OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	酵母プラスミドpSR1の部位特異的組換えの染色体工学への応用
Author(s)	松崎, 浩明
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/479
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

酵母プラスミドｐＳＲ１の
部位特異的組換えの染色体工学への応用

１９８９年

松　崎　浩　明

目次

第１章　緒論 …… 4

第２章　pSR1プラスミドの分子内組換え機構 …… 7

第１節　緒言 …… 7

第２節　実験材料と実験方法 …… 8

２．１　供試菌株とプラスミド …… 8

２．２　使用培地と培養方法 …… 9

２．３　生化学的方法 …… １１

第３節　実験結果 …… １９

３．１　S. cerevisiae におけるpSR1プラスミドの分子内組換え …… １９

１）分子内組換え部位の限定 …… １９

２）分子内組換えに伴う遺伝子変換 …… ２６

３）分子内組換えおよび遺伝子変換へのRAD52 遺伝子の関与 …… ３０

３．２　大腸菌におけるpSR1プラスミドの分子内組換え …… ３２

１）pSR1プラスミドの分子内組換えへの酵母宿主因子の関与 …… ３２

２）分子内組換えへの大腸菌の普遍的組換え遺伝子の関与 …… ３４

３．３　RタンパクのDNA への結合 …… ３４

第４節　考察 …… ３７

第５節　要約 …… ４２

第３章　pSR1プラスミドの部位特異的組換えを利用したS. cerevisiae
染色体の改変 …… ４４

第１節　緒言 …… ４４

第２節　実験材料と実験方法 …… ４５

２．１　供試菌株とプラスミド …… ４５

２．２　使用培地 …… ４７

２．３　遺伝学的方法 …… ４７

２．４　生化学的方法 …… ５１
第３節　実験結果 …… ５４
３．１　pSR1プラスミドの部位特異的組換え系の染色体上での働き …… ５４
３．２　染色体上の大きな欠失と逆位の誘発 …… ５８
３．３　非相同染色体間の相互転座 …… ６４
第４節　考察 …… ６８
第５節　要約 …… ７１

第４章　総合考察と要約 …… ７３

参考文献 …… ７８

本論文に関係のある報告 …… ８８

謝辞 …… ８９

第１章　緒論

近年、生物学では、遺伝子レベル、染色体レベル、細胞レベルの基礎的な研究が急激に進み、これらの知見を応用した遺伝子工学、染色体工学、細胞工学が生れた。これらのうち、遺伝子工学、細胞工学では、形質転換法あるいは細胞融合法などの生物を改良する技術が開発された。遺伝子工学的手法を用いると、特定の遺伝子を取り出し、他の生物に導入することが可能である。しかし、現在の技術で操作可能なDNA のサイズは小さく、せいぜい100 kbまでで、代謝系を構成する多数の遺伝子や、高等生物の巨大な遺伝子を宿主細胞に導入するのは困難である。また、遺伝子を染色体に組込むと安定に保持されるが、プラスミドやウイルスなどのベクターを使用すると、導入遺伝子は細胞内で安定に保持されず、生物を改良するための実用性に欠ける。この様に、遺伝子工学的手法では、計画的に生物の性質を改変できるが、巨大DNA の導入、導入DNA の安定保持に問題がある。一方、細胞融合法では、２種類の細胞を融合するので、多くの遺伝子や巨大な遺伝子を導入することが可能である。しかし、縁の遠い生物間での融合では、細胞複製装置に互換性がないため、融合した２種類の細胞の染色体は同時に保持されず、目的とする性質すなわち遺伝子を備えた生物を得ることは大変困難である(43)。そこで、多数の遺伝子や大きい遺伝子を用いて生物を計画的に改良するためには、十分に巨大で、しかも細胞内で安定に保持される染色体を利用する方法、すなわち染色体工学的手法が有効である。例えば、多数の遺伝子や巨大な遺伝子を連結した人工染色体を作製して細胞に導入するか、多数の遺伝子、あるいは大きい遺伝子をもつ巨大DNA または他種生物の染色体を細胞に導入後、染色体に組込ませるか、染色体の一部と置き換える方法である。このためには、染色体の構造と機能に関する十分な知見と、染色体を思い通りに改変、操作する技術が必要である。

それでは染色体工学の現状はどうであろうか。植物ではコルヒチンなどの薬剤を使用して染色体数を増加させることが、花粉の葯培養を利用して染色体数を減少させることが、また、放射線照射によって起こる欠失、逆位、転座を利用して染色体の切りはりを行うことが可能である。そして、これらの方法を用いて染色体を操作することにより、三倍体の種なしスイカあるいは転座染色体を内在する種なしスイカ、野草の耐病性を導入したコムギが作製された(95)。したがって、生物の品種改良、育種に染色体工学を利用することは有効であり、さらに多くの改変、操作技術を開発することは意義がある。最近、８塩基

認識の制限酵素を使用して数十から数百キロ塩基対（kb）のDNA 断片を調製し(50)、この様な巨大DNA や染色体DNA をパルスフィールドゲル電気泳動を用いて分離することにより(16,17,73)、染色体の構造解析が可能になった。本研究で使用する酵母Saccharomyces cerevisiaeでは、古くから遺伝解析が行われ、多数の遺伝子の染色体上での配列が分かっている。また、組換えDNA 技術が発達し、様々な遺伝子がクローニングされ、遺伝子DNA を細胞に導入したり、染色体に組込むことも可能である。既に染色体の複製、分配に必須なDNA 領域であるARS 配列（自律複製配列）(80)、セントロメア(22,79) がクローニングされ、これらのDNA 断片およびテトラヒメナ由来のテロメアを連結して人工染色体が作製され(33,59) 、巨大DNA のクローニングベクター(13)、あるいは染色体の構造と機能の研究材料(33,58,59)として利用されている。さらに多くの改変、操作技術を開発することは、基礎面でも応用面でも重要である。このように酵母では様々な技術を利用できること、染色体の構造と機能に関する多くの知見が得られていることから、酵母は染色体工学技術を開発するに格好の材料であると言えよう。

染色体の改変は、細胞内では遺伝的組換えによって起こる。すなわち、生物では遺伝的組換えにより、遺伝情報の交換や添加が行われ、新しい配列をもつ遺伝情報のセットができる。このことから、遺伝的組換えを操作することにより染色体を思い通りに改変することができると考えられる。しかし、これまで、遺伝的組換えに関してその機構を解明する研究は多くなされてきたが、これを工学的に応用する研究はあまりなされていない。これは遺伝的組換えは、DNA レベルではDNA 鎖の切断と再結合という一見、単純な機構で起こるが、実は組換えに働くタンパクが複雑に絡む反応で、組換えを操作できるだけの基礎的な知見が乏しかったからである。遺伝的組換えは、組換え部位の持つ特異性から、相同的組換え（普遍的組換え）、部位特異的組換え、非相同的組換えに分類される。相同的組換えはDNA 上の相同な領域の間で起こる組換えである。部位特異的組換えは特定のDNA 領域でのみ起こる組換えである。非相同的組換えは、全く相同性のない領域でも起こる組換えである。これらの組換え機構のうち、部位特異的組換えでは、組換えの機構がかなり解明された。部位特異的組換えは遺伝情報の交換様式によって、交叉型の組換えと遺伝子変換型の組換えに分類される。前者はお互いの情報が相互に交換される組換えであり、後者は遺伝情報が一方向に移される組換えである。交叉型の組換えには、λファージのInt タンパクによる組換え(94)、P1ファージのcre-lox 系(78)、S. cerevisiae の内在性プラスミド２μmDNA の分子内組換え(9)などがある。これらの組換えについては、in vitroで組

換えを行わせる系が開発された結果、そこに働く酵素が発見され、組換え部位DNA 配列と組換え酵素の性質およびそれらの相互作用から、組換え機構が詳細に解析された。その結果、部位特異的組換え酵素がDNA 上の特定の塩基配列を認識してDNA 鎖を切断、再結合して組換えを起こすという共通の機構が提案されている(69)。遺伝子変換型の部位特異的組換えには、S. cerevisiae の接合型変換の組換え(46,81) およびS. cerevisiae ミトコンドリアに存在するイントロンの転移(24,25,37)などがある。この系の特徴は、部位特異的エンドヌクレアーゼがDNA 上の特定の塩基配列を認識して、二重鎖切断を行うことによって開始されることである。このように部位特異的組換えは鍵となるタンパクによってDNA の特定の部位で起こるから、部位特異的組換えを操作して、染色体を自由に改変することができるのではないかと考えられる。そこで本研究では、酵母Zygosaccharomyces rouxii 由来の環状プラスミドpSR1が行う分子内組換えを利用して、S. cerevisiae 染色体の改変技術を開発することを試みた。酵母Z. rouxii 由来環状プラスミドpSR1は、一対の逆向き反復配列をもち、この部分を介して分子内組換えを行う(2,90)。

第２章では、この分子内組換えを染色体の改変に利用するために、分子内組換えの機構を解析した。まず、逆向き反復配列に変異をもつpSR1プラスミドを用いて、組換えの開始部位をS. cerevisiae 宿主内で58塩基対 (bp) 配列内に限定した。また、変異部位では、高頻度の遺伝子変換により両反復配列が同一配列となることがわかった。次に、R遺伝子を大腸菌内で発現させることにより、分子内組換えを起こし、この組換えに必要な酵母タンパクはRタンパクのみであることを示した。さらに、Rタンパクが組換え部位内に存在する14 bp の逆向き反復配列とそれに続く４個の同じ14 bp の反復配列に結合することを示した。以上の結果から、遺伝子変換を伴う部位特異的組換えの機構として、一本鎖DNA がお互いに交換して形成された交叉中間体が逆向き反復配列上を移動し、ヘテロデュープレックスが形成されるが、これはDNA 複製により解離されるという機構が考察された。また、２個の組換え部位を染色体に組込ませた後に、Rタンパクのみを生産するとこの組換え部位間の組換えにより染色体を改変できる可能性が示唆された。第３章では、この方法で染色体上の欠失と逆位および非相同染色体間の組換えの実験を行い、この手法が実施可能であることを示した。第４章では、これらの結果を総合して考察を行った。

第２章　pSR1プラスミドの分子内組換え機構

第１節　緒　言

pSR1プラスミドは、醤油、味噌の醸造に重要な耐塩性酵母のZygosaccharomyces rouxiiで検出された6,251 bpの環状二本鎖DNA プラスミドである(2,90)。その構造は酒の醸造、パン製造に使用されるSaccharomyces cerevisiae由来の２μm DNA(8)と多くの共通点をもつが、DNA の塩基配列には相同性がない。分子中に一方が959 bpからなる一対の逆向き反復配列 (IR) をもち、IRにより1,679 bpと2,654 bpの２つのユニーク領域に分けられる。このIRを介して分子内組換えを起こす結果、２つのユニーク領域の相対的な向きが異なるＡ型とＢ型の異性体として存在する。この分子内組換えには、pSR1プラスミドにコードされているＰ、ＳおよびＲ遺伝子のうち、Ｒ遺伝子の産物であるＲタンパクが必須である(2,40)。pSR1は、S. cerevisiae 細胞内でも安定に複製し、分子内組換えも起こることから、それらの機構は、S. cerevisiae 内とZ. rouxii 内とでは同じであろう。この分子内組換えの機構を解明することは、それ自体興味あることだが、組換えを人為的に操作し、染色体の改変などに利用するためにも重要である。分子内組換えはIR内で起こること、組換えにはＲタンパクが特異的に関与することから、pSR1の分子内組換えは部位特異的組換えであると考えられる。そこで、本章では、組換え部位とそれに伴う遺伝子変換および組換えに働くタンパク質を中心に、分子内組換えの機構を解明することにした。

第一に、一方のIRに変異をもつpSR1プラスミドを用いて、S. cerevisiae 宿主内で分子内組換え部位を限定した。その結果、分子内組換え部位は、見かけ上、IR内の58 bp 配列内に限定されたが、組換えに伴って、IR全域で変異部位の遺伝子変換が観察されたことから、分子内組換えは、この58 bp 配列内で開始され、交叉はIR全域で起こることがわかった。また、これらの現象はrad52 変異細胞中でも起こった。第二に、分子内組換えへの酵母宿主因子の関与を検討するために、Ｒ遺伝子を大腸菌内で発現させ、分子内組換えの有無を調べた。その結果、大腸菌内でも分子内組換えが起こり、組換えには酵母宿主因子は必要でないことが分かった。第三に、部分精製したＲタンパクを用いて、DNase Ｉ フットプリンティング法によりＲタンパクのDNA への結合を調べたところ、Ｒタンパクは58 bp

配列内に存在する14 bp の逆向き反復配列と、それに続く４個の同じ14 bp の反復配列部に結合することがわかった。これらの観察から、遺伝子変換を伴う分子内組換えの機構として、58 bp 配列内で一本鎖が交換して形成される交叉中間体がIR内を移動し、ヘテロデュープレックスが形成されるが、これはDNA 複製によって解離されるという機構が考察された。また、染色体に２個の58 bp 配列 DNAを持たせ、R遺伝子を発現すると、組換え部位間の組換えにより染色体を改変することが可能であると考えられた。

第２節　実験材料と実験方法

２．１　供試菌株とプラスミド

３．１で分子内組換え部位を限定するための酵母宿主として、S. cerevisiae 二倍体株、NA-87-11A-D (MATα/MATα leu2-3,112/leu2-3,112 his3/his3 trp1/trp1 pho5-1/pho5-1 [cir°][2]) および、一倍体株、NS1-2C (MATa trp1 leu2-3,112 his3 rad52-1 [cir°]) を使用した。NS1-2C株は小川英行（大阪大学、理学部）より分譲を受けたrad52-1 変異株より、本研究に適合する他の遺伝子符号を付与して育成した。プラスミド DNAの調製には、大腸菌Escherichia coli RR1株 (F^- r_B^- m_B^- ara14 proA2 lacY1 galK2 rspL20 xyl-5 mtl-1 supE44 hsdS20 [6]) を使用した。また、DNA 塩基配列決定に際しては、M13mp8およびM13mp11 ファージ(52) DNAの調製のため、大腸菌 JM103株 (Δlacpro thi strA supE endA sbcB hsdR$^-$ F' traD36 proAB lacI^{q}ZΔM15 [53]) を使用した。

３．２では、プラスミドの構築および大量調製のために、大腸菌 JA221株 (F^- leuB6 ΔtrpE5 lacY hsdR hsdM$^+$ recA [21])を、大腸菌内での分子内組換えを調べるために、大腸菌 JM103株、JM109 株 (recA1 Δlacpro endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 F' traD36 proAB lacI^{q}ZΔM15 [18])、JC8679 株 ($recB_{21}$ $recC_{22}$ $sbcA_{23}$ his60 thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 galK2 ara14 xyl5 mtl1 proA2 argE3 rpsL31 tsx33 supE44 [77]) を使用した。

３．３では、プラスミドの構築および大量調製のために、大腸菌 JA221株をRタンパクの生産のために、大腸菌 JM103株を使用した。

pSR1プラスミドの組換え部位の限定のためにpSR1プラスミドとYIp32Sプラスミド (YIp32 プラスミド[7]のSalI部位末端を平滑化した後、連結してSalI切断点を破壊し

た）とがHindⅢ部位で連結されているpSRT301 プラスミドを野生型プラスミドとして、このプラスミドに8 bp SalI リンカー（5'-GGTCGACC-3'）を挿入して作製された種々の変異プラスミド(40)を用いた。これらの変異プラスミドのうち、pSRT308、pSRT309、pSRT321、pSRT326、pSRT327では、291 塩基から1,249 塩基におよぶ逆向き反復配列（IR1)にSalIリンカーが1個挿入され、pSRT306 およびpSRT322 では、2,929 塩基から3,887 塩基におよぶ逆向き反復配列 (IR2)にSalIリンカーが1個挿入されている(Fig. 2-1; pSR1 プラスミドの塩基番号は、逆向き反復配列に最も近いEcoRI 部位のGを1として付けた[2])。tac プロモーター(26)を含む91 bp のHindⅢ－BamHI 断片はpDR540(68)から調製した。大腸菌のrrnBオペロン（rRNA遺伝子；[12]）のターミネーターを含む3.0 kbのPstI-SalI 断片はpKK175-6(11)から調製した。

pSRT108Aは R遺伝子の BglⅡ部位に、BamHI で切断したYIp32(7) を挿入して R遺伝子を破壊したプラスミドである(2)。pNN225はpSR1の453 塩基から677 塩基にあたるHaeⅢ－TaqI断片(2)の両端を各々HindⅢ部位、XbaI部位に変換後、pUC18 (18)の大きいHindⅢ－XbaI断片と連結して作製したプラスミドである。

２．２　使用培地と培養方法

酵母用最少培地（SGlu培地）は1 liter あたりグルコース20 gとYeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco Laboratories, Detroit, Mich., U.S.A.) 6.7 gを含み、必要あればアミノ酸および核酸［トリプトファン（最終濃度20 mg/l)、ヒスチジン (20 mg/l)、アルギニン(20 mg/l) 、メチオニン (20 mg/l)、チロシン (30 mg/l)、ロイシン (30 mg/l) 、イソロイシン (30 mg/l)、リジン (30 mg/l)、バリン (150 mg/l)、 フェニルアラニン (60 mg/ml) とウラシル (20 mg/l)、アデニン (100 mg/l) ］を加えた。酵母の栄養培地にはYPAD培地［1 liter あたり酵母エキス（大五栄養株式会社）10 g、ポリペプトン（大五栄養）20 g、アデニン（和光純薬株式会社）100 mg、グルコース 20 g] を用いた。大腸菌の完全培地として通常は改変Luria-Bertani 培地［LB培地(48)；1 liter あたりBactotryptone (Difco) 10 g、Yeast Extract (Difco) 5 g、 NaCl 5 g (pH 7.0) ］を、JM103 株でRタンパクを大量生産するときには2xYT培地［1 liter あたりBactotryptone (Difco) 16 g、Yeast Extract (Difco) 10 g、NaCl 5 g (52)]を用いた。また、必要に応じてアンピシリン (viccillin; 50 μg/ml；明治製菓株式会社）およびisopropyl-β-D- thiogalactopyranoside (IPTG; 1 mM; Sigma Chemical Company, St

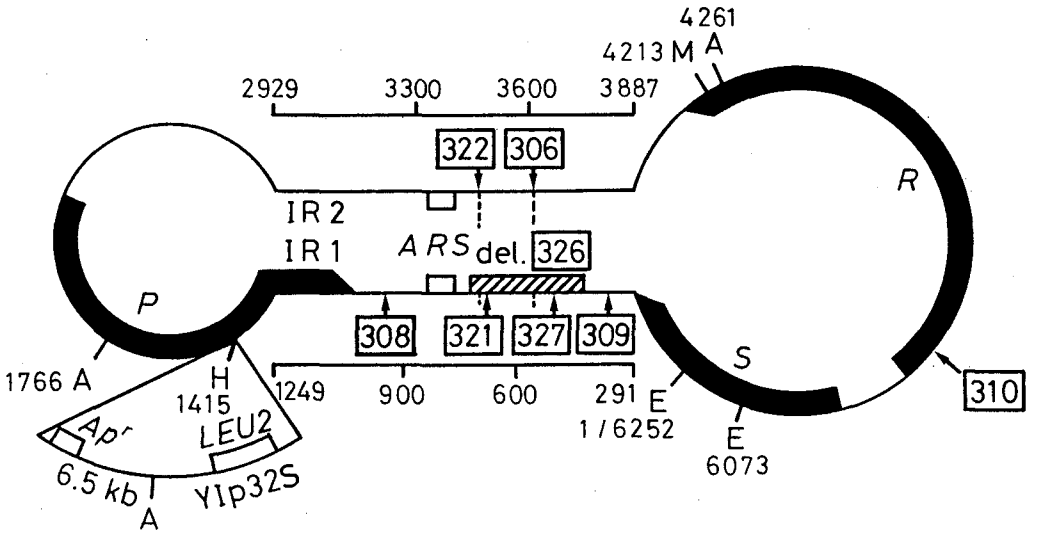


Fig. 2-1 Structure of the mutant plasmids created by the SalI linker insertion. Mutant plasmids were constructed by linker mutagenesis of pSRT301 (12.8 Kb, lacking SalI site) which consisted of the type A isomer of pSR1 (6,251 bp) and the YIp32S molecule (6.5 kb) (40). The location and orientation of the protein-coding regions on pSR1 are indicated by thick lines, and the tapered end indicates the 3'end of the coding region. The horizontal lines are marked to indicate the inverted repeats. The lower inverted repeats denoted by IR1 are streched for the nucleotide positions from 291 to 1,249, and the upper one denoted by IR2 are streched for the nucleotide positions from 2,929 to 3,887. Open boxes with ARS represent the autonomously replicating sequences. Open boxes with LEU2 and Ap^r on the YIp32S moiety represent the coding regions of the LEU2 gene of S. cerevisiae and the ampicillin-resistant gene of pBR322, respectively. The numbers at the restriction sites and on the inverted repeats in the pSR1 moiety represent the positions with respect to G of the EcoRI site as position 1. The approximate position of each insertion site is indicated by an arrow with the boxed number on the pSRT301 molecule. In pSRT326, the region shown by the hatched box with del.326 is a 311 bp deletion. Abbreviations for restriction enzyme sites are: A, AvaI; E, EcoRI; H, HindIII; and M, MluI.

Louise, U.S.A.) を加えた。大腸菌の最少培地として用いたM9培地(48)は1 liter あたり Na_2HPO_4 6 g、KH_2PO_4 3 g、NaCl 0.5 g、NH_4Cl 1 gを含む溶液を滅菌後、別に殺菌した10 mlの20% (w/v) グルコースと1 mlの1 M $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ と1 mlの0.1 M $CaCl_2$ とを加えたものである。ビタミンB1 (半井化学薬品株式会社) は最終濃度1 mg/l、カザミノ酸 (Difco) は5 g/l を必要に応じて加えた。M13 ファージのプラーク形成用平板培地として、下層にB培地 [1 liter あたりBactotryptone (Difco) 10 g、NaCl 8 g、ビタミンB1 (半井) 0.1 g、 寒天 2 g] を、上層にH-上層寒天培地[1 literあたりBactotryptone 10 g、NaCl 8 g、Bacto-agar (Difco) 8 g] を用いた。平板培地を調製するときは、断わらない限り1 liter あたり20 gの寒天を加えた。殺菌は1 kg/cm²で15分間の条件でオートクレーブ滅菌した。酵母は30℃で、大腸菌は37℃で静置培養または振とう培養を行った。

２．３　生化学的方法

大腸菌からのCsCl- エチジウムブロマイド (EB) 平衡密度勾配遠心分離法によるプラスミドDNA の調製：　本研究で使用したプラスミドは、いずれも大腸菌宿主内での複製能が与えられており、プラスミドDNA の大量調製は、大腸菌からClewell とHelinskiの方法(23)で行った。抗生物質を含むLB培地で37℃一晩振とう培養した5 mlの培養液をカザミノ酸 5 g/l、トリプトファン20 mg/l を含むM9培地150 mlに植菌して振とう培養し、培養液の600 nmでの吸光度 ($A_{600\ nm}$)が0.8 に達したときに、最終濃度が200 mg/lとなるようにクロラムフェニコール（和光純薬株式会社）を添加し、さらに16時間培養を続けた。4 ℃で集菌（8,000 rpm 5 分；久保田 Model KR-200A、RA-6ローター）し、25% (w/v) シュークロースを含む50 mM トリス（ヒドロキシメチルアミノメタン）－塩酸緩衝液 (pH 8.0) 2 ml に懸濁した。同緩衝液に10 mg/mlの濃度で溶かしたリゾチーム (Sigma) 0.3 mlを加え、氷中で５分間放置した後、0.5 mlの0.5 M エチレンジアミン四酢酸(EDTA, pH 8.0) を加え混合した。2.6 mlの62.5 mM EDTA、2 % (v/v) Triton X-100 (和光純薬) を含む50 mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、氷中で10分間放置して溶菌させた。溶菌後、0 ℃で遠心分離 (30,000 rpm、90分；日立 Model 55P-7、RT65T ローター) し上澄液を得た。上澄液4.5 mlに対し、CsCl 4.55 g、0.5 ml の5 mg/ml EB水溶液 (Sigma) を加え、分離用遠心管 (5PA シールチューブ；日立計測器サービス) にCsCl溶液を移し、シールした後、18℃で遠心分離 (50,000 rpm、16時間；日立 Model 55P-7、RPV65Tローター) した。遠心分離後、プラスミドDNA を注射器（テルモシリンジ；テルモ

株式会社）により抜き取り、Corex 遠心管に移した。２倍容の水を加えた後、さらにその２倍容の99%エタノールを加え、-20 ℃で３時間放置した後、遠心分離（10,000 rpm、10分；久保田 Model KR200-A、RA-3ローター）した。DNA を含む沈殿を0.4 mlのTE緩衝液[10 mMトリス－塩酸緩衝液 (pH 8.0)、1mM EDTA]に溶かし、これをエッペンドルフ遠心管に移し、40μl の3 M 酢酸ナトリウム水溶液を加えた。さらに、1 mlの99%エタノールを加え、-80 ℃で10分間放置した後、遠心分離（12,000 rpm、10分；Tomy、Microfuge MC-15A）し、DNA を沈殿として回収した（エタノール沈殿）。DNA を99%エタノールで1回洗浄した後、減圧下で乾固した。DNA を適当量のTE緩衝液に溶かし４℃で保存した。

大腸菌からのアルカリ変性法によるプラスミドDNA の調製：　少量のプラスミドDNA を簡便に調製するために、BirnboimとDolyによるアルカリ変性法(5)を用いた。抗生物質を含むLB平板培地上で一晩培養した大腸菌の菌体を、2 mg/ml リゾチーム（Sigma)を含む0.1 mlの第１液［50 mM グルコース、10 mM EDTA、25 mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 8.0)］の入ったエッペンドルフ遠心管にかき取り、氷中に放置した。0.2 mlの第２液［0.2 N NaOH、１％ (w/v)　ドデシル硫酸ナトリウム（SDS;　和光純薬）］を加え、氷中で５分間放置した。0.15 ml の第３液［3 M 酢酸ナトリウム（pH 4.8)]を加えて、撹拌後、１時間氷中に放置した。遠心分離（12,000 rpm、５分；Microfuge MC15A)し、上澄を別のエッペンドルフ遠心管に移した。２倍容の99%エタノールを加え、-80 ℃で10分間放置後、遠心分離(12,000rpm、10分）し、DNA を沈殿として回収した。このDNA をO.1 mlの第４液［0.1 M 酢酸ナトリウム、50 mM トリス－塩酸緩衝液（pH 8.0)]に溶かした後、0.2 mlの99%エタノールを加え、-80 ℃で10分間放置後、遠心分離（12,000 rpm、10分）し、DNA を沈殿として回収した。DNA を99%エタノールで１回洗浄した後、減圧下で乾固し、エタノールを除いた。DNA をO.05 ml のTE緩衝液（pH 8.0）に溶かし４℃で保存した。

S. cerevisiae からのプラスミドDNA の調製：　S. cerevisiae からのプラスミドDNA の調製はCameron らの方法(15)に従った。最少平板培地に生育しているS. cerevisiae 菌体をかきとって、0.4 mlのプロトプラスト緩衝液［0.1 mg/ml Zymolyase 100T (生化学工業株式会社）、1 μl/ml　β－メルカプトエタノール（半井化学薬品株式会社）、1.2 M ソルビトール、50mMリン酸緩衝液（pH 7.5)]に懸濁し、30℃で30分間放置した。80μl の SDS 溶液[2.5%　(w/v) SDS、0.5 M トリス、0.25 M EDTA]および2 μl のジエチルピロカルボン酸(Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wis., U.S.A.) を加え、65℃で30分間放置して溶菌した。0.1 mlの5 M 酢酸カリウムを加え、氷中で１時間放置した。遠

心分離（12,000 rpm、10分；Tomy、Microfuge MC15A)し、上澄を別のエッペンドルフ遠心管に移した。２倍容の99%エタノールを加え、-80 ℃で10分間放置後、遠心分離（12,000 rpm、10 分）し、DNA を沈殿として回収した。回収したDNA を0.4 mlのTE緩衝液（pH8.0)に溶かし、等量のTE緩衝液で飽和したフェノールを加え、よく撹拌して遠心分離(12,000 rpm、10分）し、上層を回収した（フェノール抽出）。これにTE緩衝液で飽和したフェノール－クロロホルム混合液（1:1, v/v) を加え、よく撹拌して遠心分離（12,000rpm、10分）し、上層を回収した（フェノール－クロロホルム抽出）。これにクロロホルムを加え、撹拌して遠心分離し上層を回収した（クロロホルム抽出）。これらの操作をもう一度繰り返した後、最後に得られた上層にエーテルを加え、よく撹拌して遠心分離(12,000 rpm、1分）し、下層を回収した。エタノール沈殿を２回繰り返し、得られたDNA 沈殿を99%エタノールで洗浄後、減圧下で乾固した。DNA をTE緩衝液に溶かし４℃で保存した。

酵素反応：　制限酵素は宝酒造株式会社、東洋紡績株式会社またはニッポンジーン株式会社から購入した。制限酵素SalIの反応は高塩濃度緩衝液［50 mM トリス－塩酸 (pH 7.5)、100 mM NaCl、10 mM $MgCl_2$、1 mM dithiothreitol (DTT; Sigma)］中で行った。その他の制限酵素反応は、TA緩衝液［33 mM トリス－塩酸緩衝液（pH 7.9)、66 mM 酢酸カリウム、10 mM 酢酸マグネシウム、0.5 mM DTT、100 μg/ml bovin serum albumine (BSA; Sigma)]中で行った。断わらない限り、いずれも37℃で１ないし２時間反応させた。T4リガーゼ（宝酒造）の反応は１μg のDNA を含むライゲーション緩衝液［66 mMトリス－塩酸緩衝液（pH 7.6)、1 mM ATP、1 mM spermidine (Sigma)、0.01 M $MgCl_2$、15 mM DTT、0.2 mg/ml BSA］中で10 unit のT4リガーゼを加え、16℃で３時間反応させた。大腸菌DNA polymerase IのKlenow断片（東洋紡績）は、Maniatisらの標準的な方法(48)に従って使用した。

ゲル電気泳動：　アガロースゲル電気泳動法はTanakaらの方法(88)に従い、１%アガロース［Agarose LO3 （宝酒造）］スラブゲルを使用し、10倍濃度の泳動用緩衝液［0.4 M トリス－酢酸緩衝液（pH7.4)、0.2 M 酢酸ナトリウム、10 mM EDTA］を使用前に希釈して用いた。試料は通常、DNA 溶液に1/5 容量の６倍濃度泳動用染色液［60% (w/v) シュークロース、10 mM EDTA、0.25% (w/v) ブロモフェノールブルー（BPB)］を加えて調製した。泳動は定電圧100Vで40分または１時間行った。泳動後、ゲルをEB水溶液（5 μg/ml)で染色し、トランスイルミネーター（Ultra Violet C62) でDNA バンドを観察した。写真はUVフィルター（Kenko SL-39)および赤色フィルター（Kenko R-60) を用い、ポラロイド

カメラ（MP-4）でフォトラマPB300 フィルム（富士フィルム株式会社）によって撮影した。また、DNA 断片の分子量の推定にはλcI857S7 ファージDNA（宝酒造）のHindⅢ断片（23.1 kb, 9.4 kb, 6.6 kb, 4.4 kb, 2.3 kb, 2.0 kb, 0.6 kb [71]）を標準にした。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動はManiatisらの方法(48)に従い、4 %、6 %、8 %のポリアクリルアミドスラブゲルを使用した。30%アクリルアミド－0.8 %メチレンビスアクリルアミド混合液、10 ml の10倍濃度のTBE 緩衝液［890 mM トリス、890 mM ホウ酸、25 mM EDTA］および20 mg/mlの過硫酸アンモニウム水溶液5 mlに脱イオン水を加え、全量を100 mlとした。この混合液を減圧下で脱気し、100 μl のテトラメチレンジアミンを加え、ゲルを重合させた。試料は、DNA 溶液に1/5 容量の６倍濃度ポリアクリルアミドゲル電気泳動用染色液[40 % (w/v) シュークロース、10 mM EDTA、0.25% (w/v) BPB、0.25% (w/v) キシレンシアノール (XC)]を加えて調製した。泳動は50V から150Vまでの範囲で定電圧で行った。泳動後の操作はアガロースゲル電気泳動の場合と同様に行った。また、DNA 断片の分子量の推定にはpBR322の HpaⅡ断片(86)を標準にした。

大腸菌の形質転換： 大腸菌の形質転換はMorrisonの方法(55)に従った。LB培地で37℃一晩培養した培養液10 ml を1 liter のLB培地に植菌し、$A_{600\ nm}$ が0.5 から0.6 になるまで振とう培養した。培養液を氷中で冷却し0 ℃で遠心分離（8,000 rpm、5分；久保田 Model KR-200A、RA-6 ローター）し、菌体を250 mlの 0.1 M $MgCl_2$水溶液で洗浄後、250 mlの0.1 M $CaCl_2$ 水溶液に懸濁し氷中に20分放置した。0 ℃で遠心分離（8,000 rpm、 5分）した後、菌体を42.5 ml の0.1 M $CaCl_2$ と7.5 mlのグリセロール混合液に懸濁し、コンピテント細胞とした。菌体懸濁液0.2 mlにDNA 溶液（0.1 ～1 μg)を加え、氷中で30分間放置後、37℃で５分間加熱した。1 mlのLB培地を加え、37℃で60分間静置培養した後、適当量を選択培地に塗布した。

S. cerevisiae の形質転換： S. cerevisiae の形質転換は酢酸リチウムを用いたItoらの方法(35)に従った。S. cerevisiae を50 ml YPAD培地で３時間振とう培養し、集菌(8,000 rpm、５分；久保田 Model KR-200A、RA-6ローター）した。菌体をTE緩衝液（pH 8.0)で２回洗浄後、5 mlのLA溶液［TE緩衝液に0.1 M 酢酸リチウム（和光）を溶かした溶液］に懸濁した。30℃で１時間振とう培養後、集菌し、菌体を5 mlのLAG 溶液［TE緩衝液に0.1 M 酢酸リチウム、15% (v/v) グリセロールを溶かした溶液］に懸濁して受用菌とした。0.3 mlの受用菌と1 ～10μg のDNA と0.7 mlのPEG 水溶液［50% (w/v) ポリエチレングリコール 4,000 (和光)］とを混合後、30℃で１時間放置した。このうちの適当量を

選択培地に塗布した。

DNA 塩基配列の決定： DNA 塩基配列の決定はM13 ファージによるクローニング技術(52)とダイデオキシチェーンターミネーションシークエンス法(72)を組合わせて行った。

（１）大腸菌 JM103株のM13 ファージmp系プラスミドによる形質転換

先の大腸菌の形質転換法と同様の方法で調製したコンピテント細胞懸濁液0.2 mlに0.1～1 μg のプラスミドDNA を加え、氷中で30分間放置した後、37℃で５分間加熱した。この液に、融解した3 mlのH-寒天上層培地、0.2 mlの対数増殖期大腸菌 JM103株の培養液、50μl の２% 5-bromo-4-chrolo-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (Sigma)のジメチルホルムアミド溶液、10μl の0.1 M IPTGを混合後、B-平板培地に重層した。37℃で一晩培養後、白色半透明のプラークを形質転換体のプラークとみなした。

（２）M13 ファージからの一本鎖DNA の調製

2xYT液体培地で培養した大腸菌JM103 株培養液にM13 ファージを接種後、さらに、37℃で4 ～5 時間培養した。培養液を遠心分離（12,000 rpm、５分；Tomy、Microfuge MC15A)後、上澄液0.8 mlをエッペンドルフ遠心管に移し、2.5 M NaClを含む20%ポリエチレングリコール6,000 溶液0.2 mlを加え、混合した。室温で15分間放置後、遠心分離（12,000 rpm、 ５分）して、ファージ粒子を沈殿として集めた。ファージ粒子をTE緩衝液(pH 8.0)に懸濁し、フェノール抽出、フェノール－クロロホルム抽出でタンパク質を除去後、エタノール沈殿を行い、一本鎖DNA を集めた。DNA を乾固後、20μl のTE緩衝液(pH 8.0)に溶解した。

（３）M13 一本鎖DNA とプライマーDNA とのアニーリング

10μl のM13 一本鎖ファージDNA 溶液と１μl のプライマーDNA と1.5 μl の10倍濃度アニーリング緩衝液［70 mM トリス－塩酸緩衝液（pH 7.5)、1 mM EDTA、200 mM NaCl、70 mM $MgCl_2$］を混合し、60℃で20分間加温後、室温に放置して、冷却し、アニーリングさせた。

（４）ポリメラーゼ反応

４種類のdNTP-ddNTP混合液（組成は、Table 2-1 に示す）を各々２μl ずつ、ミクロフュージ遠心管に分注した。次に、（３）で調製したM13 一本鎖DNA-プライマーDNA 混合液に２μl の［$\alpha-^{32}P$］dCTP (400Ci/mmol) と１μl の DNA polymerase I Klenow断片(2 units) を加え、混合した。この液を3.5 μl ずつ４本のdNTP-ddNTP混合液入エッペンドルフ遠心管に分注し、混合した。25℃で20分間放置後、チェース混合液［1 mM dATP、

1 mM dCTP、1 mM dGTP、1 mM dTTP]を1 μl ずつ加え、さらに20分間放置した。これに、6 μl のホルムアミド停止液 [95% (v/v) ホルムアミド、0.1 % (w/v) XC 、0.1 % (w/v) BPB]を加え、95℃で３分間加熱した後、急冷した。

Table 2-1. dNTP-ddNTP mix solution (dddNTP)

	dddA (μl)	dddC (μl)	dddG (μl)	dddT (μl)
0.5 mM dGTP	20	15	1	20
0.5 mM dATP	1	15	20	20
0.5 mM dTTP	20	15	20	1
100 mM Tris-HCl (pH 7.5),				
1.0 mM EDTA	20	15	20	20
H_2O	45 (ddA)	45 (ddC)	52 (ddG)	30 (ddT)
1.0 mM ddNTP	15	15	8	30
	121	120	121	121

（５）ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびオートラジオグラフィー

８％の変性ポリアクリルアミドスラブゲル（200x400x0.35mm）を使用し、次のように作製した。3.8 g のアクリルアミド、0.2 g のメチレンビスアクリルアミド、25 gの尿素、および5 mlの10倍濃度のTBE 緩衝液 [890 mM トリス、890 mM ホウ酸、25 mM EDTA] に脱イオン水を加え、全量を50 ml にした。この混合液を減圧下で脱気し、0.35 ml の10% (w/v) 過硫酸アンモニウム水溶液と100 μl のテトラメチレンジアミンを加え、ゲルを重合させた。（４）でポリメラーゼ反応を行ったDNA 試料2 μl をゲルに乗せ、2,000Vで電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを乾燥させ、Ｘ線フィルム (X-Omat AR, Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., U.S.A.) を用いてオートラジオグラフィーを行った。

合成DNA の作製： DNA 合成機（アプライドバイオシステム社）を用いて目的DNA を相補一本鎖ごとに作製した。担体に結合しているDNA 鎖を濃アンモニア水で洗浄して切り出した。アンモニアを除去した後、DNA 鎖を濃縮乾固した。２本の相補DNA 鎖をアニーリング緩衝液 [70 mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5)、1 mM EDTA、200 mM NaCl、70 mM $MgCl_2$]に溶解し、60℃で20分間放置後、自然冷却させて２本鎖合成DNA を調製した。

Ｒタンパクのin vitro組換え活性の測定： Vetterらの方法(93)を改変して行った。

0.6 μg のpSRT108A基質プラスミドDNA （A型分子）と試料タンパクを反応液[50 mMトリス－塩酸緩衝液(pH 7.4)、10 mM $MgCl_2$ ；全量100 μl]に加え、30℃で30分間反応後、この反応液に、100 μl のA溶液 [0.83% (w/v) N-ラウリルサルコシン (Sarkosyl NL-97, ICN Biomedicals, Inc., Plainview, N.Y., U.S.A.)、42 mM EDTA、8.3 mg/ml プロナーゼ（アクチナーゼE；科研製薬株式会社）] を加え、37℃で30分間放置した。これに200 μl のB溶液 [10 mM トリス－塩酸緩衝液 (pH7.4)、50 mM NaCl、1 mM EDTA、50 μg tRNA] を加えた後、フェノール抽出でタンパクを除去後、エタノール沈殿を行い、DNA を回収した。このDNA を減圧下で乾固した。このDNA をHindⅢで切断後、アガロースゲル電気泳動を行った。B型分子のバンドが観察されたとき、試料タンパクに組換え活性があると判断した。

Rタンパクの精製： tac プロモーターの下流にR遺伝子を繋いだプラスミドpNN115をもつ大腸菌JM103 株をアンピシリンを含む2xYT培地で37℃でA_{650}＝0.5 まで培養後、IPTG（最終濃度 1 mM）を加え、さらに2時間培養した。菌体（約1 g)を25% (w/v) シュークロースを含む0.25 M トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。これに、0.32mlのリゾチーム溶液 [5 mg/ml リゾチーム、0.25 M トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5)]を加え、氷中で10分間放置後、2.67 ml の溶菌液 [25 mM EDTA、1 % (w/v) Brij-58 (和光)、トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5)、2 mM DTT]を加え、さらに、10分間放置して溶菌した。溶菌液を遠心分離（40,0000 rpm、 30分；日立 Model 55P-7、RP65T ローター）し、上澄液（抽出液）を得た。抽出液をカラムにかけ、in vitro組換え活性を指標にして精製を行った。まず、抽出液をDEAEセルロースカラム (DE52 ; Whatman International Ltd., Kent, England)にかけ、D緩衝液 [50 mM トリス－塩酸緩衝液(pH7.4)、50 mM $(NH_4)_2SO_4$、1 mM EDTA、0.5 mM DTT、10% (v/v) グリセロール、0.1 mM PMSF (Sigma)]で洗浄した。組換え活性のあった通過画分を Bio-Rex70カラム (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., U.S.A.) にかけ、B緩衝液 [50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、1 mM EDTA、0.5 mM DTT、10% (v/v) グリセロール、0.1 mM PMSF]で洗浄後、0.4 M NaClを含むB緩衝液で溶出した。組換え活性のあった0.4 M NaCl溶出画分をハイドロキシアパタイトカラム (DNA-Grade Bio-Gel HTP; Bio-Rad Laboratories)にかけ、H緩衝液 [0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)、2 mM DTT、10% (v/v) グリセロール、0.1 mM PMSF]で洗浄後、0.2 M リン酸カリウム緩衝液を含むH緩衝液で溶出した。組換え活性のあった溶出画分を Bio-Rex70カラムにかけ、B緩衝液で洗浄後、0.4 M NaCl、33% (v/v) グリセロ

ールを含むB緩衝液で溶出した。組換え活性のあった溶出画分をRタンパクの精製標品として使用した。この精製標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた結果、多くのタンパクバンドが認められ、この標品はRタンパクの部分精製標品であった。また、この標品にはヌクレアーゼ活性は認められなかった。

DNase I フットプリンティング解析： Andrews らの方法(1)を改変して行った。まず、Maniatisらの方法(48)に従って、制限酵素切断で5'突出末端をもつDNA 断片とDNA polymerase I Klenow 断片および[α－^{32}P]dCTPをdATP、dGTP、dTTPを含む反応液に加え、25℃で30分間反応させて、3'末端が^{32}P で標識されたDNA 断片を調製した。このDNA 断片を適当な制限酵素で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、目的のDNA 断片を回収し、一端のみが^{32}P で標識されたDNA 断片を得た。このDNA 断片とRタンパク部分精製標品とを50μl の反応液[50 mM トリス－塩酸(pH 7.5)、5 mM $MgCl_2$、50 mM NaCl、1 mM DTT、5 % (v/v) グリセロール、100 μg/ml子牛の胸腺のDNA (Sigma)]に加え、30℃で30分間反応させた。その後、適当量のDNase I 溶液[子牛のすい臓由来のDNase I (Sigma) を50 mM KCl、10 mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.4)、10 % (v/v) グリセロール、2 mM $CaCl_2$、0.1 mg/ml BSA を含む溶液に溶かした] を加え、30℃で7分間処理した。これに、150 μl の停止溶液[50 mM EDTA、0.2% (w/v) SDS、 50 μg/ml tRNA] を加えてDNase I 処理を停止させた後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行った。このDNA 試料をDNA 変性用色素液[80% (w/v) 脱イオン化ホルムアミド、10 mM NaOH、1 mM EDTA、0.1% (w/v) XC、0.1% (w/v) BPB]に溶かし、90℃、5 分間熱変性した後に、８％の変性ポリアクリルアミドゲルに乗せ、2,000Vで電気泳動した。ゲルを乾燥後、X線フィルムを用いてオートラジオグラフィーを行った。また、タンパクの結合領域の推定はDNase I 処理したDNA 断片の泳動パターンと、同じDNA 断片をMaxam とGilbertの方法(49)でGとAまたはTとCで部分分解したDNA 断片との泳動パターンを比較して行った。

第３節　実験結果

３．１　S. cerevisiae におけるpSR1プラスミドの分子内組換え

１）分子内組換え部位の限定

大腸菌宿主内での複製能を与えるため、 pSR1 プラスミドＡ型の小ユニーク領域にYIp32Sプラスミドを連結した雑種プラスミドpSRT301 を構築し、この雑種プラスミドを用いて、そのpSR1区分に１か所SalIリンカーが挿入された種々の変異プラスミドが多数分離されている(40)。また、pSR1プラスミドの分子内組換えはIRを介して起こることがわかっている(2,90)。そこで、種々のSalIリンカー挿入変異プラスミドのうち、制限酵素解析から、そのpSR1区分の一方のIRに１か所SalIリンカーが挿入された変異プラスミド（Fig. 2-1 の矢印で示す位置にSalIリンカーが挿入されている）を用いて分子内組換えに必須な領域の限定を行った。挿入SalI部位の位置をさらに詳細に限定するために、挿入SalI部位付近のDNA をM13 ファージにクローニング後、ダイデオキシシークエンス法を用いてDNA塩基配列を決定した結果、SalIリンカーはFig. 2-2に示す位置に挿入されていた。いずれの変異プラスミドも１個のSalIリンカーを含んでいたが、多くのプラスミドでは、変異部位に塩基欠失（最大311 bp）または重複を伴っていた。すなわち、pSRT309、pSRT326、pSRT306、pSRT308では、各々、21 bp、311 bp、4 bp、22 bpの欠失が生じており、pSRT321、pSRT322では、各々、9 bp、14 bp の重複が生じていた。また、pSRT327 では、5 bpの欠失が生じており、さらに、新しくAvaI部位が形成されていた。

まず、これらのSalIリンカー挿入変異プラスミドで分子内組換えが起こるかを調べるために、これらの変異プラスミドをS. cerevisiae NA87-11A-D (leu2-3,112 [cir°])に導入した。30°Cで４日間培養後、各々の変異プラスミドごとに、平板培地上に生育したLeu⁺形質転換体からプラスミドDNA を調製した。調製したプラスミドDNA で大腸菌RR1 株をアンピシリン耐性に形質転換することにより、酵母宿主内の各プラスミド分子を１分子（クローン）ずつに分別した。各々のアンピシリン耐性形質転換体から調製したプラスミドDNAクローンを制限酵素AvaIで切断後、アガロースゲル電気泳動法で、DNA 断片の大きさを調べ、Ａ型（原型）分子かＢ型（組換え型）分子かを判断した（Ａ型分子およびＢ型分子が取ると予想された構造を、Fig. 2-3B に示す）。pSR1プラスミドの分子内組換えは、R遺伝子に適当なプロモーターを結合しない限り、大腸菌内では起こらないので、Ｂ型分子

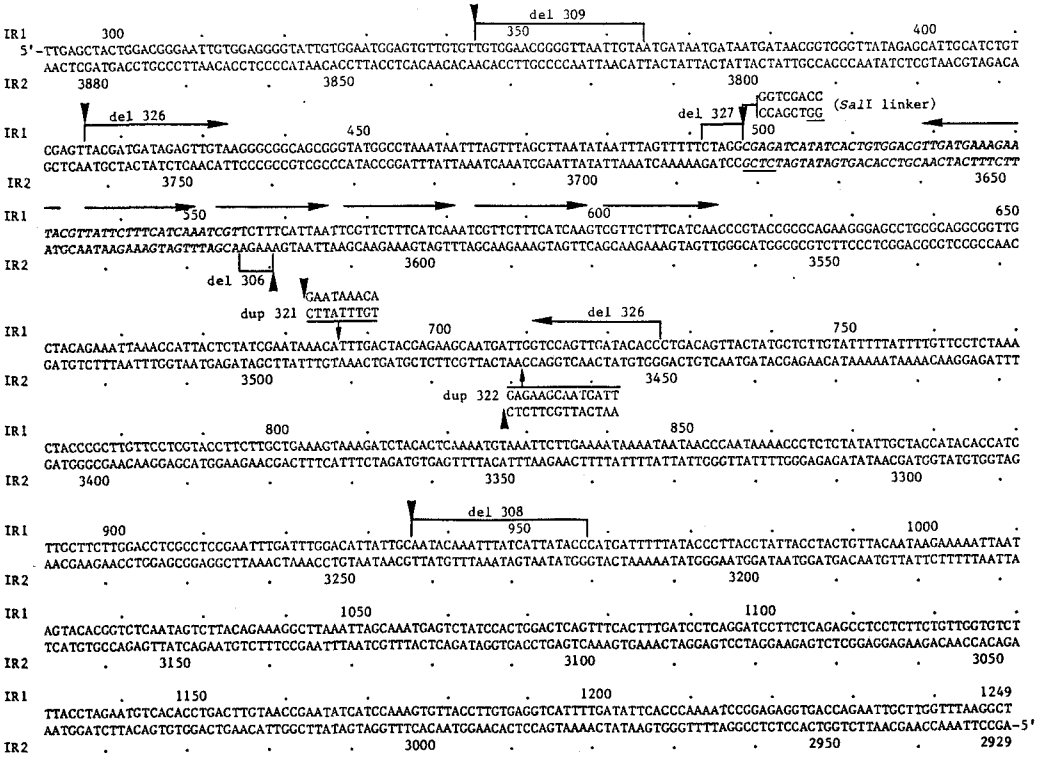


Fig. 2-2. Exact insertion sites of the SalI linker in the mutant plasmids. Insertion sites of each 8-bp SalI linker on mutant plasmids determined by sequencing the nucleotides are indicated with arrowheads bearing the mutant number (description of pSRT was omitted from the plasmid symbols) for the IR1 (upper) and IR2 (lower) sequences of the inverted repeats. del and dup represent the deletion and duplication, respectively, which occurred accidently by mutagenesis with the linker insertion. The new AvaI site, 5'-CCCGAG-3', created by the linker insertion in the pSRT327 is underlined. The italicized nucleotide sequence between the insertion sites of pSRT327 and pSRT306 indicates the 58 bp region containing the essential sequence for the intramolecular recombination. Horizontal arrows indicate the 14-bp repeated sequences.

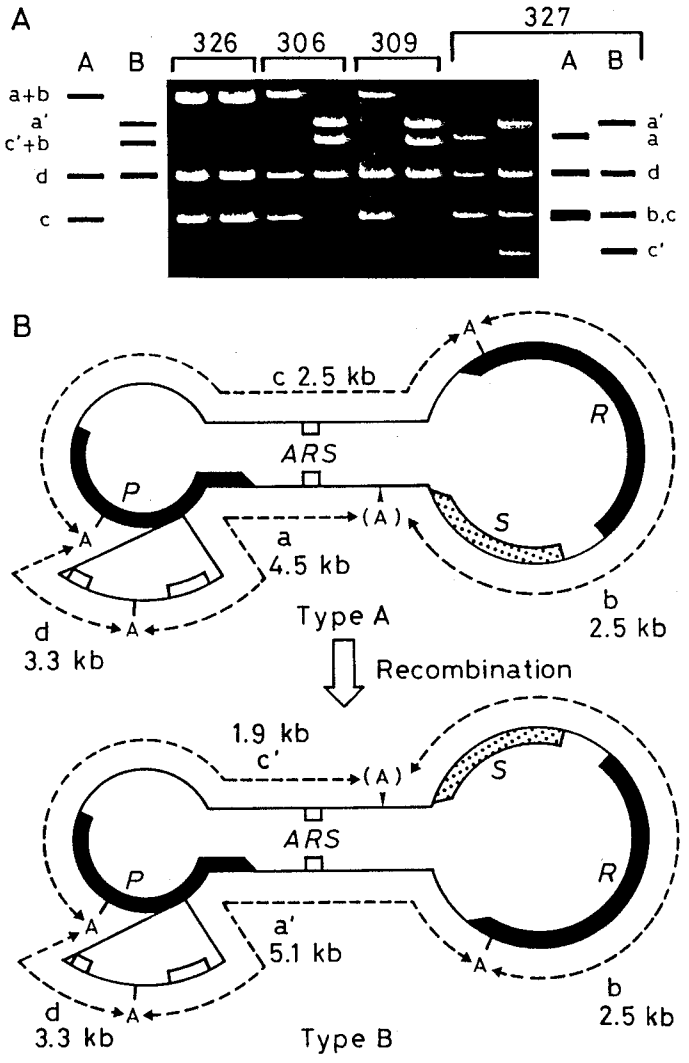


Fig. 2-3. Clonal analysis of the mutant plasmids. The DNA of each plasmid clone prepared from the E. coli transformant was restricted with AvaI and electrophoresed on agarose gel. Panel A shows the migration patterns and possible migration patterns of the restriction fragments of type A (lane A) or B (lane B) configuration of the plasmid molecules of pSRT306 (indicated as 306), pSRT309 (309), pSRT326 (326), and pSRT327 (327) as illustrated in panel B. pSRT327 has an additional AvaI site indicated by an arrowhead with (A). The a, a', b, c, c', and d bands shown in panel A correspond to the DNA fragments of the plasmid molecules as shown in panel B.

は、酵母内での組換えによって生じたと考えられる。この結果、pSRT326 では、調べたプラスミドクローンは全てA型分子であったが（35個；Fig. 2-3A に調べたクローンのうちの２クローンのゲル写真を示した）、pSRT306、pSRT308、pSRT309、pSRT321、pSRT322、pSRT327 では、A型分子とB型分子がほぼ同数ずつ得られた（Fig. 2-3A およびTable 2-2)。したがって、pSRT326 以外のプラスミドでは、S. cerevisiae 宿主内で分子内組換えが起こったと考えられる。これらの結果から、pSRT326 プラスミドが欠失している311 bpの領域（IR1 の416 塩基から726 塩基）に分子内組換えにとって必須な領域が含まれており、他のSalIリンカー挿入変異は分子内組換えに影響を及ぼさないことが示唆された。また、pSRT327 では、予想されたA型分子およびB型分子以外のクローンも得られたが、これらのクローンの解析結果は、次の「分子内組換えに伴う遺伝子変換」の項で述べる。

Table 2-2. Frequencies of gene conversion associated with intramolecular recombination

Plasmid	Host RAD52 genotype	No. of plasmid clones				
		Total	Recombinant[a]	Gene convertant		
				Total[b]	SalI/SalI[c]	+/+[d]
pSRT308	+	36	11	3(1)	2	1
pSRT322	+	33	18	10(5)	2	8
pSRT321	+	25	13	12(4)	8	4
pSRT306	+	38	21	5(1)	3	2
pSRT327	+	62	24	18(11)	10	8
pSRT309	+	33	18	1(1)	0	1
pSRT327(R⁻)	+	13	0	0	0	0
pSRT2709	+	50	34	19(5)	3	16
pSRT0627	+	35	0	1(1)	0	1
pSRT0609	+	38	1	0	0	0
pSRT327	rad52-1	33	17	5(2)	4	1
pSRT327(R⁻)	rad52-1	42	0	0	0	0

[a]Recombinant class of plasmid clones, discriminated by the relative orientation of two unique regions, which involves both the gene-convertant and nonconvertant clones.

[b]Numbers in parentheses indicate the number of plasmid clones showing the original configuration of two unique regions among the plasmid clones showing the gene conversion.

[c]SalI/SalI represents the plasmid clones having the SalI site on both copies of the inverted repeats.

[d]+/+ represents the plasmid clones having the wild type or without the SalI site for both copies of the inverted repeats.

次に、個々の変異プラスミドの挿入SalI部位に対して、左右どちら側で組換えが起こったかを調べ、組換え部位をさらに詳細に限定した。組換え部位の限定はFig. 2-4に示した方法で行った。たとえば、Fig. 2-4B に示した構造のSalIリンカー挿入変異プラスミドをS. cerevisiae 細胞内で増殖させた後、S. cerevisiae 細胞から回収したプラスミドを大腸菌に導入し、S. cerevisiae 細胞に存在した個々のプラスミドクローンを分別する。各クローンを制限酵素MluIとSalIで二重切断する。もしも、SalI部位よりも左側（Fig. 2-4BにおいてLで示した位置）で組換えが起こったならば、プラスミド分子はB－I 型の構造（Fig. 2-4A)に変化し、A型分子と同じDNA 断片が生じる。組換えがSalI部位よりも右側（Fig. 2-4B においてRで示した位置）で起こったならば、B－II型の構造（Fig. 2-4C) に変化し、A型分子と異なるDNA 断片が生じる。プラスミドクローンを制限酵素MluIとSalIで二重に切断後、アガロースゲル電気泳動で切断パターンを調べることにより、挿入SalI部位の左右どちら側で組換えが起こったかを決めることができる。

Fig. 2-3の実験のAvaI切断パターンから、組換え型（B型）と決まったプラスミドクローンを制限酵素MluIとSalIで二重切断後、アガロースゲル電気泳動にかけた（Fig. 2-5)。この結果、SalI部位が両方のIRの相対する位置に存在したり、IRから消失しているクローンも観察されたが、このような予想外のクローンは除外して考えた。このような予想外のクローンについては、後ほど述べる。種々の変異プラスミドのうち、pSRT309 (21 クローンを調べたが、そのうちの11クローンを示した)、pSRT327 (24クローンのうち5 クローンを示した）では、調べたクローンは全てA型分子と同じ切断パターンを示し、B－I 型分子であったが、pSRT306 (20 クローンのうち12クローンを示した)、pSRT321 (2クローン；結果省略)、pSRT322 (6 クローン；結果省略）では、全てA型分子と異なるパターンを示し、B－II型分子であった。したがって、pSRT309、pSRT327の挿入SalI部位よりも左側で、pSRT306、pSRT321、pSRT322 の挿入SalI部位よりも右側で組換えが起こった。このことから、組換え部位はpSRT306 のSalI部位とpSRT327 のSalI部位の間にあるといえる。pSRT306 とpSRT322 の挿入SalI部位はIR2 に他の変異プラスミドの挿入SalI部位はIR1 に存在するので、pSRT306 とpSRT327 のSalIリンカー部位の位置から、組換え部位は、IR1 上の497 塩基から554 塩基の間、IR2 上の3,624 塩基から3,681 塩基の間の58 bp 配列内（Fig. 2-2のイタリック文字で示した領域）に限定された。58 bp 配列内には3 bpのスペース部を挟む14 bp の逆向き反復配列が存在する。また、これに続いて４個の同じ14 bp 反復配列が存在するが、これらは58 bp 配列に含まれていない。

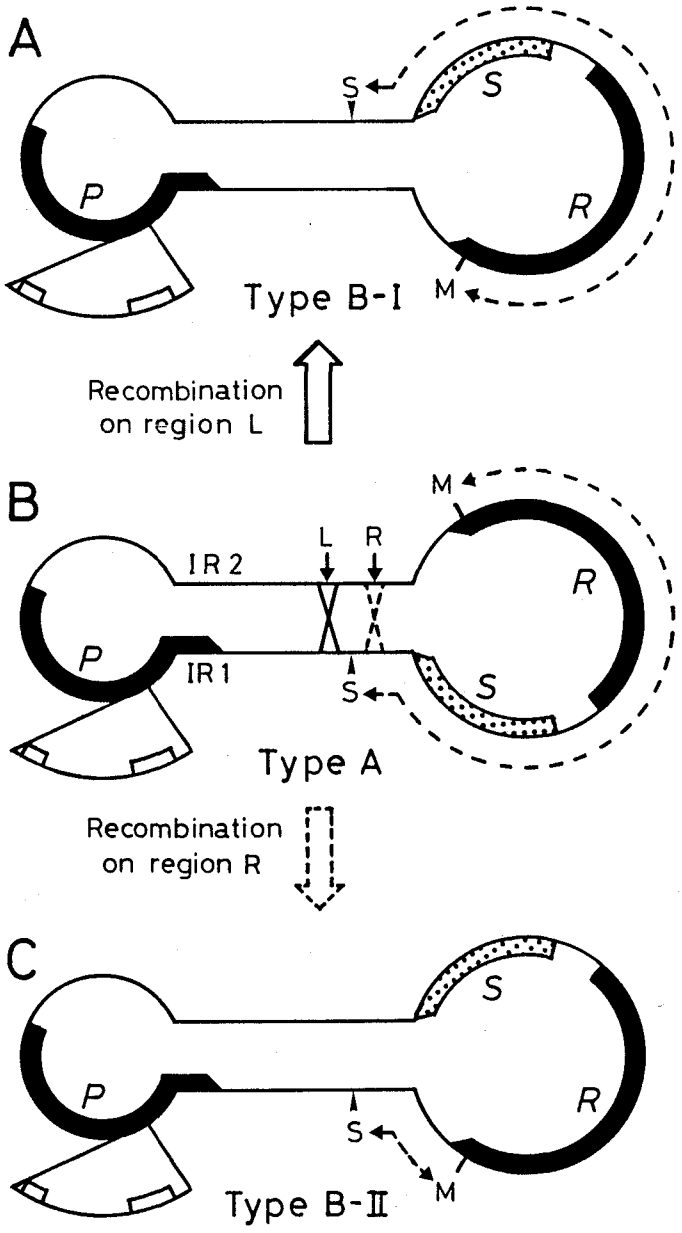


Fig. 2-4. Strategy for determination of the recombination site on the pSRT plasmids by examination of the SalI-MluI fragments. Symbols are described in the legend to Fig. 2-1.

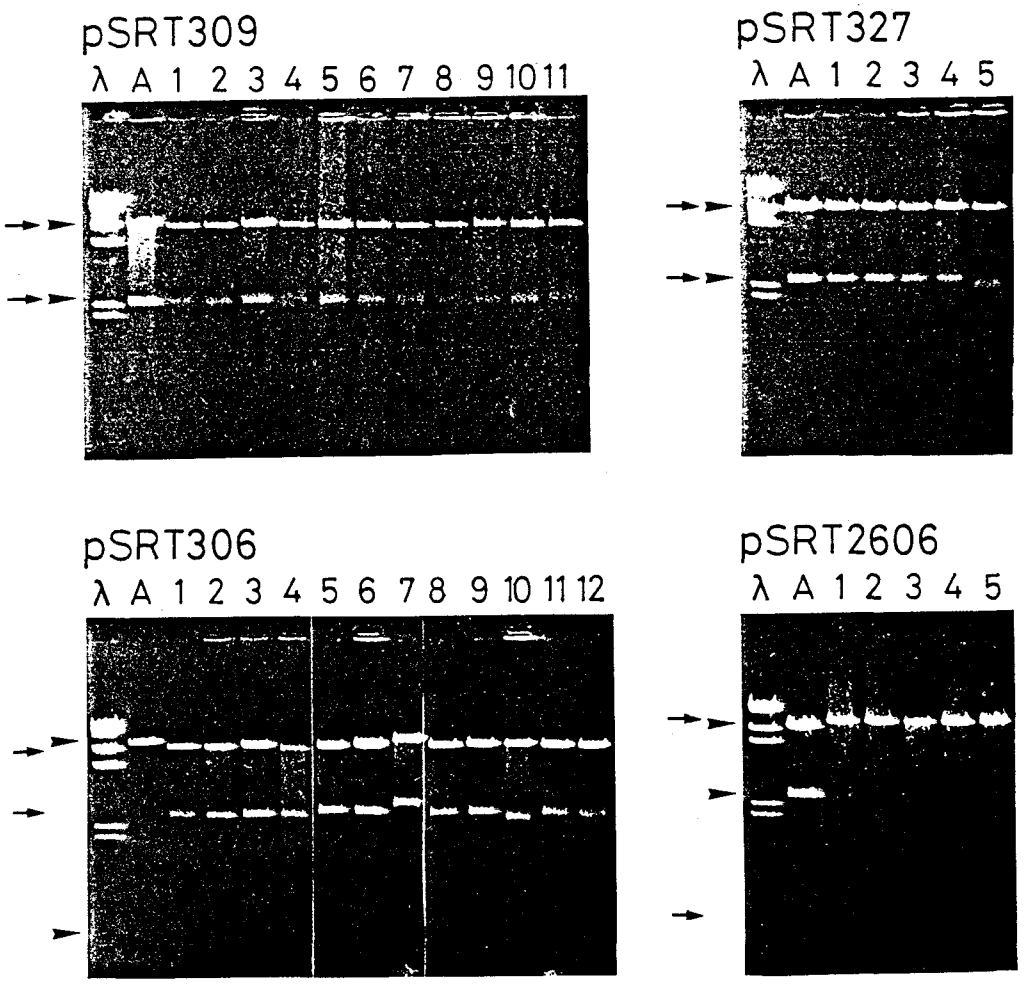


Fig. 2-5. Restriction analyses of pSRT309, pSRT327, pSRT306, and pSRT2606. Several type B (recombinant) molecules of each mutant plasmid discriminated by AvaI digestion (Fig. 2-3) were double digested with SalI and MluI and electrophoresed on an agarose gel according to the strategy shown in Fig. 2-4. Each original type A molecule of the mutant plasmids was electrophoresed on lane A of each panel, and lane λ contained the λ phage DNA restricted with HindIII. Arrowheads on the left margin of each panel indicate the migration sites of the original type A plasmid, while those indicated by arrows are the bands of type B plasmid molecules.

次に、分子内組換えに必須な領域を限定することを行った。このために、SalIリンカー挿入変異プラスミドの小さいほうのMluI-SalI 断片と、他のリンカー挿入変異プラスミドの大きいほうのMluI-SalI 断片とを連結し、Fig. 2-6に示す種々の欠失変異プラスミドを作製した。これら欠失変異プラスミドをS. cerevisiae NA87-11A-D株に形質転換法で導入した。この形質転換体を用いてSalIリンカー挿入変異プラスミドの場合と同様の方法で分子内組換えの有無を調べた。この結果、Fig. 2-6に示すように58 bp 配列を含む領域を欠失したpSRT2627、pSRT0627およびpSRT0609では、原型分子ばかりが観察されたが、58 bp 配列の外側の領域のみを欠失したpSRT2606およびpSRT2709では、ほぼ同数の原型分子と組換え型分子が観察された。したがって、58 bp 配列の外側の領域のみを欠失したプラスミドでは分子内組換えは起こるが、58 bp 配列を含む領域を欠失したプラスミドでは分子内組換えは起こらない。このことから、先に組換え部位として限定した58 bp 配列内のDNAが分子内組換えにとって必須である。R遺伝子を欠損したpSRT310 および58 bp 配列を欠失したpSRT0609では、各々１個の組換え型分子が観察されたが、これらの分子は宿主の持つ普遍的組換え系によって生じたと考えられる。

２）分子内組換えに伴う遺伝子変換

前項目で述べたように、S. cerevisiae から回収したpSRT327 プラスミドを大腸菌で１分子ずつに分別し、AvaIで切断後、アガロースゲル電気泳動を行うと、Ａ型分子とＢ型分子に相当する２種類の切断パターンが観察されると予想されたが、Fig. 2-7A の上側に示した５種類の切断パターンが観察された。ａレーンのパターンとｂレーンのパターンは、各々Ａ型分子（62クローンを調べたうちの27クローン）とＢ型分子（62クローンのうち17クローン）に一致するが、他のプラスミドの示す切断パターンは分子内組換えだけでは説明できない。pSRT327 プラスミドではSalIリンカーの挿入により新しくAvaI部位が形成されている（Fig. 2-2）。AvaI切断パターンから、遺伝子変換によりIR1 上のAvaI部位が、IR2 上の相対する位置にも移り、両方のIRにAvaI部位が形成されている場合（ｃレーン：62クローンのうち10クローン）と、IR1 上のAvaI部位が消失して、両方のIR上からAvaI部位が失われた場合（ｄレーンおよびｅレーン：62クローンのうち８クローン）とが考えられる（Fig. 2-7B)。これらの変化を隣接する挿入SalI部位で確かめるために、各レーンのプラスミドクローンを制限酵素SalIで切断してSalIリンカー部位の変化を調べた（Fig. 2-7A 下側の写真）。この結果、ａレーンおよびｂレーンのプラスミドでは１か所

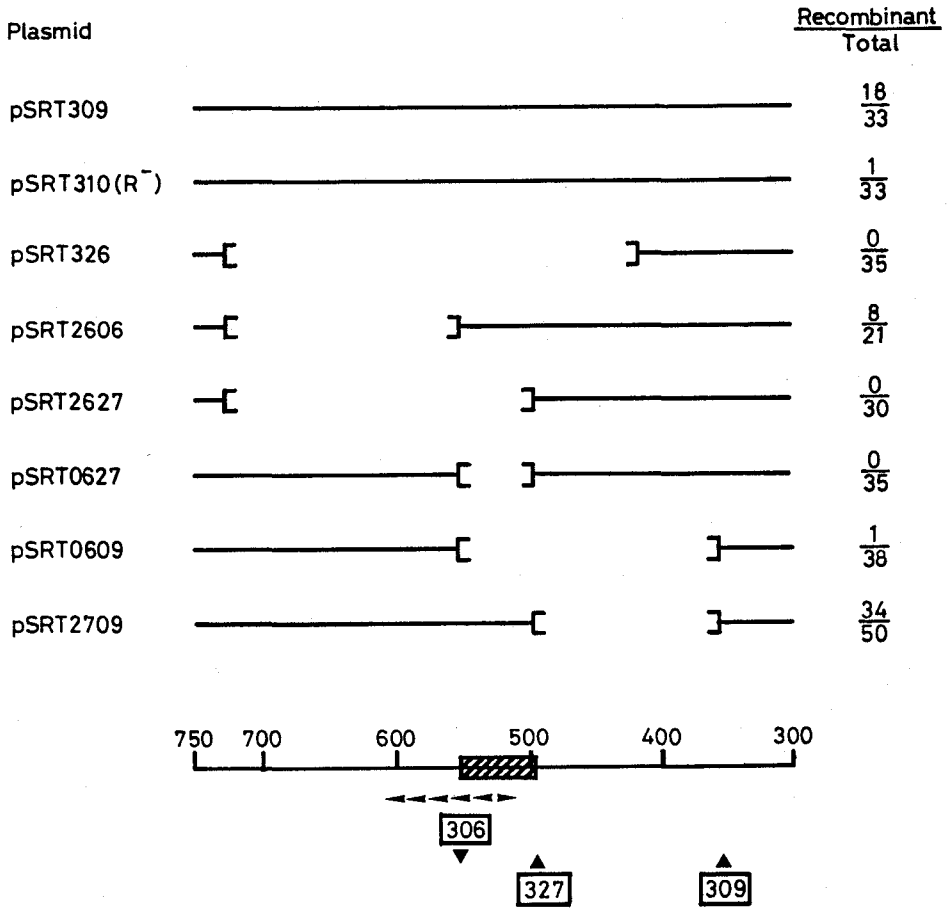


Fig. 2-6. Effect of the deletion in the inverted repeats on the intramolecular recombination of pSRT plasmids. The deletion plasmids were constructed by ligation of the appropriate SalI-MluI fragments originating from the mutant plasmids. pSRT2606 was constructed from those fragments of pSRT326 and pSRT306, pSRT2627 from pSRT326 and pSRT327, pSRT0627 from pSRT306 and pSRT327, pSRT0609 from pSRT306 and pSRT309, and pSRT2709 from pSRT327 and pSRT309. The hatched box on the scale represents the 58 bp region, and the boxes with numbers indicate the approximate insertion sites of the SalI linker in each mutant plasmid. Verification of intramolecular recombination was carried out by using the same procedure as described in the legend to Fig. 2-3.

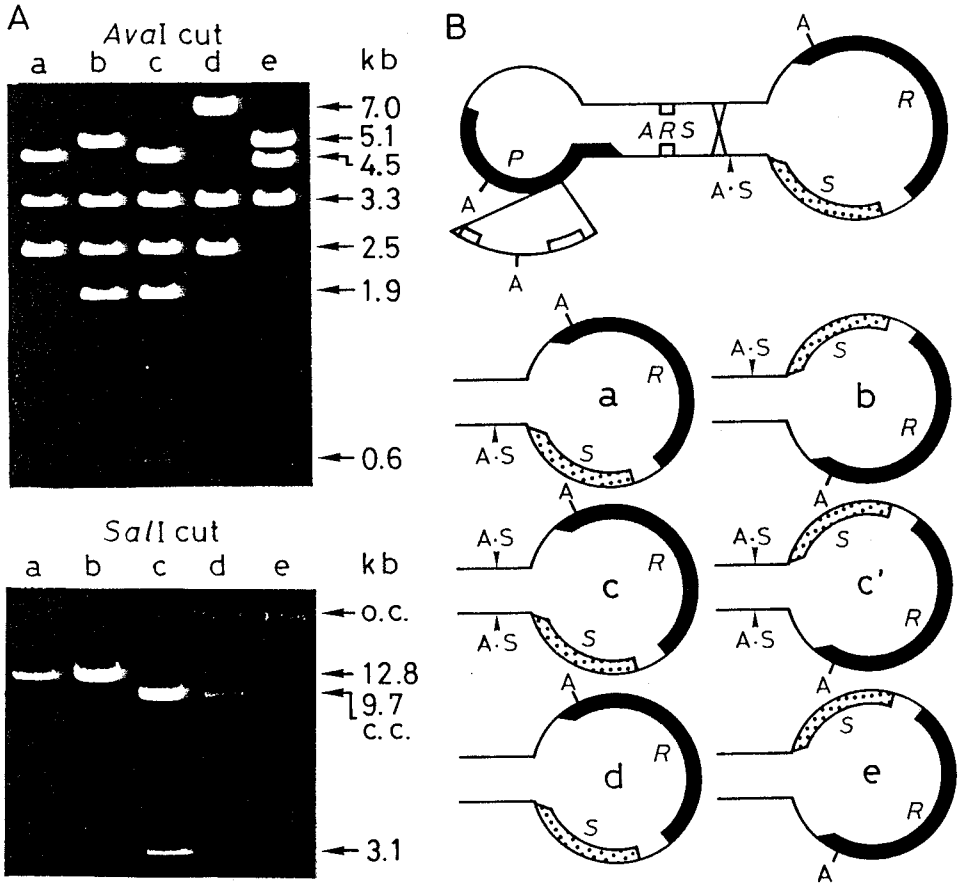


Fig. 2-7. Occurrence of variant molecules from pSRT327. Plasmid DNA of pSRT327 was prepared from the S. cerevisiae host. This DNA was used for the transformation of E. coli to the Amp^r phenotype. (A) Several independent samples of pSRT327 DNA prepared from the E. coli transformants were examined for their structure on agarose gel after restriction with AvaI and SalI. DNA samples showing five different classes of migration patterns (lanes a through e) are illustrated in these panels. The molecular sizes of the DNA fragments were estimated by comparison with the λ phage DNA digested with HindIII. (B) Structures of the pSRT327 variant molecules, assuming that gene conversion took place at the AvaI-SalI (A·S) site.

で切断され、SalI部位に変化はなかった。cレーンのプラスミドは2断片に切断され、両方のIRの相対する位置にSalI部位が生じていた。dレーンおよびeレーンのプラスミドは切断されず、両方のIRからSalI部位が消失していた。このように、SalI部位の変化はIRのAvaI部位で考えられた変化と一致することから、IRのAvaI・SalI 部位では遺伝子変換が起こると言える。以上の現象をまとめると、pSRT327 プラスミドのAvaI・SalI 部位では遺伝子変換が起こる結果、AvaI・SalI/+ 型のIRをもつプラスミドから、AvaI・SalI/AvaI・SalI 型のIRまたは+/+ 型のIRをもつプラスミドが生じる (Fig. 2-7B)。また、+/AvaI・SalI 型のプラスミドは生じなかった。

次に、種々のSalIリンカー挿入変異プラスミドおよび欠失変異プラスミドで、遺伝子変換が起こることを調べた。S. cerevisiae から回収した変異プラスミドを、大腸菌を使用して個々のクローンに分別した後、制限酵素SalIで切断し、アガロースゲル電気泳動を行った。切断パターンから、遺伝子変換の有無および種類 (+/+ 型またはSalI/SalI 型) を判断した。その結果、R遺伝子を欠損したpSRT327(R^-) および58 bp 配列を欠くpSRT0609とpSRT0627では遺伝子変換はほとんど観察されなかったが、他のプラスミドでは、+/+ 型およびSalI/SalI 型の遺伝子変換が高頻度で観察された(Table 2-2)。pSRT0627では遺伝子変換を起こしたクローンが1個観察されたが、これは宿主の普遍的組換え系によって生じたと考えられる。また、大きい欠失 (pSRT2709では153 bpが欠失している) でも、58 bp 配列に対しARS 配列 (自律複製配列) よりも遠い部位 (pSRT308)でも、高頻度で遺伝子変換が観察された。したがって、遺伝子変換は分子内組換えに伴ってIR全域で起こっている。これらの変異部位は両方のIRに形成されたり、両方のIRから消失したりするが、元の変異IRから消失して、他方のIRに変異が転移することはなかった。

遺伝子変換は大腸菌内で起こった可能性もあるが、S. cerevisiae から回収したpSRT327 を直接AvaIで切断し、アガロースゲル電気泳動を行った後、^{32}P で放射能ラベルしたpSR1プラスミドをプローブとしてサザン解析を行うと、遺伝子変換型プラスミドのバンドも観察されたこと (結果省略) から、遺伝子変換は大腸菌内で起こったのではなく、S. cerevisiae 宿主内で起こったといえる。

以上の結果から、S. cerevisiae 宿主内においてIR内の変異部位では分子内組換えに伴ってIR全域で遺伝子変換が起こることがわかった。

3）分子内組換えおよび遺伝子変換へのRAD52 遺伝子の関与

S. cerevisiae において体細胞分裂時の遺伝的組換えおよび遺伝子変換にはRAD52 遺伝子の働きが必須である(36,47,65)。そこで、pSR1プラスミドの分子内組換えおよび遺伝子変換にRAD52 遺伝子の働きが必要であるかを調べた。まず、rad52-1 変異株NS1-2CをpSRT327 で形質転換した。形質転換体を30℃で４日間培養後、NA-87-11A-D 株と同様の方法で分子内組換えと遺伝子変換の有無を調べた。この結果、rad52 変異株でも野生株と同じ頻度で分子内組換え（野生株では62クローン中24クローンに対し、変異株では33クローン中17クローン）と遺伝子変換（野生株では29%に対し、変異株では15%）が起こった(Table 2-2) 。このことから、これらの現象にはRAD52 遺伝子の働きは必要でないと言える。

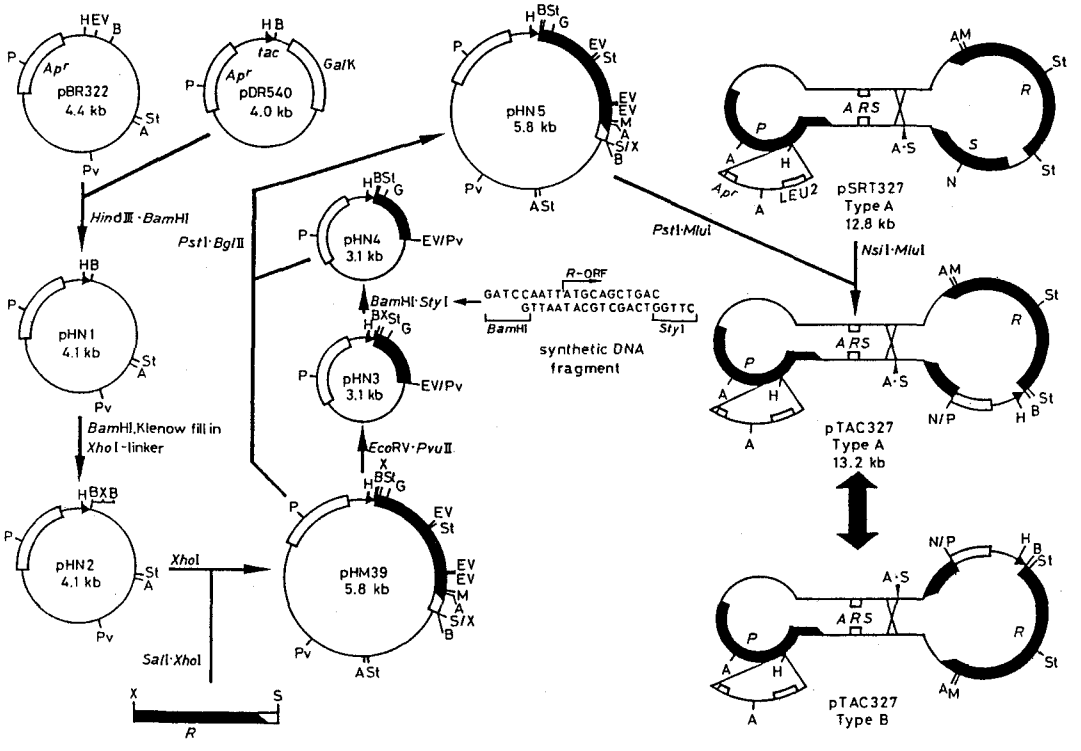


Fig. 2-8

Fig. 2-8. Construction and intramolecular recombination of pTAC327 plasmid. Plasmid pHN1 was constructed by ligation of a small HindIII-BamHI fragment of pDR540 (68) containing tac promoter and a large HindIII-BamHI fragment of pBR322(6). XhoI linker was inserted at a BamHI site of pHN1 after fill-in reaction. To clone R gene, plasmid pSRT303 (40) was restricted partially with PvuII and linearized at 152 bp upstream from ATG of the R gene and digested with BAL31 exonuclease and was ligated with XhoI linker. Consequently, XhoI linker was positioned at 16 bp upstream from the ATG of R gene on pSRT303. The XhoI-SalI fragment containing R gene was inserted into the XhoI site of pHN2 to generate pHM39. A small PvuII-EcoRV fragment of pHN39 was deleted and the small BamHI-StyI fragment was replaced with a BamHI-StyI 24 bp synthetic duplex DNA fragment to generate pHN4. A large PstI-BglII fragment of pHN4 was replaced with a large PstI-BglII fragment of pHM39 to generate pHN5. Plasmid pTAC327 was constructed by connecting a large MluI-NsiI fragment of pSRT327 with a small PstI- MluI fragment of pHN5. pTAC327 recombines to isomer as illustrated by thick arrow. Open boxes with GalK indicates the Galk gene of E. coli. The approximate position of AvaI·SalI site generated by the SalI linker insertion is indicated by an arrowhead. The tac promoter is indicated with a closed triangle. Abbreviations for the restriction sites are; A, AvaI; B, BamHI; EV, EcoRV; G, BglII; H, HindIII; M, MluI; N, NsiI; P, PstI; Pv, PvuII; S, SalI; St, StyI; and X, XhoI.

３．２　大腸菌におけるpSR1プラスミドの分子内組換え

１）pSR1プラスミドの分子内組換えへの酵母宿主因子の関与

pSR1プラスミドの分子内組換えに酵母宿主因子が関与しているかを調べるために、大腸菌内でR遺伝子を発現することを試みた。第１部で示したように、pSRT327 は S. cerevisiae 宿主内で分子内組換えを行うが、pSRT326 は組換え部位を欠失しているために、pSRT327(R⁻) はR遺伝子が欠損しているために、分子内組換えを行わない。これらのプラスミドは大腸菌内で複製することはできる。しかし、pSRT327 は大腸菌内では分子内組換えを行わず、R遺伝子プロモーターが大腸菌内で機能していないのではないかと考えられた。そこで、R遺伝子プロモーターをIPTGの誘導により大腸菌内で発現可能なtacプロモーター(26)に置き換えた。Fig. 2-8に示すように、pSRT327、 pSRT326、pSRT327(R⁻) プラスミドのNsiI-StyI 断片（543 bp）をtac プロモーターを含むPstI-BamHI断片（877 bp）と24 bp のBamHI-StyI合成２本鎖DNA で置き換えて、pTAC327、pTAC326、pTAC327(R⁻)（いずれもＡ型分子である）を作製した(Fig. 2-8 ではpTAC327 の作製方法を図示した。pTAC326、pTAC327(R⁻)はそれぞれpSRT327 をpSRT326、pSRT327(R⁻)に置き換えて作製した）。これらプラスミドでは、tac プロモーターのSD配列とR遺伝子のATG の間隔は大腸菌での発現に最適とされる7 bpである。大腸菌JM103 株をpTAC327、pTAC326、pTAC327(R⁻)で形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体を1 mM IPTGおよびアンピシリンを含むLB液体培地で37℃で２日間培養した。大腸菌からプラスミドDNA を回収し、HindⅢで切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、Ａ型分子のバンドおよびＢ型分子のバンドを観察した(Fig. 2-9)。その結果、pTAC327 ではほぼ同じ濃度でＡ型分子のバンドとＢ型分子のバンドが観察されたが、pTAC326、 pTAC327(R⁻) ではＡ型分子のバンドだけが観察された（Fig. 2-9; 9 レーン、3 レーン、5 レーン）。したがって、大腸菌内でも、Ｒタンパクの働きでpSR1プラスミドの分子内組換えが起こる。IPTGを含まないLB液体培地で培養した大腸菌からpTAC327 を回収し、分子内組換えの有無を調べるとＡ型分子とＢ型分子のバンドが観察され、分子内組換えが起こっていた（8 レーン）。これは、IPTGを含まない培地で培養してもR遺伝子が弱く発現し、それで十分組換えが生じたと考えられる。これらのことから、pSR1プラスミドの分子内組換えには酵母宿主因子は関与していないといえる。

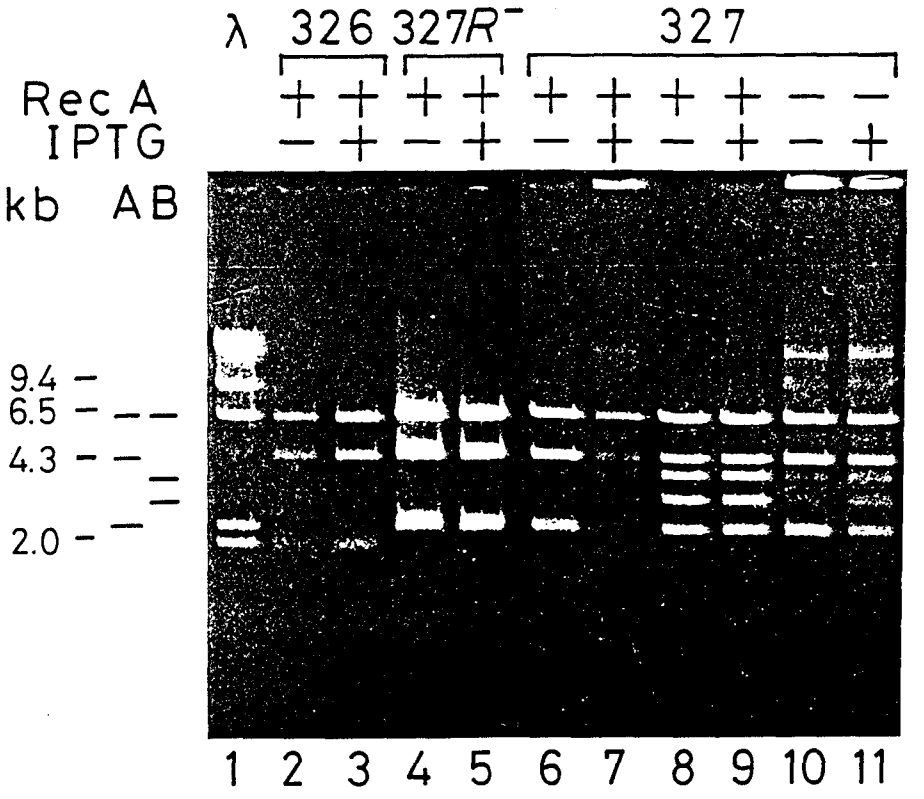


Fig. 2-9. Intramolecular recombination mediated by R protein in E. coli. Plasmids pTAC326 and pTAC327(R⁻) have the same structure of pTAC327, expect for having a short deletion at the recombination site or the disrupted R gene, respectively. pTAC326, pTAC327(R⁻), and pTAC327 plasmids were used for transformation of E. coli JM103 (recA⁺; + on RecA line) or JM109 (recA⁻; - on RecA line) strains to the Amp^r phenotype. Plasmid DNAs prepared from the E. coli transformants cultivated in nutrient medium with (+) or without (-) supplement of IPTG were examined for their molecular configuration of type A or type B on an agarose gel after restriction with HindIII. The possible migration patterns of restriction fragments of type A (lane A) or B (lane B) configuration of the plasmid molecules are shown on the left margin. The smallist restriction fragment of type A configuration of pTAC326 molecule run faster than those of other plasmid molecules. Lane 1 contained the λ phage DNA restricted with HindIII, as size marker.

２）分子内組換えへの大腸菌の普遍的組換え遺伝子の関与

大腸菌の普遍的組換えに働くrecA遺伝子、recBC 遺伝子(20)が大腸菌内で起こる分子内組換えに関与しているかを調べた。大腸菌JA221 株（recA⁻）およびJC8679株（recB⁻C⁻sbcA⁻）をpTAC327 プラスミドで形質転換した。この形質転換体を用いて、前項目のJM103株と同様の方法で分子内組換えの有無を調べた。この結果、JA221 株の場合（Fig. 2-9; 11レーン）でも、JC8679株の場合（結果省略）でも、ほぼ同じ濃度でＡ型分子のバンドとＢ型分子のバンドが観察された。したがって、pSR1プラスミドの分子内組換えはrecA⁻ 株（JA221 株）でも、recB⁻C⁻ sbcA⁻ 株（JC8679株）でも起こる。このことから、pSR1プラスミドの分子内組換えには、大腸菌の普遍的組換えに関与する遺伝子のうち少なくともrecA遺伝子とrecBC 遺伝子の働きは不必要であると考えられる。

３．３　ＲタンパクのDNA への結合

pSR1プラスミドの分子内組換えにＲタンパクが必須であることから、Ｒタンパクの組換え部位DNA への結合が示唆される。そこで、Ｒタンパクの58 bp 配列を含むDNA への結合を検討するためにDNase I フットプリンティング実験を行った。

まず、Ｒタンパク標品を得るために大腸菌内でＲタンパクを生産させ、この大腸菌からin vitro組換え活性を指標にしてＲタンパクを精製した。tac プロモーターの下流にR遺伝子を繋いだプラスミドpNN115 (Fig. 2-10)をもつ大腸菌JM103 株をアンピシリンを含む2xYT培地で37℃でA_{650}＝0.5 まで培養後、IPTG（最終濃度　1 mM）を加え、さらに２時間培養した。菌体を溶菌後、抽出液をDEAEセルロースカラム（通過画分）、Bio-Rex 70カラム（0.4 M NaCl溶出画分）、ハイドロキシアパタイトカラム[0.2 M (KH_2PO_4, K_2HPO_4)溶出画分]、Bio-Rex 70 カラム（0.4 M NaCl溶出画分）にかけて精製し、Ｒタンパク標品とした。このＲタンパク標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけたところ、多くのタンパクバンドが認められ、部分精製標品であった（結果省略）。

部分精製Ｒタンパクの58 bp 配列を含むDNA への結合をDNase I フットプリンティング法で調べた。58 bp 配列を含むプラスミドpNN225をHindⅢで切断後、3'末端を[α－^{32}P]dCTPで放射能ラベルした。このDNA 断片をXbaIで切断後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、放射能ラベルされ、58 bp 配列を含む225 bpのHindⅢ-XbaI DNA 断片を調製した（Fig. 2-11Bでは、 HaeⅢ部位がHindⅢ部位にTaqI部位がXhoI部位に相当す

る）。このDNA 断片をRタンパク部分精製標品と30℃、30分反応後、DNase I で処理した。DNA 断片を一本鎖に変性後、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。DNA 断片のサイズは、同じ225 bp DNA断片をMaxam-Gilbert 法で部分分解して得られたDNA 断片の移動度と比較して決めた（Fig. 2-11AのG+A レーンおよびT+C レーン）。この結果、58 bp 配列内に存在する一対の14 bp の逆向き反復配列とその隣に続いて存在する４個の同じ14 bp 配列がDNase I による切断から保護され（Fig. 2-11)、Rタンパクが14 bp の繰り返し配列に結合することが示唆された。

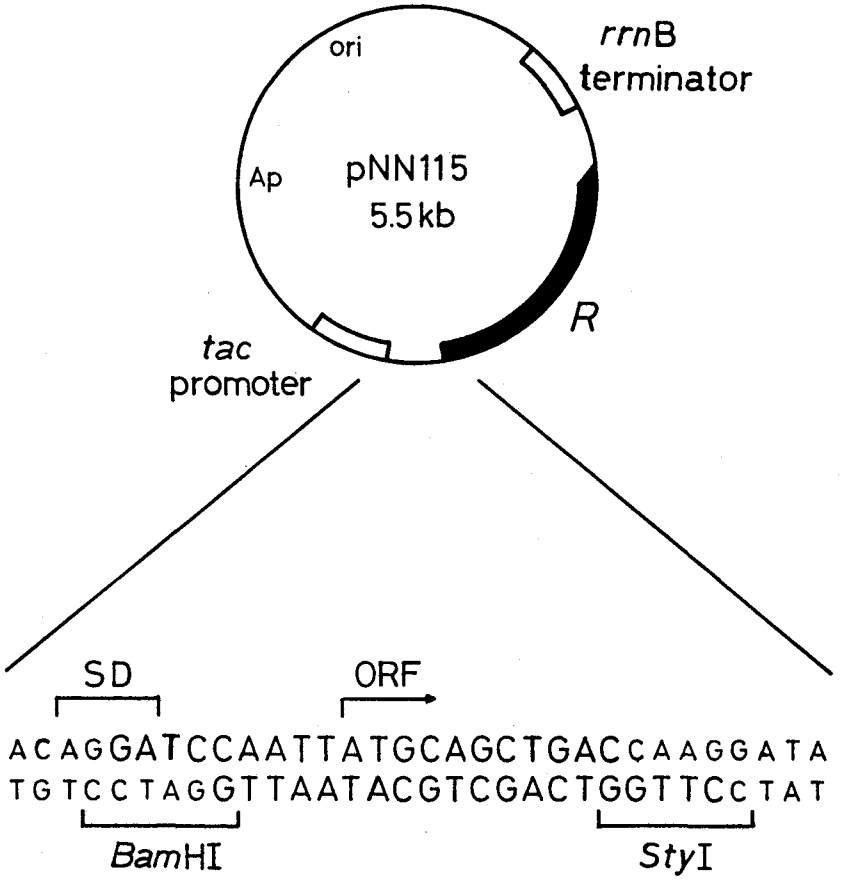


Fig. 2-10. Structure of plasmid pNN115. Plasmid pNN115 was used for production of R protein in E. coli. pNN115 was constructed with the DNAs of tac promoter-R fused-gene (Fig. 2-8) and rrnB ribosomal RNA transcription terminators (12).

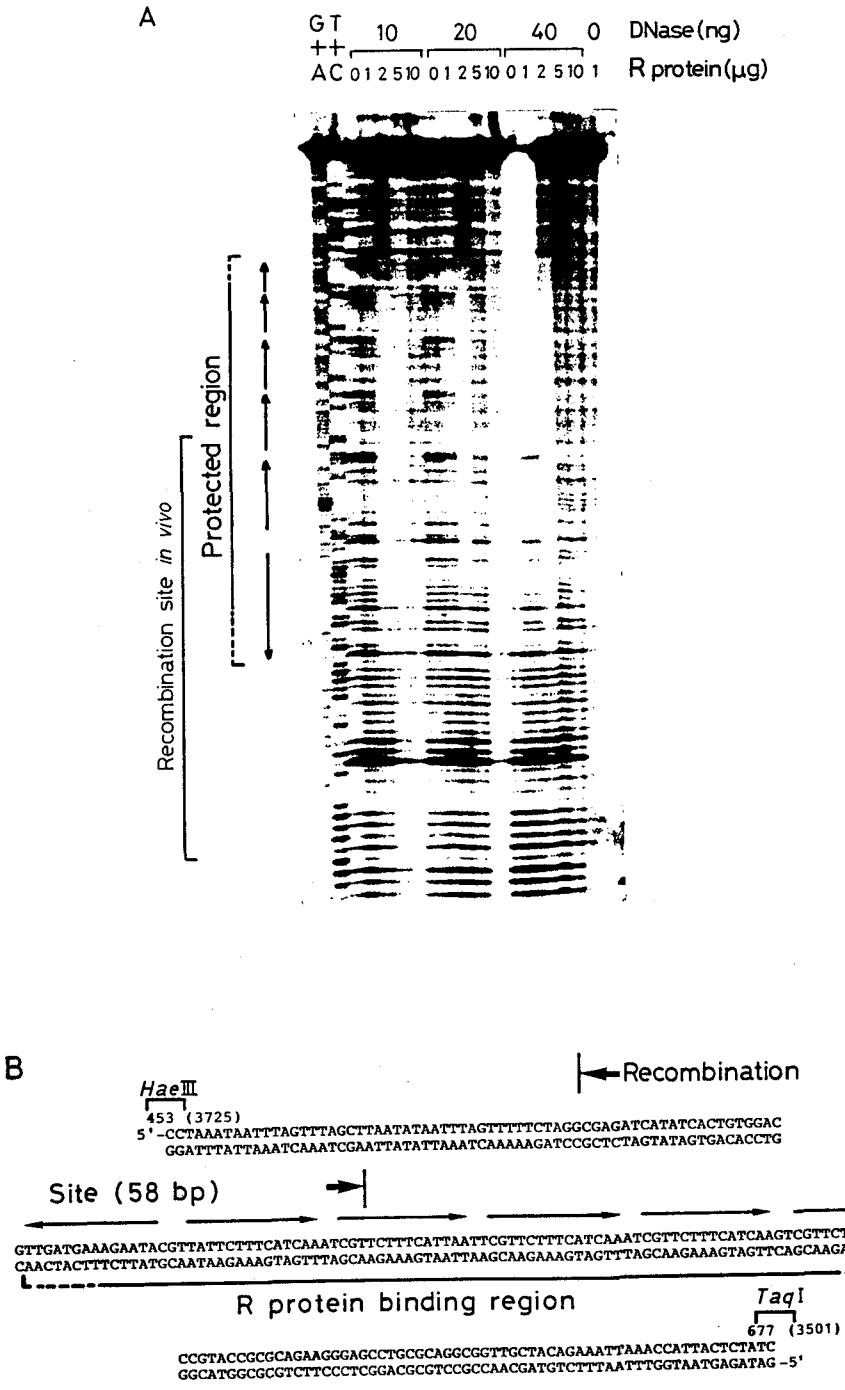

A
GT
++
AC
10
20
40
0
DNase(ng)
0 1 2 5 10 0 1 2 5 10 0 1 2 5 10 1
R protein(μg)
Protected region
Recombination site in vivo
B
Recombination
HaeIII
453 (3725)
5'-CCTAAATAATTTAGTTTAGCTTAATATAATTTAGTTTTTCTAGGCGAGATCATATCACTGTGGAC
GGATTTATTAAATCAAATCGAATTATATTAAATCAAAAAGATCCGCTCTAGTATAGTGACACCTG
Site (58 bp)
GTTGATGAAAGAATACGTTATTCTTTCATCAAATCGTTCTTTCATTAATTCGTTCTTTCATCAAATCGTTCTTTCATCAAGTCGTTCTTTCATCAAC
CAACTACTTTCTTATGCAATAAGAAAGTAGTTTAGCAAGAAAGTAATTAAGCAAGAAAGTAGTTTAGCAAGAAAGTAGTTCAGCAAGAAAGTAGTTG
R protein binding region
TaqI
677 (3501)
CCGTACCGCGCAGAAGGGAGCCTGCGCAGGCGGTTGCTACAGAAATTAAACCATTACTCTATC
GGCATGGCGCGTCTTCCCTCGGACGCGTCCGCCAACGATGTCTTTAATTTGGTAATGAGATAG-5'

Fig. 2-11

Fig. 2-11. DNase I footprints of R protein on the 225 bp DNA fragment containing recombination site. (A) 3'-End-labeled fragments corresponnding to the bottom strand of 225 bp fragment (B) containining recombination site were incubated with 1, 2, 5, or 10 μg of partially purified R protein preparation or without it (0). Samples were then treated with 10, 20, 40 ng of DNase I or without it (0) and electrophoresed on 8% denaturing acrylamide gel. Lanes G+A and T+C contain DNA sequence markers, G+A and T+C, respectively, prepared by the method of Maxiam and Gilbert (49). Protected regions are indicated by bracket, and dashed lines of bracket indicate a region of partial protection. Arrows indicate the 14 bp repeated sequences. (B) Binding region of R protein. The DNA sequence of 225 bp DNA fragment containing recombination site is indeicated. For DNase I footprinting experiment, the DNA fragment, in which HaeIII and TaqI site are converted to HindIII and XhoI site, respectively, was used.

第４節　考察

３．１でpSR1プラスミドの分子内組換えに必須な領域を、S. cerevisiae 宿主内で限定した結果、組換えに必須な部位はIR1 の497 塩基から554 塩基までの、IR2 の3,624 塩基から3,681 塩基までの58 bp 配列内に限定され、この58 bp 配列の外側の領域を欠失しても分子内組換えの頻度に影響はなかった。しかし、一方のIRに生じた変異部位ではIR全域で分子内組換えに伴って遺伝子変換が起こることから、pSR1プラスミドの分子内組換えの開始にはこの58 bp 配列が必須であるが、交叉そのものは、IR全域で起こると考えられる。このようなIR内の変異部位で起こる遺伝子変換は２μmDNA においても観察されている(51)。58 bp 配列は組換え開始部位であるが、便宜上、組換え部位と呼ぶことにする。

58 bp 配列には、3 bpのスペースを置いて隔てられた14 bp の逆向き反復配列が存在する。また、逆向き反復配列の片方の配列に続く４個の同じ14 bp の反復配列は58 bp 配列に含まれなかった。２μmDNA においても同様にIRには8 bpのスペースを置いて13 bp の

逆向き反復配列および片方の13 bp 配列に続く 1 個の13 bp の配列が存在する(8)。そして、組換え部位は8 bpのスペース部と14 bp の逆向き反復配列の中央部を含む28 bp に限定されている(74)。また、フットプリンティング実験の結果、Rタンパクおよび FLP タンパク(1)は、それぞれの反復配列に結合することがわかった。これらのことから、58 bp 配列内の14 bp の逆向き反復配列が、分子内組換え開始部位の認識配列として働いていると考えられる。Z. rouxii 、S. cerevisiae 以外の４種類の酵母、Zygosaccharomyces bailii(89)、Zygosaccharomyces bisporus(91)、Zygosaccharomyces fermentati(92)、Kluyveromyces drosophilarum(19) からも環状プラスミドが見つかっている。これらのプラスミドは塩基配列が大きく異なるにもかかわらず、いずれも一対のIRを持ち、IRを介して分子内組換えを起こす。これらのプラスミドのIR内にはいずれも3 bpまたは5 bpのスペーサーに隔てられた14 bp から29 bp の逆向き反復配列が存在する(19,91,92)。このことからも大きな一対の逆向き反復配列内にあるこの短い逆向き反復配列構造が、分子内組換え部位の認識配列として働いていると思われる。

14 bp の逆向き反復配列に続く14 bp の繰り返し配列にもRタンパクが結合することから、これらの繰り返し配列も分子内組換えに何らかの機能を持つと考えられる。しかし、これらの繰り返し配列を欠くpSRT2606プラスミドでも他のプラスミドと同様に分子内組換え（Fig. 2-6）および遺伝子変換（15クローンのうち３クローン）が起こることから、組換えおよび遺伝子変換にはこれらの繰り返し配列は必要ない。また、結果は示していないが、この繰り返し配列を欠いたIRをもつpSR1プラスミドの組換えをin vitroで行うと、ユニーク領域の逆位は起こるが、欠失は起こらないことから、この繰り返し配列が組換え反応の方向性を決定しているのではない。現在もなお、これらの繰り返し配列の機能はわからない。この研究で行った組換えの検出方法では、組換え頻度の微妙な差を検出できない可能性もあり、繰り返し配列が組換え頻度に及ぼす影響を、今後さらに詳細に調べる必要がある。

大腸菌内でR遺伝子を発現させると、一対のIRをもつプラスミドでは分子内組換えを起こすことから、分子内組換えには酵母宿主因子の働きは必要ないと考えられる。また、S. cerevisiae宿主で体細胞分裂時の普遍的組換えおよび遺伝子変換に必須なRAD52 遺伝子(36,47,65)を欠損しても分子内組換えが起こること、大腸菌宿主で普遍的組換えに働くrecA遺伝子またはrecBC 遺伝子(20)を欠損しても分子内組換えが起こることから、pSR1プラスミドの分子内組換えは、宿主の組換え系とは無関係に行われると考えられる。さら

に、部分精製したRタンパクもin vitroで分子内組換えを行う。したがって、pSR1プラスミドの分子内組換えは、おそらくRタンパクのみで行われると考えられる。また、大腸菌内あるいはin vitroでも分子内組換えが起こることから、組換え部位DNA は真核生物に特有のヌクレオソーム構造を取る必要はないと考えられる。

2μm DNAの分子内組換えは、FLP タンパクによって行われる(9)。FLP タンパクをin vitroの組換え活性(54,70,93)を指標として精製し(4)、組換え反応およびFLP タンパクの性質が調べられている。その結果、2μm DNAの組換え部位はIR内の28 bp に限定された(74)。この領域は、8 bpのスペース部を置いて存在する13 bp の逆向き反復配列の中央部である(8)。FLP タンパクは13 bp の繰り返し配列に結合し(1)、8 bpスペース部の両端に1本鎖あるいは2本鎖の切断を行った後(1,74)、3'末端に、o-ホスホチロシル基を介して共有結合する(30)。組換えは、FLP タンパクのみで起こることから、FLP タンパクは両IR間でFLP タンパク結合領域のDNA 鎖を交換すると考えられている(51)。pSR1プラスミドの分子内組換えでも、組換え開始部位は14 bp の逆向き反復配列を含む58 bp 内に限定された。Rタンパクが14 bp の繰り返し配列に結合する。このように、pSR1の分子内組換えと2μm DNAの分子内組換えは類似していることから、RタンパクはFLP タンパクと同様の機構で分子内組換えを行うと考えられる。すなわち、Rタンパクは、13 bp の逆向き反復配列に結合した後、スペーサー配列の両端で1本鎖または2本鎖のDNA を切断し、DNA 鎖を交換すると考えられる。

先に述べたように、pSR1プラスミドの遺伝子変換は分子内組換えに伴って起こる。したがって、遺伝子変換は分子内組換えと共役するか、分子内組換えによって開始されると考えられる。2μm DNAでもこの様なIRに存在する変異部位の遺伝子変換が観察されている(51)。また、Jayaram は2μm DNAの小ユニーク領域に大腸菌トランスポゾンTn5 を挿入するとS. cerevisiae 細胞内では、Tn5 の反復配列と2μm DNAのIRとで挟まれた領域の遺伝子変換が起こることを観察した(38,39)。この遺伝子変換には、FLP タンパクとRAD52 遺伝子の働きおよび組換え部位が必要である。pSR1プラスミドの遺伝子変換には、RAD52 遺伝子の働きが必要でない点から、これら2つの遺伝子変換の機構は異なると考えられる。これまでに述べてきたことから、遺伝子変換を伴う分子内組換えの機構として2つのモデルが考えられる(Fig. 2-12)。1つはSzostak らにより提唱された二重鎖切断修復モデル(87)である(Fig. 2-12A)。RタンパクはFLP タンパクと同様に一方のIRの58 bp 配列内でDNA を二重鎖切断する(Fig. 2-12A, bステップ)。切断末端がエキソヌクレ

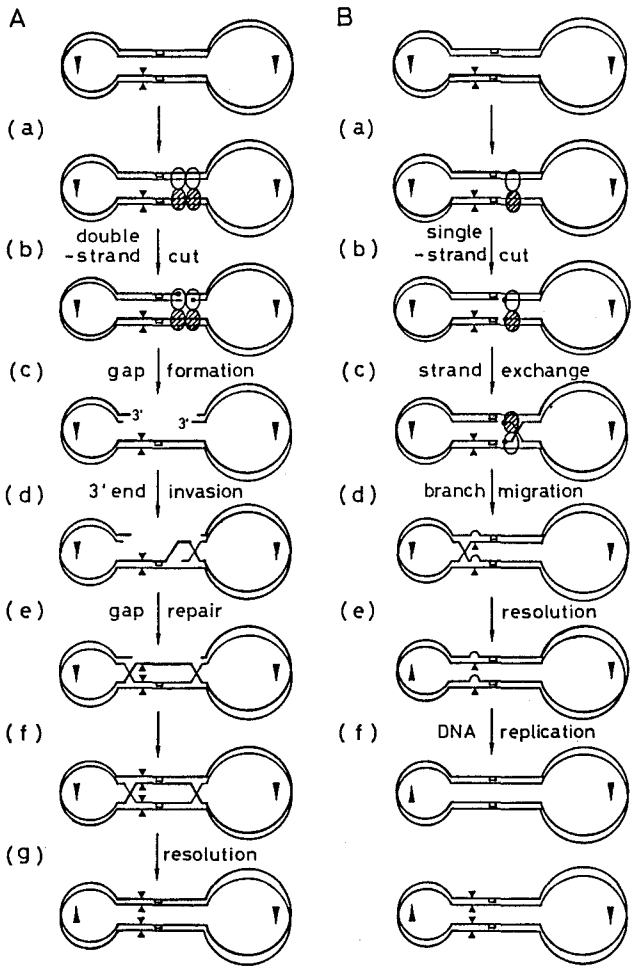


Fig. 2-12. Possible models for explaining gene conversion in the pSR1 molecule. The parallel regions of the pSR1 molecules are the inverted repeats, and the arrowheads illustrated inside the unique sequences distinguish the type A and B configurations of the plasmid molecules. Open boxes on the inverted repeats represent the approximate position of the sequences necessary for the autonomous replication of pSR1. Closed triangles on the inverted repeats indicate the marker site (i.e., inserted SalI linker). Ellipses with and without hatching represent each individual R protein which binds to the recombination initiation sites. A detailed explanation is presented in the text.

アーゼで消化され、3'末端が突出したギャップを生じる（ｃステップ）。3'末端部DNA がもう一方のIRの相補DNA 部分にアニーリングする（ｄステップ）。この3'末端をプライマーとして、もう一方のIRを鋳型としてDNA 合成が起こる（ｅステップ）。もう1 つの3'末端でも同じ反応が行われる（ｆステップ）。このようにして、ギャップが修復される結果、２個のホリデー構造が形成される。ホリデー構造はブランチマイグレイションにより移動した後、DNA 鎖の切断・再結合により解離される（ｇステップ）。２個のホリデー構造が同じDNA 鎖で解離されても、分子内組換えは起こらないが、異なるDNA 鎖で解離されると分子内組換えが起こる。変異部位が修復合成の領域に存在すれば、変異部位では遺伝子変換が生じる。この二本鎖切断修復モデルでは、S. cerevisiae のRAD52 遺伝子の働きを含めて考えられているが、pSR1の分子内組換えおよび遺伝子変換にはRAD52 遺伝子の働きは必須でない。このモデルに従うと、ＲタンパクがRAD52 遺伝子産物と同じ機能を持っているか、他の宿主因子がRAD52 遺伝子産物のかわりの働きをしているのかもしれない。

もう１つのモデルは、本研究結果に基づいて提案した一本鎖切断によって開始されるモデル（一本鎖切断交換モデル）である（Fig. 2-12B）。ＲタンパクがFLP タンパクと同様に両方のIRの58 bp 配列内で一本鎖切断を行う（Fig. 2-12B. ｂステップ）。同じ塩基配列を持つDNA 一本鎖がお互いに交換され、ホリデー構造が形成される（ｃステップ）。ブランチマイグレイションによりホリデー構造が移動し変異部位を通過すると、変異部位ではヘテロデュープレックスが形成される（ｅステップ）。IR内の変異では、本来存在したIRから消失して他方のIRに転移する変化（+/- 型から-/+ 型への変化）は認められなかったので、ヘテロデュープレックスが形成されてもミスマッチ修復は行われないと考えられる。ARS から複製が開始された後ヘテロデュープレックスが解離されるか、ヘテロデュープレックスが解離された後複製が行われると、両方のIRが変異型になった分子および両方のIRが野生型になった分子が１分子ずつ生じる（ｆステップ）。ホリデー構造が最初に切断されたDNA 鎖で解離されても、分子内組換えは起こらないが、切断されなかったDNA 鎖で解離されると分子内組換えが起こる。ブランチマイグレイションが変異部位に達しないときには遺伝子変換は起こらない。

二重鎖切断修復モデルでも、また一本鎖切断交換モデルでも、変異部位が58 bp 配列から遠くなるほど遺伝子変換の頻度は低くなるという極性が予想される。Table 2-2 の結果でpSRT306 のSalI部位を除いて考えると、このような極性の存在が示唆される。

また、一本鎖切断交換モデルでは、一回の遺伝子変換で+/+ 型分子と-/- 型分子が１分

子ずつ生じ、二重鎖切断修復モデルでは、+/+ 型分子のみまたは-/- 型分子のみが生じると考えられる。Table 2-2 の結果では、+/+ 型分子の数と-/- 型分子の数は等しい場合も、差のある場合も認められる。これは検定したプラスミドクローンの数が少なく、観察値に誤差があること、+/+ 型分子プラスミドと-/- 型分子プラスミドの宿主内安定性に差があること、二重鎖切断修復モデルにおいて切断されるIRに偏りがあること、などが考えられるから、どちらのモデルが正しいかは、現在では判断できない。λファージのInt タンパク質(45,61) およびP1ファージのcre-loxPシステム(34)の部位特異的組換えではin vitro 組換え反応でホリデー中間体が観察され、部位特異的組換えでブランチマイグレイションが起こることが示唆されていることに加え、二重鎖切断修復モデルではRAD52 遺伝子の働きを必要とすることから、遺伝子変換を伴う分子内組換えは一本鎖切断交換モデルで起こっているのではないかと思われる。

pSR1プラスミドの分子内組換えは58 bp 配列内で開始される部位特異的組換えである。また、この組換えには酵母宿主因子の働きは必要なく、組換えは宿主の普遍的組換えとは無関係に起こる。これらの特徴から、pSR1プラスミドの組換え部位を染色体上の組換え標的部位に組込み、別のプラスミドに乗せたR遺伝子からRタンパクの生産を促すことにより、染色体上で任意の組換えを行うことができると考えられる。

第5節　要約

pSR1プラスミドの分子内組換えの機構を解析するために、組換え部位の限定と組換えに必要な因子の限定を行った。まず、S. cerevisiae 宿主内で一方のIRにSalIリンカーの挿入あるいは欠失をもつ変異プラスミドの組換えと変異部位の動きを調べ、分子内組換えに必須な領域を58 bp 配列内に限定した。部位特異的組換えに伴い、IR全域で変異部位の遺伝子変換が起こる。このことから、組換えは、58 bp 配列内で開始されるが、交叉はIR全域で起こることがわかった。また、この分子内組換えおよび遺伝子変換にはRAD52 遺伝子の働きは必要なかった。次に、大腸菌内でtac プロモーターを用いてR遺伝子を発現させると、IR間で組換えを起こすことから、組換えには酵母宿主因子は必要なく、Rタンパクのみで可能であると思われた。また、recAおよびrecBC 遺伝子は大腸菌内での分子内組換えには必要なかった。さらに、大腸菌で生産し、部分精製したRタンパクを用いて、Rタ

ンパクのDNA への結合をDNase I フットプリンティング実験により調べた。この結果、Rタンパクは、58 bp 配列内に存在する14 bp の逆向き反復配列とそれに続く同じ14 bp の繰り返し配列に結合した。以上の結果から、遺伝子変換を伴う分子内組換えの機構として、58 bp 配列内で組換えが開始された後、ブランチマイグレイションによりヘテロデュープレックスを形成するが、ミスマッチ修復を伴うことなく、DNA 複製によりヘテロデュープレックスが解離される機構が示唆された。また、２個の58 bp 配列を染色体DNA に組込み、Rタンパクの生産を制御することにより染色体の組換えを人為的に操作できると考えられた。

第３章　pSR1プラスミドの部位特異的組換えを利用したS. cerevisiae染色体の改変

第１節　緒言

プラスミドまたはウイルスなどのベクターを使用する現在の組換えDNA 技術では、操作可能なDNA のサイズは小さく、せいぜい100 kbまでであり、代謝系を構成する多数の遺伝子や高等生物の巨大遺伝子(29,44) を導入することは困難である。しかも選択圧をかけない状態では、ベクターは容易に脱落する。これらの問題を解決する方法として、直接導入遺伝子を染色体に組込むか、染色体の一端をこれら巨大DNA で置き換えることなどが考えられる。また、このような染色体異常を導入することで、細胞に不稔性などの諸形質を付与することができるであろう。これらのためには、染色体レベルで、しかも、目的の位置で、必要な時に効率良く組換えを行う技術、すなわち、染色体改変技術が必要となる。染色体の改変は、細胞内では、遺伝的組換えによって起こり、しかも部位特異的組換えは特定のタンパクの働きでDNA の特定の部位で起こることから、このような染色体改変技術に部位特異的組換え系を応用することが考えられる。そこで、S. cerevisiae をモデル系とし、部位特異的組換えを利用して染色体を改変する技術の開発を行った。S. cerevisiae 細胞には、接合型変換を起こす部位特異的組換え(62,81) 、２μmDNA の逆向き反復配列での部位特異的組換え(8)、ミトコンドリアDNA に存在するイントロンの転移の部位特異的組換え(37)がある。しかし、これらの組換え系はS. cerevisiae 細胞に本来備わっているために、かえって、S. cerevisiae における染色体工学に応用することは不適当である。そこでは、S. cerevisiae と全く特異性を異にする部位特異的組換え系を利用する必要がある。そのためには、類縁の異種酵母のそれらを利用することが考えられる。

酵母Z. rouxii 由来環状プラスミドpSR1は、一対の逆向き反復配列 (IR) をもち、このIRを介して分子内組換えを行う(2)。この組換えは本来の宿主であるZ. rouxii のみならず、S. cerevisiae 宿主でも起こる。第２章でpSR1プラスミドの分子内組換え機構を解析した結果、この組換えはプラスミドにコードされているＲタンパクにより、pSR1のIRの58

bp 配列内で開始される部位特異的組換えであった。しかも、この組換えには、酵母宿主因子の働きは必要なく、この組換えは宿主の組換え系とは無関係に起こることがわかった。また、pSR1は、S. cerevisiae には存在せず、そのDNA 塩基配列は、S. cerevisiae 染色体および２μm DNAのDNA 塩基配列と相同性はない(2,31,90) 。これらのことから、pSR1の部位特異的組換え系を応用して細胞に悪影響を及ぼすことなく、S. cerevisiae の染色体を改変することができると考えられる。

S. cerevisiae 染色体の改変を行うには、次の操作が考えられる。まず、pSR1の組換え部位を、YIp 型ベクター（組込み型ベクター）を用いて同一もしくは異なる染色体上の２か所に組込む。次に、この細胞に、調節可能なプロモーターを結合したR遺伝子をもつプラスミドを導入する。プロモーターとしては、例えばガラクトース信号を認識できるGAL1遺伝子などのプロモーター部が利用できる。この導入細胞をガラクトース培地で培養すれば、R遺伝子が発現する。その結果生じたRタンパクが２つのRS間で組換えを起こし、染色体が改変される。この方法を用いると、組換え部位の挿入位置と方向に応じて、染色体上での欠失や逆位あるいは非相同染色体間での相互転座、または環状DNA の染色体への挿入を起こすことが可能である（Fig. 3-1）。２個の組換え部位を同一染色体上に同方向に挿入すると、組換え部位に挟まれた領域を欠失することができる。相互に逆方向に挿入するとその２個のRS間で逆位を起こすことができる。２本の非相同染色体に組込むと相互転座を起こすことになる。また、大きな環状DNA と染色体にそれぞれ１個ずつ組換え部位を挿入すると、大きな環状DNA をその染色体に挿入することができる。

本章では、このような染色体改変技術の可能性を検討した。その結果、２個の組換え部位を染色体に組込み、GAL1プロモーターの下流にR遺伝子を連結したプラスミドを用いてRタンパクを生産させると、染色体上の大きな欠失と逆位および非相同染色体間の組換えを高頻度で起こすことができた。

第２節　実験材料と実験方法

２．１　供試菌株とプラスミド

本章で染色体の改変のために使用したS. cerevisiae 菌株は、NBW5 (一倍体 MATα ade2^{ochre} leu2-3,112 ura3-1,2 his3-532 trp1-289 pho3-1; 我々の保存菌株)、NA87-11A (一倍体 MATα leu2-3,112 his3 trp1 pho5-1; 我々の保存菌株[2])および

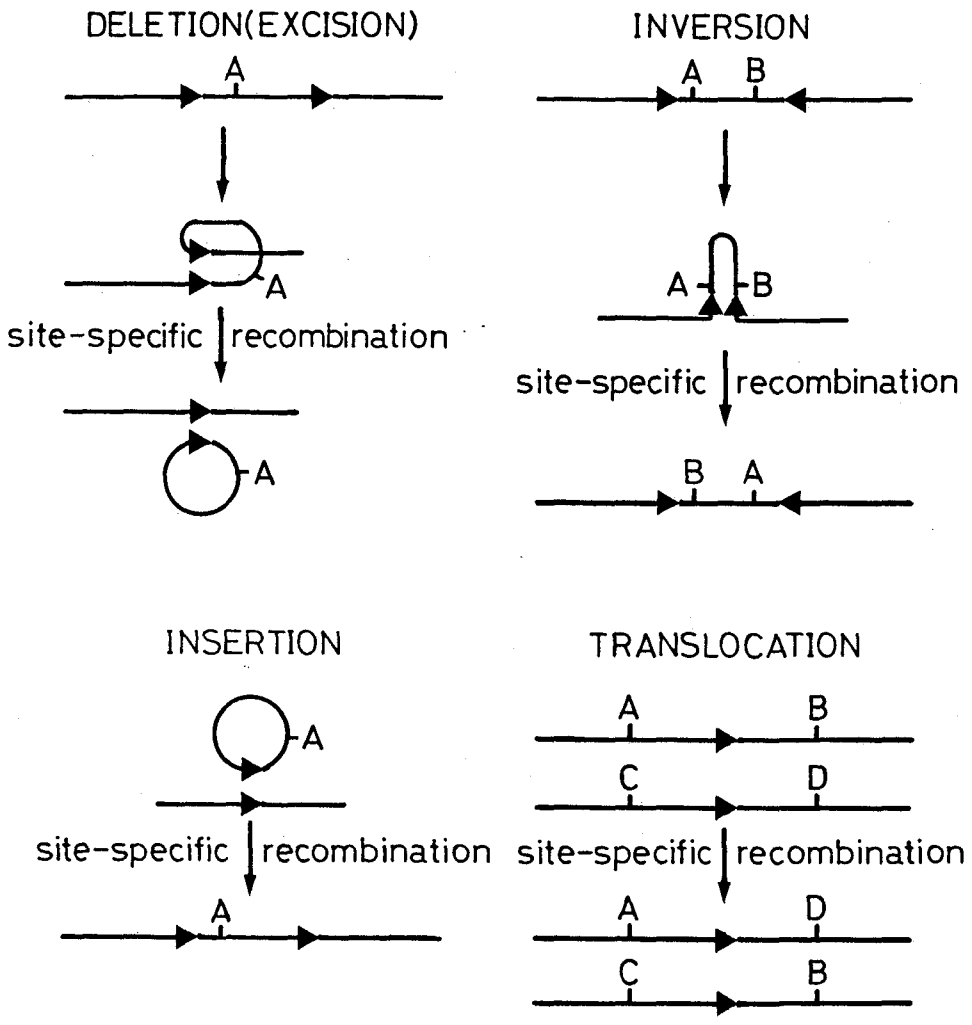


Fig. 3-1. Various modification of chromosomes by using a site-specific recombination system of pSR1. Two recombination sites (RS; arrowheads) of pSR1 are integrated into a single or two different chromosomes. Recombination between two RSs yields deletion (when two RSs are integrated in the same direction relative to each other on a single chromosome), inversion (in the opposite direction), or reciprocal translocation (two different chromosomes). When one RS is integrated on chromosome and another one is integrated on circular DNA, recombination between these two RSs yields insertion of the circular DNA into chromosome.

SH986（一倍体 MATa ade2-201^{ochre} leu2-3,112 ura3-52 trpΔ1 hisΔ3; 我々の保存菌株）である。プラスミドの調製には大腸菌JA221 株を使用した。その遺伝子型は第２章の第２節で示した。

本章の研究に使用したプラスミドをFig. 3-2およびTable 3-1 に示す。p286は S. cerevisiae のGAL1遺伝子プロモーターをもつ685 bpのEcoRI-BamHI 断片(42)を含むプラスミドであり、A. G. Hinnebush (National Institutes of Health, U.S.A.) より分譲を受けた。pRAS1 プラスミド (Fig. 3-2) はS. cerevisiae のRAS1遺伝子(27)をもつプラスミドであり、山本正幸（東京大学、医科学研究所）より分譲を受けた。p237 (Fig. 3-2)は、S. cerevisiae のURA3遺伝子(66)とSUP11 遺伝子をもつプラスミドであり、P. Hieter (Johns Hopkins University, School of Medicine) より分譲を受けた。組換え部位の染色体への組込みのために使用したプラスミドをTable 3-2 に示す。

２．２　使用培地

酵母の栄養培地（YPAD)、 最少培地 (SG1u)、 大腸菌の増殖用培地 (LB) および最少培地（M9）は第２章の第２節で示した。必要に応じて、添加したアミノ酸、アンピシリンも第２章の第２節で示した。R遺伝子を発現させるための酵母のガラクトース培地として、SG1u培地にグルコースのかわりに、1 liter あたり20 gのガラクトースを加えた培地を使用した。アデニンの表現型を調べるためには、アデニンを加えていない栄養培地 [YPD: 1 literあたりYeast Extract (Difco) 10 g、ポリペプトン（大五栄養）20 g、グルコース 20 g] を用いた。

２．３　遺伝学的方法

酵母の接合による雑種二倍体の作製：　接合に用いる２株の菌体をほぼ等量ずつ2 mlのYPAD培地に混合して植菌し、30℃で一晩静置培養した。培養液を遠心分離（3,000 rpm、5分；久保田、Model KN-80)し、上澄を除き、0.2 mlの無菌水に懸濁して選択培地に塗布した。

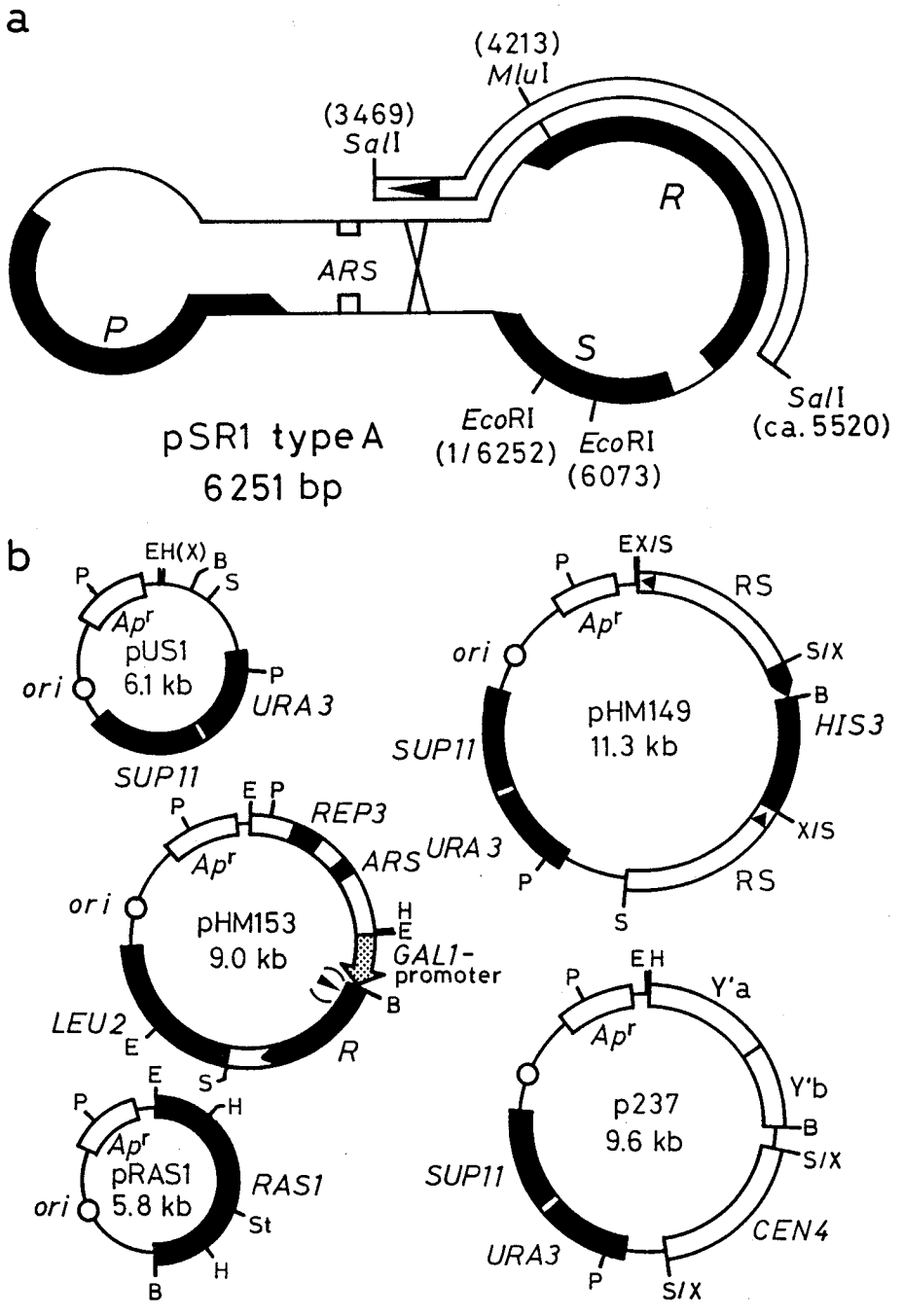

a
(4213)
MluI
(3469)
SalI
R
ARS
P
S
SalI
(ca. 5520)
EcoRI
(1/6252)
EcoRI
(6073)
pSR1 type A
6251 bp
b
EH(X)
B
S
P
Apr
pUS1
6.1 kb
ori
P
URA3
SUP11
E P
P
REP3
Apr
ARS
ori
pHM153
9.0 kb
H
E
GAL1-
promoter
B
LEU2
E
R
S
E
P
H
Apr
pRAS1
5.8 kb
RAS1
ori
St
H
B
EX/S
P
RS
Apr
ori
S/X
B
pHM149
11.3 kb
HIS3
SUP11
X/S
URA3
P
RS
S
E H
P
Y'a
Apr
Y'b
p237
9.6 kb
B
S/X
SUP11
CEN4
URA3
P
S/X

Fig. 3-2

Fig. 3-2. Structure of pSR1 and the principal plasmids used. (a) Structure of pSR1 and of 2.1-kb RS fragment. The linear portions of pSR1 represent inverted repeats, the thick lines marked P, R, and S indicate the open reading frames and the tapered ends indicate the 3' ends of the frame (2). Open boxes with ARS represent autonomously replicating sequences. A cross connecting the inverted repeats shows the approximate position of the specific recombination site (RS) which is localized within a 58-bp sequence (chapter 2). Numbers at the restriction sites represent their positions with respect to G of the EcoRI site as position 1. The 2.1-kb SalI fragment extending from nucleotide position 3469 to ca. 5520 (exact position is not determined) was used as the RS fragment and the arrowhead in the fragment indicates the specific RS site. Both the SalI ends of the RS fragment were created by linker insertion (40). (b) Structure of the principal plasmids used. Plasmid pRAS1 was used as the source of the RAS1 DNA. Plasmid pUS1 was constructed by ligation of the shorter PstI fragments of p237 and YIp5. pHM153 was constructed with the DNAs from YIp32, YEp51, p286, and pSR1 (details not shown) and used for generation of R protein. An arrowhead in parentheses on the pHM153 molecule represents the site of the R gene disruption made by restriction of a BglII site, filling in with Klenow fragment and ligation. pHM149 was constructed from pUS1 and the other DNA fragments as described in the legend of Fig. 3-3 and used for integration of the RS-URA3::SUP11-RS fragment at the his3 locus. The thin lines with a box marked Ap^r and a circle marked ori are the DNA fragments of pBR322, except for that of pBR327 of pRAS1. Double lines with closed boxes marked HIS3, LEU2, RAS1, SUP11, URA3, and GAL1-promoter are the DNAs from S. cerevisiae, R from pSR1, and REP3 and ARS from 2μm DNA. An open box with a closed triangle marked RS is the 2.1-kb RS fragment. Those marked Y'a::Y'b and CEN4 are chromosomal fragments of S. cerevisiae bearing, respectively, telomere and centromere. Abbreviations for restriction endonuclease sites are: B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, SalI; St, StuI; and X, XhoI.

Table 3-1. Principal plasmids used in this study

Plasmid[a]	Characteristics	Source or reference
YIp1	HIS3, 9.8 kb	Struhl et al. (83)
YIp5	URA3, 5.4 kb	Struhl et al. (83)
YIp32	LEU2, 6.7 kb	Botstein et al. (7)
YEp51	LEU2, GAL10-promoter, 2 μm DNA replicon, 7.3 kb	Broach et al. (10)
YRp7	TRP1, ARS1, 5.7 kb	Botstein et al. (83)
p286	GAL1-GAL10-divergent-promoter, URA3, CEN4, ARS1, 8.3 kb	A. G. Hinnebusch
pRAS1*	RAS1, 5.8 kb	M. Yamamoto
p237*	URA3-SUP11, CEN4, telomere, 9.6 kb	P. Hieter

[a]Gross structures of the plasmids with an astrisk are illustrated in Fig. 3-2.

Table 3-2. Plasmids used for integration of RS fragment into chromosomes

Plasmid	Integration locous	Relative direction of gene[a]		
pHM71-1	his3	Amp^r (←)	RS (←)	HIS3 (→)
pHM71-3	his3	Amp^r (←)	RS (→)	HIS3 (→)
pHM162	his3	Amp^r (→)	RS (→)	HIS3 (→)
pHM163	his3	Amp^r (→)	RS (←)	HIS3 (→)
pHM172	RAS1	Amp^r (←)	RS (←)	RAS1 (→)
pHM173	RAS1	Amp^r (←)	RS (→)	RAS1 (→)
pHM147	ura3	Amp^r (→)	RS (←)	URA3 (←)

[a]Relative direction of gene represents the relative direction of trnanscripts of ampicillin-resistant gene, HIS3 gene, RAS1 gene, and URA3 gene and that of RS site on these plasmids.

２．４　生化学的方法

DNA の調製：　大腸菌JA221 株よりのCsCl-EB 平衡密度勾配遠心分離法およびアルカリ変性法によるプラスミドDNA の調製は第２章の第２節で示した。プラスミドDNA は全てJA221 株から調製した。酵母からの染色体DNA の調製は、Herefordらの方法(32)に従った。8 mlのYPAD培地で30℃、一晩培養した酵母細胞を集菌（3,000 rpm、５分；久保田、Model KN-80)後、0.5 mlの0.2 M トリス（ヒドロキシメチルアミノメタン）溶液（pHは未調整）に懸濁し、エッペンドルフ遠心管に移した。25μl のβ－メルカプトエタノールを加え、30分間室温で放置した後、遠心分離（3,000 rpm、５分；Tomy、Microfuge MC-15A）し、0.5 mlのザイモリエース溶液［1.25 mg/ml Zymolyase 100T(生化学工業)、1.0 M ソルビトール、0.04 M　リン酸緩衝液（pH6.8)］に細胞を懸濁し、30℃で1 時間放置した。遠心分離（3,000 rpm、5分；Microfuge)し、溶菌緩衝液［0.2 M NaCl、0.1 M EDTA、５％ (w/v) SDS、50 mM トリス－塩酸緩衝液（pH8.5)］に懸濁し、5 μl のプロナーゼ（アクチナーゼＥ；科研製薬株式会社）を加えて60℃で30分間放置し、溶菌させた。この溶菌液に、TE緩衝液（pH8.0)で飽和したフェノール－クロロホルム混合液(1:1, v/v)を0.5 ml加え、撹拌した。遠心分離（12,000 rpm、10分；Microfuge ）後、上層を別のエッペンドルフ遠心管に移し、タンパクを除いた。もう一度同じ除タンパク操作を繰り返し、上層液に２倍容の99%エタノールを加え、穏やかに撹拌した後、上澄液を捨て、DNA を回収した。DNA を70%エタノールで一度洗浄後、減圧下で乾固した。 DNAを300 μl のTE緩衝液に溶かした後、30μl のribonuclease A水溶液（1 mg/ml; Sigma Chemical Company, St. Louise, U.S.A.)を加え、37℃で30分間放置後、さらに3 μl のプロナーゼ（1 mg/ml)を加えて37℃で30分間処理した。フェノール抽出で除タンパクを行った後、２倍容の99%エタノールを加え、沈殿するDNA を回収した。DNA を70%エタノールで一度洗浄後、減圧下で乾固した。DNA を適当量のTE緩衝液に溶かし、４℃で保存した。

形質転換：　大腸菌および酵母の形質転換法は第２章の第２節で示した。DNA の酵母染色体への組込みはOrr-Weaverらの方法(63)またはRothstein の方法(67)に従い、目的DNA を線状にして形質転換を行った。

パルスフィールドゲル電気泳動による酵母染色体DNA の分離：　パルスフィールドゲル電気泳動(73)で染色体を分離するためのDNA 試料の調製は、Carle とOlson の方法(17)に従った。5 mlのYPAD培地で培養した酵母細胞を集菌（3,000 rpm、5分；久保田、Model KN-80)し、TE緩衝液［50 mM EDTA、10 mM トリス－塩酸緩衝液(pH7.5)］で２回洗浄後、

150 μl のTE緩衝液に懸濁し、エッペンドルフ遠心管に移した。5 μl のβ－メルカプトエタノールと2 μl のザイモリエース懸濁液［20 mg/ml Zymolyase 100T、0.01 M リン酸緩衝液(pH 7.5)］を加えた。これに37℃で保温した250 μl の 1%低融点アガロース溶液（SeaPlaque Agarose ；FMC BioProducts, Rockland, ME, U.S.A.） を加え、ゲル形成器に流し込み氷上でゲル化した。ゲル断片を小試験管に移し、400 μl のLET 溶液［0.5 M EDTA、0.01 Mトリス－塩酸緩衝液（pH 7.5)］と30μl のβ－メルカプトエタノールを加え、37℃で一晩放置した。上澄液を8 mgの proteinase K（ Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany) を含む400 μl のNDS 溶液［0.5 M EDTA、1％ (w/v) N-ラウリルサルコシン（Sarkosyl NL-97、ICN Biomedicals, Inc., Plainview, N.Y., U.S.A.）、0.01 Mトリス－塩酸緩衝液(pH 9.5)］と交換し、50℃で２日間放置した。上澄液を捨て、0.2ml のTE緩衝液で１時間ごとに４回洗浄した。ゲル断片を半分に切断してDNA 試料として使用した。電気泳動装置はPulsaphor System (Model 2015 Pulsaphor System, LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden) を使用し、泳動は使用説明書の記載を一部改変して行った。サイズ 10 x 10 x 0.5 cmの１％アガロース（Seakem LE Agarose; FMC BioProducts) ゲルを使用し、0.5 倍濃度のトリス－ホウ酸緩衝液[45 mMトリス、45 mM ホウ酸、1.25 mM EDTA (pH 8.3)］を使用した。冷却装置の温度は５℃に調整し、泳動は定電圧450V、パルスタイム55秒で16時間行った。泳動後、ゲルを約0.5 μg/mlのEB水溶液に30分浸して染色し、水道水で余分のEBを洗い流した後、トランスイルミネーター（Ultra Violet C62）でDNA バンドを観察した。写真はUVフィルター（Kenko SL-39)および赤色フィルター（Kenko R-60）を用いポラロイドカメラ（MP-4）でフォトラマPB300 フィルム（富士写真フィルム株式会社）によって撮影した。

^{32}P でラベルされたDNA の調製およびサザンハイブリダイゼーション： ^{32}P でラベルされたDNA の調製はAmersham (Amersham International plc, UK) のマルチプライムDNA 標識システムを用いた。調製は以下の方法で行った。反応緩衝液［$MgCl_2$ 、β－メルカプトエタノール、トリス－塩酸（pH 7.8)］を5 μl とヌクレオチド／緩衝液［5 mMトリス－塩酸緩衝液（pH 8.0)、0.5 mM EDTA、それぞれの液中にdATP、dGTP、dTTPを含んでいる。］を各4 μl とプライマー溶液［ランダムヘキサヌクレオチド、BSA ］とプラスミドDNA （25 ng ； 100℃で５分間放置後、氷中につけて変性させた）を22μl と酵素溶液[1 unit/μl Klenow断片、50 mM KH_2PO_4 (pH 6.5)、 10 mM β－メルカプトエタノール、50% グリセロール］を２μl と［α－^{32}P]dCTP (10 mCi/ml)を４μl とを混合して、25

℃で３時間、反応させ、プローブとして用いた。

アガロース上のDNA をフィルターへ移行するためにはSouthernの方法(76)によった。アガロースゲル電気泳動後、0.25 M HClで30分室温でゲルを処理した。この後、1.5 M NaCl-0.5 M NaOH 溶液に30分間、ゲルを放置し、アルカリ変性を行い、0.5 M トリス－塩酸緩衝液（pH 7.5)-1.5 M NaCl溶液中で30分ゲルを浸して中和させた。ガラス板を20 x SSC 溶液（1 SSC は0.15 M NaCl、0.015 M クエン酸ナトリウム）を入れたバットに渡し、20 x SSC溶液に浸したろ紙(3 mm chr, Whatman Ltd., England) をガラスの上に２枚置いて、両端が20 x SSC溶液に漬かるようにした。そこにゲルを置き、両端に、アクリル板を置いた。あらかじめ、水に浸したナイロンメンブレン（Pall Biodyne Transfer Membranes, Pall BioSupport Division, Glen Cove, N.Y., U.S.A.）をゲル上に置いた。その両脇に水に浸したろ紙を置いてフィルターを押えた。フィルター上にほぼ同じ大きさのろ紙を４枚重ね、ペーパータオルを5 cmほど積んでからガラス板をのせ、約500 g の重しを置いて、この状態で一晩放置した。その後、フィルターを80℃で２時間焼き付けた。

フィルターをハイブリダイゼーション液[0.9 M NaCl、0.05 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.3)、5 mM EDTA、 0.1 % (w/v) Ficoll (分子量400,000; Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsal, Sweden)、0.1 % (w/v) Polyvinylpyrolidone (分子量360,000, PVP; 和光)、0.1% (w/v) BSA (Sigma)、0.2 % (w/v) SDS、100 μg/ml CT DNA 溶液(0.02 M トリス－塩酸緩衝液(pH 8.0)-1 mM EDTAに溶かした1 mg/ml の子牛の胸腺のDNAを30秒間６回超音波処理し、100 ℃で5 分間加熱したものを希釈して使用）] に浸して、65℃３時間保温した。その後、ビニールバッグのなかにフィルターとハイブリダイゼーション液と^{32}P でラベルしたプローブDNA （100 ℃で5 分間加熱後、氷中で急冷して変性させた）とを入れ、65℃で一晩放置して、フィルター上のDNA とプローブDNA 間のハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを取り出し、洗浄用緩衝液[5 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0)、1 mM EDTA、0.2 % (w/v) SDS] で４回洗浄し、サランラップに包んだ後、カセットに固定し、Ｘ線フィルム（Kodak Diagnostic Film X-Omat AR, Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., U.S.A.）と増感スクリーンを入れ、-80 ℃で感光させた。現像と定着はＸ線フィルムプロセッサー（Model FPM60; 富士写真フィルム株式会社）を使用した。

その他のDNA 操作： プラスミドDNA の制限酵素による切断と結合、Klenow断片による粘着性末端の平滑化、電気泳動の方法は第２章の第２節で示した。

第３節　実験結果

３．１　pSR1プラスミドの部位特異的組換え系の染色体上での働き

pSR1プラスミドの部位特異的組換え系が、染色体に組込まれた状態で行われるかは調べられていない。また、この組換え系を染色体の改変に利用するためには、その働きをON-OFF制御する必要がある。そこで、ＲタンパクをON-OFF生産するプラスミドを作製し、これを用いて染色体上に組込んだ組換え部位間で実際に組換えが起こることを調べた。Fig. 3-3a に示すように、BamHI 切断により線状にしたpHM149でNBW5株（ MATα ade2^{ochre} ura3 leu2-3,112 his3）を形質転換し、URA3およびSUP11 遺伝子の左右両側にに同方向になるように組換え部位を含むRS断片（Fig. 3-2a で矢印をもつ太線）を２個連結したDNA 断片（RS-URA3:SUP11-RS）をXV番染色体のhis3座(57)に組込んだYHM201株を作製した。YHM201株では、ade2^{ochre} 変異はSUP11 遺伝子によって抑圧される(33)。この株では、Ｒタンパクの働きで２個の挿入RS間で組換えが起こると、挿入DNA 断片からURA3およびSUP11 遺伝子を含む7.6 kbの領域が切り出される。この断片は選択圧をかけない状態では自律複製能を持たないので細胞から脱落し、細胞はAde$^-$ Ura$^-$ の表現型を示す。したがって、Ｒタンパクによる組換えは、これら細胞のアデニンとウラシルの要求性を調べるとわかる。次に、Ｒタンパクを細胞内で供給するために、ガラクトースで発現が誘導されるGAL1またはGAL10 遺伝子のプロモーター下流にR遺伝子を繋いだYEp 型プラスミドpHM153 (Fig. 3-2b)およびpHM152を作製した。YHM201株をpHM153またはpHM152で形質転換し、Leu$^+$形質でこれらプラスミドを保有する株を選び、ロイシン非含有のSGal平板培地に拡げ、30℃で４日間培養した。生育した各コロニーをロイシンおよびアデニンを含まないSGlu平板培地または、ロイシンおよびウラシルを含まないSGlu平板培地にレプリカして、アデニンとウラシルの要求性を調べた。その結果、３種類のコロニーが生じた。すなわち、コロニーを形成する細胞が、全てAde$^-$ Ura$^-$ であるコロニー（クラスI コロニー）とレプリカした細胞の一部が生育するコロニーつまり、Ade$^-$ Ura$^-$ の細胞とAde$^+$ Ura$^+$ の細胞が混在するコロニー（クラスIIコロニー）、およびAde$^+$ Ura$^+$ の細胞からなるコロニー（クラスIII コロニー）が生じた。しかし、Ade$^+$ Ura$^-$ またはAde$^-$ Ura$^+$ の細胞から成るコロニーは生じなかった。

クラスI コロニーとクラスIIコロニーの細胞で染色体からURA3-SUP11遺伝子領域が切り

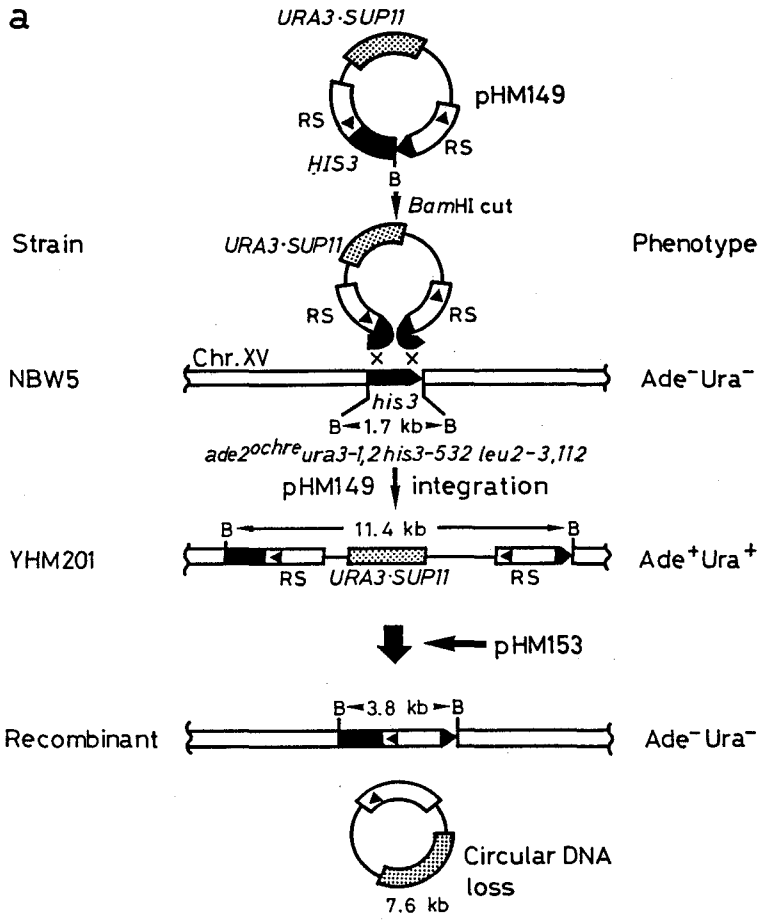

a
URA3·SUP11
pHM149
RS
RS
HIS3
B
BamHI cut
Strain
URA3·SUP11
Phenotype
RS
RS
Chr. XV
NBW5
Ade⁻Ura⁻
his3
B 1.7 kb B
ade2ochre ura3-1,2 his3-532 leu2-3,112
pHM149 integration
B 11.4 kb B
YHM201
Ade⁺Ura⁺
RS
URA3·SUP11
RS
pHM153
B 3.8 kb B
Recombinant
Ade⁻Ura⁻
Circular DNA loss
7.6 kb
b
NBW5
YHM201
Ade⁻ Ura⁻
Ade⁺Ura⁺/Ade⁻Ura⁻
1 2 3 4
1 2 3 4 5 6 7
kb
HIS3:: pHM149
11.4
HIS3:: RS
3.8
HIS3
1.7

Fig. 3-3

Fig. 3-3. Excision of a short DNA fragment from a chromosome. (a) The construction procedure of strain YHM201 used for the excision experiment. Plasmid pHM149 bearing two copies of the 2.1-kb RS fragment (Fig. 3-2a) in the same direction and two HIS3 DNA fragments, derived from a 1.7-kb S. cerevisiae DNA bearing a single complete HIS3 gene prepared from YIp1, but ligated at the BamHI ends to form the head to tail arrangement after cutting at the XhoI site in the gene, was constructed by the following procedure. The 1.7-kb BamHI HIS3 fragment prepared from YIp1 was split at the XhoI site in the his3 locus and each fragment was connected with the 2.1-kb RS fragment by XhoI/SalI ligation. Thus the 5'-HIS3-RS and RS-HIS3-3' chimeric DNA fragments were obtained. Both the chimeric fragments have the same relative nucleotide directions of the RS fragment as that of HIS3, and have the BamHI end at the HIS3 side and the SalI end at the RS side. These two fragments were inserted into the modified pUS1 (Fig. 3-2b; the HindIII site was converted to a XhoI site by restriction with HindIII, filling in with Klenow fragment and ligation with the XhoI linker); the 5'-HIS3-RS fragment was inserted at the SalI-BamHI gap of the modified pUS1, and the RS-HIS3-3' fragment at the XhoI-BamHI gap. The resultant plasmid, pHM149, has a structure in which the URA3 and SUP11 genes of S. cerevisiae derived from p237 are located between the direct repeats of two RS fragments and the head to tail configuration of the HIS3 gene is located on the other side of the RS direct repeats. Thus, the BamHI (B) resriction of pHM149 results in a linear DNA molecule having the 5' terminal region of the HIS3 DNA at one end and the 3' terminal end of HIS3 at the other end. This configuration is favorable for single-copy insertion of pHM149 at the his3 locus in chromosome XV. The linearized pHM149 molecule was integrated at the his3 locus of strain NBW5 as described in the text. The resultant strain, YHM201, having the Ade^+ Ura^+ phenotype was then transformed with pHM153 (Fig. 3-2b) and cultivated in SGal medium to excise the 7.6-kb fragment between the two RSs. (b) Genomic DNAs prepared from four class I clones showing the Ade^- Ura^- phenotype and seven class II clones having the mixed population of Ade^+ Ura+ and Ade^- Ura^- cells were restricted with BamHI, electrophoresed, blotted on a nylon membrane and hybridized with the ^{32}P-labeled 1.7-kb HIS3 fragment.

出されていることを確かめるために、各クラスのコロニー細胞のhis3座付近の制限酵素解析を行った。各クラスのコロニーの染色体DNA をBamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動を行った。DNA 断片をフィルターに移し、^{32}P で放射能ラベルしたHIS3 DNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った（Fig. 3-3b)。クラスI コロニーとクラスIIコロニーでは、調べたコロニー（４コロニーおよび７コロニー）全てにおいて11.4 kb のバンドが消失して3.8 kbのバンドが生じたことから、これらの細胞では、２個のRSによって挟まれた7.6 kbのURA3遺伝子およびSUP11 遺伝子を含む領域が染色体から切り出されている。クラスIII コロニーでは全て、11.4 kb のバンドが生じ、切り出しは起こっていなかった（６コロニー：結果省略）。したがって、コロニーの表現型はRS間の組換えを反映していると言える。

Table 3-3. Recombination between RSs on chromosome

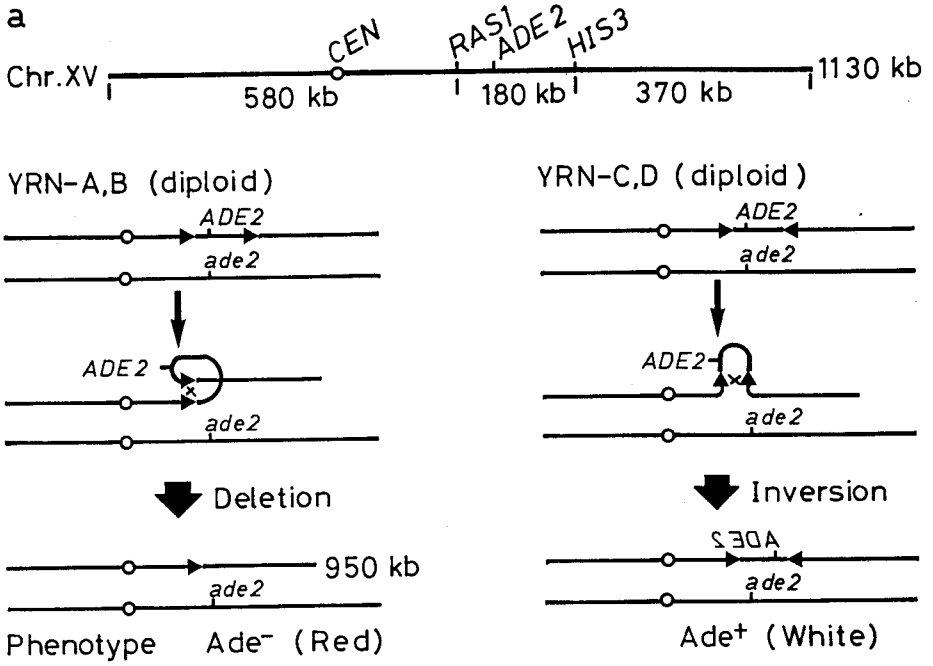
Plasmid	Medium	No. of colonies showing the following class:				Frequency of recombination (%)
		I	II	III	Total	
pHM153	SGlu	112	0	6	118	5
	SGal	2	38	81	121	98
pHM160	SGlu	123	0	0	123	0
	SGal	122	0	0	122	0
pHM152	SGlu	65	2	52	119	45
	SGal	0	13	103	116	100
pHM161	SGlu	131	0	0	131	0
	SGal	128	0	0	128	0

Cells of Strains YHM201 transformed with each plasmid were spread on SGal or SGlu plates supplemented with necessary nutrients but not leucine from the SGlu plates with the same nutrients after appropriate dilution. After 4 days' incubation at 30℃, colonies were examined for their growth by replicating on SGlu plates lacking leucine and adenine or leucine and uracil. Class I colony represents the colony showing the Ade^- Ura^- phenotype, class II colony represents one having the mixed population of Ade^+ Ura^+ and Ade^- Ura^- cells, and class III colony represents one showing the Ade^+ Ura^+ phenotype. We judged class I and class II colonies as recombinant colonies. pHM153 and pHM160 carry the R gene or disrupted R gene on downstream of the GAL1-promoter (Fig. 3-2b), respectively, but pHM152 and pHM161 carry each one on downstream of the GAL10-promoter in stead of GAL1-promoter, respectively (details not shown).

SGal培地で培養すると、pHM153でもpHM152でも90%以上のコロニーがクラスI コロニーまたはクラスIIコロニーであった（Table 3-3)。したがって、染色体に組込まれたRS間でも効率良く組換えが起こる。YHM201株をpHM153またはpHM152で形質転換して得られたLeu$^+$形質転換体をSGlu平板培地に拡げ、４日間培養するとSGal培地よりも低頻度だが、クラスI コロニーとクラスIIコロニーが生じた（pHM153では5 %のコロニーが、pHM152では45 %のコロニーがクラスI コロニーまたはクラスIIコロニーであった）。しかし、R遺伝子を破壊したpHM153またはpHM152（各プラスミドの名前はpHM160およびpHM161）でYHM201株を形質転換し、形質転換体をSGal平板培地で４日間培養してもクラスI コロニーおよびクラスIIコロニーは生じなかった（pHM160では122 コロニーを、pHM161では128 コロニーを調べた）。したがって、URA3-SUP11遺伝子領域の切り出しは、pHM153プラスミドあるいはpHM152プラスミドで生産されたRタンパクの働きで高頻度で起こるが、SGlu培地でもpHM153プラスミドあるいはpHM152プラスミド上のR遺伝子は弱く発現していると考えられた。pHM153とpHM152はともに染色体上で高頻度で組換えを起こすために十分なプラスミドであるが、今後、Rタンパクの生産には、ON-OFF制御がより良く効いているpHM153を使用することにした。

３．２　染色体上の大きな欠失と逆位の誘発

pSR1プラスミドの組換えを染色体上で効率良く働かすことが可能であることがわかったので、この組換え系を用いて染色体上に大きな欠失と逆位を作ることを試みた。まず、クローン化HIS3 DNA内部のXhoI部位で切断し、直線状としたpHM71-1, pHM71-3, pHM162またはpHM163プラスミド（HIS3 DNAとRS断片をもつYIp 型プラスミド；Table 3-2 ）でADE2$^+$ 一倍体株NA87-11A（ MATα leu2-3,112 his3 trp1 pho5-1）を形質転換後、形質転換体をさらに、クローン化RAS1 DNA内部のStuI部位で切断したpHM172またはpHM173（RAS1 DNA とRS断片をもつYIp 型プラスミド；Table 3-2 ）で形質転換し、XV番染色体のhis3座とRAS1座に各々１コピーのRS断片を組込んだ（Fig. 3-4a)。RAS1座とhis3座とは約60 cM (57)すなわち、約180 kb (56) 離れており、この間にADE2$^+$ 座が存在する。RS断片の組込みにより作製された４種類の株（組込まれたプラスミドの組合わせはpHM71-1 とpHM172, pHM71-3 とpHM173, pHM162とpHM172, pHM163とpHM173である）をRタンパク生産プラスミドpHM153を内在するade2変異一倍体株SH986 (MATa ade2 leu2-3,112 his3 trp1)と交雑し


a
Chr.XV
CEN
RAS1
ADE2
HIS3
580 kb
180 kb
370 kb
1130 kb
YRN-A,B (diploid)
ADE2
ade2
Deletion
950 kb
Phenotype Ade⁻ (Red)
YRN-C,D (diploid)
Inversion
Ade⁺ (White)

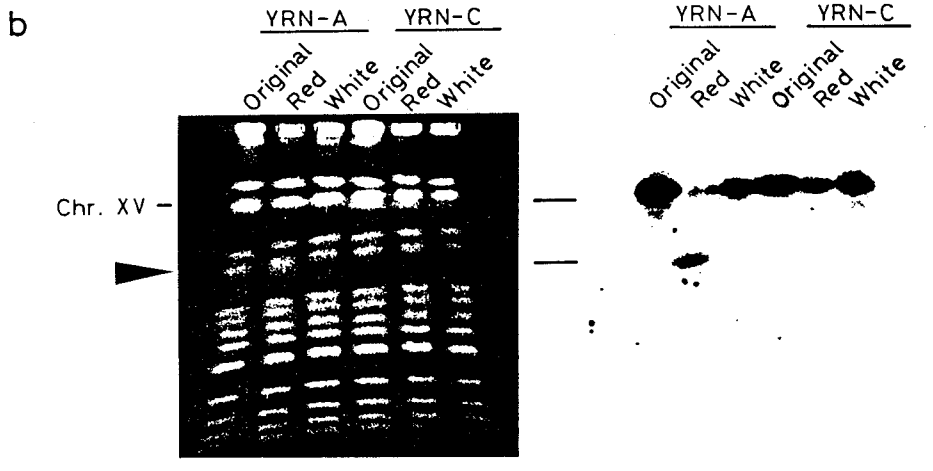

b
YRN-A
YRN-C
Original
Red
White
Chr. XV

Fig. 3-4

Fig. 3-4. Deletion and inversion of a chromosomal segment. (a) Strategies to delete or invert the RAS1-HIS3 region of chromosome XV. The RS fragments were inserted at the RAS1 and HIS3 loci of chromosome XV by using pBR322-based YIp plasmids. For insertion of the RS fragment at the RAS1 locus, a YIp plasmid was constructed by insertion of a 2.9-kb EcoRI-BamHI fragment bearing the RAS1 gene (27) derived from pRAS1 (Fig. 3-2b) at the short EcoRI-BamHI gap of pBR322. Then the chimeric plasmid was ligated with a 1.6-kb PstI fragment of YRp7' (i.e., the 1.4-kb EcoRI fragment bearing ARS1 and TRP1 from S. cerevisiae of YRp7 was inverted) bearing the TRP1 gene at the PstI site as selection marker, and the RS fragment at the SalI site of the pBR322 moiety. For insertion of the RS fragment at the HIS3 locus, another YIp plasmid was constructed by ligation of a 1.7-kb BamHI fragment bearing the HIS3 gene prepared from YIp1 and the RS fragment, respectively, at BamHI and SalI sites of pBR322. Two types of plasmids were constructed for RAS1 plasmid and four types of plasmids for the HIS3 plasmid with the different relative orientations of RS to the RAS1 or HIS3 DNA. DNAs of these chimeric plasmids were prepared in E. coli and linearized by restriction at the StuI site of the RAS1 DNA and at the XhoI site of the HIS3 DNA of the respective plasmids. These StuI and XhoI sites are, respectively, unique in these chimeric plasmids. (b) PFGE patterns of chromosomes. One clone each showing the red (Ade^-) or white (Ade^+) phenotype was isolated at random from YRN-A (having two RSs in the same direction) and YRN-C (having two RSs inverted). Slots were added with DNA prepared from equivalent amounts of cells. The chromosomal bands (left) were hybridized with the ^{32}P-labeled 1.7-kb HIS3 fragment (82) after blotting onto a nylon membrane (right). The arrowhead on the left margin indicates the site of a new chromosomal band.

た。作製された４種類の雑種二倍体はADE2^{+}/ade2^{-} 遺伝子型をもつので、YPD 平板培地上では白色(Ade^{+})コロニーを形成する。４種類の株のうちYRN-A (pHM71-1とpHM172) およびYRN-B (pHM71-3とpHM173) 株では２個の挿入RS断片が染色体上に同方向に組込まれているため、SGal培地で培養するとＲタンパクの働きにより、２個のRS間で組換えが起こり、RAS1座からhis3座間の領域が欠失する。このクローンは野生型ADE2遺伝子を失うので、YPD 平板培地上で赤色(Ade^{-})コロニーを形成する。また、YRN-C (pHM162 とpHM172) およびYRN-D (pHM163 とpHM173) 株では、２個の挿入RS断片が染色体上で逆方向に組込まれているために、それらのRS間で組換えが起こると、RAS1座-his3 座間の領域で逆位が生じる。このクローンは遺伝子型に変化がないのでYPD 平板培地上で白色コロニーを形成する。これら４種類の株をロイシンを含まないSGluまたはSGal液体培地で30℃２日間培養後、YPD 平板培地に塗布し、さらに、４日間培養してコロニーの色を調べた。この結果、SGal培地で培養するとYRN-A およびYRN-B 株では高頻度（約80％）で、YRN-C およびYRN-D 株では低頻度（約５％）で赤色コロニーが生じた。しかし、SGlu培地で培養すると

Table 3-4. Appearance of red and white colonies in cells having the RS insertion at the RAS1 and HIS3 loci of chromosome XV

Strain	Relative direction of RS		Medium	No. of colonies			Red
	RAS1	HIS3		Red	White	Total	(%)
YRN-A	←	←	SGlu	2	280	282	0.7
			SGal	318	53	371	85.7
YRN-B	→	→	SGlu	1	312	313	0.3
			SGal	259	34	293	88.4
YRN-C	←	→	SGlu	0	296	296	0
			SGal	12	279	291	4.1
YRN-D	→	←	SGlu	0	267	267	0
			SGal	16	294	310	5.2

Cells of each strain were inoculated from SGlu medium supplemented with necessary nutrients but not leucine to the SGlu or SGal broth supplemented with the same nutrients and cultivated at 30℃ for 2 days. The cells were then spread on YPD plates after appropriate dilution and all the colonies that appeared on three plates were scored for their red (Ade^{-}) and white (Ade^{+}) phenotypes after 4 days' incubation at 30 ℃.

いずれの株も殆どが白色コロニーであった（Table 3-4)。このことから、YRN-A およびYRN-B 株ではRタンパクの働きによりRAS1座-his3 座間の領域で欠失が起こると考えられる。実際に欠失が起こっていることを検討するために、YRN-A 株およびYRN-C 株由来の赤色クローンと白色クローンの染色体パターンを、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）で調べた。しかし、両株とも欠失染色体は認められなかった（Fig. 3-4b 左側）。欠失染色体が他の染色体と重なっている可能性があるので、HIS3 DNA断片をプローブとしてサザン解析を行った。PFGEで分離した染色体DNA をゲルからフィルターに移した後、^{32}P で放射能ラベルしたHIS3 DNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。この結果、Fig. 3-4b （右側）に示すように、YRN-A 株から生じた赤色クローンでは、XV番染色体とXV番染色体よりも速く移動する染色体にプローブDNA が結合したが、他のクローンではXV番染色体にのみ結合した。したがって、YRN-A 株由来の赤色クローンではXV番染色体に欠失が生じ、欠失染色体はXIII番染色体と重なっていると考えられた。YRN-C 株由来の赤色クローンでは欠失は認められず、２本あるXV番染色体のうち、野生型ADE2遺伝子をもつ染色体が細胞から失われたか、遺伝子変換によりADE2/ade2 遺伝子型からade2/ade2 遺伝子型に変換されていると考えられる。

YRN-C 株とYRN-D 株をSGal培地で培養すると、RAS1座－his3座間の領域で逆位が起こると考えられる。しかし、逆位が生じても、XV番染色体のサイズは変化しないので、パルスフィールドゲル電気泳動法で確認することはできない。そこで、SGal培地で培養したYRN-C 株のクローンの染色体に組込まれたRS断片を含む領域の制限酵素解析を行い、逆位が生じていることを検討した。Fig. 3-5a で示すようにRS断片付近では、MluI部位はRS断片の内部に１か所存在するが、XhoI部位、XbaI部位はRS断片の外側にのみ存在する。２個のRS間の組換えによりRAS1座-his3 座間の領域の欠失が起こると、２個の挿入RSによって挟まれたMluI-XhoI 断片およびMluI-XbaI 断片は消失するが、両挿入RSの外側にあるMluI-XhoI断片およびMluI-XbaI 断片は組換え後も残る。また、XhoI断片、XbaI断片は１個に減少する。RAS1座-his3 座間の領域で逆位が起こると、MluI-XhoI 断片およびMluI-XbaI 断片は全て残るが、XhoI断片およびXbaI断片は組換えの後では変化する。SGlu培地またはSGal培地で培養したYRN-A およびYRN-C 株のクローンの染色体DNA をMluIとXhoIの二重切断で、あるいはXhoI単独で、またXbaI単独で切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、RS DNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った（Fig. 3-5b)。この結果、YRN-C 株をSGal培地で培養したクローンのなかには、MluI-XhoI 断片に変化はないが、

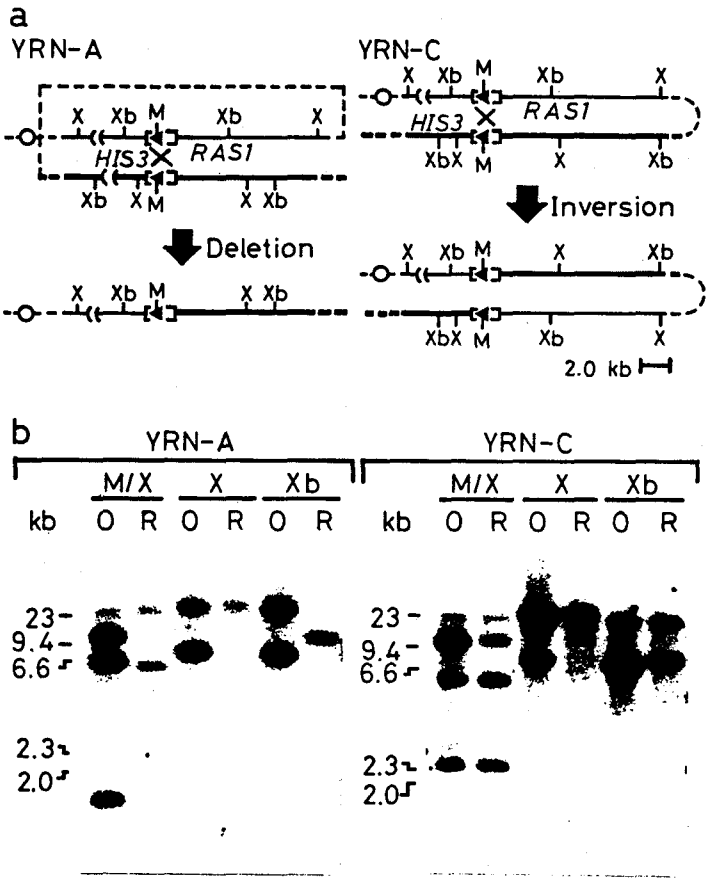


Fig. 3-5. Restriction analysis of modified chromosome XV. (a) Restriction maps of MluI, XbaI and XhoI sites flanking the RS fragment inserted at the RAS1 and HIS3 loci of chromosome XV, and of the modified chromosomes resulting from the recombination between two RSs. ◀] represents the 2.1-kb RS fragment. Abbreviations for restriction sites are: M, MluI; X, XhoI; Xb, XbaI.

(b) Results of restriction analysis of the region flanking the RS insertion sites of chromosome XV. The genomic DNAs were prepared from cells showing the original chromosomal pattern (O) and the clone showing the recombinant chromosome (R) determined by preliminary experiments of strains YRN-A and YRN-C, respectively. The DNA samples were double digested with MluI and XhoI (M/X), or singly with XhoI (X) or XbaI (Xb), electrophoresed on an agarose gel, blotted, and hybridized with the ^{32}P-labeled RS fragment as probe. The molecular sizes of the DNA fragments were estimated with λ phage DNA digested with HindIII.

XhoI断片およびXbaI断片が変化したクローンが得られた。また、YRN-A 株をSGal培地で培養すれば、欠失で予想された制限酵素地図を示すクローンが得られた。したがって、YRN-C 株をSGal培地で培養すると、２個の2.1 kbのRS断片の間で組換えを起こして、RAS1座-his3座領域の逆位が起こり、YRN-A 株をSGal培地で培養すると２個のRS断片の間で組換えを起こしてRAS1座-his3 座間の領域で欠失が起こる。　以上の結果から、pSR1の部位特異的組換え系を用いて、染色体上の大きな欠失と逆位を造成することが可能である。

３．３　非相同染色体間の相互転座

pSR1プラスミドの部位特異的組換え系を利用した非相同染色体間での組換えの可能性を検討するために、Ｖ番染色体のura3座とXV番染色体のhis3座との間で組換えを行い、これらの遺伝子座で区分される左右領域を互いに交換することにより、相互転座を起こすことを試みた。まず、クローン化URA3 DNAの内部に１か所存在するNcoI部位で切断し直線状としたpHM147（RS断片とURA3-SUP11 DNAをもつYIp 型プラスミド；Table 3-2)で一倍体NBW5株（MATα leu2-3,112 ura3-1,2 his3-532)を形質転換し、ura3座にRS断片を挿入した。さらに、この形質転換体をクローン化HIS3 DNA内部に１か所存在するXhoI部位で切断して直線状としたpHM71-1 またはpHM71-3 （RS断片とHIS3 DNAをもつYIp 型プラスミド；Table 3-2 ）で形質転換し、染色体のhis3座に１コピーのRS DNA断片が組込まれたYRN-1株（pHM147とpHM71-1 が組込まれている）およびYRN-2 株（pHM147とpHM71-3 が組込まれている）を作製した（Fig. 3-6）。染色体上でのセントロメアに対するURA3遺伝子およびHIS3遺伝子の転写方向は既知であり(41)、YRN-1 株では２個の挿入RS DNAが各々の染色体のセントロメアに対し共に同方向に組込まれ、YRN-2 株では互いに逆方向に組込まれている。したがって、２個のRS間で組換えが起こると、YRN-1 株ではＶ番染色体とXV番染色体からはセントロメアを１個持つ新しい組換え型の染色体２本が得られると考えられる。しかし、YRN-2 株では、組換えの結果、セントロメアを２個持つ染色体とセントロメアを全く持たない染色体が得られると考えられる。この結果、YRN-2 株では組換え型染色体が失われやすいため、細胞増殖が阻害されるが、YRN-1 株では細胞は正常に増殖すると考えられる。また、染色体地図から染色体の物理的なサイズを計算すると(56,57) 、Ｖ番染色体は710 kbでXV番染色体は1130kbであるが、YRN-1 株のように組換えが起こると新しい染色体は910 kbと930 kbになると予想される。YRN-1 株およびYRN-2 株にＲタンパク生産プラ

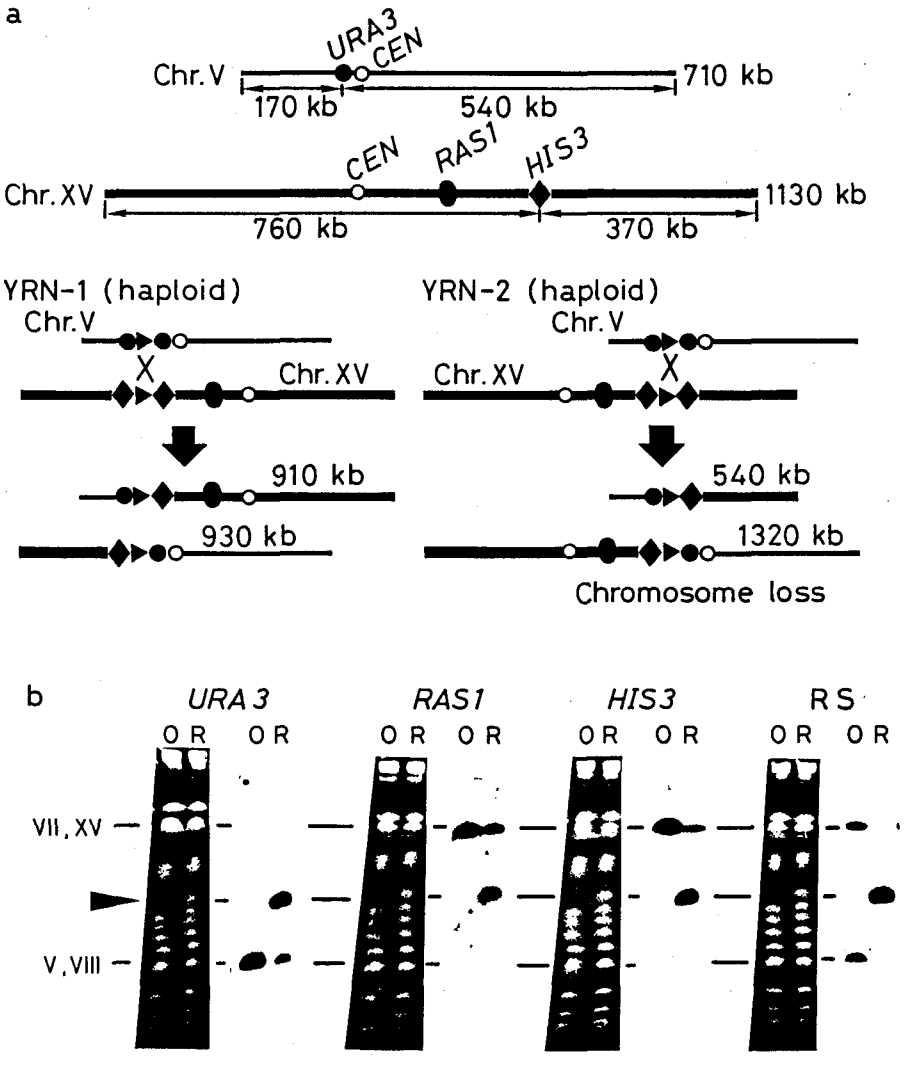

a
URA3
CEN
Chr. V
710 kb
170 kb
540 kb
CEN
RAS1
HIS3
Chr. XV
1130 kb
760 kb
370 kb
YRN-1 (haploid)
Chr. V
X
Chr. XV
910 kb
930 kb
YRN-2 (haploid)
Chr. V
Chr. XV
X
540 kb
1320 kb
Chromosome loss
b
URA 3
RAS1
HIS3
RS
O R O R
O R O R
O R O R
O R O R
VII, XV
V, VIII

Fig. 3-6

Fig. 3-6. Recombination between non-homologous chromosomes. (a) strategy of recombination between chromosomes V and XV. For insertion of the RS fragment at the ura3 locus on chromosome V, a YIp type chimeric plasmid was constructed with a modified pUS1, which the HindIII site was converted to XhoI in the preparation of pHM149 (Fig. 3-3a). The RS fragment was connected at the XhoI site of the modified pUS1. Two HIS3 plasmids constructed in the deletion and inversion experiments (Fig. 3-4) were used for integration of the RS site on chromosome XV. Since these two HIS3 plasmids have the RS fragment in opposite direction to each other, one of the transformants, YRN-1, has two RS fragments at URA3 and HIS3 in the same direction relative to the respective centromeres; and the other, YRN-2, has them in the opposite directions. The plasmid DNAs were linearlized by restriction before transformation at the unique NcoI site in the URA3 DNA for the URA3 plasmid and at the XhoI site in the HIS3 DNA as described (Fig. 3-4a). (b) Detection of recombinant chromosomes by PFGE and Southern hybridization with a ^{32}P-labeled 0.85-kb PstI-NsiI fragment (66) of YIp5 (83) bearing URA3, a 1.8-kb HindIII fragment of pRAS1 bearing RAS1, the 1.7-kb BamHI fragment of YIp1 bearing HIS3, and the RS fragment as probes. Four sets of the same PFGE gels as for chromosome separation were prepared. Each slot on the gels was charged with a DNA sample prepared from the cells having the original configuration of chromosomes V and XV (O), or from the galactose-grown cells having the recombinant chromosomes and cured for pHM153 (R). These gels were blotted and hybridized with the four individual probes as indicated. The arrowhead on the left margin indicates the site of a new chromosomal band.

スミドpHM153を形質転換で導入し、SGlu平板培地上で得られたLeu$^+$形質転換体（各々YRN-1[pHM153]，YRN-2[pHM153]と名付ける）をロイシン非含有のSGalまたはSGlu液体培地で一晩培養後、ロイシン非含有のSGlu平板培地に塗布した。生育してきたコロニーから任意に選択したクローンの染色体パターンをパルスフィールドゲル電気泳動で調べた。YRN-1[pHM153] 株をSGal培地で培養すると約20%のクローン（55クローン中11クローン：これらのクローンのうち、1クローンの染色体パターンをFig. 3-6b のRレーンに示す）で970 kbに相当する新しいバンドが認められた。しかし、NBW5株では、この方法を使用すると、V番染色体にはVIII番染色体が、XV番染色体にはVII番染色体が重なって移動するため、もとのV番染色体とXV番染色体の消失を泳動パターンから確かめることはできない。そこで、YRN-1[pHM153] 株のSGlu培地で培養した元のクローンおよびSGal培地で培養して得られた新しいクローンからRタンパク生産プラスミドpHM153を除去し、染色体DNA をパルスフィールドゲル電気泳動で分離した後、DNA をフィルターに移し、^{32}P で放射能ラベルしたV番染色体上のURA3遺伝子、XV番染色体上のHIS3、RAS1遺伝子またはRS DNAをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った（Fig. 3-6b)。新しいクローンでは何れのプローブでも新しい染色体バンドに強い結合シグナルを示し、RS DNA以外のプローブでは元のV番染色体、XV番染色体のバンドにも弱く結合した（Rレーン）。元のクローンでは何れのプローブでも元のV番染色体、XV番染色体バンドにのみ結合した（Oレーン）。また、RS DNAをプローブとすると新しいクローンの新しい染色体バンドの濃さは、元のクローンのV番染色体バンドの濃さとXV番染色体バンドの濃さを合せたものにほぼ等しい。したがって、新しい染色体バンドにはV番染色体のura3座とXV番染色体のhis3座との間の組換えで生じた2本の新しい染色体が重なっていると考えられた。さらに、YRN-1[pHM153]株をSGlu培地で培養した場合には、新しいクローンの出現頻度は低かった（54クローン中2クローン）。したがって、YRN-1 株では、V番染色体とXV番染色体は予想通り(Fig. 3-6a) 、Rタンパクの働きでura3座とhis3座との間で組換えを起こし、セントロメアを1個持つ組換え型染色体2本が生じている。

新しいクローンでも、V番染色体およびXV番染色体とプローブDNA との結合シグナルが認められる。結果を示さないが、pHM153を除去した後、単一コロニー分離を繰り返した株でもこれらの結合シグナルは認められ、この細胞をYPAD培地で培養すると結合シグナルがさらに増加することから、Rタンパクの働きとは無関係に、新しい染色体から元の染色体が再生されると考えられる。

YRN-2[pHM153] 株をロイシンを含まないSGlu培地またはSGal培地で培養しても、新しい組換え型染色体バンドを持つクローンは得られなかった（52クローンを調べた）。また、YRN-2[pHM153] 株をSGlu培地で培養しても正常に増殖したが、SGal培地で培養すると著しい増殖阻害が起こった（結果省略）。したがって、YRN-2 株では予想通り（Fig. 3-6a)、Rタンパクの働きにより、セントロメアを２個持つ染色体と全く持たない染色体に組換わったと考えられた。

次に、YRN-1 株の転座染色体では、実際に２個の挿入RS DNA断片間で組換えが起こったことを確認するために、YRN-1 株の転座前のクローンと、転座後のクローンの染色体上のRS DNA断片挿入付近の制限酵素地図を調べた。RS DNA断片にはMluI部位が１か所存在する（Fig. 3-2a)が、BamHI 部位、PstI部位、SalI部位は存在しない。したがって、組換えがRS断片間で起こったならば、組換えの前後でMluI-MluI 断片および MluI-BamHI 断片は変化しないが、PstI-PstI 断片およびSalI-SalI 断片は変化する（Fig. 3-7a)。YRN-1 株の転座前のクローンと転座後のクローンの染色体DNA をMluIとBamHI との二重切断、PstI単独切断あるいはSalI単独切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、RS DNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、Fig. 3-7b に示すように組換えの前後でMluI、BamHI 二重切断の断片のサイズは変化しなかったが、PstI断片およびSalI断片のサイズは変化した。このことから、YRN-1 株で生じた転座染色体は染色体に組込んだ２個のRS断片間の組換えでできたと言える。以上の結果から、pSR1の部位特異的組換えを利用して非相同染色体間での組換えにより相互転座を高頻度で起こすことが可能である。

第４節　考察

第３章では、pSR1プラスミドの部位特異的組換えを利用して、S. cerevisiae 細胞の染色体を効率良く改変する方法を開発した。この方法を用いて染色体上での逆位と欠失および非相同染色体間の組換えを80%および20%という高頻度で起こすことができた。この様にpSR1の組換えは線状DNA の組換え、環状DNA の組換え、同方向に反復する組換え部位間の組換え、逆方向に反復する組換え部位間の組換え、分子内組換え、分子間組換えなどを起こすことから、この組換えでは、組換え部位DNA の高次構造、２個の組換え部位の相対的な位置による組換えの阻害はないと考えられる。したがって、この系を用いてさらに環

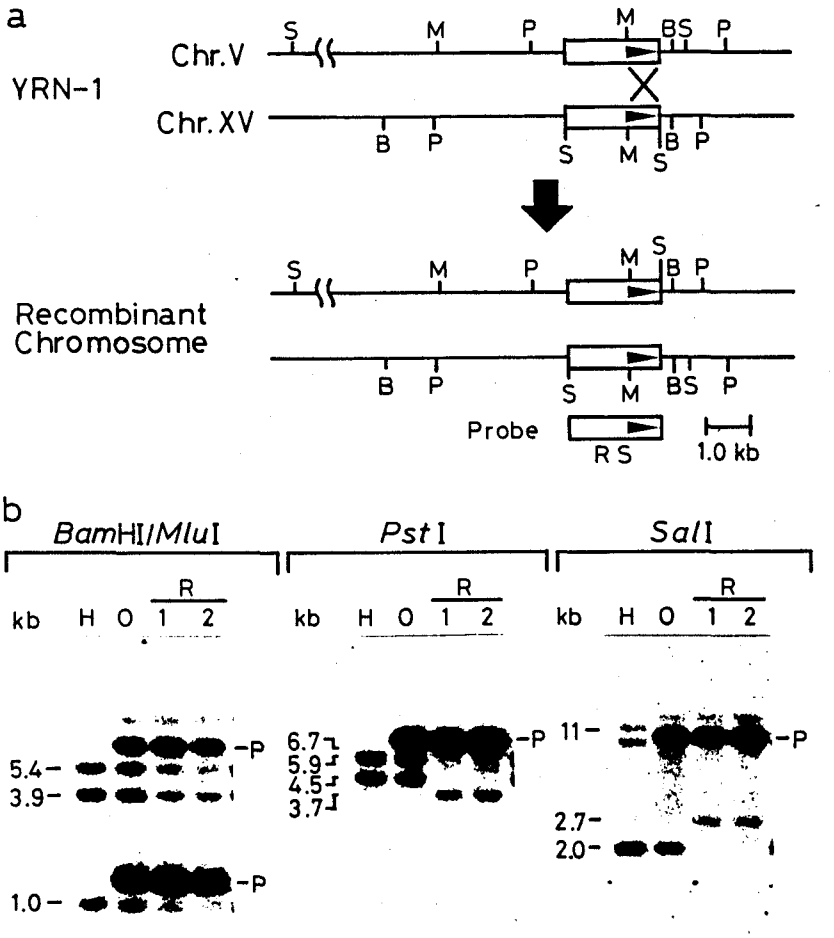


Fig. 3-7. Restriction analysis of the recombinant chromosomes created by the recombination between chromosome V and XV. (a) Restriction maps of the BamHI, MluI, PstI and SalI sites flanking the RS fragments inserted at the ura3 and his3 loci on chromosome V and XV. The abbreviations for restriction sites are as in Fig. 3-2 and Fig. 3-5. (b) DNA samples were prepared from the host cells (strain YRN-1) without pHM153 (H); from the cells of YRN-1 harbouring pHM153 but having the original configuration of chromosomes (O); and from those having the recombinant chromosomes (R). The DNA samples were double digested with BamHI and MluI, or singly with PstI and SalI, electrophoresed on an agarose gel, blotted, and hybridized with the ^{32}P-labeled RS fragment as probe. The migration site of pHM153 (linear molecule) (P) is indicated on the right-hand margin of the gels. The molecular sizes of the DNA fragments were estimated with λ phage DNA digested with HindIII.

状DNA を染色体に組込むことも可能であろう。また、染色体に逆向きに反復させた組換え部位を多コピー挿入し、Rタンパクを生産させると２μmマッピング(28)と同様の原理で染色体を脱落させることもできると考えられる。このように、pSR1の部位特異的組換えを利用した染色体改変技術は、染色体の繋ぎ換え、染色体へのDNA の挿入、特定の染色体の消去などの種々の染色体操作に応用でき、染色体レベルでの生物の育種、品種改良のための有力な手段となるであろう。S. cerevisiae では、クローン化遺伝子ライブラリーを利用して、また、例えば、染色体に約100 コピー存在するTy因子のδ反復配列(14)を利用して、染色体の様々な位置に組換え部位（RS）を組込むことが可能であり、上記の各操作を幅広く行うことが可能である。酵母では、pSR1と２μmDNA 以外にも、５種類の環状プラスミドが良く知られており(19,89,91,92) 、これらのプラスミドの持つ分子内組換えを利用することもできる。

pSR1プラスミドは、細胞内ではＡ型分子とＢ型分子がほぼ同数存在することから、pSR1の部位特異的組換えは可逆反応である。したがって、単純に考えると、この組換えを染色体の改変に利用すると、最終的には、元のクローンと組換え体クローンが同数存在する平衡状態に達し、50%以上の組換え体クローンを得ることは不可能であると予想される。しかし、染色体からのURA3-SUP11遺伝子の切り出し、RAS1座-his3 座間の領域の欠失では、分子内組換えが分子間組換えよりも効率良く起こること、生成環状DNA に自律複製能がないこと、生成環状DNA のサイズが大きく細胞内で不安定であることなどの理由から90%、80%の高頻度で組換え体クローンに変換されたと考えられる。他の染色体改変操作でも、一度利用された組換え部位が不活化され、組換え反応が不可逆になるなどの工夫をすることにより全クローンを組換え体に変換することが可能になるであろう。

本研究で作製したRタンパク生産プラスミドを使用するとグルコース培地でR遺伝子の発現を抑制した状態でも、ガラクトース培地でR遺伝子を誘導した状態よりも低頻度だが、RS間で組換えが起こり、R遺伝子が弱く発現していると考えられた。グルコース培地条件下での組換えを低く抑えるためには、さらに発現が抑制されるプラスミドを構築する必要がある。また、グルコース培地条件下で、pHM153を使用した場合と、pHM152を使用した場合との間で認められた組換え頻度の差は、それぞれのGAL プロモーターの機能の差と考えられる。

URA3座とRAS1座間での相互転座染色体を作製したとき、相互転座染色体が本来の構造の染色体に戻りやすいという現象が観察された。この現象は、Rタンパクが生産されなくて

も起こり、Rタンパクの働きがないとき本来の染色体から転座染色体が生じる頻度よりも相互転座染色体から本来の染色体に戻る頻度のほうが高い。これらの観察から、S. cerevisiae 細胞には、構造的に異常な染色体を本来の染色体に再生する機構が備わっている可能性が考えられる。また、本来の染色体は、組換え型より、安定性、機能などの点で優れていることが示唆される。しかし、他の研究者により多くの相互転座染色体(41, 64, 84)、欠失染色体(56, 85) が作製されているが、この様な再生現象が観察された報告は1つしかない(84)。さらに、この報告では、XV番染色体のhis3座とXII番染色体のRDN1座（rRNA遺伝子座）との間で組換えを起こし、相互転座により、rRNA遺伝子の繰り返し配列が2本の転座染色体に分配され、分配されたrRNA遺伝子の相同性を介した組換えにより再生が起こったと考え、特別な再生機構は考えていない。本研究で観察された再生現象は、ura3座－his3座間での転座染色体に特異的なものかもしれないが、その機構を研究することは、再生現象を防ぎ、改変染色体の構造を安定に維持するために重要である。

第5節　要約

pSR1プラスミドの部位特異的組換えを利用してS. cerevisiae 染色体を人為的に改変する技術の開発を試みた。その技術として次のような方法を考案した。酵母染色体の任意の2か所にYIp 型ベクターを用いてpSR1の組換え部位を含むRS断片を組込む。この細胞にガラクトース代謝系遺伝子プロモーターの下流にR遺伝子を連結したプラスミドを導入した後、ガラクトース培地で培養して、Rタンパクを生産させ、2個のRS間で組換えを行わす。この方法を用いて染色体上の欠失と逆位、非相同染色体間の相互転座、巨大環状DNAの染色体への組込みが可能である。まず、染色体に組込んだRS間で組換えが起こるかを調べるために同方向に向いた2個のRSの間にSUP11 およびURA3遺伝子を挟むDNA を染色体に組込み、R遺伝子を発現させた。約95%の細胞でSUP11 およびURA3遺伝子の切り出しが起こったことから、染色体に組込んだRS間でも組換えが起こることがわかった。つぎに、欠失、逆位、相互転座を起こすことを試みた。二倍体細胞の一方のXV番染色体上約180 kb離れたRAS1座とhis3座とにRS断片を組込み、R遺伝子を発現させると、RS断片が同方向に挿入されている細胞では約80%の細胞で欠失が、逆方向に挿入されている細胞では逆位が起こった。一倍体細胞のV番染色体のura3座とXV番染色体のhis3座とにRS断片を組込み、R

遺伝子を発現させると約20%の細胞で相互転座が起こった。したがって、この技術を用いて欠失、逆位、相互転座のような染色体の改変を起こすことが可能であることがわかった。この技術は生物の品種改良、育種に利用できると考えられる。

第４章　総合考察と要約

本論文では、まず、pSR1プラスミドの分子内組換えの機構を理解するために、組換えに必須な領域の限定、組換えに働く因子の限定、組換え部位領域DNA とＲタンパクの結合を調べ、次に、pSR1プラスミドの分子内組換えを用いて、染色体上の欠失と逆位、非相同染色体間の組換えを起こす染色体の改変技術を開発した。

第２章では、pSR1プラスミドの分子内組換えの機構を解析した。pSR1の一方のIRに変異をもつプラスミドの分子内組換えと変異部位の挙動から組換え部位はIR内の58 bp の配列内に限定された。この58 bp 配列内には、3 bpのスペース部を置いて隔てられた14 bp の一対の逆向き反復配列が存在する。この部位特異的組換えは、宿主の普遍的組換え系とは無関係に起こり、酵母宿主因子の働きを必要としない。また、Ｒタンパクは、組換え部位に存在する14 bp の逆向き反復配列およびそれに続く４個の同じ14 bp の繰り返し配列に結合する。これらの観察から遺伝子変換を伴う分子内組換えの機構として、二重鎖切断修復モデルと一本鎖切断交換モデルを提案した。部位特異的組換えにはS. cerevisiae の接合型変換の組換え(46,81) 、S. cerevisiae ミトコンドリアに存在するイントロンでの転移(24,25,37)などのように大領域の遺伝子変換を伴う部位特異的組換え（遺伝子変換型組換え）とλファージのInt タンパクの組換え(94)、P1ファージのcre-lox 系の組換え(78)、MuファージのCin タンパクによる組換え(75)、サルモネラ菌のHin タンパクによる組換え(75)、２μmDNA の分子内組換え(9)の様に交叉を行う組換え（交叉型組換え）が存在する。遺伝子変換型組換えの特徴は、部位特異的エンドヌクレアーゼがDNA 鎖を二重鎖切断することにより開始されることである。また、接合型変換の組換えには普遍的組換えおよび修復に働く遺伝子の働きが必要である(47)。しかし、これらの特徴は、pSR1の組換えとは異なる。また、交叉型組換えの特徴は、１）組換えは組換えタンパクによって行われ、他の宿主因子の働きを必要としないこと（Int タンパクによる組換えは例外で宿主因子を必要とする）、２）宿主の組換えとは無関係であること、３）組換え部位に逆向き反復配列が存在し、この配列に組換えタンパクが結合すること、などであり(69)、pSR1プラスミドの組換えと一致する。また、Ｒタンパクとこれらの組換えタンパクの C末端には弱い相同領域が存在する(2,3,31)。よって、pSR1の分子内組換えは交叉型の組換えに属

し、その組換えモデルとして、一本鎖切断交換モデルが適切であると考えられる。また、Int タンパクの組換え(45,61) およびcre-loxPの組換え(34)では、in vitro組換え反応でホリデー中間体が観察されていることからも一本鎖切断交換モデルの可能性が示唆される。pSR1プラスミドの組換えにおいてもin vitro反応でホリデー中間体の存在を調べることにより組換えモデルを検証できるであろう。

第３章では、pSR1プラスミドの部位特異的組換えを利用して染色体を改変する技術を開発した。この技術の大きな特徴は部位特異的組換えを人為的に操作して染色体の改変を行ったことである。このことにより、指定した部位で指定した種類の改変、効率良い改変、改変のON-OFF制御が可能である。本研究以外にも、染色体へのテロメアの挿入とその解離による欠失染色体の作製(60)、染色体上の大きな領域を小ベクターDNA で置換することによる欠失染色体の作製(85)、クローン化DNA を染色体に挿入し、それらDNA 間の相同的組換えによる相互転座染色体の作製(41,64,84)などの染色体改変技術が開発されている。これらの方法はいずれも、宿主が持つ相同的組換え（普遍的組換え）の機構や形質転換を利用するため、組換え体クローンを栄養要求性の相補などで選択する必要がある。ところが、pSR1の部位特異的組換えを利用した方法では、組換え開始部位を染色体へ組込む際に、形質転換と相同的組換えを利用するが、改変自体は部位特異的組換えで起こすので、無作為選択でも組換え体クローンを得ることが十分可能である。たとえば、Ｖ番染色体のura3座とXV番染色体のhis3座との相互転座クローンの出現頻度は相同的組換えを利用すると１細胞あたり、１世代あたり$1x10^{-7}$と低いが(41)、pSR1の部位特異的組換えを利用すると約$1x10^{-2}$（第３章の結果で１世代を２時間として計算した）と高く、組換え体をパルスフィールドゲル電気泳動で選択することが可能である。また、部位特異的組換えを停止することができるので、組換え後に染色体に残る２個の組換え開始部位間で起こる組換えを普遍的組換えの頻度まで下げることができ、改変染色体を安定に維持することが可能である。さらに、改変を細胞内で行い、巨大DNA を試験管内で操作することを避けることができるので、DNA が剪断される確率が低く、染色体の改変を容易に行える。また、指定した部位で指定した種類の組換えを起こすことができるので、高等生物のように、非正統的組換えの多い細胞でも、思い通りの改変、DNA の染色体の指定部位への組込みが可能である。

この染色体改変技術をさらに広範囲に利用するためには、染色体上の任意の位置に組込んだRS間で高頻度で組換えが起こる必要がある。本研究では、XV番染色体のRAS1座とhis3

座間での組換えおよびＶ番染色体のura3座とXV番染色体のRAS1座間での組換えが起こることを示した。この様に、pSR1プラスミドの部位特異的組換えを用いて、染色体上の欠失と逆位、非相同染色体間の相互転座を起こすことが可能であるので、組換えには、RS DNAが存在するDNA が環状か線状か、また、分子内組換えか分子間組換えかは影響を及ぼさないと考えられる。第２章に示したpSR1の分子内組換え機構に基づくと、pSR1の分子内組換えは、１）Ｒタンパクによる組換え部位の認識とその組換え部位DNA への結合、２）２個の組換え部位DNA の対合、３）ＲタンパクによるDNA 鎖の切断と再結合、の３段階の過程を通じて起こる。１）の段階には、クロマチン構造のような染色体の高次構造が、２）の段階には、染色体全体の高次構造と核内での組換え部位の配置が、その効率に影響を及ぼすと考えられる。現時点では、これらが、染色体の改変に及ぼす影響については分らず、今後の検討を必要とする。

pSR1プラスミドの部位特異的組換えを利用して、染色体上での欠失と逆位、非相同染色体間の相互転座を起こすことができた。この染色体改変技術を用いて、染色体を繋ぎ変えたり、染色体にDNA を挿入したり、特定の染色体を消去して、染色体を自由に操作して染色体レベルでの生物の品種改良、育種を行うことが可能である。この染色体改変技術を用いると、約200 kbのDNA の挿入が可能と考えられるから、約100 個の遺伝子を導入できることになる。したがって、窒素固定や光合成などの数段階から数十段階の反応からなる代謝系を移植することが可能である。相互転座染色体ad,cb （２本の染色体をab,cd で表現すると、相互転座染色体はad,cb となる）と本来の染色体ab,cd をもつ雑種二倍体ab,cd/ad,cb が減数分裂を行うと、ab,cb、ab,cd、ad,cb、ad,cdなどの染色体をもつ配偶子が形成される（動原体はa 領域とb 領域に存在すると仮定した）。しかし、これらのうち、ab,cb とad,cd の染色体をもつ配偶子は染色体の一部を欠くために生育できず、一回の転座で稔性は半分に減少する。さらに多くの転座染色体を形成すると稔性をさらに減少させることができるであろう。このような相互転座染色体を染色体改変技術を利用して構築すると不稔生物を作製することが可能である。pSR1の部位特異的組換えを利用してベクターを染色体に挿入することにより、育種株に増殖可能なプラスミドを残さずに生物を改良することが可能である。また、この技術を用いて、染色体から、特定のDNA 領域を環状DNA として、切り出すことが可能なことから、切り出されたDNA に宿主の自律複製配列および大腸菌の複製起点を連結しておくと、切り出されたDNA 断片のコピー数が数十倍に増加し、染色体の指定した領域のDNA を直接または大腸菌を利用して容易に回収できる。しか

も、この方法では、最低200 kbの切り出しが可能であるから、人間の血液凝固因子Ⅷ遺伝子（最低180 kb）(29)やキイロショウジョウバエのbithorax複合体遺伝子（約320 kb）(44)などの高等生物の巨大遺伝子および原核生物のオペロンを形成する遺伝子群を一挙に回収できるであろう。さらに、pSR1の部位特異的組換えを利用して、染色体上に欠失や逆位を起こして、また、これらの改変染色体を８塩基認識の制限酵素で切断して、パルスフィールドゲル電気泳動にかけることにより染色体構造を解析することも可能である。

要約

酵母Z. rouxii 由来の環状プラスミドpSR1は、959 bpからなる一対の逆向き反復配列をもち、この部分を介して分子内組換えを行う。この分子内組換えにはプラスミド自身がコードするＲタンパクが関与し、組換えはS. cerevisiae 宿主でも起こる。このpSR1プラスミドの分子内組換え機構を利用した酵母S. cerevisiae の染色体改変技術の開発について述べたのが本論文である。

第２章では、pSR1プラスミドの分子内組換えの機構を解析することを行った。分子内組換え部位を限定するために、pSR1プラスミドの一方のIRにSalIリンカーが挿入された種々の変異プラスミドおよび欠失変異プラスミドをS. cerevisiae 宿主に導入し、変異プラスミドの組換えと変異部位の動きを調べ、組換え部位を58 bp の配列内に限定した。この配列内には一対の14 bp の逆向き反復配列が存在する。この部位特異的組換えに伴い、IR全域で変異部位の遺伝子変換が高頻度で起こる。このことから、組換えは、58 bp 配列内で開始されるが、交叉はIR全域で起こることがわかった。また、分子内組換えおよび遺伝子変換には普遍的組換えに関与するRAD52 遺伝子の働きは不要であった。大腸菌内でtac プロモーターを用いてR遺伝子を発現させると、普遍的組換えに関与するrecA遺伝子およびrecBC 遺伝子を欠損してもIR間で分子内組換えが起こることから、分子内組換えには、酵母宿主因子は関与することなく、Ｒタンパクのみで起こると思われた。さらに、大腸菌で大量生産し、部分精製したＲタンパクを用いて、Ｒタンパクの組換え部位DNA への結合をDNase I フットプリンティング実験により調べたところ、Ｒタンパクは58 bp 配列に存在する一対の14 bp の逆向き反復配列とそれに隣接する４個の同じ14 bp の繰り返し配列に結合することがわかった。この結果は、２μm DNAでの観察と同様である。これらのこと

から、58 bp 配列内で組換えが開始された後、ブランチマイグレイションによりヘテロデュープレックスを形成するが、ミスマッチ修復を伴うことなくヘテロデュープレックスがDNA 複製により解離されることが示唆され、この組換えは特異な部位特異的組換えであると考えられた。また、２個の58 bp 配列をDNA に組込み、Ｒタンパクの生産を制御することによりpSR1の組換えを人為的に操作できると考えられた。

第３章では、pSR1プラスミドの部位特異的組換えを利用したS. cerevisiae 染色体の改変技術の開発を試みた。染色体改変方法として次のような方法を考案した。
S. cerevisiae の遺伝子および組換え開始部位（RS）を含むRS断片を連結したYIp 型ベクターを用いて組換え開始部位をS. cerevisiae 染色体の任意の２か所に組込む。この細胞にGAL1遺伝子プロモーターの下流にR遺伝子を繋いだYEp 型プラスミドを導入した後、ガラクトース培地で培養して、Ｒタンパクを生産させ、２個のRS間で組換えを行わす。この方法を用いて染色体上の欠失と逆位、非相同染色体間の相互転座、巨大環状DNA の染色体への組込みが可能である。まず、染色体に組込んだRS間で組換えが起こるかを調べるために同方向に向いた２個のRS断片の間にSUP11-URA3遺伝子を挟むDNA を染色体に組込み、R遺伝子を発現させた。約95％の細胞でSUP11-URA3遺伝子の欠失が起こったことから、染色体に組込んだRS間でも組換えが起こることがわかった。次に欠失と逆位の可能性を調べるために、二倍体細胞の一方のXV番染色体上約180 kb離れたRAS1座とhis3座とにRS断片を組込みR遺伝子を発現させるとRS断片が同方向に挿入されている細胞では約80％の細胞で欠失が逆方向に挿入されている細胞では逆位が起こった。さらに、転座の可能性を調べるために、一倍体細胞のＶ番染色体のura3座とXV番染色体のhis3座とにRS断片を組込み、R遺伝子を発現させると約20％の細胞で相互転座が起こった。したがって、この技術を用いて欠失、逆位、相互転座のような染色体の改変を効率良く起こすことが可能であることがわかった。この技術は生物の品種改良、育種に利用できると考えられる。

参考文献

1. Andrews, B. J., G. A. Proteau, L. G. Beatty, and P. D. Sadowski. 1985. The FLP recombinase of the 2μ circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. Cell 40:795-803.
2. Araki, H., A. Jearnpipatkul, H. Tatsumi, T. Sakurai, K. Ushio, T. Muta, and Y. Oshima. 1985. Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. J. Mol. Biol. 182:191-203.
3. Argos, P., A. Landy, K. Abremski, J. B. Egan, E. Haggard-Ljungquist, R. H. Hoess, M. L. Kahn, B. Kalionis, S. V. L. Narayana, L. S. Pierson III, N. Sternberg, and J. M. Leong. 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. EMBO J. 5:433-440.
4. Babineau, D., D. Vetter, B. J. Andrews, R. M. Gronostajski, G. A. Proteau, L. G. Beatty, and P. D. Sadowski. 1985. The FLP protein of the 2-micron plasmid of yeast: purification of the protein from Escherichia coli cells expressing the cloned FLP gene. J. Biol. Chem. 260:12313-12319.
5. Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.
6. Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, H. W. Boyer, J. H. Crosa, and S. Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. a multipurpose cloning system. Gene 2:95-113.
7. Botstein, D., S. C. Falco, S. E. Stewart, M. Brennan, S. Scherer, D. T. Stinchcomb, K. Struhl, and R. W. Davis. 1979. Sterile host yeasts (SHY): a eucaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. Gene 8:17-24.

8. Broach, J. R. 1981. The yeast plasmid2 μ circle, p.445-470. In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), The molecular biology of the yeast saccharmyces: life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

9. Broach, J. R., V. R. Guarascio, and M. Jayaram. 1982. Recombination within the yeast plasmid 2μ circle is site-specific. Cell 29:227-234.

10. Broach, J. R., Y.-Y. Li, L.-C. C. Wu, and M. Jayaram. 1983. Vectors for high-level, inducible expression of cloned genes in yeast, p.83-117. In M. Inouye (ed.), Experimental manipulation of gene expression. Academic Press Inc., New York, N. Y.

11. Brosius, J. 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. Gene 27:151-160.

12. Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter, and H. F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 148:107-127.

13. Burke, D. T., G. F. Carle, and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogeneous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. Science 236:806-812.

14. Cameron, J. R., E. Y. Loh, and R. W. Davis. 1979. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. Cell 16:739-751.

15. Cameron, J. R., P. Philippsen, and R. W. Davis. 1977. Analysis of chromosomal integration and deletions of yeast plasmids. Nucleic Acids Res. 4:1429-1448.

16. Carle, G. F., and M. V. Olson. 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 12:5647-5664.

17. Carle, G. F., and M. V. Olson. 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3756-3760.

18. Celeste Y.-P., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage

cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119.

19. Chen, X. J., M. Saliola, C. Falcone, M. M. Bianchi, and H. Fukuhara. 1986. Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast Kluyveromyces drosophilarum. Nucleic Acids Res. 14:4471-4481.

20. Clark, A. J.. 1973. Recombination deficient mutants of E. coli and other bacteria. Ann. Rev. Genet. 7:67-86.

21. Clarke, L., and J. Carbon. 1978. Functional expression of cloned yeast DNA in Escherichia coli: specific complementation of arginosuccinate lyase (argH) mutations. J. Mol. Biol. 120:517-532.

22. Clarke, L., and J. Carbon. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. Nature (London) 287:504-509.

23. Clewell, D. B., and D. R. Helinski. 1969. Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62:1159-1166.

24. Colleaux, L., L. d'Auriol, M. Betermier, G. Cottarel, A. Jacquier, F. Galibert, and B. Dujon. 1986. Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into E. coli as a specific double strand endonuclease. Cell 28:521-533.

25. Colleaux, L., L. d'Auriol, F. Galibert, and B. Dujon. 1988. Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6022-6026.

26. de Boer, H. A., L. J. Comstock, and M. Vasser. 1983. The tac promoter: A functional hybrid derived from the trp and lac promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25.

27. DeFeo-Jones, D., E. M. Scolnick, R. Koller, R., and R. Dhar. 1983. ras-related gene sequences identified and isolated from Saccharomyces cerevisiae. Nature (London) 306:707-709.

28. Falco, S. C., Y. Li, J. R. Broach, and D. Botstein. 1982. Genetic properties of chromosomally integrated 2μ plasmid DNA in yeast. Cell 29:573-584.

29. Gitschier, J., W. I. Wood, T. M. Goralka, K. L. Wion, E. Y. Chen, D. H. Eaton, G. A. Vehar, D. J. Capon, and R. M. Lawn. 1984. Characterization of the human factor VIII gene. Nature (London) 312:326-330.

30. Gronostajski, R. M., and P. D. Sadowski. 1985. The FLP recombinase of the Saccharomyces cerevisiae 2 μ m plasmid attaches covalently to DNA via a phosphotyrosyl linkage. Mol. Cell. Biol. 5:3274-3279.

31. Hartley, J. L., and J. E. Donelson. 1980. Nucleotide sequence of the yeast plasmid. Nature (London) 286:860-864.

32. Hereford, L., K. Fahrner, J. Woolford Jr., M. Rosbash, and D. B. Kaback. 1979. Isolation of yeast histon genes H2A and H2B. Cell 18:1261-1271.

33. Hieter, P., C. Mann, M. Snyder, and R. W. Davis. 1985. Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. Cell 40:381-392.

34. Hoess, R., A. Wierzbicki, and K. Abremski. 1987. Isolation and characterization of intermediates in site-specific recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6840-6844.

35. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153: 163-168.

36. Jackson, J. A., and G. R. Fink. 1981. Gene conversion between duplicated genetic elements in yeast. Nature (London) 292:306-311.

37. Jacquier A., and B. Dujon. 1985. An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. Cell 41:383-394.

38. Jayaram, M. 1986. Association of reciprocal exchange with gene conversion between the repeated segments of 2-μm circle. J. Mol. Biol. 191:341-354.

39. Jayaram, M. 1986. Mating type-like conversion promoted by the 2μm circle site-specific recombinase: implications for the double-strand-gap repair model. Mol. Cell. Biol. 6:3831-3837.

40. Jearnpipatkul, A., H. Araki., and Y. Oshima. 1987. Factors encoded by and affecting the holding stability of yeast plasmid pSR1. Mol. Gen. Genet. 206:88-94.

41. Jinks-Robertson, S., and T. D. Petes. 1986. Chromosomal translocations generated by high-frequency meiotic recombination between repeated yeast genes. Genetics 114:731-752.

42. Johnston, M., and R. W. Davis. 1984. Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 4:1440-1448.

43. Kao, F.-T., and T. T. Puck. 1970. Genetics of somatic mammalian cells: linkage studies with human-Chinese hamster cell hybrids. Nature (London) 228:329-332.

44. Karch, F., B. Weiffenbach, M. Peifer, W. Bender, I. Duncan, S. Celniker, M. Crosby, and E. B. Lewis. 1985. The abdominal region of the bithorax complex. Cell 43:81-96.

45. Kitts, P. A., and H. A. Nash. 1987. Homology-dependent interactions in phage λ site-specific recombination. Nature (London) 329:346-348.

46. Kostriken, R., J. N. Strathern, A. J. S. Klar, J. B. Hicks, and F. Heffron. 1983. A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in Saccharomyces cerevisiae. Cell 35:167-174.

47. Malone, R. E., and R. E. Esposito. 1980. The RAD52 gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:503-507.

48. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning:

a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

49. Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65:499-560.

50. McClelland, M., L. G. Kessler, and M. Bittner. 1984. Site-specific cleavage of DNA at 8- and 10-base-pair sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:983-987.

51. McLeod, M., S. Craft, and J. R. Broach. 1986. Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the Saccharomyces cerevisiae plasmid 2μm circle. Mol. Cell. Biol. 6:3357-3367.

52. Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. Methods Enzymol. 101: 20-78.

53. Messing, J., R. Crea, and P. H. Seeburg. 1981. A system for shotgun DNA sequencing. Nucleic Acids Res. 9:309-321.

54. Meyer-Leon, L., J. F. Senecoff, R. C. Bruckner, and M. M. Cox. 1984. Site-specific genetic recombination promoted by the FLP protein of the yeast 2-micron plasmid in vitro. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 49:797-804.

55. Morrison, D. A.. 1977. Transformation in Escherichia coli: cryogenic preservation of competent cells. J. Bacteriol. 132:349-351.

56. Mortimer, R. K., and D. Schild. 1981. Genetic mapping in Saccharomyces cerevisiae, p.11-26. In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), The molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

57. Mortimer, R. K., and D. Schild. 1985. Genetic map of Saccharomyces cerevisiae, edition 9. Microbiol. Rev. 49:181-212.

58. Murray, A. W., N. P. Schultes, and J. W. Szostak. 1986. Chromosome length controls mitotic chromosome segregation in yeast. Cell 45:529-536.

59. Murray. A. W., and Szostak, J. W. 1983. Construction of artificial chromosomes in yeast. Nature (London) 305:189-193.

60. Murray, A. W., and J. W. Szostak. 1986. Construction and behavior of circularly permuted and telocentric chromosomes in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 6:3166-3172.

61. Nunes-Düby, S. E., L. Matsumoto, and A. Landy. 1987. Site-specific recombination intermediates trapped with suicide substrates. Cell 50: 779-788.

62. Orr-Weaver, T. L., and J. W. Szostak. 1985. Fungal recombination. Microbiol. Rev. 49:33-58.

63. Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak, and R. J. Rothstein. 1983. Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. Methods Enzymol. 101:228-245.

64. Potier, S., B. Winsor, and F. Lacroute. 1982. Genetic selection for reciprocal translocation at chosen chromosomal sites in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 2:1025-1032.

65. Prakash, S., L. Prakash, W. Burke, and B. A. Montelone. 1980. Effects of the RAD52 gene on recombination in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 94:31-50.

66. Rose, M., P. Grisafi, and D. Botstein. 1984. Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in Escherichia coli. Gene 29:113-124.

67. Rothstein, R. J. 1983. One-step gene disruption in yeast. Methods Enzymol. 101:202-211.

68. Russel, D. R., and G. N. Bennett. 1982. Construction and analysis of in vivo activity of E. coli promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing. Gene 20:231-243.

69. Sadowski, P.. 1986. Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. J. Bacteriol. 165:341-347.

70. Sadowski, P. D., D. D. Lee, B. J. Andrews, D. Babineau, L. Beatty, M. J. Morse, G. Proteau, and D. Vetter. 1984. In vitro system for

genetic recombination of the DNAs of bacteriophage T7 and yeast 2-micron circle. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 49:789-796.

71. Sanger, F., A. R. Coulson, G. F. Hong, D. F. Hill, and G. B. Petersen. Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. 1982. J. Mol. Biol. 162:729-773.

72. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.

73. Schwartz, D. C., and C. R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37:67-75.

74. Senecoff, J. F., R. C. Bruckner, and M. M. Cox. 1985. The FLP recombinase of the yeast 2-μm plasmid: characterization of its recombination site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7270-7274.

75. Silverman, M., and M. Simon. 1983. Phase variation and related systems. p.537-557. In J. A. Shapiro (ed.), Mobile genetic elements. Academic Press, Inc., New York, N. Y.

76. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.

77. Stahl, M. M., I. Kobayashi, F. W. Stahl, and S. K. Huntington. 1983. Activation of Chi, a recombinator, by the action of an endonuclease at a distant site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2310-2313.

78. Sternberg, N., and R. Hoess. 1983. The molecular genetics of bacteriophage P1. Ann. Rev. Genet. 17:123-154.

79. Stinchcomb, D. T., C. Mann, and R. W. Davis. 1982. Centromeric DNA from Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. 158:157-179.

80. Stinchcomb, D. T., K. Struhl, and R. W. Davis. 1979. Isolation and characterization of a yeast chromosome replicator. Nature (London) 282:39-43.

81. Strathern, J. N., A. J. S. Klar, J. B. Hicks, J. A. Abraham, J. M. Ivy, K. A. Nasmyth, and C. McGill. 1982. Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. Cell 31:183-192.

82. Struhl, K., and R. W. Davis. 1980. A physical, genetic and transcriptional map of the cloned his3 gene region of Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. 136:309-332.

83. Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer, and R. W. Davis. 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1035-1039.

84. Sugawara, N., and J. W. Szostak. 1983. Recombination between sequences in nonhomologous positions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5675-5679.

85. Surosky, R. T., and B.-K. Tye. 1985. Construction of telocentric chromosomes in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2106-2110.

86. Sutcliffe, J. G.. 1979. Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasimid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77-90.

87. Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, and F. W. Stahl. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. Cell 33: 25-35.

88. Tanaka, T., and B. Weisblum. 1975. Construction of a colicin E1-R factor composite plasmid in vitro: means for amplification of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 121:354-362.

89. Toh-e, A., H. Araki, I. Utatsu, and Y. Oshima. 1984. Plasmids resembling 2-μm DNA in the osmotolerant yeasts Saccharomyces bailii and Saccharomyces bisporus. J. Gen. Microbiol. 130:2527-2534.

90. Toh-e, A., S. Tada, and Y. Oshima. 1982. 2-μm DNA-like plasmids in the osmophilic haploid yeast Saccharomyces rouxii. J. Bacteriol. 151: 1380-1390.

91. Toh-e, A., and I. Utatsu. 1985. Physical and functional structure of a

yeast plasmid, pSB3, isolated from Zygosaccharomyces bisporus. Nucleic Acids Res. 13:4267-4283.

92. Utatsu, I., S. Sakamoto, T. Imura, and A. Toh-e. 1987. Yeast plasmids resembling 2μm DNA: regional similarities and diversities at the molecular level. J. Bactriol. 169:5537-5545.

93. Vetter, D., B. J. Andrews, L. Roberts-Beatty, and P. D. Sadowski. 1983. Site-specific recombination of yeast 2-μm DNA in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7284-7288.

94. Weisberg, R. A., and A. Landy. 1983. Site-specific recombination in phage lambda, p. 211-250. In R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl, and R. A. Weisberg (ed.), Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

95. 改造される植物, p. 70-109, 藤巻宏, 鵜飼保雄（共著）, 培風館株式会社.

本論文に関係のある報告

1. Gene conversion associated with site-specific recombination in yeast plasmid pSR1.
   Hiroaki Matsuzaki, Hiroyuki Araki, and Yasuji Oshima.
   Molecular and Cellular Biology 8:955-962 (1988).
2. Chromosome engineering in Saccharomyces cerevisiae using a site-specific recombination system of a yeast plasmid.
   Hiroaki Matsuzaki, Ryoichi Nakajima, Junko Nishiyama, Hiroyuki Araki, and Yasuji Oshima. (投稿中)

謝　辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学工学部、大嶋泰治教授に衷心より謝意を表します。また、本論文の作成に際し、有益なる御助言と御教示を賜りました大阪大学工学部、岡田弘輔教授、山田靖宙教授、高野光男教授、菅健一教授、吉田敏臣教授、ならびに大阪大学産業科学研究所、二井将光教授に厚く感謝の意を表します。

さらに、本研究を遂行する過程において適切なる御助言をもって御指導頂きました大阪大学工学部　荒木弘之先生に深く感謝の意を表します。

本研究に対し、有益な御助言と激励を下さった大阪大学工学部　高田信男先生、原島俊先生、関達治先生に厚く感謝致します。

本研究に御協力下さった中西規之氏（鐘紡株式会社）、中島亮一氏（オリエンタル酵母株式会社）、西山淳子先生（大阪女子大学）、名田茂之氏に深く感謝致します。

合成DNA の作製に際し、御指導頂きました大阪大学工学部　根来誠司先生、菌株を供与して頂きました大阪大学理学部　小川英行教授、プラスミドを供与して頂きました東京大学医科学研究所　山本正幸先生に深く感謝致します。多種類のプラスミドを提供して頂きましたAmornrat Jearnpipatkul博士、技術協力および実りある討論をして頂きました中出真嗣氏（現、小野薬品工業株式会社）に深く感謝致します。

吉田和哉先輩、黄龍逸氏、改正善彦氏（現、武田薬品工業株式会社）を初め、大嶋研究室の皆様には、種々の御助言、御激励を頂き、深く感謝致します。