報告番号 乙第 1893 号

DNAの不連続複製機構

——短鎖DNAの合成開始に関与するRNA——

小川　徹

名古屋大学図書
和 826900

目次

頁

I. 要旨 ----- 5

II. 序論 ----- 10

III. 実験材料と方法 ----- 29

(a) バクテリア，バクテリオファージおよび培養の条件 ----- 29

(b) 標識化合物 ----- 31

(c) 酵素 ----- 32

(d) パルス標識 ----- 33

(e) 短鎖DNAの精製 ----- 34

(f) ポリヌクレオチドキナーゼ反応 ----- 37

(g) アルカリ処理した短鎖DNAの調製 ----- 40

(h) DNAの5'-モノヌクレオチドへの分解および5'-モノヌクレオチドへの同定 ----- 40

(i) DNAの密度標識 ----- 41

(j) DNaseによる短鎖DNAの分解 ----- 42

(k) [^{32}P]正リン酸による T7ファージ短鎖DNAの標識および短鎖DN

A の精製 ---- 43
(l) T7 プライマーRNA のヌクレアーゼによる分解 ---- 45
(m) クロマトグラフィーおよび電気泳動 ---- 46
(n) ヌクレオチドおよび核酸 ---- 48
(o) その他の実験材料と方法 ---- 51
IV. 結果 ---- 53
A. 大腸菌の RNA 連結短鎖 DNA ---- 53
(a) アルカリ分解により出現する 5'-水酸基末端の定量 ---- 53
(b) polA および lig 変異株の RNA 連結 DNA 分子数の測定 ---- 55
(c) RNA 連結 DNA 分子の 5' 末端標識 ---- 58
(d) RNA 連結 DNA 分子の密度標識 ---- 64
(e) リボヌクレオチド－デオキシリボヌクレオチド混成オリゴヌクレオチドの検出 ---- 66
(f) オリゴリボヌクレオチドの分析 ---- 70

(g) RNA－DNA結合に関与するデオキシリボヌクレオチドの分析 ----- 73
B. T7ファージのプライマーRNA ----- 75
(a) 短鎖DNAのアルカリ加水分解 ----- 75
(b) T4 3'→5'エキソヌクレアーゼによる短鎖DNAの分解 ----- 77
(c) 5'-三リン酸末端の検出 ----- 79
(d) 5'末端のジーおよびトリリボヌクレオチドの同定 ----- 82
V. 考察 ----- 85
(a) アルカリ分解によって出現するDNAの5'末端の標識 ----- 85
(b) RNA連結短鎖DNAの精製 ----- 90
(c) 大腸菌RNA連結DNAのRNA部分の構造と代謝および機能 ----- 95
(d) T7ファージのプライマーRNA ----- 100
(e) [^{32}P]正リン酸を用いて in vivo で短鎖DNAを標識する方法 ----- 103
(f) 総合的考察 ----- 106

略　　語 ----- 118
謝　　辞 ----- 119
参考文献 ----- 120
表 ----- 124
図 ----- 136

LIFE C151
20×20

I. 要旨

DNA複製は短鎖DNAの合成と連結の繰り返しから成る不連続的機構で進行する。短鎖DNA画分をアルカリ、又はRNaseで処理すると5′末端に水酸基を持ったDNAが生じることから、短鎖DNAの中にRNAを結合した分子があることが示唆され、RNAが短鎖DNA合成のプライマーになっているという考えが提唱されていた。しかしながら、実際に短鎖DNAの5′末端にRNAが共有結合していることを直接的に示す結果は何も得られておらず、実験結果と仮説の間にはギャップが存在していた。

本研究では、まず遊離のRNAを含まない短鎖DNAを単離する方法を確立し、次に大腸菌から単離した短鎖DNAをポリヌクレオチドキナーゼを用いたポストラベル法で解析した。短鎖DNA画分中に5′末端にRNAを共有結合している分子が存在していることが以下の結果から強く示唆された。1：精製の

全ステップを通じてDNAと挙動を共にするRNAが存在しており、このRNAはジメチルスルフォキシドで変性後も硫酸セシウム平衡密度勾配遠心でDNAの位置にバンドを形成する。2：短鎖DNA画分に存在するRNAの数が同量の同じ画分をアルカリ処理した時に出現する5'-水酸基末端を持つDNAの数に一致する。3：膵臓DNaseIまたはT4ファージDNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性で短鎖DNAを分解すると、過沃素酸処理に抵抗性で、しかも5'末端にリボヌクレオチドを持ったオリゴヌクレオチドが得られる。このことは、DNase分解物中に5'末端にリボヌクレオチドを、3'末端にデオキシリボヌクレオチドを持った混成オリゴヌクレオチドが存在することを意味している。また、密度標識法を用いて単離した、合成後間もない短鎖DNA分子の5'末端にRNAが結合していることから、RNA連結DNA分子は複製フォークで合成された新生DNA分

子であることが示唆された。

RNA連結DNAのDNA部分をT4DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性（および膵臓DNaseI）により分解してRNAの鎖長を測定した。RNA部分の鎖長は、以前に報告されていた値よりもずっと短かく、モノ～トリヌクレオチドであった。またこのRNAの一次構造はユニークではないことが判明した。これらはin vivoで分解途上にあったプライマー分子と考えられる。RNA-DNA連結部のデオキシリボヌクレオチドも以前の報告と異なってユニークではなく、4種類のヌクレオチドすべてが検出された。

また本研究において、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'-水酸基末端を持ったDNAを定量する方法を改良し、RNA連結DNAの数をより正確に定量する方法を確立した。この方法を用いて各種大腸菌変異株中に存在するRNA連結短鎖DNAを定量した結果から、DNAポリメラーゼIのnick translation（5'

→3'エキソヌクレアーゼ活性による分解と、ポリメラーゼ活性によるヌクレオチドの重合が共役した反応）によってRNAが除去されることが示唆された。

関らによるポストラベル法を用いた解析から、T7ファージのRNA連結環鎖DNAのRNA部分はAとCに富んだ塩基組成のモノ～ペンタリボヌクレオチドであることが判明した。またテトラーおよびペンタリボヌクレオチドの5'末端のジヌクレオチドはpA-Cであった。本研究では、これらのオリゴヌクレオチドの中に三リン酸末端を持ったintactな分子が存在するかどうかを検討した。[32P]正リン酸を取り込ませたT7ファージ感染菌から環鎖DNAを精製し、T4 DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を用いてDNA部分を分解した。分解物中に、5'末端にATP残基を持ったトリー、テトラー、およびペンタヌクレオチドが検出された。ペンタ

ヌクレオチドの大部分は3'末端にデオキシリボヌクレオチドを持っていたが、3'末端にリボヌクレオチドを持つ分子も少量検出された。ポストラベル法による結果から判断して、前者はintactなテトラリボヌクレオチド分子の3'末端にデオキシリボヌクレオチドが1残基結合したもので、後者はintactなペンタリボヌクレオチド分子そのものと考えられる。ATP末端を持ったトリー および テトラヌクレオチドは3'末端にデオキシリボヌクレオチドを結合していなかった。これらがintactな分子そのものかどうかは不明である。ポストラベル法で検出されたRNA連結短鎖DNAのRNA部分が^{32}Pで標識され、三リン酸末端を持った分子が検出されたことから、このRNAがDNA鎖合成のプライマーとして<u>de novo</u>に合成されているという可能性が強く示唆される。

II、序　論

DNAの複製は染色体上の特定の場所で開始して、両方向あるいは片方向に向って終点まで、巨視的にみて連続的に進行する(1-7)。DNAの合成は、巻き戻された二本の親鎖DNAの両方を鋳型にしてほぼ同時に、半保存的機構で進行する(8)。二本のDNA鎖はそれぞれ逆向きの極性を持っている(9)ため、合成される娘鎖の伸長方向は、巨視的にみて一方は5'→3'方向であり、他方は3'→5'方向である。二本の娘鎖が両方とも連続的に合成されるためには、5'→3'方向にヌクレオチドを重合するDNAポリメラーゼと、3'→5'方向にヌクレオチドを重合するDNAポリメラーゼが存在しなければならない(図1A)。しかしながら、既存のDNAポリメラーゼは全て5'→3'方向のヌクレオチド重合活性を示し、逆向きの重合活性を持ったポリメラーゼは知られていない(10)。この矛盾を解決するために提出されたのが、不連続複製モデルである

(11, 12)。岡崎らは大腸菌およびT4ファージ感染菌において、合成直後のDNAは鎖長1000～2000ヌクレオチドの短鎖として存在していることを発見し、DNAの複製は5′→3′方向に合成された短鎖が連結されることによって進行するというモデルを提唱した(11-14)。in vivoでの巨視的なDNA合成の方向と、DNAポリメラーゼがin vitroで示すヌクレオチドの重合方向の矛盾は、巨視的に3′→5′方向に伸長するDNA鎖のみが不連続的に複製されるモデル(図1B)で解決できるが、両鎖とも不連続的に複製されるモデル(図1C)も可能である。

短鎖DNAはその後数年間の研究から、原核生物からヒトを含む真核生物に至る多くの生物において普遍的に存在していることが明らかとなった(15-19)。短鎖DNAが不連続複製の中間体であることを支持する主な結果は次のとうりであった。1：放射性のDNA前駆体(チミンまたはチミジン)でパルス標識

すると、放射能は最初に短鎖DNAにとり込まれ、標識時間が長くなるにつれて長鎖DNAに移る(14)。2：DNAの連結に関与する酵素(DNAリガーゼおよびDNAポリメラーゼI)の存在が明らかになり、これらを一時的に阻害すると短鎖DNAが蓄積することが判明した(20-28)。3：T4ファージの短鎖DNAは実際に5′→3′方向に合成されている(29)。また電子顕微鏡によるDNA複製点の観察からも、不連続複製モデルが支持された(30-33)。

一方、Tyeらは大腸菌dut(sot)変異株(dUTPase欠損株)を用いた研究から、短鎖DNAのかなりの部分は不連続複製によって生じたものではなく、DNAにとり込まれたウラシル残基の除去修復の中間体として生じた可能性があると報告した(34-37)。その後単離されたウラシルDNA-グリコシラーゼ欠損株を用いた研究から、通常の細胞内にはその様な中間体は殆んど存在していないことが判

明した(38－40)。しかしながら、短鎖DNAが他の未知の機構によって、合成直後のDNA鎖の切断により生じたものであり、実際の複製中間体は検出されていないという可能性は否定できない。短鎖DNAが不連続複製における真の中間体であることを証明するためにも、短鎖DNAの合成開始の機構を解明することが重要である。

既存のDNAポリメラーゼはRNAポリメラーゼと異なり、de novoにDNA鎖の合成を開始することができず、3′－水酸基末端を持ったオリゴ－あるいはポリヌクレオチドをプライマーとして要求する(10)。従って短鎖DNAの合成に際して、プライマーがどの様に供給されるのかが問題となる。プライマーの供給に関して最初に出されたモデルは"knife and fork モデル"(15, 41, 42)であり、次に提出されたのが"prefork synthesis モデル"(43)であった。前者は5′→3′方向に連続的に合成されるDNA鎖がある時点で反対側の鋳型D

NA上に乗り移って、フォークの進行方向に対して逆向きに伸長し、その後乗り移った地点で娘鎖に切断が入るというモデルであり、後者はフォークの上流で親鎖DNAに切断が入り、切断点の5'水酸基末端が娘鎖合成のプライマーになるというモデルである。しかしながらこれらのモデルの実験的裏付けは得られなかった。1971年、Brutlagらは、大腸菌を宿主とするファージM13のDNA複製開始がRNAポリメラーゼの特異的阻害剤であるリファンピシンによって阻害されることから、DNAの合成開始にRNAがプライマーとして関与しているというモデルを提唱した(44)。一方、同じ年にVermaらは逆転写酵素(reverse transcriptase)がRNAを鋳型にしてDNAを合成する際にRNAがプライマーになることを示唆する結果を発表した(45)。この二つの報告を契機に、短鎖DNAの合成がRNAによって開始されているという可能性が当研究室において検討され、間もなく新生短鎖DNAの

5′末端にRNAが共有結合していることを示唆する以下の結果が得られた(46-48)。1：[^{3}H]チミジンで短時間パルス標識した細胞から抽出したDNAは、硫酸セシウムの平衡密度勾配遠心にかけると通常のDNAよりも浮上密度のやや重い位置にバンドを形成する。バンドの位置はRNase処理や、アルカリ処理により、通常のDNAの位置へ移動する。またパルス標識の時間を長くして行くと標識されたDNAの浮上密度は減少し、最終的に通常のDNAと同じ浮上密度を示す(46)。2：[^{3}H]ウリジンでパルス標識すると、RNAにとり込まれた放射能の一部が、硫酸セシウム中で[^{3}H]チミジンでパルス標識したDNAと同じ浮上密度を示す(46)。3：トルエン処理大腸菌に[α-^{32}P]dCTPをとり込ませ、合成された短鎖DNAを抽出してアルカリまたは膵臓RNase Iで処理すると、放射能はリボヌクレオチドとして回収される(47)。このことは短鎖DNA中にrPy-dCという結合が存在す

ることを示している。4：[^{3}H]チミジンでパルス標識した細胞から精製した短鎖DNAをアルカリまたはRNaseで処理すると鎖長が50～100ヌクレオチド減少する。また[^{3}H]ウリジンでパルス標識した細胞から精製した短鎖DNAを膵臓DNaseIまたはT4DNAポリメラーゼに付随している3′→5′エキソヌクレアーゼ活性で分解すると、50～100ヌクレオチドの鎖長のRNAが回収される(48)。これらの結果は、短鎖DNAの5′末端に鎖長50～100ヌクレオチドのRNAが結合していることを示唆している。5：短鎖DNAをあらかじめ未標識のATPとポリヌクレオチドキナーゼで処理して全ての5′末端をリン酸化した後アルカリで処理し、更に[γ-^{32}P]ATPとポリヌクレオチドキナーゼで処理するとDNAが^{32}Pで標識される。標識されるDNAの末端数は、同量の試料をアルカリ分解せずにフォスファターゼで処理し、同じ方法で標識した時に標識されるRNAの末端数に等しい(48)。このことはDNAの5′末端にRN

Aが結合しており、アルカリ処理によってRNAが分解されて新たに5'-水酸基末端を持ったDNAが出現することを示唆している。

しかしながら、その後の研究から上記のRNA連結DNA分子の検出方法にはいくつかの問題点があることが判明してきた。セシウム溶液中でパルス標識したDNAの浮上密度の変化を見る実験は、当研究室において筆者を中心に数回の追試を試みたが再現不能であり、精製短鎖DNAを用いなければ正確な浮上密度は求まらないことが判明した。更に[^{3}H]ウリジンで標識した細胞から短鎖DNAを精製すると、精製の初期段階では確かに短鎖DNAと挙動を共にするRNAが存在するが精製を進めるとこれらのRNAはDNA画分から分離できることが判明した。同様な結果は、その後他の研究グループからも相次いで報告された(I.R. Lehman, 私信; 49, 50)。トルエン処理菌を用いた^{32}Pのデオキシリボヌクレオチドからリボヌクレオチドへの転移の実

験は、検出方法に問題があることが判明した。またこの方法は、in vitro の系にしたために生じる反応を区別することが困難であり、更にDNA中へのリボヌクレオチドのとり込み(51)、RNA中へのデオキシリボヌクレオチドへのとり込み(52)、標識基質中へのリボヌクレオチドの混入等の可能性を検討しなければならず、一見有効に見えても、RNA連結短鎖DNAの検出方法としては問題があることが判明した。更にポリヌクレオチドキナーゼを用いてアルカリ分解後に出現するDNAの5'-水酸基末端を定量する方法は、この酵素がDNAの5'末端のリン酸基をATPのγ位のリン酸基で置き換える反応をすることが判明したために(53)、RNAを連結していないDNAが多量に共存する場合は使用できない方法であることが判明した。また細胞および短鎖DNAの精製途上に用いる試薬および器具類からポリヌクレオチドキナーゼの活性を阻害する物質が混入するために、定量的な

解析を行う場合は短鎖DNAの精製に充分注意を払い、更にリン酸化反応が定量的に進行することを確認しながら解析を進めなければならないことが判明した。

以上の理由から、RNAが短鎖DNAの合成に関与しているという考えはその実験的根拠を失ない、新たにRNA連結短鎖DNA分子の検出方法から検討しなおす必要が生じてきた。in vivoで合成された短鎖DNAの5'末端にRNAが共有結合しているか否かを検討する最も簡便な方法は、アルカリ分解またはRNase処理によって5'末端に水酸基を持ったDNAが出現するかどうかを調べる方法である。アルカリ処理により5'-水酸基末端DNAが生じることは、必ずしもRNA連結DNA分子が存在することを意味しておらず、また RNaseを用いた場合でも、5'末端付近への非共有的結合の可能性や、5'末端付近のDNAの内部にリボヌクレオチドが存在しているという可能性が否定できないので、最終的には別の方法を用いて検討し直さなければ

ならないが、この方法はRNAとDNAの非共有的結合によって解析を妨害される心配がなく、また簡便であるために、未知の試料を用いてRNA連結DNA分子の存在を検討するのに適した方法である。5'-水酸基末端を持ったDNAを検出・定量する方法として最初に検討したのは、脾臓エキソヌクレアーゼを用いて5'-水酸基末端を持ったDNAを選択的に分解する方法である(54)。この酵素は5'末端に水酸基を持つオリゴヌクレオチドを選択的に分解することが知られており(55)、以前当研究室において短鎖DNAの5'末端を含むDNA断片を単離する目的で使用されていた(56)。この酵素で短鎖DNAに相当する鎖長のDNAを完全に分解することはできないが、5'-水酸基末端DNAと5'-リン酸基末端DNAの混合物中で、5'-水酸基末端を持ったDNAが占める比率は、試料をそのままこの酵素で処理した時に分解される割合と、フォスファターゼ処理して全5'末端を水酸基にした

時に分解される割合の比から求めることが可能である。[^{3}H]チミジンでパルス標識した大腸菌から短鎖DNAを部分精製し、ATPとポリヌクレオチドキナーゼで処理して全5'末端をリン酸化した後、アルカリまたはRNaseで処理して得られた短鎖DNAをこの方法で分析したところ、5'-水酸基末端を持ったDNA分子が存在していることが判明した(54)。

一方ポリヌクレオチドキナーゼを用いてアルカリ分解後に出現するDNAの5'-水酸基末端を定量する方法は、5'-リン酸基末端DNAを含む試料にも適用できるように改良を試みた結果、リン酸化の反応を0°Cで行えば、ほぼ5'-水酸基末端DNAのみを選択的に標識できることが判明した(57)。この方法を用いた解析からも、大腸菌短鎖DNA中にはアルカリ処理により5'-水酸基末端DNAを生じる画分があることが示された(57, 58)。脾臓エキソヌクレアーゼ法は[^{3}H]チミジンでパルス標識されたDNAを分析するため、新たに合成さ

れたDNAのみに着目できる方法である。一方ポリヌクレオチドキナーゼを用いる方法は新生短鎖DNAに特異的でないために、複製フォークに由来しないRNA連結短鎖が存在すれば測定されるが、この方法を用いることにより5'-水酸基末端の絶対量とRNA-DNA連結部のデオキシリボヌクレオチドの塩基組成を求めることができる。膵臓エキソヌクレアーゼおよびポリヌクレオチドキナーゼを用いた解析から、大腸菌においてDNAポリメラーゼIを一時的に阻害すると、アルカリ分解後に出現する5'-水酸基末端DNAの量が数倍増加することが示された(54, 57, 58)。

RNA連結DNAが存在することを直接的に証明するためにも、またRNAプライミングのより詳細な機構を知るためにも、まずRNAを連結した状態の短鎖DNAを単離しなければならない。本研究では大腸菌から遊離RNAを殆んど含まない短鎖DNA画分を得る方法を確立し、この画分にRNAを5'末端

に共有結合したDNAが実際に存在していることを証明した。またこのRNAを連結した短鎖DNAが複製フォークに由来する新生DNAであることを示唆する結果を得た。RNA部分の鎖長は以前に報告されていた値よりもはるかに短かく、鎖長1～3ヌクレオチドであり、ユニークな一次構造を持っていないことが判明した。これらのオリゴリボヌクレオチドは in vivo で分解酵素にあったプライマー分子と考えられる。

また本研究において、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'-水酸基末端DNAを定量する方法を改良し、RNA連結短鎖DNAの数をより正確に定量する方法を確立した。この方法を用いた解析から、大腸菌 polA 480株（DNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の ts 変異株）、polA 413株（DNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼとポリメラーゼの両方の活性の ts 変異株）および polA 12株（DNAポリメラーゼIのポリ

メラーゼ活性のts変異株）においては、高温（43°C）で野生株および lig ts 7 株（DNAリガーゼ活性のts変異株）に比して、2～9倍程度RNA連結DNA分子が蓄積することが示された。この結果は、DNAポリメラーゼIの nick translation によってRNA部分が分解されることを示唆している。またRNAとの結合に関与するデオキシリボヌクレオチドとして、4種類のヌクレオチドすべてが検出された。

短鎖DNAの精製方法が確立し、またポリヌクレオチドキナーゼと[γ-32P]ATPを用いてRNA連結短鎖DNAの5′末端を32Pで標識し、更にRNA部分を単離してその構造解析を行うことが可能となったために、当研究室においていくつかの原核生物の系について手分けして解析が行われた。その結果バクテリオファージT7では、短鎖DNAに結合しているRNA分子は鎖長1～5ヌクレオチドであ

り、テトラリボヌクレオチドの塩基配列はpA-C-C-Nまたは pA-C-A-N（いずれの場合もNはA及びCに富む）であることが判明した（59, 60）。ペンタリボヌクレオチドの5'末端のジヌクレオチドはテトラリボヌクレオチドの場合と同様にpA-Cであった。またモノヌクレオチドおよびジー，トリヌクレオチドの5'末端の塩基はいずれもAとCに富んだ組成であった。一方、T4ファージの鋳鎖DNAに結合しているRNA分子も同様に鎖長1～5ヌクレオチドであった（59, 61）。ペンタリボヌクレオチドはRNA分子全体の約40%を占め、その5'末端のジヌクレオチドはpA-Cであった。テトラリボヌクレオチドの5'末端の塩基はAであったが、トリリボヌクレオチド以下の5'末端の塩基はユニークではなかった。T4，T7いずれの場合もペンタリボヌクレオチドよりも長い分子は検出されないことから、ペンタリボヌクレオチドは分解を受けていない完全なプライマー分子であるという

可能性が考えられる。またテトラリボヌクレオチドの5′末端はpCではなくてペンタリボヌクレオチドの場合と同じくpAであることから、この分子も同様に完全なプライマー分子であるという可能性が考えられる。しかしながら、大腸菌を用いた本研究から示唆された様に、RNase Hがプライマーの除去に関与していて、より長いプライマーRNAからペンタヌクレオチド以下の分子が生じている可能性も否定できない。またトリリボヌクレオチド以下の分子についても、それらが分解途上のものなのか、またはintactな分子が含まれているのか不明である。

プライマー分子がde novoに合成されていると仮定すれば、intactな分子は5′末端に三リン酸を結合していることが予想される。もし三リン酸末端を持った分子が検出できればintactなRNA分子についての情報が得られるばかりでなく、そのRNA分子がde novoに合成されたものであり、実際に短鎖DNA

合成のプライマーとして機能しているという可能性がより強く示唆される。

生体内で合成されているRNA連結短鎖DNA分子の5′末端にミリン酸が結合しているか否かを検討する最も直接的な方法は、[^{32}P]正リン酸をとり込ませた細胞から短鎖DNAを精製して5′末端の構造を解析する方法である。T7ファージではファージの遺伝子6の産物である5′→3′エキソヌクレアーゼと宿主大腸菌のDNAポリメラーゼIを同時に阻害するとRNA連結短鎖DNA分子が著しく蓄積することが知られており(59, 60, 62)、この系を利用することによりRNA連結DNA分子を比較的多量に調製することができる。従って本研究では、この系を用いてT7ファージのRNA連結短鎖DNAを in vivo で[^{32}P]正リン酸により標識し、5′末端にミリン酸を持ったRNA連結DNA分子を検出することを試みた。その結果、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて検出されたモノ～ペンタリボヌクレオチド

分子が実際に［^{32}P］正リン酸により in vivo で標識されること，さらにテトラ－およびペンタリボヌクレオチドは5′末端に三リン酸を結合していることが判明した。

III. 実験材料と方法

(a) バクテリア，バクテリオファージおよび培養の条件

大腸菌々株 RS 5064 (polA 480, trp), KS 268 (liq ts7, thy) および MM 383 (polA 12, thy) は各々 I. R. Lehman 博士（スタンフォード大学），E. B. Konrad 博士（スタンフォード大学）および小川英行博士（大阪大学）より分与された。C-N 27 株（polA 4113, his）および C-N 3 株（polA 480, his）は篠崎一雄博士（名古屋大学，現在国立遺伝学研究所）より分与された。これらの菌株以外に W3110 株（野生株），W3110 T⁻ 株（thy），および B 3 株（thy）を使用した。バクテリオファージ T7 ts 136（遺伝子 6 の ts 変異株）は F. W. Studier 博士（Brookhaven National Institute）より分与された。

大腸菌の RNA 連結阻害 DNA の研究では菌株はすべて 0.5 % カザミノ酸を添加した A 培地 (25)（RS 5064 の場合は最終濃度 20 μg/ml のレートリプトファンを，チミン要求株の場合は最終濃度

2 μg/ml のチミンをさらに添加した）中で振とう培養により増殖させた。

T7ファージのプライマーRNAの研究では、低リン酸カザミノ酸を添加したM9培地を使用した。この培地は18.7 mM NH_4Cl, 20 mM KCl, 80 mM NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.4%(w/v) グルコース, 1 mM $MgSO_4$, 10 μM $FeCl_3$, 0.5%(w/v) 低リン酸カザミノ酸、および 488 μM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.3) を含む。リン酸イオンの濃度を上げ、カザミノ酸を加えた点以外は原報 (63) に準じている。低リン酸カザミノ酸は以下のとおり作成した。20% カザミノ酸 (Difco, Certified) 50 ml に 1 M $MgCl_2$ 8 ml および濃アンモニア水 1.8 ml を加え、0°C で3時間撹拌した。生じた沈澱 ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) を沪過して除き、沪液を減圧下に一晩放置後塩酸を加えて pH を 7.3 に調整し、水を加えて液量を 50 ml に合わせた。この脱リン酸処理後のカザミノ酸には、Martin と Doty の方法 (64) で測定して 480 μM

の無機リンと1.8 mMの有機リンが含まれていた。この培地中で30°Cで6×10⁸細胞/mlまで増殖させた大腸菌を遠心により集菌し、リン酸カリウム緩衝液を含まない等量の低リン酸M9－カザミノ酸培地に懸濁した。30°Cで10分間培養後、T7ファージをm.o.i. 10で感染させた。ファージ感染後のDNA合成の様式は[³H]チミジンの取り込み速度の時間経過および[³H]チミジンでパルス標識されるDNAのアルカリ性ショ糖密度勾配中での沈降パターンでみる限り、通常のM9－0.5%カザミノ酸培地を用いた場合と全く同じであった。

(b) 標識化合物

[メチル-³H]チミン(49.5 Ci/mmol)および[メチル-³H]チミジン(20～58 Ci/mmol)は、New England Nuclear社(米国)より購入した。[γ-³²P]ATP(15,700～62,300 cpm/pmol)は、Radiochemical Center社(英国)より購入したものまたは[³²P]正リン酸よりGlynnとChappellの

方法（65）に従って調製したものを使用した。〔32P〕正リン酸は原子力研究所またはNew England Nuclear社の製品を使用した。

（c）酵素

バクテリオファージT4ポリヌクレオチドキナーゼ，大腸菌アルカリ性フォスファターゼおよびT4 DNAポリメラーゼは，各々Richardson（66），Torriani（67）およびHuangとLehman（68）の方法に従って，研究室員が手分けして精製したものを使用した。ヌクレアーゼSWは向井純一郎博士（九州大学）より恵与いただいたものまたは生化学工業株式会社より購入したものを使用した。ヘビ毒フォスフォジエステラーゼは，Worthington Biochemical社より購入したものを，SulkowskiとLaskowskiの方法（69）に従って混入しているヌクレオチダーゼ活性を除去して使用した。牛膵臓DNaseI（シグマ社，DN-EP）はGarrettらの方法（70）に従ってベントナイト処理したも

のを使用した。ヌクレアーゼP1（Penicillium citrinumのヌクレアーゼ）は岡中明博士（ヤマサ醤油株式会社）より、また大腸菌RNAポリメラーゼ（ホロ酵素）は石浜明博士（京都大学）より恵与された。

T4DNAポリメラーゼ、大腸菌アルカリ性フォスファターゼおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼは、λAファージの一本鎖DNAおよびf2ファージのRNAを用いたトランスフェクションによる測定（48）で、DNaseおよびRNase活性が認められなかった。またベントナイト処理したDNaseIは、f2ファージRNAを用いたトランスフェクションによる測定で、RNase活性が認められなかった。

(d) パルス標識

[^{3}H]チミジンによるパルス標識は、30°Cまたは43°Cで細胞濃度約8×10^8/mlの培養液（40～300 ml）に[^{3}H]チミジン（2.5～58 Ci/mmol）を最終濃度が0.1 μMまたは0.2 μM

になるように添加し、20～40秒間振とうすることによって行なった。43°Cでパルス標識する場合は、30°Cで培養した培養液（50ml以下）をあらかじめ43°Cに保温しておいた培養フラスコに移し、43°Cで3分間振とうした後［^{3}H］チミジンを添加した。標識の停止は、培養液を等量の75%エタノール－2%フェノール－21mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.1）－2mMEDTAと混合することにより行った。

(ｃ) 短鎖DNAの精製

RNAのDNAへの非共有的結合、および長鎖DNAの剪断（shearing）による短鎖DNAへの混入を最小限に食い止めるという観点から、本研究では、以下の短鎖DNAの精製法を採用した。

パルス標識した細胞を遠心により集菌後、培養液の1/10容の10mMEDTA－1%N－ラウロイルサルコシン酸ナトリウムに懸濁し

9/10容の1%SDS－SSC－27%(w/v)ショ糖－10mM EDTAを加え，37°Cで10分間保温して溶菌させた。この溶菌液をプロナーゼ処理およびフェノール処理し，得られた核酸を0.1×SSC－0.01%SDSに対して透析した。透析後エタノール沈澱により濃縮した核酸を培養液の1/10容の0.1×SSC－0.1%SDS－1mM EDTAに溶解し，同じ組成の溶液に対して透析した後沸騰水中で4分間処理し，氷－食塩水中で急冷して変性させ，同じ溶液を含む5－20%(w/v)のショ糖密度勾配遠心にかけて短鎖DNA画分（約1800ヌクレオチド以下）を得た（図2）。大部分のcoldなDNAおよびRNA（16Sおよび23S rRNA）はこの段階で除去できた。プールした短鎖DNAをエタノール沈澱で濃縮後，最初の培養液の1/50容の5mM Tris-HCl (pH7.4)－10mM NaCl－0.1mM EDTAに溶解し，同じ組成の溶液に対して透析した後90°Cで2分間加熱し，急冷後ニトロセルロースのカラ

ムクロマトグラフィーを行った（図3）。RNAの大部分は非吸着画分に、DNAの大部分は吸着画分に回収された。DNA画分を5mM Tris-HCl (pH 8.0) - 0.1mM EDTAに対して透析後、培養液の約1/100に濃縮し、10mM Tris-HCl (pH 8.0) - 0.1mM EDTAに対して透析した（ニトロセルロース画分）。

うべしされたDNAの回収率は、シュ糖密度勾配遠心の後で90%以上であった。またシュ糖密度勾配遠心でプールしたカウントの70～80%がニトロセルロース画分に回収された。RNA連結短鎖DNAをアルカリ分解することによって出現する5'-水酸基末端DNAを分析する場合には、ニトロセルロース画分をそのまま使用した。RNAを連結したままの短鎖DNAをポリヌクレオチドキナーゼと[γ-32P]ATPによりポストうべしして分析する場合には、更に以下の精製操作を行った。

ニトロセルロース画分に存在する核酸の全

5′末端を反応条件(iii)[(f)を参照]を用いて^{32}Pで標識した。未反応のATPおよび低分子核酸をセファデックスG100のゲル沪過で除いた後、90°Cで2分間加熱し、急冷後硫酸セシウムの平衡密度勾配遠心を行った。遊離RNAの除去が不完全な場合には、再度硫酸セシウム平衡密度勾配遠心を行った。DNA画分をプールし、10mM Tris-HCl (pH 8.0)-0.1mM EDTAに対して透析した([5′-^{32}P]短鎖DNA)。この精密度勾配遠心でプールした短鎖DNAの40～50%が回収された。

上記の操作中使用した器具および試薬溶液類は、可能な限り乾熱滅菌(200°C、4時間)またはオートクレーブ(120°C、2気圧、20分)処理したものを使用した。また実験操作はポリエチレン手袋をして行った。

(f) ポリヌクレオチドキナーゼ反応

ポリヌクレオチドキナーゼ反応には、以下の3種類の条件を使用した。モデルDNAを

用いた反応は、いずれの条件下でも定量的に進行する。核酸試料はすべて反応直前に90°Cで2分間加熱後氷水中で急冷したものを用いた。

(i) マスキング

試料中に存在する全ての核酸の5′末端を未標識のATPを用いてリン酸化する場合は、以下の組成の反応液を用いた。67mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM $MgCl_2$, 17mM 2-メルカプトエタノール, 40μM ATP, 2~5nM*ポリヌクレオチドおよび100ユニット/mlの酵素。反応は37°Cで30分間行った。

(ii) 5′-水酸基末端の選択的標識

5′-水酸基末端と5′-リン酸基末端を持つDNAの混合溶液中で前者のみを選択的に標識する際には、以下の組成の反応溶液を用いた。67mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM $MgCl_2$, 17mM 2

---

*: オリゴ-およびポリヌクレオチドの濃度はすべて、オリゴマーおよびポリマーの濃度で表示した。

－メルカプトエタノール，16μM［γ-32P］ATP，2～5nMポリヌクレオチドおよび332ユニット/mlの酵素。反応は0°Cで60分間行った。

(iii) 非選択的標識

試料溶液中に存在する核酸の全末端を標識する場合は，次の方法に従った。まず10mM Tris-HCl (pH 8.0)，1mM MgCl2，0.1mM EDTA，3～8nMポリヌクレオチドを含む溶液に大腸菌アルカリ性フォスファターゼを最終濃度が0.4ユニット/mlになるように加え，37°Cで30分間保温して核酸の全末端のリン酸基を除去した。次に下記の反応液中で37°C，30分間のリン酸化反応を行った。67mM Tris-HCl (pH 8.0)，10mM MgCl2，17mM 2－メルカプトエタノール，1.5mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8)，16μM［γ-32P］ATP，2～5nMポリヌクレオチドおよび67ユニット/mlのポリヌクレオチドキナーゼ。

(g) アルカリ処理した短鎖DNAの調製

(f)(i)の条件でマスキングした短鎖DNAは、セファデックスG-100のカラムを通して未反応のATPを除き、マスキング処理前の容量まで濃縮した後、10mM Tris-HCl (pH 8.0) - 0.1mM EDTAに対して透析した。次に0.15N NaOH中で37°Cに20時間保温した後中和して10mM Tris-HCl (pH 8.0) - 0.1mM EDTAに対して透析した。

(h) DNAの5'-モノヌクレオチドへの分解および5'-モノヌクレオチドの同定

5'-^{32}P-DNA (10-40 fmol) を20mM Tris-HCl (pH 8.0) - 10mM $MgCl_2$ および10μg 膵臓DNase Iを含む反応液 (50μl) 中で37°C, 2時間処理後、5μlの1Mグリシン-KOH緩衝液 (pH 9.2) と25μgの蛇毒フォスフォジエステラーゼを加えて更に37°Cで90分間処理した。反応終了後、4種の5'-dNMP (各25~40nmol) と共にPEI-セルロースプレート (Polygram

Cel 300 PEI, Macherey-Nagel, 西独）にスポットした。0.25 M ギ酸を用いて溶媒の先端が原点から 10 cm 上昇するまで展開した後風乾し、さらに 0.5 M ギ酸リチウム緩衝液（pH 3.0）で原点から 18 cm まで展開した（71）。風乾後 0.5～1 cm 間隔に刻んで各切片の放射能を測定した。

(i) DNA の密度標識

DNA を密度標識する場合には、重水（重水素含量 99.75 %, Merck 社）中に以下の化合物を含む"重い培地"を使用した。0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.3）, 3.7 mM $(^{15}NH_4)_2SO_4$（ネー化学）, 2 μM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, 1 mM $MgSO_4$, 1 % (w/v) グルコース, 0.1 % (w/v) 重水素化藻加水分解物（Canada Merck 社）および 20 μg/ml L-ヒスチジン（大腸菌 C-N27 株の場合）または 2 μg/ml チミン（大腸菌 W3110 T⁻ 株の場合）。この培地で大腸菌を培養する場合、重い培地と通常の"

軽い培地"［(a)の項参照］を3:1の割合で含む培地中で前培養した細胞を低速遠心（5000 g，5分）により集菌し，重い培地に移した（細胞初濃度 6×10^6/ml）。重い培地から軽い培地へ変更する場合は，培養液を氷水中で冷却して低速遠心で集菌し，冷却した等量の軽い培地で洗浄後，30°Cに保温しておいた等量の軽い培地に懸濁した。

(j) DNaseによる短鎖DNAの分解

［5'-^{32}P］短鎖DNAを膵臓DNaseIで分解する場合は，50mM Tris-HCl（pH 7.2），20mM $MgCl_2$，15mM $CaCl_2$，24μg大腸菌tRNA，^{32}P標識試料，および20μgの酵素を含む反応液（200μl）を37°Cで1時間保温後，更に20μgの酵素を加えて1時間保温した。

DNaseIとT4DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼの両方で分解する場合は，まず50mM Tris-HCl（pH 8.0），10mM

$MgCl_2$, 12 μg 大腸菌 tRNA, ^{32}P 標識試料および 10 μg の DNase I を含む溶液（100 μl）を 37°C で 1 時間保温後、2-メルカプトエタノール（10 mM）と T4 DNA ポリメラーゼ（4.9 ポリメラーゼユニット/ml）を加えて更に 37°C で 2 時間保温した。

T4 DNA ポリメラーゼの 3'→5' エキソヌクレアーゼのみで分解する場合は、50 mM Tris-HCl（pH 8.6）, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 120 μg/ml 大腸菌 tRNA, ^{32}P 標識短鎖 DNA（5～10 mM）および酵素（5～10 ポリメラーゼユニット/ml）を含む反応液を 37°C で 2 時間保温した。

(ル) [^{32}P] 正リン酸による T7 ファージ短鎖 DNA の標識および短鎖 DNA の精製

大腸菌 C-N3 株（polA 480）の培養液（80 ml）に T7 ファージ ts136 株を感染させ、感染と同時に 25 mCi の $H_3{}^{32}PO_4$ を加えた。30°C で 19 分間培養後、43°C に移した。2 分

後に等量の75%エタノール-2%フェノール-21mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.1）-2mM EDTAと混合して操作を停止した。$H_3{}^{32}PO_4$を添加する時期は、細胞内のrNTPプールの比放射能が十分高くなり、4種のrNTPの放射能がほぼ等しく、しかもα、βおよびγ位の各リン酸基の比放射能もほぼ等しくなる時期を検討して決定した（結果未掲載）。

核酸DNAの精製は、ニトロセルロース画分までは（e）に記された方法に従い、以後の操作は下記の通り行った。ニトロセルロース画分を5mM Tris-HCl（pH7.5）-1mM EDTAに対して透析した後90°Cで2分間処理して氷水中で急冷し、硫酸セシウムの平衡密度勾配遠心を行った。この平衡密度勾配遠心は、更に2回繰返し、各遠心の前にはプールした画分を上記のとうり透析後、90°Cで2分間熱処理した。最後の遠心で得られたDNA画分（4ml）を5mM Tris-HCl（pH7.5）-1mM EDT A

に対して透析後、1.6 ml に濃縮し、90°C で 2 分間処理してもつぎ デックス G-100 カラム（1.5φ × 29 cm）を通過させ低分子夾雑物を除去した。得られた短鎖 DNA を 0.5 ml に濃縮し、10 mM Tris-HCl（pH 8.0）- 0.1 mM EDTA に対して透析した。

(l) T7 ファージプライマー RNA のヌクレアーゼによる分解

T7 短鎖 DNA を T4 DNA ポリメラーゼの 3'→5' エキソヌクレアーゼで処理して得られたオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ P1 による分解は、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）、10 - 100 nmol オリゴヌクレオチドおよび 10 μg の酵素を含む反応液（20 - 25 μl）中、37°C で 90 分間行った。またヌクレアーゼ SW による分解は、50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液（pH 10.4）、0.1 M NaCl、2 mM 酢酸マグネシウム、100 nmol オリゴヌクレオチドおよび 60 ユニットの酵素から成る反応液（100 μl）を用い

、37°Cで6時間行った。蛇毒フォスフォジエステラーゼ処理は、30mMグリシン-KOH緩衝液(pH 9.0)、2.5mM $MgCl_2$、70-140nmolヌクレオチドおよび10μgの酵素から成る反応液(24μl)中で、37°Cで90分間行った。

(m) クロマトグラフィーおよび電気泳動

ニトロセルロースカラムクロマトグラフィーで短鎖DNAを精製する場合は、以下の操作を行った。最初の大腸菌培養液の1/5容の短鎖DNA溶液〔5mM Tris-HCl (pH 7.4)-10mM NaCl-0.1mM EDTAを含む〕を90°Cで2分間処理して氷水中で急冷し食塩の5M水溶液を加えて最終濃度を0.5Mにした。この試料溶液を5mM Tris-HCl (pH 7.4)-0.5M NaCl-1mM EDTAで平衡化したニトロセルロースカラム(培養液の1/30のベッド容)にかけ、6~8カラム容の同じ溶液で洗浄後、0.05%SDS-0.1mM EDTAで吸着した短鎖DNAを溶出した。

DNase 分解物は、以下の通りDEAE-セファデックスA-25カラムを用いてヌクレオチド鎖長に従って分画した。EDTAを加えて反応を止めた分解物を7～10倍に希釈して尿素を最終濃度7Mになる様に加え、DEAE-セファデックスA-25のカラム（0.25×20 cm）にかけた。溶出には特に記載してある場合を除いて7M尿素・20mM Tris-HCl（pH 8.0）を含む0-0.4M NaCl の直線濃度勾配（全量100 ml）を用いた。

沪紙電気泳動は東洋沪紙No 50 又はNo 51Aを用いて0.05Mクエン酸緩衝液（pH 5.0）中で1250V/55 cm の電圧をかけて45～60分間行った。

ボロン酸ゲルカラムは岡山らの方法（72）に従って調製した。このカラムを用いてシス-ジオール化合物を持つ化合物と持たない化合物を分離する場合は、次の操作を行った。100～200 μl の1M TEAB（pH 8.5）に溶かした試料を、あらかじめ1M TEAB（pH 8.5）で

平衡化したボロン酸ゲルカラム（ベッド容1.5～2ml）にかけ、1カラム容の1MTEAB（pH 8.5）でカラムを洗った。ゲルに結合したヌクレオチドは再蒸水で溶出した。流速は8ml/hr/cm²に保ち、0.1カラム容ずつ採取した。

PEI-セルロース薄層プレートを用いて4種のリボヌクレオシド2'(3'),5'-二リン酸（pNp）を分離。同定する場合は、展開溶媒として（I）2Mギ酸ナトリウム緩衝液（pH 3.1）（73）、または（II）0.85Mリン酸カリウム緩衝液（pH 3.4）（74）を用いた。

(n) ヌクレオチドおよび核酸

³Hで標識した5'-リン酸基末端DNAおよび5'-水酸基末端DNA（鎖長200-2800ヌクレオチド）は報告された方法（57）に従って調製した。4種のpNpは大腸菌tRNA［西村逸博士（国立がんセンター）より恵与された］をヌクレアーゼS1で分解し、さらにPLCで分解したものを7M尿素存在下にDEAE

ーセファデックスA-25カラムにより分画して調製した。5'-リン酸基末端を持ったジーおよびトリリボヌクレオチドは、大腸菌tRNAをヌクレアーゼSWで分解後7M尿素存在下にDEAE-セファデックスA-25カラムにより分画して調製した。5'-リン酸基末端を持ったオリゴリボヌクレオチド（鎖長4～6ヌクレオチド）は酵母RNA（Boehringer-Mannheim社）を膵臓RNaseI、大腸菌アルカリ性フォスファターゼおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼで逐次処理したもの、または大腸菌tRNAをヌクレアーゼSWで限定分解したものを上述の方法で鎖長に従って分画して得た。^{3}Hで標識した5'-リン酸基末端を持ったオリゴデオキシリボヌクレオチド（鎖長2～8ヌクレオチド）は、[^{3}H]チミジンを取り込ませた大腸菌B3株から調製したDNAを膵臓DNaseIで分解し、上述の方法で鎖長に従って分画して調製した。^{14}Cで標識した"重いDNA"は、12μMの[^{14}C]チミン（51

mCi/mmol）を含む重い培地［(i)の項参照］で培養した大腸菌W3110T⁻株からThomasらの方法（75）に従って調製した。5′末端に［γ-³²P］ATP残基を持ったジー，トリー および テトラ リボヌクレオチドは，［γ-³²P］ATP存在下に in vitro で合成したRNAをヌクレアーゼSWで分解して調製した。RNA合成は50mM Tris-HCl（pH 8.0），10mM 2-メルカプトエタノール，0.5mM $MnCl_2$，5mM $MgCl_2$，各400μMのCTPおよびUTP，各80μMのGTPおよび［γ-³²P］ATP（4×10⁶cpm/nmol），130μgの熱変性したT2ファージDNAおよび200μgの大腸菌RNAポリメラーゼから成る反応液（1ml）中で37°C，4時間行った。反応後フェノール処理とセファデックスG-50のゲル沪過により精製した核酸を上記の750μlのヌクレアーゼSW反応液中で602ユニットの酵素を用いて37°Cで4時間処理した。分解物は7M尿素存在下のDEAE-セファデックスA-25からムクロマトグラフ

イーを行って分画した。

(o) その他の実験材料と方法

核酸分離用のセトロセルロース粉末（Serva社）は、使用前にBoezi とArmstrongの方法（76）に従って前処理した。オリゴヌクレオチドの過沃素酸酸化とアニリン処理は、Steinschneider と Fraenkel-Conrat の方法（77）に従った。DNAおよびRNAにとり込まれた放射能は、それぞれ酸不溶性でアルカリ抵抗性および酸不溶性でアルカリ感受性の画分にとり込まれた放射能を測定することにより求めた。溶液状態の試料中の^{32}Pの放射能を求める場合は、液体シンチレーションカウンターで^{3}Hを測定する条件でチェレンコフ光を測定した。沪紙および薄層プレート上の放射能を求める場合は、トルエン系シンチレーターに入れて液体シンチレーションカウンターで測定した。かうら溶出液等の脱塩は原田によって記された方法（78）に従った。増感オートラジ

オグラフィーはKodak XR-1フィルムと極光HS増感紙を用いてLaskeyとMillsの方法(79)に従って行った。PEI-セルロースプレートからのヌクレオチドの回収は、Barrellによって記された方法(80)に従って行った。

IV 結果

A. 大腸菌のRNA連結短鎖DNA

(a) アルカリ分解により出現する5'-水酸基末端の定量

RNA連結DNAをアルカリ分解すると、5'末端に水酸基を持ったDNAを生じる。この5'-水酸基末端は、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて定量することができる。この方法を用いて短鎖DNA画分中に存在すると考えられるRNA連結短鎖DNAを検出、定量しようとする場合、次の3つの条件が満たされなければならない。1: RNAを結合していないDNAは全てアルカリ分解前に5'末端がリン酸化されていること。2: アルカリ分解の操作により5'-水酸基末端を生じるようなDNA鎖の切断が起きないこと。3: 5'-水酸基末端のみが選択的に、かつ定量的に標識されること。

条件(2)を満たすために、アルカリ分解は

0.15N水酸化ナトリウム中、37°Cで20時間行った。この条件ではアルカリによるDNA鎖の切断は約13,000ヌクレオチド当り1か所程度と推定され、この内約1/5が5'末端に水酸基を、4/5が5'末端にリン酸基を持った状態に切断されている（図4）。この条件下でRNAは完全にモノヌクレオチドまで分解される（広瀬進，未発表データ）。

5'-水酸基末端を選択的に標識するためには、ポリヌクレオチドキナーゼの反応を0°Cで行えば良い（57）。但し通常の0°Cの反応の条件下でも、5'-リン酸基末端DNAの1～3%程度は^{32}Pで標識されるので、RNA連結DNAに比べてRNAを連結していないDNAが多量に共存する場合は、5'水酸基末端DNAを選択的に標識することは困難である。

多量のバクテリアから巨鎖DNAを精製する場合に、DNA試料中に細胞由来の夾雑物が混入してきてポリヌクレオチドキナーゼの反応を阻害し、反応が定量的に進行しない場

合があることが明らかになってきた（未発表データ）。本研究では、反応の進行程度を知るために、精製した大腸菌DNAを短鎖DNAの大きさに分解した5'-水酸基末端DNAをモデル基質として試料に加え、それがリン酸化される程度を測定した（表1）。表1でA～Cはマスキングの条件で反応を行い、D～Fはマスキング後アルカリ処理した短鎖を、5'-水酸基末端を選択的に標識する条件でポリヌクレオチドキナーゼ処理したものである。CとAの値の差、およびFとDの値の差がそれぞれBおよびEの値にほぼ等しいことからこれらの試料では、リン酸化反応が定量的に進行していることがわかる。0°Cの反応および37°Cで全末端を標識する反応で、定量的に進行しない場合が時々見られたが、この様な場合は試料を数倍希釈することにより90%以上の5'-水酸基末端を標識することができた。

(b) <u>pol</u> A および <u>lig</u> 変異株のRNA連結D

NA分子数の測定

大腸菌をDNAリガーゼまたはDNAポリメラーゼIを欠損させた条件下におくと新生短鎖DNAの連結がとまり、短鎖が著しく蓄積する（20－28）。このことはDNAリガーゼおよびDNAポリメラーゼIが短鎖DNAの連結のステップに関与していることを示唆している。この様な条件下におかれた細胞から短鎖DNAを精製し、アルカリ分解により出現する5'-水酸基末端を前項(a)に従って測定した（表2）。30°Cでは C-N27株（polA 4113，DNAポリメラーゼIのポリメラーゼ活性と5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の両方が温度感受性の株），MM383株（polA12，DNAポリメラーゼIのポリメラーゼ活性のみが温度感受性の株），KS268株（ligts7，DNAリガーゼの温度感受性株）共に野生株と同程度の数のRNA連結短鎖DNAが存在している。RS5064株（polA480，DNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の温度感

受性株）のRNA連結短鎖DNAの数は、これらよりも2～3倍高い値であった。一方これらの菌を43°Cで短時間処理すると、3種類のpolA株のRNA連結DNAの数は野生株の場合の数倍に増加した。一方ligts7株のRNA連結DNAの数は野生株と同程度であり、その値は30°Cでの値とほぼ同じであった。従ってDNAリガーゼ阻害下では、RNAを連結していない状態の短鎖が蓄積し、DNAポリメラーゼIのポリメラーゼ活性または5'→3'エキソヌクレアーゼ活性阻害下では、RNAを連結した短鎖が蓄積することが明らかになった。30°Cでpol A 480株中に他の株よりも多くのRNA連結DNAが存在していることは、この株のDNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼが低温でも低い［野生株の場合の1/15～1/20（81）］ことを反映していると考えられる。

以上の結果は短鎖DNAがRNAをプライマーにして合成され、完成後にDNAポリメ

ラーゼIの"nick translation"（5'→3'エキソヌクレアーゼ活性による分解にポリメラーゼ活性による合成が伴った反応）活性（82－84）でRNA部分が除かれてDNAに置き換えられるという考えによく合致している。

(c) RNA連結DNA分子の5'末端標識

アルカリ分解により5'-水酸基末端DNAが出現することは、RNA連結DNA分子が存在することを間接的に示唆しているに過ぎず、より直接的にRNA連結DNA分子の存在を証明するためには、DNAに結合した状態のRNAを分離、同定しなければならない。in vivoで大腸菌に[^{3}H]ウリジンを取り込ませ短鎖DNAを精製すると、精製を進めるに従って短鎖画分のRNAに取り込まれた放射能は次第に減少し、遂には検出されなくなる（玉野井冬彦、未発表データ）。従ってRNAを連結したDNA分子を検出するためにはより高い比放射能で、しかもRNA部分がどん

なに短かくても検出できる方法で標識する必要があり、その為に本研究ではポリヌクレオチドキナーゼと[γ-32P]ATPを用いて短鎖DNAの5'末端を標識することを試みた。

細胞内の全RNAに比べて存在量が極めて微量と予想されるDNAに共有結合したRNAを検出するためには、短鎖DNA画分に非共有的結合により混入してくるRNAを完全に除去しなければならない。以前当研究室では短鎖DNAを精製する場合、細胞をまず1%SDS-SSC-27%ショ糖-10mMEDTA中で100°C、5分間の熱処理を行って滅菌させた後、フェノール処理、プロナーゼ処理を行って除蛋白し、75000g、1時間の遠心で不溶物を除去後セファロース2Bカラムクロマトグラフィーを行い、短鎖DNA画分を硫酸セシウムの平衡密度勾配遠心にかけてRNAを除くという方法(48)が主にとられていた。この方法では、セファロース2Bのカラムクロマトグラフィーにより、長いDNAを

除去して得られた短鎖DNAの画分に細胞由来のRNAの大部分が含まれており、RNAを除く操作は次の段階の硫酸セシウムの平衡密度勾配遠心だけである。しかしながら、大量のRNAの存在下にDNAをセシウム溶液の平衡密度勾配遠心にかけると、RNAが非特有的にDNAに結合し、熱処理と平衡密度勾配遠心を数回繰り返してもその様なRNAを効果的に除くことは出来ない（未発表データ）。RNAの短鎖DNA画分への混入を防ぐためにも、また長鎖DNAの断片による短鎖DNA画分への混入を防ぐためにも、精製のなるべく初期の段階で短鎖DNAを大部分のRNAおよび長鎖DNAから分離することが必要である。以上の観点から短鎖DNAの精製法を再検討し、最終的に本研究では実験方法の項に記した方法を採用した。

ニトロセルロース画分に含まれる全核酸の5′末端を反応条件(iii)の下でポリヌクレオチドキナーゼと[γ-32P]ATPを用いて32Pで標

識した後セファデックスG-100カラムクロマトグラフィーと硫酸セシウムの平衡密度勾配遠心を行い32Pで標識された短鎖（[5'-32P]短鎖DNA）を得た。得られた短鎖DNAの中にはアルカリ感受性（アルカリ分解することにより酸可溶性になる）の5'-32P末端を持つ分子が含まれていた。この標識短鎖を90%ジメチルスルフォキシド（DMSO）中で37°C，30分間変性処理後、10%DMSOを含む硫酸セシウム平衡密度勾配遠心にかけたところ、アルカリ感受性の放射能はアルカリ非感受性の放射能、および3Hの放射能とともに、DNAの位置にバンドを形成し、RNAの位置には全く放射能が検出されなかった（図5）。アルカリ感受性の放射能は7M尿素存在下、中性のDEAE-セファデックスA-25のカラムクロマトグラフィーでリボヌクレオシド2'(3'),5'-二リン酸〔pNp〕と同じ、実効電荷-4の位置に溶出され、更に異なる二種の展開溶媒を用いたPEIセルロース薄層クロマトグ

ウフィーにおいても4種のpNpマーカーと一致することから、リボヌクレオチドに由来すると考えられる。以上の結果から鋳型DNA中に、5'末端にリボヌクレオチドを共有結合したDNA分子が存在していることが示唆される。アルカリ感受性の放射能は以前の[^{3}H]ウリジンを用いた標識実験(46)と異なってDNAの位置に完全に重なり、浮上密度のシフトは検出できなかった。この事はRNA連結DNA分子のRNA部分の鎖長が以前に報告された50～100ヌクレオチドという値(46,48)よりもずっと短いことを示唆している。

アルカリ感受性の^{32}Pの放射能がDNAに共有結合したリボヌクレオチドに由来しているとすれば、その量は、同じ数の試料をアルカリ分解した時に出現する5'-水酸基末端DNAの数に一致する筈である。表3は鋳型DNAの5'-リボヌクレオチド末端とアルカリ分解により出現する5'-水酸基末端とを、同じ培養液から調製した試料を用いて測定したもので

ある。非選択的に全末端を標識するポリヌクレオチドキナーゼの反応条件下（表3.A）で取り込まれたアルカリ感受性の^{32}Pの放射能は、マスキング処理後アルカリ処理によって出現する5'水酸基末端の数（表3.B）にほぼ一致している。従って用いた試料はDNAに結合していない遊離RNAを殆んど含んでいないと考えられる。マスキング処理後アルカリ処理せずに直接0°Cでポリヌクレオチドキナーゼ反応を行った場合、少量の放射能がDNAに取り込まれる（表3.C）。これは5'リン酸基末端を持ったDNAがポリヌクレオチドキナーゼの交換反応（53）によって標識されたためと考えられる。RNA連結DNAとRNA非連結DNAの割合（表3.A）は脾臓エキソヌクレアーゼ法で求めた割合（54）とほぼ一致している。脾臓エキソヌクレアーゼ法は[^{3}H]チミジンによってパルスラベルされる短鎖DNA、即ち新しく合成された短鎖DNAのみを選択的に分析する方法であり、この結

果にポリヌクレオチドキナーゼ法で得た結果が一致することから、娘鎖DNA画分に存在する分子は殆んど全てが新生娘鎖DNAであることが示唆される。

(d) RNA連結DNA分子の密度標識

RNA連結DNAが複製点で新しく合成された分子であることをより明確に示すために以下の密度標識実験を行った。

大腸菌 polA 4113 株を $(^{15}NH_4)_2SO_4$、重水素化藻加水分解物および重水を含む"重い培地"で 7×10^8 細胞/ml まで培養後、通常の"軽い培地"に移した。30°C で軽い培地に移して5分後(A)および20分後(B)に[^{3}H]チミジンを加えて40秒間のパルス標識を行った。一方、同様に増殖させた細胞を軽い培地に移し、30°C で3分間(C)または13分間(D)培養後43°C に温度を上げ、2分後に[^{3}H]チミジンを加えて40秒間のパルス標識を行った。A, B, C, D の各試料では軽い培地に移してからの

DNAの増加量は、各々5%，20%，15%、および25%である（図6）。

各々の試料から調製した残鎖DNA（ニトロセルロース画分）をフォスファターゼ処理後、[γ-^{32}P]ATPとポリヌクレオチドキナーゼで処理して全5′末端を^{32}Pで標識し、更にセファデックスG-100カラムクロマトグラフィーと硫酸セシウム平衡密度勾配遠心によって精製した。得られた標識短鎖を塩化セシウムの平衡密度勾配遠心によって分析した結果を図7に示す。軽い培地中での複製が進行するにつれ、アルカリ感受性の^{32}P標識末端を持つRNA連結DNAは重いDNAの位置から徐々に軽いDNAの位置へ移動している。このことはRNA連結DNAが複製点、またはその近傍で合成されていることを示している。試料CおよびDでは表3、Aの結果と異なり、アルカリ感受性末端に比べ約4～5倍のアルカリ抵抗性のRNA非連結DNA分子が存在しており、これらは主に重いDNAから成って

いる。また試料AおよびBにおいても同様なDNA分子が検出された。これらは複製点に由来しない重いDNA分子が細胞内で、または短鎖DNAの精製途上で切断されて生じたDNA断片と思われる。

(e) リボヌクレオチド－デオキシリボヌクレオチド混成オリゴヌクレオチドの検出

RNA連結DNA分子の存在をより直接的に証明するために、短鎖DNAをDNase処理して5′末端部分からリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドが共有結合した混成オリゴヌクレオチドを分離することを試みた。

pol A 480株より調製した[5′-^{32}P]短鎖DNAを膵臓DNaseIで分解後、セファデックスG-100カラムにかけたところ、放射能の殆んど全てがヘプタヌクレオチド以下の鎖長に相当する領域に溶出された(結果未掲載)。次にこの分解物を7M尿素存在下、中性でDEAE-セファデックスA-25のカラムクロマトグラ

フィーを行った結果、分解物の鎖長は大部分が2～6ヌクレオチドであることが判明した（図8）。

DNaseI分解物中には、RNA連結DNAに由来する5′末端にリボヌクレオチドを、3′末端にデオキシリボヌクレオチドを持った混成オリゴヌクレオチドと、RNAを連結していないDNAに由来するオリゴデオキシリボヌクレオチドが存在することが予想される。各鎖長画分に存在する5′末端にリボヌクレオチドを持つ分子の割合は、アルカリ分解によって生じる［5′-^{32}P］pNpを定量することによって求めた（表4）。ジ～ヘキサヌクレオチドのすべてに5′末端にリボヌクレオチドを持った分子が含まれていた。DNaseI処理前の［5′-^{32}P］純鎖DNA中の5′-リボヌクレオチド末端のうち、93%がDNaseI分解後ジ～ヘキサヌクレオチド画分に回収された。

DNaseI分解物の3′-末端ヌクレオチドが実際にデオキシリボヌクレオチドであることは、ポス

ン酸ゲルカラムクロマトグラフィー（結果未掲載，Bの項を参照）または過沃素酸抵抗性によって確認した。後者の一例を図9に示した。3′末端に通常のリボヌクレオチドを持つ分子を過沃素酸で処理すると2′,3′-シス-ジオールが酸化されてジアルデヒドを生じ，これを更にアニリンで処理するとβ-脱離により3′末端のヌクレオシドに相当する部分が消失し，モノエステル結合したリン酸基が3′末端に出現して実効電荷に−1の変化が生じる。図9においてテトラリボヌクレオチドのマーカーは過沃素酸およびアニリン処理により実効電荷が−5から−6へ変化したが，5′-^{32}P-テトラリボヌクレオチドの電荷は全く変化しなかった。DNaseI分解物中の他の鎖長のオリゴヌクレオチドについても同様の結果が得られた。

以上の結果はDNaseI分解物中に5′および3′末端が各々リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドから成る混成オリゴヌクレオチドが存在すること，即ち短鎖DNA画分

に存在するリボヌクレオチド末端はDNAに非共有的に会合したRNAに由来するのではなく、DNAの5'末端に共有結合したリボヌクレオチドに由来することを示している。3'末端のヌクレオシド残基の2'位が修飾されたオリゴリボヌクレオチドや3'末端にリン酸基を持ったオリゴリボヌクレオチドは過沃素酸に抵抗性を示すが、短鎖DNAの精製にはオリゴリボヌクレオチドを除去するいくつかのステップが含まれていること、短鎖DNAを32Pで標識する前にフォスフォモノエステラーゼ処理していること、およびT4DNAポリメラーゼがRNAを分解しないことから、この様な分子の混入は無視できると考えられる。

上記の実験結果から、RNA連結DNAのRNA部分の鎖長はモノーからペンタヌクレオチドの範囲にあることが示唆される。

混成オリゴヌクレオチドは、大腸菌pol A 4113株（43°C）、およびW3110株（20°C）より調製した短鎖DNAのDNaseI分解物中にも

存在していることが確認された。またそれらのRNA部分の鎖長は同様にモノーからペンタヌクレオチドの範囲にあることが示唆された（結果未掲載）。

(f) オリゴリボヌクレオチドの分析

RNA連結DNAのRNA部分の鎖長を正確に求めるためには、DNase I分解で得られる混成オリゴヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチド部分の鎖長を揃えるか、あるいは完全にデオキシリボヌクレオチド部分を除去してリボヌクレオチド部分のみを単離しなければならない。T4ファージ感染により誘導されるDNAポリメラーゼ（T4遺伝子43産物）に付随している3'→5'エキソヌクレアーゼ活性（以下T4 3'→5'エキソヌクレアーゼと略す）はRNAを分解しない(68)。この酵素をRNA連結DNAに作用させると5'末端からはRNAの3'末端にデオキシリボヌクレオチド1残基を結合した分子と少量のRNA

分子が生じる。またRNAを連結していないDNAの5′末端からは、主にジヌクレオチドが生じる(59-61、68)。従って[5′-^{32}P]鎖鎖DNAをDNaseIとT4 3′→5′エキソヌクレアーゼ、またはT4 3′→5′エキソヌクレアーゼ単独で分解して分解物を鎖長に従って分画し、得られたオリゴヌクレオチドを分析すればオリゴリボヌクレオチド部分の鎖長を求めることが可能である。

図10は大腸菌polA 480株より調製した[5′-^{32}P]鎖鎖DNAをDNaseIとT4 3′→5′エキソヌクレアーゼで分解後、DEAE-セファデックスカラムを用いて鎖長に従って分画した結果である。分解物の大部分は、ジー、トリー、およびテトラヌクレオチドとして回収された。DNaseI分解物の場合と同様にしてこれらのオリゴヌクレオチドの5′および3′末端に存在するリボヌクレオチドの割合を求めた結果を表5に示す。分解前の5′-リボヌクレオチド末端の88%がジー～テトラリボヌクレオ

チド画分に回収された。5'末端にリボヌクレオチドを持つジヌクレオチドの約40%および、5'末端にリボヌクレオチドを持つトリヌクレオチドの約10%が過沃素酸により分解された。これらは各々ジ-およびトリリボヌクレオチドと考えられる。残りのジヌクレオチドの約60%およびトリヌクレオチドの約90%は過沃素酸に抵抗性であった。これらは各々モノリボヌクレオチドとモノデオキシリボヌクレオチドおよびジリボヌクレオチドとモノデオキシリボヌクレオチドから成る混成オリゴヌクレオチドと考えられる。

以上の結果から、大腸菌 polA 480 株中でDNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の囲繞下に蓄積するRNA連結DNA分子のRNA部分の鎖は大部分が1～3ヌクレオチドであることが判明した。

同様な実験を他の大腸菌4株を用いて行った結果、polA 4113 株中に、DNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼとポリメラ

ーゼの両活性を阻害した条件下で蓄積するRNA連結鋳型DNAおよび野生株（W3110株）中に20°Cでおいて存在しているRNA連結鋳型DNAのRNA部分は、同様に殆んど大部分が鎖長1～3ヌクレオチドであった。

モノリボヌクレオチド、およびジ-、トリリボヌクレオチドの5'末端のリボヌクレオチド、即ちDNAとの結合部側（3'側）から1、2、3番目のヌクレオチドはいずれもAMPに富む傾向が見られたが、4種類のヌクレオチドすべてが存在していた（表6）。

(g) RNA-DNA結合に関与するデオキシリボヌクレオチドの分析

鋳型DNAをアルカリ分解後［γ-32P］ATPとポリヌクレオチドキナーゼを用いて32Pで標識し標識されたDNAをDNaseIと牌毒フォスフォジエステラーゼで分解し、得られたモノヌクレオチドを同定することにより、RNA-DNA連結部のデオキシリボヌクレオチ

ドを同定することができる。当初RNA-DNA連結部のデオキシリボヌクレオチドはdCMPであるという結果が得られていた(48)が、その後アルカリ分解によって出現する5'-水酸基末端を0°Cのポリヌクレオチドキナーゼ反応で選択的に標識して分析したところ、4種類のデオキシリボヌクレオチドすべてが検出された(58)。この結果は本研究において0°Cでのリン酸化反応が定量的に進行していることが確認された試料を用いた分析においても確認された。polA 480株を用いて得られた結果を表7に示す。ピリミジンヌクレオチドがやや多いが、4種類のヌクレオチドすべてが存在していた。

B. T7ファージのプライマーRNA

(a) 短鎖DNAのアルカリ加水分解

T7ファージのRNA連結短鎖DNAの5'末端の構造を調べるために、まず[32P]正リン酸を取り込ませた感染菌から精製した標識短鎖DNA(以下[32P]短鎖DNAと記す)をアルカリ加水分解した。この処理によって全カウントの約1%が酸可溶性になった。この酸可溶性の画分をTM尿素存在下のDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィーにより分析した結果を図11に示す。アルカリ分解に用いた全カウントの0.8%が画分13-29(ピークI)に、0.2%が画分49-62(ピークII)に、そして更に0.2%が画分70-80(ピークIII)に回収され、他にカウントのピークは検出されなかった。ピークIはモノリボヌクレオチドで、PEI-セルロース薄層クロマトグラフィーによる分析から2'(3')-GMP(34.5%)、2'(3')-AMP(29.0%)、2'(3')-CMP(18.7%)、および2'(3')-UMP(17.8%)から成

っていることがわかった。ピークⅡの位置はpNpの溶出位置に相当している。PEI-セルロース薄層クロマトグラフィーの結果から、このピークはpCp(56.0%)、pAp(21.4%)、pGp(12.5%)、およびpUp(10.1%)から成っていることが判明した。ピークⅢの位置はpppNpの位置に相当している。このピークを同定するためにヌクレアーゼP1を用いた。RNAのアルカリ分解によって生じるヌクレオチドの3'位のリン酸基はこの酵素で遊離されるが、2'位のリン酸モノエステル結合はこの酵素に抵抗性であることが知られている(85)。また5'-ミリン酸末端は分解されない。ピークⅢをこの酵素で処理してPEI-セルロース薄層クロマトグラフィーで解析した結果、未分解物(38 cpm)の他にATP(60 cpm)とPi(17 cpm)が生じていることが判明した。この結果は5'末端にATP残基を持つ短鎖DNA分子が存在していることを意味している。5'末端にATP残基を持つ短鎖DNA分子と5'-リボヌク

レオチド残基を持つ短鎖DNA分子の比は、ピークⅡとピークⅢのカウントの比から計算して約1：2であった。リボヌクレオシド5'-ニリン酸末端は検出されなかった。

(b) T4 3'→5' エキソヌクレアーゼによる短鎖DNAの分解

三リン酸末端を持ったRNA部分の鎖長を調べる目的で[^{32}P]短鎖DNAをT4 3'→5' エキソヌクレアーゼで分解した。分解物を7M尿素存在下にDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィーを行った結果を図12に示す。カラムから溶出された全カウントの99%はモノヌクレオチドの位置に回収され、続いて6つのカウントのピークが得られた。ポリヌクレオチドキナーゼを用いてポストラベルした[5'-^{32}P]短鎖DNAを同様に分解した場合はモノ-からヘキサヌクレオチドまでの合計6つのピークが得られており(59, 60)、このピークの数の差は in vivo で標識されたR

NA連結短鎖DNA分子の中に、5'末端にミリン酸を持つものが存在していることを反映していると考えられる。ピーク4、5、6、7の位置は各々5'末端にミリン酸を持ったジ-、トリ-、テトラ-、およびペンタリボヌクレオチドの溶出位置に相当する。

ピーク1(モノヌクレオチド)はT4 3'→5'エキソヌクレアーゼによって DNA部分が3'末端から順に遊離されて生じた分子と考えられる。ピーク2(ジヌクレオチド)は大部分がRNAを連結していないDNAの5'末端由来のジデオキシリボヌクレオチドで、5'末端にリボヌクレオチド1残基を結合した短鎖DNA分子に由来するリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドの混成分子も少量存在していると考えられる。

3から7までの各ピークをボロン酸ゲルカラムにより分析した。シス-ジオール構造を持つ化合物は弱アルカリ性でボロン酸と縮合し、この縮合物はpHを下げることによって解

離することが知られている。従って T 4 3' → 5' エキソヌクレアーゼ分解初中で 3' 末端にリボヌクレオシドを持つ分子とデオキシリボヌクレオシドを持つ分子を、このカラムを用いて分離することが可能である。図13に見られる通り、ピーク3、4、および7のカウントは大部分がカラムを素通りした。従ってこれらの分子は3'末端にデオキシリボヌクレオシドを持っていると考えられる。一方、ピーク5および6のカウントは約半分がカラムを素通りし、残りの半分はカラムに結合した。カラムに結合した分子は3'末端にリボヌクレオシドを持った分子で T 4 3' → 5' エキソヌクレアーゼがRNAとDNAの結合まで(または更にRNAの内部まで)切り込んで生じた分子と考えられる。

(c) 5'-ミリン酸末端の検出

ピーク3〜7のカウントでボロン酸ゲルカラムに結合したもの(b)および結合しなか、

たもの(a)を各々ヌクレアーゼP1で処理して、どの画分からATPが出現するかを、PEI-セルロース薄層クロマトグラフィーにより分析した(図14)。画分7a, 7b, 6bおよび5bにおいてATPの位置に放射能が検出された。これらのスポットが実際にATPのスポットであることは、これらのスポットから回収したカウントを蛇毒フォスフォジエステラーゼで処理するとAMPとピロリン酸を生じることから確認された(図15)。T4 3'→5'エキソヌクレアーゼの特異性とDEAE-セファデックスカラムからの溶出位置から判断して、画分7a(実効電荷−8)に存在するATP末端を持った分子はテトラリボヌクレオチドの3'末端にデオキシリボヌクレオチドが1残基結合した分子と考えられる。従ってATP末端を持ったintactなテトラリボヌクレオチドプライマーが存在することが示された。画分7bに存在するATP末端を持った分子は、実効電荷が−8でポロン酸ゲルに結合す

ることから、ペンタリボヌクレオチドと考えられる。ポストウベル法による解析ではペンタヌクレオチドは短鎖DNAに結合しているオリゴリボヌクレオチドの中で最も鎖長が長く、存在量はテトラリボヌクレオチドの約15%であった(59、60)。このペンタリボヌクレオチドが画分7bのATP末端を持ったペンタリボヌクレオチドに対応すると考えられる。従ってintactなペンタリボヌクレオチドから成るプライマー分子が存在することも、ほぼ確実と考えられる。画分6bおよび5bに存在するATP末端を持った分子は同様に各々テトラ-およびトリリボヌクレオチドと考えられる。これらの分子はintactなプライマーRNAそのものか、又はT4 3'→5'エキソヌクレアーゼがRNA部分の内部まで切り込んだために、より長い分子(ペンタ-およびテトラリボヌクレオチド)から生じたものと考えられる。

ヌクレアーゼP1処理によって生じたヌク

レオシドーリン酸は，AMPとCMPに富んだ組成をしている。この結果はポストうべル法を用いた分析結果（59，60）とよく一致している。ボロン酸ゲルに結合しない画分は，結合する画分に比べてヌクレアーゼP1処理後UMP（dTMP）の位置に回収される放射能をより多く含んでいた。TTではRNA－DNA連結部のデオキシリボヌクレオチドはdTMPに富んでいる（全体の約40％を占める）という結果（藤山秋佐夫，小原雄治，岡崎恒子，準備中）を考え合わせると，UMP（dTMP）の位置の放射能の増加分はボロン酸ゲルカラムに結合しないオリゴヌクレオチドの3′末端に存在するdTMP残基に由来するものと考えられる。

(d) 5′末端のジー および トリリボヌクレオチドの同定

画分7aおよび6bに存在するテトラリボヌクレオチドプライマーの5′末端のジーおよ

びトリリボヌクレオチドの同定を行う目的で、この二つの画分をヌクレアーゼSWで処理した。この酵素は5'末端にリン酸基を持つテトラヌクレオチド以上のオリゴ-およびポリヌクレオチドに作用させると、5'-リン酸基末端を持ったジ-およびトリヌクレオチドを生成する(86)。RNAの5'末端に存在する三リン酸はこの酵素で分解されない(未発表データ)。分解物を7M尿素存在下にDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィーにかけて、画分6bの場合は電荷-5のピークを、画分7aの場合は電荷-5および-6のピークをプールしてヌクレアーゼP1で分解しPEI-セルロースプレートにスポットして展開した(図16)。ATPのスポットの他にCMPのスポットと微量のAMPのスポットが検出された。従って画分7aおよび6bに存在するプライマーRNAの5'末端のジヌクレオチドは大部分、pppA-Cで微量のpppA-Aも存在していることが判明した。また画分7aの

プライマーRNAの5'末端から3番目のヌクレオチドは大部分がCMPと考えられる。これらの結果はポストラベル法による解析の結果とよく一致しており、二つの異なる分析方法で解析された分子が同じものであるということを示している。

V. 考察

ポリヌクレオチドキナーゼを用いて大腸菌の新生短鎖DNAの解析を行った結果，5'末端にリボヌクレオチドを結合した短鎖DNA分子が存在していることが明らかになった。その過程でRNA連結DNA分子の定量法，およびRNA連結DNA分子を単離精製し，更にRNA部分を単離してその構造を解析する方法が確立された。また〔^{32}P〕正リン酸を用いてin vivoで短鎖DNAを標識することにより，T7ファージのintactなプライマーRNAを検出することができた。以下，本研究で用いた方法および得られた結果について考察する。

(a) アルカリ分解によって出現するDNAの5'末端の標識

アルカリ分解によって出現するDNAの5'-水酸基末端を標識する方法は，部分精製した試料を用いて行うことが可能であり，簡便な

方法である。5'-水酸基末端を持ったDNAを定量する方法としては、ポリヌクレオチドキナーゼを用いる方法以外に脾臓エキソヌクレアーゼを用いて5'-水酸基末端DNAを選択的分解する方法が開発されている(54)。この方法の特徴はパルス標識によって取り込まれた放射能を測定するために、新しく合成された短鎖DNAが選択的に検出できる点にある。一方、この方法の問題点は、RNA連結DNAとRNAを連結していないDNAのcpmは求まるけれども、それらの絶対量が求まらないことである。またアルカリ処理により5'-水酸基末端を持ったDNAが生じることは、RNA連結DNAが存在することの状況証拠の1つでしかなく、直接的な証明にはならない。一方ポリヌクレオチドキナーゼを用いてアルカリ分解後に出現するDNAの5'水酸基末端を定量する方法は、同様に間接的方法ではあるが、この方法では5'-水酸基末端の絶対量とRNA-DNA連結部のデオキシリボヌクレ

オチドの組成を求めることが可能である。リン酸化反応が定量的に進行することはモデル基質を加える実験（表1）により確認できる。この確認は、多量の細胞から精製した少量の短鎖DNAを分析する場合に特に重要である。この方法を用いて大腸菌のRNA連結短鎖DNAの存在量を測定した結果、DNAポリメラーゼI阻害下では通常の条件下、あるいはDNAリガーゼ阻害下に比べてRNA連結短鎖DNAが数倍蓄積していることが判明した（表2）。この結果はRNAが短鎖DNA合成のプライマーとして利用された後、DNAポリメラーゼIのnick translation活性によって除かれてDNAに置き代えられると考えることによりうまく説明できる。3種類のpolA変異株の高温におけるRNA連結DNAの数に差が見られるが、これは阻害されている活性の役割の違い、または（および）変異のleakinessの違いによるものと思われる。前者の場合には、polA12株では残存している5′→3′エキソヌクレ

アーゼ活性によりRNAの分解がある程度生じ、またpolA 480株ではポリメラーゼ活性が正常であるために"Displacement合成"[二本鎖DNA上の一本鎖切断点から3'-水酸基末端をプライマーにして一本鎖DNAを遊離させながら進行するDNA合成(10,15)]によって一本鎖になった鋳型鎖DNAの5'末端部分がヌクレアーゼにより分解される事等の可能性が考えられる。一方、polA 4113株では両方の活性に欠陥があるために上記の様なRNA除去反応が起きず、他の2種のpolA株よりも多くのRNA連結DNAが残存している可能性が考えられる。

膵臓エキソヌクレアーゼ法と異なり、ポリヌクレオチドキナーゼ法は新生鎖に特異的ではなく、複製点に由来しないRNA連結DNAが存在すればその様な分子も定量される。しかしながら密度標識実験の結果(図7)からその様な分子は存在しないことが示唆された。またDNAポリメラーゼI阻害下でR

NA連結矩鎖DNAが蓄積することは、膵臓エキソヌクレアーゼ法によっても示されており（54）、従って二つの方法はいずれも信頼できる方法であると考えられる。

多くの原核生物および真核生物においてRNA連結矩鎖DNAが存在することが、膵臓エキソヌクレアーゼ法（58, 62, 87-89）およびポリヌクレオチドキナーゼ法（58, 59）を用いて示されている。またコリシンE1 DNA複製の際に、複製起点で最初に合成されるDNA（6S DNA断片）にRNAが結合していることが、上記二法を用いて示されている（90, 91）。

RNA-DNA連結部のデオキシリボヌクレオチドは、アルカリ分解により出現するDNAの5'-水酸基末端を選択的かつ定量的に標識した後モノヌクレオチドに分解して同定した（表7）。得られた結果は以前の報告（48）と異なり、4種類のヌクレオチドすべてが検出された。以前の結果は不純物を多く含む試

料を用いて、ポリヌクレオチドキナーゼの反応を37°Cで行って得られた結果なので、恐らくポリヌクレオチドキナーゼの反応がかなり阻害された条件下で、多量に存在するDNAの5'-リン酸基末端の一部が交換反応(53)によって標識されたものと考えられる。RNA-DNA連結部のヌクレオチドはトルエン処理した大腸菌に[α-32P]dNTPを取り込ませて合成された鎖鎖DNAをRNAase Pルカリ分解し、リボヌクレオチド画分に回収される放射能を定量、同定することによって決定することも可能である。初期にこの方法で求められたrPy-dCという構造(47)はその後の実験では確認されず、16種類のすべての組合せのヌクレオチドが検出されている(58)。同様な結果は大腸菌溶菌液を用いた同様な実験からも得られている(92)。

(b) RNA連結鎖DNAの精製

鎖鎖DNAの調製法を改良して非共有的な

RNAとDNAの結合を防ぎ、再現よくRNA連結短鎖DNAを単離する方法を確立できた。この精密度勾配遠心により短鎖画分を得る方法は、リボゾームRNAのかなりの部分を長鎖DNAと同時に除く事が出来るという点で以前使用されていたセファロースCBカラムクロマトグラフィーよりも優れている。更に、硫酸セシウム平衡密度勾配遠心の前にニトロセルロースのカラムクロマトグラフィーを行うことによって、DNAに非共有的に結合するRNAをほぼ完全に除くことが出来た。RNA連結DNAの含量がかなり微量の遊離RNAの混入をも防ぎたい場合は、ニトロセルロースカラムクロマトグラフィー又はセシウム溶液中での平衡密度勾配遠心を繰り返せば満足できる試料が得られる。

精製された短鎖に結合しているRNAは大部分がモノ-からトリリボヌクレオチドで非常に短いものであったが、これらがより長いRNA分子から精製途上に分解されて生じた

ものであるという可能性は無視できると考えられる。ヌクレアーゼや不純物の混入、pHの変化等を防ぐためには細心の注意が払われており、使用した試薬類および精製操作によってRNAが分解されないことは確認されている。

精製途上でDNA鎖に切断が生じて短鎖DNAの数が増加するのを防ぐために、剪断力をかけない様に注意し、長いDNA分子を精製の初期のステップで除いておくことも重要である。短鎖DNA画分中にはRNAを連結していない分子が多量に存在していた（表3）。密度標識実験で得られる短鎖DNAは複製点（フォーク）に由来しないDNA断片を相当量含んでいると考えられる（図8）が、通常の細胞から得られる短鎖の場合は、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて測定されるRNA連結DNAとRNA非連結DNAの比が新生短鎖DNAに特異的な脾臓エキソヌクレアーゼ法で求めた値（54）とほぼ同じであることか

ら、RNAを連結していないDNAも大部分は新生分子と考えられる。

本研究では鎖長約1800ヌクレオチド以下の短鎖DNAを解析した。長鎖DNA中にRNAを連結した分子が存在するかどうかは現在まで検討されていない。長鎖DNA画分を解析する場合は、大量に存在するリボゾームRNAの除去、および剪断力やプルカリによるDNA鎖の切断の防止等にかなりの困難が予想される。

本研究で用いたRNA連結短鎖DNAの調製法および分析法は、その後当研究室においてT7(59,60)、T4(59,61)、P2、φX174の各ファージ、および枯草菌を用いた短鎖DNA合成開始機構の研究にも応用されている。真核生物の短鎖DNAを調製する場合は、短鎖DNAの鎖長が100～200ヌクレオチドと原核生物の場合の1/10程度しかないために、ニトロセルロースカラムクロマトグラフィーや、硫酸セシウム平衡密度勾配遠心で

の回収率が悪くなる可能性があり、方法を変更する必要があるかも知れない。

Uyemuraらは大腸菌野生株および pol A 変異株において、RNA連結DNAが検出できないと報告している(81)。彼らが用いた鋳型の調製法およびRNA連結DNAの検出方法の詳細が不明なので、検出できない理由は明らかでない。MiyamotoとDenhardtは大腸菌 pol A ex2株(DNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼの ts 変異株)中にRNA連結鋳型DNAが存在していることを脾臓エキソヌクレアーゼおよびポリヌクレオチドキナーゼを用いて証明している(93)。また彼らは、ポリヌクレオチドキナーゼを用いる方法で、大腸菌 dnaG 変異株(プライマー合成酵素の ts 変異株)およびTAMT株(15T⁻株から分離された株; thy, arg, met, trp)ではRNA連結DNAが検出できるけれども野生株では検出できないと報告している(94)。dnaG 変異株を高温にさらし、またTAMT株をチミン飢

飢状態にしてDNA合成を止めてもRNA連結矩鎖DNAが検出されることから、彼らはこれらの分子は新生矩鎖DNAではないと結論している。しかしながら彼らが用いている矩鎖DNA画分にはRNAが混入している可能性が充分考えられ、またRNA連結DNA分子の検出法もアルカリ分解によって生じるpNpを定量するだけの間接的なものなので、dnaG変異株とTAMT株で検出されたpNpがRNA連結DNAに由来しているという点に関して疑問が持たれる。

(c) 大腸菌RNA連結DNAのRNA部分の構造と代謝および機能

新生矩鎖DNAの5'末端にRNAが結合しているという事実から、このRNAが矩鎖DNA合成のプライマーとして機能していることが示唆される。今後はintactなRNA分子を単離し、その構造および鋳型DNA上での合成部位等を明らかにして行かなければなら

ない。更にこのRNA分子が短鎖DNA合成のプライマーであることを最終的に証明するためには、DNA合成に必要であることが知られている酵素群を用いてin vitroでDNA合成系を再構成し、そこで実際にin vivoで検出されるものと同じ性質を持ったRNAが合成され、それをプライマーにして短鎖DNAが合成されることを示さなければならない。

環状一本鎖のファージDNAを鋳型に用いたin vitroのDNA複製機構の研究から大腸菌のdnaG遺伝子産物がプライマー合成酵素であることが示唆されている(95-98)。この酵素はrNTP以外にdNTPを基質として利用することができる(99)。G4、φX174ファージ等のDNAを鋳型として用いた場合に合成されるプライマーの5'末端はrATPまたはrADP残基であるが、St-1、あるいはα3ファージDNAを鋳型にすると、dATPまたはdADPを5'末端に持ったデオキシリボヌクレオチドのみから成るプライマ

一が合成され得る(100, 101)。本研究で用いたポストラベル法では、DNAプライマーを検出することは不可能である。しかしながら[^{32}P]正リン酸により in vivo で標識した大腸菌短鎖DNAに三リン酸末端は検出されず(未発表データ)、またプライマー合成酵素が至適基質濃度ではrNTPをdNTPよりも数倍速い速度で取り込み(99)、しかも細胞内のrNTPの濃度はdNTPの濃度よりも数倍〜10倍程度高いことから、大腸菌細胞内でDNAプライマーが合成されている可能性は少いと考えられる。デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドの混合プライマーはポストラベル法で検出可能であるが、T4 3'→5'エキソヌクレアーゼ分解物中にはその様な分子は検出されなかった。

大腸菌polA変異株および野生株から精製されたRNA連結短鎖DNAのRNA部分は大部分がモノ〜からトリリボヌクレオチドで、非常に短いものであった。またそれらの5'末

端のリボヌクレオチドはAMPに富んでいたがユニークではなく、4種類のリボヌクレオチドすべてが検出された。5'末端に三リン酸を持ったRNA連結DNAが存在するかどうかを検討するために、polA 4113株とpolA 480株にin vivoで[^{32}P]正リン酸を取り込ませて短鎖DNAを精製しアルカリ分解を行ったが、5'末端由来のリボヌクレオチドとしてはpNpが検出されるのみであった。従ってモノ-からトリリボヌクレオチドの5'末端にはリン酸基が1残基しか結合していないと考えられる。

以上の結果、および短鎖DNAのかなりの部分[DNAポリメラーゼI阻害下で50～70%、野生株で70～90%(表3および未掲載データ)]がRNAを連結していないという結果は、in vivoにおいてはRNAの除去が非常に速く、長鎖DNAの形成の律速段階は短鎖DNA同志が連結される反応であることを示唆している。polA変異株中に高温で蓄積する短鎖DNAに結合しているRNAが分解途上の

ものばかりとすると、この株中に残存しているDNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼIがRNAを分解しているという可能性の他に、他の酵素(例えばRNaseH)がRNAの除去に関与しているという可能性が示唆される。大腸菌のRNaseHはRNA・DNAのハイブリッドのRNA鎖を切断するエンドヌクレアーゼで、この酵素をRNA連結DNAと一本鎖DNAから成るハイブリッドに作用させた場合、RNAとDNAの間の結合は抵抗性を示す(未発表データおよび文献102, 103)。従って、通常細胞内ではプライマーRNAの5'末端側はRNaseHで除去され、3'末端の数ヌクレオチドをDNAポリメラーゼIの5'→3'エキソヌクレアーゼが除去している可能性が考えられる。この考えが正しいとすれば、RNaseHの条件致死変異株を用いて一時的にこの酵素の活性を阻害すれば、intactなプライマーRNAを結合した短鎖DNAが蓄積するはずである。この可能性を検討する

ためにRNaseHの変異株の分離を試みているが、未だ成功に至っていない。

(d) T7ファージのプライマーRNA

T7ファージ感染菌に[^{32}P]正リン酸を取り込ませると、ポストラベル法で検出されるRNA連結DNAのRNA部分(75, 77; 序論を参照)が実際に標識されることが判明した。また、テトラ-およびペンタリボヌクレオチドは5′末端に三リン酸を持った intact な分子であることが判明した。これらの結果は、短鎖DNAの5′末端に結合しているRNAがDNA合成のプライマーとして、ファージ感染後、恐らくDNA鎖合成の直前に鋳型DNA上で de novo に合成されるという可能性を強く示唆している。

画分5(実効電荷−6)および6(実効電荷−7)に存在するATP末端を持った分子は、いずれもボロン酸ゲルに結合することから、3′末端にリボヌクレオシドを持っていると考

えられる。通常T4 3'→5'エキソヌクレアーゼを用いてRNA連結DNAを分解した場合、分解物の大部分はRNAの3'末端にデオキシリボヌクレオチドを結合した分子である。図13の分析では短鎖DNAをT4 3'→5'エキソヌクレアーゼで全カウントの約90%が酸可溶性になる迄分解した試料を用いたが、より弱い条件で分解を行い、全カウントの約75%が酸可溶性になった試料を用いた場合も、ポリU酸ビルに結合する放射能の割合は変化しなかった（結果未掲載）。短鎖DNA画分にこれらの短いオリゴリボヌクレオチドが混入してくる可能性はまず無いと考えられ、また長いRNA鎖が非共有的結合により短鎖DNA画分に多少混入してくるとしても、それらはT4 3'→5'エキソヌクレアーゼで分解されないので、検出されたオリゴリボヌクレオチドはRNA連結DNA分子に由来すると考えられる。ヌクレオチド組成がプライマーRNAのものに似ている事もこの考えを支持している。

何故大量にこの様なデオキシリボヌクレオチドを結合していない分子が生じるのか不明である。以上の理由から、画分5および6に存在するATP末端を持ったトリーおよびテトラリボヌクレオチドはintactなプライマーなのか、またはより長いプライマーがT4 3'→5'エキソヌクレアーゼによって分解されて生じたものなのか明らかでない。

T4 3'→5'エキソヌクレアーゼ分解物をヌクレアーゼP1で分解しPEIセルロース薄層クロマトグラフィーで分析した結果、O.D.マーカーに一致しない放射能のスポットがいくつか検出された(図14)。それらはいずれも4種のdNTPとは異なる位置に存在していた。恐らく不完全分解物または何らかの特異構造を持つヌクレオチドと考えられる。

最近Scherzingerら(104, 105)、およびRichardsonら(106-108)はT7フェージDNAの複製に必須である遺伝子4の産物を精製し、それがin vitroでプライマーRNAを合成すること

を示した。この蛋白質は、ATP, CTP, DNA結合蛋白および一本鎖鋳型DNAの共存下でpppA-C-C-A (104, 105) または ppp A-C-C-C (106-108) という配列を持ったテトラリボヌクレオチドを合成し、このテトラリボヌクレオチドはT7DNAポリメラーゼによるDNA鎖合成のプライマーとなる。これらin vitroで合成されるプライマーRNAの構造は実際にin vivoで合成され矩鎖DNAの5'末端に結合して存在しているRNAの構造とよく一致しているが、後者の方が鎖長、塩基配列ともより変化に富んでいる。

(e) [^{32}P]正リン酸を用いてin vivoで矩鎖DNAを標識する方法

[^{32}P]正リン酸を用いてin vivoで標識した矩鎖DNAを分析する方法は、脾臓エキソヌクレアーゼ法およびポストラベル法に次いで、3番目に開発されたRNA連結DNA分子の検出法である。この方法には、実際にin vivo

で存在している分子をそのままの姿でとり出して分析できるという利点があり、膵臓エキソヌクレアーゼ法の間接的で、RNA分子の構造についての情報が得られないという欠点、およびポストラベル法のnascentな分子に特異的でなく、しかもintactな分子の構造についての情報が得られないという欠点が同時に克服できるため、原理的に最も優れた方法と考えられる。しかし実際にこの方法を用いてプライマーRNAを分離するためには、いくつかの問題点を解決しなければならない。核酸全体に取り込まれる^{32}Pの放射能の中でプライマー分子に取り込まれるカウントの占める割合は、わずか0.03%程度であるため、夾雑物によって分析を妨げられやすく、分析に先立ってプライマー分子をできるだけきれいに精製しておかなければならない。本研究では、ポストラベル法のために開発した精製法を行い、その後さらに二回の硫酸セシウム平衡密度勾配遠心と、セファデックスG-100のゲル沪

過を行った。RNA連結抱鎖DNAのDNA部分を分解する際に、DNase Iを使わずにTチ3'→5'エキソヌクレアーゼのみを使用することもオリゴデオキシリボヌクレオチドの混入を防ぐのに役立つと考えられる。得られたプライマーRNA画分の塩基組成はAおよびCに富んでいて(図14)ポストラベル法の分析結果とよく一致しており、夾雑物の混入は無視できるレベルと考えられる。硫酸セシウム平衡密度勾配遠心後のセファデックスG-100によるゲル沪過のステップを省いて得られた抱鎖画分に含まれるRNAはGに富んだ塩基組成をしていた[結果B(a)]。この結果は、この画分に夾雑RNA分子が存在することを示唆しているものと思われる。

[^{32}P]正リン酸でプライマーRNAを標識する方法の最も大きな問題点は、プライマーRNAを高い比放射能で標識することが困難な点である。本研究で標識されたRNAの比放射能は、ポストラベル法で通常用いられる[γ-

^{32}P]ATPの比放射能の1/100程度と推定される。そのためにプライマーRNA画分に回収されるカウントが少なく、各鎖長のプライマー分子の構造を詳細に解析することができず、ポストラベル法の結果と比較しながら解析を行い、結論を下すという方法をとらざるを得なかった。今後、より高い比放射能で標識するためには、細胞内の無機リンおよびヌクレオチドのプールを減らすために何らかの工夫をすることが必要と思われる。

またポストラベル法と異なって[^{32}P]正リン酸を用いる標識法ではプライマーRNA中の各ヌクレオチド残基にとり込まれる^{32}Pの正確な比放射能を求めることが困難で、従ってプライマーRNA分子を正確に定量することは困難である。

(ナ) 総合的考察

本研究を契機に、以後当研究室で行われた研究から、大腸菌、T7、T4、P2、φX

174，の各ファージおよび枯草菌において，RNA連結短鎖DNAが存在していることが示された。また真核細胞についても，二，三の哺乳動物とそのウィルスの系において，主に分離核や細胞抽出液等のin vitroの系を用いてRNA連結短鎖DNAが合成されることが示されており（19，109），短鎖DNAがRNAをプライマーにして合成されるという機構は，生物界において普遍的に存在しているものと考えられる。従って一見単純に見えるDNA鎖の伸長は，次の様な多くの素過程から成っていることが示唆される（図17参照）。1：親鎖二本鎖DNAの巻き戻し。2：鋳型一本鎖DNA上でのプライマーRNA鎖の合成。3：プライマーの3′末端から5′→3′方向へのDNA鎖の伸長。4：プライマーRNAの除去。5：DNA鎖間のギャップの充填。6：DNA鎖の連結。

RNAがプライマーとして使われていることの意味については，一般に，鋳型DNA上

で最初の数ヌクレオチドを合成する反応はそれ以後のヌクレオチド重合反応に比べて正確さに欠け、相補的でないヌクレオチドをとり込む頻度が高くなるために、DNA鎖よりも確実に除去できるRNA鎖をプライマーに用いた方がより正確な複製が可能であるという点が挙げられている(110, 111)。

我々の研究グループではこれまで一貫して生体内に存在している複製中間体を種々の方法で解析することによりDNA複製機構を解き明かそうとする立場をとってきた。これはin vitroの研究ではin vivoを忠実に反映した系を作ることが困難であるために、in vivoの反応の一面しかとらえることが出来ない場合が多く、またin vitroにしたために生じるarti-factをとらえる恐れすらあるためである。しかしながらDNA複製の分子機構の詳細を知るためには、反応に関与する酵素群を精製してin vitroでその作用機構を調べることが必須であり、このニつのアプローチは車の両輪の

関係にあると言える。T7, T4および大腸菌においてDNAの不連続複製に関与することが示唆されている酵素を表8にまとめた。これらの酵素の複製フォークでの作用部位が図17に示されている。これらの酵素の不連続複製における役割の中で、プライマーRNAの除去、娘鎖DNA間のギャップの充填、および娘鎖DNAの連結は、本研究を始めとするin vivoでの各種変異株を用いた研究から示唆されたものである。in vitroの研究からT4ファージでは遺伝子41と61の産物が協同して、in vivoで検出されるRNA連結DNAのRNA部分(75, 76;序論参照)と同じ構造を持ったプライマーを合成することが示されている(B. Alberts, 私信; 112, 113)。またT7ファージでは遺伝子4の産物がプライマー合成酵素でありin vivoで検出されるものと同様な構造から成るプライマーをin vitroで合成することが示された[考察(d)参照]。この酵素は分子量約58,000の単一ポリペプチドであるが、不連続複製に

おいて中心的役割を果しており、プライマー合成活性以外に、T7DNAポリメラーゼによるプライマーRNAの3'末端からのDNA鎖の伸長を促進する活性、NTPase活性および二本鎖DNAを巻き戻す活性等を持っている(104-108)。

ポストラベル法では2000 cpm/fmol程度の高い比放射能で短鎖DNAを標識できるので、この方法で標識した短鎖DNAと塩基配列が既知のゲノムDNAのハイブリッドを形成させ、短鎖DNAの5'末端をDNAの塩基配列上にマップすることが可能である。T7DNAを制限酵素HpaIIで分解して得られるH3フラグメント(339塩基対)のH鎖上に短鎖DNAの合成開始点をマップした結果、このフラグメント上には5カ所の開始点が存在していることが判明した(藤山秋佐夫、小原雄治、岡崎恒子、準備中;75)。これら5つの部位には、5' G-A-C-$\overset{C}{A}$-N_1-N_2-N_3 3' という共通構造が存在しておりN_2またはN_3からDNA鎖の合

成が開始する。従って鋳型し鎖上の相補的な塩基配列 3′ C-T-G-$\frac{G}{T}$-N_4(-N_5) 5′ がプライマーRNA〔pppA-C-$\frac{C}{A}$-N_1(-N_2)〕合成のシグナルと考えられる。この様な塩基配列はゲノムDNAの塩基配列がランダムであると仮定すると、100～200ヌクレオチド鎖長当りに1カ所存在している。一方短鎖DNAの鎖長は1000～2000ヌクレオチドであるため、合成開始可能な部位が常に短鎖DNAの合成開始に関与しているのではなく、平均して10カ所の内の1カ所程度が合成開始点として利用されていることが示唆される。即ち短鎖DNAの鎖長は合成開始可能部位が実際に合成開始点として利用される頻度によって規定されるものと思われる。またその頻度はDNA二本鎖の巻き戻し速度とプライマー合成酵素の存在量（および巨視的に5′→3′方向に伸長する鎖ではDNA鎖の伸長速度）に依存しているものと考えられる。

上記の通り、TAつ？一方では不連続複製

の全貌が分子レベルではほぼ解明された。また T4 ファージにおいても intact なプライマーRNA の構造およびその合成に関与する酵素、また不連続複製に関与する他の酵素とそれらの役割等が明らかになってきた（表8参照）。これに対して大腸菌の不連続複製機構は未だ未知の部分が多い。in vitro の解析は大腸菌そのものの DNA では分子量が大き過ぎて、intact な状態の分子を扱えないことから、大腸菌の複製系に依存して増殖する小型の一本鎖 DNA をゲノムとするファージを用いて進められており、得られた結果から大腸菌 DNA の不連続複製の機構が推測されているに過ぎない。一本鎖環状のファージ DNA を複製型の二本鎖環状 DNA に変換する過程で RNA がプライマーとして要求されるが、このプライミングの反応は用いるファージ DNA によって次の3つのタイプに分類される（99, 115）。第1のタイプは M13 および f1 等の繊維状ファージの DNA の場合で、大腸菌の R

NAポリメラーゼがプライマー合成酵素として利用される。その タイプはG4, St-1, λ3等の場合で、これらのプライ-ジDNAを用いた場合は、一本鎖DNA結合蛋白と基質NTP存在下に大腸菌dnaG蛋白が鋳型DN上の特定の位置(複製開始点)でプライマーRNAを合成する(95, 96, 98)。プライマーRNAは鎖長26-29ヌクレオチドでその一次構造は決定されている(116)。鎖長が一定していないのはDNA合成への切り替り部位が一定していないためである。また基質としてdNTPを共存させるとプライマーの鎖長はdNTPとrNTPの比に依存して短くなる(99)。一方φX174プライ-ジのDNAを用いた場合のDNA合成はその3のタイプに分類される。このタイプではプライマーの合成に先立ち、数多くの蛋白質によってプレプライミング複合体が形成される事が必要である(表8参照)。この複合体に依存してdnaG蛋白質がプライマーRNA合成を行う。遺伝的解析から

大腸菌の不連続複製にはdnaB, dnaC, dnaGの各遺伝子産物、および一本鎖DNA結合蛋白質が必要とされることが知られている(117, 118)ので、大腸菌の短鎖DNA合成の開始にはRNAのタイプに類似したプライミングが働いていることが推測される。プレプライミングの素過程は不明な点が多い。φX174 DNAを鋳型にrNTPを用いてプライマー合成を行わせると、DNA上の数カ所で鎖長14～50ヌクレオチドのRNAが合成され、引き続きDNA合成を行わせるとこれらのRNAは全てプライマーとして利用される(119)。DNA鎖上での合成部位、および各部位で合成されるRNAの一次構造は決定されていない。プライマー合成時にDNA合成系を共存させた場合は1つの環状鋳型DNA当り1分子のRNAが合成され、このRNAをプライマーにして1ヌクレオチド鎖長のDNAが合成される(120)が、このプライマーRNAの合成部位および一次構造についての情報は得られていない。この

様に第3のタイプのプライミングの機構に関しては未知の部分が多いが、今後はクローニングした大腸菌DNAを用いて大腸菌DNAそのものの in vitro 複製系を開発し、不連続複製の分子機構を解明して行かなければならない。一方、in vivo の研究ではRNaseH変異株を単離してintactなプライマーRNA分子を検出することが急務である。またφX174DNAやクローニングした大腸菌DNA等を用いて、DNAの塩基配列上に短鎖DNAの合成開始点をマップすることにより、短鎖合成開始のシグナルに関する知見が得られるであろう。

真核生物のプライマーRNAは哺乳動物の培養細胞およびウィルス感染培養細胞の in vitro の系で単離されている(19, 109)。それらは原核生物で明らかにされた例とは異なり、約10ヌクレオチドの一定の長さを持つ、塩基配列の特に定まっていないRNA分子とされている。しかしながら、正確な鎖長は不明で

あり、また塩基配列も完全にランダムなのか、ある程度特定の配列を持った部分があるのか、或いはユニークな配列を持ったいくつかの分子の混合物を分析しているために見かけ上ランダムな配列なのか等の点が不明である。またRNAプライマーの合成に関与する酵素(群)についての知見は何も得られていない現状である。一方、真核生物の短鎖DNAは鎖長約100～200ヌクレオチドで、この長さはヌクレオソーム構造の1単位分に相当しており、不連続複製とヌクレオソーム構造の関係に興味が持たれる。原核生物との比較という面からも、またヌクレオソームのDNA複製における役割という面からも、真核生物の不連続複製機構の解明が待たれる。

今後解決されなければならない問題の1つは、不連続複製が両鎖で起きているのか、それとも片鎖のみで起きているのかという問題である。*in vitro*で再構成されたDNA複製系では巨視的に3′→5′方向に伸長するDNA

鎖のみが不連続的に合成されるが、大腸菌、枯草菌、および P2、φX174、PM2 等のファージを用いた in vivo の研究からは、両鎖が不連続に合成される可能性が示唆されている。この問題は in vivo で巨視的に 5′→3′ 方向に伸長する DNA 鎖の合成開始部位、およびプライマーRNA の有無を検討することにより解答が得られるであろう。

プライミングは短鎖 DNA の合成開始以外に染色体 DNA の複製開始にも必須の反応である。大腸菌では RNA ポリメラーゼが複製開始に関与することが知られており (121)、RNA が最初の DNA 合成の際にプライマーとなっていることが示唆されている (広瀬進、岡崎恒子、準備中)。複製開始反応と短鎖 DNA の合成開始反応の関係を明らかにすることも、今後の課題の1つである。

略語

5'-水酸基末端DNA：5'末端に水酸基を持ったDNA

5'-リン酸基末端DNA：5'末端にリン酸基を持ったDNA

SDS：ドデシル硫酸ナトリウム

SSC：0.15M NaCl - 0.015Mクエン酸ナトリウム

EDTA：エチレンジアミン四酢酸

Tris：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン

DMSO：ジメチルスルフォキシド

TEAB：重炭酸トリエチルアンモニウム

m.o.i：感染多重度

ボロン酸ゲル：ジヒドロキシボロニル基を結合させたBio-Gel P-60

PEI-セルロース：ポリ（エチレンイミン）-セルロース

O.D.：吸光度

謝辞

本研究の遂行に当り、御指導、御鞭撻下さった故岡崎令治教授、岡崎恒子助教授に心から感謝します。また研究協力および討論に加わって下さった分子生物学研究施設第2部門の皆様に感謝します。本研究の中で、アルカリ分解後に出現する5'-水酸基末端の定量に関する研究は、広瀬進博士との共同研究によって行われたものである。

参考文献

1. Cairns, J. 1963. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 43-46
2. Huberman, J. A., Riggs, A. D. 1968. J. Mol. Biol. 32: 327-341
3. Schnös, M., Inman, R. B. 1970. J. Mol. Biol. 51: 61-73
4. Schnös, M., Inman, R. B. 1971. J. Mol. Biol. 55: 31-38
5. Wolfson, J., Dressler, D., Magazin, M. 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 499-504
6. Bird, R. E., Louarn, J., Martuscelli, J., Caro, L. 1972. J. Mol. Biol. 70: 549-566
7. Prescott, D. M., Kuempel, P. L. 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2842-2845
8. Meselson, M., Stahl, F. W. 1958. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44: 671-682
9. Watson, J. D., Crick, F. H. C. 1953. Nature 171: 737-738
10. Kornberg, A. 1974. DNA Synthesis. Freeman, San Francisco, 399 pp.
11. Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K. 1967. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 20: 255-260
12. Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Sugino, A. 1968. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59: 598-605
13. Sakabe, K., Okazaki, R. 1966. Biochim. Biophys. Acta 129: 651-654
14. Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Kainuma, R., Sugino, A., Iwatsuki, N. 1968. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 129-143
15. Richardson, C. C. 1969. Ann. Rev. Biochem. 38: 795-840
16. Goulian, M. 1971. Ann. Rev. Biochem. 40: 855-898
17. Klein, A., Bonhoeffer, F. 1972. Ann. Rev. Biochem. 41: 301-332
18. Edenberg, H. J., Huberman, J. A. 1975. Ann. Rev. Genet. 9: 245-284
19. Ogawa, T., Okazaki, T. 1980. Ann. Rev. Biochem. 49: 421-457
20. Sugimoto, K., Okazaki, T., Okazaki, R. 1968. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:1356-1362
21. Newman, J., Hanawalt, P. C. 1968. J. Mol. Biol. 35: 639-642
22. Hosoda, J., Mathews, E. 1968. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61: 997-1004
23. Richardson, C. C., Masamune, Y., Live, T. R., Jacquemin-Sablon, A., Weiss, B., Fareed, G. C. 1968. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 151-164
24. Pauling, C., Hamm, L. 1969. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64: 1195-1202
25. Gellert, M., Bullock, M. L. 1970. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67: 1580-1587
26. Masamune, Y., Frenkel, G. D., Richardson, C. C. 1971. J. Biol. Chem. 246: 6874-6879
27. Kuempel, P. L., Veomett, G. E. 1970. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 973-980
28. Okazaki, R., Arisawa, M., Sugino, A. 1971. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 2954-2957
29. Okazaki, T., Okazaki, R. 1969. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64: 1242-1248
30. Inman, R. B., Schnös, M. 1971. J. Mol. Biol. 56: 319-325
31. Delius, H., Howe, C., Kozinski, A. W. 1971. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 3049-3053
32. Wolfson, J., Dressler, D. 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2682-2686
33. Kriegsten, H. J., Hogness, D. S. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 135-139
34. Tye, B.-K., Neyman, P.-O., Lehman, I. R., Hochhauser, S., Weiss, B. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 154-157
35. Tye, B.-K., Lehman, I. R. 1977. J. Mol. Biol. 117: 293-306
36. Tye, B.-K., Chien, J., Lehman, I. R., Duncan, B. K., Warner, H. R. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 233-237

37. Alberts, B., Sternglanz, R. 1977. Nature 269: 655-661
38. Tamanoi, F., Okazaki, T. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2195-2199
39. Tamanoi, F., Machida, Y., Okazaki, T. 1978. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 239-242
40. Makino, F., Munakata, N. 1978. J. Bacteriol. 134: 24-29
41. Mitra, S., Kornberg, A. 1966. J. Gen. Physiol. 49 (6): 59-79
42. Guild, W. R. 1968. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 142-143
43. Haskell, E. H., Davern, C. I. 1969. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64: 1065-1071
44. Brutlag, D., Schekman, R., Kornberg, A. 1971. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 2826-2829
45. Verma, I. M., Meuth, N. L., Bromfeld, E., Manly, K. F., Baltimore, D. 1971. Nature New Biol. 233: 131-134
46. Sugino, A., Hirose, S., Okazaki, R., 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1863-1867
47. Sugino, A., Okazaki, R. 1973. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 88-92
48. Hirose, S., Okazaki, R., Tamanoi, F. 1973. J. Mol. Biol. 77: 501-517
49. Probst, H., Gentner, P. R., Hofstätter, T., Jenke, S. 1974. Biochim. Biophys. Acta 340: 361-373
50. Zechel, K. 1978. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 82: 71-112
51. Berg, P., Fancher, H., Chamberlin, M. 1963. in Informational Macromolecules, H. J. Vogel et al. eds., pp. 467-483, Academic Press, New York.
52. Hurwitz, J., Yarbrough, L., Wickner, S. 1972. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 628-635
53. van de Sande, J. H., Kleppe, K., Khorana, H. G. 1973. Biochemistry 12: 5050-5055
54. Kurosawa, Y., Ogawa, T., Hirose, S., Okazaki, T., Okazaki, R. 1975. J. Mol. Biol. 96: 653-664
55. Razzell, W. E., Khorana, H. G. 1961. J. Biol. Chem. 236: 1144-1149
56. Sugino, A., Okazaki, R. 1972. J. Mol. Biol. 64: 61-85
57. Okazaki, R., Hirose, S., Okazaki, T., Ogawa, T., Kurosawa, Y. 1975. Biochem. Biophys. Res. Commun. 62: 1018-1024
58. Okazaki, R., Okazaki, T., Hirose, S., Sugino, A., Ogawa, T., Kurosawa, Y., Shinozaki, K., Tamanoi, F., Seki, T., Machida, Y., Fujiyama, A., Kohara, Y. 1975. in DNA Synthesis and Its Regulation, M. Goulian et al. eds., pp. 832-862, Benjamin Inc., Menlo Park, Calif.
59. Okazaki, T., Kurosawa, Y., Ogawa, T., Seki, T., Shinozaki, K., Hirose, S., Fujiyama, A., Kohara, Y., Machida, Y., Tamanoi, F., Hozumi, T. 1978. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 203-219
60. Seki, T., Okazaki, T. 1979. Nucleic Acids Res. 7: 1603-1619
61. Kurosawa, Y., Okazaki, T. 1979. J. Mol. Biol. 135: 841-861
62. Shinozaki, K., Okazaki, T. 1977. Molec. Gen. Genet. 154: 263-267
63. Studier, F. W. 1973. J. Mol. Biol. 79: 237-248
64. Martin, J. B., Doty, D. M. 1949. Anal. Chem. 21: 965-967
65. Glynn, I. M., Chappell, J. B. 1964. Biochem. J. 90: 147-149
66. Richardson, C. C. 1971. Proc. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 2: 815-828
67. Torriani, A. 1966. Proc. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1: 224-235
68. Huang, W. M., Lehman, I. R. 1972. J. Biol. Chem. 247: 3139-3146
69. Sulkowski, E., Laskowski, M. 1971. Biochim. Biophys. Acta 240: 443-447
70. Garrett, C. T., Wilkinson, D. S., Pitot, H. C. 1973. Anal. Biochem. 52: 342-348
71. Mirzabekov, A. D., Griffin, B. E. 1972. J. Mol. Biol. 72: 633-643
72. Okayama, H., Ueda, K. Hayaishi, O. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1111-1115

73. Randerath, K., Randerath, E. 1967. in Methods in Enzymol., Grossman, L. and Moldave, K., eds. vol. 12A, pp. 323-347, Academic Press, New York
74. Cashel, M., Lazzarini, R. A., Kalbacher, B. 1969. J. Chromatog. 40: 103-109
75. Thomas, C. A., Jr., Berns, K. I., Kelly, T. J., Jr. 1966. Proc. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1: 535-540
76. Boezi, J. A., Armstrong, R. L. 1967. in Methods in Enzymol., Grossman, L. and Moldave, K., eds. vol. 12A, pp. 684-686, Academic Press, New York
77. Steinschneider, A., Fraenkel-Conrat, H. 1966. Biochemistry 5: 2735-2743
78. 原田文夫 1972. 核酸実験法 上（蛋白質 核酸 酵素別冊）石浜明他編 pp. 203-204 共立出版
79. Laskey, R. A., Mills, A. D. 1975. Eur. J. Biochem. 56: 335-341
80. Barrell, B. G. 1971. Proc. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 2: 751-779
81. Uyemura, D., Eichler, D. C., Lehman, I. R. 1976. J. Biol. Chem. 251: 4085-4089
82. Kelly, R. B., Cozzarelli, N. R., Deutscher, M. P., Lehman, I. R., Kornberg, A. 1970. J. Mol. Biol. 245: 29-45
83. Roychoudhury, R., Kössel, H. 1973. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50: 259-265
84. Roychoudhury, R. 1973. J. Biol. Chem. 248: 8465-8473
85. Kuninaka, A., Fujimoto, M., Yoshino, H. 1975. Agr. Biol. Chem. 39: 597-602
86. Mukai, J.-I. 1965. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21: 562-567
87. Tamanoi, F., Okazaki, T., Okazaki, R. 1977. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77: 290-297
88. Machida, Y., Okazaki, T., Okazaki, R. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2776-2779
89. Kowalski, J., Denhardt, D. T. 1979. Nature 281:704-706
90. Bird, R. E., Tomizawa, J. 1978. J. Mol. Biol. 120: 137-143
91. Tomizawa, J., Ohmori, H., Bird, R. E. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 1865-1869
92. Ramareddy, G. V., Goulian, S. H., Goulian, M. 1975. Biochim. Biophys. Acta 402: 323-342
93. Miyamoto, C., Denhardt, D. T. 1977. J. Mol. Biol. 116: 681-707
94. Denhardt, D. T., Kowalski, J., Miyamoto, C. 1978. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 243-252
95. Wickner, S. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2815-2819
96. Rowen, L., Kornberg, A. 1978. J. Biol. Chem. 253: 758-764
97. Lark, K. G. 1972. Nature New Biol. 240: 237-240
98. Bouché, J.-P., Zechel, K., Kornberg, A. 1975. J. Biol. Chem. 250: 5995-6001
99. McMacken, R., Rowen, L., Ueda, K., Kornberg, A. 1978. in The Single-Stranded DNA Phages, D. T. Denhardt et al. eds., pp. 273-285, Cold Spring Harbor Lab., New York.
100. Wickner, S. 1978. in The Single-Stranded DNA Phages, D. T. Denhardt et al. eds., pp. 255-271, Cold Spring Harbor Lab., New York
101. Sumida-Yasumoto, C., Ikeda, J.-E., Benz, E., Marians, K. J., Vicuna, R., Sugrue, S., Zipursky, S. L., Hurwitz, J. 1978. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 311-329
102. Berkower, I., Leis, J., Hurwitz, J. 1973. J. Biol. Chem. 248: 5914-5921
103. Darlix, J.-L. 1975. Eur. J. Biochem. 51: 369-376
104. Scherzinger, E., Lanka, E., Morelli, G., Seiffert, D., Yuki, A. 1977 Eur. J. Biochem. 72: 543-558
105. Hillenbrand, G., Morelli, G., Lanka, E., Scherzinger, E. 1978. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 449-459

106. Richardson, C. C., Romano, L. J., Kolodner, R., LeClerc, J. E., Tamanoi, F., Engler, M. J., Dean, F. B., Richardson, D. S. 1978. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 427-440
107. Romano, L. J., Richardson, C. C. 1979. J. Biol. Chem. 254: 10476-10482
108. Romano, L. J., Richardson, C. C. 1979. J. Biol. Chem. 254: 10483-10489
109. Hand, R. 1978. Cell 15: 317-325
110. Alberts, B. M., Barry, J. Bittner, M., Davies, M., Hama-Inaba, H., Liu, C.-C., Mace, D., Moran, L., Morris, C. F., Piperno, J., Sinha, N. K. 1977. in Nucleic Acid-Protein Recognition, H. J. Vogel ed., pp. 31-63, Academic Press, New York
111. Watson, J. D. 1976. in Molecular Biology of the Gene, pp. 231-233, W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif.
112. Liu, C.-C., Burke, R. L., Hibner, U., Barry, J., Alberts, B. 1978. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 469-487
113. Nossal, N. 1980. J. Biol. Chem. in press
114. Kolodner, R., Masamune, Y., LeClerc, J. E., Richardson, C. C. 1978. J. Biol. Chem. 253: 566-573
115. Schekman, R., Weiner, A., Kornberg, A. 1974. Science 186: 987-993
116. Bouché, J.-P., Rowen, L., Kornberg, A. 1978. J. Biol. Chem. 253: 765-769
117. Wechsler, J. A. 1978. in DNA Synthesis: Present and Future, I. Molineux, and M. Kohiyama, eds., pp. 49-70, Plenum Publishing Corp., New York
118. Meyer, R. R., Glassberg, J., Kornberg, A. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1702-1705
119. McMacken, R., Kornberg, A. 1978. J. Biol. Chem. 253: 3313-3319
120. McMacken, R., Ueda, K., Kornberg, A. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4190-4194
121. Lark, K. G. 1972. J. Mol. Biol. 64: 47-60
122. Burton, K. 1956. Biochem. J. 62: 315-323

表1. リン酸化反応の定量性

	基質	取り込まれた ^{32}P (fmol)
A	鋳型DNA	16
B	5'-水酸基末端DNA	74
C	鋳型DNA + 5'-水酸基末端DNA	94
	CとAの差	78
D	アルカリ処理鋳型DNA	50
E	5'-水酸基末端DNA	85
F	アルカリ処理鋳型DNA + 5'-水酸基末端DNA	134
	FとDの差	84

43°Cでパルス標識した大腸菌RS5064株(polA480)培養液から調製した鋳型DNA(ニトロセルロース画分, 300μl)を使用した。A～C:ニトロセルロース画分10μl(A), 5'-水酸基末端DNA 74 fmol(B), または両者の混合物(C)を30μlの反応液中でマスキングの条件で未標識のATPを[γ-^{32}P]ATPに代えて反応させた。D～F:ニトロセルロース画分

200μlを用いて600μlの反応液中でマスキングを行い、更にアルカリ分解を行った。アルカリ処理した短鎖DNA 10μl（D）、5'-水酸基末端DNA 85 fmol（E）、または両者の混合物（F）を30μlの反応液中で、5'-水酸基末端を選択的に標識する条件で反応させた。

表2. 各種変異株におけるRNA連結DNA分子の定量

	菌株	細胞当りの個数 30°C	細胞当りの個数 43°C
A	W3110 (野生株)	11	10
B	C-N27 (polA 4113)	12	93
C	RS5064 (polA 480)	31	44
D	MM383 (polA 12)	15	25
E	KS 268 (ligts7)	13	14

30°C又は43°Cでパルス標識した大腸菌から短鎖DNAを調製し、マスキング後アルカリ処理を行った。60～150 μlの反応液で5'-水酸基末端DNAを標識した。細胞当りの個数は、^{3}Hのカウント当りに取り込まれた^{32}Pの量と、細胞当りに取り込まれた^{3}Hのカウントから計算した。アルカリ処理前の短鎖DNAを同じ条件で標識した時にアルカリ抵抗性画分へ取り込まれる少量の^{32}Pの放射能(5'-リン酸基末端DNAへの取り込み)を差し引いた値を示した。

表3．RNA連結DNA分子の標識

前処理	取り込まれた放射能（fmol／5000 cpm ^{3}H）RNA	DNA
A．大腸菌アルカリ性フォスファターゼ	24	43
B．マスキング → アルカリ		27
C．マスキング		<2

43°Cでパルス標識した大腸菌RS506F株（polA 480）培養液120 mlから，400 μlのニトロセルロース画分を調製した。A：III(e)に記された方法で［5′-^{32}P］矩鎖DNAを調製し，RNAとDNAに取り込まれた放射能を測定した。BおよびC：ニトロセルロース画分をマスキング後直接（C），またはアルカリ処理後（B），III(f)に記された反応条件(ii)を用いてリン酸化した。

表4. [5'-^{32}P]短鎖DNAのDNase I分解物の検定

鎖長（ヌクレオチド）	存在量（%）	5'末端がデオキシリボヌクレオチドのもの	5'末端がリボヌクレオチドのもの
2	21.5	20.3	1.2
3	25.7	19.0	6.7
4	22.7	13.9	8.8
5	17.4	9.2	8.2
6	12.6	5.2	7.4
合計	100	67.6	32.3

43°Cでパルス標識した大腸菌RS5064株（polA480）の短鎖DNAを分析した。各鎖長のオリゴヌクレオチドの存在量は図8から求めた。図8の各ピークを脱塩後0.3M KOH中で37°C, 18時間、加水分解後、過塩素酸で中和した。析出した過塩素酸カリウムを遠心により除去した後、同じ鎖長の^{3}Hで標識した5'-リン酸基末端を持つオリゴデオキシリボヌクレオチドを加えて、牛毒フォスフォジエステラーゼで処理した。分解物を沪紙電気泳動にか

けて5′-dNMPとpNpを分離した。このニつのスポットの位置に回収されるカウントから、5′末端にデオキシリボヌクレオチドを持つ分子とリボヌクレオチドを持つ分子の比を計算した。3Hのカウントはすべて5′-dNMPの位置に回収された。

表5. [5'-^{32}P] 短鎖DNAのDNaseIおよびT4 3'→5'エキソヌクレアーゼによる分解物の検索

鎖長 (ヌクレオチド)	存在量(%)	5'末端がデオキシリボヌクレオチドのもの	5'末端がリボヌクレオチドのもの	3'末端がリボヌクレオチドのもの
2	68.9	61.7	7.2	3.0
3	21.6	5.9	15.7	1.5
4	9.5	2.0	7.5	-
合計	100	69.6	30.4	

43°Cでパルス標識した大腸菌RS5064株(polA480)の短鎖DNAを分析した。各鎖長のオリゴヌクレオチドの存在量は図10から求めた。5'末端および3'末端のヌクレオチドは、表4および図9と同じ方法で検索した。

表6. 5'末端のリボヌクレオチドの同定

鎖長(ヌクレオチド)	GMP	AMP	CMP	UMP
1	25.3%	32.2%	26.6%	15.9%
2	25.1	40.0	17.3	17.6
3	22.1	48.5	14.4	15.0

20°Cでパルス標識した大腸菌野生株(W3110)の娘鎖DNAを分析した。[5'-32P]娘鎖DNAをT4 3'→5' エキソヌクレアーゼで分解後、DEAE-セファデックスA-25カラムで鎖長に従って分画した。ジー、トリー、およびテトラリボヌクレオチドの過沃素酸抵抗性画分を表4の場合と同様にアルカリと蛇毒フォスフォジエステラーゼで処理した。分解物をクM尿素存在下にDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィーで分画し、pNp画分をPEI-セルロース薄層クロマトグラフィーで分析した。

表7. RNA-DNA結合に関与するデオキシリボヌクレオチド

dGMP	dTMP	dAMP	dCMP
18%	30%	19%	34%

43°Cでパルス標識した大腸菌RS5064株（polA 480）の短鎖DNAを分析した。短鎖DNA（ニトロセルロース画分）をマスキング後アルカリ処理して、III(ナ)に記された反応条件(ii)を用いてリン酸化した。EDTAを加えて反応を停止した後0.15M NaOHで37°C, 20時間処理後、セファデックスG-100のゲル沪過を行った。（反応停止後のアルカリ処理は未反応のATPをゲル沪過で効率良く除くのに有効であった。）得られた標識DNAをIII(ね)に記された方法で5'-dNMPに分解して同定した。

表8、T7，T4，および大腸菌DNAの不連続複製に関与する蛋白質

蛋白質	遺伝子	機能	複製フォーク(図17)での作用部位
T7：			
プライマー合成酵素	4	・プライマー合成 ・NTPase ・二本鎖巻き戻し	2, 4
DNA結合蛋白質		・一本鎖DNAへの結合	3
DNAポリメラーゼ	5, trxA(大腸菌)	・DNA鎖の伸長 ・ギャップの充填(?)	2, 5, 6
5'-エキソヌクレアーゼ	6	・プライマーの除去	6
大腸菌DNAポリメラーゼI	polA(大腸菌)	・プライマーの除去 ・ギャップの充填(?)	6
DNAリガーゼ	1.3	・DNA鎖の連結	7
大腸菌DNAリガーゼ	lig(大腸菌)	・DNA鎖の連結	7
T4：			
遺伝子41蛋白質	41	・DNA依存NTPase ・遺伝子61蛋白質と協同でのプライマー合成 ・leading鎖合成の促進	2, 4
遺伝子61蛋白質	61	・遺伝子41蛋白質と協同でのプライマー合成 ・leading鎖合成の促進	2, 4
二本鎖不安定化蛋白質	32	・一本鎖DNAへの結合	3
DNAポリメラーゼ	43	・DNA鎖の伸長 ・ギャップの充填(?)	2, 5, 6

ポリメラーゼ付属蛋白質	44, 62		・DNA依存ATPase ・DNA合成促進	2, 5
DNAリガーゼ	30		・DNA鎖の連結	7

大腸菌：

蛋白質 i (X)			・プレプライミング	
蛋白質 n (Z)			・プレプライミング	
蛋白質 n' (Y)			・DNA依存ATPase ・プレプライミング	
蛋白質 n''			・プレプライミング	
DnaC蛋白質	dnaC		・dnaB・dnaC複合体形成 ・プレプライミング	
DnaB蛋白質	dnaB		・DNA依存NTPase ・移動プロモーター ・プレプライミング ・プライミング	2, 4
二本鎖不安定化 (DNA結合蛋白質 一本鎖結合蛋白質)	ssb-1		・一本鎖DNAへの結合	3
プライマー合成酵素	dnaG		・プライマー合成	4
DNAポリメラーゼIII本体酵素			・DNA鎖の伸長	2, 5
α θ ε } ポリメラーゼIII コア酵素	polC (dnaE)			
γ (DnaZ蛋白質)	dnaZ			
δ (EFIII)	dnaX			
β (EFI)				
DNAポリメラーゼI	polA		・プライマーの除去 ・ギャップの充填	6
DNAリガーゼ	lig		・DNA鎖の連結	7

DNA gyrase	gyrA (nalA) gyrB (cou)	・DNA鎖の超らせん化 ・DNA依存ATPase ・超らせんの歪みの解消	1
rep 蛋白質	rep	・DNA依存ATPase ・二本鎖巻き戻し	1

＊leading鎖：巨視的にみて5′→3′方向に伸長する娘鎖

詳細および文献に関しては引用文献19を参照のこと。

図1、複製点におけるDNA鎖の伸長モデル
A：二本の娘鎖が各々重合の方向性の異なる酵素によって連続的に合成される場合。B：巨視的にみて5'→3'方向に伸長する娘鎖は連続的に、3'→5'方向に伸長する娘鎖は不連続的に複製される場合。C：両娘鎖が不連続的に複製される場合。

図2、[3H]チミジンでパルス標識したDNAのショ糖密度勾配遠心
43°Cでパルス標識した大腸菌RS5064株(polA 480)より調製したDNA試料4mlを、4mlの80%ショ糖クッション上に作成した5～20%のショ糖の直線密度勾配(28ml)の上に重層し、ベックマンSW27ローターで18°Cで16時間遠心した。遠心管の底から1.1mlずつ分画して各画分の放射能と紫外吸収を測定した。画分19～31をプールした。—○—, 3Hのカウント；—●— 260nmの吸光度。

図3．ニトロセルロースカラムクロマトグラフィー

図2でプールした短鎖DNA（3ml）をニトロセルロースカラムで分画した。DNA試料をカラム（1×6.4 cm）にかけた後27mlの洗浄液で洗い、溶出液で吸着したDNAを溶出した。2mlずつ分画して各画分の放射能と紫外吸収を測定した。画分18および19をプールした。
—●—，^{3}Hのカウント；—○—，260nmの吸光度。

図4．アルカリによるDNA鎖の切断

^{3}Hで標識した大腸菌B3株の変性DNA（平均鎖長8350ヌクレオチド）を0.1M，0.15M，又は0.3M NaOHで図に示した時間処理した。アルカリ処理は試料40μlまたは80μl（DNA濃度26nM）をプラスチック小試験管に封入したものを37°Cの孵卵器中で保温して行った。アルカリ処理前後のDNAの5′水酸基末端数および全末端数を皿(i)(ii)および(iii)に記された方法で測定し、何ヌクレオチド当りに1個の切

鎖が生じたかを計算した。A：5'-水酸基末端を生じる切断。B：5'-水酸基末端および5'-リン酸基末端を生じる切断。—●—, 0.1 M NaOH；—○—, 0.15 M NaOH；—✱—, 0.3 M NaOH。アルカリ分解時の試料はNaOH以外にDNA試料由来の、Tris-HCl (pH 8.0)およびEDTAナトリウム塩(pH 8.0)を各々9 mMおよび0.09 mMずつ含む。

図5. [5'-^{32}P]短鎖DNAの硫酸セシウム平衡密度勾配遠心

43°Cでパルス標識した大腸菌RS5064株(polA 480)から調製した[5'-^{32}P]短鎖DNA 110 μlを1.2 mlの再蒸留したDMSOと混合し、37°Cで30分間保温後0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, および10 % DMSOを含む硫酸セシウム溶液(ρ=1.44, 11.5 ml)中でベックマン50 Ti ロータを用いて15°C, 36,000 rpmで60時間遠心した。遠心管の底から0.4 mlずつ分画し、DNAおよびRNAに取り込まれた放射能を測定した。—○—, ^{32}P-RNA；—●—, ^{32}P-DNA；—✱—, ^{3}H-DNA。

LIFE C151 20×20

図6、重い培地から軽い培地へ移した後のDNA量の変化

重い培地で 7×10^8 細胞/ml まで増殖させた大腸菌C-N27株（polA 4113）、25 ml を通常の培地に移し、30°C で培養を開始した。3分および13分後に 6 ml の培養液を 43°C に保温した培養フラスコに移し 43°C で振とうした。一定時間毎に 1 ml の培養液を 0.5 ml の 0.75 N 過塩素酸中に採取し、Burton の方法（122）に従ってDNA含量を定量した。軽い培地で培養を開始した時点（0分）でのDNA量に対する割合（%）をプロットした。—●—, 30°C ; —○—, 43°C.

図7、密度標識DNAの塩化セシウム平衡密度勾配遠心

[5'-^{32}P]超鎖DNA溶液 0.8 ml を、50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA および 0.1% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムを含む塩化セシウム溶液（ρ=1.70、5 ml）中でベックマン 50 Ti ロータを用いて 15°C、36,000 rpm で 60 時間遠

心した。遠心管の底から0.11mlずつ採取し、DNAおよびRNAに取り込まれたカウントを測定した。A～Dの各試料の調製方法は、本文中および皿(i)に記されている。図中の矢印は別の遠心管で遠心して求めた重いDNA(H)および軽いDNA(L)の位置を示す。—●—, ^{32}P-DNA; —○—, ^{32}P-RNA; —×—, ^{3}H-DNA。

図8. [5'-^{32}P]短鎖DNAのDNaseI分解物のDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィー

43°Cでパルス標識した大腸菌RS5064株(polA480)から調製した[5'-^{32}P]短鎖DNAをDNaseIで分解し、7M尿素存在下、中性でDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィーを行った。5'-AMPおよび5'末端にリン酸基を持ったジーおよびトリリボヌクレオチドを鎖長のO.D.マーカーとしてとして加えた。括弧内の数字は鎖長(ヌクレオチド)を示す。—●—, ^{32}Pのカウント; —○—, 260nmの吸光度。

図9. DNaseI分解物の過沃素酸およびアニリン処理前後のDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィー

図8と同様に調製したDNaseI分解物中のテトラヌクレオチドに同じ鎖長のリボヌクレオチド（O.D.マーカーとして）を加え，7M尿素存在下，中性でDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィーを行った(a)。ピーク画分を脱塩後，過沃素酸とアニリンで処理して同様にカラムクロマトグラフィーを行った(b)。溶出には0.15Mから0.25Mの塩化ナトリウムの直線濃度勾配（100 ml）を用いた。—●—, ^{32}Pのカウント；—○—, 260 nmの吸光度。

図10. [5'-^{32}P]短鎖DNAのDNaseIおよびT4 3'→5' エキソヌクレアーゼ分解物のDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィー

43°Cでパルス標識した大腸菌RS5064株（polA 480）から調製した[5'-^{32}P]短鎖DNAを，DNaseIとT4 3'→5' エキソヌクレアーゼで

分解し、図8と同様にカラムクロマトグラフィーを行った。括弧内は鎖長（ヌクレオチド）を示す。●, ^{32}Pのカウント；○, 260 nmの吸光度。

図11. T7ファージの[^{32}P]短鎖DNAのアルカリ分解物のDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィー

[^{32}P]短鎖DNAはIII(長)に記された方法に従って調製した。但し2回目のセファデックスG-100カラムクロマトグラフィーは省略した。アルカリ分解は0.3M KOH中、37°Cで18時間行った。陽イオン交換樹脂[Bio-Rad AG50W(H^+)]を加えて中和した後、DEAE-セファデックスA-25カラム(0.24×22 cm)にかけた。10mM Tris-HCl(pH7.5)-7M尿素を含む塩化ナトリウムの直線濃度勾配(0-0.3M, 120 ml)を用いて溶出した。5'-AMP(0.1μmol)をO.D.マーカーとして加えた。●, ^{32}Pのカウント；○, 260 nmの吸光度。

図12. [^{32}P]短鎖DNAのT4 3'→5' エキソヌクレアーゼ分解物のDEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィー

[^{32}P]短鎖DNAをT4 3'→5' エキソヌクレアーゼを用いて分解した。この分解で全カウントの90.8%が酸可溶性になった。分解物をDEAE-セファデックスA-25カラム（0.16×90cm）にかけ、10mM Tris-HCl（pH 7.5）-7M尿素を含む0.03-0.32M NaClの直線濃度勾配（全量230ml）で溶出した。画分番号259以降は、10mM Tris-HCl（pH 7.5）-7M尿素-2M NaClで溶出した。大腸tRNAのヌクレアーゼSWによる部分分解物を鎖長のO.D.マーカーとして加えた。ATP末端を持ったジ-，トリ-，およびテトラリボヌクレオチドの溶出位置は、同じマーカーを加え、同じ条件でクロマトグラフィーを行って求めた。図の上にプールした画分が示されている。—●—，^{32}Pのカウント；—○—，260nmの吸光度。

図13、オリゴヌクレオチドのボロン酸ゲルカラムクロマトグラフィー

図12に示された画分3～7を分析した。—●—、^{32}Pのカウント；—○—、260nmの吸光度。

図14、ヌクレアーゼP1分解物のPEIセルロース薄層クロマトグラフィー

図13で得られたボロン酸ゲルに結合する画分（3b～7b）および結合しない画分（3a～7a）の一部を各々ヌクレアーゼP1で処理した。分解物に4種の5'-NMPおよびATPをO.D.マーカーとして加え、PEIセルロースの薄層クロマトグラフィーを行い、増感オートラジオグラフィーによって放射能を検出した。

図15、蛇毒フォスフォジエステラーゼ分解物のPEIセルロース薄層クロマトグラフィー

図14でATPの位置に出現したカウントを回収し、蛇毒フォスフォジエステラーゼで処理して図14と同様に分析した。1：$Na_4{}^{32}P_2O_7$およ

び $H_3{}^{32}PO_4$ のマーカー。2：画分5b。3：画分6b。4：画分7a＋7b。

図16．ATP末端を持つジー，およびトリリボヌクレオチドのヌクレアーゼP1分解物のPEIセルロース薄層クロマトグラフィー

画分7aおよび6bの一部をヌクレアーゼSWで分解し，7M尿素存在下にDEAEセファデックスA-25のカラムを用いて分画した。画分6b分解物のpppA-Nおよび画分7a分解物のpppA-Nとpppa-N_1-N_2の各ピークをヌクレアーゼP1で処理し，4種の5'-NMPおよびATPをO.D.マーカーとして加え，図14と同様に分析した。1：画分7aから得られたジヌクレオチド。2：画分7aから得られたトリヌクレオチド。3：画分6bから得られたジヌクレオチド。

図17．現時点で妥当と考えられる不連続複製モデル

親鎖上の黒丸はプライマーRNAの合成開始が可能な部位を示す。丸で囲んだ番号は、複製に関与する蛋白質（表8参照）の作用部位を示す。

図 1.

A
B
C
3'
5'
3'
3'
3'
3'

図 2.

^{3}H (cts/min x 10^{-4} per 30 μl)
A_{260}
Fraction number
0
5
10
15
20
25
30
1
2

図 3.

^{3}H (cts/min x 10^{-2} per 40 μl)
A_{260}
Fraction number
0
5
10
15
20
25

図 4.

A
B
Chain length (nucleotide)/1 cut
100,000
50,000
0
20,000
10,000
0
10
20
30
40
Time (hr)

図 5.

RADIOACTIVITY (cpm/0.1ml)
1000
500
0
○ AL 32P
● AR 32P
× AR 3H
0
10
20
FRACTION NUMBER FROM BOTTOM

図 6.

DNA Content (%)
130
120
110
100
0
10
20
30
min

図 7.

A
B
C
D
^{32}P cpm/fr (—○— AL , —●— AR)
^{3}H cpm/fr (--+--)
Fraction number

図 8.

(1)
(2)
(3)
(4)
(5)
(6)
^{32}P (cts/min x 10^{-2})
A_{260}
Fraction number

図 9.

(a)
(b)
^{32}P (cts/min x 10^{-2})
A 260
Fraction number

図 10.

(1)
(2)
(3)
(4)
^{32}P (cts/min x 10^{-3})
A_{260}
Fraction number

図 11.

cpm / fraction
Absorbance at 260 nm
Fraction number

図 12.

3
4
5
6
7
pppApN
pppA(pN)$_2$
pppA(pN)$_3$
cpm/fraction
Absorbance at 260nm
Fraction number

図 13.

3
4
5
6
7
cpm/fraction
Absorbance at 260 nm
Fraction number

図 14.

UMP
CMP
AMP
GMP
ATP
origin
a b a b a b a b a b
7 6 5 4 3

図 15.

1
2
3
4
origin
PPi
pA
Pi

図 16.

1
2
3
origin
pppA
pG
pA
pC
pU

図 17.

LEADING STRAND
LAGGING STRAND
unwinding
primer synthesis
elongation
primer removal
& gap filling
ligation