©2024 筑波大学生物学類

大腸菌の様々な DNA 損傷修復系の欠損変異株に対する変異原の影響

竹森　友哉（筑波大学 生物学類）　　指導教員：鈴木　石根（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

窒素 N の安定同位体 ^{15}N で標識したプラスミドに陽子線を照射すると、非常に多くの変異が導入され、この変異の度合いは ^{15}N の標識率によって高まった[1]。しかし、この変異がどの様に DNA に損傷を与えているか、また大腸菌の DNA 損傷修復系で修復されているのかは不明であった。そこで、大腸菌の持つ DNA 損傷修復系を欠損させた変異株を入手した。陽子線の効果を調べるのに先立ち、UV を照射し、それらの生存率の変化を観察した。

大腸菌には大きく分けて、塩基除去修復・ヌクレオチド除去修復・ミスマッチ修復・相同組換え・DNA フォトリアーゼの 5 種の DNA 損傷修復系が存在する。塩基除去修復は、損傷塩基に特異的な酵素が損傷塩基を切り取ることで開始され、1 塩基分だけの DNA 合成を行い、DNA 鎖を結合して修復が完了する[2]。ヌクレオチド除去修復は、大きな DNA 損傷に対して働く[2]。塩基除去修復では 1 個の損傷塩基を切り出すのに対し、ヌクレオチド除去修復では DNA 損傷を含む 10 ヌクレオチド程度の DNA 断片が切り出される[2]。ミスマッチ修復は複製エラーの修復に関与するため、この修復系の遺伝子に欠損が生じると、自然突然変異頻度が大幅に上昇する[2]。相同組換えは、RecA タンパク質を中心に、タンパク質と一本鎖 DNA との複合体をつくり、相同鎖の対合を行う修復系である[2]。DNA フォトリアーゼは、DNA の損傷を光エネルギーを用いて修復する。これらのうち、ヌクレオチド除去修復・ミスマッチ修復・相同組換えは、細胞内に変異が蓄積されると誘導される SOS 修復に関与する[2]。

【材料・方法】

1.　遺伝子欠損変異株の作出

国立遺伝学研究所の大腸菌のバイオリソースの Keio コレクションの中から、DNA 修復に関連する遺伝子の欠損変異株を 13 株入手した。Keio コレクションの株では、カナマイシン耐性遺伝子の置換によって標的遺伝子が破壊されているが、将来的にカナマイシン耐性を持つプラスミドを ^{15}N で標識し、大腸菌に導入するため、染色体上のカナマイシン耐性遺伝子を外す必要があった。そこで組換え酵素遺伝子を含むプラスミド pBAD_Flp を形質転換し、アラビノースで相同組換え酵素を誘導し、カナマイシン耐性遺伝子を欠失した株を作出した。その後、温度感受性の複製起点を持つ pBAD_FLP は、37℃で培養し脱落させた。

耐性遺伝子を欠失した後の株と、耐性遺伝子を持つ Keio コレクション株と野生株から抽出した DNA を鋳型とし、標的遺伝子の両端から約 200 bp ずつ離れた位置に設計したプライマーを用いて PCR 反応を行って標的遺伝子領域を増幅させ、電気泳動により分離した。その結果、カナマイシン耐性遺伝子の脱落が確認できたもののうち、5 種類の修復系に関わる遺伝子の変異株を一つずつ選び、それらを以降の実験で用いた。

2.　UV 照射

1.の実験で得られた 5 種の欠損変異株と、Keio コレクションの宿主株である BW25113 株に対し、クリーンベンチ内の UV 殺菌ランプ（波長 253.7 nm, UV 照射強度 51 μW cm^{-2}）を、LB 培地で培養した培養液を 1.0×10^{8} cells mL^{-1} に希釈し、直径 7 cm のシャーレに 5 mL 入れて UV 照射した。それらの細胞に 0、1、5、10、30、60 分間 UV を照射し、それぞれを 10^{5} 倍あるいは 2×10^{4} 倍希釈し、50 μL ずつ 3 枚の LB 寒天プレートに植菌した。37℃で一晩培養し形成されたコロニーを数え、未照射のプレート上で形成されたコロニー数の平均を 100 %としたときの、それぞれのプレートでのコロニー形成率を細胞生存率とし、照射時間と生存率、及び変異した遺伝子と生存率の関係を考察した。

【結果と考察】

1.　遺伝子欠損変異株の作出

13 の変異株のうち、7 つの変異株のカナマイシン耐性遺伝子が抜け落ちていることが確認できた。5 つの DNA 修復系全てについて少なくとも 1 つ以上の変異株で、想定された欠損株を得ることができた。

2.　UV 照射による影響

変異株と野生型の生存率を比較すると、変異株の生存率は野生株に比べて低くなった（図）。また、野生株と DNA フォトリアーゼの欠損株では照射開始直後に顕著な生存率の低下が起こり、その後一旦回復し、その後は照射時間につれて生存率は低下した。一方でミスマッチ修復系を欠き SOS 修復の起こらない株では、照射時間が長くなるにつれて生存率が漸減した。

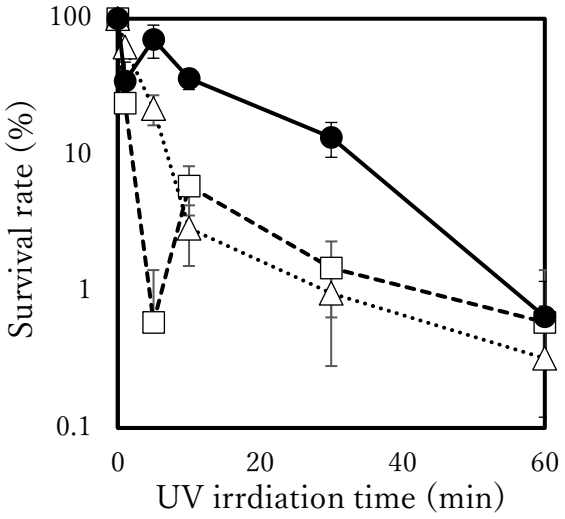


図. UV 照射時間と細胞生存率の関係　UV を野生型(●)，DNA フォトリアーゼ欠損株(□)，ミスマッチ修復欠損株(△)に照射した時の各株の生存率の変化

【今後の展望】

今回は、変異原として UV のみを用いて実験を行ったが、将来的な ^{15}N 標識プラスミドの導入と陽子線照射を踏まえ、培養液を真空状態に封止し、その際の生存率の変化および損傷修復系による違いを観察したいと考えている。

【参考文献】

[1] Yang T, University of Tsukuba, Ph.D. thesis (2023)
[2] Katarzyna H M et al. Environ Mol. Biol. 60, 368-384 (2019)