bp に、SS- を鋳型としたとき 1924 ~ 1944bp に相補的な合成オリゴヌクレオチドで何れもニックカセット内に位置する。また、一本鎖環状 DNA にプライマーをアニーリングさせる条件は 20 mM Tris-HCl (7.5)、250 mM NaCl、6.25 ng/ μ l 一本鎖環状 DNA の混合液に、予め 70 °C 2 分加熱し氷上に置いたプライマーを 0.5 pmol/ μ l になるように混ぜ、37 °C 30 分加熱した後室温に 5 分置いた。

人工的にヘテロ二重鎖を構築するために用いたプライマーは、*rpsL* の開始コドンの一番目の A から数えてトランジションは 242 番目の A:T $\rightarrow$ G:C、二塩基フレームシフトは 110~115 番目の 3(TA) $\rightarrow$ 2(TA) 変異を導入するようにし、ミスマッチ部位の前後 15 塩基を相補的な配列にした。また、一本鎖環状 DNA にプライマーをアニーリングさせる条件は 20 mM Tris-HCl (7.5)、250 mM NaCl、6.25 ng/ μ l 一本鎖環状 DNA、0.5 pmol/ μ l プライマーの混合液を、70 °C 2 分、60 °C 10 分加熱した後室温に 15 分置いた。

3. 試薬・培地

本研究で使用した試薬は、特に記載のない限り、和光純薬工業、Sigma 社から購入したものを使用した。

本研究で使用した培地は、L broth [1 % (w / v) Bact trypton (Difco 社)、0.5 % (w / v) Bact yeast extract (Difco 社)、0.5 % (w / v) NaCl]、L - rich broth [2.5 % (w / v) Bact trypton (Difco 社)、0.75 % (w / v) Bact yeast extract (Difco 社)、0.6 % (w / v) NaCl、0.6 % (w / v) glucose]、SOC [2 % (w / v) Bact trypton (Difco 社)、0.5 % (w / v) Bact yeast extract (Difco 社)、0.06 % (w / v) NaCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、20mM glucose] である。

寒天培地として用いる場合には、1.5 % の濃度で agar (Difco 社) を加えて使用した。

抗生物質は、アンピシリンは 100 μ g / ml、テトラサイクリンは 5 μ g / ml、ストレプトマイシンは 100 μ g / ml、カナマイシンは 50 μ g / ml で使用した。

通常の培養には L broth を用い、DNA 調製用の菌体を培養する場合には L - rich broth を用いた。SOC は、エレクトロポレーション法 (Dower *et al.*, 1988) の際に使用した。

4. FPLC クロマトグラムによる CC DNA と OC DNA の分離

試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系で、CC DNA と OC DNA が混在している鋳型 DNA 標品、及び複製産物より、CC DNA と OC DNA の分離には FPLC クロマトグ

ラムを使用する。試料とする DNA をエタノール沈殿法により沈殿物とし、50 mM NaCl を含む pH が 8.5 の TE [10mM Tris - HCl、1mM EDTA] で懸濁し、FPLC クロマトグラムにかけるとする。FPLC クロマトグラムに使用する緩衝液は、pH が 7.5 の TE に NaCl が入った溶液を用いる。また、流速は 0.1 ml / min で 4 °C で行う。まず、カラムの大きさが 1 ml の HiTrap Q カラム (Pharmacia Biotech 社) を使用する。0.2 M ~ 0.6 M NaCl の塩濃度勾配 (linear gradient) を 40 ml 流し 0.5 ml ずつ分画する。DNA の入っている画分をエタノール沈殿法により濃縮を行った後、次の段階に進む。次は、Mono Q HR 5 / 5 カラム (Pharmacia Biotech 社) を使用する。0.698 M ~ 0.71 M NaCl の塩濃度勾配 (linear gradient) を 20 ml 流した後、0.71 M ~ 0.8 M NaCl の塩濃度勾配 (linear gradient) を 10 ml 流し 0.5 ml ずつ分画し、CC DNA あるいは OC DNA の入っている画分をエタノール沈殿法により濃縮を行った。

5. T7 DNA ポリメラーゼに内在する 3'→5' エキソヌクレアーゼの性質を調べるために用いた基質の調製法

OC DNA は、pFS4 を *Bam*HI 切断、CIP 処理、*Bgl*II 切断し T4 DNA リガーゼによる自己環状化反応を行い調製する。但し、自己環状化させるためのライゲーション反応は、プラスミド DNA の濃度が 4 ng/μl にし 16 °C 2 時間行った。二本鎖線状 DNA は、pFS4 を *Sty*I 切断により調製した。一本鎖線状 DNA は、*Sty*I 切断により調製した二本鎖線状 DNA を 98 °C 5 分間加熱し、氷上に置き急冷して調製した。

6. *rpsL* 変異検出系

試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系で、鋳型 DNA は 300 ng、複製産物は 20 ng の DNA を MF101 にエレクトロポレーション法を用いて導入した。エレクトロポレーション用のコンピテントセル 40 μl に DNA 2 μl を幅が 0.2 cm のキューベットの中で懸濁し、*E. coli* Pulser (BioRad 社) を用いて 2.5 kV の電圧をかけた。その試料を 1 ml の SOC 中に懸濁し、30 °C 90 分間保温後、寒天培地に塗布する。変異頻度の算出方法 (Mo *et al.*, 1991) は、ストレプトマイシン耐性 (*Sm^r*) になった形質転換体の数を、プラスミドが形質転換された数で割って求めた。*Sm^r* 変異体の数は、エレクトロポレーションをした原液から 3 枚のストレプトマイシン (*Sm*) とカナマイシン (*Km*) を含む L 培地プレートに播く。3 枚の寒天培地に生えてきた各々の数から平均を求め、*Sm^r* 変異体の生菌数を算出した。プラスミドが形質転換された数は、エレクトロポレーションをした原液から菌体の数が、100 ~ 300 個になるように希釈した。その際、希釈系列を 4 つ作りその各々から 2 枚の *Km* を含む L 培地プレートに播く。合計 8 枚の L 培地プレートに生えてきた各々の数から平均を求

め、プラスミドが形質転換された生菌数を算出した。

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で、*rpsL* の前進突然変異頻度を測定する方法 (Mott *et al.*, 1991) は、プラスミド DNA 標品で MC1061 に形質転換することにより求めた。25 ng の DNA 標品を 40 μ l のコンピテント細胞に混合し、エレクトロポレーション法により形質転換した。エレクトロポレーションは E. coli Pulser (BioRad 社) で行った。形質転換体の数を測定するために、SOC 培地で 30 $^{\circ}$ C 1 時間振動培養した菌液を希釈し、50 μ g/ml の Km を含む L 培地プレートに播き、30 $^{\circ}$ C 24 時間培養し生菌数を数えた。*rpsL* 変異体の数を測定する際には、SOC 培地で 30 $^{\circ}$ C 1 時間振動培養した菌液を希釈し、50 μ g/ml の Km と 100 μ g/ml の Sm を含む L 培地プレートに播き、30 $^{\circ}$ C 24 時間培養し生菌数を数えた。変異頻度の決定は、Km^r Sm^r 形質転換体の数を Km^r 形質転換体の数で割ることにより求めた。変異の生じた部位は、自動 DNA シークエンサー (Model373A、Applied Biosystems 社) を用いて決定した。

7. 試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系

Pol III*, β 、DnaA、DnaB、DnaC、DnaG、SSB、HU、GyrA、GyrB は、スタンフォード大学・医学部・生化学教室のコーンバーグ教授より供与された (Kaguni & Kornberg, 1984; Sekimizu *et al.*, 1988; Maki *et al.*, 1988)。

複製反応は van der Ende らの方法 (van der Ende *et al.*, 1985) に基づいている。125 μ l の反応溶液には、40 mM HEPES - KOH (7.6)、8 mM 酢酸マグネシウム、2 mM ATP、1 μ g の鋳型 DNA 標品、100 μ M の dNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP)、DnaA (200 ng)、DnaB (300 ng)、DnaC (150 ng)、DnaG (70 ng)、GyrA (2 μ g)、GyrB (900 ng)、SSB (2 μ g)、HU (40 ng)、Pol III* (600 ng)、 β (300 ng) を含んでいる。反応は、30 $^{\circ}$ C 2 時間保温する。反応を終結するときには、最終濃度が SDS が 0.5 %、EDTA が 25 mM になるように SDS と EDTA を加え、65 $^{\circ}$ C 10 分間加熱する。次に、Proteinase K (35 μ g/ml) を加え、55 $^{\circ}$ C 30 分間処理する。混合液は、フェノール/クロロホルム抽出しエタノール沈殿の後、1 mM Tris-HCl (7.5)、0.1 mM EDTA で溶解させる。

8. 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系

大腸菌 DNA pol III* は Maki 等 (1988) によって報告されている方法で調製した。 β サブユニットは東洋紡績社より供与された。校正機能欠損変異型 DNA pol III* は部位特異的変異導入法により *dnaQ* の 103 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した *dnaQ32* を過剰発現用プラスミドにクローニングした後、細胞内で過剰発現させた

細胞を集菌して、Maki 等 (1988) によって報告されている方法で調製した (Fujii *et al.*, 投稿準備中)。SSB は Lohman 等 (1986) によって報告されている方法で調製した。古草菌 MutM は当研究室で調製 (Azuma *et al.*, 未発表データ) されたものを使用した。*Bam*HI、*Bgl*II、*Xba*I、*Sty*I は宝酒造より購入した。T7 DNA ポリメラーゼ、T4 DNA リガーゼ、*Dam* メチラーゼ、Ung は New England Biolabs 社より購入した。CIP は Boehringer Mannheim 社より購入した。購入した製品に関しては、特に記述がない限り説明書の反応条件で行った。

可能な限り鋳型のバックグラウンドの変異頻度を下げるために、プラスミド DNA を Ung と MutM による処理を行った。Ung 処理はプラスミド DNA 1 μ g 当たり 10 ユニット (U) の Ung を使用し 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応した。MutM 処理は Ung 処理したプラスミド DNA 1 μ g 当たり 190 ng の古草菌 MutM を使用し 37 $^{\circ}$ C 30 分反応した。また、確実に全てのプラスミド DNA がフルメチル化した状態にするためにプラスミド DNA 1 μ g 当たり 15 U の *Dam* メチラーゼを使用し 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応した。このように調製した pFS4 を基質として図 4-1 の一連の流れの実験を行った。鎖特異的にニックを導入するために用いた制限酵素の反応条件は、プラスミド DNA 1 μ g 当たり 28 U の *Bam*HI、23 U の *Bgl*II、140 U の *Xba*I、140 U の *Sty*I を使用し *Bam*HI のみ 30 $^{\circ}$ C 1 時間で残りは 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応した。CIP は 20 U 使用し 37 $^{\circ}$ C 30 分反応した。自己環状化させるためのライゲーション反応は、プラスミド DNA の濃度が 1 ng/ μ l にし 16 $^{\circ}$ C 2 時間行った。その際、使用する T4 DNA リガーゼの量は突出末端の形状が *Bam*HI 型では 1 u/ μ l にし *Xba*I 型では 8 u/ μ l にした。OC DNA から一本鎖環状 DNA に変換するために用いた T7 DNA ポリメラーゼの反応条件は、50 mM Tris-HCl (8.0)、5 mM MgCl₂、20 mM KCl、5 mM DTT、プラスミド DNA 1 μ g 当たり 12.5 U の T7 DNA ポリメラーゼを使用し 37 $^{\circ}$ C 30 分反応した。プライマー伸長反応は、20 mM Tris-HCl (7.5)、4 % Glycerol、8 mM DTT、80 μ g/ml BSA、8 mM MgCl₂、1 mM ATP、100 μ M dNTPs、2 ng/ μ l primed template DNA、67.2 μ g/ml SSB、8 ng/ μ l β 、primed template DNA 1 μ g 当たり 300 U の DNA pol III* を使用し 30 $^{\circ}$ C 5 分反応した。反応は EDTA を 25 mM になるように加え終了させる。混合液は、フェノール/クロロホルム抽出しエタノール沈殿の後、1 mM Tris-HCl (7.5)、0.1 mM EDTA で溶解させる。

第三章

試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系で大腸菌の複製酵素により
誘発される複製エラー

I. 序

原核および真核細胞のDNA複製酵素による複製エラーについては、それらの高い忠実度およびバックグラウンド変異の低い鋳型 DNA の調製が困難なために、試験管内 DNA 複製系での解析がほとんど進んでいない。言い換えると、バックグラウンド変異の十分に低い鋳型 DNA の調製ができれば、複製エラーの検出が可能となる。従来のファージミドを用いた鋳型となる一本鎖環状 DNA を生物学的に調製する方法では、バックグラウンドの変異頻度を十分に下げることができない (Thomas *et al.*, 1991; Kroutil *et al.*, 1998; Pham *et al.*, 1998)。しかし、細胞内で増幅した二本鎖のプラスミド DNA の状態ならばバックグラウンドの変異頻度を十分に下げることができる。そこで、二本鎖 DNA を鋳型とする試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系 (van der Ende *et al.*, 1985) と *rpsL* 前進突然変異検出系 (Mo *et al.*, 1991) とを組み合わせ、大腸菌の複製酵素である DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素 (DNA pol III HE) によって誘発される複製エラーの検出を試みた。

II. 結果と考察

1. 試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系を用いた *rpsL* 前進突然変異検出系

試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系の流れ図、および複製反応を行う際、鋳型として用いた pMOL3 プラスミド DNA を図 3-1 に示した。精製した 10 種類の蛋白質 (DNA pol III*, β , DnaA, DnaB, DnaC, DnaG, SSB, HU, GyrA, GyrB) により再構成した試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系では、一回限りのケインズ型複製に引き続いて、ローリングサークル型複製が長時間に渡り進行する (Funnel *et al.*, 1986)。この試験管内 DNA 複製で、放射能標識したヌクレオチドの取り込みを見たのが図 3-2 A である。反応を 2 時間後に止めた時の DNA 合成量は、反応系に含まれている鋳型 DNA の 4.4 倍の合成量を示した。反応を 2 時間後に止めたこの複製産物をアガロースゲル電気泳動により分離し観察したところ、複製した大部分の産物はゲルの中に入りきらず、未複製の CC DNA の量から数 % の CC DNA のみが複製反応中に鋳型として利用されたことが分かった (図 3-2 B)。また、この複製産物を制限酵素 *Cla*I で消化しアガロースゲル電気泳動により分離し観察したところ、ゲルの中に入りきらなかった産物のバンドが消失し、代わりに pMOL3 を線状 DNA にしたときと同じ位置にバンドが現れた (図 3-2 B)。この結果から、ゲルの中に入りきらなかった産物は、ローリングサークル型複製によって生じた非常に長い二本鎖 DNA であることが明らかになった。

図 3-1 に示すように、試験管内で 2 時間複製反応を行って得られた産物を *Cla*I で切断し単位長にした後、リガーゼにより自己環状化させる。このような自己環状

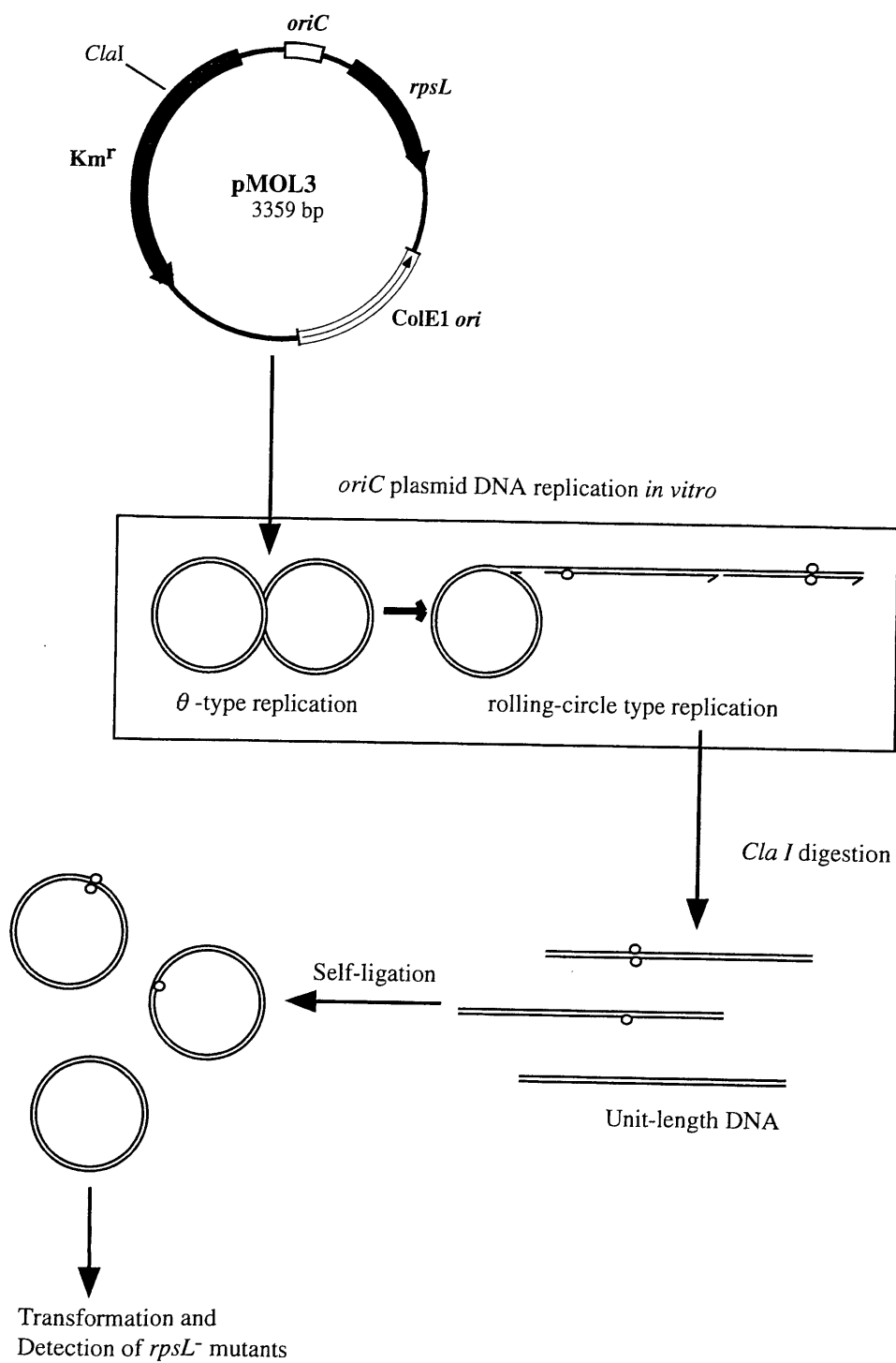


図3-1 試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系を用いた *rpsL* 前進突然変異検出系

pMOL3 の *Km^r* と *rpsL* の矢印は転写の方向を、*ColE1 ori* の矢印は複製の方向を示す。詳細は、材料と方法および本文を参照せよ。

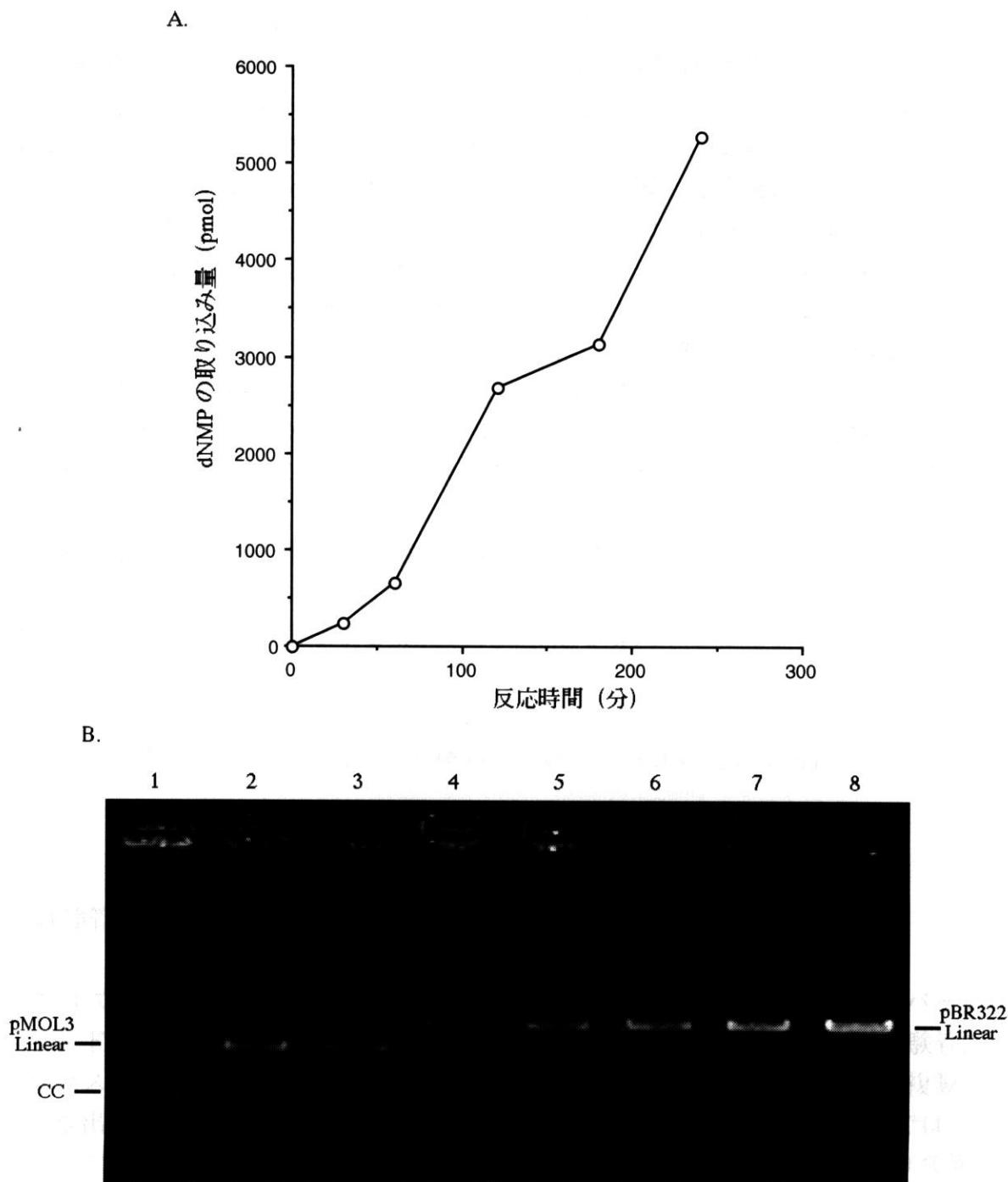


図3-2 試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系で合成される産物は、長大な二本鎖 DNA である

(A) プラスミド DNA (pMOL3) を鋳型 DNA ($0.6 \text{ nmol}/25 \mu\text{l}$) として、反応液中に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dTTP を加えて、試験管内複製反応を行った。経時的に試料を分取し、酸不溶性画分に移行するものをシンチレーションカウンターを用いて定量した。(B) 複製反応 ($1 \mu\text{g}/125 \mu\text{l}$) を2時間後に停止させ、制限酵素 *Cla*I で処理した。試料は0.7%ゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイド染色を行った。レーン1, *Cla*I 消化前の複製産物 ($1/200$) ;レーン2, *Cla*I 消化後の複製産物 ($1/200$) ;レーン3, *Cla*I 消化した10 ng の pMOL3 ;レーン4~8, 線状化した pBR322 (各5, 10, 15, 25, 50 ng)

化反応産物の全てが CC DNA に変換されているわけではなく、ニックあるいはギャップの入った OC DNA が 10 ~ 20 % 程度含まれていた (data not shown)。このような OC DNA は、Okazaki 断片間や複製が不完全だった DNA 断片、あるいはリガーゼの効率が 100 % ではないために生じたものと思われる。このような CC DNA と OC DNA が混在している標品を用いて変異を検出した場合、複製エラー以外に形質転換後に、この標品に少量含まれている OC DNA に起因して誘発される変異を同時に検出する可能性が考えられた。そこで、DNA リガーゼにより自己環状化反応させた CC DNA と OC DNA が混在した標品を更に DNA ジャイレースにより処理する (Maki *et al.*, 1992)。この処理により CC DNA には負の超らせんが導入されるがニックの入った OC DNA はそのままである。DNA の高次構造によって DNA を分離することが出来る FPLC MonoQ カラムを用いて OC DNA と負の超らせんを導入した CC DNA を分離した。この CC DNA を複製産物としてメチル化を行った後、変異検出用の大腸菌 (MF101) に導入して変異体を選択し、*rpsL* 遺伝子に生じた変異を塩基配列レベルで決定した。

標的遺伝子として *rpsL* 遺伝子を用いた検出系 (Mo *et al.*, 1991) では、ストレプトマイシン抵抗性 (Sm^r) である変異型の *rpsL* 遺伝子をもつ宿主 (Funatsu & Wittmann, 1972) に、野生型の *rpsL* 遺伝子をもつプラスミドを導入するとストレプトマイシン感受性 (Sm^s) になるが、変異が誘発されて *rpsL* 遺伝子の機能がなくなったプラスミドを導入すると Sm^r になる。このように *rpsL* 系では、容易に前進突然変異を選択することができ、変異頻度が低くても極めて鋭敏に変異体の選択が可能な系である。

2. 試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系で検出された *rpsL*⁻ 変異

表 3-1 で示すように複製産物の変異頻度は 1.9×10^{-4} であり、鋳型 DNA のバックグラウンド変異と比較して 50 倍の変異頻度の上昇が観察された。よって、試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系を用いれば、DNA pol III HE によって誘発される複製エラーの検出が可能であることが明らかになった。ローリングサークル型複製では、リーディング鎖合成で生じた複製エラー (前変異) は、ラギング鎖合成により変異として固定されるので、リーディング鎖合成で誘発された複製エラーは全て検出できる。一方、ラギング鎖合成中に生じた複製エラーは、ヘテロ二重鎖の状態に残ることになる。*Dam* メチラーゼでフルメチル化した、このような複製エラーがヘテロ二重鎖の状態であるプラスミド DNA で大腸菌を形質転換した場合、 Sm^r を示す割合は 4 ~ 20 % であると予想される (第四章を参照)。このことから複製産物で検出される変異の大部分は、リーディング鎖合成で誘発された複製エラーを反映して検出されるものと思われる。

A.

変異の種類	検出された変異の数		変異頻度 (X 10 ⁻⁶)	
	鋳型 DNA	複製産物	鋳型 DNA	複製産物
塩基置換	20	51	0.95	47
1 塩基フレームシフト	8	125	0.38	120
2 塩基フレームシフト	0	9	<0.048	8.3
欠失	36	13	1.7	12
重複	15	5	0.71	4.6
配列置換	1	2	0.048	1.9
変異全体	80	205	3.8	190

B.

変異の種類	鋳型 DNA に比べて の相対的増加 (倍)
塩基置換	49
1 塩基フレームシフト	320
2 塩基フレームシフト	>170
欠失	7.1
重複	6.5
配列置換	40
変異全体	50

表 3 - 1 試験管内で DNA pol III HE によって誘発された変異

3. 試験管内 DNA 複製で生じた *rpsL*⁻ 変異のスペクトラム解析

i) 全体像

鋳型 DNA と複製産物で検出した *rpsL*⁻ 変異体より、どのような変異が生じているのかを知るために各々 80、205 個の変異体を無作為に選び、その変異を塩基配列レベルで決定した (表 3-1)。鋳型 DNA と比較して、複製産物では表 3-1 で示した全てのタイプの変異頻度が上昇していることがわかった。特に塩基置換、一塩基フレームシフト、二塩基フレームシフトに関しては、鋳型 DNA に比べて顕著に変異頻度の上昇が観察され、試験管内で誘発された変異を検出していると結論できた。また、残りのタイプの変異についても、鋳型 DNA に比べて有意な変異頻度の上昇が観察されることから、これらの変異は複製エラーを反映して検出されたと考えられる。

ii) 塩基置換

複製産物で検出された塩基置換は、同じ *rpsL* を標的遺伝子とした *mutS*⁻ 株で検出された塩基置換の発生傾向 (Fujii *et al.*, 1999) と大きく異なっていた。複製産物では、トランスバージョンの G:C → T:A と A:T → C:G、トランジションの G:C → A:T の3つの変異で塩基置換全体の 88 % を占め (表 3-2)、何れのタイプも発生数に対して発生部位が少なくホットスポット (ある特定の部位で多数の同じ変異が独立に生じる) が観察された (図 3-3)。

ミューテーター変異株の解析から、損傷塩基によって誘発される塩基置換として、主要な変異が3つ知られている。1つは、鋳型 DNA 中の dG の酸化 (8-oxo-dG) により G:C → T:A のトランスバージョンが誘発される。この変異は、MutM、MutY により抑制される (Tajiri *et al.*, 1995; Michaels *et al.*, 1992)。2つ目は、基質の dGTP の酸化 (8-oxo-dGTP) により A:T → C:G のトランスバージョンが誘発される。この変異は、MutT により抑制される (Tajiri *et al.*, 1995; Maki & Sekiguchi, 1992)。3つ目は、鋳型 DNA 中の dG のメチル化 (O⁶-methyl-dG) または (メチル化された) dC の脱アミノ化 (T or U) により G:C → A:T のトランジションが誘発される。この変異は、メチルトランスフェラーゼ、Vsr、Ung により抑制される (Sohail *et al.*, 1990; Duncan & Weiss, 1982)。

試験管内複製反応で用いた鋳型となるプラスミド DNA 中には酸化された dG が、dNTP プール中には酸化された dGTP が内在していると思われる (Tajiri *et al.*, 1995)。また、*rpsL* を標的遺伝子とした *mutM*⁻ *mutY*⁻ 二重変異株および *mutT*⁻ 変異株で検出された G:C → T:A と A:T → C:G の検出部位 (Tajiri *et al.*, 1995) と今回複製産物で検出されたこれらの変異の検出部位がよく似ていたことから、複製産物で検

変異の型	検出された変異の数		変異頻度 ($\times 10^{-6}$)	
	鋳型 DNA	複製産物	鋳型 DNA	複製産物
トランスバージョン				
G : C $\rightarrow$ T : A	8	26	0.38	24
A : T $\rightarrow$ C : G	0	7	<0.05	6.5
G : C $\rightarrow$ C : G	2	2	0.095	1.8
トランジション				
G : C $\rightarrow$ A : T	9	12	0.43	11
A : T $\rightarrow$ G : C	1	4	0.05	3.7

表 3-2 鋳型 DNA と複製産物で検出された塩基置換

3
 X
 T
 A
 5' - CTAAAACCAG AG GAGCTATTTA ATGGCAACAG TTAAGTAGCT GGTACGCAAA CCACGTGCTC GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC 60
 C
 A
 X
 4
 2
 X
 T
 3
 X
 A
 2
 X
 C
 GTGCCTGCGC TCGAAGCATG CCGGCAAAAA CGTGGCGTAT GTACTCGTGT ATATACTACC ACTCCTAAAA AACCGAACTC 140
 T
 A
 X
 2
 A
 X
 3
 T
 X
 2
 2
 X
 G
 C
 CGCGCTGCGT AAAGTATGCC GTGTTCTGCTCT GACTAACGGT TTCGAAGTGA CTTCTACAT CGGTGGTGAA GGTCACAACC 220
 T
 A
 3
 X
 C
 3
 X
 A
 2
 X
 A
 TGCAGGAGCA CTCCGTGATC CTGATCCCGT GCGGTCGTGT TAAAGACCTC CCGGGTGTTT GTTACCACAC CGTACGTGGT 300
 A
 G
 A
 3
 X
 C
 GCGCTTGACT GCTCCGGCGT TAAAGACCGT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG CGTCCTAAGG CTTAA -3' 375

rpsL の開始コドンの一番目の塩基を 1 として数を振っている。シャインダルガノ配列と開始コドン、終止コドンの塩基配列には下線を引いた。鋳型 DNA 及び複製産物で検出された変異は、鋳型の二本鎖の内、どちらの鎖を鋳型として変異が誘発されたのか不明であるため、ここでは便宜的に *rpsL* のコーディング鎖側で生じた変異として、検出された変異をその配列の上（複製産物）か下（鋳型 DNA）に示す。検出された変異に X N と記されてる場合、同じ変異が N 個検出されたことを表す。

出されたトランスバージョンの G:C → T:A と A:T → C:G は損傷塩基に起因して誘発された変異であると思われた。複製産物で検出されたトランジションの G:C → A:T に関しても検出された部位が、損傷した鋳型 DNA 中の dC (例えば脱アミノ化) によって誘発されたと示唆される G:C → A:T の検出部位 (第 4 章を参照) (Fujii & Maki, 投稿準備中) とよく似ていることから、損傷塩基によって誘発されたのかも知れない。このように、複製産物で検出された塩基置換は主に損傷塩基に起因して検出されたものと思われた。

iii) 一塩基フレームシフト

鋳型 DNA に最初から含まれている (バックグラウンド変異) 一塩基フレームシフトの変異頻度は 0.38×10^{-6} であるが、複製産物で検出された一塩基フレームシフトの変異頻度は 120×10^{-6} であり、鋳型 DNA に比べて複製産物では、一塩基フレームシフトの変異頻度は 320 倍上昇している。図 3-4 で示すとおり、複製産物では同じ塩基の並んだ部位 (ラン) で、付加もしくは欠失の強力なホットスポットが観察された。また、表 3-3 A で分類した何れのタイプも複製産物では、鋳型 DNA に比べて変異頻度の大幅な上昇が観察された。複製産物ではランでの変異が 86 % を占めており、付加と欠失で発生傾向が異なっている (表 3-3 B)。付加では明らかにランの長さが長くなるほど変異頻度が高くなるが、欠失では必ずしもこの傾向は当てはまらず、ランの長さに依存していない。同じ *rpsL* を標的遺伝子とした *mutS⁻* 株で検出されたランでの一塩基フレームシフトも同じ発生傾向が観察されたので (Fujii *et al.*, 1999)、細胞内でも試験管内と同じ発生機構によって一塩基フレームシフトが誘発されていると思われた。また、複製産物で検出されたノンランでの変異は、欠失がほとんどであることが明らかになった。

複製産物で検出された一塩基フレームシフトには、いくつかの特徴が観察された。A/T のランにおいて、付加ではランの長さが長くなるほど変異頻度が高くなるが、欠失では必ずしもこの傾向は当てはまらず、ランの長さに依存していない。しかし、興味深いことに、付加も欠失も 4A/T と 5A/T を境にして大きな変異頻度の差を生じている。4A/T 以下の部位での変異頻度は、それぞれ似た値を示しているが、5A/T 以上では 6A/T での付加のみが異常に高い変異頻度を示しており、残りは似た値を示した。この結果から校正機能を持つ DNA ポリメラーゼは A/T のランにおいて、6A/T を除いて付加と欠失はほぼ均等に誘発され、付加も欠失も 4A/T と 5A/T を境にして大きな変異頻度の差を生じ、6A/T では圧倒的に付加が誘発され易いと考えられる。G/C のランにおいては、*rpsL* 中に 4G/C 以上の配列がないため、長いランについては不明であるが、少なくとも 3G/C 以下のランに関しては、付加が 1 例も検出されていないことから欠失が圧倒的に起こりやすいと考えられる。このような 3A/T 以下のランと 3G/C 以下のランにおける一塩基フレームシフトの特異性の違い

上段；複製産物
下段；鋳型 DNA

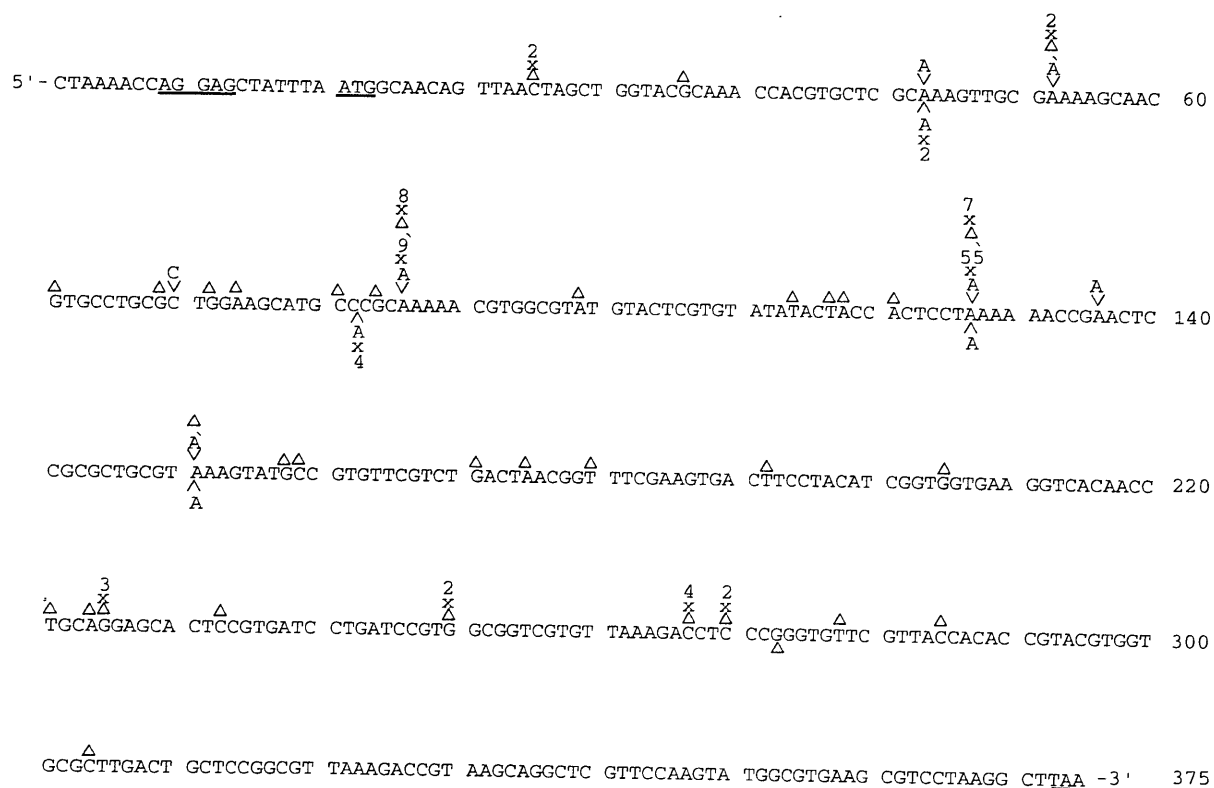


図3-4 試験管内でDNA pol III HEにより誘発された一塩基フレームシフトの部位

△は-1の欠失、V（Λ）は+1の付加が検出された部位を表す。但し、同じ塩基が並んだ（ラン）配列中で検出された変異は、生じた部位の特定ができないので便宜的にラン配列の内、開始コドンに近い側に記載した。

A.

変異の型	検出された変異の数		変異頻度 (X 10 ⁻⁶)		
	鋳型 DNA	複製産物	鋳型 DNA	複製産物	
ランで生じた変異					
付加					
6A/T → 7A/T	1	55	0.05	51	(88)* ¹
5A/T → 6A/T	0	9	<0.05	8.3	(17)
4A/T → 5A/T	0	1	<0.05	0.93	(2.4)
3A/T → 4A/T	2	2	0.095	1.9	(1.1)
2A/T → 3A/T	0	1	<0.05	0.93	(0.19)
欠失					
6A/T → 5A/T	0	7	<0.05	6.5	(11)
5A/T → 4A/T	0	8	<0.05	7.4	(15)
4A/T → 3A/T	0	2	<0.05	1.9	(4.8)
3A/T → 2A/T	0	2	<0.05	1.9	(1.1)
2A/T → 1A/T	0	4	<0.05	3.7	(0.77)
3G/C → 2G/C	1	3	0.05	2.8	(3.2)
2G/C → 1G/C	0	14	<0.05	13	(1.9)
ノンランで生じた変異					
付加	4	1	0.19	0.93	(0.045)
欠失	0	16	<0.05	15	(0.72)

*1. 複製産物で検出された変異を変異率に換算した値 (x 10⁻⁷/bp)

B.

変異の種類	変異に占める割合 (%)	
	鋳型 DNA	複製産物
ランで生じた変異		
付加	37.5	54.4
欠失	12.5	32.0
ノンランで生じた変異		
付加	50.0	0.8
欠失	0.0	12.8

表 3-3 鋳型 DNA と複製産物で検出された一塩基フレームシフト

は、スリッページ (Streisinger *et al.*, 1966) が生じる際の相補鎖の融解のし易さが関係しているのかもしれない。つまり、G/C のランでは、新生鎖側のループアウトが A/T のランに比べて生じにくいのかかもしれない。一方、ノンランでのフレームシフト変異の標的部位は極めて多いにも関わらず、圧倒的に欠失が多く観察された。このことは、欠失では鋳型鎖側がループアウトし伸長反応が行われるのに対して、付加では新生鎖側のループアウトに加えてミスマッチ末端からの伸長反応が必要なため、付加の方がより複雑な発生機構であることを反映した結果なのかもしれない。

iv) 二塩基フレームシフト

二塩基フレームシフトは、鋳型 DNA では 1 例も検出されず、この変異頻度は 0.048×10^{-6} 以下となる。一方、複製産物では 9 例検出され、この変異頻度は 8.3×10^{-6} であり、鋳型 DNA に比べて複製産物では、二塩基フレームシフトの変異頻度は 170 倍以上上昇している。複製産物で検出された 9 例の内、4 例が TA が 3 つ並んだランでの欠失で、1 例が同じランでの付加として検出されているので恐らくこの 5 例は、スリッページによって誘発されたものと思われる。残りの 4 例については、ノンランでの欠失でありノンランでの付加は検出されていない。これは、一塩基フレームシフトで観察されたノンランでの変異の発生傾向と同じであり、同じ機構が働いているのかもしれない。

v) 欠失、重複、配列置換

鋳型 DNA と複製産物で検出された欠失をまとめたのが表 3-4 になる。欠失の発生機構として順向き反復配列を介して生じたものと思われる欠失と、順向き反復配列を介さずに生じたものと思われる欠失の割合は、複製産物では 2.3:1 の割合であった。複製産物の内、鋳型 DNA と同じ欠失は 3 例見つかり、内 2 例は同じ部位 (複製産物では、この部位以外の欠失は 1 例ずつしか検出されていない) で生じていた。鋳型 DNA では、試験管内 DNA 複製で鋳型として利用できない *oriC* 領域を欠失したものが 26 % 含まれていた。また、同じ部位で生じた欠失が、いくつも検出されている。鋳型 DNA に含まれている欠失で、*oriC* 領域を欠失したものを除いた変異頻度は 1.3×10^{-6} であるが、複製産物での欠失の変異頻度は 12×10^{-6} であり、鋳型 DNA に比べて複製産物では、欠失の変異頻度は 9.2 倍上昇している。また、鋳型 DNA と複製産物で検出された欠失は、ほとんどが異なる部位で生じていたことから、鋳型 DNA に比べて複製産物では、欠失の変異頻度が 9.2 倍上昇していることに信頼性を与え、試験管内 DNA 複製で欠失が誘発されていることを示唆する。

鋳型 DNA では重複は 15 例見つかったが、その内、結果として順向き反復配列に

A.

変異の生じた部位	変異の種類	変異の生じた数	欠失の大きさ (bp)	oriC 領域の欠失
-689 ~ 286	CCCTGCAGG → CCTGCAGAG	3	915	有
-568 ~ 137	GACGAA → CGAACT	1	705	有
-367 ~ 243	CGGTGATCCTG → GTGATCCTGAT	1	610	有
-337 ~ 645	TGAGGGG → AGGGGAT	1	982	有
-167 ~ 169	ATTTCGTC → TTCGTCTG	1	336	無
-155 ~ 181	TTACGGTT → ACGGTTTC	7	336	無
-72 ~ 508	CCTAAAATTC → TAAAATICTG	1	580	無
39 ~ 64	CCACGTGC → ACGTGCCT	1	26	無
164 ~ 357	GCCGTG → CGTGAA	2	194	無
169 ~ 282	CCGTGTTCTG → GTGTTCTGTTA	3	114	無
269 ~ 328	GTGTTAAAGACC → GTTAAAGACCGT	4	60	無
306 ~ 843	TGGTGCCT → GTGCGCTCT	3	538	無
317 ~ 854	GCTCCG → TCCGAC	2	538	無
-780 ~ -78	CAGT · TTTA → CTA · AATT	1	703	有
-333 ~ 38	TTAT · ACAC → GTGC · TCGC	1	371	有
-251 ~ 638	AGTA · GATC → AGAA · TCAG	1	889	有
-188 ~ 809	TCTC · ATTG → ATAC · CAGG	1	997	無
-143 ~ 15	CAGC · CAGA → TAAC · TAGC	1	158	無
52 ~ 54	CGAAAAGC → CGAGC	1	3	無

B.

変異の生じた部位	変異の種類	変異の生じた数	欠失の大きさ (bp)	oriC 領域の欠失
-710 ~ 96	ACAACGTGGC → AACGTGGCGT	1	806	有
-167 ~ 169	ATTTCGTC → TTCGTCTG	1	336	無
-12 ~ 291	AAACC → ACCGT	1	303	無
-11 ~ 33	TAAAACCA → AAACACG	1	44	無
-9 ~ 353	CAGG → GSCG	1	362	無
126 ~ 271	CACTCC → CTCCCG	1	146	無
175 ~ 192	TCTGACT → TGACTTC	1	18	無
306 ~ 843	TGGTGCCT → GTGCGCTCT	2	538	無
-672 ~ 210	ATTT · ATCA → TGAA · GGTC	1	882	有
-4 ~ 537	GCTA · TTTA → GAAG · CTTC	1	541	無
15 ~ 371	TTAA · CTAG → AGGC · TTAA	1	357	無
62 ~ 228	AACG · TGCC → GGAGC · CACT	1	167	無

表 3 - 4 鋳型 DNA と複製産物 で検出された欠失

A は鋳型 DNA で、B は複製産物で検出された欠失を示す。変異の種類のカラムは、矢印の左側の配列が元々の配列で、下線の引いてある部位は、順向き反復配列を表す。矢印の右側の配列は、欠失の起こった結果、生じた配列である。

なったものが4例（全て異なる部位で検出された）で、複雑なクラス II 重複（Mo *et al.*, 1991）は11例見つかり、全て同じ部位に生じていた。複製産物では重複は5例見つかり、全てが鋳型 DNA で検出されたクラス II 重複と同じ変異であった。配列置換（Mo *et al.*, 1991）に関しては、鋳型 DNA で1例、複製産物で2例見つかり、全て同じタイプの変異であった。鋳型 DNA に比べて複製産物では、重複と配列置換の変異頻度はそれぞれ6.5倍と40倍上昇している。重複に関しては、十分な数の変異を検出できたので変異頻度の上昇は信頼でき、試験管内 DNA 複製で重複が誘発されていることを示唆する。しかし、配列置換に関しては、検出された変異の数が少ないため、変異頻度の上昇は信頼できないが、複製産物で2例見つかり、恐らく試験管内 DNA 複製で配列置換が誘発されていると思われる。

クラス II 重複や配列置換は、その発生機構として鋳型スイッチングが提唱されている（Mo *et al.*, 1991; Rosche *et al.*, 1998）。今回、クラス II 重複や配列置換が試験管内で有意に誘発されていることから、複製フォークを介した複製反応において、複製酵素それ自体が鋳型スイッチングを起こしうることが示唆された。鋳型スイッチングを介しての突然変異と思われる変異は、生物種を問わず観察されているので（Ripley, 1982; Golding & Glickman, 1985; Golding *et al.*, 1987; Ripley *et al.*, 1986; Giroux *et al.*, 1988; Hartnett *et al.*, 1990）、それらの変異も複製反応中の複製エラーに起因した鋳型スイッチングによって誘発されたのかもしれない。

重合反応している複製装置が、いったんその部位から離れて別の部位で重合反応を行うことにより誘発されると考えられる欠失、配列置換、クラス II 重複が本実験系で検出されている。これらの変異頻度を見た場合、順向き反復配列を介して生じたものと思われる欠失が 8.3×10^{-6} 、順向き反復配列を介さずに生じたものと思われる欠失が 3.7×10^{-6} 、配列置換が 1.9×10^{-6} 、クラス II 重複が 4.6×10^{-6} であった。これらの結果から、複製装置がいったん重合反応している部位から離れて別の部位で重合反応を行い変異を誘発する際、新生鎖の3'端の何残基かと相補的な配列をもつ複製フォークの前方の同一鋳型上に最もアライメントしやすく、これよりは少し低い頻度で完全な相補的な配列をもたない複製フォークの前方の同一鋳型上や、相補的な配列をもつ逆側の鋳型上へのアライメントを介して変異が誘発されると思われる。しかし、いったん重合反応した領域をもう一度、重合反応することにより生じると考えられるクラス I 重複は、どの配列でも標的になると考えらるのだが1例も検出されていない。これは、いったん重合反応している部位から離れた新生鎖の3'端が再びアライメントを行う際、いったん重合反応した領域とはアライメントしづらい、恐らくいったん重合反応した領域はその相補鎖と安定な二重鎖を作っているためであると思われる。これらの結果から、重合反応している部位から離れた新生鎖の3'端が再びアライメントを行う際の主要な標的は、複製フォークの前方の同一鋳型上あるいは、相補的な配列をもつ逆側の鋳型上になるとと思われる。

第四章

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で大腸菌の複製酵素により
誘発される複製エラー

I. 序

試験管内で複製酵素により誘発された前変異を網羅的に検出するために、前進突然変異検出系を用いた実験は過去数十年に渡り行われてきている (Fersht, 1979; Kunkel, 1985; Carraway *et al.*, 1990)。実験系は主に一本鎖環状 DNA 上にプライマーとなる一本鎖線状 DNA を貼り付けて、ポリメラーゼにより伸長反応を行い (ギャップフィリング、プライマー伸長反応)、200 ~ 400 塩基の標的遺伝子上に生じたエラーを検出する。その際、鋳型となる一本鎖環状 DNA はファージミドベクターに標的遺伝子をクローニングし生物学的に調製されてきたのだが、鋳型中に含まれるバックグラウンドの変異頻度が高いため、染色体の複製に関わる複製酵素により誘発される複製エラーを標準的な反応条件下では検出することができなかった

(Thomas *et al.*, 1991; Kroutil *et al.*, 1998; Pham *et al.*, 1998)。実際に、ファージミドベクターに *rpsL* 遺伝子 (コーディング配列が 375 塩基) をクローニングしたプラスミド DNA から、生物学的に一本鎖環状 DNA を調製したところ、その変異頻度は 10^{-4} の前半が限界であり、この調製法では複製エラーを検出することは難しいことが分かった。二本鎖環状 DNA の状態で調製した標品に比べて変異頻度を下げることが難しい原因として、細胞内でローリングサークル型複製により一本鎖環状 DNA が生産される際、複製様式が異なるために忠実度が低下している、複製後修復が十分に働かない、操作自体の問題として一本鎖の状態が長く DNA 上に傷がつきやすい等が考えられる。

細胞内で染色体の複製に関わる DNA 複製酵素の忠実度は非常に高く、これまでに唯一標準的な反応条件下で複製酵素により誘発される複製エラーを検出できたのは、第三章で述べた大腸菌の DNA pol III HE を用いた試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系 (*oriC* 系) だけである。しかし、この実験系では二本鎖の内どちらを鋳型として前変異が誘発されたのかを区別出来ないという問題点があった。一本鎖環状 DNA を鋳型として用いれば上記の問題点を克服できるのだが、鋳型のバックグラウンドの変異頻度が高く、かつこの実験系では前変異がヘテロ二重鎖であるため細胞内に形質転換後、全ての前変異が変異として固定されるわけではない。そのため検出できた変異の各々が等価ではなく複製エラーの実体を反映しないことから、これらの点を改善する必要があった。そこで新たな実験系を開発し、大腸菌の野生型 DNA pol III HE により誘発された前変異を塩基配列レベルで決定し解析を行った。また、*oriC* 系との比較を行うことにより複製フォーク中での複製エラーとプライマー伸長反応中での複製エラーの発生傾向の違いに関しても考察する。

II. 結果

1. 試験管内で酵素学的に二本鎖環状 DNA から一本鎖環状 DNA への変換法

大腸菌の複製酵素である DNA pol III HE により誘発される複製エラーは、試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系 (*oriC* 系) で調べたところ、*rpsL* を標的遺伝子とした前進突然変異検出系において 1.9×10^{-4} の変異頻度であることが分かった。よって、*rpsL* を標的遺伝子として試験管内で誘発される複製エラーを検出する際、鋳型 DNA 標品の変異頻度を 1.9×10^{-4} 以下にしなければ複製エラーの検出は困難である。バックグラウンドの変異頻度の低い一本鎖環状 DNA 標品をファージミドを用いて調製することは困難であるが、プラスミド DNA の状態で調製すれば *rpsL* を標的遺伝子として 10^{-6} 前半の変異頻度の標品が調製可能である。そこで、試験管内で酵素学的にプラスミド DNA を一本鎖環状 DNA に変換することで、変異頻度の低い鋳型 DNA 標品の調製が可能ではないかと考えた。

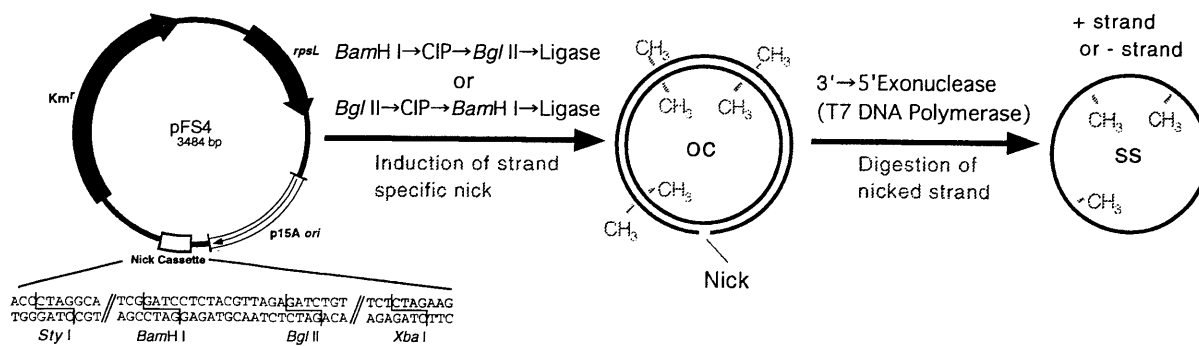
一本鎖環状 DNA を調製するための基質として、鎖特異的にニックを導入するための 4 種類の制限酵素切断領域をもたせたニックカセットをクローニングした pFS4 プラスミド DNA を構築した (図 4-1)。*rpsL* コーディング鎖を含む一本鎖環状 DNA (SS+) を調製するときには (図 4-1)、先ず *Bam*H I 切断を行い、続いてアルカリホスファターゼ処理により 5' 端を脱リン酸化後、*Bgl* II 切断する。*Bam*H I と *Bgl* II 切断で生じた突出末端部は相補的なので、リガーゼによる自己環状化反応により *rpsL* 非コーディング鎖側に特異的にニックが導入された OC DNA の調製が可能である。T7 DNA ポリメラーゼの 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性は、二本鎖、一本鎖を問わず末端部が存在すれば (ニックを含む) 働き、環状構造以外は消化することを確認したので (図 4-2)、ここで導入したニックを介して T7 DNA ポリメラーゼ処理により *rpsL* 非コーディング鎖側を特異的に消化することで、SS+ を調製する。*rpsL* 非コーディング鎖を含む一本鎖環状 DNA (SS-) を調製するときには、*Bam*H I と *Bgl* II 切断の順序を逆にして調製する (図 4-1)。このように調製した SS+、SS- をアガロースゲル電気泳動を行い、EtBr 染色したところ、元々の OC DNA は観察されず純度が高いことが分かった (図 4-2)。

試験管内で酵素学的に調製した鋳型となる一本鎖環状 DNA 標品 (SS+(-)) の変異頻度は、元となるプラスミド DNA 標品 (CCC) に比べて 5 ~ 6 倍の変異頻度の上昇が観察されたものの 10^{-5} 前半の値が得られ、従来のファージミドを用いた方法に比べて一桁低い変異頻度をもつ鋳型 DNA 標品の調製ができた (表 4-1)。*oriC* 系の結果から DNA pol III HE により誘発される複製エラーに比べて約 1/7 の変異頻度なので、この鋳型を用いれば複製エラーの検出は可能であろうと判断した。

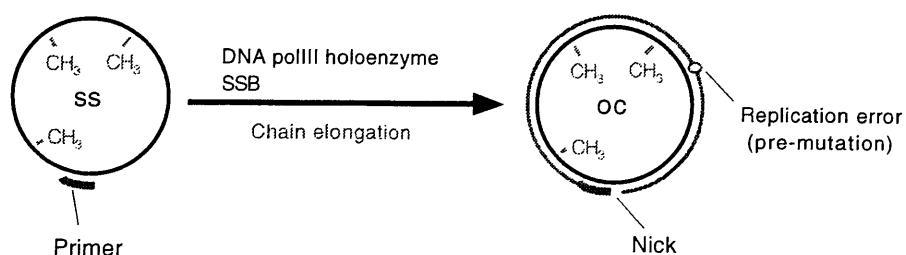
2. 試験管内 DNA 複製反応以外で検出されるバックグラウンド変異の検出傾向

鋳型となる SS+(-) の変異頻度は、元となるプラスミド DNA 標品 (CCC) に比べて 5 ~ 6 倍の変異頻度の上昇が観察されたので、試験管内で SS+(-) を調製する際の

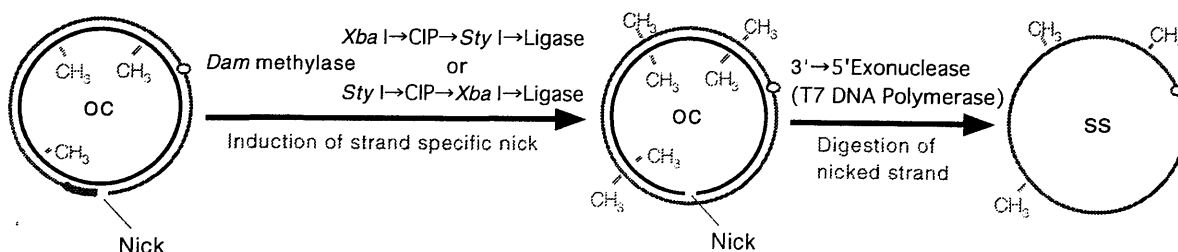
一段階: プラスミド DNA から一本鎖環状 DNA への変換



二段階: 一回目の DNA 複製 (ss → ds)



三段階: 複製産物から一本鎖環状 DNA への変換



四段階: 二回目の DNA 複製 (ss → ds)

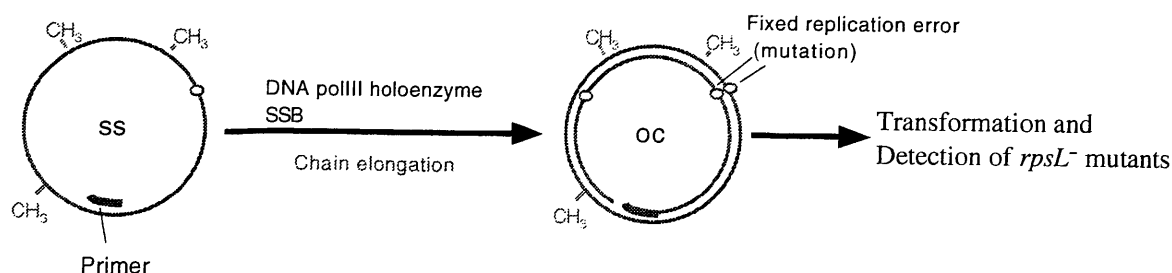


図 4 - 1 DNA pol III HE を用いて誘発される複製エラーを検出するための二連続 ssDNA → dsDNA 複製系

pFS4 の Km^r と $rpsL$ の矢印は転写の方向を、p15A ori の矢印は複製の方向を示す。
 詳細は、材料と方法および結果を参照せよ。

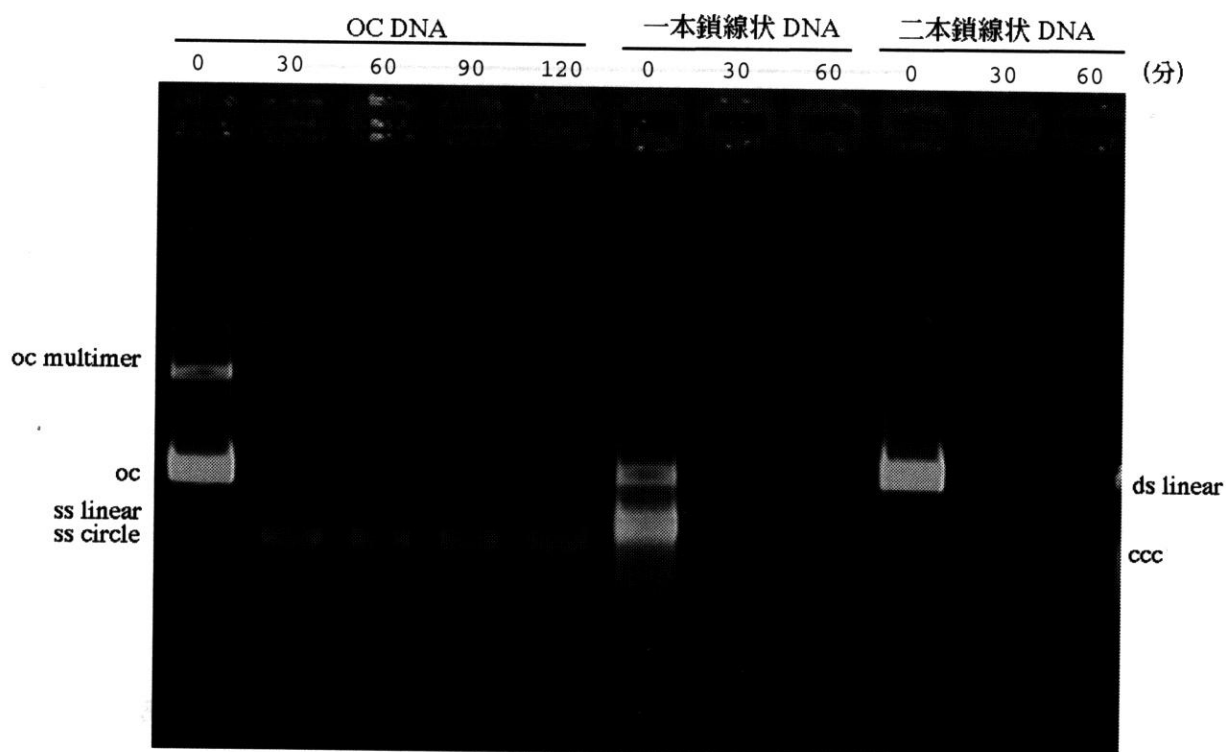


図4-2 T7 DNA ポリメラーゼ処理によって生じる一本鎖環状 DNA

OC DNA は $1.1\mu\text{g}$ 、一本鎖線状 DNA は $1\mu\text{g}$ 、二本鎖線状 DNA は $1\mu\text{g}$ 入った反応液に 12.5 ユニットの T7 DNA ポリメラーゼを混ぜ 37°C に保温して反応を開始する。経時的に OC DNA は 255 ng、一本鎖線状 DNA と二本鎖線状 DNA は 400 ng 相当を反応液から分取して、30 mM EDTA と 0.6 % SDS の存在下で反応を停止させる。そして、それぞれの試料を 0.7 % アガロースゲルで電気泳動し EtBr 染色を行った。0 分の試料は T7 DNA ポリメラーゼを混ぜておらず、上記の反応液とは独立に調製したものである。

DNA 標品		変異頻度 (X 10 ⁻⁶)
CCC		4.9 ± 0.67
Treated CC		9.2 ± 1.3
SS+		25 ± 3.6
SS-		28 ± 5.4
Heteroduplex	+	43 ± 9.8
	-	66 ± 7.6
Fixed	+	150 ± 28
	-	150 ± 34

表 4 - 1 DNA pol III HE によって誘発された *rpsL*⁻ 前進突然変異の変異頻度

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系の各段階で調製された DNA 標品の変異頻度を表す。変異頻度は各 DNA 標品で 4 回独立に形質転換実験により得られた変異頻度を平均化したもので標準偏差の値も同時に記載した。CCC は細胞内で増幅した pFS4 プラスミドで、SS は pFS4 を試験管内で酵素学的に一本鎖環状 DNA にしたものである。Heteroduplex (ヘテロ二重鎖標品) は一回のみプライマー伸長反応を行った産物でヘミメチルの状態である。Fixed (固定した標品) は前変異を固定するための二回目のプライマー伸長反応を行った産物でヘミメチルの状態である。試験管内 DNA 複製産物の +、- は一回目のプライマー伸長反応でそれぞれ SS+、SS- を鋳型として用いた標品である。

処理がバックグラウンドの変異頻度の上昇を引き起こさないのかを調べた。T7 DNA ポリメラーゼを用いて OC DNA を一本鎖環状 DNA に変換する処理と複製反応以外の全ての反応を行ったプラスミド DNA 標品 (Treated CC; 材料と方法を参照) の変異頻度は、CCC に比べて 1.9 倍の変異頻度の上昇が観察された (表 4-1)。そこで、これらの試験管内 DNA 複製反応以外で検出されるバックグラウンドの変異頻度の上昇は、どのような変異に起因しているのかを塩基配列レベルで調べた。

CCC、Treated CC、SS+、SS- に由来する Sm' 変異体を各々 109、200、100、100 個無作為に選び、生じた変異を塩基配列レベルで決定した (表 4-2)。CCC と比較して Treated CC の変異頻度の上昇に大きく寄与している変異のクラスは、一塩基フレームシフトで 14 倍の変異頻度の上昇が観察された (表 4-2)。その変異頻度の上昇に寄与している一塩基フレームシフトの型は、ランやノンランでの G(C) の -1 で (表 4-5)、変異全体の 46 % を占めていた。このように Treated CC では、どの段階で生じたのかは不明であるが試験管内で -1 フレームシフトを誘発する傷が G(C) 上に生じることが分かった。一方、SS+(-) に関しては、SS+(-) を調製する際の基質となる OC DNA が Treated CC とほぼ同じ処理を受けているので、SS+(-) の比較の対照は Treated CC になる。Treated CC と比較して SS+(-) の変異頻度は約 3 倍上昇しており、変異頻度の上昇に大きく寄与している変異のクラスは塩基置換で 5 ~ 10 倍の変異頻度の上昇が観察された (表 4-2)。その変異頻度の上昇に寄与している塩基置換の型は、SS+ と SS- の両標品に共通して G → A (形質転換後に SS → RF 変換されるときの新生鎖側での変異として記述) が、SS+ でのみ C → A、C → G が明らかに上昇している (表 4-4)。Treated CC と比較して SS+(-) で特異的に変異頻度が上昇している塩基置換は、SS+(-) 中に内在している傷に起因して誘発されたものと推定される。しかし、Treated CC 中に損傷塩基が内在していたとしても、形質転換後に損傷塩基が修復されれば、野生型の方向 (Sm') に固定されるため変異頻度の上昇には寄与しない。よって、Treated CC と比較して SS+(-) で特異的に変異頻度が上昇している変異の型は、試験管内で二本鎖を一本鎖に変換したことに起因して損傷塩基が生じたのかどうかは不明である。

表 4-2 で示すように、2 塩基以上の欠失は二塩基フレームシフト (2 塩基の欠失)、小さな欠失 (3 ~ 10 塩基の欠失)、大きな欠失 (11 塩基以上の欠失) の 3 つの変異のクラスに分類している。CCC と比較して Treated CC では、二塩基フレームシフトと大きな欠失は検出数 (表 4-2) と変異の内容 (data not shown) からこれらの変異を誘発する傷は生じていないと思われる。しかし、3 ~ 10 塩基の小さな欠失は CCC で検出されなかったが、Treated CC で 17 例検出され、その内 15 例が *rpsL* の 236 ~ 247 番目の 2(TGATCC) が 1(TGATCC) になる 6 塩基欠失の型であることから、試験管内の操作の過程で CCC 上の 2(TGATCC) に傷が生じたことが示唆される。一方、Treated CC と SS+(-) では、2 塩基以上の欠失はほぼ同水準の変異頻度で検出されており (表 4-2)、変異の内容も似ていた (data not shown)、試験管内で二本鎖を一本鎖に変換しても 2 塩基以上の欠失を誘発する損傷塩基は生じない

A.

変異の種類	検出された変異の数							
	CCC	Treated CC	SS		Hetero-duplex		Fixed	
			+	-	+	-	+	-
塩基置換	51	35	62	28	151	105	108	103
一塩基フレームシフト	8	112	26	60	32	51	17	60
二塩基フレームシフト	1	7	1	0	6	17	16	17
小さな欠失 ^{*1}	0	17	0	1	1	6	0	4
大きな欠失 ^{*2}	7	21	3	2	3	18	58	13
その他 ^{*3}	7	3	0	0	0	1	1	0
IS1	35	5	8	9	7	2	0	3
変異全体	109	200	100	100	200	200	200	200

*1, 3~10 塩基の欠失

*2, 11 塩基以上の欠失

*3, 配列置換、重複、二重変異

B.

変異の種類	変異頻度 (X 10 ⁻⁶)							
	CCC	Treated CC	SS		Hetero-duplex		Fixed	
			+	-	+	-	+	-
塩基置換	2.3	1.6	16	7.8	32	35	81	77
一塩基フレームシフト	0.36	5.2	6.5	17	6.9	17	13	45
二塩基フレームシフト	0.045	0.32	0.25	<0.28	1.3	5.6	12	13
小さな欠失	<0.045	0.78	<0.25	0.28	0.22	2.0	<0.75	3.0
大きな欠失	0.31	0.97	0.75	0.56	0.65	5.9	44	9.8
その他	0.31	0.14	<0.25	<0.28	<0.22	0.33	0.75	<0.75
IS1	1.6	0.23	2.0	2.5	1.5	0.66	<0.75	2.3
変異全体	4.9	9.2	25	28	43	66	150	150

表 4-2 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出された *rpsL* に占める変異のクラス分け

pFS4 (CCC) は 109、鋳型である SS は 100、残りの標品は各 200 の Sm^r コロニーを無作為に選び、生じた変異を塩基配列レベルで決定し、検出された変異を変異の各クラスに分類した。

と思われる。

3. SS DNA → ヘテロ二重鎖 → 新生鎖 SS DNA により複製エラーを検出する際の 問題点

ギャップフィリングやプライマー伸長反応系では、DNA ポリメラーゼにより誘発された前変異はヘテロ二重鎖の状態である。ヘテロ二重鎖標品で宿主を形質転換すると変異の種類や生じた部位により検出効率が異なる (Parker & Marinus, 1992) ので、検出した変異の個々を等価に比較することは不可能である。そこで、試験管内で誘発された複製エラーを全て検出することが可能な実験系の構築を試みた。図 4-1 で示すように試験管内 DNA 複製を行った産物を、先ほど記述した酵素学的に一本鎖環状 DNA を調製する方法と同様に、しかしニックカセットの *Sty*I と *Xba*I を利用して鋳型鎖側にニックを導入することで新生鎖のみからなる一本鎖環状 DNA を調製した。この標品で宿主を形質転換することで、細胞内で全ての前変異が固定され検出した変異の個々を等価に比較することが可能となる。

大腸菌の野生型および校正機能欠損型 DNA pol III HE で複製したヘテロ二重鎖標品より新生鎖側の一本鎖環状 DNA を調製し、その変異頻度を測定したところ前変異を固定したときの変異頻度 (後述する; 第五章を参照) (Fujii *et al.*, 投稿準備中) とほぼ同じ値が得られ、試験管内で誘発された複製エラーを全て検出できることが示唆された。ここで検出した複製エラーを評価する際、最も良い比較の対照は試験管内で複製したヘテロ二重鎖標品より調製する鋳型鎖側の一本鎖環状 DNA である。そこで、ヘテロ二重鎖標品より鋳型鎖側の一本鎖環状 DNA を調製し、その変異頻度を測定したところ野生型よりも校正機能欠損型標品から調製した一本鎖環状 DNA 標品の方が変異頻度が高く、その変異頻度は野生型 DNA pol III HE で複製したヘテロ二重鎖標品より調製した新生鎖の一本鎖環状 DNA 標品よりも高かった (data not shown)。一本鎖環状 DNA に比べて二本鎖環状 DNA の方が数十倍形質転換効率が高いので、恐らく処理しきれない二本鎖環状 DNA が数 % 混入している結果であろうと思われる。この結果から、新生鎖側の一本鎖環状 DNA 標品にも同様に二本鎖環状 DNA が数 % 混入していることが予想され、検出した変異の個々を等価に比較することが困難であると思われるので、一本鎖環状 DNA 標品を用いて複製エラーを検出する方法を諦めた。

4. 新生鎖 SS DNA → OC DNA により複製エラーを検出する二連続 ssDNA → dsDNA 複製系

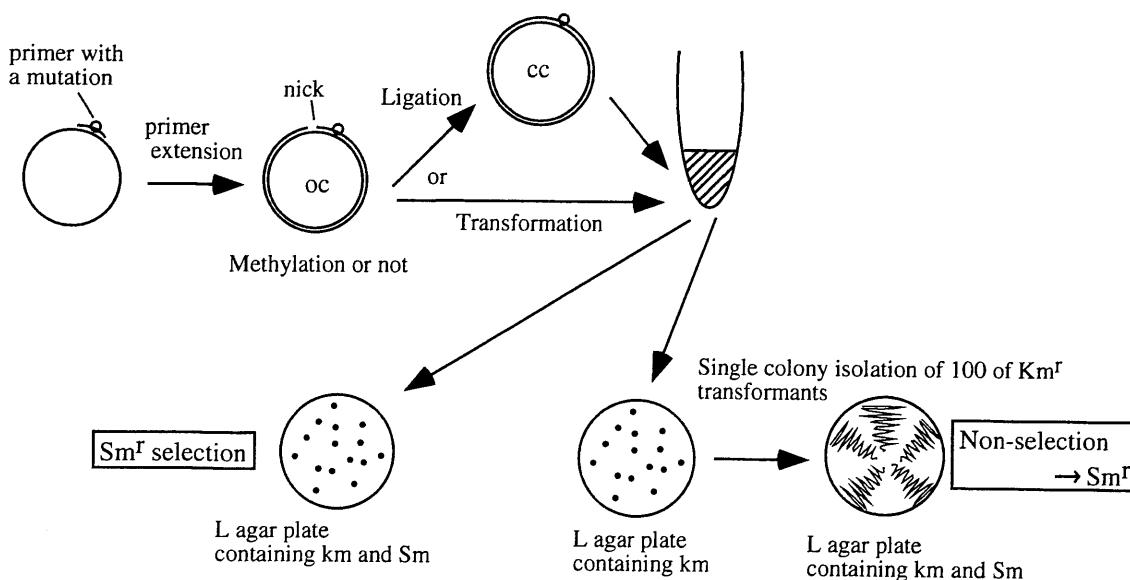
一本鎖環状 DNA 標品を用いて変異を検出する際、僅かな二本鎖環状 DNA の混入

でも形質転換効率の違いから変異頻度全体に影響を及ぼすことが予想されるので、複製エラーを含む DNA 標品が二本鎖環状 DNA になるような実験系の開発を試みた。試験管内で複製を行った産物から上記と同様に新生鎖の一本鎖環状 DNA を調製後、複製エラーを含むこの標品を鋳型として DNA pol III HE を用いてもう一度プライマー伸長反応を行う。このように二本鎖環状 DNA に変換することで、一回目のプライマー伸長反応により生じた前変異（ヘテロ二重鎖）を全て試験管内で変異（ホモ二重鎖）として固定する（図 4-1）。この系において問題となるのが、前変異を固定するための二回目のプライマー伸長反応でも、複製酵素により変異が誘発されヘテロ二重鎖が生じることである。そこで、ヘテロ二重鎖の変異頻度への寄与を調べることにした。

鋳型として pFS4 を酵素学的に一本鎖環状 DNA に変換し、*rpsL* 領域にトランジション型あるいは二塩基フレームシフト型の変異をもたせたプライマーを貼り付け伸長反応させ、人工的にヘテロ二重鎖をもつプラスミド DNA の Sm^r になる検出効率を調べた（表 4-3）。フルメチル標品は、変異をもたせた鎖により数倍の差が認められたが、検出効率は 4 ~ 20 % ぐらいであった。鋳型鎖のみがメチル化されたヘミメチル標品は、トランジション型および二塩基フレームシフト型共に 0.4 % 以下の検出効率で、変異をもつ鎖側の近くにニックがあってもなくとも差は観察されなかった。

直接 Sm を含むプレートでフルメチル化したヘテロ二重鎖標品を選択したとき、まるで形質転換後にヘテロ二重鎖が野生型 (Sm^s) *rpsL* の方向に特異的な修復を受けているような結果であった（表 4-3）。形質転換体を直接 Sm を含むプレートで選択した場合、野生型 (Sm^s) と変異型 (Sm^r) *rpsL* をもつプラスミドが混在した形質転換体における Sm^r になる割合と、形質転換後にヘテロ二重鎖が野生型あるいは変異型 *rpsL* に修復される程度の両方を反映して Sm^r として検出されると考えられる。そこで、形質転換体の内どのくらいの割合で変異型の *rpsL* をもつプラスミドを保持しているのかを調べるために、形質転換体を Sm を含まないプレートに播きコロニーを形成させた後、各コロニーを Sm を含むプレートに播いて Sm^r を示す割合を調べた。表 4-3 で示すように、フルメチル標品は変異を導入した鎖や変異の種類によって差はあるのだが、何れも直接 Sm を含むプレートで選択した場合に比べて高い値を示した。また、相補的なミスマッチをもつ標品 (TS と NT) の検出効率を足すと 75 ~ 100 % であり、形質転換後にフルメチル標品はほとんど修復を受けていないことを示す。よって、形質転換後に直接 Sm^r になる細胞の割合が低く出たのは、細胞内における野生型と変異型の *rpsL* をもつプラスミドのセグリゲーションのパターンが個々の細胞で不均一であるためなのだろう。一方、ヘミメチル標品で形質転換した菌液を Sm を含まないプレートに播きコロニーを形成させた後、各コロニーを Sm を含むプレートに播いて Sm^r を示す割合を調べたところ、ほとんどが Sm^s であった（表 4-3）。よって、ヘミメチル標品では、宿主に形質転換後すぐにミスマッチ修復系により修復されるため、直接 Sm を含むプレートにまいても 0.4 % 以下

A.



B.

ミスマッチ ^{*1}	Sm ^r 選択 (%)				非選択 → Sm ^r 選択 (%)			
	ヘミメチル		フルメチル		ヘミメチル		フルメチル	
	TS ^{*2}	NT	TS	NT	TS	NT	TS	NT
トランジション	0.13	0.30	5.7	16	1.0	2.0	43	61
-2 フレームシフト	<0.24	0.22	3.5	19	<1.0	<1.0	27	48
-2 フレームシフト (CC)	0.36	<0.38	ND	ND	<1.0	<1.0	ND	ND

*1, トランジションは *rpsL* の 242 番目の A:T → G:C。-2 フレームシフトは *rpsL* の 110~115 番目の 3(TA) → 2(TA)。CC と記した試料以外は、ニックをもつ OC DNA である。

*2, TS は、*rpsL* の転写鎖側に変異が導入されている。
NT は、*rpsL* の非転写鎖側に変異が導入されている。

表 4-3 人工的に構築したヘテロ二重鎖標品で形質転換した宿主の Sm^r になる割合

pFS4 由来の一本鎖環状 DNA を鋳型として *rpsL* の特定の部位がミスマッチになるようにしたプライマーを用いてプライマー伸長反応を行う。このように構築したヘテロ二重鎖標品で MC1061 を形質転換した。Sm^r 選択は形質転換体を Km と Sm を含むプレートに播いたときの生菌数を Km を含むプレートに播いたときの生菌数で割った値である。非選択 → Sm^r は形質転換体を Km を含むプレートに播き、生えてきたコロニーを無作為に 100 個選び Km と Sm を含むプレートにシングルコロニーアイソレーションして、生えてきたコロニーの割合である。ND は、変異頻度を決定していない。

しか抵抗性を示さなかったと思われる。

これらの結果から前変異がヘテロ二重鎖のとき、過去に報告されている結果 (Lahue *et al.*, 1989; Parker & Marinus, 1992) と一致して、ミスマッチ修復系が修復する型のヘテロ二重鎖であればヘミメチルの状態ではほとんど修復される。そこで、図 4-1 で示すように前変異を固定した最終標品では、検出したい前変異をもつ鎖側 (一回目のプライマー伸長反応で複製した新生鎖側) のみがメチル化されたヘミメチルの状態にすることで、前変異の固定の際に生じるヘテロ二重鎖の変異頻度への寄与はほとんど無視できることが示唆される。しかし、前変異の固定の際に生じるヘテロ二重鎖の内、ミスマッチ修復系が修復できない型のヘテロ二重鎖が生じた場合、変異として有意な頻度で検出される可能性がある。そこで、このような変異に対してのヘテロ二重鎖の寄与を推定するために、一回目のプライマー伸長反応で複製したヘテロ二重鎖標品 (鋳型鎖のみがメチル化されたヘミメチルの状態) の一部を分取し、調べることにした。例えば、固定した標品の + で検出された変異は、一回目のプライマー伸長反応では SS+ を鋳型として複製しているので新生鎖側は SS- となり、前変異を固定する二回目のプライマー伸長反応では新生鎖の SS- を鋳型として用いている。よって、一回目のプライマー伸長反応で SS- を鋳型として複製したヘテロ二重鎖標品の - が比較の対照となる。また、先に述べたように、前変異がヘテロ二重鎖のとき、ミスマッチ修復系が修復する型のヘテロ二重鎖であればヘミメチルの状態ではほとんど修復されるので、例えば、固定した標品の + とヘテロ二重鎖標品の + で検出されたこの様な型の変異を相互に比較することで、一回目のプライマー伸長反応で誘発された前変異が正常な塩基間に由来した型であるかの判断が出来る。

5. 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出した変異の発生傾向

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で大腸菌の DNA pol III HE を用いて誘発された変異の発生頻度を調べたところ、前変異を固定したときにどちらの鎖を鋳型にしても 1.5×10^{-4} の変異頻度で、鋳型である SS+(-) に比べて 5 ~ 6 倍の変異頻度の上昇が観察された (表 4-1)。また、この変異頻度は、*oriC* 系の結果 (1.9×10^{-4}) とほぼ同水準で妥当な値であった。一方、前変異がヘテロ二重鎖の標品では、鋳型である SS+(-) に比べて 2 倍前後の変異頻度の上昇が観察された (表 4-1)。固定した標品とヘテロ二重鎖標品の変異頻度の上昇がどのような変異に起因しているのかを調べるために、Sm プレート上に生えた変異体の内、無作為に 200 個を選び塩基配列レベルで変異の種類と生じた部位を決定した (表 4-2、図 4-3)。前変異を固定した標品では、+、- によらず塩基置換が半分以上を占め、次いで +、- によって差はあるがフレームシフトと欠失が続いた。ヘテロ二重鎖標品でも検出された変異の傾向は似ており、塩基置換が半分以上を占め、次いでフレームシフトが続いた。

21.

上段; Heteroduplex +
下段; Fixed +

3' - GATTTTGGTC CTCGATAAAT TACCGTTGTC AATTGGTCGA CCATGCGTTT GGTGCACGAG CGTTTCAACG CTTTTCGTGTG 60

CACGGACGCG ACCTTCGTAC GGGCGTTTTT GCACCGCATA CATGAGCACA TATATGATGG TGAGGATTTT TTGGCTTGAG 140

GCGCGACGCA TTTCATACGG CACAAGCAGA CTGATTGCCA AAGCTTCACT GAAGGATGTA GCCACCATT CCAGTGTG 220

ACGTCCTCGT GAGGCACTAG GACTAGGCAC CGCCAGCACA ATTTCTGGAG GGCCCAAG CAATGGTGTG GCATGCACCA 300

CGCGAAGTGA CGAGGCCGCA ATTTCTGGCA TTCGTCCGAG CAAGGTTTCAT ACCGCACTTC GCAGGATTCC GAATT -5' 375

3. 上段: Heteroduplex -
下段: Fixed -

5' - C T A A A A C C A G G A G C T A T T T A A T G G C A A C A G T T A A C C A G C T G G T A C G C A A A C C A C G T G C T C G C A A A G T T G C G A A A A G C A A C 60

GTG C C T G C G C T G G A A G C A T G C C G C A A A A A C G T G G C G T A T G T A C T C G T G T A T A T A C T A C C A C T C C T A A A A A A C C G A A C T C 140

C G C G C T G C G C T A A A G T A T G C C G T G T T C C G T C T G A C T A A C G G T T T C G A A G T G A C T T C C T A C A T C G G T G G T G A A G G T C A C A A C C 220

T G C A G G A G C A C T C C G T G A T C T G A T C C G T G C G G T C G T G T T A A G A C C T C C G G G T G T T C G T T A C C A C A C C G T A C G T G G T 300

G C G C T T G A C T G C T C C G G C G T T A A G A C C G T A A G C A G G C T C G T T C C A A G T A G C G T C C T A A G G C T T A A -3' 375

塩基置換になるミスペアは12種類の組み合わせがある。*rpsL* 配列中で Sm' になる塩基置換はその12種類全てを検出でき、それぞれ7～18ヶ所の検出可能部位が存在し、SS+(-) 各鋳型中に170の塩基置換が検出可能である (data not shown)。表4-4で示したようにヘテロ二重鎖標品では G→A と C→A (変異は新生鎖側での変化を示す) が大半を占めているのに対して、固定した標品ではほぼ同水準の変異頻度でそれ以外に C→T、G→T、T→G も高頻度に検出された。また、G→A と C→A の検出された部位はホットスポットが観察されることから (図4-3)、変異を誘発しやすい配列の存在を示唆する。

Sm' となる一塩基フレームシフトでこれまでに見いだされているエンドポイントは *rpsL* 配列の全長375塩基の内、終止コドンから48塩基上流で-1フレームシフトが見つかる。その場合、終止コドンから7番目のアミノ酸をコードしているコドンが新たに終止コドンになった結果、Sm' になったと思われる。よって、*rpsL* コーディング配列の90%以上で (SS+、- 各鋳型中に約340) フレームシフトの検出が可能であると思われる。表4-5で示したように、+か-にもよるがヘテロ二重鎖標品で高頻度に検出された 2G→G、2C→C、3C→2C、ノンランでの欠失は、固定した標品でもほぼ同水準に検出された。固定した標品でヘテロ二重鎖標品よりも明らかに高頻度に検出されたのは、6A→5A、3G→2G、6A→7A であった。

6. 高頻度に検出された塩基置換は損傷塩基に起因している

固定した標品で高頻度に検出された塩基置換は、G→A、C→A、C→T、G→T、T→G である (表4-4)。この内、固定した標品とヘテロ二重鎖標品ではほぼ同水準の変異頻度で G→A と C→A が検出されたので、これらの変異は損傷塩基に起因して誘発されたものと示唆される。ヘテロ二重鎖標品で検出された G→A と C→A はその中間体である C:A、G:A ミスペア (鋳型鎖: 新生鎖) が形質転換後にミスマッチ修復系により修復されないペアであるので、本実験系で用いた鋳型 DNA 上あるいは dNTP プール中にも内在していると推定される損傷塩基 (Tajiri *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998) に起因していると思われる。このような損傷塩基の候補として、C:A は鋳型の C が脱アミノ化して U になった結果 (Lindahl & Nyberg, 1972)、G:A は鋳型の G が酸化されて 8-oxo-dG (Tajiri *et al.*, 1995) 等に起因するのかもしれない。また、先に述べたように Treated CC と比較して SS+(-) でも G→A と C→A が高頻度に検出されており (表4-4)、この内 C→A の変異頻度は複製産物 (固定した標品とヘテロ二重鎖標品) と SS+(-) でほぼ同水準であることから、複製産物で検出された C→A は SS+(-) 中に内在している損傷塩基に起因して誘発されたものであると示唆される。一方、G→A の変異頻度は複製産物と比較して SS+(-) では 1/5 ～ 1/13 しか検出されなかったのだが、検出された部位 (SS+ で 17 例、SS- は 8 例) は 1 例をのぞき完全に一致していた。上述したように鋳型上の C

		変異頻度 (X 10 ⁻⁶)						
変異の型	CCC	Treated CC	SS		Heteroduplex		Fixed	
			+	-	+	-	+	-
トランスバージョン								
C → A	0.81	0.51	6.7	1.4	8.4	2.6	17	4.5
G → T			0.26	1.1	<0.22	0.33	1.5	11
A → C	0.22	<0.046	0.26	<0.28	<0.22	<0.33	<0.75	0.75
T → G			0.26	0.28	0.43	0.33	6.0	5.3
A → T	0.90	0.28	1.5	<0.28	0.86	<0.33	0.75	<0.75
T → A			<0.26	2.0	<0.22	1.3	<0.75	0.75
G → C	0.090	0.23	0.26	0.28	<0.22	0.33	0.75	<0.75
C → G			1.0	0.28	0.86	0.99	2.3	<0.75
トランジション								
A → G	0.22	0.046	<0.26	<0.28	0.22	<0.33	3.0	0.75
T → C			0.77	<0.28	0.22	0.33	0.75	0.75
G → A	0.13	0.55	4.4	2.2	22	28	25	37
C → T			0.52	0.28	<0.22	<0.33	24	17

表 4-4 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出された塩基置換

CCC、Treated CC で検出された変異は、誘発された変異の由来が不明なので相補的な関係になる変異のタイプの間に変異頻度を記載した（例えば、G:C → T:A では G → T と C → A の間に記載）。SS で検出された変異は、形質転換後に SS → RF 変換される際の新生鎖側での変化として記載した。ヘテロ二重鎖標品と固定した標品で検出された変異は、一回目のプライマー伸長反応での新生鎖での変化を表す。

変異頻度 (X 10 ⁻⁶)								
変異の型	CCC	Treated CC	SS		Heteroduplex		Fixed	
			+	-	+	-	+	-
2塩基のラン								
-1								
2A → A	<0.045	<0.046	0.25	0.85	<0.22	0.33	1.5	<0.75
2T → T			<0.25	<0.28	<0.22	0.66	<0.75	<0.75
2G → G	<0.045	1.9	0.75	1.7	1.1	0.33	1.5	1.5
2C → C			0.50	2.8	0.65	6.6	<0.75	14
3塩基以上のラン								
-1								
5A → 4A	0.13	0.046	-	0.57	-	0.66	-	2.3
5T → 4T			<0.25	-	0.22	-	<0.75	-
6A → 5A	<0.045	0.23	-	0.85	-	0.33	-	4.5
6T → 5T			0.50	-	<0.22	-	0.75	-
3G → 2G	<0.045	1.0	1.0	0.85	<0.22	<0.33	0.75	2.3
3C → 2C			0.75	1.7	0.86	1.7	0.75	2.3
+1								
5A → 6A	0.045	0.14	-	<0.28	-	<0.33	-	0.75
5T → 6T			<0.25	-	<0.22	-	0.75	-
6A → 7A	<0.045	0.046	-	<0.28	-	<0.33	-	2.3
6T → 7T			0.25	-	0.22	-	1.5	-
ノンラン								
-1								
A	0.045	0.28	0.75	2.6	1.3	0.99	3.8	0.75
T			<0.25	1.7	0.43	1.7	<0.75	3.8
G	<0.045	1.3	0.75	1.7	1.3	0.66	<0.75	5.3
C			0.25	1.1	0.65	2.6	1.5	5.3
その他	0.14	0.19	0.75	0.57	0.22	0.33	<0.75	<0.75

表 4-5 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出された一塩基フレームシフト

-は検出できない変異を表す。表の見方は表 4 と同じである。

が脱アミノ化した U に起因して $G \rightarrow A$ が誘発されたとすれば、SS+(-) で低い変異頻度であったのは、形質転換後に Ung の働きにより U が取り除かれ、AP 部位が生じ $SS \rightarrow RF$ 変換を妨げられた結果である (Warner & Duncan, 1978; Schaaper & Loeb, 1981)。一方、ヘテロ二重鎖標品では U に対しては常に A がペアーを組んでいるので形質転換後に Ung や dsUdg (Gallinari & Jiricny, 1996) の働きは逆に変異を固定する方向に働いた結果である。

複製産物で検出された $G \rightarrow A$ と $C \rightarrow A$ は損傷塩基に起因して誘発されたものと示唆されるが、このような観点で固定した標品で高頻度に検出された $C \rightarrow T$ 、 $G \rightarrow T$ の発生原因を考えると、それぞれ $G \rightarrow A$ 、 $C \rightarrow A$ と相補的な関係になる。よって、一回目のプライマー伸長反応の際に誘発された複製エラー (前変異) を固定した結果検出できたというよりも、前変異を固定するための二回目のプライマー伸長反応を行うために調製した新生鎖の一本鎖環状 DNA 上に生じた損傷塩基に起因している可能性が高い。事実、同じ原因に起因しているとしたら、鋳型間の変異の発生傾向の違い (表 4-4) と検出された部位が $C \rightarrow T$ 、 $G \rightarrow T$ の検出部位とほぼ完全に一致しかつ部位間の発生傾向の類似性 (図 4-3) を説明できる。このように、固定した標品で高頻度に検出された $G \rightarrow A$ 、 $C \rightarrow A$ 、 $C \rightarrow T$ 、 $G \rightarrow T$ は、鋳型上に生じた損傷塩基によって誘発されたものと示唆される。残りの固定した標品で高頻度に検出された $T \rightarrow G$ に関しても、校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出された変異頻度 (第五章を参照) (Fujii *et al.*, 投稿準備中) とほぼ同じなので、複製エラーというよりも損傷塩基に起因している可能性が高い。しかし、 $T \rightarrow G$ は固定した標品と比べてヘテロ二重鎖標品では低い変異頻度であることから、 $T \rightarrow G$ になるミスペアーをもったヘテロ二重鎖標品では、A:G ミスペアー (鋳型鎖: 新生鎖) の A は正常な塩基であると思われる。よって、 $T \rightarrow G$ は、dNTP プール中に内在しているであろう損傷塩基 (例えば、8-oxo-dGTP) (Maki & Sekiguchi, 1992) に起因して誘発されたものと推測される。また、塩基置換の変異頻度全体に占める割合は低いですが + の標品で検出された $C \rightarrow G$ の変異頻度は、SS+ とほぼ同水準なので鋳型となる一本鎖環状 DNA 上に生じた損傷塩基 (例えば、8-oxo-dG) (Zhang *et al.*, 1998) に起因している可能性が高い。

7. 一塩基フレームシフトの発生傾向

固定した標品で検出された一塩基フレームシフトの内、同一の変異の型で 2 例以上検出した型は、ノンランでの欠失、ランでの G と C の欠失、 $2A \rightarrow A$ 、 $5A \rightarrow 4A$ 、 $6A \rightarrow 5A$ 、 $6A \rightarrow 7A$ 、 $6T \rightarrow 7T$ である (表 4-5)。この内、ノンランでの欠失、ランでの G と C の欠失、 $2A \rightarrow A$ は、ヘテロ二重鎖標品もしくは SS+(-) でも同水準の変異頻度で検出されていることから、塩基置換の場合と同様に SS+(-) 中に内在している損傷塩基に起因して検出されたものと示唆される。残りの $5A \rightarrow 4A$ 、 $6A$

→ 5A、6A → 7A、6T → 7T に関して、ヘテロ二重鎖標品と SS+(-) の発生傾向と比較すると、5A → 4A と 6A → 5A は損傷塩基に起因して検出された可能性があるが、6A → 7A と 6T → 7T は正常な塩基間に由来する複製エラーを反映して検出されたものと思われる。

塩基置換の場合と同様に、固定した標品で検出された一塩基フレームシフトも大部分が損傷塩基に起因して誘発されたことが示唆される。一塩基フレームシフトを誘発する変異原は、カーシノゲンである AAF 等のアダクトによる塩基の修飾が知られているが (Hoffmann & Fuchs, 1997; Wagner & Fuchs, 1997)、自然 DNA 損傷に起因して一塩基フレームシフトを誘発する損傷塩基はほとんど知られていない

(Wang *et al.*, 1998; Lyons-Darden & Topal, 1999)。本実験系で調製した鋳型となる一本鎖環状 DNA 上には、酸化損傷を受けた塩基、脱プリン/ピリミジンによって生じる AP 部位、脱アミノ化した塩基等の損傷塩基が内在していると考えられるので、これらの自然 DNA 損傷に起因した損傷塩基が塩基置換だけではなく一塩基フレームシフトも誘発しているものと思われる。しかし、塩基置換と一塩基フレームシフトが検出された部位 (図 4-3) はほとんどの場合異なっているので、塩基置換と一塩基フレームシフトを誘発する損傷塩基は異なる、あるいは同一の損傷塩基だが周辺の配列に依存して塩基置換と一塩基フレームシフトのどちらが誘発されやすいのかが決まるのかもしれない。

8. 複製エラーに依存して検出された 2 塩基以上の欠失の発生傾向

固定した標品とヘテロ二重鎖標品で検出された 2 塩基以上の欠失は、それぞれ + が 74 例と 10 例、- が 34 例と 41 例である (表 4-2)。両標品とも 2 塩基以上の繰り返し配列を介して誘発されたと考えられる型が 90 % 以上を占めていた (data not shown)。先に述べたように、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で複製反応以外の処理を行っても特定の変異の型 (2(TGATCC) → 1(TGATCC)) を除き、2 塩基以上の欠失の変異頻度の上昇が観察されないことから (表 4-2)、今回検出された 2 塩基以上の欠失の由来が特定の変異の型を除き、複製反応以外の段階でアーティファクトとして生じたとは考えにくい。また、同じ野生型 DNA pol III HE を用いた *oriC* 系でも 2 塩基以上の欠失が有意な頻度で検出されている (第三章を参照) ので、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出された 2 塩基以上の欠失は、主に DNA pol III HE によって誘発された複製エラーを反映していると考えられる。

異なる標品間で検出された主要な変異を表 4-6 に示した。固定した標品の + と - で検出された変異の発生傾向は、誘発された変異の型によって、+ か - のどちらか一方で高頻度に検出される型が観察され、変異誘発における鋳型鎖間の塩基配列特異性が示唆される。また、ヘテロ二重鎖標品でも、固定した標品で検出された変異の発生傾向と似た面があり、+ か - のどちらか一方で高頻度に検出される型が観察され

変異の生じた部位	変異の種類	欠失の大きさ (bp)	変異頻度 ($\times 10^{-7}$)					
			Heteroduplex		Fixed		Heteroduplex の検出効率 (%)	
			+	-	+	-	+	-
-353~649	AGAT ~ ATAA → AGATAA	1002	<2.2	<3.3	53	<7.5	<4.2	-
-242~653	TGATAAAA ~ ATAAAAACG → TGATAAAAACG	895	<2.2	53	340	38	<0.65	140
269~328	GTGTAAAGACC ~ GTTAAAGACCGT → GTGTAAAGACCGT	60	6.6	<3.3	<7.5	7.5	>88	-
110~115	3 (TA) → 2 (TA)	2	<2.2	53	110	60	<2.0	88
236~247	2 (TGATCC) → TGATCC	6	2.2	20	<7.5	23	-	87
275~278	2 (GT) → GT	2	2.2	<3.3	<7.5	38	>29	<8.7
2塩基以上の欠失で上記の欠失が占める割合 (%)			50	93	91	65		

表 4-6 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出された二塩基以上の欠失

ヘテロ二重鎖の検出効率は、DNA pol III HE を用いて検出されたヘテロ二重鎖標品の各変異のタイプを前変異を固定した標品での各変異のタイプで割った値である。各変異のタイプは、一回目のプライマー伸長反応での新生鎖での変化を表す。

た。

表4-6で示したように、固定した標品で検出された2塩基以上の欠失の内、3(TA) → 2(TA)と895塩基の欠失が+、-両標品で高頻度に検出され、ヘテロ二重鎖標品でも-で高頻度に検出された。しかし、これら2種類の変異が固定される前のヘテロ二重鎖では、形質転換後にミスマッチ修復系(MutHLS系)によって3(TA) → 2(TA)になるミスペアーは修復されるが、895塩基の欠失になるミスペアーは修復できないと思われる。よって、固定した標品で検出された2塩基以上の欠失を評価する際、比較の対照となるヘテロ二重鎖標品で検出された変異が、形質転換後にミスマッチ修復系(MutHLS系)で修復されるかされないかで固定した標品で検出された2塩基以上の欠失の捉え方が異なることになる。そこで、2塩基以上の欠失の内、主に代表例として3(TA) → 2(TA)と895塩基の欠失について異なる項で以下に述べる。

9. 3(TA) → 2(TA)の誘発は鋳型鎖によって由来が異なる

3(TA) → 2(TA)の二塩基フレームシフト(-TA)は、表4-3で示したようにヘミメチルのヘテロ二重鎖では、形質転換後にミスマッチ修復系により修復され0.4%以下しかSm'を示さない。表4-6で示すように、固定した標品の+で検出された-TAの変異頻度は 110×10^{-7} であった。ヘテロ二重鎖標品の-で検出された-TAの変異頻度は 53×10^{-7} であったので、固定した標品の+で検出された-TAの変異頻度の内、 53×10^{-7} 分は二回目のプライマー伸長反応で生じた変異を反映しているのかもしれない。その場合、鋳型がSS+のとき一回目のプライマー伸長反応で生じた-TAの変異頻度は 57×10^{-7} となる。ヘテロ二重鎖標品の+では-TAは検出されず変異頻度は 2.2×10^{-7} 以下となるので、鋳型がSS+のときに誘発された-TAの内、ヘテロ二重鎖標品では-TAとして検出できる効率は3.9%以下であると推定される。この様に表4-3の実験結果と一致して、ヘテロ二重鎖標品で-TAになるミスペアーはほとんど修復されているので、固定した標品の+で検出した-TAの少なくとも半分は複製エラーを反映していると思われる。一方、表4-6で示すように、固定した標品の-とヘテロ二重鎖標品の-で検出した-TAの変異頻度は、同水準に高頻度で検出され、固定した標品に比したヘテロ二重鎖標品の検出効率は88%であった。よって、鋳型がSS-のとき、一回目のプライマー伸長反応で生じた-TAになるミスペアーを持ったヘテロ二重鎖は、形質転換後にミスマッチ修復系による修復を受けていないので、損傷塩基に起因して誘発されたことが示唆される。表4-3で示したように、-TAになるミスペアーを持ったヘテロ二重鎖のSm'になる検出効率を求めた実験より、フルメチル化してミスマッチ修復系が働かないようにしても検出効率は20%以下である。よって、鋳型がSS-のときヘテロ二重鎖標品で検出した-TAになるミスペアーの鋳型鎖側には野生型(Sm')になる配列が存在していないことを示唆す

るので、-TA を誘発する損傷塩基は dNTP プール中に由来するのではなく、鋳型鎖上の損傷塩基によって誘発されたものと推定される。鋳型が SS- のとき、損傷塩基によって -TA が誘発されたとすれば、プラスミドを構成する二本鎖の内、この損傷塩基は SS+ よりも 24 倍以上 SS- に内在していることになる。また、このような鋳型鎖間での損傷塩基のバイアスは、塩基置換（表 4-4）と一塩基フレームシフト（表 4-5）でもあると思われるので、損傷の受けやすさ受けにくさは周辺の塩基配列に依存していると考えられる。

10. 大きな欠失になるミスペアーを持ったヘテロ二重鎖は形質転換後、鋳型鎖によって変異として固定される割合が異なる

大きな欠失で特に 895 塩基の欠失は、上記の 3(TA) → 2(TA) の結果と類似した検出傾向が観察された。表 4-6 で示すように、固定した標品の + と比べたヘテロ二重鎖標品の + での 895 塩基の欠失の検出効率、0.65 % 以下であった。一方、固定した標品の - とヘテロ二重鎖標品の - で検出した 895 塩基の欠失の変異頻度は、同水準に高頻度で検出された。表 4-3 で示したように、ヘテロ二重鎖標品をフルメチル化してミスマッチ修復系が働かないようにして、野生型 (Sm^s) と変異型 (Sm^r) *rpsL* が 1 細胞内に混在している場合、 Sm^r の表現型を示すのは 4 ~ 20 % ぐらいである。よって、形質転換後に大きな欠失もそのまま修復を受けず残っていれば、固定した標品に比べたヘテロ二重鎖標品での検出効率は 4 ~ 20 % ぐらいであると予想される。ところが、表 4-6 で示すように 895 塩基の欠失になるミスペアーを持ったヘテロ二重鎖標品は、形質転換後に鋳型が SS+ で誘発されたヘテロ二重鎖では野生型 (Sm^s)、鋳型が SS- では変異型 (Sm^r) *rpsL* の方向に、特異的な修復を受けているような結果であった。

CCC、Treated CC、SS+(-) で大きな欠失は、30 種類の型 (data not shown) で 33 例（表 4-2）検出されているが、複製産物（固定した標品とヘテロ二重鎖標品）で検出された大きな欠失（16 種類の型で 92 例）は、その何れの型とも異なっていたので、複製産物で検出された大きな欠失が損傷塩基によって誘発され、強力なホットスポットが生じたとは考えにくい。895 塩基の欠失になるミスペアーを持ったヘテロ二重鎖標品は、3(TA) → 2(TA) になるミスペアーを持ったヘテロ二重鎖標品の Sm^r になる検出傾向と似ていても（表 4-6）、異なる原因に起因して形質転換後に一方的にどちらかの鎖に固定していると思われる。よって、メチル化によって修復の方向性が決まるミスマッチ修復系とは別の、ループアウトした構造を認識し（例えば、SbcCD）（Connelly et al., 1998）、修復の方向性を決めるような修復系が存在するのかもしれない。大きな欠失の際に生じるループアウトした一本鎖は二次構造を形成すると思われるが、相補的な一本鎖どうしても配列が異なるために生じる二次構造の形と安定性が異なると推定されるので、この違いが細胞内における未知の修

復系の修復効率に影響を及ぼしているのかもしれない。表 4-6 で示したその他の欠失も、標品によって検出数が少ない型があるものの、全般的な標品間の変異の検出傾向が 895 塩基の欠失と似ていたので、895 塩基の欠失で観察された事象は特殊な例ではなく普遍性のある事象なのかもしれない。

III. 考察

1. 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系の特徴と問題点

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系（図 4-1）は、従来のプライマー伸長反応系やギャップフィリング系とは異なる 3 つの特徴がある。1）細胞内で増幅させたプラスミド DNA を試験管内で酵素学的に一本鎖環状 DNA に変換するため、従来のファージミドを介した生物学的な一本鎖環状 DNA の調製法に比べて一桁低いバックグラウンド変異をもつ鋳型 DNA 標品の調製が可能である。2）プラスミド DNA を試験管内で酵素学的に一本鎖環状 DNA に変換するため、同じプラスミド DNA から異なる 2 種類の鋳型 DNA 標品（SS+ と SS-）の調製が可能である。3）一回目のプライマー伸長反応で誘発された複製エラー（前変異）は、二回目のプライマー伸長反応を行うことで全て変異として固定されるので、固定した標品で検出した変異の個々を等価に扱うことが出来る。

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で、大腸菌の DNA pol III HE により誘発された前変異を固定した標品は、鋳型である SS+(-) 標品に比べて 5 ～ 6 倍の変異頻度の上昇が観察されたので（表 4-1）、試験管内 DNA 複製反応に依存した変異を検出できた。しかし、固定した標品で検出された変異を塩基配列レベルで調べたところ、損傷塩基に起因して誘発されたと思われる変異が多数あった。よって、固定した標品で検出された変異が、正常な塩基間に由来する DNA pol III HE に依存した複製エラーであるか、損傷塩基に起因して誘発された変異であるのかを区別できるのかが重要な問題となる。

2. 正常な塩基間に由来する複製エラーと損傷塩基に由来する変異は区別できる

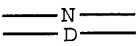
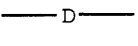
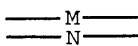
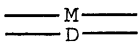
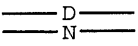
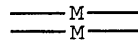
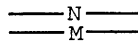
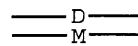
表 4-1 で示した DNA 標品（Treated CC、SS、ヘテロ二重鎖標品、固定した標品）で、形質転換後に検出された変異は、1）変異が検出された部位は、各 DNA 標品中でどのような状態であったのか、2）形質転換後にその部位が修復を受けるか受けないか、を反映して Sm^r 形質転換体として検出される。1）は、Treated CC では正常な塩基と損傷塩基のミスペアー、SS では損傷塩基、ヘテロ二重鎖標品と固定した標品では正常な塩基間の（ミス）ペアーと正常な塩基と損傷塩基の（ミス）ペアー

ーが考えられる。2) は、宿主に内在するミスマッチ修復系や損傷塩基を修復する修復系の修復効率に依存している。そこで、Sm^r になりうる (前) 変異をもった DNA 標品で形質転換した宿主が、どのくらいの割合で Sm^r 形質転換体として検出されうるのかを概念的に示したのが表 4-7 である。表 4-7 で示した Sm^r 形質転換体として検出される割合は、以下の推測に基づいて構成した。損傷塩基をもった一本鎖環状 DNA (SS) は、形質転換後に損傷塩基が修復されなければ 100 % 検出され、修復されれば修復される割合に応じて 0 ~ 100 % の間で検出効率に変化する。二本鎖環状 DNA では、両鎖共に変異型 (Sm^r) *rpsL* (正常な塩基どうしのペアー、正常な塩基と損傷塩基のペアー) の場合、形質転換後に 100 % 検出される。野生型 (Sm^s) と変異型 (Sm^r) *rpsL* (正常な塩基どうしのペアー、正常な塩基と損傷塩基のペアー) で構成された二本鎖環状 DNA では、形質転換後にミスマッチや損傷塩基を修復する修復系の修復効率に影響される。表 4-3 で示したように、ヘテロ二重鎖標品をフルメチル化してミスマッチ修復系が働かないようにしたとき、Sm^r の表現型を示すのは 4 ~ 20 % ぐらいであるので、形質転換後にミスマッチや損傷塩基がそのまま修復を受けず残っていて、野生型 (Sm^s) と変異型 (Sm^r) *rpsL* が 1 細胞内に混在している場合、Sm^r の表現型を示すのは 4 ~ 20 % ぐらいである。一方、形質転換後にミスマッチや損傷塩基が修復される場合、正常な塩基間で構成されたミスペアーをもった標品は 0.4 % 以下の検出効率で、損傷塩基と正常な塩基で構成されたペアーをもった標品は、損傷塩基を修復する効率にも依るが 0 ~ 20 % の間で検出効率に変化する。

そこで、各 DNA 標品 (Treated CC、SS、ヘテロ二重鎖標品、固定した標品) で検出された変異を表 4-7 に基づいて解析することにより、前変異を固定した標品で検出した変異の由来が、正常な塩基間に由来する DNA pol III HE に依存した複製エラーであるのか、損傷塩基に起因して誘発された変異であるのかを区別できる。

3. 前変異を固定した標品で検出された変異の発生傾向

表 4-7 に基づいて前変異を固定した標品で検出された変異の内 (表 4-2)、主に損傷塩基に起因して検出された変異の型は、塩基置換が G → A、C → A、C → T、G → T、T → G、C → G であり (表 4-4)、一塩基フレームシフトはノンランでの欠失、ランでの G と C の欠失、2A → A であり (表 4-5)、- の標品で検出された 3(TA) → 2(TA) と 2(TGATCC) → 1(TGATCC) である (表 4-6) と推定される。これらの損傷塩基に起因して検出された変異は、固定した標品の + と - でそれぞれ 86×10^{-6} と 120×10^{-6} の変異頻度となり、変異頻度全体に占める割合はそれぞれ 57 % と 80 % となる。一方、損傷塩基に起因して検出された変異以外の内、検出数や各 DNA 標品 (CCC、Treated CC、SS、ヘテロ二重鎖標品、固定した標品) で検出された変異との比較から、固定した標品で正常な塩基間に由来する複製エラーを反映して検

DNA 標品	DNA 鎖 ^{*1}	損傷 (ミスマッチ) の生じた部位 ^{*2}	Sm ^r 変異体 の割合 (%)	
			修復 ^{*3}	
			+	-
CCC Treated CC			0 ~ 20	4 ~ 20
SS			0 ~ 100	100
Heteroduplex			<0.4	4 ~ 20
	— 新生鎖 —		100	100
	— 鋳型鎖 —		0 ~ 20	4 ~ 20
Fixed			100	100
	— 鋳型鎖 —		<0.4	4 ~ 20
	— 新生鎖 —		100	100

*1 鋳型鎖側のみがメチル化されている。Fixed の鋳型鎖は、一回目のプライマー伸長反応で合成された新生鎖である。

*2 N, 正常な塩基
M, ミスマッチな塩基
D, 損傷塩基

*3 +, 損傷 (ミスマッチ) した塩基が形質転換後に修復される。
-, 損傷 (ミスマッチ) した塩基が形質転換後に修復されない。

表 4 - 7 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で予想される各標品における Sm^r 変異体の出現する割合

出された変異の型は、塩基置換が+の標品で検出された A → G (表 4-4)、一塩基フレームシフトは 6A → 7A、6T → 7T (表 4-5)、-の標品で検出された 3(TA) → 2(TA) を除く二塩基フレームシフトと大きな欠失 (表 4-2、表 4-6、data not shown) であると思われる。これらの正常な塩基間に由来する複製エラーは、固定した標品の+と-でそれぞれ 60×10^{-6} と 19×10^{-6} の変異頻度となり、変異頻度全体に占める割合はそれぞれ 40 % と 13 % となるが、大きな欠失を除くと固定した標品の+と-でそれぞれ 17×10^{-6} と 9.3×10^{-6} の変異頻度となり、変異頻度全体に占める割合はそれぞれ 11 % と 6.2 % となる。

4. 前変異を固定した標品で検出された正常な塩基間に由来する複製エラー

固定した標品で正常な塩基間に由来する複製エラーは、塩基置換 (表 4-4) が+の標品で検出された A → G (3 例) ぐらいで、残りの変異の型は 1 例検出できないかぐらいであると思われるので、塩基置換の変異率は $\sim 5 \times 10^{-8}$ / 塩基/複製であると推定される。一塩基フレームシフト (表 4-5) は 6A → 7A (3 例)、6T → 7T (2 例) ぐらいが正常な塩基間に由来する複製エラーで、残りの変異の型はほとんど検出できていないと思われるので、一塩基フレームシフトの変異率は $\sim 1 \times 10^{-8}$ / 塩基/複製であると推定される。また、大腸菌の *mutL*⁻ 株を用いた遺伝学的な研究で、F'*prolac* 上の *lacI* 遺伝子を標的遺伝子とした前進突然変異検出系から推定される DNA pol III HE によって誘発される点突然変異の変異率は $\sim 5 \times 10^{-8}$ であると報告されており (Schaaper, 1993)、今回、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で推定した変異率とよく一致している。

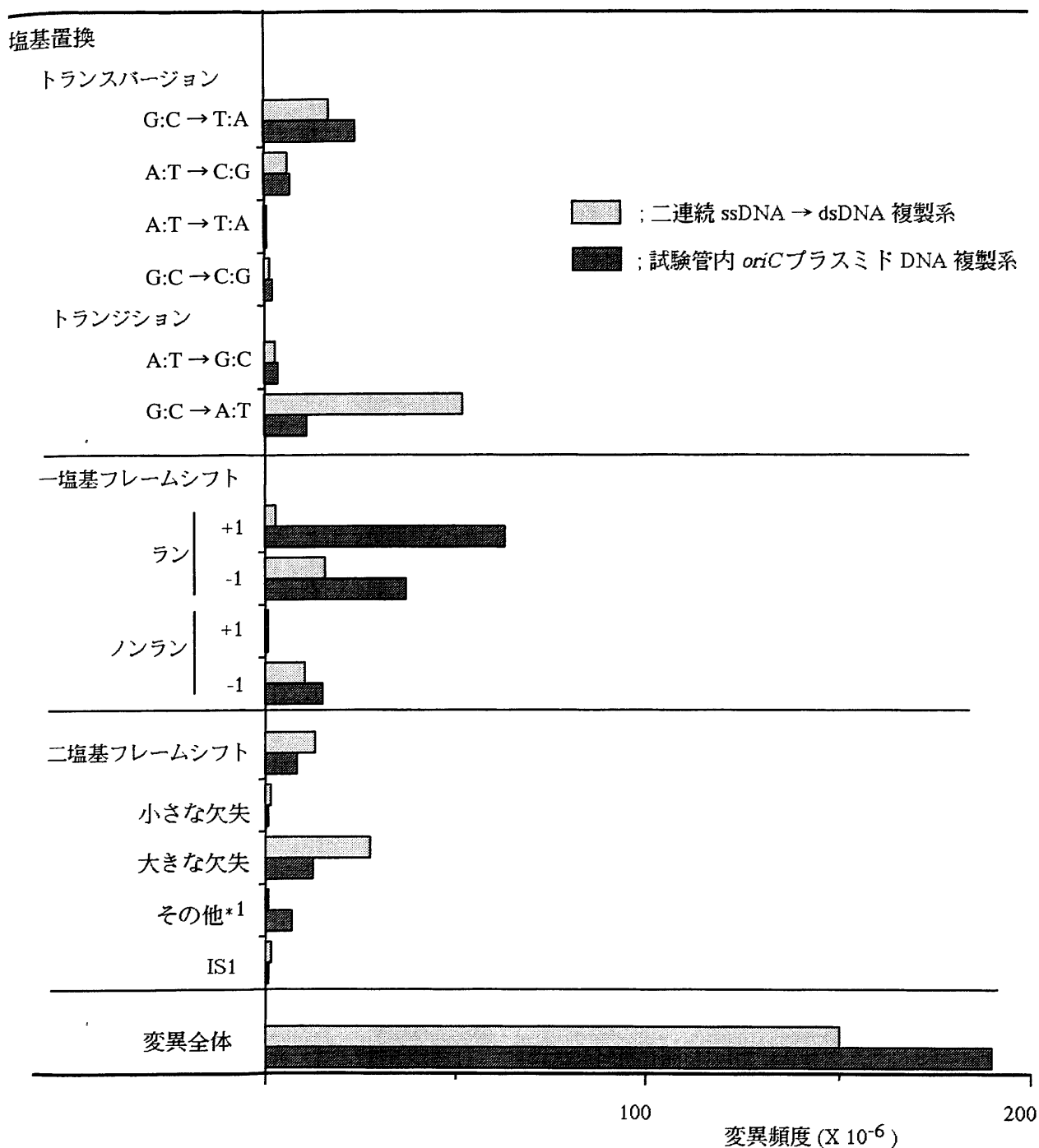
残りの二塩基フレームシフトと大きな欠失 (表 4-2、表 4-6、data not shown) は、2 塩基以上の繰り返し配列を介して誘発されたと思われる型が 90 % ぐらいであり、幾つかの強力なホットスポットが観察された。二塩基フレームシフトと大きな欠失の最も強力なホットスポットは、ともに+の標品で検出され、それぞれ 3(TA) → 2(TA) と 895 塩基の欠失 (表 4-6) で、変異頻度はそれぞれ $5 \sim 11 \times 10^{-6}$ と $29 \sim 34 \times 10^{-6}$ で、それぞれの変異が二塩基フレームシフトと大きな欠失の変異頻度全体に占める割合はそれぞれ 83 ~ 92 % と 74 ~ 77 % となる。よって、二塩基フレームシフトと大きな欠失は鋳型鎖側の配列に依存して検出できる変異の発生頻度が大幅に異なることが示唆される。

大腸菌の DNA pol III HE を用いて試験管内で誘発される変異を調べた実験が、最近 Pham 等 (1998) によって報告された。彼らの実験系は、*lacI*^r (310 塩基) を標的遺伝子とした前進突然変異検出系 (ギャップフィリング) で、実験系自体の制約として検出できる変異は、主に塩基置換と -1 フレームシフトである (Schaaper & Dunn, 1987)。彼らの実験結果は、DNA pol III HE によって誘発された変異の発生頻度が $620 \sim 810 \times 10^{-6}$ で、その内、塩基置換が $340 \sim 370 \times 10^{-6}$ 、-1 フレームシフト

が $220 \sim 440 \times 10^6$ であった。しかし、検出された塩基置換は主に3つの型 ($G \rightarrow A$ 、 $C \rightarrow A$ 、 $C \rightarrow G$; 新生鎖側での変化として記述) で何れも鋳型 DNA 標品に含まれている損傷塩基によって誘発されたと考察された。今回、固定した標品で検出した塩基置換の $G \rightarrow A$ 、 $C \rightarrow A$ 、 $C \rightarrow G$ は、損傷塩基に起因して検出されたと結論しており、Pham 等の結果と比較して $G \rightarrow A$ と $C \rightarrow A$ の変異率はほぼ一致しているが、 $C \rightarrow G$ の変異率は二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系の方が一桁低い。Pham 等は、正常な塩基間に由来する複製エラーの変異率は、塩基置換が $1 \sim 3 \times 10^6$ / 塩基/複製、-1 フレームシフトが $1.7 \sim 3.7 \times 10^6$ / 塩基/複製であると推定しているが、これらの値は二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系で推定した正常な塩基間に由来する複製エラーの変異率に比べて、塩基置換と-1 フレームシフトの両方で100倍ぐらい高い変異率である。この極端な推定した変異率の違いは恐らく、二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系と異なり Pham 等の実験系では、検出した変異が損傷塩基に起因して誘発された変異であるのか、正常な塩基間に由来する DNA pol III HE に依存した複製エラーであるのかを判断することが困難なために、塩基置換と-1 フレームシフトの変異率を過剰に推定したものと思われる。

5. プライマー伸長反応よりも複製フォークの方が忠実度が低い

同じ野生型 DNA pol III HE を用いた *oriC* 系 (第三章を参照) と今回の二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系の共通する部分は、1) 誘発されたヘテロ二重鎖の状態にある複製エラー (前変異) を全てホモ二重鎖にし、変異として固定することで誘発された全ての複製エラーを検出できる、2) 標的遺伝子として *rpsL* を用いている。異なる部分は、二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系がプライマー伸長反応に対して、*oriC* 系は複製フォークを形成した反応である。そこでプライマー伸長反応と複製フォークでは DNA pol III HE の忠実度に異なる影響を及ぼすのかを検討するために、各々で検出された変異の発生傾向を比較すると、全体の変異頻度はほぼ同じであるがその内容は大きく異なっていた (図 4-4)。二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系に比べて *oriC* 系では塩基置換が若干低く、一塩基フレームシフトは4倍高かった。*oriC* 系で検出された塩基置換はトランスバージョンの $G:C \rightarrow T:A$ 、 $A:T \rightarrow C:G$ 、トランジションの $G:C \rightarrow A:T$ の3タイプで塩基置換全体の88%を占めており、何れも損傷塩基に起因して誘発されたものであると考察した (第三章を参照)。二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系では上記3タイプの内、トランスバージョンの変異率はほぼ同じ値で検出されたのだが、トランジションは5倍近く高頻度に検出された。*oriC* 系では DnaB (ヘリカーゼ) により二本鎖を一本鎖に巻き戻した直後に二本鎖になることから、トランスバージョンを引き起こす損傷塩基は鋳型中あるいは dNTP プール中に予め内在しており、トランジションを引き起こす損傷塩基は主には予め一本鎖にしたことで生じた可能性が高いことを示していると思われる。



*1, 配列置換、重複

図 4-4 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系と試験管内 *oriC* プラスミド複製系で誘発された変異の比較

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系の変異頻度は、前変異を固定した複製産物の + と - で検出した変異頻度の平均値を示す。試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系の変異頻度は第 3 章の実験結果を転載した。

oriC 系で検出された一塩基フレームシフトは二連続 ssDNA → dsDNA 複製系に比べてノンランではほぼ同水準であるが、ランでは全体的に付加が 23 倍、欠失が 2.3 倍と変異頻度の上昇が観察された。二連続 ssDNA → dsDNA 複製系に比べて *oriC* 系でランでの変異頻度の上昇に寄与しているのは、2(A:T) → 1(A:T) (4.9 倍)、5(A:T) → 4(A:T) (6.2 倍)、6(A:T) → 5(A:T) (2.5 倍)、5(A:T) → 6(A:T) (11 倍)、6(A:T) → 7(A:T) (27 倍) である。特に、6(A:T) → 7(A:T) は *oriC* 系で最も高頻度に検出された変異で一塩基フレームシフト全体の 43 %、変異全体の 27 % を占めていた。このように二連続 ssDNA → dsDNA 複製系に比べて *oriC* 系では一塩基フレームシフトが明らかに高頻度に誘発され、少なくとも一塩基フレームシフトに関しては *oriC* 系の方が忠実度が低かった。同じ複製酵素を用いているにも関わらずこのような違いが生じた原因として、1) 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系では SSB に覆われた鋳型であるが、*oriC* 系では DnaB により一本鎖になったものが鋳型になるので鋳型としての構造が異なる、2) *oriC* 系ではリーディング鎖合成とラギング鎖合成が同時に行われ、また、DnaB との相互作用 (kim *et al.*, 1996) などの様々なストレスに起因して、プライマー伸長反応系のような単純な反応に比べて忠実度が下がったのかもしれない。何れにしても、プライマー伸長反応系と複製フォークによる伸長反応系では DNA pol III HE に対して塩基選択の忠実度、あるいはミスペアに対するの校正機能による修復効率、あるいはミスペアからの伸長反応の効率の何れか（全てかもしれないが）に異なる影響を与えていることが示唆される。

二塩基フレームシフトは *oriC* 系でも 3(TA) → 2(TA) がホットスポットで同じ傾向を示したが、三塩基以上の欠失は二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出されたようなホットスポットは検出されず、*oriC* 系では 13 例中同一のものは一つの部位で 2 例見つかっただけで残りは異なる部位で各 1 例ずつであった。このことは、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出された 3 塩基以上の欠失のホットスポットは、予め一本鎖にしたことによって特異的な構造が鋳型鎖上に生じたことに起因するのかもしれない。また、*oriC* 系では姉妹鎖にストランドスイッチングすることによって誘発されられると思われるクラス II 重複と配列置換が検出されたが、このような複製フォークに依存して誘発される変異は二連続 ssDNA → dsDNA 複製系では全く検出されず妥当な結果である。

6. 試験管内で誘発された複製エラーから推定される生物学的意義

oriC 系で検出された変異の大部分は、リーディング鎖合成時の複製エラーを反映していると考えられる（第三章を参照）。一方、今回の二連続 ssDNA → dsDNA 複製系はちょうどラギング鎖合成に近く、ラギング鎖合成時の複製エラーを反映しているのかもしれない。もしそうであるならば、リーディング鎖複製の方がラギング鎖複製よりも忠実度が低いことになる。細胞内での染色体複製時の複製エラーは、

リーディング鎖複製の方が忠実度が低いことが示唆されている (Fijalkowska *et al.*, 1998) ので、細胞内でも試験管内と同じ事象が起こっているのかもしれない。別の見方では、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系はミスマッチ修復におけるロングパッチ修復の反応状況 (Lahue *et al.*, 1989) に似ている。DNA pol III HE を用いた二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出された複製エラーがロングパッチ修復における変異誘発の程度を反映しているならば、複製フォークを形成した染色体複製よりもロングパッチ修復の方が変異率全体としては高い忠実度をもつ。しかし、ロングパッチ修復が行われる鋳型の配列構成によっては、表 4-6 で示したような一度誘発されたら変異として固定してしまう型の欠失が誘発されうるので、細胞内で誘発される欠失 (Schaaper *et al.*, 1986; Schaaper & Dunn, 1991) の一部はこのようなロングパッチ修復時の複製エラーに起因しているのかもしれない。

第五章

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で大腸菌の校正機能欠損型
DNA pol III HE によりにより誘発される複製エラー

I. 序

野生型 DNA pol III HE により誘発される複製エラーは、重合反応を担う触媒サブユニット (α サブユニット) (Maki & Kornberg, 1985) のミスインサーションに起因するがその大部分は校正機能により除去され、除ききらずかつ伸長反応が出来たものを反映している。二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系の特質として誘発された複製エラーは全て検出できるのだが、野生型 DNA pol III HE を用いて検出された複製エラーは、正常な塩基間に由来したというより損傷塩基に由来するものが大部分であると思われた (第四章を参照) (Fujii & Maki, 投稿準備中)。

試験管内の研究より α サブユニットのミスインサーション頻度 (Sloane *et al.*, 1988; Bloom *et al.*, 1997) から考えて、二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系で予想される損傷塩基に由来して誘発されると思われる変異を越えて、校正機能欠損型 DNA pol III HE によって誘発される複製エラーを検出できることが予想された。そこで、校正機能を欠損させた DNA pol III HE により誘発される複製エラーを検出することにより、誘発される変異の実体及び変異の誘発に重要であると考えられる塩基配列特異性はどのような配列なのかを解析することを試みた。また、野生型 DNA pol III HE を用いて検出された変異との比較を行うことで、校正機能の役割と複製エラーの誘発に関して考察する。

II. 結果

1. 校正機能欠損型 DNA pol III HE の構築

校正機能欠損型 DNA pol III HE を調製するために、3' $\rightarrow$ 5' エキソヌクレアーゼ活性を担う ϵ サブユニット (Scheuermann & Echols, 1984) の機能ドメインに塩基置換変異を導入した *dnaQ32* を構築した (Fujii *et al.*, 投稿準備中)。この *dnaQ32* を過剰発現用ベクターにクローニングしたプラスミドを大腸菌に導入し、過剰発現させたのち DnaQ32 をもつ DNA pol III HE を精製した。精製した DNA pol III HE を用いて 3' $\rightarrow$ 5' エキソヌクレアーゼ活性を調べたところ、予想通り野生型 DNA pol III HE に比べて 3' $\rightarrow$ 5' エキソヌクレアーゼ活性が 5.7 % しか (検出された活性は、酵素標品中に混入すると考えられる野生型 DNA pol III* に由来していると思われる) 検出されなかった (Fujii *et al.*, 投稿準備中)、ここで精製した DNA pol III HE を校正機能欠損型として用いることにした。

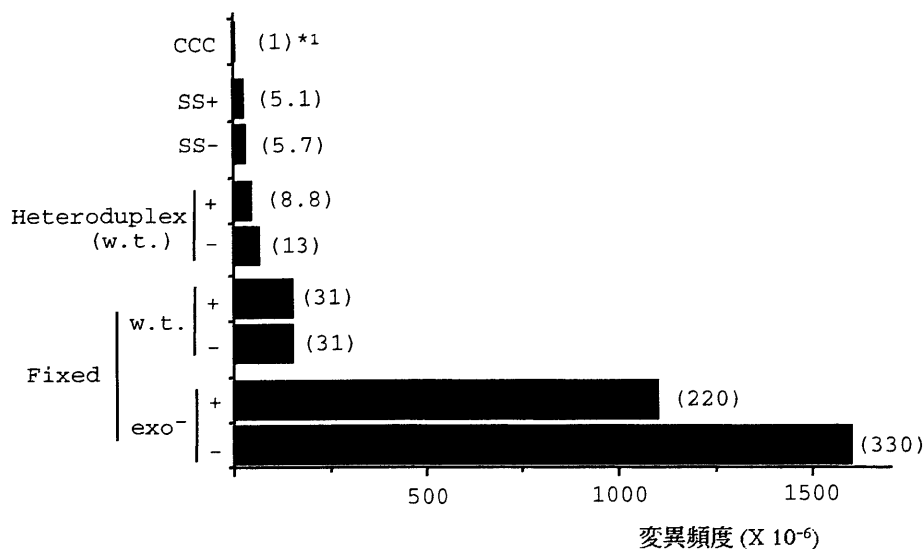
2. 変異の発生傾向

試験管内で校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発される複製エラーを検出するために、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系（第四章を参照）を行った。この際、鋳型となる一本鎖環状 DNA は、pFS4 プラスミド DNA を試験管内で酵素学的に調製した SS+ と SS- である。二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で一回目のプライマー伸長反応では、校正機能欠損型 DNA pol III HE を用い、校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発された複製エラー（前変異）を固定するための二回目のプライマー伸長反応では、野生型 DNA pol III HE を用いた。また、前変異を固定した最終標品は、一回目のプライマー伸長反応で合成した新生鎖側のみをメチル化したヘミメチルの状態である（材料と方法を参照）。

校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発された前変異を固定した標品の変異頻度を測定したところ、+ の標品が 1.1×10^3 、- の標品が 1.6×10^3 で、鋳型である SS+(-) に比べて 44 ~ 57 倍、野生型 DNA pol III HE により誘発された前変異を固定した標品に比べて 7 ~ 11 倍の変異頻度の上昇が観察された（図 5-1）。校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発された前変異を固定した標品の変異頻度の上昇がどのような変異に起因しているのかを調べるために Sm プレート上に生えた変異体内、無作為に 200 個選り塩基配列レベルで変異の種類と生じた部位を決定した（表 5-1、図 5-2、図 5-3）。野生型 DNA pol III HE で検出した結果とは異なり、校正機能欠損型 DNA pol III HE では、一塩基フレームシフトが変異頻度の上昇に最も寄与しており塩基置換がそれに続き、残りの種類の変異は少数であった。また、各クラスの変異を野生型 DNA pol III HE で検出した変異と比較したとき、一塩基フレームシフトは 22 ~ 45 倍、塩基置換は 5.7 ~ 7.3 倍の変異頻度の上昇が観察され、残りのクラスの変異は変異頻度の上昇が観察されなかった（表 5-1）。

3. 塩基置換

校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発された塩基置換を表 5-2 に示した。塩基置換の発生傾向は、野生型 DNA pol III HE で検出された塩基置換と比べて、ほぼ同水準から 230 倍も高頻度に検出された変異の型まで変化に富んでいた。トランジションは、A:T → G:C の A → G (12×10^6 /塩基)（新生鎖側での変化として記述）が T → C ($\sim 1.0 \times 10^6$ /塩基) に比べて 10 倍以上誘発されやすく、対して G:C → A:T は恐らく G → A と C → T が同じぐらいの変異率 ($4 \sim 6 \times 10^6$ /塩基：後述する) であると思われる。G → A と C → T は、野生型 DNA pol III HE で複製した標品でも高頻度に検出され、鋳型となる一本鎖環状 DNA 上に生じた損傷塩基に起因して誘発されたものと示唆された（第四章を参照）。校正機能欠損型 DNA pol III HE で検出した G → A、C → T は、野生型 DNA pol III HE で複製した標品よりも数倍高頻度に検出されたが（表 5-2）、この変異頻度の上昇分は以下の観察結果から正常な塩基間による複製エラーを反映しているものと推定される。



*1, CCC の変異頻度を 1 としたときの相対的増加

図 5 - 1 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出された変異頻度

校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて誘発された前変異を固定した標品の変異頻度を表す。変異頻度は 4 回独立に形質転換実験により得られた変異頻度を平均化したものである。CCC は細胞内で増幅した pFS4 プラスミドで、SS は pFS4 を試験管内で酵素学的に一本鎖環状 DNA にしたものである。Heteroduplex (ヘテロ二重鎖標品) は、野生型 DNA pol III HE を用いて一回プライマー伸長反応を行った産物でヘミメチルの状態である。Fixed (固定した標品) は、野生型 (w.t.) あるいは校正機能欠損型 DNA pol III HE (exo⁻) を用いて誘発された前変異を固定するために、野生型 DNA pol III HE を用いて二回目のプライマー伸長反応を行った産物でヘミメチルの状態である。試験管内 DNA 複製産物の +、- は一回目のプライマー伸長反応でそれぞれ SS⁺、SS⁻ を鋳型として用いた標品である。校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて誘発された前変異を固定した標品を除く全ての標品の変異頻度は第 4 章の実験結果を転載した。

変異の種類	検出された変異の数				変異頻度 (X 10 ⁻⁶)			
	Fixed				Fixed			
	w.t.		exo ⁻		w.t.		exo ⁻	
	+	-	+	-	+	-	+	-
塩基置換	108	103	84	70	81	77	460	560
一塩基フレームシフト	17	60	106	127	13	45	580	1000
二塩基フレームシフト	16	17	3	0	12	13	17	<8.0
小さな欠失 ^{*1}	0	4	0	0	<0.75	3.0	<5.5	<8.0
大きな欠失 ^{*2}	58	13	7	1	44	9.8	39	8.0
その他 ^{*3}	1	0	0	1	0.75	<0.75	<5.5	8.0
IS1	0	3	0	1	<0.75	2.3	<5.5	8.0
変異全体	200	200	200	200	150	150	1100	1600

^{*1}, 3~10 塩基の欠失
^{*2}, 11 塩基以上の欠失
^{*3}, 配列置換、二重変異

表 5 - 1 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出された *rpsL*⁻ に占める変異のクラス分け

野生型 (w.t.) あるいは校正機能欠損型 DNA pol III HE (exo⁻) を用いて誘発された前変異を固定した標品で検出した Sm^r 変異体より、各 200 の Sm^r コロニーを無作為に選び、生じた変異を塩基配列レベルで決定し、検出された変異を変異の各クラスに分類した。試験管内 DNA 複製産物の +、- は一回目のプライマー伸長反応でそれぞれ SS⁺、SS⁻ を鋳型 DNA として用いた標品である。野生型 DNA pol III HE を用いて誘発された前変異を固定した標品の結果は第 4 章の実験結果を転載した。

上段: Fixed -
下段: Fixed +

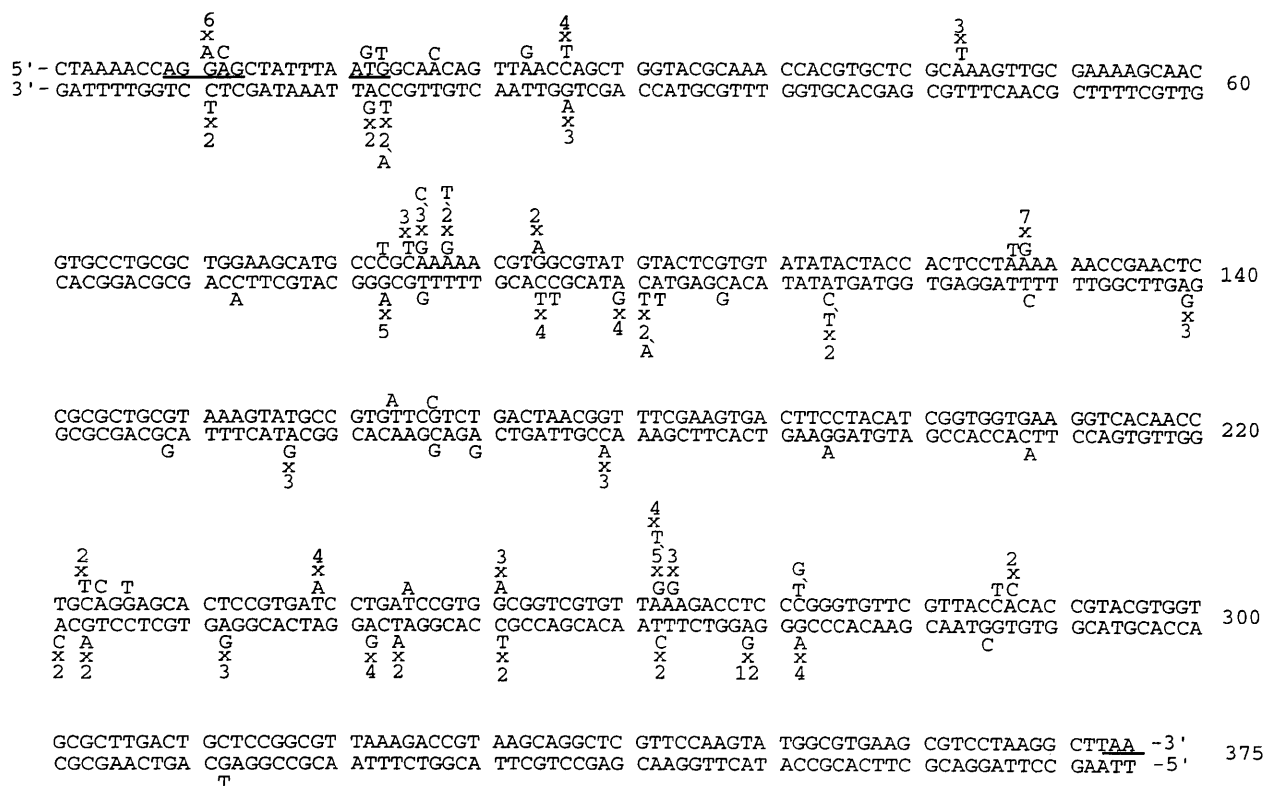


図 5 - 2 校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出された塩基置換の部位

rpsL の開始コドンの一番目の塩基を 1 として数を振っている。シャイン
ダルガノ配列と開始コドン、終止コドンの塩基配列には下線を引いた。こ
こで示した配列は一回目のプライマー伸長反応で合成された新生鎖を表
し、新生鎖で検出された変異をその配列の上 (SS- を鋳型として検出され
た変異) か下 (SS+ を鋳型として検出された変異) に示す。検出された変
異に X N と記されている場合、同じ変異が N 個検出されたことを表す。

変異の型	変異頻度 (X 10 ⁻⁶)			
	Fixed			
	w.t.		exo ⁻	
	+	-	+	-
トランスバージョン				
C → A	17	4.5	39	<8.0
G → T	1.5	11	5.5	16
A → C	<0.75	0.75	17	48
T → G	6.0	5.3	5.5	8.0
A → T	0.75	<0.75	17	72
T → A	<0.75	0.75	11	48
G → C	0.75	<0.75	5.5	8.0
C → G	2.3	<0.75	17	8.0
トランジション				
A → G	3.0	0.75	180	170
T → C	0.75	0.75	17	<8.0
G → A	25	37	83	88
C → T	24	17	72	96

表 5 - 2 校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出された塩基置換

各変異のタイプは、一回目のプライマー伸長反応での新生鎖中の変化を表す。野生型 DNA pol III HE を用いて誘発された前変異を固定した標品の結果は第 4 章の実験結果を転載した。

野生型および校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いてプライマー伸長反応で複製したヘテロ二重鎖標品をフルメチル化し、標品間で誘発された変異の内容を比較した (data not shown)。両標品共に G → A が塩基置換の主要な型で、標品間での変異頻度の差は 50 % 以内であり、C → T は共にほとんど検出されなかった。また、このヘテロ二重鎖標品で検出された G → A の変異頻度は野生型 DNA pol III HE で複製した前変異を固定した標品で検出された G → A の変異頻度 (表 5-2) とほぼ一致している。よって、ヘテロ二重鎖標品で検出された G → A は校正機能によって修復を受けないミスペア (C:A, 鋳型鎖: 新生鎖) に由来しており、損傷塩基 (例えば、鋳型鎖上の C が脱アミノ化した U) に起因して誘発されたと示唆される。このことは同時に、ヘテロ二重鎖標品と野生型 DNA pol III HE で複製した前変異を固定した標品で検出された G → A の変異頻度は、野生型および校正機能欠損型 DNA pol III HE で複製する際、鋳型 DNA 標品中に含まれている損傷塩基によって誘発される G → A の変異頻度の上限を示していると推定される。C → T に関しても同様の考え方 (第四章を参照) で、野生型 DNA pol III HE で複製した前変異を固定した標品で検出した C → T の変異頻度 (表 5-2) が損傷塩基によって誘発される上限を示していると推定される。よって、固定した標品で野生型 DNA pol III HE に比べて校正機能欠損型 DNA pol III HE での数倍の変異頻度の上昇は有意な値であり、検出された半数以上は校正機能が欠損したことにより誘発された正常な塩基間による複製エラーを反映しているものと思われる。

一方、校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出されたトランスバージョンの C → A、G → T、T → G は、野生型 DNA pol III HE で複製した前変異を固定した標品とほぼ同水準の変異頻度であった (表 5-2)。これらのミスペアは校正機能により取り除かれないということを意味し、以前に報告されている結果 (Brenowitz *et al.*, 1991; Bloom *et al.*, 1997) とは大きく異なるので、正常な塩基間によるミスペアではなく損傷塩基に由来している可能性が高い。その場合、校正機能のあるなしに関わらないので、 α サブユニットの塩基選択のみに依存してミスペアが形成されかつ伸長することが示唆される。校正機能による修復をあまり受けない損傷塩基が幾つか報告されている。その内、8-oxo-dGTP が鋳型上の A に取り込まれたとき、ポリメラーゼの種類にもよるが例えば大腸菌の Klenow 断片では、校正機能によりあまり修復を受けないので (Pavlov *et al.*, 1994)、本実験系で検出された C → A や T → G はそれぞれ鋳型上の 8-oxo-dG と dNTP プール中の 8-oxo-dGTP に起因して誘発されたのかもしれない。上記以外のトランスバージョンは、A → C、A → T、T → A が SS- を鋳型としたときによく検出され、SS+ と - を鋳型としたときの検出可能部位はそれぞれ A → C は共に 14、A → T は 7 と 17、T → A は 17 と 7 である。SS+ を鋳型としたとき A → C、A → T、T → A の変異率は 1.2、2.4、0.6 × 10⁶/塩基に対して、SS- を鋳型としたときにはそれぞれ 3.4、4.2、6.9 × 10⁶/塩基となり、SS- を鋳型としたときの方が変異率が高く 2 ~ 10 倍のバイアスが観察された。残りの G → C、C → G は検出可能部位が 12 ヶ所以上あるにもかかわらず検出数が少ないことから、

塩基置換への寄与が少ないことが示唆される。

正常な塩基間による複製エラーに依存して誘発されたと思われる塩基置換をトランジションとトランスバージョンで分けたとき、トランジションは 6.7×10^{-6} /塩基でトランスバージョンは 3.1×10^{-6} /塩基となり、*rpsL* 中では 2 倍ぐらいトランジションが誘発されやすいと推定される。

4. 一塩基フレームシフト

校正機能欠損型 DNA pol III HE で検出された変異の発生頻度の上昇に最も寄与しているのが一塩基フレームシフトであり（表 5-1）、どのような変異が誘発されているのかを詳細に調べたのが表 5-3 である。同じ塩基が連続していない（ノンラン）配列上では、C を鋳型としたとき付加よりも欠失がよく検出され、特に SS- を鋳型としたときに顕著であった。残りの塩基を鋳型としたときには、ほぼ同水準に付加や欠失が観察された。ノンランでの付加や欠失（総数 47 例）は大半が同一部位では 1 例のみ検出され（図 5-3）、ホットスポットの存在によって検出されたのではなくランダムに誘発されていた。同じ塩基が連続した（ラン）配列上では、2 塩基ランの欠失の場合、鋳型が 2C を除きほぼノンランでの欠失と同じ変異率で誘発されていた。付加でも鋳型が 2C のときノンランに比べてよく誘発されていた。鋳型が 2G のとき、付加は + でノンランに比べてよく誘発されているが、- で検出されずノンランに比べて誘発されやすいのかは不明である。3 塩基以上のランにおける付加や欠失の傾向は、構成する塩基の種類によって大きく異なる。鋳型が G あるいは C の場合には、3 塩基ランしか存在しないのだが、明らかに 3C を鋳型としたときの欠失が高頻度に誘発されている。鋳型が 3C の付加や鋳型が 3G の付加と欠失は、鋳型が 3C の欠失に比べて一桁低い変異率で、この値は 2C を鋳型としたときの欠失の変異率とほぼ一致している。鋳型が A あるいは T の場合では、6 塩基ランまで存在している。A が鋳型のとき、3A の欠失は - で + よりも 10 倍以上検出されていることから、変異の誘発における周りの配列の影響が示唆される。また、4A の変異率に比べて 5A と 6A では約 5 倍高頻度に誘発されている。一方付加では、A が鋳型のとき 3 ~ 5 A がほぼ同じ変異率で 6A のみ 3 ~ 5 A に比べて約 7 倍の変異率の上昇が観察された。T が鋳型のとき、欠失は 3T と 4T でほぼ同じ変異率であり 5T と 6T で僅かに高く誘発されている。一方付加では、T が鋳型のときランの数が増加するに従って変異率の上昇が観察され、6T での変異頻度は本実験系で検出された全ての変異の中で最も高い変異頻度であった。これらの結果から一塩基フレームシフトを誘発する鋳型の塩基配列は、その組成によって傾向が全く異なり複数の一塩基フレームシフト誘発の発生機構の存在を示唆する。

標品の +、- を問わず検出された一塩基フレームシフトの塩基組成とランの長さの違いが及ぼす変異率への寄与を示したのが図 5-4 A、B である。付加はどの塩基も

配列*1	変異率 (X 10 ⁻⁷ /base)			
	-1 フレームシフト		+1 フレームシフト	
	+	-	+	-
2 塩基のラン				
2A	5.0	8.0	<2.5	<2.7
2T	<1.8	<3.6	3.7	<3.6
2G	11	24	4.3	2.4
2C	3.2	18	5.0	<2.0
3 塩基以上のラン				
3A	18	32	<9.2	11
3T	<3.7	40	15	<13
4A	-	40	-	20
4T	28	-	14	-
5A	-	110	-	140
5T	150	-	11	-
6A	-	67	-	400
6T	140	-	92	-
3G	150	190	18	<27
3C	<18	27	18	13
ノンラン				
A	3.8	2.5	1.3	0.84
T	0.58	1.8	1.2	3.6
G	1.7	7.1	<0.54	<0.78
C	2.2	5.5	<0.54	2.4

*1, 一回目のプライマー伸長反応の新生鎖側の配列

表 5 - 3 校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出された一塩基フレームシフト

- は検出できない変異を表す。各変異のタイプは、一回目のプライマー伸長反応での新生鎖中の変化を表す。

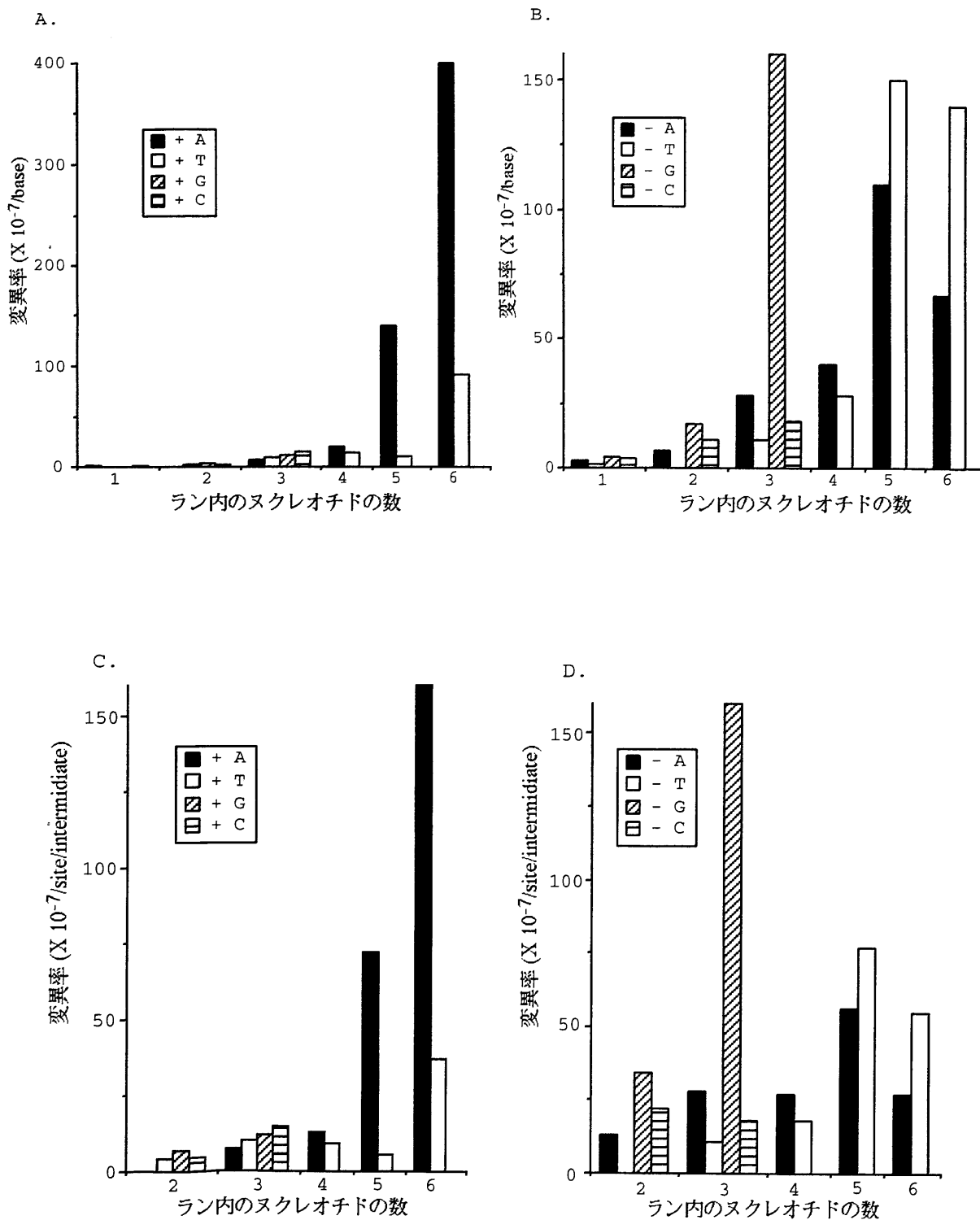


図 5 - 4 校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出された一塩基フレームシフトのラン配列の影響

各変異のタイプは、一回目のプライマー伸長反応での新生鎖中の変化を表す。
図の A と C は付加を、B と D は欠失を表す。詳細は本文を参照。

2塩基を境として3塩基で数倍変異率の上昇が観察された。鋳型がAのときは更に5塩基まで3塩基とほぼ同じ変異率で6塩基になると一気に変異率が上昇した。鋳型がTのときは鋳型がAのときと大きく異なりランの数が増えるに従い顕著な変異率の上昇が見られた。欠失は付加のパターンとは大きく異なり、鋳型がCと5塩基までの鋳型がA、Tの欠失のパターンがよく似ていて、鋳型がA、Tのとき6塩基になると変異率の上昇が観察されず頭打ちになっている。鋳型がGのときは鋳型がCのときのパターンとは全く異なり、ランの数に対しての変異率の上昇は鋳型がA、Tのときと似ている。また、付加における鋳型がA:Tのランのとき、ランの長さに応じて鋳型がTのときにバイアスがかかるが、鋳型がG:Cのランの欠失でも鋳型がCのときにバイアスがかかり、このような極端なバイアスが係るときには鋳型がピリミジンであるという共通項があった。

5. 二塩基フレームシフトと欠失

校正機能欠損型 DNA pol III HE で検出された二塩基フレームシフトと欠失は、+で10例、-で1例と検出数は少ないのだが、興味深いことに野生型 DNA pol III HE で検出された変異頻度（第四章を参照）とほぼ一致していた（表5-1）。+で10例中、3例が野生型 DNA pol III HE の+で高頻度に検出した895塩基の欠失で、3例が3(TA) → 2(TA)で、残りの4例は全て異なる型で内2例が野生型でも検出された欠失であった。-で検出された1例は、野生型で検出していない欠失であった（data not shown）。

III. 考察

1. 検出した変異は正常な塩基間で誘発された複製エラーを反映している

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で野生型 DNA pol III HE を用いて検出された塩基置換と一塩基フレームシフトの大部分は、損傷塩基に起因して誘発された変異であると示唆された（第四章を参照）。一方、今回校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発された塩基置換と一塩基フレームシフトの大部分は、以下に示す観察結果から正常な塩基間で誘発された複製エラーを反映していることが示唆される。

校正機能欠損型 DNA pol III HE で検出された変異が損傷塩基に起因するのではない正常な塩基間で誘発された複製エラーを反映していれば、フルメチル化したヘテロ二重鎖の状態でも10%前後の検出効率を示すはずである（第四章を参照）。そこで、校正機能欠損型 DNA pol III HE で複製したヘテロ二重鎖標品をフルメチルの状態にし変異頻度を測定したところ、SS+、-のどちらの鎖を鋳型にしてもほぼ同じ

300 ~ 310 X 10⁶であった。+、- 両標品から Sm^r 変異体を各々 200 個無作為に選び、生じた変異を塩基配列レベルで決定した (data not shown)。損傷塩基に由来すると思われる G → A、C → A は予想通り高頻度に検出され、これらの変異を除いた変異頻度は +、- それぞれ 210 X 10⁶ と 240 X 10⁶ となり、固定した標品に比べてそれぞれ 19 % と 15 % の検出効率を示す。また、固定した標品で検出数が多く複製エラーの変異頻度の実体を反映していると思われる変異の型をヘテロ二重鎖標品と比べたところ (表 5-4)、ヘテロ二重鎖標品の検出効率は何れも 20 % をきり、正常な塩基間で誘発された複製エラーを反映していることが示唆された。

遺伝学的な研究では、ミスマッチ修復系と校正機能の活性を欠損もしくは低下した二重変異株で検出される変異は、 α サブユニットの塩基選択の忠実度を反映していると考えられている (Schaaper, 1993)。そこで、*mutS⁻ dnaQ49* 二重変異株で pFS4 と同じ *rpsL* を標的遺伝子とした pMOL21 プラスミド上で検出された変異 (Aoki *et al.*, 未発表データ) と本実験系で検出された変異との発生傾向の比較を行った。*mutS⁻ dnaQ49* 二重変異株では、塩基置換と一塩基フレームシフトのみが検出され、一塩基フレームシフトは塩基置換に比べて 6.5 倍高頻度に検出された。*mutS⁻ dnaQ49* 二重変異株で検出された塩基置換は検出数が少なく大まかな傾向なのだが、トランジションのみが検出され A:T → G:C と G:C → A:T は 2.8 : 1 の割合であり、本実験系から推定される正常な塩基間に起因した A:T → G:C と G:C → A:T は 1.5 : 1 の割合でよく似た傾向を示している。*mutS⁻ dnaQ49* 二重変異株で検出された一塩基フレームシフトは、同じ型の部位における付加と欠失の割合が本実験系で検出されたパターン (表 5-3) とよく似ていた。幾つかの例を挙げると、*mutS⁻ dnaQ49* 二重変異株で 2G/2C、3G/3C、6A/6T 配列中での付加と欠失の割合はそれぞれ 1 : 4、1 : >10、3 : 1 であった。この結果からも二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出された変異は、正常な塩基に起因した複製エラーを反映したものであることが示唆される。

2. 校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発される複製エラーの変異率

二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で正常な塩基間で校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発される複製エラーの変異率は、塩基置換が 2.2 ~ 2.8 X 10⁶ / 塩基 / 複製、一塩基フレームシフトが 1.7 ~ 2.9 X 10⁶ / 塩基 / 複製であると推定される。二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で正常な塩基間で野生型 DNA pol III HE により誘発される複製エラーの変異率は、塩基置換が ~ 5 X 10⁸ / 塩基 / 複製、一塩基フレームシフトが ~ 1 X 10⁸ / 塩基 / 複製であると推定された (第四章を参照)。よって、野生型 DNA pol III HE の忠実度への校正機能による寄与は、塩基置換が 44 倍以上、一塩基フレームシフトが 170 倍以上であると推定される。本実験系で推定された校正機能欠損型 DNA pol III HE により誘発される複製エラーの変異率および校正機能の忠実

変異の種類	変異頻度 (X 10 ⁻⁶)				Heteroduplex の 検出効率 (%)	
	exo ⁻		Heteroduplex *1			
	Fixed					
	+	-	+	-	+	-
A → G	180	170	4.8	6.0	2.7	3.5
3G → 2G	88	56	3.0	10	3.4	18
5A → 4A		56		4.4		7.9
5T → 4T	77		1.5		1.9	
6A → 5A		40		2.9		7.3
6T → 5T	83		4.5		5.4	
5A → 6A		72		2.9		4.0
6A → 7A		240		18		7.5
6T → 7T	55		1.5		2.7	

*1, このヘテロ二重鎖標品はフルメチル化している。

表 5 - 4 二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いたヘテロ二重鎖標品の検出効率

ヘテロ二重鎖の検出効率は、校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出されたヘテロ二重鎖標品の各変異のタイプを前変異を固定した標品での各変異のタイプで割った値である。各変異のタイプは、一回目のプライマー伸長反応での新生鎖での変化を表す。

度への寄与の程度は、大腸菌の遺伝学的な研究から推定されている値とよく一致している (Schaaper, 1993; Pham *et al.*, 1998)。

試験管内で大腸菌の校正機能欠損型 DNA pol III HE (MutD5 HE) により誘発される複製エラーの研究が最近 Pham 等 (1998) により報告された。彼らの実験系は *lacI*^r を標的遺伝子とした前進突然変異検出系 (ギャップフィリング) で、実験系自体の制約として検出できる変異は、主に塩基置換と -1 フレームシフトである (Schaaper & Dunn, 1987)。彼らの実験結果は、塩基置換が $2 \sim 10 \times 10^6$ / 塩基 / 複製、-1 フレームシフトが $9 \sim 22 \times 10^6$ / 塩基 / 複製であると推定しているが、二連続 ssDNA $\rightarrow$ dsDNA 複製系で今回推定した塩基置換 ($2.2 \sim 2.8 \times 10^6$ / 塩基 / 複製) と -1 フレームシフト ($1.2 \sim 1.7 \times 10^6$ / 塩基 / 複製) の変異率と比べて、塩基置換が ~ 5 倍ぐらい高く、-1 フレームシフトが $5 \sim 18$ 倍ぐらい高い変異率である。このような変異率が異なる原因として、標的遺伝子と校正機能欠損型 DNA pol III HE が異なること以外に、反応条件の違いに起因して Pham 等の方が高い変異率になったのかもしれない。試験管内 DNA 合成反応を行う際、本実験系に比べて Pham 等の反応条件では、鋳型 DNA に含まれる一塩基あたりに使用するポリメラーゼの量 (ユニット) が約 100 倍多く、反応時間も 6 倍長い。校正機能欠損型 DNA pol III HE で検出される複製エラーは、誤った塩基の取り込みとそのミスマッチ末端からの伸長反応の効率に依存する。誤った塩基の取り込みの率は DNA pol III HE の α サブユニットに依存しているので、我々と Pham 等の実験で同じ率で誤った塩基の取り込みが起こっていると思われる。しかし、Pham 等の反応条件の方が、誤った塩基の取り込みにより形成されたミスマッチ末端からの伸長反応を行える機会は、本実験系の反応条件と比べてはるかに多いと思われる。その為に、彼らが MutD5 HE で検出した複製エラーの変異率は、本実験系と比べて高くなったのかもしれない。

3. ミスマッチ末端からの伸長反応の効率が変異誘発の重要な要素である

校正機能欠損型 DNA pol III HE で検出された複製エラーは、 α サブユニットによる塩基選択の忠実度とミスペアーからの伸長反応の程度を反映しており、興味深い特徴が観察された。表 5-2 で示したように塩基置換で最も変異頻度の上昇に寄与しているのは、 $A \rightarrow G$ であった。鋳型である SS+ と SS- を用いたとき $A \rightarrow G$ の検出可能部位がそれぞれ 14 と 15 ヶ所あり、その内それぞれ 8 と 6 ヶ所で検出された (図 5-2)。変異率で考えた場合、一塩基あたり $11 \sim 13 \times 10^6$ となり、Sloane 等 (1988) の α サブユニットを用いた実験で鋳型の T に対しての dGTP の取り込みが 2.2×10^4 であるので約 1/18 の値となる。一方、 $A \rightarrow G$ とちょうど相補的な関係に当たる $T \rightarrow C$ は、鋳型である SS+ と SS- を用いたとき検出可能部位がそれぞれ 15 と 14 ヶ所あり、一塩基あたり $\sim 1.0 \times 10^6$ の変異率となり、Sloane 等 (1988) の α サブユニットを用いた実験で鋳型の A に対しての dCTP の取り込みが 7.7×10^4 である

ので約 1/770 の値となる。Bloom 等 (1997) の実験より、 α サブユニットと α ホロ酵素のミスインサーション頻度にはほとんど差が観察されないことから、今回用いた校正機能欠損型 DNA pol III HE が A:dCMP ミスペアの C から伸長反応することは、結果として同じ変異 (A:T $\rightarrow$ G:C) を誘発することになる T:dGMP ミスペアの G から伸長反応することに比べて計算上約 1/150 しか伸長反応していないことになる。トランジションは Wobble ペアを組むことによって誤った塩基が取り込まれ誘発され则认为られているが (Echols & Goodman, 1991)、今回の結果は α サブユニットによる塩基選択以上にミスマッチ末端からの伸長反応の効率が変異誘発に重要な要素であることが示唆される。

4. 一塩基フレームシフトの発生要因

校正機能欠損型 DNA pol III HE で検出された一塩基フレームシフトは、基本的には同じ塩基が並んだ数が多いほど欠失も付加も変異率の上昇が観察されたのだが、塩基の組成によってその上昇の程度は大きく異なっていた。ランの長さに伴う変異率の上昇は T7 DNA ポリメラーゼ (校正機能欠損型) でも観察されているのだが、プロセッシビティー因子であるチオレドキシンと複合体を形成しているかないかでフレームシフトの発生傾向が大きく異なり、プロセッシビティーの高い染色体の複製に関わる複製酵素とプロセッシビティーの低いポリメラーゼでは、一塩基フレームシフトの発生機構が異なることが示唆されている (Kunkel *et al.*, 1994)。ランの長さに伴う変異率の上昇はランの長さだけではなく周辺の配列にも影響されることが HIV-1 逆転写酵素を用いた研究で知られており (Bebenek *et al.*, 1993)、大腸菌の野生型 DNA pol III HE でも同様な知見が得られている (Seki *et al.*, 1999)。しかし、T7 DNA ポリメラーゼ、T4 DNA ポリメラーゼ、Pfu DNA ポリメラーゼを用いて鋳型が T のランの長さを変化させたとき、周辺配列を極力等しくしてもランの長さに伴う変異率の上昇が観察されたことから、ランの長さに変異率の上昇には密接な関係があることが示唆されている (Kroutil *et al.*, 1996)。

一塩基フレームシフトの発生要因として、1) 新生鎖あるいは鋳型鎖がループアウトする (Streisinger *et al.*, 1966)、2) 誤った塩基の取り込み (Kunkel & Soni, 1988)、3) 新生鎖が別の部位にミスアライメントする (Mo *et al.*, 1991; Rosche *et al.*, 1998)、4) ϵ サブユニットによる新生鎖末端のメルティング (Fujii *et al.*, 1999) のどれかが引き金となり一塩基フレームシフトが誘発され则认为されている。ランの長さに伴う変異率の上昇の要因として、3) のようなストランドスイッチングによるコピー選択では、ランを含む周辺領域の欠失が高頻度に検出されることが期待される。しかし、そのような変異は検出されていないので、3) は発生要因ではないと思われる。また、2) のミスインサーションミスアライメントは、校正機能を欠損させたプロセッシビティーの低いポリメラーゼで観察された知見を元

にして提唱されたモデルである。2) では、新生鎖のミスマッチ末端から効率よく伸長反応できないときにポリメラーゼが DNA 上から解離し、偶発的に新生鎖のミスマッチ末端が鋳型の前後一塩基の相補的な配列と対合して一塩基フレームシフトが誘発されると考えられている。もしそうであるならば、校正機能欠損型 DNA pol III HE で検出された塩基置換の T → C は A → G に比べて非常に低い変異頻度 (表 5-2) であり、恐らくは A:dCMP のミスマッチ末端から効率よく伸長反応できないと思われるので、ノンランで新生鎖上の T の欠失 (鋳型が 3' - AG) や C の付加 (鋳型が 3' - GA) が高頻度に誘発されると予想されるが結果は異なっていた (図 5-3、表 5-3)。また、校正機能はミスマッチ末端を効率よく修復することから、校正機能が存在する野生型 DNA pol III HE の場合では、ミスインサーションミスアライメントが一塩基フレームシフトの主要な発生機構とは考えにくい (Fujii *et al.*, 1999; Seki *et al.*, 1999)。しかし、野生型 DNA pol III HE を用いた *oriC* 系で検出された一塩基フレームシフトのランの長さに伴う変異率の上昇のパターンは (第三章を参照)、校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いた二連続 ssDNA → dsDNA 複製系のパターンとよく似ており、同じ発生要因に起因していると推定される。よって、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で校正機能欠損型 DNA pol III HE を用いて検出された一塩基フレームシフトのうち、ランの長さに伴い変異率が上昇したものに関しては、ミスインサーションミスアライメントを介して誘発されたのではなく、異なる発生機構に起因していると思われる。

一塩基フレームシフトが生じる際にスリッページに起因したと仮定して想定される中間体当たりの変異率 (Kunkel, 1990) を示したのが図 5-4 C、D である。付加のパターンは図 5-4 A とほとんど変わらないが、欠失は鋳型が T のとき 3 塩基から 6 塩基のランで変異率がほぼ同水準になり、鋳型が A のときも 3 塩基から 6 塩基のランで変異率の上昇がある程度抑制されている。また、6A → 7A と 3G → 2G の中間体当たりの変異率は同じであり、ランの長さに応じた鋳型が T の付加と鋳型が C の欠失の発生傾向が似ていることから同じ機構で誘発されているのかもしれない。

スリッページが誘発される発生機構として、仮に α サブユニットの活性中心内で鋳型がピリミジンのランでは、ベント構造 (Dlatic & Harrington, 1995) をとることで一塩基分ループアウトした中間体が安定になるとしたら、鋳型が T と C ではベントの方向性が逆のために鋳型が T では新生鎖側 (付加) が、鋳型が C では鋳型鎖側 (欠失) のループアウトが誘発されやすいのかもしれない。その場合、鋳型が C の付加は誘発されにくいのに比べて鋳型が T の欠失はよく誘発されている (図 5-4) ので、鋳型が T よりも C の方がより強固なベントを形成していると思われる。また、鋳型がプリンランでは、ベント構造をとりにくいために鋳型がピリミジンのランとは異なる発生傾向を示したのかもしれない。あるいは、今回校正機能欠損型として用いた DNA pol III HE は 3' → 5' エキソヌクレアーゼの活性ドメインに変異を導入したため、新生鎖をポリメラーゼの活性中心からエキソヌクレアーゼの活性中心へ転移する活性がなくなったスイッチング変異体 (Stocki *et al.*, 1995) とは異なり

転移活性はあると思われることから、一塩基フレームシフトはメルティングミスアライメント (Fujii *et al.*, 1999) によって誘発されているのかもしれない。野生型 DNA pol III HE は正しいヌクレオチドを取り込んでも 6 % は校正機能により取り除かれると推定されている (Echols *et al.*, 1983) ので、校正機能欠損型 DNA pol III HE でも正しいヌクレオチドを取り込んだ新生鎖末端をポリメラーゼの活性中心からエキソヌクレアーゼの活性中心へ野生型 DNA pol III HE と同様に転移していると考えられる。その場合、校正機能欠損型 DNA pol III HE で変異率が大幅に増大するのは、末端部の塩基を除去できないために野生型 DNA pol III HE に比べて同じ部位で何度もメルティングが起こりミスアライメントをより誘発する、もしくは野生型 DNA pol III HE では一塩基分除去した後、新生鎖を鋳型鎖に戻すが校正機能欠損型 DNA pol III HE では本来よりも一塩基分余計なためミスアライメントがより誘発されるのかもしれない。また、ランの長さに伴う変異率の上昇はミスアライメントのし易さや一塩基分ループアウトした変異中間体の安定性等の要素が働く結果であろう。

今回の結果から、ランにおける一塩基フレームシフトを誘発する塩基配列特異性の特徴として以下の 2 点が挙げられる。1) 中間体の数に依存するタイプで、これは複製酵素自体が偶発的に誘発する複製エラーを反映している。2) 変異を誘発する中間体の数に依存せずランの長さに応じて変異率の上昇が観察されるタイプで、これは複製酵素自体が偶発的に誘発する複製エラーというより鋳型鎖側が変異を特異的に誘発する。但し上記 2 点は独立に作用するのではなく、先ず 1) の状態がありランの長さやランを形成する塩基の種類に依存して 2) が上乗せされると思われるが、傾向として鋳型がプリンのときは 1) がピリミジンのときは 2) の特性が強くていられると思われる。また、1) ではランの長さやランを形成する塩基の種類によらず鋳型鎖側がループアウトする欠失が、新生鎖側がループアウトする付加よりも誘発されやすいのに対して、2) ではランの長さやランを形成する塩基の種類に依存して付加や欠失の誘発のされ易さが異なると思われる。

5. 2 塩基以上の欠失の誘発は校正機能で抑制されない

表 5-1 で示すように、塩基置換と一塩基フレームシフトの発生頻度は、校正機能が欠損することによって大幅な頻度の上昇が観察された。一方、2 塩基以上の欠失の頻度の上昇は、校正機能が欠損していても観察されなかった。この結果から、2 塩基以上の欠失の発生機構と塩基置換や一塩基フレームシフトの発生機構は、異なることが示唆される。また、このことは、 α サブユニットの重合反応を担う活性部位では、構造的に 2 塩基以上のループアウトを許容できないということを意味しているのかもしれない。

野生型および校正機能欠損型 DNA pol III HE で誘発される 2 塩基以上の欠失の大

部分は、繰り返し配列を介して誘発されたものと考えられる（第四章を参照）ので、同一鎖上の異なる部位へ新生鎖の末端が跳んだ結果であろう。複製反応中に欠失が誘発される発生機構として、1）誤った塩基を取り込んで、伸長反応が効率よく行えないために新生鎖の3'末端部が別の相補的な部位にストランドスイッチングする、2）新生鎖の3'末端部が偶発的にもしくはDNA pol III HEを介して別の相補的な部位にストランドスイッチングする、が考えられる。前変異を固定した標品では2塩基以上の欠失の変異頻度は野生型と校正機能欠損型DNA pol III HEではほぼ同じであった（表5-1）。この結果はこれらの変異が誘発される際、校正機能による変異誘発の抑制が行われていないことを示している。つまり、 α サブユニットの忠実度に依存して誘発され、一度誘発したら新生鎖の3'末端部から伸長反応が問題なく行えた結果であると思われる。よって、これらの変異の誘発は、1）の誤った塩基の取り込みが引き金で生じたものではないことが示唆され、主には2）の状況が生じて誘発されたものと推定される。その際、野生型DNA pol III HEでは2塩基以上の欠失の強力なホットスポットが観察されたので（第四章を参照）、鋳型鎖の配列によっては配列特異的にストランドスイッチングを容易に引き起こしうることが示唆される。

第六章

総論と展望

複製エラーに起因した自然突然変異の発生を理解する上で、複製酵素により誘発される複製エラーの実体を解明することは非常に重要な問題である。遺伝学的手法を用いて複製エラーの実体を解明しようとする場合、検出された変異と複製酵素により誘発された複製エラーとの因果関係が間接的なものでありかつ定性的なため、複製エラーの実体を理解することが非常に困難である。そこで、生化学的手法を用いることによって、検出された変異と複製エラーとの因果関係を直接的なものとしかつ定量的にすることで、複製エラーの実体の解明を目指した。*oriC*系を用いることによって、試験管内で複製酵素によって誘発された複製エラーを検出できた。しかし、ここで検出された複製エラーが正常な塩基間に由来したものであるのかどうかを判断するとき、鋳型のバックグラウンド変異とミューテーター変異株からの遺伝学的なデータとの比較によって推定するため、その判断は間接的であった。一方、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で検出した複製エラーは、前変異を固定する前の標品との比較により、直接的に検出された複製エラーが正常な塩基間に由来したものであるのかどうかを判断することが可能になった。二連続 ssDNA → dsDNA 複製系から、校正機能が欠損したときに誘発される点突然変異（塩基置換、一塩基フレームシフト）では、変異の型によって高頻度に誘発される変異とあまり誘発されない変異とで大きな変異率の差が観察された。しかし、野生型 DNA pol III HE との比較から、それらの変異が正常な塩基間に由来している限り、変異の型を問わず一様に効率よく校正機能によって修復され、正常な塩基間に由来した点突然変異の変異率は、 $\sim 10^8$ / 塩基 / 複製と推定された。大腸菌内では複製後修復系による正常な塩基間からなる前変異の修復効率は 99.6 % 以上であると思われるので、結果として最終的に残る複製エラーに起因した自然突然変異率は、 $\sim 10^{11}$ / 塩基 / 複製と推定される。この値は、遺伝学的に推定されている値に比べて (Drake, 1991; Schaaper, 1993) 若干あるいは一桁低い値である。また、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系では、損傷塩基（自然 DNA 損傷）に由来したと思われる点突然変異が多数検出され、これらの損傷塩基に由来した前変異は校正機能や複製後修復系による修復を容易に免れるように思われた。よって、複製エラーに起因した自然突然変異の発生には、正常な塩基間に由来した複製エラーはほとんど寄与しておらず、損傷塩基に由来した複製エラーが主要な原因なのかもしれない。その場合、複製反応前に DNA 中や dNTP プール中から如何に損傷塩基を取り除くかが、変異の発生を抑制するための重要な問題となる。あるいは、最近、大腸菌の DinB と UmuC が DNA ポリメラーゼであることがわかり (Wagner *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999)、特に DinB を細胞内で過剰発現させると自然突然変異頻度の上昇が観察されることから (Kim *et al.*, 1997)、複製エラーに起因した自然突然変異の発生には、DNA pol III HE 以外の DNA ポリメラーゼが寄与しているのかもしれない。

*oriC*系と二連続 ssDNA → dsDNA 複製系との比較から複製様式の違いが DNA pol III HE の忠実度に影響を及ぼすことが示唆された。遺伝学的な研究から、大腸菌の複製開始点である *oriC* から複製が開始した後、そのまま安定に複製が進行していく

わけではなく、何度か複製フォークの再生が PriA を介して起こっていると示唆されている (Kogoma, 1997; Liu *et al.*, 1999)。PriA を介した複製フォークの再形成では、*oriC* で形成される複製フォークと異なり PriA を含めた複数のタンパク質が複製フォークを形成していると思われる (Ng & Marians, 1996; Liu *et al.*, 1999)。よって、このような PriA 等を含んだ複製フォークでは、DNA pol III HE の忠実度に影響を及ぼしているのかを知ることは、複製エラーに起因した自然突然変異の発生を理解する上で重要なことであると思われる。

oriC 系と二連続 ssDNA → dsDNA 複製系との比較から、リーディング鎖複製の方がラギング鎖複製よりも忠実度が低いかもしれないと思われた。そこで、直接的にこの問題を検証する方法として、ローリングサークル型複製系と二連続 ssDNA → dsDNA 複製系とを組み合わせればよいと思われる。*oriC* 系と異なり、試験管内で一本鎖の突出末端をもたせた OC DNA を鋳型 DNA として、その一本鎖上に直接 DnaB をローディングさせることで複製フォークを再構成できることが報告されている

(Yuzhakov *et al.*, 1996)。そこで、試験管内で pFS4 プラスミド DNA 上に一本鎖の突出末端をもたせ、これを鋳型 DNA として鋳型鎖の特定ができるローリングサークル型複製を行わせる。次に、*oriC* 系と同様にユニークな制限酵素で単位長にし、リガーゼにより自己環状化させる。この自己環状化させた複製産物の二本鎖は、それぞれリーディング鎖複製とラギング鎖複製に由来した新生鎖なので、二連続 ssDNA → dsDNA 複製系で用いた方法と同様にリーディング鎖複製とラギング鎖複製に由来した新生鎖を試験管内で調製した後、それらを鋳型としてプライマー伸長反応を行うことで変異として固定する。そして、これらの標品で検出される複製エラーを相互に比較することで、リーディング鎖複製とラギング鎖複製には忠実度に差があるのか、また誘発される変異に特異性があるのか等を解析できることが期待される。

参考文献

Avery, O. T., MacLoeb, C. M. & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *Pneumococcus* types. *J. Exp. Med.* 79, 137-158.

Bebenek, K., Abbotts, J., Wilson, S. H. & Kunkel, T. A. (1993). Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. Contribution of template-primer misalignment, miscoding, and termination probability to mutational hot spots. *J Biol Chem* 268(14), 10324-34.

Bebenek, K. & Kunkel, T. A. (1990). Frameshift errors initiated by nucleotide misincorporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(13), 4946-50.

Bloom, L. B., Chen, X., Fygenon, D. K., Turner, J., O'Donnell, M. & Goodman, M. F. (1997). Fidelity of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. The effects of beta, gamma complex processivity proteins and epsilon proofreading exonuclease on nucleotide misincorporation efficiencies. *J Biol Chem* 272(44), 27919-30.

Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41(3), 459-72.

Brenowitz, S., Kwack, S., Goodman, M. F., O'Donnell, M. & Echols, H. (1991). Specificity and enzymatic mechanism of the editing exonuclease of *Escherichia coli* DNA polymerase III. *J Biol Chem* 266(12), 7888-92.

Carraway, M., Rewinski, C. & Marinus, M. G. (1990). Mutations produced by DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli* after in vitro synthesis in the absence of single-strand binding protein. *Mol Microbiol* 4(10), 1645-52.

Chang, A. C. & Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134(3), 1141-56.

Cohen, S. N. & Change, A. C. (1977). Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. *J Bacteriol* 132(2), 734-7.

Connelly, J. C., Kirkham, L. A. & Leach, D. R. (1998). The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14), 7969-74.

Dlakic, M. & Harrington, R. E. (1995). Bending and torsional flexibility of G/C-rich sequences as determined by cyclization assays. *J Biol Chem* 270(50), 29945-52.

Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16(13), 6127-45.

Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16), 7160-4.

Duncan, B. K. & Weiss, B. (1982). Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 151(2), 750-5.

- Echols, H. & Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* 60, 477-511.
- Echols, H., Lu, C. & 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. (1979). Fidelity of replication of phage phi X174 DNA by DNA polymerase III holoenzyme: spontaneous mutation by misincorporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(10), 4946-50.
- Fijalkowska, I. J., Jonczyk, P., Tkaczyk, M. M., Bialoskorska, M. & Schaaper, R. M. (1998). Unequal fidelity of leading strand and lagging strand DNA replication on the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17), 10020-5.
- Fujii, S., Akiyama, M., Aoki, K., Sugaya, Y., Higuchi, K., Hiraoka, M., Miki, Y., Saitoh, N., Yoshiyama, K., Ihara, K., Seki, M., Ohtsubo, E. & Maki, H. (1999). DNA Replication Errors Produced by the Replicative Apparatus of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 289(4), 835-850.
- Fujii, S. & Maki, H. (in preparation). Fidelity of the DNA Polymerase III Holoenzyme of *Escherichia coli* is higher during Primer Extension Reaction than during Reaction Formed Replication Fork in vitro.
- Fujii, S., Masuda, Y., Ihara, K. & Maki, H. (in preparation). Sequence Specificity of DNA Replication Errors Produced by a Proofreading-deficient DNA Polymerase III Holoenzyme of *Escherichia coli* in vitro.
- Funatsu, G. & Wittmann, H. G. (1972). Ribosomal proteins. 33. Location of amino-acid replacements in protein S12 isolated from *Escherichia coli* mutants resistant to streptomycin. *J Mol Biol* 68(3), 547-50.
- Funnell, B. E., Baker, T. A. & Kornberg, A. (1986). Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem* 261(12), 5616-24.
- Gallinari, P. & Jiricny, J. (1996). A new class of uracil-DNA glycosylases related to human thymine-DNA glycosylase. *Nature* 383(6602), 735-8.
- Giroux, C. N., Mis, J. R., Pierce, M. K., Kohalmi, S. E. & Kunz, B. A. (1988). DNA sequence analysis of spontaneous mutations in the SUP4-o gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8(2), 978-81.
- Golding, G. B., Gearhart, P. J. & Glickman, B. W. (1987). Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes. *Genetics* 115(1), 169-76.
- Golding, G. B. & Glickman, B. W. (1985). Sequence-directed mutagenesis: evidence from a phylogenetic history of human alpha-interferon genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(24), 8577-81.

- Griffith, F. (1928). The significance of Pneumonococal types. *J. Hyg.* 27, 113-159.
- Hartnett, C., Neidle, E. L., Ngai, K. L. & Ornston, L. N. (1990). DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 3,4-dioxygenase: evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences within genes during their evolutionary divergence. *J Bacteriol* 172(2), 956-66.
- Hashimoto-Gotoh, T., Kume, A., Masahashi, W., Takeshita, S. & Fukuda, A. (1986). Improved vector, pHSG664, for direct streptomycin-resistance selection: cDNA cloning with G:C-tailing procedure and subcloning of double-digest DNA fragments. *Gene* 41(1), 125-8.
- Hoffmann, G. R. & Fuchs, R. P. (1997). Mechanisms of frameshift mutations: insight from aromatic amines. *Chem Res Toxicol* 10(4), 347-59.
- Horiuchi, T., Maki, H. & Sekiguchi, M. (1989). Mutators and fidelity of DNA replication. *Bulletin de l'Institute Pasteur* 87, 309-36.
- Kaguni, J. M. & Kornberg, A. (1984). Replication initiated at the origin (oriC) of the *E. coli* chromosome reconstituted with purified enzymes. *Cell* 38(1), 183-90.
- Kim, S., Dallmann, H. G., McHenry, C. S. & 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. R., Maenhaut-Michel, G., Yamada, M., Yamamoto, Y., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T. & Ohmori, H. (1997). Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25), 13792-7.
- Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(2), 212-38.
- Kroutil, L. C., Frey, M. W., Kaboord, B. F., Kunkel, T. A. & Benkovic, S. J. (1998). Effect of accessory proteins on T4 DNA polymerase replication fidelity. *J Mol Biol* 278(1), 135-46.
- Kroutil, L. C., Register, K., Bebenek, K. & Kunkel, T. A. (1996). Exonucleolytic proofreading during replication of repetitive DNA. *Biochemistry* 35(3), 1046-53.
- Kunkel, T. A. (1985). The mutational specificity of DNA polymerase-beta during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations. *J Biol Chem* 260(9), 5787-96.
- Kunkel, T. A. (1990). Misalignment-mediated DNA synthesis errors. *Biochemistry* 29(35), 8003-11.
- Kunkel, T. A., Patel, S. S. & Johnson, K. A. (1994). Error-prone replication of repeated DNA sequences by T7 DNA polymerase in the absence of its processivity subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15), 6830-4.

- Kunkel, T. A. & Soni, A. (1988). Mutagenesis by transient misalignment. *J Biol Chem* 263(29), 14784-9.
- Lahue, R. S., Au, K. G. & Modrich, P. (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 245(4914), 160-4.
- Lindahl, T. & Nyberg, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11(19), 3610-8.
- Liu, J., Xu, L., Sandler, S. J. & Marians, K. J. (1999). Replication fork assembly at recombination intermediates is required for bacterial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7), 3552-5.
- Lohman, T. M., Green, J. M. & Beyer, R. S. (1986). Large-scale overproduction and rapid purification of the *Escherichia coli* ssb gene product. Expression of the ssb gene under lambda PL control. *Biochemistry* 25(1), 21-5.
- Luria, S. E. & Delbruck, M. (1943). Mutations of bacteria from virous sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28, 491-511.
- Lyons-Darden, T. & Topal, M. D. (1999). Abasic sites induce triplet-repeat expansion during DNA replication in vitro. *J Biol Chem* 274(37), 25975-8.
- Maki, H. & 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., Maki, S. & 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. & Sekiguchi, M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355(6357), 273-5.
- Maki, S., Takiguchi, S., Miki, T. & Horiuchi, T. (1992). Modulation of DNA supercoiling activity of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins. Antagonistic actions of LetA (CcdA) and LetD (CcdB) proteins. *J Biol Chem* 267(17), 12244-51.
- Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A. P. & Miller, J. H. (1992). Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15), 7022-5.
- Miller, J. H. (1996). Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol* 50, 625-43.
- Mo, J. Y., Maki, H. & 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.

- Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 25, 229-53.
- Nakajima, N., Ozeki, H. & Shimura, Y. (1981). Organization and structure of an *E. coli* tRNA operon containing seven tRNA genes. *Cell* 23(1), 239-49.
- Ng, J. Y. & Marians, K. J. (1996). The ordered assembly of the phiX174-type primosome. II. Preservation of primosome composition from assembly through replication. *J Biol Chem* 271(26), 15649-55.
- Parker, B. O. & Marinus, M. G. (1992). Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(5), 1730-4.
- Pavlov, Y. I., Minnick, D. T., Izuta, S. & Kunkel, T. A. (1994). DNA replication fidelity with 8-oxodeoxyguanosine triphosphate. *Biochemistry* 33(15), 4695-701.
- Pham, P. T., Olson, M. W., McHenry, C. S. & Schaaper, R. M. (1998). The base substitution and frameshift fidelity of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme in vitro. *J Biol Chem* 273(36), 23575-84.
- Raleigh, E. A., Murray, N. E., Revel, H., Blumenthal, R. M., Westaway, D., Reith, A. D., Rigby, P. W., Elhai, J. & Hanahan, D. (1988). McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning [published erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1995 Sep 11;23(17):3612]. *Nucleic Acids Res* 16(4), 1563-75.
- Ripley, L. S. (1982). Model for the participation of quasi-palindromic DNA sequences in frameshift mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(13), 4128-32.
- Ripley, L. S., Clark, A. & deBoer, J. G. (1986). Spectrum of spontaneous frameshift mutations. Sequences of bacteriophage T4 rII gene frameshifts. *J Mol Biol* 191(4), 601-13.
- Rosche, W. A., Ripley, L. S. & Sinden, R. R. (1998). Primer-template misalignments during leading strand DNA synthesis account for the most frequent spontaneous mutations in a quasipalindromic region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 284(3), 633-46.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning; A laboratory manual.*, (New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schaaper, R. M. (1993). Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268(32), 23762-5.
- Schaaper, R. M., Danforth, B. N. & Glickman, B. W. (1986). Mechanisms of spontaneous mutagenesis: an analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli* lacI gene. *J Mol Biol* 189(2), 273-84.
- Schaaper, R. M. & Dunn, R. L. (1987). Spectra of spontaneous mutations in *Escherichia coli* strains defective in mismatch correction: the nature of in vivo DNA replication errors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(17), 6220-4.

- Schaaper, R. M. & Dunn, R. L. (1991). Spontaneous mutation in the *Escherichia coli* lacI gene. *Genetics* 129(2), 317-26.
- Schaaper, R. M. & Loeb, L. A. (1981). Depurination causes mutations in SOS-induced cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(3), 1773-7.
- Scheuermann, R. H. & Echols, H. (1984). A separate editing exonuclease for DNA replication: the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(24), 7747-51.
- Seki, M., Akiyama, M., Sugaya, Y., Ohtsubo, E. & Maki, H. (1999). Strand asymmetry of +1 frameshift mutagenesis at a homopolymeric run by DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli* [In Process Citation]. *J Biol Chem* 274(47), 33313-9.
- Sekimizu, K., Yung, B. Y. & Kornberg, A. (1988). The dnaA protein of *Escherichia coli*. Abundance, improved purification, and membrane binding. *J Biol Chem* 263(15), 7136-40.
- Sloane, D. L., Goodman, M. F. & Echols, H. (1988). The fidelity of base selection by the polymerase subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *Nucleic Acids Res* 16(14A), 6465-75.
- Sohail, A., Lieb, M., Dar, M. & Bhagwat, A. S. (1990). A gene required for very short patch repair in *Escherichia coli* is adjacent to the DNA cytosine methylase gene. *J Bacteriol* 172(8), 4214-21.
- Stocki, S. A., Nonay, R. L. & Reha-Krantz, L. J. (1995). Dynamics of bacteriophage T4 DNA polymerase function: identification of amino acid residues that affect switching between polymerase and 3' → 5' exonuclease activities. *J Mol Biol* 254(1), 15-28.
- Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E. & Inouye, M. (1966). Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31, 77-84.
- Tajiri, T., Maki, H. & Sekiguchi, M. (1995). Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 336(3), 257-67.
- Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R. & Goodman, M. F. (1999). UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16), 8919-24.
- Thomas, D. C., Roberts, J. D., Sabatino, R. D., Myers, T. W., Tan, C. K., Downey, K. M., So, A. G., Bambara, R. A. & Kunkel, T. A. (1991). Fidelity of mammalian DNA replication and replicative DNA polymerases. *Biochemistry* 30(51), 11751-9.
- Treffers, H. P., Spinell, V. & Belser, N. O. (1954). A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 1064-1071.

- van der Ende, A., Baker, T. A., Ogawa, T. & Kornberg, A. (1985). Initiation of enzymatic replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome: primase as the sole priming enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(12), 3954-8.
- Wagner, J. & Fuchs, R. P. (1997). Frameshift mutagenesis induced in *Escherichia coli* after in vitro treatment of double-stranded DNA with methylene blue plus white light: evidence for the involvement of lesion(s) other than 8-oxo-7,8-dihydro- 2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 10(5), 568-74.
- Wagner, J., Gruz, P., Kim, S. R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R. P. & Nohmi, T. (1999). The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell* 4(2), 281-6.
- Wang, D., Kreutzer, D. A. & Essigmann, J. M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat Res* 400(1-2), 99-115.
- Warner, H. R. & Duncan, B. K. (1978). In vivo synthesis and properties of uracil-containing DNA. *Nature* 272(5648), 32-4.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids; A structure for deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Wertman, K. F., Wyman, A. R. & Botstein, D. (1986). Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene* 49(2), 253-62.
- Weymouth, L. A. & Loeb, L. A. (1978). Mutagenesis during in vitro DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(4), 1924-8.
- Yuzhakov, A., Turner, J. & O'Donnell, M. (1996). Replisome assembly reveals the basis for asymmetric function in leading and lagging strand replication. *Cell* 86(6), 877-86.
- Zhang, Q. M., Ishikawa, N., Nakahara, T. & Yonei, S. (1998). *Escherichia coli* MutY protein has a guanine-DNA glycosylase that acts on 7,8-dihydro-8-oxoguanine:guanine mispair to prevent spontaneous G:C-->C:G transversions. *Nucleic Acids Res* 26(20), 4669-75.

謝辞

本研究を行うにあたり御指導下さいました奈良先端科学技術大学院大学、真木寿治教授に感謝致します。日頃より貴重なご助言を下さいました秋山昌広助教授、真木智子助手、藤川勝義氏、奈良先端科学技術大学院大学原核生物分子遺伝学講座の皆様、ならびに有用な実験材料を分与して下さいました井原啓一氏に感謝致します。常に有意義な討論をして下さいました、梅津桂子助手、増田雄司博士に感謝致します。最後になりましたが、大学院への進学を許して下さいました両親に心よりお礼申し上げます。