

P1-025

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の DNA修復欠損変異株の分離とその特性の解析

望月佳世¹, 時下進一², 太田敏博², 山形秀夫²¹東京薬科大学生命科学研究科, ²東京薬科大学生命科学部

Isolation and characterization of DNA repair deficient mutants of *Thermus thermophilus*

Mochizuki Kayo¹, Tokishita Shin-ichi², Ohta Toshihiro² and Yamagata Hideo²¹School of Life Science, Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Science, ²School of Life Science, Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Science

【背景と目的】

75°C以上で生育できる高度好熱菌には古細菌をはじめ多くの種が知られているが、本学の大島教授らにより1973年に伊豆・峰温泉で単離された *Thermus thermophilus* は、生育温度が50~85°C、至適生育温度が70~75°Cのグラム陰性、好気性の真正細菌である。また *T. thermophilus* は形質転換系が確立した生物の中で、最も高温で生息する菌の一つである。好気性であるため通常の振盪培養で増殖し、栄養培地中での倍加時間は20~40分、最少合成培地で生育が可能で、栄養要求性株を利用した突然変異誘発頻度の解析も可能である。

70~75°Cの高温で生育する高度好熱菌の細胞内では、大腸菌のような中温菌に比べDNA損傷もより高頻度で生じていると考えられる。例えばシトシン塩基の脱アミノ反応でウラシル塩基が生じるが、この反応は37°Cにくらべ85°Cでは1,000倍以上高いと推定されている。また、ヌクレオチド除去修復欠損株 ($\Delta uvrA$) は野生株に比べ弱いUV感受性しか示さない。したがって、そのDNA修復活性の特性や高度好熱菌に特有の修復機構は関心がもたれているが、詳細についてはほとんど明らかになっていない。本研究では種々のDNA修復機能欠損株を分離し、変異原に対する致死感受性、突然変異誘発頻度を解析することを目的とした。

【方法】

(1) *recA* 変異株および *recA uvrB* 二重変異株: pCR4-TOPOベクターにクローニングした *T. thermophilus recA* 遺伝子の中央部分にカナマ

イシン耐性 *HTK* 遺伝子 (1kb) または *pyrE* 遺伝子 (0.6kb) を挿入したプラスミドを構築した。このプラスミドを制限酵素により直鎖状にした後、各々 *T. thermophilus* WH11 (*his-11*) 株または YM11 (*his-11*, $\Delta pyrE$, *uvrB::HTK*) に取込ませて、組換えの結果生じたカナマイシン耐性の形質転換株 (*recA::HTK*) またはウラシル非要求性株 (*recA::pyrE*) を得た。

(2) *udgA* 変異株、*udgB* 変異株および *udgA udgB* 二重変異株: ウラシル-DNAグリコシラーゼの遺伝子と推定されている二つの遺伝子 *udgA*, *udgB* について、*recA* 遺伝子の場合と同様に *HTK* 遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、WH11 (*his-11*) 株を形質転換させた。二重変異株 (*udgA::HTK*, *udg::pyrE*) については、現在作成中である。

【結果】

(1) 得られた変異株 KMR200 (*his-11*, *recA::HTK*) および KMR300 (*his-11*, $\Delta pyrE$, *uvrB::HTK*, *recA::pyrE*) について *recA* 遺伝子の欠損を確認するため、PCRによる挿入断片のサイズ測定ならびにサザンブロッティングを行っている。また、これら変異株のUVや変異原に対する致死感受性について調べた結果について報告する。

(2) 得られた変異株 KMU600 (*his-11*, *udgA::HTK*) および KMU700 (*his-11*, *udgB::HTK*) について *His*⁺ 復帰変異の頻度を調べたが、野生株と同程度であった。今後、*udgA*, *udgB* 両遺伝子を欠損した変異株を作製して突然変異頻度を調べる予定である。