

2
学位申請論文

大腸菌の可視光感受性変異株に関する研究

中東憲治

要旨

可視光に感受性(致死)の大腸菌変異株について、主として分子遺伝学的な手法により、変異株の性質を解析すると共に、光感受性のメカニズムを研究した。

最初に分離された *visA* 変異株は、可視光照射下で生存できず、蛍光灯を光源として、約7500 lxの光線にさらした場合、2時間後には生存率が約1/10となる。塩基配列の比較により、*visA* 遺伝子は、ヘム生合成の最終段階で、プロトポルフィリンIXをヘムに変換するフェロケラターゼをコードすると予想した。本研究では、*visA* 遺伝子を欠失した変異株の解析により、*visA* 遺伝子がフェロケラターゼをコードするという確証を得た。また、欠失株から分離した光抵抗性の復帰株を解析し、ほとんどの変異がヘム生合成系の遺伝子であることを明かにした。このことから、*visA* 変異株の光感受性はフェロケラターゼの基質であるプロトポルフィリンIXが細胞内に蓄積する為であると結論した。

また、*visA*⁺/*visA*⁺ 部分2倍体より、新たに光感受性を示す *visB* 変異株を分離した。*visB* 変異株は *visA* 変異株に比べて弱い光感受性を示す。*visB* 遺伝子をクローン化して塩基配列を決定した後、予想されたアミノ酸配列を解析して、VisB蛋白質がFADを含むモノオキシゲナーゼであると推測した。*visB* 遺伝子は大腸菌染色体の63分付近にマップされたが、この付近に位置する遺伝子の内、*ubiH* がフラビンを含むモノオキシゲナーゼであると考えられていたので、*visB* 遺伝子を欠失した株を作成し、表現型が *ubiH* 株に相当することを確認した。また、*ubiH* 株の表現型は *visB* 遺伝子によって相補できることも分かったので、*visB* が *ubiH* と同一の遺伝子であると結論した。*visA* 株と同様、*visB* 変異株の光感受性についても、生合成の中間体の蓄積によるものと推測した。

visB 遺伝子の直後には、アミノ酸レベルで約30%の相同性を持つ遺伝子(*visC*)が存在した。この遺伝子はユビキノン合成に必須ではないが、*visC* 遺伝子を欠失した大腸菌はやはり光感受性を示した。

*visA*変異株も*visB*変異株も酸素分子のない条件では光感受性を示さないので、光照射によって何等かの活性酸素種が発生していると考えた。酸素分子から直接発生する活性酸素としては、スーパーオキシド、過酸化水素、一重項酸素が挙げられる。光照射を受けた*vis*変異株の細胞中でどの分子種が発生するかを調べるため、前の2者によって誘導を受ける遺伝子が光照射によって影響を受けるかどうかを調べた。しかし、どの遺伝子に関しても特異的な誘導は観察できなかった。このことから、これらの光感受性株では、一重項酸素が致死の原因になっているのではないかと考えられる。

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	材料と方法	6
第 3 章	実験結果	13
第 1 節	<i>visA</i> 変異株の解析	13
a)	<i>visA</i> 株の光感受性	
b)	<i>visA</i> 遺伝子のヘム生合成への関与	
c)	$\Delta visA$ 株からの光抵抗株の分離とその解析	
第 2 節	<i>visB</i> 変異株の解析	22
a)	<i>visB</i> 変異株の分離	
b)	<i>visB</i> 遺伝子のクローニング	
c)	<i>visB</i> 遺伝子の染色体の位置	
d)	<i>visB</i> 遺伝子近傍の遺伝子構成	
e)	プロモーターのマッピング	
f)	VisB蛋白質の機能	
g)	<i>visB</i> 株の光感受性のメカニズム	
h)	<i>visC</i> 遺伝子の機能と光感受性への関与	
第 3 節	光感受性と酸素	36
a)	酸素分子の必要性	
b)	<i>visA</i> , <i>visB</i> 株で発生する活性酸素種	
c)	<i>vis</i> 変異株の光感受性に対する抗酸化剤の効果	
第 4 章	考察	45
第 1 節	<i>visA</i> 変異	45
a)	VisA蛋白質の機能	
b)	<i>visA</i> 株で光増感剤となる物質	
第 2 節	<i>visB</i> 変異	49
a)	VisB蛋白質の機能	
b)	<i>visB</i> 株で光増感剤となる物質	
c)	<i>visC</i> 変異	
第 3 節	光感受性と活性酸素の関係	52
第 4 節	まとめ	54
謝辞		55
参考文献		56

第I章 序論

光合成によって蓄積される光のエネルギーは、生物にとって根源的なエネルギー源であり、ごく僅かな例外を除けば、生命活動は全て光のエネルギーによってまかなわれている。また一方で、光は主要な感覚の媒体となり、行動の指針を与える。さらに進化した生物には、自らの目的のため発光するものさえある。

すでに、生命の発生する時点において、太陽光の照射により引き起こされる様々な反応が化学進化に重要な役割を果たしたと考えられている。また、その後の生物の進化にも、光を有効に利用する方向へと進む流れがつねに存在してきたのは明かである。しかしながら、生物にとって光は常に優しい存在だったわけではない。いったん誕生した原初の生命にとって、光線により引き起こされる化学反応は致命的なものであったと考えられ、致命的な影響を避ける方法を発達させた現在でも、光線による障害を完全に防ぐことは成功していない。むしろ、光合成にしても、視覚にしても、もともと細胞内で自然に起きる(多分有害であったであろう)光化学反応を、長い年代をかけ、有効な手段として進化させてきた結果獲得できたものに違いない。

光合成や視覚に関する研究は、光生物学、特に可視領域の分野で常に主流となるテーマであろう。確かに、高度に発達した光受容系と、それに呼応する機構は興味深く、しかも重要な研究テーマである。しかし、生物の光受容は複雑に発達した機構を常に必要とするものではない。様々な生物において、各々の光受容の必要性や体制の複雑度に応じた光受容器官が存在する。そのような、種々のレベルの光受容について知見を得ることは、高度な光受容を理解する上でも役立つに違いない。

大腸菌の様に、なんら特殊な光受容機構を持たないと考えられている生物でさえも、可視光を照射した際に普段とは異なる鞭毛運動を示すことが知られているので(Taylor and Koshland, 1975, Taylor *et al.*, 1979)、光照射を行動に結び付けるなんらかの機構が存在するのは確かである。また一方では、大腸菌の呼吸鎖の電子伝達が、光照射によって活性化されるという報告もある(Tiphlova and

Karu, 1990)ので、大腸菌の光応答機構を知ることは、視覚や光合成など、高等生物のもつ光受容機構のプロトタイプを知ることにつながるのかもしれない。

大腸菌の光応答のメカニズムを知ることを目的として、本研究を始めるにあたり、まず最初に考えたことは、可視光の有無によって発現量の変化するような遺伝子が大腸菌ゲノムから分離することであった。そこで、光を当てた条件と当てない条件で転写量の異なるようなプロモーターを含むDNA断片のクローニングを試みた。その結果、光によって活性が抑制されるような転写活性をもつDNA断片を、2クローン分離することができた(表I-1)。これらのDNA断片(Ls-1とLs-17)は染色体上の86分、8分に由来し、図I-1に示したように、前者からの転写活性は480 nm付近の青色光によって顕著に抑制されることが分かった。

しかし、どちらの断片からの転写活性も極めて弱いものであったため、活性調節の機構等について詳しい研究を行うには困難が予想された。そこで、転写活性が上昇し、かつ光感受性を失っていないような変異の分離を試みた。目的のような変異の分離そのものでは満足のゆく結果を得られなかったが、この過程で非常に興味ある変異(*visA* 変異)株を分離することができた。*visA* 変異を持つ大腸菌は、強い可視光の存在下では全く増殖することが出来ない。この変異が、光感受性の転写活性に直接関係したものであるかどうかは明かではなかったが、このような変異を起こす遺伝子について研究することが、光による転写活性の調節や、さらに進んで運動(鞭毛運動)の調節などを理解する糸口になる可能性があると考えられた。この現象は極めて明白に観察できるものであり、非常に扱いやすいことも分かったので、まずこの株の光感受性の解析を行うことにした。

比較的単純な生物が、強い可視光を浴びて死滅することは、この例が始めてではなく、以前から知られている。例えば、光合成細菌(*Rhodospseudomonas*, *Chromatium*)、好塩菌(*Halobacterium*)、藍藻(*Anacystis*)、緑藻(*Chlorella*, *Chlamydomonas*)等の光合成を行う単細胞生物が、可視光によって死ぬことがあると報告されている(Abeliovich and Shilo, 1972, Dworkin, 1959, Dundas and Larsen, 1963)。また、光合成を行わず、従って光とはあまり縁がない細菌(*Myxococcus*, *Corynebacterium*)についても同様の現象が観察されている(Burchard and Dworkin, 1966, Mathews and Sistrom, 1959)。高等生物ではあ

まり例がないが、遺伝的あるいは後天的な人間の光過敏症も、細胞レベルで見れば同じような現象と言えるであろう。

ここに挙げた例全てに共通することは、内在性、あるいは外部から加えた色素が光増感物質として働いた結果、障害が起きること、酸素の存在下でのみ起きることであり、このことから、「光酸化による死(photooxidative death)」と呼ばれている。しかし、人間の光過敏症に関する研究を除けば、これまで光感受性について行われた研究は顕微鏡的な観察や生化学的なものばかりで、分子遺伝学的な研究はない。

visA 変異株の光感受性を相補する遺伝子の塩基配列は既に決定されており、VisA 蛋白質は320アミノ酸からなるペプチドであることが明らかになっていた(Miyamoto *et al.*, 1991)。最近になって、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の HEM15 遺伝子の塩基配列が報告され(Labbe-Bois, 1990)、その産物がVisA 蛋白質と約28%の相同性を示すことが分かった。HEM15 遺伝子は酵母ミトコンドリアに存在し、ヘム合成の最終段階でポルフィリン環に鉄(II)イオンを挿入するフェロケラターゼをコードするので、*visA* 遺伝子も大腸菌のフェロケラターゼをコードしている可能性が強く示唆された。

本論文第III章、実験結果の第1節では、*visA* 遺伝子の機能を解析すると同時に、*visA* 変異株が光感受性を示す機構についても、分子遺伝学的な解析を行った結果を示す。

第2節では新たに分離した光感受性株について、*visA* 株の場合と同様の解析を行った結果を示した。

最後に、第3節では両変異株の光感受性と酸素の関係についての解析結果を示した。

表 I-1 転写活性の光による阻害

Plasmid	β -ガラクトシダーゼ活性	
	Light	Dark
pLY223-2	30.1	31.8
pLY223-2- Δ 22	0.18	0.16
pLYls-1	0.25	1.32
pLYls-17	0.21	0.72

表 I-1の説明

各プラスミドを持ったCA274 ($lacZ_{am} trp_{am}$)株をM9グルコース培地中、25°Cで培養し、対数増殖期に達した時点で、最終濃度5-mMのisopropyl- β -D-thiogalactoside(IPTG)を加え、さらに180分培養を続けた。トルエン処理の後、 β -ガラクトシダーゼの活性を測定した。

pLY223-2; pUC18にゼニゴケ葉緑体由来のアンバーサプレッサー-tRNA遺伝子をつないだプラスミド(Nakahigashi *et al.*, 1990)であり、ラクトースプロモーターによりサプレッサーが発現する。

pLY223-2 Δ 22; pLY223-2からラクトースプロモーター部分を欠失して作成した。

pLYls-1; pLY223-2 Δ 22のtRNA遺伝子の上流にLs-1断片をつないだプラスミドである。Ls-1断片からの転写によりサプレッサーが発現する。

pLYls-17; pLY223-2 Δ 22のtRNA遺伝子の上流にLs-17断片をつないだプラスミドである。Ls-17断片からの転写によりサプレッサーが発現する。

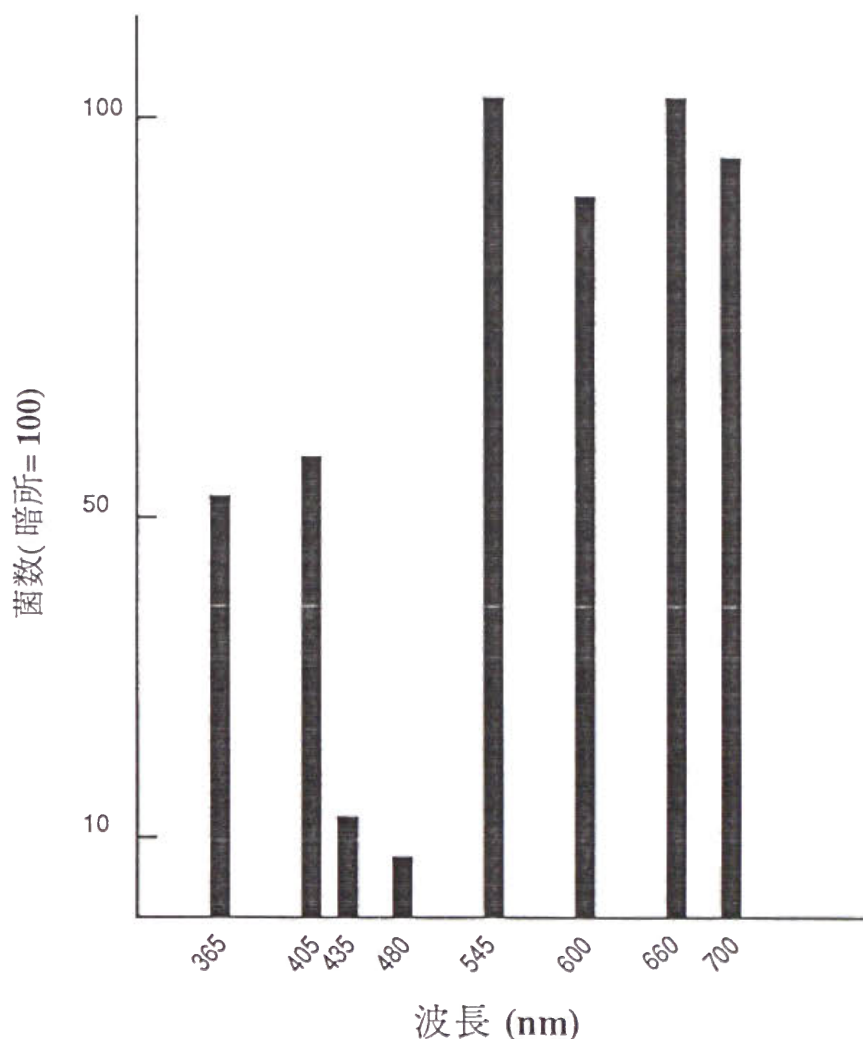


図 I-1 Ls-1断片からの転写活性の各波長の光線による阻害

pLYLs-1で形質転換したCA274 (*lac_{am} trp_{am}*)をM9ラクトース培地中で対数増殖期まで増やし、2mlづつ小型のペトリ皿(35x10mm)に分注した。30 KWキセノンランプからの光線を大型スペクトログラフ装置(Okazaki Large Spectrograph, Watanabe *et al.*, 1982)によって、単色光に分光し、減光フィルターを挿入して各波長とも 1.5×10^{15} 光子/cm²s⁻¹が照射されるように調整して、大腸菌サンプルに6時間照射した。この間、培養は25℃で行われた。照射後、LB培地上にサンプルを広げ、37℃、暗所で一晚培養した後、コロニー数を数えた。横軸は照射した光線の波長を、縦軸は非照射のコントロールを100とした菌数の比を示す。

照射によって転写活性が阻害される波長ではサブレッサー活性が減少するため、非照射のコントロールに比べて増殖が遅くなる。

第II章 材料と方法

a) 大腸菌株

本研究で使用した大腸菌株を表1に示す、これらは全て*E. coli* K12株由来である。VS011, VS111, VS551はP1トランスダクションにより、 Cm^R をマーカーとして、QC772からCA274, VS101, VS550に*sodA*'-'*lacZ*遺伝子を導入した株である。VS200はCA274の*visA*遺伝子の一部を欠失した株であり、VS201～VS216は、VS200を親株として分離した光抵抗性変異株のうちの一部である。VS560, VS561は、 Km^R をマーカーとして、VS005から、CA274, AN385に $\Delta visB: Km^R$ 遺伝子をP1トランスダクションにより導入した株である。VS600はP1トランスダクションにより、 Km^R をマーカーとして、VS006からCA274に $\Delta visC: Km^R$ 遺伝子を導入した株である。VS005, VS006はJC7623の*visB*, *visC*を $\Delta visC: Km^R$, $\Delta visB: Km^R$ で置き換えて作成した。なお、AN172, AN385はI. G. Young博士から分与された株である。

表 II-1 大腸菌株

A) 既に分離されていた株

菌株	遺伝子型	文献
CA274	<i>lacZ_am trp_am</i>	(Russell <i>et al.</i> , 1970)
AN172	<i>ubiH434</i>	(Young <i>et al.</i> , 1973)
AN385	<i>ubiA420 Sm^R</i>	(Alexander and Young, 1978b)
QC772	<i>sodA</i> '-' <i>lacZ Cm^R</i>	(Carlioz and Touati, 1986)
JC7623	<i>recB21 recC22 sbcB15 sbcC201 +*</i>	(Kushner <i>et al.</i> , 1971)

* *thr-1 ara-14 leuB6 Δ(gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 supE44 galK2 rac⁻ hisG4 rfbD1 mgl-51 rpsL31 kdgK51 xyl-5 mtl-1 argE3 thi-1*

B) 本研究で作成した株

菌株	関連した遺伝型、表現型	その他の遺伝型
VS011	<i>sodA'</i> - <i>'lacZ Cm^R</i>	<i>lac_am trp_am</i>
VS101	<i>visA1</i>	以下表示のない限り同様
VS111	<i>visA1 sodA'</i> - <i>'lacZ Cm^R</i>	
VS200	$\Delta visA$	
VS201	$\Delta visA hemA$	
VS206	$\Delta visA hemA$	
VS215	$\Delta visA hemA$	
VS217	$\Delta visA hemA$	
VS202	$\Delta visA hemB$	
VS203	$\Delta visA hemB$	
VS216	$\Delta visA hemB$	
VS207	$\Delta visA hemC$ or <i>hemD</i>	
VS281	$\Delta visA$ hemin permeable	
VS550	<i>visB103</i>	
VS551	<i>visB103 sodA'</i> - <i>'lacZ Cm^R</i>	
VS560	$\Delta visB: KmR$	
VS561	$\Delta visB: KmR} ubiA$	as AN385
VS600	$\Delta visC: KmR}$	
VS005	$\Delta visB: KmR}$	as JC7623
VS006	$\Delta visC: KmR}$	as JC7623

b) プラスミド

b1) pUC118

ベクタープラスミドとしては、主にpUC118(Vieira and Messing, 1987)を用いた。

b2) pHA1

*hemA*遺伝子(Li *et al.*, 1989)とその近傍を含む約1300-bpのDNA断片を、CA274株由来のDNAから、5'プライマー(CAACGTTGGTATTATTTC)、及び3'プライマー(GCAACGATAGAAGGCTTCAT)をもちいてPCRで増幅し、pUC118の*Sma*I部位にクローン化したプラスミドである。

b3) pVPシリーズ、pVKシリーズ

*lvisB1*に含まれる*Hind*III断片を*Pst*Iあるいは*Kpn*Iで分解し、各制限酵素断片をpUC118の対応するサイトにクローン化した。pVPは*Pst*I断片、pVKは*Kpn*I断片を含み、挿入された断片が長いものから順に1, 2, ...と命名した。

b4) pVB274

*visB*遺伝子とその近傍を含む約1900-bpのDNA断片を、CA274株のDNAから5'プライマー(CTTTCTTTATGCATGGCCTT)、及び3'プライマー(AACAGAGTGATATCTGAGCA)をもちいてPCRで増幅し、pUC118の*Sma*I部位にクローン化したプラスミドである。

b5) pKT1033

katG'-'*lacZ*融合遺伝子をプラスミドベクターpACYC184(Chang and Cohen, 1978)に挿入したプラスミドである(Tao *et al.*, 1989)。

b6) pHI201

5'の調節領域を含んだ*nfo*遺伝子の一部を、pMC1403(Casadaban *et al.*, 1983)に挿入したプラスミドである。なお、pKT1033とpHI201は米井修治博士から分与されたものである。

c) λ ファージ

c1) λ gt- λ C、Charon28

大腸菌ライブラリーの作成には、ベクターとして λ gt- λ C(Thomas *et al.*, 1974)、およびCharon28(Rimm *et al.*, 1980)を用いた(III-2参照)。

c2) λ visA

大腸菌染色体上約11分に由来し、*visA*遺伝子を含む3.5KbのEcoRI断片を λ gt- λ CのEcoRI部位の1つに挿入したファージである。

c3) λ visB1

III-2参照

c4)その他の λ ファージクローン

その他に使用した λ ファージクローンは全てKoharaらのライブラリー(Kohara *et al.*, 1987)に由来する。

d) 培養条件

通常、完全培地としてはLB培地を、最小培地としては、M9培地を使用した(Sambrook *et al.*, 1989)。硝酸イオンやフマル酸を電子受容体にする培地(NO₃培地、Fumalate培地)はIngledewとPoole(Ingledew and Poole, 1984)に従って合成した。また、培地には0.2%のグルコース、0.2%のラクトース、0.6%のコハク酸ナトリウム、各20 μ g/mlのアミノ酸、100 μ g/mlの5-アミノレプリン酸(ALA)、10 μ g/mlのヘム塩化物(ヘミン)を必要に応じて加えた。プレートの光照射は、40W 蛍光灯の下15 cm (約7500 lx、*visA*株の場合)あるいは7.5 cm(*visB*株の場合)にプレートを置くことによって行った。液体培養への照射はHoya-Schott (株) の" Cold Light"照射装置(HLS2151)を使った。暗所でのコントロールサンプルはアルミホイルで包み、同じ場所で培養を行った。

嫌氣的条件での培養には、試験官をシリコンゴムで密栓し、注射針を通して窒素ガスを送り込む事によって空気を完全に置換した。

他に記述がない限り、培養は37°C、好氣的条件、暗所で行った。

e) 大腸菌遺伝子の部位特異的な欠失、破壊

e1) λ ファージによる方法

プラスミド上で目的のDNA部分を欠失させ、att部位(*pop'*)を持たない λ ファージベクター(λ gt- λ C)に欠失遺伝子を再度クローン化した。この組換えファージを、挿入断片と染色体との相同組換えによって大腸菌に溶原化させた後、溶原菌から熱パルス法によってファージをキュアした。ファージを失った菌から欠失遺伝子のみ残している株を選抜した。

e2) JC7623株(*recB recC sbcB*)を用いる方法

プラスミド上で目的のDNA部分をTn903由来のカナマイシン耐性(Km^R)遺伝子(Oka *et al.*, 1981)で置き換えた。プラスミドから Km^R を含む大腸菌DNA断片を切り出し、直鎖状態でJC7623株にトランスフォームした。生じたカナマイシン耐性菌から、ゲノムDNAが導入したDNAで置き代った株を選抜した。JC7623由来の株から目的の株へはP1ファージを用いて導入した。

e3) 欠失部位

実際に欠失に用いたDNA断片と欠失部位は図II-1の通りである。 $\Delta visA$ 株はe1)の方法で、 $\Delta visB$ と $\Delta visC$ 株はe2)の方法を用いて作成した。

全ての欠失変異はPCRによって確認した。

f) λ ファージクローンによる大腸菌変異の相補

λ ファージ液($>10^9$ p.f.u./ml)をLBプレート上に線状に引き、ファージ液が乾いた後、大腸菌一夜培養液をそれに交差して選択条件で培養を行った。

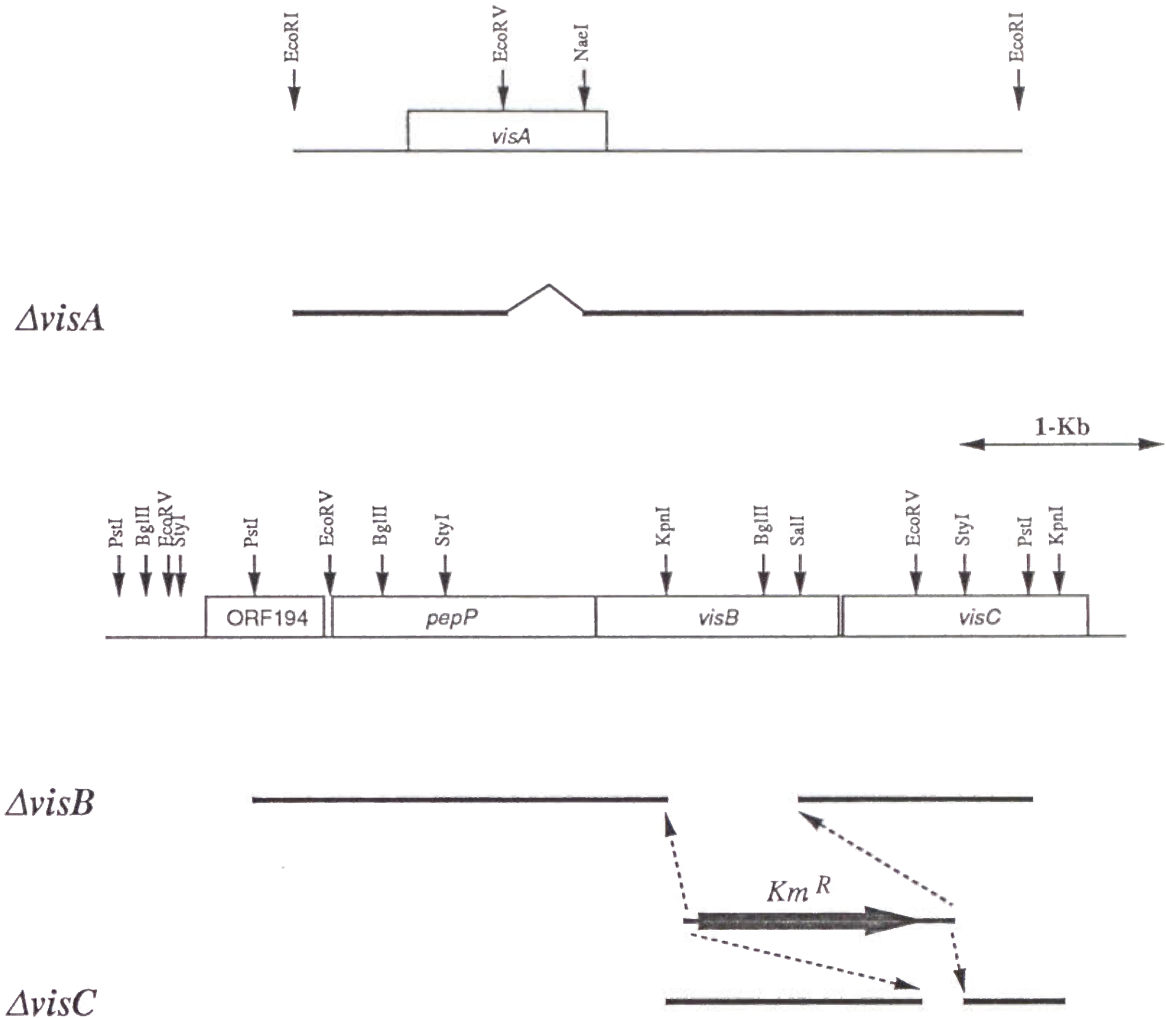


図 II-1 各欠失変異の欠失部位

*visA*及び*visB-visC*遺伝子付近の制限酵素地図の下に、各欠失変異を分離した際に使用したDNA断片と欠失させた部分を示した（太線で示した部分を使って染色体DNAとの交換を行った）。

$\Delta visA$; *visA*遺伝子を含む3.5-kbのEcoRI断片のうち、406-bpのEcoRV-NaeI断片をプラスミドクローン上で欠失し、改めて λ gt- λ Cにクローンした後、本文e1)に示した方法でクロモソームと置き換えた。

$\Delta visB$; *visB*遺伝子を含む4-kbのPstI断片から、662-bpのKpnI-SalI断片を欠失し、代わりにカナマイシン耐性遺伝子を挿入した後、プラスミドベクターから切り出して本文e2)の方法でクロモソームと置き換えた。

$\Delta visC$; *visC*遺伝子を含む2-kbのKpnI断片から、243-bpのEcoRV-StyI断片を欠失し、代わりにカナマイシン耐性遺伝子を挿入した後、プラスミドベクターから切り出して本文e2)の方法でクロモソームと置き換えた。

g) ポリアクリルアミドゲル中でのSOD活性の検出

対数増殖期後期の培養液から、Touati (Touati, 1983) に従って粗抽出液を調整し、熱処理を行わずに、非変性条件の10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動後、Elroy-Steinら(Elroy-Stein *et al.*, 1986) に従ってNBTとリボフラビンによる染色を行った。ゲル上でSOD活性を持つ蛋白質が存在する部分はNBTが青色に変化しないことからSODのバンドを検出できる。

h) シーケンシング

塩基配列の決定は*stepwise-deletion*法(Yanish-Perron *et al.*, 1985)によって作成した欠失プラスミドを用いる方法、及び、プライマーを合成して行う方法を併用した。PCRによって増幅した断片の場合、PCRによるエラーを防ぐため、独立に増幅したDNAに由来する最低2つのクローンを混合してシーケンシング反応を行った。反応にはSequenase™ Ver.2 Kit.(United states Biochem. Corp.)を用いた。

i) その他の方法

カララーゼ活性の検出は、菌体に直接30%の過酸化水素水を滴下し、発生する酸素ガスを観察した。

N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)による突然変異の誘発、P1ファージによる形質導入、 β -ガラクトシダーゼ活性の測定等はMiller (Miller, 1972) に従った。

大腸菌からのゲノムDNAやRNAの分離はAusubelら(Ausubel *et al.*, 1987)に従った。

クローニング、PCR、プライマーイクステンション他、基本的な遺伝子操作はSambrookら(Sambrook *et al.*, 1989)に従った。

第III章 実験結果

第1節 *visA*変異株の解析

a) *visA*株の光感受性

始めに分離された一連の光感受性株は、全て*visA*変異に属し、感受性の強さには僅かな差が見られるものの、どの株も蛍光灯下15 cm(約7500 lx)に置かれた場合に全くコロニーを形成しない。代表的な*visA*株(V S101)の光感受性を後に述べる株の感受性と共に図III-1、III-2に示した。*visA*変異株は光照射下で増殖が出来ないだけでなく、照射するに従って生存率が低下していく。

b) *visA*遺伝子のヘム生合成への関与

酵母のフェロケラターゼ(*HEM15*遺伝子産物)と、*visA*遺伝子の産物が高い相同性を示すことは、*visA*遺伝子が同じ機能を持つ酵素をコードすることを強く示唆する。また、大腸菌のフェロケラターゼの遺伝子(*hemH*)が、*visA*遺伝子がマップされている11分の付近にマップされている(Bachmann, 1990, Cox and Charles, 1973)ことも、この仮定を支持する。

フェロケラターゼが失われた場合、大腸菌はヘムを合成できないと考えられるので、ヘムを補欠分子として含む蛋白質は全て機能を失うはずである。そこで、代表的なヘム蛋白質である、シトクロム類やカタラーゼの活性の有無について調べてみた。シトクロムの存在の指標としては酸素呼吸能(コハク酸を唯一の炭素源とできるかどうか)を用い、カタラーゼについては菌体の活性を直接調べた。ところが、どの*visA*株もこれらの活性を有しており、ヘム合成能は(少なくとも完全には)失われていなかった。これらの株はVisA活性を部分的にしか失っていない可能性があるため、*visA*遺伝子の一部を欠失して、機能を全く失ったと思われる株(V S200)を作成した。V S200株はそれまでに分離されていた*visA*株に比べて、光照射をした際の生存率の低下はゆっくりしているものの(図

III-2b))、感受性を示す光の強度は同等であった。(光源からの同程度の距離で光感受性が現れた)。また、極端に増殖が遅く、0.1%のグルコースを加えたLB培地での分裂間隔は約80分であり、細胞濃度が約 2×10^8 cells/mlで定常状態に達する。

増殖速度からも予想されたが、 $\Delta visA$ 株は酸素呼吸能を完全に失っており、カタラーゼ活性も全く検出できなかった。次に、これが細胞内のヘム欠損によるものかどうかを調べることにした。

通常、大腸菌は細胞外からヘムを取り入れる事ができないが、突然変異によってヘムを取り込めるような株が出現する(Li *et al.*, 1988, Säsärman *et al.*, 1968)。そこで、NTGによって突然変異を誘発し、VS200からヘム透過性株(VS281)を分離した。図III-3に示したように、この株は培地中のヘミン(ヘム塩化物)濃度が上昇するに従って活発に増殖するようになり、10 mg/mlで野生株とほぼ同様の増殖率に達した。この結果から、VisA蛋白質がヘム合成に必須であると結論した。また、CoxとCharlesは、*hemH*株にはフェロケラターゼの基質であるプロトポルフィリンIXが細胞内に蓄積し、コロニーが赤色を示すと報告しているが(Cox and Charles, 1973)、 $\Delta visA$ 株は通常の大腸菌に比べ明かに強い赤色味を示すことも*visA*が*hemH*と同一の遺伝子であることを支持する。

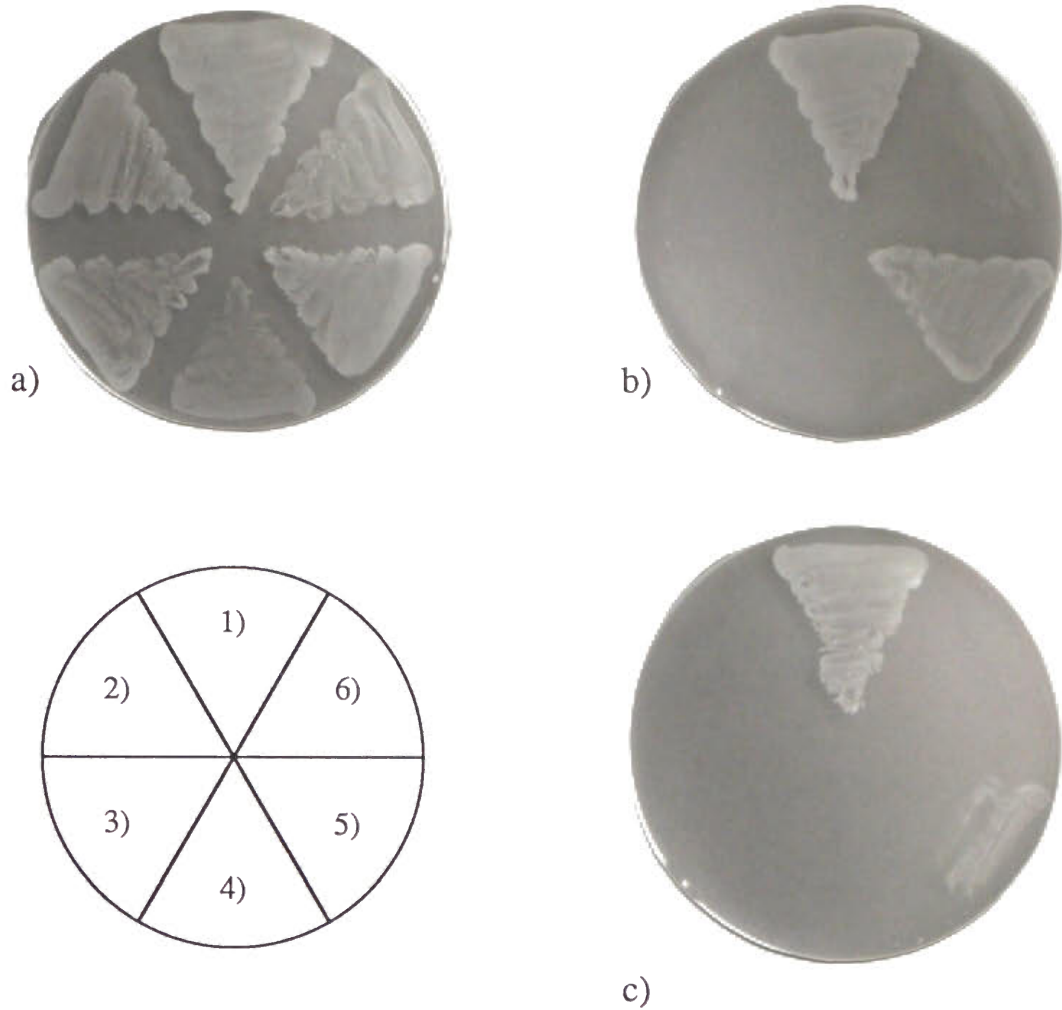


図 III-1 *vis*株の光感受性 1

LBプレート上に、白金耳を用いて各株の一夜培養液を扇状に広げ、37℃で一晩培養した。培養は、a)暗所、b)蛍光灯下15 cm、c)蛍光灯下7.5 cmで行った。

1) CA274(*vis*⁺)、2) VS101(*visA1*)、3) VS550 (*visB103*)、4) VS560($\Delta visB$)、5) VS600($\Delta visC$)、6) VS551(*visB103 sodA*⁻)

a) VS560が増殖が遅い以外は差は見られない。

b) CA274, VS600は殆ど影響を受けていないが、VS550, VS551は僅かに見られるのみであり、VS101, VS560は全く増殖していない。

c) CA274に影響は見られないが、VS600はかなり増殖を阻害され、他は全く増殖していない。

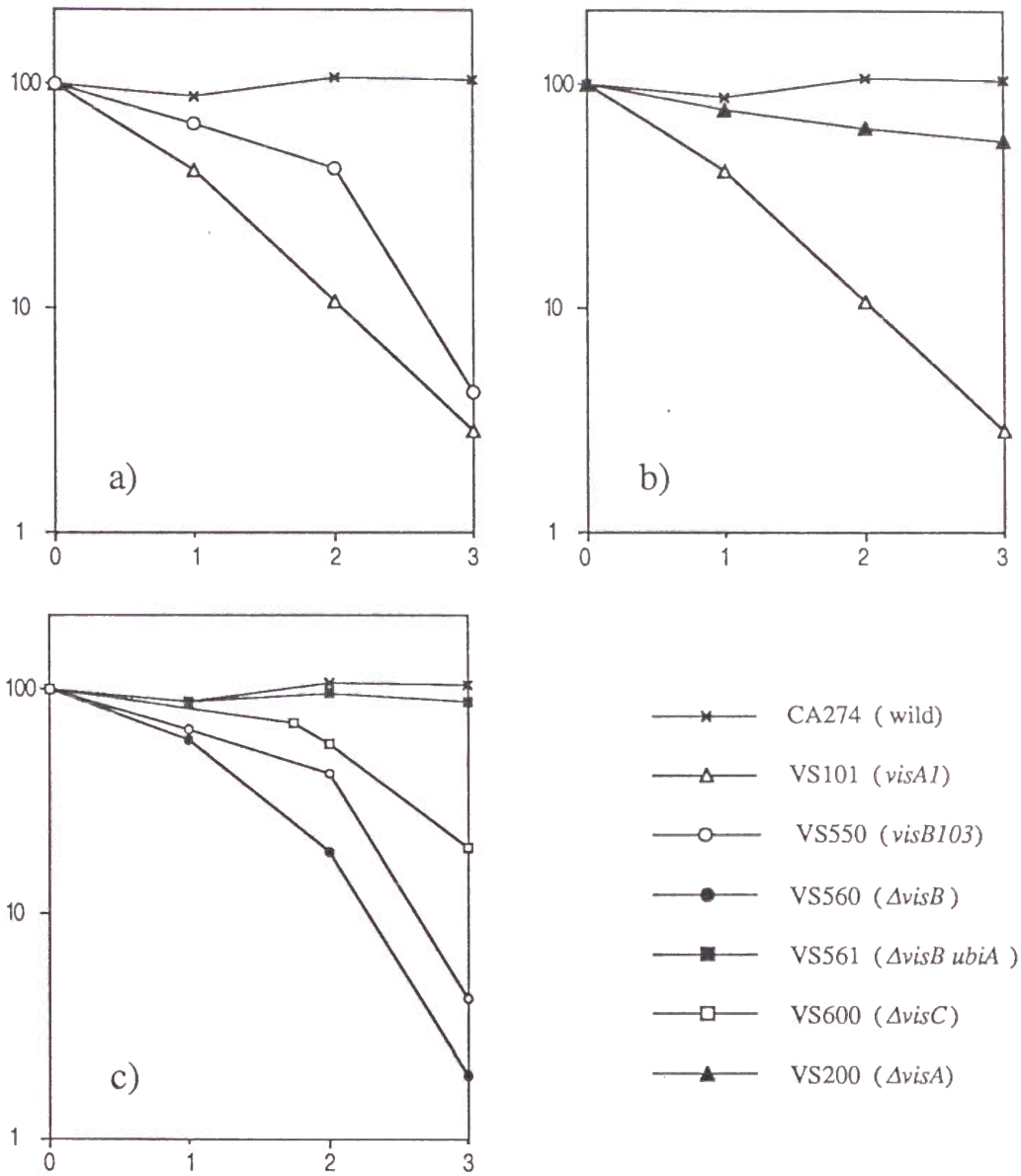


図 III-2 *vis*株の光感受性 2

各株の一夜培養液を適当に希釈してプレートに広げ、一定の時間、蛍光灯下15 cmにさらした後、暗所でコロニーを作らせた。横軸には照射時間を、縦軸は(照射時間0の値を100とする)生存率を示した。

- a) 野生株と *visA*株 *visB*株を比較した。
- b) *visA*株と $\Delta visA$ 株を比較した。
- c) *visB103*株、 $\Delta visB$ 株、 $\Delta visC$ 株を比較した。

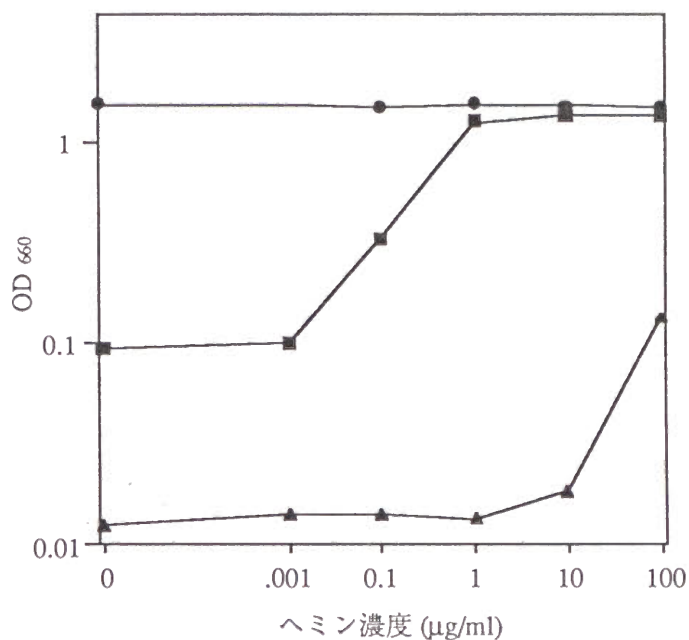


図 III-3 $\Delta visA$ ヘム透過性株のヘムに依存した増殖

各株の培養液をヘミンを添加したLB培地中で、 OD_{660} が0.01になるよう希釈した。6時間培養を行ったのち、再び OD_{660} を測定し、培地のヘミン濃度に対してプロットした。

●, CA274 (vis^+); ■, VS281 ($\Delta visA$ ヘム透過性); ▲, VS200 ($\Delta visA$)

VS200株はVS281に比べ、ヘミンを加えない場合にも増殖が遅いが、これは一夜培養液の段階で活性が落ちているためと考えられる。また、100 $\mu\text{g/ml}$ でわずかに増えているのは、通常の株も高濃度では多少ヘミンを取り込むためと思われる。

c) $\Delta visA$ 株からの光抵抗株の分離とその解析

光感受性の機構を明かにする目的で、*visA*株から新たな変異によって光非感受性になるような株を分離し、その変異の解析を試みた。真の復帰変異や遺伝子内サプレッサー変異を避けるため、親株として*visA*遺伝子を欠失したVS200を用い、NTG処理の後に、多数の光抵抗株を得た。このうち独立に分離した73株を使用して以下の解析を進めた。これらの光非感受性株は、何れも親株であるVS200とほぼ同様の遅い増殖速度を示し、またカタラーゼ活性も持たないので、ヘム合成能が回復していないのは明かである。また、親株のVS200は、*visA*遺伝子をクローン化した λ ファージ($\lambda visA$)を溶原化することで呼吸能を回復し、野生株と同様の増殖能を示すようになるが、分離した光抵抗株では、 $\lambda visA$ を溶原化しても、どの株も増殖に変化は見られない(図III-4 a))。このことから、これらの株は*visA*の他にも呼吸機能になんらかの関係がある遺伝子を欠損していることが分かった。また、何れの株もVS200のような赤色を示さないことから、フェロケラターゼ以前のステップでヘム生合成に働く酵素が欠損しているのではないかと推測した。そこで、ヘム合成の中間体のうち、細胞膜をよく透過する5-アミノレブリン酸(ALA)を培地中に加え、再度 $\lambda visA$ による相補実験を行った。図III-4 b)に一例を示したように、この条件では73株のうち43株が増殖能を回復した。この結果から、これらの株がALA合成より前のステップに機能するヘム合成酵素のうち、何れかを欠損していることものと推察できる。図III-5に大腸菌のヘム生合成経路と、各段階を触媒する酵素を遺伝子名で示すが、これらの遺伝子群のうち、*hemA*、*hemB*、および*hemC*と*hemD*を含むオペロンについては既に塩基配列が報告されている(Li *et al.*, 1989, Li *et al.*, 1988, Sasarm an *et al.*, 1987)。そこで、染色体上にマップされた位置と、塩基配列から作成した制限酵素地図を基に、小原らの作成した大腸菌関連ライブラリーのうちから、これらの遺伝子がのったクローンを選び出した。*hemA*遺伝子を含むクローン4D10と $\lambda visA$ を光抵抗株に共感染し、2重溶原菌が増殖能を回復するか否かを調べた。その結果、先の実験でALA依存性を示した48株中の46株が増殖率を回復した(図III-4c))。一方、ALA依存性を示さなかった株の中

<実験結果>

にそのような株は存在しなかった。さらに、その中から無作意に2株を選び、4D10に含まれるゲノムDNAのうち、*hemA*遺伝子部分のみをクローン化したプラスミド(pHA1)で形質転換したところ、プラスミドを持つ菌は λ *visA*のみの溶原化によって増殖率を回復した。従って、これらの株の新たな変異部位は*hemA*遺伝子であると結論した。一方、*hemB*遺伝子を持った8F10、*hemC-hemD*オペロンを持った12G1ファージを用いて同様の実験を行った場合、ALA依存性を示さなかった株のみから各々16株、3株に増殖率の回復が見られたので、これらの株の新たな変異部位は各クローンに含まれる*hemB*あるいは*hemC-D*遺伝子にあると考えられた。

尚、残りの6株のうち2株については、現在までにクローン化されていない*hemE*遺伝子の変異であるという有力な証拠を得ている。 これらを合計すると、光感受性の Δ *visA*株から分離した73株の光抵抗株のうち、少なくとも67株については、その新たな変異部位は何れかの*hem*遺伝子にあることが分かった(図III-5)。このことから細胞中のヘムの存在と光感受性には関係がないことが示唆される。また、これらの遺伝子産物の機能が失われた変異株が光抵抗性を示す理由としては、フェロケラターゼが触媒する反応(プロトポルフィリンIXからヘム)以前でヘム生合成が停止した結果ではないかと考えられる。

Δ *visA hemA*の2重変異株は、培地中にALAを加え、HemA蛋白質の機能をバイパスした条件では光感受性を示すという結果もこの仮説を支持する。

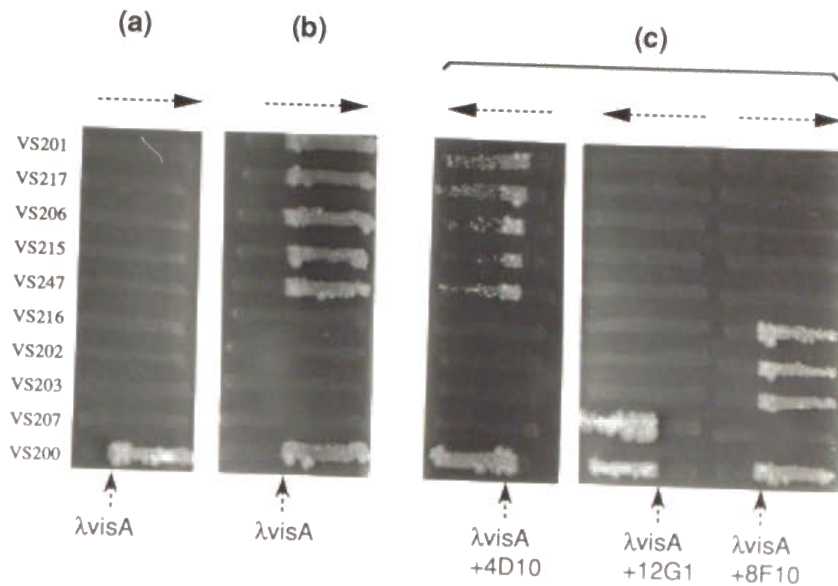


図 III-4 光抵抗性、復帰変異株のλファージクローンによる相補

VS200 ($\Delta visA$)とそれから分離した一連の光抵抗株に対して、*visA*及び*hem*遺伝子を持つλファージクローンを交差し、呼吸欠損が相補できるかどうか調べた。分離した73の抵抗株のうち、6株についてのみ示す。

- a) *visA*遺伝子を含むλ*visA*のみを交差した。
- b) a)と同じ条件だが、LBプレートに100μg/mlのALAを加えた。
- c) λ*visA*と他の*hem*遺伝子を含むファージを混合して交差した。

λ*visA*と共感染した小原ファージのうち、4D10は*hemA*遺伝子、8F10は*hemB*遺伝子、12G1は*hemC*と*hemD*のオペロンを含む。

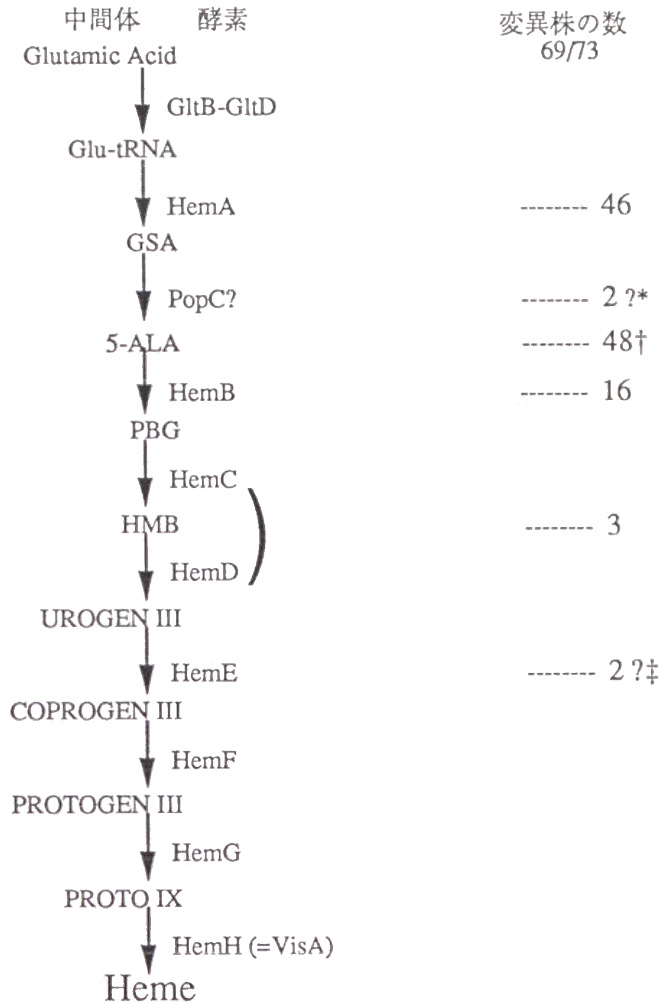


図 III-5 ヘム生合成経路と光抵抗性復帰株の変異部位

大腸菌におけるヘム生合成経路とともに各ステップを触媒する酵素を遺伝子名で示した。さらに、光抵抗性復帰株うち、これらの遺伝子の変異と考えられたものについて、その数を示した。?を付けたものについては、まだはっきり分かっていない。

中間体の正式名称は、GSA, glutamate-1-semialdehyde; 5-ALA, 5-aminolevulinic acid; PBG, porphobilinogen; HMB, hydroxymethylbilane; UROGEN III, uroporphyrinogen-III; COPROGEN III, coproporphyrinogen-III, PROTOGEN III, protoporphyrinogen-III; PROTO IX, protoporphyrine-IXである。また、酵素の名称は、GltB-GltD, glutamyl-tRNA synthetase; HemA, glutamyl-tRNA dehydrogenase; PopC ?, GSA aminotransferase (この酵素をコードする遺伝子についてはまだはっきり分かっていない); HemB, ALA dehydratase; HemC, PBG deaminase; HemD, urogen cosynthase; HemE, UROGEN III dehydratase; HemF, COPROGEN III oxidase; HemG, PROTOGEN III oxidase; HemH(=VisA), ferrochelatase

* 5-ALAで相補できる48株の内、hemA変異でない2株については、この変異である可能性が高い。

† 5-ALAを加えることによって変異が相補できる株。

‡ (Nishimura K. *et al.* personal communication)

第2節 *visB*変異株の解析

a) *visB*変異株の分離

VS101株が分離された後、NTGを用いて光感受性の大腸菌変異株を多数分離したが、それらの株は何れも *visA* 遺伝子を含むプラスミドやファージによって相補され、*visA* 遺伝子の変異株であることが分かった(Miyamoto *et al.*, 1991)。これまで分離された *visA* 変異は全て劣性であるから、*visA* 遺伝子が2倍体になった株を作成し、この株から新たな変異株を分離すれば、別の遺伝子の変異によって光感受性になった株を得る確率が高くなるはずである。そこで、CA274株に λ *visA*を溶原化し、*visA* 遺伝子の部分2倍体とした大腸菌を親株として、NTGによる突然変異誘発を行い、光感受性株の選抜を行った。その結果、*visA* 遺伝子によって相補することのできない変異を1株得た。この株をVS550、変異を支配する遺伝子を *visB* と命名した。

VS550の光感受性は、いくつかの点で一連の *visA* 変異株とは異なっていた。最も重要な違いは、この株を完全に死滅させるには *visA* 株の場合より強い光を必要とすることである。プレート上で培養する場合、蛍光灯下15cmでは、これまで分離した *visA* 株は全くコロニーを形成できないのに対して、VS550では僅かに増殖が見られた(図III-1)。そのため、バックグラウンドを完全に無くすには、通常の培養を蛍光灯下7.5cmで行う必要があった。蛍光灯によるVS550の致死曲線を代表的な *visA* 株(VS101)と共に図III-2a)に示した。VS550の紫外線耐性や熱耐性についても調べたが、野生株との違いは見られなかった。

b) *visB* 遺伝子のクローニング

visB 遺伝子をクローン化する目的で、CA274株のゲノムライブラリーを作成した。ベクターとしては λ gt- λ c及びCharon 28を用い、それぞれEcoRIとHindIIIにより完

全分解したゲノムDNAを使って 10^5 , 10^7 の独立したクローンを得た。これらのクローンのうちに*visB*遺伝子を含むものがあれば、VS550株に溶原化した場合に光感受性を相補するはずである。しかしながら、これらのベクターは何れも単独で溶原化できないため、実際にはVS550にヘルパーとして野生型の λ ファージを溶原化し、その溶原菌にライブラリーを追感染した。その結果、Charon28で作成したライブラリーから目的のクローンを数個得ることができ、このうち1つ(λ visB1)を以後の解析に使用した。

c) *visB*遺伝子の染色体上の位置

λ visB1は約12-kbの大腸菌DNA断片を含んでいた。この断片の一部をプローブとして、小原らの作成した大腸菌整列クローンのサブセットに対するハイブリダイゼーションを行ったところ、染色体上約63分に相当するクローン、22H4(468), 5E11(469), 10B4(470)にシグナルが認められた。さらに、 λ visB1に含まれるDNA断片の制限酵素地図を作成して小原らのものと比べたところ、両者はよく一致する事が分かった。次に、この領域を含む小原らのファージクローン22H4~6C5 (468~472) でVS550の光感受性を相補できるかどうか調べてみたところ、10B4(470)のみにこの活性がみられた。ハイブリダイゼーション及び相補実験の結果を図III-6a)に示した。*visB*変異株の相補実験によって、*visB*遺伝子は10B4のみに含まれ、両脇の5E11や1A2には含まれない狭い領域に存在することが明かとなったので、*KpnI*及び*PstI*を使って λ visB1上のDNA断片をプラスミドにサブクロニングし、より短いDNA断片を用いて相補実験を行った。図III-6b)に示す通り、*KpnI*では約2-kbの断片上に、*PstI*では約4-kbの断片上に*visB*遺伝子があることが示唆された。

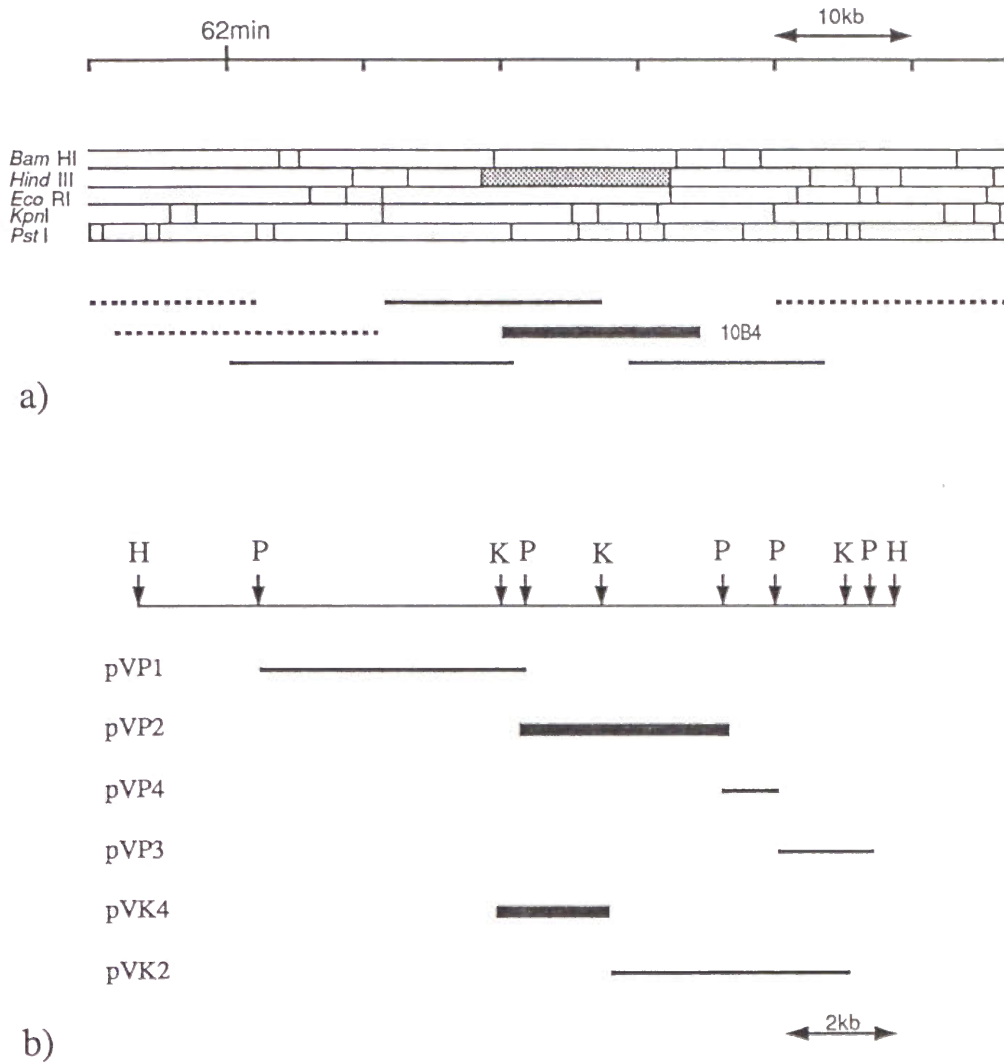


図 III-6 *visB* 遺伝子のマッピング

a) 染色体62～63分部分の制限酵素地図(中段)と、小原クローンに含まれるDNA断片が由来する部位(下段)を対応させた(Kohara *et al.*, 1987を改変)。制限酵素地図中、網目で示したHindIII断片がλvisB1に含まれていた。λクローンのうち、実線で示したものはλvisB1と共通する配列を含み、太線で示したクローン(10B4)は*visB*変異株の光感受性を相補することができた。

b) λvisB1由来のHindIII断片上のKpnI、PstI切断部位(上段)と、各切断断片を含むプラスミドによる*visB*変異株の相補を示した。実線で示した部分のDNAを含むプラスミドのうち、太線で示したものは*visB*変異株の光感受性を相補することができた。

H, HindIII; K, KpnI; P, PstI

d) *visB* 遺伝子近傍の遺伝子構成

visB 遺伝子の一次構造を調べるため、2-kbの*KpnI*断片について塩基配列を決定し、この断片中のオープンリーディングフレーム(ORF)を検索したが、2つのリーディングフレーム（各々、5'末端と3'末端が断片上には含まれていなかった）が存在したのみで、その他には蛋白をコードすると思われるような完全なORFは発見できなかった。しかしながら、塩基配列の決定の際に用いた欠失プラスミドや*PstI*断片による*visB*株の相補実験から、5'末端を欠いたリーディングフレームが*visB* 遺伝子である可能性が高いと判断した。そこで、*KpnI*断片の周辺についても更に塩基配列を決定し、2つのリーディングフレームがORFであることを確認した。野生株に由来し、*visB* 遺伝子と思われるORF部分のみを含んだプラスミド(pVB274)は、予想どおり、VS550株を光抵抗性にする活性を持っていた。以上の結果から、このORFが*visB* 遺伝子であると結論した。さらに、VS550株のDNAをクローン化し、*visB*領域の塩基配列を調べたところ、103番目のコドン(GGA)が(AGA)に置換していることが分かった。これにより起きるアミノ酸置換(グリシンからアルギニン)が光感受性変異の正体と思われた(図III-7, III-9参照)。(以後、この変異を*visB103*と表記する)

塩基配列を決定した約5-kbの領域中には、既に述べた2つのORFの他にも、より5'方向に2つのORFが続き、合計4つの遺伝子がオペロン(以下、*visB* オペロンと呼ぶ)をなしていると考えられた。後で述べる知見も含め、この領域の塩基配列と遺伝子の配置を図III-7に示した。*visB* オペロンを構成する遺伝子について簡単に説明する。

最も上流にあり、194アミノ酸からなるORFについては、遺伝子産物についての知見は得られていない。しかしながら、後で述べる転写開始点の直後のAUGコドンから始まり、このORFの終始コドンの次にあるAUGコドンが次の*pepP* 遺伝子のものであることから、何らかの機能を持つ遺伝子ではないかと考えている。

2番目のORFの産物についてデータベースとの検索を行ったところ、大腸菌のプロリンアミノペプチダーゼII (PepP)の配列(Yoshimoto *et al.*, 1989)と完全に一致

した。改めてDNAレベルで検索したところ、Yoshimotoらによって報告された *Pst*I-*Kpn*I断片の塩基配列は、*pepP*遺伝子のみでなく、上流部、下流部においても今回解析した塩基配列と完全に一致することが分かったため、2番目のORFは *pepP*遺伝子であると結論した。既にクローン化されていたにも関わらず、*pepP*遺伝子はこれまでゲノム上にマップされていなかったため、この遺伝子が染色体の63分にあることが本研究で始めて明らかになった。

先に述べた通り、3番目のORFは *visB*遺伝子であることがわかった。*pepP*遺伝子の3'末(...GCATGA)と *visB*遺伝子の5'末(ATGAGCG...)はGCATGAGCGという形で4塩基重複している。

4番目のORFの産物(400アミノ酸)とVisB蛋白質(396アミノ酸)にはアミノ酸レベルで約30%の相同性が見られるので、このORFを *visC*と命名した。この遺伝子についてはまた後で述べる。

さらに、*visB*オペロンの5'方向にある *Pst*I切断部位から上流は、6sRNAの遺伝子(*ssr*)を含む *Pst*I断片の塩基配列(Hsu *et al.*, 1985)と一致している。*ssr*遺伝子は反対鎖にコードされている。

e) プロモーターのマッピング

*visB*オペロンの転写開始点を解析するため、ORF194、*pepP*、*visB*遺伝子の5'末端部に相補的なオリゴDNAを合成し、大腸菌野生株から調製したRNAを鋳型としてプライマー伸長反応を行った。*pepP*や*visB*のプライマーを用いた反応では転写開始点と思われるシグナルは発見できなかったが、ORF194のプライマーを用いた反応では、開始コドンの22塩基上流にシグナルが見られた(図III-8)。この部分からさらに6塩基はなれて大腸菌のプロモーター-共通配列に似た領域(5'TGGTCC-17bp-TAGCAT3')が存在することから、この部分がmRNAの5'端に相当すると考えられる。

1 GTTAGTTTTTCGGTGATCGGACCTTGTTCAAAGTAACGGTGTGTTCTATGGTCTGCTGCAGCATCCGAAATACGGTGTTCATACTTCCCGCGTAGTCAACGAGTCTTTTGGCTTTTTCITGGCGG
121 TAACTCATAGCTGATATTCAAATCGGGCAATGAAGACCAACTGTTCAAGTATTTTGACTCTAGTGGGTTCTTTCAGATCTTCGAACCGTGGTTCAGATCGTCCGGCTGCCTGATTCAAACGG
241 ATCCCTTTGGTCAGCGGGGAGTTACACGCAGGTAAGCGGCCAAAATAATTGGATATCGACGGGTTGTGCACATGCCACCTTCCCTGCTGATTGACTGCGCTGCCTTCGTTTGTAGACCCC
361 ATGGTCTCGGAAGGGCGGACACTATAGCTACCCCTGATGAGAAGAGACAAGCCCTTTTCTGGTCCACCAGGGGCCAAAAGTGGTAGCATATCATGAAATATTCCTCCCTTTCACGACGAATGC
-35 ----- 5'aatatt..... ORF194 M L
-10 -----
481 TTATGCTATACAGAACGAAATGCCTGGTTACAACGAAATGAACCCAGTATCTGAACCAACAAGGGACGGGTTGACCCACAGCTGAGATGCATGGTTAATCAGCGGGATGATATGTGGCG
M S I Q N E M P G Y N E M N Q Y L N Q Q G T G L T P A E M H G L I S G M I C G G
601 GTAACGATGACAGCTCATGGCTACCGCTACTTTCACGACCTGACGAACGAGGATGGCTTTCGGTCAATGAGCTGGCACAGGCACCTGCCTAAAATGCACCTCTGCCACCAGCGGATGGCCCTGC
N D D S S W L P L L H D L T N E G M A F G H E L A Q A L R K M H S A T S D A L Q
721 AGGATGACGGCTTCCCTTTTTCAGCTTTATCTGCCTGATGGCGATGATGTACGGCTTTTCGATCGGGCTGATGCATGGCAGGTTGGGTCAATCACCTCCTTGGTCTTTGGCGTTACCG
D D G F L F Q L Y L P D G D V S V F D R A D A L A G W V N H F L L G L G V T Q
841 AACCGAAGCTGGATAAAGTACCGCGGAAACCGGTGAAGCTATCGACGATCTGGGTAACTTCGGCAACTGGGTTACGACGAAGACGAAGATCAGGAAGAGCTTGAATGTCCGTTGAAG
P K L D K V T G E T G E A I D D L R N I A Q L G Y D E D Q E E L E M S L E E
961 AGATCATCGAATACGTTTCGGCTGTATGCCACGACACCTTTACTCATCCGCAACCGACCGCCAGAGTACAATAACCGACTCTACACTAAAACAATAACCGTAAGGAG
I I E Y V R V A A L L C H D T F T H P Q P T A P E V Q K P T L H
1081 AGTGTATAGTGAGATATCCCGGCAAGAGTTTCACGGTCCCGCTCAGGCCCTGGTGGAGCAATGCAACCCGGCAGCGCCCGCTGATTTTGGCTGCACCAGAGTAACACGCTAGCGCC
pepE M S E I S R Q E F Q R R R Q A L V E Q M Q P G S A A L I F A A P E V T R S A
1201 GACAGCGAATACCCCTATCGTCAGAACAGTGACTTCTGGTACTTCCCGCTTAAACGAACCGGAAGCGGTGCTGGTGTGATTAAGAAGCGATGACACTCATAACCCACAGCGTCTGTGTTT
D S E Y P Y R Q N S D F W Y F T G F N E P E A V L V L I K S D D T H N H S V L F
1321 AACCGGTTCCGACCTGACGGGGAGATCTGGTTGGCCGTAGGCCAGGATGCCCGCCAGAGAACTGGCGTTGACCCGCGACTGGGATTCAGCGAAATCAATCAGCAACTT
N R V R D L T A E I W F G R R L G Q D A A P E K L G V D R A L A F S E I N Q Q L
1441 TATCAACTACTTAACGGCTGGATGTGGTTTACCATGCCAGGGGAAATATGCATATGCTGAACTGGGAAAACCTGGTAAAGGTTCCGGCGCAAAATCTCACC
Y Q L L N G L D V V Y H A Q G E Y A D V I V N S A L E K L R K G S R Q N L T
1561 GCACCGCAACGATGATCGACTGGCTCCTGTTGTTTCATGAAATCGCCGCTGTTCAAATCGCCAGAAAGAGATTGCCCTACTCCGCGCGGGAGAAATCACCGCATGGCACAATACACGG
A P A T M I D W R P V V H E M R L F K S P E E I A V L R R A G E I T A M A H T R
1681 GCGATGGAATAATCCCGTCCGGGAATGTCGAGTACCATCTGGAAAGGGGAAATTCACCACGAAATTTAACCGCCACCGTGGCGCTATCCGTCCTATAACACCCATTTGTCGGCAGCGGTGAA
A M E K C R P G M F E Y H L E G E I H H E F N R H G A R Y P S Y N T I V G S G E

1801 AACGGCTGCATTTGCACCTACACCCGAAACAGTGTGAAATGCGCCAGCGGACTGGTGTGATTTGACCGGGGTTGTGAAATACAAAGGTTACGCTGGCGATATTACCCGCCACCTTCCCGG
N G C I L H Y T E N E C E M R D G D L V L I D A G C E Y K G Y A G D I T R T F P
1921 GTCACGGGCAAAATCACCCAGGCCAGCGTGAATCAGACATTTGCTGGAGTCTCTCGAAACCCAGCCCTGGCCCTGTATFCGTCCGGGAACTTCCAATTCGGAAGTCACTGGTGAAGTG
V N G K F T Q A Q R E I Y D I V L E S L E T S L R L Y R P G T S I L E V T G E V
2041 GTCCGATCATGTTAGCGGCTGGTAAACTCGGCATCCCTGAAAGTGTGATGAACCTGCTAGAACGCCATCGTCCCTTTCTTATGTCATGGCCCTTAGCCACTGGTTAGGA
V R I M V S G L V K L G I L K G D V D E L I A Q N A H R P F F M H G L S H W L G
2161 CTGGATGTCCATCAGCTGGTGTATTTATGGTCAGGATCCCTCGCGGATTTCTGGAAACCGGGCATCTGACTGACCCGTAGACCAGGGCTGTATATTGGCCCGGATGCAGAAAGTCCAGAACAA
L D V H D V G V Y G Q D R S R I L E P G M V L T V E P G L Y I A P D A E V P E Q
2281 TATCCGGGTAATCCGGCATTCGFAATTGAAGACGACATTTGATTAACGAAACCGGTAACGAAACCTCACCCGACGCTGGTGAAGAAAGCCGGAAAGAAATCGAAAGCGTTGATGGTTCGCTCGG
Y R G I G I R I E D I V I T E T G N E N L T A S V V K K P E E I E A L M V A A
2401 AGAAGCAATGACCGTAATCATCGTGGCGGCAATGGCGGCGCACGCTGGCGCTGGCTATTTCCCGGTTAAGTCAACGGGGCGCTGCCGGTACATTTGATTTGAAGCGGACTGGCCGACG
R K Q
A in ubiH424 (G>D)
visB M S V I I V G G M A G A T L A I S R L S H G A L P V H L I E A T A P E
2521 AGTCACATGCTCATCCGGCTTTGATGGACGAGCGATAGCGCTGGCGGCGGTACCTGTACAGCAACTGGCGGCATCGCGCTCGCAATCTCTGGCGGATTCGGCAACTGCCATCACCA
S H A H P G F D G R A I A L A G T C Q L A R I G V W Q S L A D C A T A I T T
2641 CCCTGCATGTCAGCGATCGTGGTCAACCGTGGATTTGTCACCCCTCGCGCGCAGAAGATTACCAACTGGCGGCGCTGGACAGTTGTGAAATTCACAATGTCGAAATGTCGGGCAACGGCTGTTGTCAT
V H V S D R G H A G F V T L A A E D Y Q L A A L G Q V V E L H N V G Q R L F A L
2761 TGCTGCGTAAAGCACCTGGCGTAAACGCTGCATTTGCCCTGATCGCTGGCTAACCTTGCCCGTACTCAGAGTCACTGAGTCAAGTGTGAGAGTGGCGAGACGCTGACGGCGCGGTGC
L R K A P G V T L H C P D R V A N V A R T Q S H V E V T L E S G E T L T G R V L
2881 TGCTAGCAGCTGATGGCACCCATTCAGCGTTAGCCACCGCGTGGCGGTTGACTGGCAGCAGGAGCCCTTACGAACAACCTGGCCGCTGATTCGCAACGTTGCTACTTCCGTTGGCGATGAAG
V A A D G T H S A L A T A C G V D W Q Q E P Y E Q L A V I A N V A T S V A H E G
3001 GGCGCGCTTTTGAACGCTTACGCAACATGGCCCGCTGGCGATGTTGCCGATGCTGACGGACGCTGTTCCGCTGGTCTGGTGTCACTCCACTGGAAACGGCCGAAAGAGGTGTTGTCGTGGA
R A F E R F T Q H G P L A M L P M S D G R C S L V W C H P L E R R E E V L S W S
3121 GTGACGAGAAGTTTGGCGTGAACCTCCAGTCCGCGCTTTGGCTGGGACTTTGGAAAAATACCCACGCTGGTAAACGCACTGTTATCCGCTGGCGGTTAACCCACGCCAGATCTATTA
D E K F C R E L Q S A F G W R L G K I T H A G K R S A Y P L A L T H A A R S I T
3241 CCATCGTACCGTGTGGCAATGGCGCGCAACTCTGCACCCGATTTGCCGGCAAGGTTTAACCTCGGTATGCCAGATGTGATGAGTCTTCCGGAAACCCCTGACTCAGGCGCAGG
H R T V L V G N A A Q T L H P I A G Q G F N L G M R D V M S L A E T L T Q A Q E
3361 AGCCCGGAGAAACATGGGGGATTTACGGCGTATTTGCGCGTATTCAGCAGCGCTCGACAGCGGATCCGGAAGCAACCAATGGCGTACGGACAGCCCTTGTACATCTTTTGGCAACCCGTT
R G E D M G D Y G V L C R Y Q Q R R Q S D R E A T I G V T D S L V H L F A N R W
3481 GGCACCGCTGTTGTCGGCGCAACATCGGGCTGATGACGATGGAATTAATCACCCCGCACCGGATGTCGTGGCGCAGCCCTCGGTTGGTGGCGGCTTGAAGCGGTTTTAAG
A P L V V G R N I G L M T M E L F T P A R D V V A Q R T L G W V A R

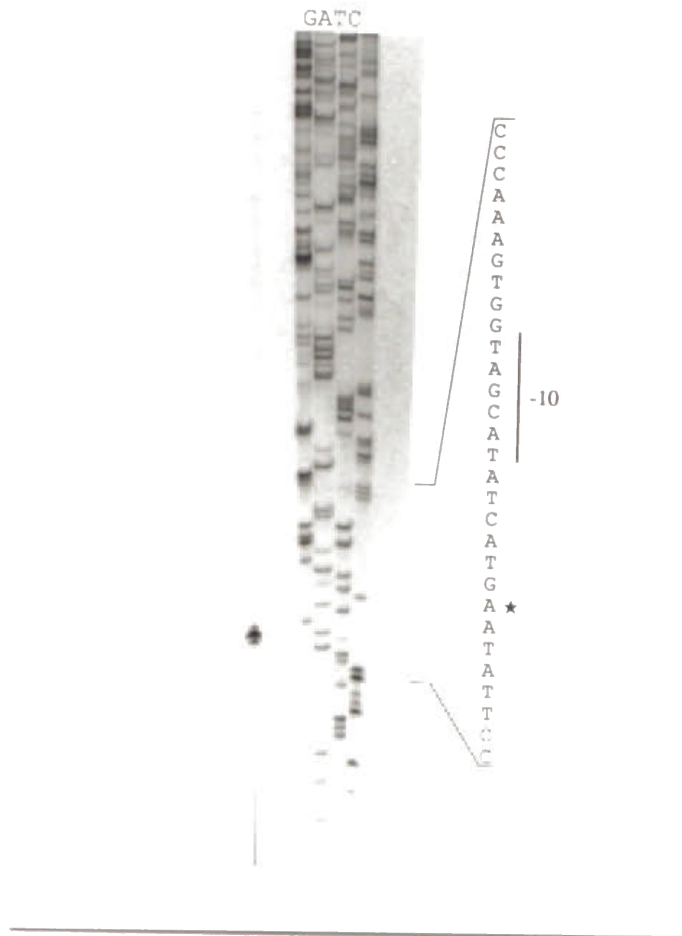


図 III-8 ORF194上流のプライマー伸長反応

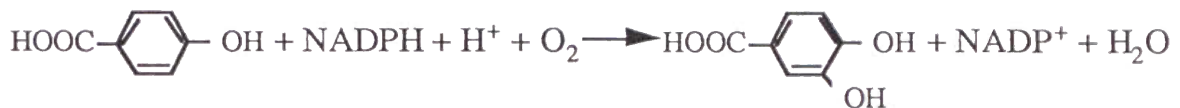
ORF194の5'末端から27~46番目の塩基に相補的なオリゴDNA (TCATTTTCGTTGTAACCAGGC)をプライマーとし、大腸菌CA274株由来の全RNA、50 μ gを用いてプライマー伸長反応を行った。サイズマーカーとして、同じプライマーを用いてシーケンス反応を行い、共に6% アクリルアミド尿素ゲルで電気泳動後、オートラジオグラムをとった。

f) VisB蛋白質の機能

VisB蛋白質の機能を推定するため、アミノ酸データベースに登録された蛋白質とVisB、VisC蛋白質のホモロジーを検索した。その結果、双方ともに*Pseudomonas fluorescens*の4-ヒドロキシベンゼンヒドロキシラーゼ(4-hydroxybenzoic acid-3-monooxygenase, EC 1.14.13.2、以下HBHaseと略) (Weijer *et al.*, 1982)と約20%の相同性があることが分かった。3者のアミノ酸配列の比較を図III-9に示す。

*Pseudomonas*属の細菌は各種の芳香属炭化水素を炭素源として生育できるが、炭素源として4-ヒドロキシ安息香酸を利用する際にはHBHaseが多量に誘導されるため、この酵素はフラビンを含む酸化還元酵素のモデルとしてよく研究されている(Entsch *et al.*, 1976, Hosokawa and Stanier, 1966, Howell *et al.*, 1972)。

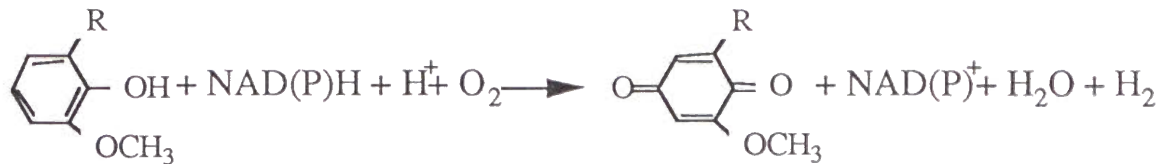
HBHaseは次に示す反応を触媒し、一分子あたり1つのFADを補欠分子に持つ。



この酵素は、X線解析により、高次構造も決定されているので(Hofsteenge *et al.*, 1980; Wierenga *et al.*, 1979)、VisBやVisCと比較したところ、よく保存されているのはモノヌクレオチド結合ドメイン(Rossmann *et al.*, 1975)を始めとするFAD結合領域であることが分かった。しかし、大腸菌は4-ヒドロキシ安息香酸を炭素源にできず、しかも、これまで知られている代謝経路にはこれに相当する酵素が存在しないと思われたので、VisBやVisCはHBHaseそのものではなく、よく似た機能を持つ酵素である可能性が高いと考えた。

大腸菌染色体の62~63分には比較的多くの遺伝子がマップされているので(Bachmann, 1990)、これらの遺伝子の中にvisBと同じものがある可能性があると考えた。そこで、この中にFADを含む酸化還元酵素をコードする遺伝子があるかどうか調べたところ(Clark and Cronan JR, 1980; Lovet and Clark, 1985; Stauffer *et al.*, 1986; Tobey and Grant, 1986; Knoell, 1981; Young *et al.*, 1973)、ubiHがこれに該当すると考えられていることが分かった。UbiHはユビキノン生合成の中間段階で、2-octaprenyl-6-methoxyphenolから、2-octaprenyl-6-

methoxy-1,4-benzoquinoneへの反応を触媒する(Young *et al.*, 1973)。この反応にはNAD(P)Hが必要とされており、以下のような反応と考えられる(Alexander and Young, 1978a, Knoell, 1981b)。(R=octaprenyl基)



この反応は基質の形状などもHBHaseによく似ているので、さらに詳しく *visB* と *ubiH* の関係を調べることにした。

UbiH蛋白質の機能が完全に失われ、ユビキノンが細胞中に存在しない場合、大腸菌は酸素呼吸欠損になり、好氣的条件下では非発酵性培地上で生育できなくなるはずである。しかしながら、最初に分離した *visB103* 株(VS550)はコハク酸を炭素源にして生育でき、呼吸能を保持している事が分かった。そこで、染色体上の *visB* 遺伝子の一部を Km^R 遺伝子で置き換えた $\Delta visB$ 株(VS560)を作成したところ、この株はコハク酸を炭素源にできず、酸素呼吸能を欠損していることが分かった。この結果は *visB* が *ubiH* と同じ遺伝子であるという予想を支持する。また、 $\Delta visB$ 株はVS550株よりも強い光感受性を示すことも分かった(図III-1c)。

visB が *ubiH* と同一遺伝子であることを最終的に確認するため、既に分離されている *ubiH* 株を入手し、クローン化した *visB* 遺伝子によってこの変異が相補できるかどうか調べてみた。入手した *ubiH424* 株(AN172) (Young *et al.*, 1973)は *visB* 遺伝子を持つ λ ファージ ($\lambda visB1$ あるいは10B4)を溶原化することによってコハク酸を利用できるようになった。また、このことは *visB* 遺伝子のみを持つプラスミド(pVB274)でも確認できたので、*visB* 遺伝子が *ubiH* 遺伝子と同じものであることがはっきりした。さらに、この株由来のDNAの *visB* 遺伝子付近をPCRで増幅した後、クローン化して塩基配列を決定したところ、9番目のコドンが(GGC)から(GAC)に置換することにより、グリシンからアスパラギン酸への変異を起こしている事が分かった(図III-7, III-9参照)。この部分のアミノ酸残基はモノヌクレオチド結合ドメインの中でも最も相同性の高い部分の1つである(Hofsteenge *et al.*, 1980)。

D in UbiA424

VisB MSVIVGGGMAGATLALAISRLSHGALPVHLIEATAPES-HAHPGFDGRAIALAAGTCQQLARIGVWQS-LADCA~~TA~~ITTVHVSDRG
 VisC MQSVDVAIVGGGMVG--LAVA-CGLQGSALRVAVLEQRVQEP~~LA~~ANAPPQLRVSAINAASEKLL~~TRL~~GVWQDILSRRA~~SC~~YHGMEVWDKD
Pseudomonas MKTQVAIIGAGPSG--LLLG-QLLHKAGIDNVILERQTPDYVLGR----IRAGVLEQGMVDLLREAGV-DRRMARDGLVHEGVEI--AF
 HBHase

R in VisB103

HAGFVTLAAEDYQLAALGQVVELHNVGQRLFALLRKAPGVTLHCPDRVANVARTQSHVEVTLE-SGETL--TGRVIVAADGTHSALATAC
 SFGHISFDDQSMGYSHLGHIVENSVIHYALWNKAHQSSITLLAPAEALQQVAWGENETFLTLK-DGSML--TARLVI~~GADGANS~~WLRNKA
 AGORRRIDLKRLSGGKTVT~~Y~~YGQTEVTRDLM~~E~~AREACGATTVYQAAEVRLHDLQGERPYVTFERDGERLRLD~~CD~~YIAGCDGFHG-ISRQS

VDWQQEP-~~YEQLAVIANVAT~~SV~~A~~HEGRAFERFTQHGL~~AMPL~~MSDGR-C~~SLVW~~CHPLERREEVLSW~~DEKFCRELQSAFGWR~~LG-KITHG
 IPLTTFWD-YQH~~HALVAT~~IRTEEPHDAVARQVFHGE~~GLAFLPLSDPHLCSIVWSLSPEEAQRMQQASEDEFNRALNIAFDN~~RLG-LCKVD
 IPAERLKVFERVYFFGWLGLLADTPVSHELIYANHPRGFALCSQRSATRSRYVQVPLTEKVEDWSDERF~~WTELKARLP~~AEVAEKLVTG

AG-KRSAYPLALTHAARSI~~THR~~TVLVGNAAQTLHP IAGQGFNLGMRDVM~~SLAETLTQAQ~~ERGE-DMGD-Y--GVLCRYQQRRQSDREATI
 ES-ARQVFP~~LTGRYARQFASHRLALVGDAAHTIHP~~LAGQGVNLGFM~~DAAE~~LIAELKRLHRQ~~GK-DIGQ-Y--IYLR~~RYERSRKHSAALML
 PSLEKSIAP~~LRSFVV~~EPMQHGR~~FLAGDAAHI~~VPP~~TGAKGLNLAASDVSTLYRLLKAYREG~~LELLERYSAICL~~RR~~I-WKAERFSY~~WMT~~

GVTDSL~~VH--LFANRWAPLVVGRNIGLMTMELF~~TPAR-DVVAQRT-LG----WVAR
 AGMQGFRD--LFSG~~TNPAK~~LLRDIGL~~KLADTLPGVKAQLIRQAMGLNDLPEWL-R~~
 SVLHRFPD~~TDAFSQRIQQTELE~~Y~~Y~~LGSE-AGL~~ATIAENYVGLPYE~~ELE

図 III-9 VisB蛋白質、VisC蛋白質、*Pseudomonas fluorescens* の4-ヒドロキシ安息香酸ヒドロキシラーゼの
アミノ酸配列の比較

3者のうち、2つ以上が同じアミノ酸の部分は太字で示した。VisB103、UbiA424のアミノ酸置換についても示した。

〈実験結果〉

g) *visB*株の光感受性のメカニズム

visB 遺伝子がユビキノン生合成に働いていることが明らかになったので、細胞中のユビキノン欠損が光感受性の原因かどうかを調べた。*visB*株以外のユビキノン欠失株について光感受性を調べてみたが、テストした*ubiA*株、そして*ubiH424*株のいずれについても、光感受性は観察できなかった。

そこで、*visA*変異からの復帰変異の場合のように、ユビキノン生合成をUbiH蛋白質が働くより前のステップで停止した場合、光感受性に変化が見られるかどうか調べた。大腸菌のユビキノン生合成経路を図III-10に示すが、*ubiH424*株はここに示した中間生成物のうちIV, V, VIを細胞内に蓄積していると報告されている(Young *et al.*, 1973)ので、IVの生成以前に機能する遺伝子と*visB*の2重変異株を作成して感受性を調べる事にした。AN385株(*ubiA*)のゲノム上の*visB*遺伝子の一部を Km^R と置換し、*ubiA* $\Delta visB$ の2重変異株(VS561)を作成した。図III-1c)に示したように、この株はCA274株(*ubi*⁺)由来の $\Delta visB$ 株(VS560)と違い、ほとんど光感受性を示さなかった。この違いが*ubiA*変異以外の遺伝的バックグラウンドによるものではないことを確認するため、小原ライブラリーから、*ubiA*遺伝子を持つクローンを選択してVS561に溶原化させた。このファージが溶原化して*ubiA*⁺となった場合、VS561は予想通り光感受性を示した。

h) *visC*遺伝子の機能と光感受性への関与

*visC*遺伝子は*visB*遺伝子と共に転写されると考えられ、しかもその産物はアミノ酸レベルで約30%もの相同性があることから、VisCはVisBと機能的になんらかの関係を持っているのではないかと考えた。そこで、*visC*遺伝子の欠失変異株(VS600)を作成し、その表現型を調べた。しかし、 $\Delta visB$ 株と違い、この株はコハク酸を栄養源にできる事が分かったので、呼吸能は失っていない。従って、*visC*遺伝子は少なくともユビキノンの合成に必須ではないと思われる。しかしながら、 $\Delta visC$ 株も弱いながら光感受性を示す(図III-1, III-2c))。*visC*遺伝子については今後さらに詳しい解析が必要であろう。

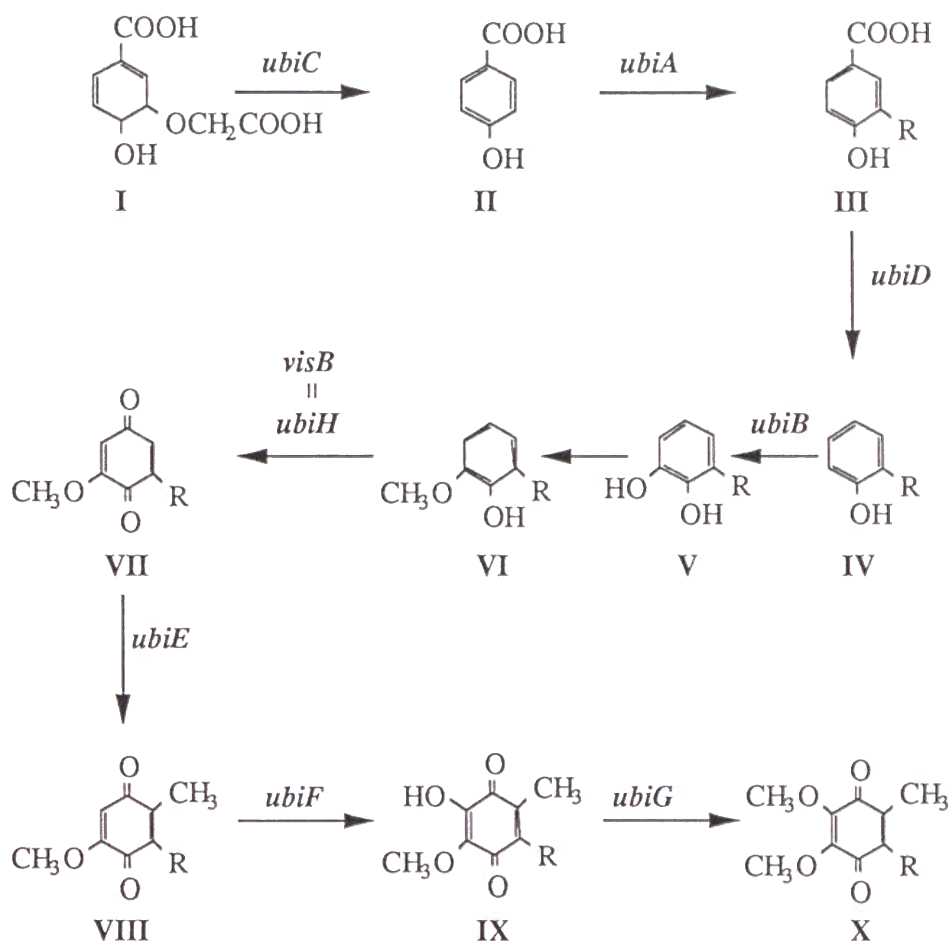


図 III-10 大腸菌のユビキノン生合成経路

大腸菌におけるユビキノン生合成経路とその中間体の構造式を示した(Bentley and Meganathan, 1987)。矢印の上には通常の場合において各反応を触媒する酵素の構造遺伝子名を示した。各中間体の名称を以下に示す。

I, chorismic acid; II, 4-hydroxybenzoic acid; III, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoic acid; IV, 2-octaprenylphenol; V, 2-octaprenyl-6-hydroxyphenol; VI, 2-octaprenyl-6-methoxyphenol; VII, 2-octaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone; VIII, 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone; IX, 2-octaprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinone; X, ubiquinone

第3節 光感受性と酸素

a) 酸素分子の必要性

序論で述べたように、これまでに知られている光感受性の例では、障害を起こすのに光線だけでなく酸素が不可欠である(Abeliovich and Shilo, 1972, Burchard and Dworkin, 1966, Dworkin, 1959, Mathews and Siström, 1959)。*vis* 変異株の光感受性も同様の現象であろうと考え、光感受性と酸素の関係について調べた。

液体培地中で光感受性をテストする際、試験管中の空気を窒素ガスで完全に置換したところ、*visA*株、*visB*株ともに光感受性は見られなくなった。しかしながら、この実験は完全培地を用いて行ったので、大腸菌はおもに発酵によってエネルギーを得ていると考えられ、ヘムやユビキノンの生合成が不発酵であることが光感受性の現れない原因であるとも考えられる。この可能性を排除するため、嫌氣的呼吸を行うような条件で調べてみた。大腸菌は酸素の他にも多くの分子を最終電子受容体として呼吸を行う能力を持つが、主として硝酸イオンやフマル酸を用いる電子伝達系が使われる(Ingledeew and Poole, 1984)。非発酵性のグリセロールを炭素源にし、硝酸イオンやフマル酸を電子受容体にして増殖するような条件で実験を行ったところ、どちらの培地においても光感受性は観察されなかった(表III-1)。この結果から*vis*変異株が感受性を示すには、酸素分子が存在しなければならないことがわかる。

表III-1 嫌気的条件下での光感受性

菌株	* LB		M9 glucose		Fumalate		NO ₃	
	+O ₂	-O ₂	+O ₂	-O ₂	+O ₂	-O ₂	+O ₂	-O ₂
‡ Wild	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>visA</i>	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>visB</i>	-	+	-	+	-	+	-	+

* LB, LB培地、M9 glucose, M9 glucose培地、Fumalate, フマル酸培地、NO₃, NO₃培地 を使用した。

+ +O₂, 好気的條件、-O₂, 嫌気的條件

‡ Wild, CA274株、*visA*, VS101株、*visB*, VS550株

10ml小試験管に5mlの液体培地を分注し、OD₆₆₀が約0.01になるよう一夜培養液を加えた。嫌気的條件、好気的條件の各々について暗所と明所で培養し、24時間後に再びOD₆₆₀を測定した。暗所ではどのサンプルもよく増殖したが、各条件によってODに差があるので、明所で増殖が観察されたものを+で示し、明所で全く増殖しなかったものを-で示した。+で示した条件では、どの例も"明所でのOD/暗所でのOD"の値が0.7よりも大きく、-で示した条件では、明所では全く増殖していなかった。

b) *visA*, *visB*株で発生する活性酸素種

酸素が生体に対して有毒に働く場合、酸素分子が直接、標的物質と反応するのではなく、酸素分子が活性酸素と呼ばれる一群の分子種に変化した後に各種の生体物質と反応する例がほとんどである。活性酸素には色々な分子種が含まれるが、酸素分子から直接発生すると考えられているのは、酸素分子が還元されてできるスーパーオキシド(O_2^-)や過酸化水素(H_2O_2)、通常の酸素分子(三重項酸素, 3O_2)が励起されてできる一重項酸素(1O_2)の3種類である(Nakano *et al.*, 1988)。そこで、光照射した際に、この3つのうちどれが*visA*株や*visB*株の細胞中で発生しているのかを調べることにした。

高温などによるストレスを受けた場合に誘導される蛋白の一群が存在するように、スーパーオキシドや過酸化水素によるストレスを受けた場合にもそれぞれ一群の蛋白が誘導される(Christman *et al.*, 1985, Greenberg and Demple, 1989, Walkup and Kogoma, 1989)。この適応応答の機構に関しては、最近の研究により、スーパーオキシドについても、過酸化水素による誘導についても、特異的な転写アクティベーターの働きで各々のレギュロンに属する遺伝子が活性化されることが分かってきた(Christman *et al.*, 1989, Greenberg *et al.*, 1990, Tao *et al.*, 1989)。一重項酸素に対してはこのような適応応答は知られていない。

スーパーオキシドによって活性化を受ける遺伝子としては、マンガン含有スーパーオキシドディスムターゼ(Mn-SOD)をコードする*sodA*やエンドヌクレアーゼIVをコードする*nfo*が、過酸化水素により活性化を受ける遺伝子としてはカタラーゼ1 (大腸菌のカタラーゼはヒドロペルオキシダーゼ活性も持つため、HP1と略される)をコードする*katG*についてよく研究されている(*sodA*; Takeda and Avila, 1986, Touati, 1983, 1988. *nfo*; Chan and Weiss, 1987, Cunningham *et al.*, 1986. *katG*; Loewen *et al.*, 1985, Triggs-Raine *et al.*, 1988)。これらの遺伝子は大腸菌の生育に全く影響のない程度の微量な活性酸素にも鋭敏に反応するので、細胞内に発生するスーパーオキシドや過酸化水素をモニターするには、これらの遺伝子の活性化を調べるのが最も簡単かつ有効な方法である。

遺伝子の発現量を調べる方法としては、各々の遺伝子のコード領域の途中に *lacZ* 遺伝子を結合した融合遺伝子を使い、 β -ガラクトシダーゼ活性を指標とする方法を用いた。なお、*sodA'*-*lacZ* 融合遺伝子は染色体の *sodA* と置き換えたものの、*nfo'*-*lacZ*、*katG'*-*lacZ* の場合はプラスミド上のエクストラコピーの発現を解析した。

光による活性化の有無を調べる前に、活性酸素ストレスによって各融合遺伝子がどのような挙動変化を示すか調べてみた。

野生型、*visA1*、*visB103* の 3 種類の株について、平常状態と弱い活性酸素ストレスをかけた状態とで β -ガラクトシダーゼ活性を測定したものが表 III-2 である。全体的に見た場合、どの融合遺伝子も、増殖に影響の無い程度の活性酸素ストレスに対してもよく活性化を受けることが分かる。

各株を比較した場合、*katG* に関しては大きな差はみられないのに対して、*sodA* については非常に興味深い違いがある。*visA* 株では実験的に加えたパラコートによるスーパーオキシドストレスのない状態でも非常に高い活性が見られ、逆に *visB* 株は野生株に比べ低い活性しかない。同じくスーパーオキシドによる誘導をうける *nfo* では、*sodA* 程はつきりはしないものの、*visA* 株では同じような傾向がみられる。しかし *visB* 株に関しては野生株と差がない。

この実験で使用した *sodA'*-*lacZ* 融合遺伝子を持つ株は、Mn-SOD 活性を失っているため、融合遺伝子は通常とは違う挙動を示している可能性がある。そこで、直接 Mn-SOD の活性を比較することにした。大腸菌は Mn-SOD の他に鉄を含む SOD (Fe-SOD) を持つので、両者を電気泳動により分離した後で各変異株の SOD 活性を較べたものを図 III-11 に示す。*visB* 株では Mn-SOD のバンドが殆ど見られず、融合遺伝子の実験を裏付ける結果となったが、*visA* 株では野生株とあまり差は見られず、むしろ先の *nfo* 融合遺伝子の結果と一致している。

表 III-2 活性酸素による指標遺伝子の誘導

遺伝子型*	β -ガラクトシダーゼ活性					
	融合した遺伝子					
	<i>sodA</i>		<i>nfo</i>		<i>katG</i>	
	+	-	+	-	+	
wild	314	801	545	1095	85	190
<i>visA1</i>	911	1439	1199	2218	83	253
<i>visB103</i>	106	193	761	2229	89	162

* 測定した株の遺伝子型、*sodA*'-'*lacZ*の測定には各々、wild, VS011株; *visA1*, VS111株; *visB103*, VS551株を使用し、*nfo*'-'*lacZ*と*katG*'-'*lacZ*の測定には wild, CA274株; *visA1*, VS101株; *visB103*, VS550株をpHI201, pKT1033で形質転換したものを用いた。

+ -, 通常の状態 +, 増殖に影響のない程度に活性酸素ストレスを与えた場合
*sodA*と*nfo*に対しては10 μ Mのパラコート、*katG*には50 μ Mの過酸化水素を培地中に加えた。

各株の一夜培養液をLB培地で1000倍に希釈し、約 5×10^8 cells/mlまで(約4時間)培養した。表に示した最終濃度になるよう薬剤を加え、更に45分間培養を続けた後、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。活性の単位はMillerに従った(Miller, 1972)。

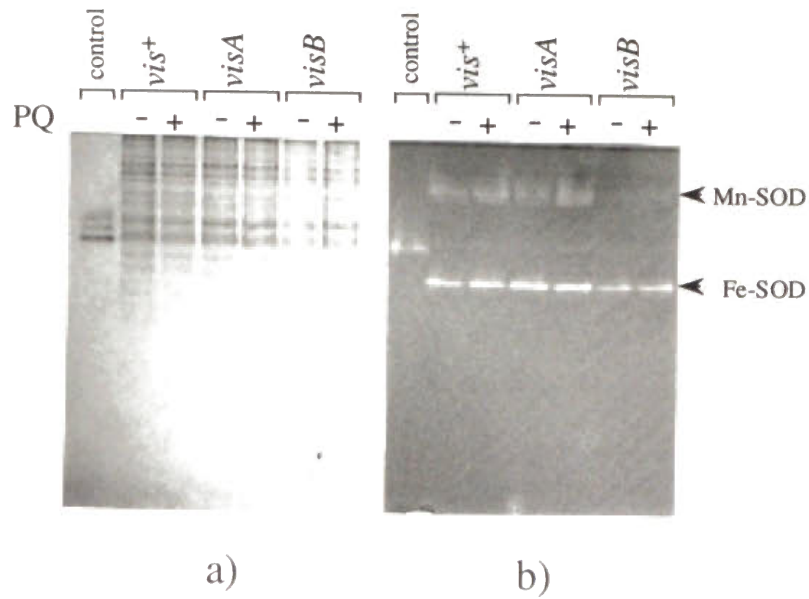


図 III-11 *vis*変異株のSOD活性

各株をLB培地中、約 5×10^8 cells/ml程度まで培養し、10 mlずつ2本の試験管に分注した。一方に最終濃度 $10 \mu\text{M}$ のバラコートを加えた後、更に45分培養を続けた。各培養液から蛋白質粗抽出液を分離した。a) $1 \mu\text{g}$ を電気泳動し、クーマシー染色を行った。マーカーとして $1 \mu\text{g}$ のウシSOD (Sigma S-2515)を用いた。b) $50 \mu\text{g}$ を電気泳動し、SOD活性で染色した。マーカーとして $0.01 \mu\text{g}$ のウシSODを用いた。大腸菌のマンガン含有SOD(Mn-SOD)はブロードなバンドとして、鉄含有SOD(Fe-SOD)は単一のバンドとして観察できる。

必ずしも通常の状態を反映はしていないものの、融合遺伝子が僅かな活性酸素にも反応することが確認できたので、光照射により活性化が起きるかどうかをしらべてみた。いくつかの強度の光を当てて調べてみたが、表III-3に示したように、どちらの株についても、またどの融合遺伝子についてもパラコートや過酸化水素を加えた場合のような特異的な活性化は観察できなかった。この結果から、*visA*についても*visB*についても光照射によるスーパーオキシドや過酸化水素の特異的な増加はないものと思われる。

c) *vis*変異株の光感受性に対する抗酸化剤の効果

酵素による防御系以外にも、生体内に存在する各種の低分子化合物が抗酸化的に働いて、活性酸素により起きる生体物質の酸化を防いでいる。実際、序論で示したような単細胞生物の光感受性は、殆どの場合、抗酸化機能をもつカロテノイドが細胞から失われた為に起きることが分かっている(Dworkin, 1959, Mathews and Siström, 1959)。このような抗酸化剤を外部から加えることで光感受性を押えることができるかもしれないと考え、抗酸化剤として知られている尿酸、還元型グルタチオン、 β カロチン、アスコルビン酸、トコフェロール、尿酸、マンニトールなどを培地中に加えて光感受性を調べた。その結果、アスコルビン酸を加えた場合にのみ、*visB*株の光感受性が打ち消されることが分かった(図III-12)。アスコルビン酸の防御効果は培地中の濃度が約2mMで最もよく現れた。*visA*株に関してはこのような効果は全く見られなかった。

表 III-3 光による指標遺伝子の誘導

遺伝子型	誘導による β -ガラクトシダーゼ活性の上昇率*			
	活性酸素+	500 lx	2000 lx	5000 lx
a) <i>sodA'</i> -' <i>lacZ</i>				
wild	2.55	0.85	1.43	1.16
<i>visA1</i>	1.58	1.21	1.06	0.94
<i>visB103</i>		N.D.		
b) <i>nfo'</i> -' <i>lacZ</i>				
wild	2.01	0.75	0.95	0.96
<i>visA1</i>	1.85	0.82	0.99	1.08
<i>visB103</i>	2.93	N.D.	1.04	1.15
$\Delta visB$	1.93	N.D.	0.97	0.96
c) <i>katG'</i> -' <i>lacZ</i>				
wild	2.23	0.94	1.01	1.13
<i>visA1</i>	3.05	1.04	1.04	1.33
<i>visB103</i>	1.82	1.18	1.05	1.23

* 各遺伝子、各株で通常の状態の値(表 III-2 の"- "の値)を1として示した。

† 表 III-2の"+ "と同様に処理した。

N.D., 実験を行わなかった。

基本的に表III-2と同様の実験を行ったが、光照射については薬剤と同じ時点で始め、同じ時間だけ照射した。活性測定に使用した株も表III-2と同様であるが、低い活性しか示さなかった *visB103*株については *sodA* の測定は行わず、 *nfo* の実験では *visB103* だけでなく $\Delta visB$ 株(VS560) についても行った。

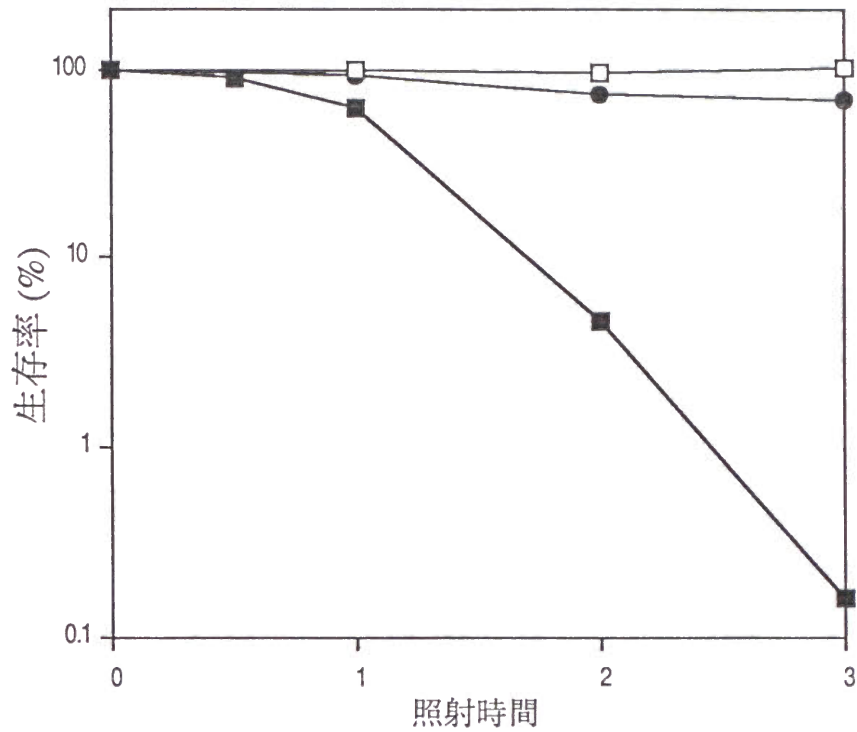


図 III-12 *visB*株の光感受性に対するアスコルビン酸の効果

図 III-2と同様の実験を行ったが、光源はプレート上7.5cmに設置した。VS550については2mMのアスコルビン酸を加えたLBプレートと加えないプレートについて調べた。

●, CA274 (*vis*⁺); ■, VS550 (*visB*) -アスコルビン酸; □, VS550 (*visB*) +アスコルビン酸

第IV章 考察

第1節 *visA*変異

a) VisA蛋白質の機能

以下の理由により、*visA*遺伝子がフェロケラターゼをコードしており、以前にマップされた*hemH*と同一の遺伝子であると結論した。

- 1, *visA*遺伝子はヘム生合成に必要である。
- 2, *visA*の染色体上の位置は、以前*hemH*がマップされている位置に非常に近い。
- 3, VisA蛋白のアミノ酸配列は酵母のフェロケラターゼと高い相同性を示す。
- 4, $\Delta visA$ 変異株のコロニーは赤色を示すが、これはフェロケラターゼの基質であるプロトポルフィリンIXが細胞内に蓄積する為と考えられる。

フェロケラターゼは酵母の他、ウシ、ラット、ニワトリ等のミトコンドリアから精製されており、何れも分子量約40000と報告されている(Camadro and Labbe, 1988, Dailey, 1982b, Hanson and Dailey, 1984, Taketani and Tokunaga, 1981)。これに対して、光合成細菌(*Rhodospseudomonas sphaeroides*)由来のものは115000と報告されている(Dailey, 1982a)。大腸菌の酵素は、酵母と全域にわたって相同性を示し、分子量は36152と計算される事からも、光合成細菌よりもミトコンドリア由来の酵素によく似ている。フェロケラターゼのアミノ酸配列が明らかになったのは酵母に続いて2例目なので、改めて酵母と配列を比較したところ、興味深い事実を見いだした(図IV-1)。各種の試料から精製したフェロケラターゼを用いた実験によって、近接する2つのフリーなSH基が鉄(II)イオンに結合するというモデルが提唱されている(Dailey, 1984)。しかし、酵母と大腸菌のフェロケラターゼには保存したシステイン残基が全く存在せず、しかも、酵母において結合領域の可能性を指摘されている、2個のシステインが連続した領域(Labbe-Bois, 1990)に対応する部分で数アミノ酸が欠失している。大腸菌のフェロケラターゼでは何か別のコンポーネントによって鉄(II)イオンとの結合機能を維持しているのかもしれない。

b) *visA*株で光増感剤となる物質

*visA*株の光感受性はフェロケラターゼの機能欠損、あるいは低下によるものであることが分かった。しかし、それによって起きる細胞内のヘム欠乏が原因ではない。これに関しては、*visA*株が新たにヘム合成の、より初期段階にある酵素の活性を失うことで光非感受性にもどることが、最もはっきりした証拠である。また、同じ結果から、VisA欠損によってヘム生合成の中間体が細胞に蓄積することが原因ではないかと推測される。すなわち、有害な中間体が合成されるより以前で生合成がストップした場合、光感受性は現れない。株により多少の濃度変化はあるものの、 $\Delta visA$ だけでなく、他の*visA*株もCoxとCharlesの分離した*hem H*株同様に赤色を呈し、細胞内にプロトポルフィリンIXが蓄積していると思われるので、光感受性の原因物質はプロトポルフィリンIXである可能性が極めて高い。

プロトポルフィリンIXが原因となって光感受性になる例は他の生物でも知られている。粘液細菌(*Myxococcus xanthus*)は暗所で形成したコロニーを明所に移動するとコロニーの中心部から溶菌することが観察されているが、これは細胞中に蓄積するプロトポルフィリンIXが原因と考えられている(Burchard and Dworkin, 1966)。また、骨髄性プロトポルフィリン症(以下EPPと略)と呼ばれる人間の遺伝病では、プロトポルフィリンIXが血中などに多量に蓄積し、表皮近くでは光を受けて溶血などの有害な現象を引き起こすために光過敏症となる(Buettner and Oberley, 1979, Krasnovsky, 1979)。粘液細菌中に存在する状態で、プロトポルフィリンIXは425 nmに吸収極大を持つと報告されているが(Burchard and Dworkin, 1966)、大腸菌の吸収波長を直接測定した場合、*visA*株に特有のピークが420 nm付近に表れるので、これがプロトポルフィリンIXの吸光と思われる。このように細胞中でのプロトポルフィリンIXの吸光は420nm付近にあるのに対して、EPPの場合、光過敏を最も強く起こすのは約400nmと言われており、また、粘液細菌では410 nmに溶菌作用のピークがあると報告されている(Burchard et al., 1966)。一方、*visA*株の場合、特定波長を透過する干渉フィルターによって蛍光灯光を遮り、各々の波長で光感受性を

調べたところ、460nm付近の光線が最も効力を持つという結果を得ている。プロトポルフィリンIXの吸光と有効な波長の差、また各生物種での有効な波長の差がどういう原因によるものかはっきりしないが、干渉フィルターの実験は光の透過率等のファクターが考慮に入られていないので、これに関しては更に詳しい実験が必要と思われる。

原因物質が同じばかりでなく、EPPはフェロケラターゼの機能低下により起こると考えられている点でも *visA* と同じである。III-3で述べたように、多くの生物で観察される光感受性は、防御物質であるカロテノイドが失われたことにより起きるのに対して、この2例は細胞内の光増感剤が増加する事により起きる点でユニークである。EPPに対応するような変異は、他の生物からは見つからないので、*visA*株で起きている現象はEPPのモデルになると考えている。

第2節 *visB*変異

a) *VisB*蛋白質の機能

*visB*については、遺伝子産物の通常の機能はユビキノン生合成である事が明らかになった。大腸菌のユビキノン生合成については、生合成能力を失った変異株の解析により、通常の好氣的条件下では図III-10に示したような経路をたどるとされている(Bentley and Meganathan, 1987)。しかし、嫌氣的条件下では同じ反応に別の酵素が使用されることや(Alexander and Young, 1978b, Knoell, 1981a)、図III-10に挙げられた以外にもユビキノン生合成に関与すると考えられる酵素が存在する(Bar-Tana et al., 1980, Howlett and Bar-Tana, 1980, Nonet et al., 1987)など、まだ分かっていない事も多い。*visB*(=*ubiH*)は、ユビキノン生合成系の遺伝子として、配列が明らかになった最初の例であるが、この株からの復帰変異を解析すれば、*visA*の場合と同様、ユビキノン生合成に関与する遺伝子についても新たな知見を得ることが出来るであろう。

b) *visB*株で光増感剤になる物質

*visB*株に光感受性をもたらす機構についても*visA*株と同様なプロセスで考察を進めることができる。すなわち、

1. ユビキノンが細胞から失われても大腸菌は光感受性にはならない。

これは、既に分離されていた幾つかの*ubi*株が光感受性でないこと、*ubiA*と $\Delta visB$ の2重変異株は光感受性でないことから明かである。

2. *visB103*あるいは $\Delta visB$ 変異によって蓄積するユビキノン生合成の中間体が原因ではないかと考えられる。

やはり*ubiA* $\Delta visB$ の2重変異株は光感受性でないことが理由として挙げられる。

しかし、以前に分離されていた*ubiH424*変異株は光感受性を示さないので、

*visB103*や $\Delta visB$ 変異株に蓄積する中間体は*ubiH424*変異株とは異なるのかもしれない。

Youngらは*ubiH424*変異によって細胞に蓄積するユビキノン生合成の中間体を解析しており、UbiHの基質である2-octaprenyl-6-methoxyphenol (図III-10に示した中間体VI、以後、全ての中間体を図III-10中の番号で示す) 以外に、VやIVが蓄積している事を明かにした。しかも、最も多量に存在するのはIVであり、VやVIは僅かしか蓄積しない(Young *et al.*, 1973)。

一方、Knoellは、中間体IVからユビキノンを合成する活性を持つ酵素複合体を細胞膜分画から分離しているが(Knoell, 1979)、この複合体による反応が活発でない条件では、複合体に中間体IVが結合した状態で生合成が停止していると報告している(Knoell, 1981a)。従って、*ubiH424*変異は図IV-2b)のように複合体全体の活性が停止していると考えるのが自然だろう。これに対して、 $\Delta visB$ のようにUbiH蛋白を全く失った場合は、図IV-2c)に示すように中間体VIが自由に酵素複合体から離脱できると考えれば、中間体VIが蓄積するはずである。また、図IV-2d)のように、渡された中間体VIがVIIに変化せず、すぐ解離してしまうような変異体であれば、やはり細胞中に中間体VIが蓄積すると思われるので、*visB103*はそのような変異ではないだろうか。今後、*visB*株に蓄積する中間体を実際に同定することが必要であろう。

c) *visC*変異

VisC蛋白の機能についても、 $\Delta visC$ 株の光感受性についても、現時点では詳しく議論できるだけのデータを得ていない。しかし、遺伝子の配置からいって、*visB*と*visC*はなんらかの関係を持った遺伝子である可能性が高いとおもわれる。先に述べたようにユビキノン生合成にはまだ不明の点も多いので、VisC蛋白はユビキノン生合成に(必須ではないが)関連があるのではないかと考えている。

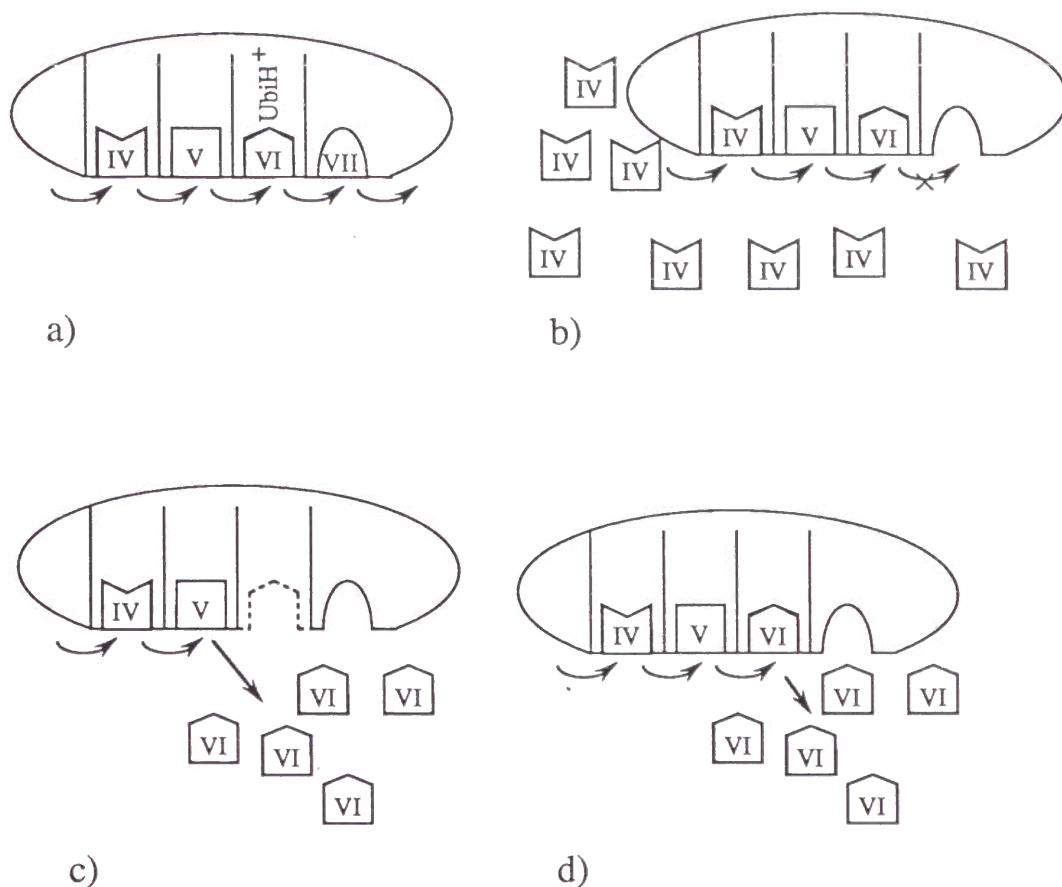


図 IV-2 *visB (ubiH)* 株に蓄積する中間体のモデル

visB (ubiH) 株に蓄積する中間体のモデルを示した。楕円はユビキノロン生合成後期に機能する酵素複合体を示し、ローマ数字入りの多角形は図III-10と共通番号で生合成の中間体を示す。

- a) 野生株、複合体が正常に機能しているので中間体は蓄積しない。
- b) *ubiH424* 株のモデル、UbiH424蛋白質に中間体VIが結合したままになり、複合体全体の機能がなくなるので、複合体に取り込まれる直前の中間体(IV)が多く蓄積する。
- c) $\Delta visB$ 株のモデル、UbiH蛋白質が存在しないが、その他の酵素は機能するので、中間体VIが作られ、そのまま複合体から解離してゆく。
- d) *visB103* 株のモデル、UbiH蛋白質と中間体VIのアフィニティが低下しているため、反応が起きる以前に多くのVIが解離してゆく。

第3節 光感受性と活性酸素の関係

プロトポルフィリンIXの光化学反応によって発生し、EPP患者に光過敏症を引き起こす原因となる活性酸素種は、一重項酸素であるという説が有力である(Lamola *et al.*, 1973, Dubbleman *et al.*, 1978)。しかしながら、一重項酸素の生成を物理化学的に証明するのは極めて難しいため、はっきりは分かっておらず、スーパーオキシドや過酸化水素が関与するという報告もある(Hsu *et al.*, 1971, Buettner and Oberley, 1979)。visA変異についても、EPPと同様、プロトポルフィリンIXを蓄積する原因になると思われることから、同種の活性酸素が生成していることが予測される。融合遺伝子を用いた実験では、スーパーオキシドによって活性化されるsodAやnfoにも、また過酸化水素によって活性化されるkatGにも、光照射による特異的な活性化は観察できなかった。従って、この2種の活性酸素は、少なくとも大腸菌の生存に影響を与える程には発生していないと考えられる。消去法ではあるが、のこる一重項酸素の発生が光感受性をもたらしている可能性が高い。

visB株の場合に発生する活性酸素種に関しても、光による指標遺伝子の誘導ではvisA株と同様の結果を得ていることから、やはり一重項酸素ではないかと考えられる。

アスコルビン酸は各種の活性酸素と反応するが、一重項酸素も効率よく消去するという報告がある(Bodannes and Chan, 1979, Chon and Khan, 1983)ので、visB株の光感受性が、アスコルビン酸の存在下で抑制されるという結果は融合遺伝子の系で得た結果と矛盾しない。visA株の場合にはこのような現象は見られないが、一重項酸素の寿命はスーパーオキシドや過酸化水素に比べると極めて短いので、一重項酸素を有効に消去するためには発生場所のごく近傍に消去剤が存在せねばならない。アスコルビン酸は水溶性なので、他の脂溶性一重項酸素消去剤(β -カロチン、トコフェロール等)に比べて多量に培地中に存在することができるが、細胞膜を通して拡散できないので、visA株で一重項酸素の発生する場所は、アスコルビン酸の到達できない様な環境にあるのではないかと考えられる。

*visA*株と*visB*株は*sodA*遺伝子の発現において正反対の性質を示す。しかし、両者とも光による誘導は見られないので、この現象は光感受性とは関係がないと考えられる。*visA*株では、*nfo*でも同様に暗所明所を問わず発現量の増加が見られるので、暗所でも生存に影響のない程度にスーパーオキシドの発生が増加しているのではないかと考えられる。*visB*株の場合、*nfo*は野生株と同様のパターンを示すので、*sodA*特有の現象と考えられる。*sodA*遺伝子はスーパーオキシドによる調節以外にも、鉄取り込みレギュロン等の調節を受ける事が知られているので、なにか別の要素が関与しているのかも知れない。

第4節 まとめ

1. *visA*遺伝子は*hemH*と同一の遺伝子であり、フェロケラターゼをコードしている。
2. *visA*株の光感受性はヘム生合成の中間体のプロトポルフィリンIXが細胞内に多量に蓄積することが原因と考えられる。
3. 新たに光感受性を示す*visB*株を分離した。*visB*遺伝子は*ubiH*と同一の遺伝子で、ユビキノン生合成の中間段階で2-octaprenyl-6-methoxyphenolから2-octaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinoneへの反応を触媒する酵素をコードしている。
4. *visB*株の光感受性はユビキノン生合成の中間体の蓄積が原因と考えられる。
5. *visA*株*visB*株ともに、細胞内に蓄積した生合成中間体が細胞内で光増感剤として働き、発生した活性酸素が細胞に有害な働きをする。
6. 生成する活性酸素種は、一重項酸素($^1\text{O}_2$)と考えられる。

謝辞

本研究、特に *visA* 変異に関する部分は井口八郎博士、宮本一政氏、西村耕一氏と共同で行われた研究の成果の一部です。

ご指導下さいました井口八郎博士に感謝いたします。

山岸秀夫博士には様々な面で助けていただきました、感謝いたします。

研究生活の始めに小関治男名誉教授に御指導いただいたことは何ものにも代えられない経験でした、感謝いたします。

Ian. G. Young 教授にはわざわざ大腸菌株を送っていただきました、ありがとうございました。

米井修治博士には、プラスミドや大腸菌株ばかりでなく、多くの貴重な助言をいただきました、感謝いたします。

最後に、研究においても、その他の生活でも、恒に楽しく過ごせるような環境を与えてくださった多くの人々に感謝いたします。

参考文献

- Abeliovich, A. and Shilo, M. (1972) *J. Bacteriol.*, **111**, 682-689.
- Alexander, K. and Young, I. G. (1978a) *Biochemistry*, **17**, 4745-4750.
- Alexander, K. and Young, I. G. (1978b) *Biochemistry*, **17**, 4750-4755.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1987) *Current protocols in molecular biology* (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York)
- Bar-Tana, J., Howlett, B. J. and Hertz, R. (1980) *J. Bacteriol.*, **143**, 637-643.
- Bentley, R. and Meganathan, R. (1987) Biosynthesis of the isoprenoid quinones ubiquinone and menaquinone, *in* "Escherichia coli and Salmonella typhimurium", 512-520. (American Society of Microbiology, Washington, D.C.)
- Bodannes, R. S. and Chan, P. C. (1979) *FEBS lett.*, **105**, 195-196.
- Buettner, G. R. and Oberley, L. W. (1979) *FEBS Lett.*, **98**, 18-20.
- Burchard, R. P. and Dworkin, M. (1966) *J. Bacteriol.*, **91**, 535-545.
- Burchard, R. P., Gordon, S. A. and Dworkin, M. (1966) *J. Bacteriol.*, **91**, 896-897.
- Camadro, J.-M. and Labbe, P. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 11675-11682.
- Carlioz, A. and Touati, D. (1986) *EMBO J.*, **5**, 623-630.
- Casadaban, M. J., Martinez-Arias, A., Shapiro, S. K. and Chou, J. (1983) *Methods Enzymol.*, **100**, 293-308.

- Chan, E. and Weiss, B. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3189-3193.
- Chang, A. C.-Y. and Cohen, S. N. (1978) *J. Bacteriol.*, **134**, 1141-1156.
- Chon, P.-I. and Khan, A. U. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 932-937.
- Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S. and Ames, B. N. (1985) *Cell*, **41**, 753-762.
- Christman, M. F., Storz, G. and Ames, B. N. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3484-3488.
- Clark, D. P. and Cronan, J. E. J. (1980) *J. Bacteriol.*, **144**, 179-184.
- Cunningham, R. P., Saporito, S. M., Spitzer, S. V. and Weiss, B. (1986) *J. Bacteriol.*, **168**, 1120-1127.
- Dailey, H. A. (1982b) *J. Biol. Chem.*, **257**, 11453-11459.
- Dailey, H. A. (1982a) *J. Biol. Chem.*, **257**, 14714-14718.
- Dailey, H. A. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 2711-2715.
- Dubbleman, T. M. A. R., De Goeij, A. F. P. M. and Van Steveninck, J. (1978) *Biochem. Biophys. Acta*, **511**, 141-151.
- Dundas, I. D. and Larsen, H. (1963) *Arch. Mikrobiol.*, **46**, 19-28.
- Dworkin, M. (1959) *Nature*, **184**, 1891-1892.
- Entsch, B., Ballou, D. P. and Massey, V. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2550-2563.
- Greenberg, J. T. and Demple, B. (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 3933-3939.

- Greenberg, J. T., Monach, P., Josephy, P. D. and Demple, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6181-6185.
- Hanson, J. W. and Dailey, H. A. (1984) *Biochem. J.*, **222**, 695-700.
- Hofsteenge, J., Vereijken, J. M., Weijer, W. J., Beintema, J. J., Wierenga, R. K. and Drenth, J. (1980) *Eur. J. Biochem.*, **113**, 141-150.
- Hosokawa, K. and Stanier, R. Y. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 2453-2460.
- Howell, L. G., Spector, T. and Massey, V. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4340-4350.
- Howlett, B. J. and Bar-Tana, J. (1980) *J. Bacteriol.*, **143**, 644-651.
- Hsu, J., Goldstein, B. D. and Harber, L. C. (1971) *Photochem. Photobiol.*, **13**, 67-77.
- Hsu, L. M., Zagorski, J., Wang, Z. and Fournier, M. J. (1985) *J. Bacteriol.*, **161**, 1162-1170.
- Ingledeew, W. J. and Poole, R. K. (1984) *Microbiological Reviews*, **48**, 222-271.
- Knoell, H.-E. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 919-925.
- Knoell, H.-E. (1981a) *FEMS Microbiol. Lett.*, **10**, 59-62.
- Knoell, H.-E. (1981b) *FEMS Microbiol. Lett.*, **10**, 63-65.
- Krasnovsky, A., A., Jr. (1979) *Photochem. Photobiol.*, **29**, 29-36.
- Kushner, S. R., Nagaishi, H., Templin, A. and Clark, A., J. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 824-827.
- Labbe-Bois, R. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 7278-7283.

- Lamola, A. A., Yamana, T. and Trozzolo, A. M. (1973) *Science*, **179**, 1131-1133.
- Li, J.-M., Russell, C. S. and Cosloy, S. D. (1989) *Gene.*, **82**, 209-217.
- Li, J.-M., Umanoff, H., Proenca, R., Russell, C. S. and Cosloy, S. D. (1988) *J. Bacteriol.*, **170**, 1021-1025.
- Loewen, P. C., Switala, J. and Triggs-Raine, B. L. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, **243**, 144-149.
- Lovet, S. and Clark, A. J. (1985) *J. Bacteriol.*, **162**, 280-285.
- Mathews, M. M. and Siström, W. R. (1959) *Nature*, **184**, 1892-1893.
- Miller, J. F. (1972) *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)
- Miyamoto, K., Nakahigashi, K., Nishimura, K. and Inokuchi, H. (1991) *J. Mol. Biol.*, submitted.
- Nakahigashi, K., Inokuchi, H. and Ozeki, H. (1990) *FEBS Lett.*, **265**, 59-62.
- Nakano, M., Asada, K. and Ohyanagi, Y. (1988) 活性酸素, 蛋白質核酸酵素, 33
- Nonet, M. L., Marvel, C. C. and Tolan, D. R. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 12209-12217.
- Oka, A., Sugisaki, H. and Takanami, M. (1981) *J. Mol. Biol.*, **147**, 217-226.
- Rimm, D. L., Horness, D., Kucera, J. and Blattner, F. R. (1980) *Gene*, **12**, 301-309.
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C. I. and Banaszak, L. J. (1975) *The enzymes*, **11**, 61-102.

- Russell, R. L., Abelson, J. N., Landy, A., Gefer, M. L., Brenner, S. and Smith, J. D. (1970) *J. Mol. Biol.*, **47**, 1-13.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)
- Sasarman, A., Nepveu, A., Echelard, Y., Dymetryszyn, J., Drolet, M. and Goyer, C. (1987) *J. Bacteriol.*, **169**, 4257-4262.
- Stauffer, L. T., Plamann, M. D. and Stauffer, G. V. (1986) *Gene*, **44**, 219-226.
- Sāsārman, A., Surdeanu, M., Szégli, G., Horodniceanu, T., Greceanu, V. and Dumitrescu, A. (1968) *J. Bacteriol.*, **96**, 570-572.
- Takeda, Y. and Avila, H. (1986) *Nucl. Acids Res.*, **14**, 4577-4589.
- Taketani, S. and Tokunaga, R. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 12748-12753.
- Tao, K., Makino, K., Yonei, S., Nakata, A. and Shinagawa, H. (1989) *Mol. Gen. Genet.*, **218**, 371-376.
- Taylor, B. L. and Koshland, D. E. J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **123**, 557-569.
- Taylor, B. L., Miller, J. B., Warrick, H. M. and Koshland, D. E. J. (1979) *J. Bacteriol.*, **140**, 567-573.
- Thomas, M., Cameron, J. R. and Davis, R. W. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4579-4583.
- Tiphlova, O. and Karu, T. (1990) *Photochem. Photobiol.*, **51**, 1S.
- Tobey, K. L. and Grant, G. A. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 12179-12183.

Touati, D. (1983) *J. Bacteriol.*, **155**, 1078-1087.

Touati, D. (1988) *J. Bacteriol.*, **170**, 2511-2520.

Triggs-Raine, B. L., Doble, B. W., Mulvey, M. R., Sorby, P. A. and Loewen, P. C.
(1988) *J. Bacteriol.*, **170**, 4415-4419.

Vieira, J. and Messing, J. (1987) *Methods. Enzymol.*, **153**, 3-11.

Walkup, L. and Kogoma, T. (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 1476-1484.

Watanabe, M., Furuya, M., Miyoshi, Y., Inoue, Y., Iwahashi, I. and Matumoto,
K. (1982) *Photochem. Photobiol.*, **36**, 491-498.

Weijer, W. J., Hofsteenge, J., Vereijken, J. M., Jekel, P. A. and Beintema, J. J.
(1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 385-388.

Wierenga, R. K., deJong, R. J., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. and Drenth, J. (1979) *J.*
Mol. Biol., **131**, 55-73.

Yanish-Perron, C., Viera, J. and Messing, J. (1985) *Gene*, **33**, 103-119.

Yoshimoto, T., Tone, H., Honda, T., Osatomi, K., Kobayashi, R. and Tsuru, D.
(1989) *J. Biochem.*, **105**, 412-416.

Young, I. G., Stroobant, P., MacDonald, C. G. and Gibson, F. (1973) *J. Bacteriol.*,
114, 42-52.