



Title	大腸菌recA遺伝子とSOS機能の誘導
Author(s)	小川, 英行
Citation	大阪大学低温センターだより. 1980, 31, p. 1-4
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/9873">https://hdl.handle.net/11094/9873</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 大腸菌 recA 遺伝子と SOS 機能の誘導

理学部 小川英行 (豊中 4305)

研究分野が現在の様に分化してしまうと、自分の研究内容を他の研究分野の人に、少しでも正確に伝えようとする、それは大変な仕事であることに気がつきます。そこで少しでも導入を容易にしようとする、歴史的に説き起こすのが良い様です。しかし、十分な紙数があるわけではありませんし、例えば、順に説き起こしても、途中で読者を迷子にしまいそうな気がしますので、いっその事、一気に現場へ案内しようと思います。変な言い方ですが、そこで迷子になっていただく方が、まだましだろうという発想からです。

### 1. 遺伝的組換えと recA 遺伝子

こししばらく、われわれの研究室では、遺伝子の遺伝的組換えの分子機構を明らかにする研究を進めて来ました。生物材料としては、分子レベルで最も研究の行い易い、大腸菌とそれに感染するバクテリオファージを主として用いて来ています。遺伝学では、遺伝子を染色体上に位置づけたり、変異と置き換えたりする最も基本的な方法に、この遺伝子組換えを用いていますし、自然界では、親から子へ遺伝子が伝達される際に、祖父と祖母から由来した遺伝子の組合わせを固定化することが無い様に良く混ぜ合わせて子に伝える役割をしていると考えられます。このことは、ある環境変化が起っても、それに適応していける遺伝子の組合わせを用意して置くという可能性を持っているでしょうし、また別の視点からすれば、例えば人間一人一人の遺伝子組合わせが、一卵性双生児の場合を除けば、誰一人として同じではないということを保障しているとも言えます。

一方遺伝子組換えの現象を分子レベルで見ると、その本質は、遺伝子が一列に配列した DNA 分子が、細胞中で切断され、他の DNA 分子または自身の他の部分と繋がって新しい分子を作ることであると言っても良いと思います。どの部分で繋がるか、どの様な仕組を経て繋がるかによって、二つの DNA 分子の同じ部分を交換したり、挿入される結果になったり、また欠失することにもなります。これらの反応過程を支えているのが種々の酵素群で、DNA 鎖に切れ目を入れるもの、切れ目または末端から一本鎖を剥き出しにするもの、一本鎖の状態を保持させて置くもの、二本鎖のねじれを巻き戻したり、巻き込んだりするもの、一本鎖の剥き出し部分を埋めるもの、鎖に出来た切れ目を繋ぐもの等々、次第に良くわかって来ています。現在、これらの道具ともいえる諸酵素がどの様なやり方で細胞内で組換えを行なっているか調べられています。生体内での最も一般的組換え反応は、相同な部分の入れ替えですが、その際、1塩基にも間違いが生じない仕組で行われている筈ですし、またどの塩基物分でも起り得る筈で、それらを保障している仕組は何かということになります。最近では生体内

と同じ反応を試験管の中で再現することが、ポツポツ出来る様になって来て、その素過程が明確になって来つつあります。

この組換え反応と、現在盛んに行なわれている遺伝子組換え技術との違いは、後者は、本来、細胞が外来性のDNA分子を自身のとは区別して壊してしまう「制限酵素」の一群を利用して行うところにあります。この酵素はそれぞれDNA分子上の一定の塩基配列を認識して、その部位を切断するので、必ず切口が一定になりますし、一定の断片が得られます。この酵素を鋏として、DNAリガーゼという、DNA鎖の切れ目を繋ぐ酵素を糊として使って試験管内で組換えDNAをつくる事が出来ます。この方法は鋏の酵素が4～6個の塩基配列を認識するのに頼るため、本来断片単位の不連続的な組換えしか出来ませんが、繋ぐ反応は断片内部の塩基配列順序には全く無関係に出来るので、人工的DNA分子が自由に出来ます。

さて大分道草をくいましたが、ここでお話ししたい本題に入りましょう。この様な組換えの仕組の仕事をしている内に、大腸菌の変異で不思議な変異があるのに興味を持ちました。それはrecAと呼ばれる遺伝子変異で、組換えが全く出来ません。当然組換えに必要な道具の内の一つが欠けていると考えられるわけですが、不思議なことに、次の様に諸性質も一変しているのです。

- (1) 放射線に対して非常に感受性になっている。
- (2) DNA分子に損傷が起きたときに、はじめて出現して来ると考えられる、DNA分子修復系が現れなくなっている。結果としてDNA分子の猛烈な崩壊が誘導される。
- (3) 突然変異が起こらなくなっている。
- (4) 溶原化したファージのリプレッサーが壊れなくなっている。つまりファージの誘発現象が見られない。

等々です。(最近では、DNA損傷後起こる上記の様な反応にあずかる機能は、誘導されるSOS機能によって起こるといっている。)単一の遺伝子変化で、何故この様に見え無関係に見える諸性質が同時に変化するのか。今までにもその様な例はなく、その仕組みを知ろうということになったわけです。

## 2. recA遺伝子のクローニングとrecAたんぱく質の精製

recA遺伝子の種々の突然変異の性質から、recA遺伝子は、一つのたんぱく質を作っていることは間違いなさそうです。まずどんな性質のたんぱく質をつくっているのかを知ろうということになりますが、大腸菌といえども、約3,000個の遺伝子があるわけで、大部分がたんぱく質をつくっているとして、その中から一種類のたんぱく質を見つけ出すのは、むづかしい相談です。それでrecA遺伝子を含む小部分のDNA断片を大腸菌染色体(一本の環状DNA分子)から取り出して、その断片からつくられるたんぱく質を解析するという方法をとりました。具体的には大腸菌DNAの約 $\frac{1}{70}$ 位のDNAを持つ $\lambda$ ファージをrecA遺伝子の隣の遺伝子へ入り込ませ、誘発したときに間違ってrecA遺伝子を取り込んで来るものを遺伝的手法で分離するのです。一担recA遺伝子が $\lambda$ ファージに取り込まれてしまえば、そこからつくられるたんぱく質の同定や、recA遺伝子が断片上のどの部分にあるかを決めるのは、 $\lambda$ ファージが非常に良く分っているので簡単です。その結果recAたんぱ

く質は分子量約38,000ダルトン、recA遺伝子約1,000ヌクレオチド対の大きさであることがわかりました。次はいよいよrecAたんぱく質の性質を調べるわけですが、その為にはrecAたんぱく質を大腸菌から分離精製しなければなりません。しかし今分っているのは分子量だけですから、それを頼りに行くとすると、その量でも多くない限り不可能です。それでまず大腸菌にrecAたんぱく質を多量につくらせる工夫をしました。一つは大腸菌当りのrecA遺伝子の数を増してやることです。それには、一般にプラスミドと呼ばれ、大腸菌の細胞質部分に存在して、大腸菌の染色体とは独立に増殖できる小さな環状DNA分子を利用することです。このプラスミドの中には菌当たり通常約30分子存在しているものがありますから、これにrecA遺伝子を繋いでやれば普通の約30倍のrecA遺伝子を持つ菌が出来るわけです。果せるかなこの菌では通常の約50倍位のrecAたんぱく質を作っていることがわかりました。第二に大変都合なことには、しかも大変面白いことですが、recAたんぱく質の合成はDNAに損傷が起きると、急に多量に合成され始めるということがわかって来たことです。この菌では合成される、たんぱく質の約30%近くをrecAたんぱく質にすることが出来ました。こうなれば、その精製も大変に楽になり、硫酸分画とDEAEセルロース、ホスホセルロースなどのカラムを使って95%以上に精製することができました。そのたんぱくには次の様な性質がありました。

- (1) 非常に集合し易い性質がある。
- (2) DNA、特に一本鎖DNAには強く、ATP存在下で結合する。
- (3) 二本鎖DNAをほどいたり、より戻したりする活性がある。
- (4) 二本鎖DNAに相同な一本鎖DNAを取り込ませ、部分的に三本鎖のDNA(D-loop)を作る。
- (5) 一本鎖DNAの存在下でATPを分解する活性がある。

などです。これらはDNA分子との相互作用で起こる活性で、組換えとかDNA修復に関連したものと考えられますが、別のグループによって、

- (6)  $\lambda$ ファージのリプレッサーたんぱく質を分割してしまい、プロテアーゼ活性もある。
- ということがわかって謎を解く道筋が立てられる様になって来ました。

### 3. recA遺伝子の全塩基配列とrecAたんぱく質の全アミノ酸配列

遺伝子がクローニングされると、その塩基配列の決定も最近は比較的簡単に行なえる様になって来ました。Maxam-Gilbertの方法です。われわれはこの方法を用いてrecA遺伝子の全塩基配列を決定しました。mRNAの読みの開始は、試験管内でRNAポリメラーゼを用いて行い、その5'末部分の塩基の一次配列から決定しました。読まれたmRNAはrecAたんぱく質を合成させる情報を持つことを確認してあります。また、たんぱく質のN末端から5個のアミノ酸配列を決めて、recAたんぱく質の読み始めをDNA上に決めました。すると自動的にその後の全アミノ酸配列がDNA塩基配列から求められます。これが正しいことは、recAたんぱく質のアミノ酸組成がDNA塩基配列から求められたものと完全に一致することからも確認されました。表紙の図柄はrecA遺伝子の塩基配列とrecAたんぱく質のアミノ酸配列を表わしています。また、recA遺伝子のmRNA読み始め

部分の解析からは、mRNA合成の開始、つまりrecAたんぱく質合成の制御をしているたんぱく質（lexA遺伝子の産物）が相互作用をする場所もわかりましたし、開始部位は非常に効率良く、RNAポリメラーゼに読まれ易い構造であることもわかりました。またrecA遺伝子の終りには、mRNA合成終結の信号もあって、recA遺伝子だけが単独でいつも読まれていることがわかりました。

#### 4. recA遺伝子のSOS機能誘導のモデル

とうとう紙数も尽きて、説明なしで一跳躍した状態になってしまいますが、現在recA遺伝子にまつわる現象がどのように説明されるか大ざっぱにまとめて終りにいたします。

recA遺伝子の転写は、通常lexAたんぱく質に抑えられて、わずかしかなrecAたんぱく質は作られていません。しかしその量で組換えを行うには十分な量です。組換えに関与したrecAたんぱく質のはたらきは、2章で述べた様な活性がもたれていると思われます。一方DNAに損傷や合成阻害が起ると、DNAが部分的に少量壊れます。恐らくその崩壊産物とrecAたんぱく質が相互作用をすると、プロテアーゼ活性を発揮する様になると考えられます。そこでlexAたんぱく質が壊れ、ファージがあればそのリプレッサーなども壊れます。lexAたんぱく質が壊れるとrecAたんぱく質の合成が活潑に行なわれ、それがDNA損傷した場所、特に一本鎖部分に結合してDNAを保護し、修復合成を助けるものと思われます。ファージがあれば平行してその増殖も起り得るわけです。DNA損傷後誘導合成されて来る、DNA修復合成系も、恐らく同じ様にlexAたんぱく質で制御されていて、lexAたんぱく質が壊れると発現されると思われます。恐らくこの系が非常に変異を起こさせ易い修復を行うと考えられます。しかし何故変異を起こさせ易い系がわざわざ用意されているのか、それは、あるいは、異常事態の際には次の環境変化に備え、種々の変異を起こしておけば、その中でどれかが生き残る可能性が出て来るということなのかもしれません。また何故組換えに関与している遺伝子がこのSOS機能の誘導に関係していなければならないのか、まだ良くわかりません。が、いずれにしても生物の仕組みと言うのは、分ってくればくるほど、巧妙だなと感心させられます。30億年間連続して増え続けて来られたという歴史の重みがあるのでしょう。