大腸菌における紫外線障害の光修復機構に関する研究

A Study on the Mechanism of Photoreactivation in *Escherichia coli*

国立栄養研究所 (The National Institute of Nutrition)

山 崎 陽 代 (Haruyo Yamazaki) 真 田 宏 夫 (Hiroo Sanada)

鈴 江 緑 衣 郎 (Ryokuero Suzue) 中 嶋 洋 子 (Yoko Nakashima)

河 田 正 治 (Shoji Kawada)

Photoreactivation of ultraviolet (UV) damage has been demonstrated in many bacteria, plants and animals.

In the previous paper, we reported on the phenomenon of photoreactivation in vitamin B₁ requiring mutants of *E. coli* B. The present study was performed to clarify the mechanism of photoreactivation.

E. coli DNA labeled with ³H-thymidine was irradiated with UV light of 255 mμ. In the presence of visible light, the irradiated DNA was incubated with enzyme which was extracted from *E. coli* B. The reaction was terminated by addition of trichloroacetic acid. The precipitated DNA was hydrolyzed with formic acid, paper chromatographed and the radioactivity of each fraction was counted.

As the result of this experiment, a new radioactive peak of thymine dimer with R_f value 0.24 was observed.

However, about 30% of the dimers were split off from irradiated DNA by photoreactivating treatment.

It was concluded that photoreactivating enzyme exists in *E. coli* B, and UV-induced thymine dimers in DNA are eliminated by the enzyme in the presence of light.

著者らは前報において、ビタミンB₁要求大腸菌変異株における紫外線障害の光修復作用について報告し、ビタミン B₁ 要求変異株の種類によって光修復能力に差があることや、変異株は野生株に比べて光修復能力が低いことなどを認めた¹⁾。そこで今回は大腸菌における紫外線障害の光修復作用機構について研究した。

紫外線障害の原因の多くは、紫外線照射が細胞に影響を及ぼして DNA に変化を起こすことであり、この細胞内 DNA の変化の中で生物学的に特に重要なものはチミンダイマーの形成であることが報告されている^{2)~4)}。そして紫外線障害の光修復機構は DNA 上に生じたチミンダイマーの monomerization と関係があり、そこに関与する酵素は光によって活性化されて DNA のチミンダイマーに作用するのであろうということが報告されている⁵⁾⁶⁾。

この光修復酵素は、酵母については Muhammed によって分離精製されており⁷⁾、紫外線照射した DNA を酵母の光修復酵素とともに光を照射しながらインキュベートすることによって、チミンダイマーの monomerization が行なわれたことが報告されている⁸⁾⁹⁾。

このように酵母の光修復酵素に関する報告は多いが、大腸菌に関してはあまり報告されていない。そこで著者らは前報で報告した大腸菌の光修復作用が、大腸菌に存在するであろう光修復酵素によるチミンダイマーの monomerization によるものであるかを調べ、紫外線障害の光修復機構について研究したので報告する。

実験材料

(1) 使用菌株

^3H -DNA抽出には、金沢大学医学部久野教授より分与された *E. coli* W (3110-217) チミン要求菌を使用し、光修復酵素源として *E. coli* B (ATCC 11303) を使用した。

(2) 使用培地

E. coli W Thy^- の培養には前報と同様の最小培地 10 ml にペプトン 2%, チミン 40 γ , ^3H -標識チミジン $100\mu\text{c}$ を加えた培地を使用した。 ^3H -標識チミジン(methyl- ^3H) は The Radiochemical Centre(Amersham England) より入手した。

E. coli B の培養には、最小培地にペプトン 1%, 酵母エキス 0.5%を加えた培地を使用した。

実験方法

実験方法の概要は Fig. 1 に示した通りである。

Fig. 1. Experimental procedure

(1) ^3H -標識 DNA の調製

実験材料の項で述べたように、*E. coli* W Thy^- を ^3H -チミジン (spec. act. 5.0c/mM) の含まれた培地で対数末期まで培養し、菌体を集め、仔牛胸腺 DNA (type 1, Sigma Chem. Co.) 2mgを加えて、Marmurの方法¹⁰⁾によってDNAを抽出した。すなわち、菌体を saline-EDTA (0.15 M-NaCl+0.1 M-EDTA) で2回遠心洗浄後 saline-EDTA に懸濁し25% sodium lauryl sulfateを加えて60°Cに10分間加熱後、冷却して溶菌させる。溶菌液に5 Mの過塩素酸ソーダを1 Mになるように加え、等量のクロロホルム・イソアミル

アルコール (24:1v/v) を加えて30分位振とうし、3,000×g で遠心分離し、核酸成分を分離する。核酸溶液に2倍量の冷エタノール (95%) を静かに加え、粗DNAをガラス棒に巻き取り、希 saline-citrate 溶液 (0.015M-NaCl+0.015M- $\text{Na}_3\text{-クエン酸}$) に溶解する。クロロホルム抽出、エタノール沈澱、溶解の操作をくり返して精製し、最後のエタノール沈澱物を希 saline-citrate に溶かし、酢酸-EDTA (3.0M-酢酸ソーダ+0.001M-EDTA) を1/10量加えて、激しく攪拌しながら0.54容のイソプロパノールを加えてDNAを選択的に沈澱させ、希 saline-citrate に溶かす。

(2) 酵素液の調製

E. coli B を1 l の培地で1晩培養し、菌体 (湿重量約1 g) を10,000×g で10分間遠沈して集菌し、緩衝液 (0.005M-グルタチオン, 0.002M-EDTA, 0.005M-リン酸緩衝液pH7.0, 20%グリセロールを含む0.15M-KCl)¹¹⁾ 10ml を加えて20kcの超音波発生装置で5分間破碎し、10,000×gで10分間遠沈して得られた上澄を酵素液とした。酵素液の蛋白量は Warburg and Christian の方法により測定した¹²⁾。

(3) 紫外線照射と光修復処理

^3H -標識 DNA (1.4×10³cpm/ μg) に15Wの紫外線灯を5 cmの距離から氷で冷却しながら10分間照射した。

照射 DNA (50 μ g) に酵素液 0.5ml (蛋白量 14mg/ml), 緩衝液 0.8ml を加え, 320m μ ~420m μ の波長の光線を照射しながら37°Cで60分間インキュベートした。

(4) 加水分解

光修復処理後, 20%トリクロル酢酸 (TCA) 1.5ml 加えて反応を止め, 沈澱物を10% TCA 1ml で洗い, エーテルで洗って TCA を除き沈澱物を99%ギ酸で175°C, 45分間加水分解した。

(5) ペーパークロマトグラフィー

加水分解物をワットマンの汙紙 (3MM) につけ, n-ブタノール:酢酸:水=80:12:30の溶媒¹³⁾により, 室温で約20時間ペーパークロマトグラフィーを行なった。

(6) 放射能の測定

ペーパークロマトグラムを1cmの幅に切り, シンチレーター液 (Toluol 500ml, PPO 2 g, POPOP50mg) に入れ, 液体シンチレーションカウンターによって測定した。

実験結果及び考察

³H-標識DNAに紫外線を照射し, 加水分解してペーパークロマトグラフィーを行ない, ³H-チミンの放射活性を測定した結果, Rf値 0.59のチミンの位置の他に, Rf値 0.24のチミンダイマーの位置にピークが認められた。紫外線を照射しない DNA にはチミンダイマーの位置にピークは認められなかった (Fig. 2)。このことから紫外線照射によって DNA にチミンダイマーが形成されることは明らかである。

Fig. 2. Formation of thymine dimer by UV-irradiation

Table 1. Monomerization of thymine dimer

Incubation time (min)		$\frac{\text{dimer}}{\text{monomer}} \times 100 (\%)$	ratio (%)
0		11.4 $\pm$ 0.4	100
60	Dark	11.6 $\pm$ 0.5	102
	Light	8.2 $\pm$ 0.4	73

されなかった。このことから酵母と大腸菌の紫外線に対する著しい感受性の違いは, チミンダイマーの除去修復に関与する酵素の活性の違いと関係があるのではないかと考えられる。また大腸菌においてチミンダイマーの除去修復欠損株 (e $\times$ c⁻) でも著しい修復を示したという報告もあり¹⁵⁾, 大腸菌にはダイマーの除去が行なわれなくても修復を導く能力があることも考えられる。

次に紫外線を照射した DNA を *E. coli* B から抽出した酵素液とともに, 320m μ ~420m μ の光線を照射しながら 37°C でインキュベートした結果, 紫外線照射によって形成されたチミンダイマーの約30%が monomerize された。320m μ ~420m μ の光線を照射せずに暗所でインキュベートした場合には, チミンダイマーの monomerization は認められなかった (Tab. 1)。

これらの結果は大腸菌にチミンダイマーの monomerization に関与する酵素が存在することを示し, その酵素は320m μ ~420m μ の光線照射によって活性化されるのであろうと考えられる。

Setlow らは酵母の光修復酵素によってチミンダイマーの約80%が除去されたということを報告しているが¹⁴⁾, 今回著者らが行なった実験では, 大腸菌の酵素によってダイマーは約30%しか除去

しかしながら、紫外線照射によって DNA にチミンダイマーが形成され、障害の原因となっていることは明らかであり、紫外線障害の修復過程には、必然的ではないにしろ、チミンダイマーの除去が重要な部分を占めていることは明らかである。

要 約

紫外線障害の光修復機構について、特にチミンダイマーの monomerization について研究した。その結果、 ^3H -チミジン標識 DNA に紫外線を照射することによって DNA にチミンダイマーが形成されることは明らかとなり、このチミンダイマーを含む DNA を大腸菌より抽出した酵素液とともに $320\text{m}\mu\sim 420\text{m}\mu$ の光線を照射しながら 37°C で 60 分間インキュベートすることによってダイマーの monomerization は約 30% 認められた。

本研究は三島海雲記念財団の学術研究奨励金の御援助を受けた。ここに深甚な謝意を表します。また *E. coli* W チミン要求菌を分与下さった金沢大学医学部第 2 生化学教室久野滋教授に深く感謝する。

文 献

- 1) 山崎陽代, 鈴江緑衣郎, 真田宏夫, 中嶋洋子, 河田正治: 栄養学雑誌, **28**, 53 (1970)
- 2) R. Beukers and W. Berends: *Biochim. Biophys. Acta.*, **41**, 550 (1960)
- 3) A. Wacker, H. Dellweg and D. Weinblum: *J. Mol. Biol.*, **3**, 787 (1961)
- 4) R. B. Setlow, W. L. Carrier and F. J. Bollum: *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)*, **53**, 1111 (1965)
- 5) H. Harm and C. S. Rupert: *Mutation Res.*, **6**, 355 (1968)
- 6) W. Harm, H. Harm and C. S. Rupert: *Mutation Res.*, **6**, 371 (1968)
- 7) A. Muhammed: *J. Biol. Chem.*, **241**, 516 (1966)
- 8) R. B. Setlow and W. L. Carrier: *J. Mol. Biol.*, **17**, 237 (1966)
- 9) J. S. Cook: *Photochem. Photobiol.*, **6**, 97 (1967)
- 10) J. Marmur: *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961)
- 11) J. S. Cook and J. R. Mcgrath: *Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S.)*, **58**, 1359 (1967)
- 12) O. Warburg and W. Christian: *Biochem. Z.*, **310**, 384 (1941)
- 13) C. Smith: *Photochem. Photobiol.*, **2**, 503 (1963)
- 14) R. B. Setlow and W. L. Carrier: *J. Mol. Biol.*, **17**, 237 (1966)
- 15) 鈴木堅之, 森明充興, 島津良枝, 堀井善一郎, 斉藤恵津子: シンポジウム「放射線障害の回復」報文集 3, 放射線医学総合研究所, (1968)

(受付: 昭和45年2月1日)