DNA複製領域の 遺伝子工学的手法による分離

国立遺伝学研究所 安田 成一*

どのようなレプリコンであれ、DNA複製を生化学的に研究する上で、その分子量が大きすぎることは多くの不都合の原因となる。複製に関与するDNA領域のみを他の部分から分離できれば種々の操作、分析が容易になると思われる。ここでは複製に関与する領域を分離した研究例のうち筆者自身のものも含めて、薬剤抵抗性遺伝子をもつDNAをマーカーとして利用し遺伝子工学的手法を用いたものについて述べる。この方法の原理は、それ自身では複製能のないマーカーDNA（薬剤抵抗性遺伝子を含む）と結合して、それを薬剤抵抗性プラスミドとして複製させ得るようなDNAフラグメントを選択することである。

1. F 因子

Timmisら¹⁾は *Staphylococcus aureus* のペニシリン耐性産生プラスミド pI 258 のアンピシリン抵抗性遺伝子を含む *Eco* RI フラグメントを精製し、F *lac* 因子DNAの *Eco* RI 分解物と混合し、DNAリガーゼ処理を行なって、次にこれをCaCl₂処理したアンピシリン感受性大腸菌にとりこませた後、アンピシリン抵抗性のコロニを選択した。その菌株から彼等はF因子の複製領域のDNAフラグメント(6 Md)とアンピシリンフラグメント(4.5 Md)とから新しいプラスミド pSC138を得た。そのF部分の分子量はもとのF *lac* DNAの9.5 Mdにくらべて約1/16である。pSC138にはもとのF *lac* 因子にあったラクトース発酵能やトランスファー能力はない。しかし複製の種々の特徴、例えば他のF因子と同一細胞内で安定に共存できないこと、細胞当りのDNAコピー数が約1であること、アクリジンオレンジで複製が阻害されること、また *dna A* 宿主菌を integrative suppression する能力などはもとのF *lac* 因子と同様である。これらのことから pSC 138は、6 MdのF因子部分の機能によって複製しているものと結論された。このフラグメントは少なくともF特異的な複製蛋白質

の構造遺伝子と、その標的であるDNA複製開始部位のヌクレオチド配列を含んでいると考えられる。

Lovett および Helinski²⁾ は、R因子の一種 R 6-5 由来のカナマイシンフラグメントを用いて、Timmisらと同様にF因子の複製領域をクローン化した。得られたプラスミド pML 31はその複製に関する性質では pSC 138と同様であった。後にこれら2種の独立に得られたプラスミドはF因子の同じDNA部分を含んでいることが電子顕微鏡によるDNAのヘテロデュプレックス法で確認された³⁾。また、F *lac* DNA中でのこの複製フラグメントの位置がやはりヘテロデュプレックス法で決定されたが⁴⁾、その結果は、F因子の欠失変異株の分析から、F因子の複製に必須であると推定されていた領域と一致した。

以上のように複製領域の分離のためのこの方法の有効性は明らかである。この方法で得られたプラスミドを用いて初めて可能になった研究として次のものが挙げられる。

Eichenlaubら⁵⁾は、ミニF-カナマイシンプラスミドであるpML 31を用いFの複製が、DNA上のある一定点から始まって両方向に向かって進むことを明らかにした。彼等の方法は、複製途上のpML 31 DNA分子を、エチジウムブロマイド存在下でのその特殊な密度によって分離精製し、電子顕微鏡で複製した部分の長さや位置を(制限酵素によって切られる位置を標準として)数多くの分子について測定するというものである。このような研究はもとのF因子のように巨大なDNA分子をそのまま用いていたのでは困難であったものである。

近い将来、これらミニFプラスミドを用いての複製開始部位のヌクレオチド配列の決定、F特異的な複製蛋白質の分離、それに *in vitro*でのF因子の複製などの報告があらわれるであろう。

2. R 因子

Timmisら¹⁾は、R因子R6-5の複製領域を、pSC 138を分離したのと同様にアンピシリンフラグメントと結合することによりクローン化した。このプラスミ

Cloning of replication regions of various replicons.

* S. Yasuda (National Institute of Genetics)

現在の所属 米国スタンフォード大学

ド pSC 135 の R6-5 部分は 11.8 Md で、もとの R6-5 の約 1/5 の大きさである。R6-5 のもつトランスファー能と 4 剤 (クロラムフェニコール, ストレプトマイシン, スルファミドおよびカナマイシン) 抵抗性をすべて失っているが, 細胞当りのコピー数, *dna A* 宿主を integrative suppression する能力を有することなど, 複製に関する機能は R6-5 と同じである。また複製領域の, R6-5 DNA 内での位置が決定された。このプラスミドについてはそれ以上に詳しく調べられていない。

3. 大腸菌

筆者ら⁶⁾は上記のものと同様の方法で大腸菌の複製領域をプラスミドとしてクローン化した。宿主は同じ大腸菌なので, 複製蛋白質はすべて宿主から供給されるため, DNA としてはそれらの標的である複製開始部位を含むだけでよい。その手順を図 1 に示す。

図1 大腸菌 DNA の複製開始部位のクローニングの手順。太線はアンピシリンフラグメント, 線上の小円は DNA 上の *Eco* RI site を示す。

まずマーカー DNA として pSC 138 のアンピシリンフラグメントを用いることにしたが, それを大量に調製するためにまずミニ ColE1 である pVH51⁷⁾ プラスミド上にクローン化しなおし, そのミニ ColE1- アンピシリンプラスミド pYT10⁸⁾ からアンピシリンフラグメントを調製した。一方大腸菌 1100 株 (*end A*) の DNA を *Eco* RI で完全分解し, アンピシリンフラグメントと合わせてリガーゼ処理をおこなった。この DNA 混合溶液を大腸菌 LC 248 (*Hfr rec A*) 株に CaCl_2 法で形質転換し, アンピシリン抵抗性菌を選択した。独立に

得られた 3 株のアンピシリン抵抗性菌を調べたところ, すべて同じ大きさのプラスミドを含むことが判明した。それらのうちの 1 つ pSY 211 について詳しく調べた結果, これが *E. coli* の複製開始部位を含むものであるとわれわれは結論した。以下にその根拠になった pSY 211 の諸性質をのべる。

(1) pSY 211 の DNA の構造

pSY 211 DNA は分子量 10.7 Md の開環状プラスミドとして得られるが, これを *Eco* RI で処理すると, 4.5 Md のアンピシリンフラグメントと, 6 Md の染色体由来と考えられる DNA とに分解される。アンピシリンフラグメントには複製能がないことが証明されているので, 6 Md の DNA フラグメント中に複製機能が存在する筈である。pSY 211 は *Eco* RI で 2 か所, *Bam* HI で 4 か所, *Hin* d III でも 4 か所, それに *Xho* I で 2 か所切断される。これらの酵素による restriction map を図 2 に示す。6 Md の *Eco* RI フラグメントの *Hin* d III map を図 2 中段に改めて示してあるが, この構造は, Marsh と Worcel⁹⁾ が報告した大腸菌染色体の複製開始領域の DNA の *Eco* RI-*Hin* d III map とほぼ完全に一致する (図 2 下段)。彼等の方法は, *dna A* または *dna C* の温度感受性変異株を用いて高温で DNA 複製を一たん終結させ, 次にそれを低温に移すことにより DNA の複製の開始をシンクロナイズし, 複

図2 pSY 211 の restriction map. 上段 太線部分はアンピシリンフラグメント。中段 pSY 211 の 6 Md *Eco* RI フラグメント内の *Hin* d III site とそれらの間の距離 (Md)。下段 Marsh & Worcel による大腸菌染色体複製開始領域の restriction map。両端は *Eco* RI site。内部の *Hin* d III site 3 か所とそれらの間の距離を示す。

複製開始領域を特異的にパルスラベルし、このラベルを指標として *Eco* RI と *Hin* d III とで restriction map を作製したものである。このように全く異なる原理で得られた結果が著しい一致を示したので、pSY 211 の 6 Md の *Eco* RI フラグメントが大腸菌染色体の複製開始部位を含むものであると結論できる。

(2) pSY 211 は不安定なプラスミドである

pSY 211 を含む大腸菌 LC 248 (Hfr *rec A*) をアンピシリンのない栄養培地で一夜培養すると、ほとんどの菌は pSY 211 を失っており、約 1/60 の菌がこれを保持しているにすぎない。平賀¹⁰⁾は、大腸菌の複製開始部位を含む F 因子、F *poh*⁺ を分離したが(本特集、平賀・三木の項参照)、これも Hfr *rec A* 菌では非常に失われやすい。このことは、同一の細胞内に 2 つの複製開始部位が含まれるため、これらが少数しかない複製蛋白質を奪い合う結果と考えることができる。

(3) pSY 211 は *rec*⁺ 株では宿主染色体の複製開始部位に組み込まれる

pSY 211 は *rec A* 株中ばかりでなく *rec*⁺ 株中でも不安定であるが、*rec*⁺ 株では、pSY 211 のアンピシリン抵抗性が安定に保たれるようになった菌が高頻度で出現する。これらの安定なアンピシリン抵抗性を示す菌では、pSY 211 の全分子が、宿主菌染色体の一定位置——遺伝子地図の *dnaA* と *ilv* の中間——に組み込まれていることが、P1 による形質導入で明らかになった。この *dnaA-ilv* 領域は今まで種々の方法で複製開始部位が map されて来たところである。¹⁰⁻¹⁴⁾ *rec A* 菌ではこのような組み込みは見られないので、この組み込みの過程は *rec A*⁺ 依存である。このことは pSY 211 上のヌクレオチド配列と共通の配列が染色体の *dnaA-ilv* 領域にあることを意味する。¹⁵⁾ 以上のことは、pSY 211 が大腸菌の複製開始部位を含むという結論をさらに強く支持する。

(4) 大腸菌の遺伝子地図上での複製開始部位の位置の決定

今まで多くの研究者により大腸菌の複製開始部位の位置決定が試みられ、現在では *dnaA-ilv* 領域のあたりにあると考えられているが、いずれの方法もその分解能が悪く、それ以上の詳しい位置決定はできなかった。pSY 211 が染色体の複製開始部位で組み込まれるので、そのアンピシリン抵抗性遺伝子を詳しく map すれば、それが即ち複製開始部位の map であることになる。P1 による形質導入でこれを行なったところ、複製開始部位は *uncA* 遺伝子と *rbsK* 遺伝子の中間にあることが判明した(図 3)。これは今まで報告された複製開始部

位の位置の決定に関するどの結論よりも精度の高いものである。

図 3 大腸菌遺伝子地図¹⁶⁾ 上での複製開始部位の位置を矢印で示す。

(5) pSY 211 分子内での複製開始部位の位置の決定

pSY 211 DNA は *Bam* HI で 4 つのフラグメント(6.6, 2.0, 1.2, および 0.4 Md)に切断される(図 2 参照)が、これらのうちのどのフラグメントに複製開始部位が存在するかを調べるため、われわれはミニ F-カナマイシンプラスミド pML31 の derivative である pMF 21¹⁷⁾ (*Bam* HI で 1 か所のみ切断される)を、pSY 211 とともに *Bam* HI で分解し、リガーゼ処理後 Hfr *rec A* 株に形質転換を行ない、カナマイシン抵抗菌を選択した。Hfr 菌中では pMF 21 は増殖できないので、この *Bam* HI site に何らかの別のレプリコンが挿入されたプラスミドをもつ菌のみが選択される筈である。その結果得られたプラスミドはすべて、pMF 21 の DNA の他に、pSY 211 の 1.2 Md の *Bam* HI フラグメントを含んでいた。このことは、この 1.2 Md フラグメントに複製開始部位が含まれていることを示す。

以上に述べてきたように大腸菌の複製開始部位の DNA が全染色体の約 1/300 の大きさの閉環状プラスミドとして容易に取扱えるようになったので、大腸菌染色体の複製に関する生化学的研究が大いに発展することが期待される。筆者自身、現在 A. Kornberg 研でこのプラスミドの *in vitro* 複製の研究に取り組んでいるところである。また杉本、高浪らによって 1.2 Md フラグメントのヌクレオチド配列の決定が進行中である。原理的にはどのようなレプリコンからも同じ方法で複製開始部位がクローン化できる筈なので、それらのヌクレオチド配列の比較などによってレプリコン間の相互関係

を知ること可能になるであろう。

文 献

- 1) Timmis, K., Cabello, F., Cohen, S. N. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 2242-2246.
- 2) Lovett, M. A., Helinski, D. R. (1976) *J. Bacteriol.*, **127**, 982-987.
- 3) Skurray, R. A., Guyer, M. S., Timmis, K., Cabello, F., Cohen, S. N., Davidson, N., Clark, A. J. (1976) *J. Bacteriol.*, **127**, 1571-1575.
- 4) Guyer, M. S., Figurski, D., Davidson, N. (1976) *J. Bacteriol.*, **127**, 988-997.
- 5) Eichenlaub, R. E., Figurski, D., Helinski, D. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 1138-1141.
- 6) Yasuda, S., Hirota, Y. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5458-5462.
- 7) Hershfield, V., Boyer, H. W., Chow, L., Helinski, D. R. (1976) *J. Bacteriol.*, **126**, 447-453.
- 8) 武田穰 安田成一, 未発表
- 9) Marsh, R. C., Worcel, A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 2720-2724.
- 10) Hiraga, S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 198-202.
- 11) Bird, R. E., Louarn, J., Martsucelli, J., Caro, L. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, **70**, 549-551.
- 12) Hohlfeld, R., Vielmetter, W. (1973) *Nature New Biol.*, **242**, 130-132.
- 13) Louarn, J., Funderburgh, M., Bird, R. E. (1974) *J. Bacteriol.*, **120**, 1-5.
- 14) Masters, M. (1975) *Mol. Gen. Genet.*, **143**, 105-111.
- 15) Franklin, N. C. (1971) *The Bacteriophage Lambda* (Hershey, A. D. ed.) pp. 175-194, Cold Spring Harbor Laboratory.
- 16) Bachmann, B. J., Low, K. B., Taylor, A. L. (1976) *Bacteriol. Rev.*, **40**, 116-167.
- 17) Manis, J. J., Kline, B. C. (1977) *Mol. Gen. Genet.*, **152**, 175-182.

(1978年4月3日受理)

53年度 編集実行委員

委員長 石 浜 明 (京大・ウイルス研究所)
副委員長 御 橋 廣 真 (名大・理・物理学)

浅 野 朗 (阪大・蛋白質研究所)	品 川 嘉 也 (京大・医・生理)
井 口 八 郎 (京大・理・生物物理)	外 村 辨 一 郎 (京大・農・食品工学)
植 木 龍 夫 (阪大・基礎工・生物工学)	中 岡 保 夫 (阪大・基礎工・生物工学)
奥 田 賢 三 (大阪工大・一般教育・数理生物)	中 西 守 (東大・薬・薬品物理化学)
北 川 禎 三 (阪大・蛋白質研究所)	丹 羽 太 貫 (京大・医・放射線基礎医学)
北 里 宏 (滋賀医大・第二生理)	森 島 續 (京大・工・石油化学)

(五十音順)