

博士論文

大腸菌の DNA 二本鎖切断修復における
核様体の時空間制御機構

学習院大学大学院 自然科学研究科
生命科学専攻 博士後期課程

野田 俊輔

(21244001)

指導教員 菱田卓 教授

目次

第1章 序論.....	4
1-1 大腸菌における相同組換え修復.....	7
1-2 染色体の高次構造.....	12
1-3 SMC ファミリータンパク質	15
1-4 大腸菌 SMC 様タンパク質 RecN.....	21
第2章 材料及び実験方法.....	26
2-1 株及び培地	26
2-2 PCR.....	26
2-3 コロニーPCR.....	27
2-4 PCR site direct mutagenesis 法	27
2-5 lambda RED リコンビナーゼ法.....	28
2-6 MECS123 $\Delta recN$ 株の作製	29
2-7 BW25113 $\Delta recN \Delta ruvC$ 株の作製	30
2-8 プラスミド DNA.....	31
2-8-① pSOS-RecN プラスミドの作製	31

2-8-② pBAD-RecN プラスミドの作製	32
2-8-③ pSOS-RecN ^{K35A} 、pBAD-RecN ^{K35A} プラスミドの作製.....	33
2-8-④ pSOS-GFP-RecN, pBAD-GFP-RecN プラスミドの作製	34
2-8-⑤ pRecA プラスミドの作製	34
2-8-⑥ pRecA-mCherry プラスミドの作製.....	34
2-9 大腸菌の形質転換.....	35
2-10 細胞生存率測定	36
2-11 ウェスタンブロット	36
2-12 蛍光顕微鏡観察	37
2-13 タイムラプス撮影.....	38
第3章 結果.....	40
3-1 アラビノース依存的に RecN を発現誘導する大腸菌株の構築.....	40
3-2 RecN 発現誘導時期を変化させたときの細胞生存率への影響.....	42
3-3 DSB によって断片化した核様体は、RecN 発現誘導によって再構築される	43
3-4 RecN は組換え過程の中期から後期への移行を促進している	45
3-5 核様体の再構築過程において、RecN は核様体断片の間に局在する	48

3-6 核様体断片のギャップ領域に存在する RecN は核様体断片を再構築する	51
3-7 ギャップ領域にある DSB は相同組換え修復の基質として維持されている	54
3-8 RecN は RecA と共にギャップ領域に局在し、協調して核様体を再構築する	56
第 4 章 考察.....	59
4-1 DSB 修復における核様体構造の動態と RecN の役割.....	60
4-2 なぜ核様体ギャップ領域が形成されたのか？	61
4-3 RecN の発現誘導によってなぜ核様体は再構築されたのか？	62
4-4 RecN の ATPase 活性が持つ役割について	64
4-4 核様体再構築過程における相同組換え修復.....	65
参考文献.....	69
謝辞.....	107

第1章 序論

DNA 二本鎖切断 (DSBs; double strand breaks) は DNA 上で生じる最も重篤な損傷であり、電離放射線や化学変異原、複製フォークの阻害などによって引き起こされる。DSB は染色体構造の局所的な崩壊を引き起こすため、DSB が修復されない場合や不適切に修復された場合は、染色体レベルのゲノム不安定性が引き起こされ、これはヒトにおける発がんや老化の原因になっている。DSB は電離放射線や化学変異原などの外的要因や、DNA 複製の阻害によって生じる [Dronkert and Kanaar, 2001; Bessho, 2003; Kuzminov A, 1999; Cortez, 2015; Payne-Dwyer, 2022]。特に、細胞内で生じる DSB の多くが DNA 複製の阻害を原因として起きており、外的要因がない環境下でも、大腸菌では 1 回の細胞分裂につき 0.1-1 回生じると言われている [Kuzminov, 1999]。DNA の複製は複製起点にある二本鎖 DNA の二重らせん構造が解かれるところから始まり、その後両方向に向かって DNA の合成が始まる [O'Donnell, 2013]。この時、DNA が解けた結果形成される Y 字型の DNA 鎖を複製フォークという。複製フォークにはレプリソームと呼ばれるタンパク質の巨大な複合体が形成されており、実際に DNA の合成を行う DNA ポリメラーゼや、DNA ポリメラーゼを複製フォークに固定する役割を持つ DNA クランプなどで構成されている。DNA の合成が開始されると、複製フォークは進行していくが、マイトマイシン C (MMC) などのクロスリ

ソク剤、紫外線や活性酸素などによる塩基の化学修飾や RNA ポリメラーゼとの衝突などによって複製フォークの進行が阻害される場合がある。この複製阻害が解消されない場合はレプリソームが複製フォークから解離し、ヌクレアーゼが停滞した複製フォークの DNA 鎖を切断するなどの現象が起こるとされており、DSB の原因となる [Zeman and Cimprich 2014]。複製阻害などの要因によって生じた DSB が修復されないか、不正確に修復される場合は、突然変異や染色体再編成、細胞死などを引き起こす。DSB の修復経路は大きく分けて 2 種類存在すると考えられており、非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) と相同組換え修復 (Homologous recombination : HR) が知られている [Cromie et al., 2001; Wyman et al., 2004]。非相同末端結合は DSB 末端同士を連結するシンプルな修復方法である。DSB 末端の一部が分解され加工された後、DNA リガーゼによって結合される。しかし、DSB によって失われた塩基情報は復元されないため、変異が生じやすい修復方法である。また次に紹介する相同組換えは修復の際に姉妹染色体を必要とするため、細胞周期の S 期から G2/M 期でしか起こらない修復経路であるのに対し、非相同末端結合は修復の際に姉妹染色体を必要としないため、細胞周期を通して起こる修復経路である [Rothkamm et al., 2003, Mao et al., 2008]。相同組換え修復 (Homologous recombination : HR) は複製の際に生じた姉妹染色体を用いて DSB を修復する経路で、その仕組みはあらゆる

生物種の間で高度に保存されている。相同組換えは前期、中期、後期の3過程で構成されている [Cromie et al., 2001; Wyman et al., 2004] (図 1)。相同組換え前期は DSB 末端の認識と削り込み反応 (resection) を含む過程である。この反応はエキソ/エンドヌクレアーゼによって触媒されており、ヌクレアーゼによって DSB 末端は 3'側の一本鎖 DNA が突出した構造に加工される (3'突出末端) (図 1A)。相同組換え中期は、前期で生じた 3'突出末端と相同な配列を姉妹染色体 DNA 鎖から探し出す相同鎖探索 (homology search) と、3'突出末端を姉妹染色体 DNA 鎖に侵入させ対合する鎖交換反応 (DNA strand exchange reaction) が起こり、D-loop と呼ばれる構造が形成される (図 1B)。D-loop 形成後は 3'突出末端がプライマーとなって姉妹染色体 DNA 鎖を鋳型とした DNA 修復合成が起こり、DSB によって失われた塩基が挿入される。DNA 修復合成が進行し、3'突出末端側から伸長する DNA 鎖が反対側の DSB 末端に結合すると、2つの相同な2本鎖 DNA 鎖が交換され、DNA 鎖が交差した構造が形成される (図 1C)。この DNA 鎖が交差した構造はホリデー構造 (Holliday junction) または組換え中間体と呼ばれており、これらの構造は相同組換え後期で解消される。ホリデー構造を解消する経路として DSBR (double-strand break repair) 経路が知られており、ヌクレアーゼ複合体がホリデー構造を特異的に認識して切断することで、ホリデー構造を解消する。これによって DSB が生じていた DNA 鎖と姉妹染色体

DNA 鎖が分離できるようになる。この時、ヌクレアーゼ複合体が切断する位置によって非交叉型の組換え体が生じる場合と、交差型の組換え体が生じる場合がある。一方で、3'突出末端側から伸長する DNA 鎖が反対側の DSB 末端に結合する前に D-loop を解消し、ホリデー構造を経ないで合成した DNA 鎖と反対側の DSB 末端でアニーリングさせた後に、さらに DNA 修復合成を行う経路も知られている。この経路は SDSA 経路と呼ばれており、SDSA (synthesis-dependent strand annealing) 経路で修復した場合は非交叉型の組換え体のみを生じる。

相同組換え修復の過程においては様々なタンパク質が働いており、そのメカニズムはあらゆる生物種で保存されている。特に真核生物では出芽酵母、原核生物では大腸菌を用いた先行研究が、相同組換え修復メカニズムの理解やモデル構築において非常に大きな役割を果たしてきた。ここでは、大腸菌相同組換えにおける分子機構を以下に紹介する。

1-1 大腸菌における相同組換え修復

1-1- (1) 相同組換え前期

DSB が大腸菌のゲノム DNA 上に生じると、RecBCD が DSB の末端を認識する [Cox et al., 2000; Amundsen et al 2003; Singleton et al., 2004; Dillingham et al., 2008; Cox, 2007; 8 Smith, 2012]。RecBCD は 3'-5'ヘリカーゼ/エンドヌクレアーゼ活性

を持つ RecB、5'-3'ヘリカーゼ活性を持つ RecD と、これらを 1 つの複合体になぎとめている RecC サブユニットによって構成されている、330 kDa の複合体である。RecBCD は DSB 末端に結合した後、RecD の 5'-3'ヘリカーゼ活性と RecB のエキソヌクレアーゼ活性を介して 5'、3'側双方の DNA 鎖を分解する(図 2A)。その後、大腸菌ゲノム上において約 5kb につき 1 箇所(ゲノム全体で約 1000 箇所)存在する Chi (crossover hotspot instigator, 5'-GCTGGTGG-3') 配列を RecC が認識するとヘリカーゼ活性とヌクレアーゼ活性の極性が変化し、5'-3'方向のみに削り込むようになり、3'末端が突出した一本鎖 DNA 領域が形成されるようになる。

1-1- (2) 相同組換え中期

RecBCD によって一本鎖 DNA 領域が形成された後、複数の RecA 分子が一本鎖 DNA の周囲に結合し、らせん状のフィラメント構造 (RecA ヌクレオプロテインフィラメント、通称; RecA フィラメント) を形成する [Cox, 2007; Smith, 2012; Bell and Kowalczykowski, 2016; Lee and Greene, 2016; 11 Kim et al., 2017]。この RecA フィラメントは DSB 部位の一本鎖 DNA と姉妹染色体にある相同な領域の二本鎖 DNA のうち、一本鎖 DNA と相補する配列を持つ DNA 鎖を対合させ D-loop を形成する。

RecA はバクテリア間で高度に保存された 38 kDa のタンパク質であり、相同鎖探索や鎖交換反応などの、相同組換えにおいて中核をなす過程を触媒する重要な機能を持つ。RecA は 2 つの DNA 結合ドメインを有しており、中央ドメインには一本鎖 DNA 結合及び RecA フィラメントの形成に必要な第一 DNA 結合部位が、C 末端側には二本鎖 DNA 結合に関与し、鋳型の二本鎖 DNA の二重らせんを解いて鎖交換反応を行うのに必要な第二 DNA 結合部位がある [Mazin and Kowalczykowski, 1998; Yang et al., 2020 ; Shinohara et al., 2015]。また、RecA の中央領域には ATPase ドメインがあり、ATP 結合型の RecA は ADP 結合型の RecA よりも、一本鎖 DNA に対する結合親和性が高い。RecA フィラメントは ATP 結合型の RecA で形成されており、RecA フィラメント中の RecA の ATP 結合部位は隣り合う RecA モノマーの境界面に位置している [Bell and Kowalczykowski, 2016]。また、RecA の ATPase 活性は DNA 依存的であり、特に、一本鎖 DNA 存在下において活性が促進される [Shan et al., 1997]。RecA の ATP 結合活性は RecA フィラメントの形成に必要なのに対し、RecA の ATP 加水分解活性は RecA フィラメントの形成ではなく、RecA フィラメント形成より後の過程である鎖交換反応および D-loop 形成に必須である [Shan et al., 1997]。ATP の加水分解によって RecA は ATP 結合型から ADP 結合型に変化し、DNA に対する結合親和性が低下する。したがって、RecA の ATP 加水分解活性は RecA を DNA から解離させる

機能を持つ。RecA はこれらのような ATP 結合・加水分解活性を介して、フィラメント中にある RecA モノマーの位置を再配置する機能を持っている [Kim et al., 2017]。ATPase 活性を介した RecA モノマーの再配置は組換え反応の促進において重要であると考えられており、実際に、RecA フィラメントによる相同鎖探索は、一本鎖 DNA 上に RecA が敷き詰められている状態よりも、ATP 加水分解によって RecA モノマーの一部が解離した状態の方が鎖交換反応の活性が高いことが示されている [Zhao et al., 2017]。さらに、RecA フィラメントは細胞内でひも状の柔軟性のある構造を取っており、フィラメントを細胞の長軸方向に伸ばすことで相同鎖探索に要する時間を減らし、より効率的にしていることが明らかになっている [Lesterlin et al., 2014; Wiktor et al., 2021]。これらのことから、RecA フィラメントは組換え反応を行う上で、フィラメント上の RecA モノマーの飽和度を変動させてフィラメント構造を柔軟に可動させる必要があると考えられている。

また、RecA フィラメントは相同鎖探索や鎖交換反応を触媒する機能のほかに、SOS 応答と呼ばれる、DNA 修復に必要な遺伝子群を発現誘導する機構を活性化する。この SOS 応答によって発現誘導される遺伝子群は SOS 遺伝子群と呼ばれており、相同組換えに関与する SOS 遺伝子として *recN*, *ruvA*, *ruvB* が知られている [Cox, 2007; Bell and Kowalczykowski, 2016]。通常、これらの遺伝子の発現は

SOS 遺伝子上流にある SOS box に結合する LexA リプレッサーによって発現が抑制されているが、RecA フィラメントによって LexA が持つ自己切断活性が活性化されることで、SOS 遺伝子群の発現を脱抑制する [Gao et al., 2023; Maslowska et al., 2019]。また、RecA 自身も SOS 遺伝子群の一つであり、SOS 応答によって発現量が増加する [Bell and Kowalczykowski, 2016]。

1-1- (3) 相同組換え後期

D-loop が形成されると DNA 修復合成が起こり、DNA ポリメラーゼが D-loop の 3' 突出末端部分をプライマーとして用いることで塩基が挿入される。DNA 修復合成によって D-loop の 3' 突出末端部分と反対側の DSB 末端がつながると、組換え中間体が形成される。組換え中間体は、主に RuvABC 複合体によって解消される。RuvABC 複合体はホリデー構造を認識する RuvA、ヘリカーゼ活性を持つ RuvB、ヌクレアーゼ活性を持つ RuvC で構成される複合体である [Cromie et al., 2001; Wyman et al., 2004; Cox et al., 2000; Shinagawa and Iwasaki, 1996; West, 1997; Parsons et al., 1995]。RuvA と RuvB の複合体は ATP 依存的なヘリカーゼ活性を介してホリデー構造の位置を移動させる（分岐点移動）。このうち、RuvB ヘリカーゼは六量体を形成する AAA+ATPase であり、隣り合うモノマー同士の境界面に Walker A モチーフとアルギニンフィンガーが配置されている [Hishida et

al., 2004; Wald et al., 2022]。これらの部位で ATP 結合・ATP 加水分解・ADP の解離が協調して起こることでモーター活性を示すと考えられている。RuvC は活性に二価の金属イオンを要求する二量体のヌクレアーゼで、ホリデー構造に生じた (A/T) TT (G/C) 配列を認識して切断し [Bennett et al., 1993; Shah et al., 1994; Shida et al., 1996]ホリデー構造を解消する。その後、切断された DNA 鎖は DNA リガーゼによって再結合されることで損傷 DNA 鎖と姉妹染色体 DNA 鎖が分離され、DSB 修復が完了する。

1-2 染色体の高次構造

細胞内において、ゲノム DNA はタンパク質と共に高次構造を形成することで染色体という形で存在しており、DSB 修復においても染色体の高次構造を適切に制御することは重要である。染色体の構造は、真核生物と原核生物では異なる制御メカニズムが存在する。真核生物のゲノム DNA は八量体ヒストンタンパク質によって巻き付くことでヌクレオソームを形成する。さらにヌクレオソームが重なってクロマチン繊維を形成し、凝縮された状態で核膜の中に格納されている [Kouzarides et al., 2007]。ゲノム DNA の高次構造を適切に制御することは、核膜の中にゲノム DNA を格納することだけではなく、DNA 複製や遺伝子の転写制御、DNA 損傷修復を行う上でも重要である [Martin et al., 2020]。真核生物の

クロマチンにおいて、ヌクレオソームが高度に凝縮された構造を持つ領域はヘテロクロマチンと呼ばれている [Passarge et al., 1979]。ヘテロクロマチン領域は RNA ポリメラーゼなどのタンパク質が結合しづらい状態になっており、この領域の遺伝子は転写が抑制されている [Sinha et al., 2009; Grewal & Elgin, 2002]。一方、弛緩しているクロマチン領域はユークロマチンと呼ばれており、RNA ポリメラーゼなどのタンパク質が結合しやすく、遺伝子の転写が起こりやすい [Kouzarides et al., 2007]。また、外的・内的環境に応じてこれらのクロマチン構造を凝縮、弛緩することで、遺伝子発現や DNA 損傷修復を制御している。

原核生物は核膜とヒストンを持たず、真核生物とは異なるメカニズムでゲノム DNA 全体の構造が制御されている。大腸菌ゲノムは約 4.6Mbp の環状 DNA である [Verma et al., 2019]。大腸菌ゲノム DNA はランダムコイル構造を取った場合、その体積は最大で $523\mu\text{m}^3$ 程であると推定されているが、これは大腸菌細胞の体積と考えられている $1.0\mu\text{m}^3$ よりも大きい。そのため、大腸菌のゲノム DNA を細胞内へ格納するためには、ランダムコイルを取っている時の体積よりも 1000 倍以上に凝縮し、コンパクトにしなければならない。折りたたまれて凝縮された大腸菌のゲノム DNA は核様体 (Nucleoid) と呼ばれるが、核様体は大きく分けて 2 つの仕組みで構築されている。一つ目は環状 DNA である大腸菌ゲノム DNA に形成される超らせん構造である。超らせん構造の形成・解消に関わ

るタンパク質としてトポイソメラーゼが知られており、大きく分けて I 型と II 型に分類されている。I 型トポイソメラーゼは二本鎖 DNA のうち片方の鎖を切断して、再結合する。II 型は二本鎖 DNA のうち両方の鎖を切断し、切れ目に別の二本鎖 DNA を通した後に切断した二本鎖 DNA 鎖を再結合する。大腸菌は I 型トポイソメラーゼであるトポイソメラーゼ I とトポイソメラーゼ III、II 型トポイソメラーゼであるトポイソメラーゼ IV、DNA ジャイレースを有している [Verma et al., 2019]。このうち、DNA ジャイレースは負の超らせん構造の形成に関わるのに対し、トポイソメラーゼ I は負の超らせん構造の解消に関与する。これらのトポイソメラーゼの活性のバランスが適切に制御されることによって、超らせん構造による大腸菌ゲノム DNA の折りたたみが可能になる。また、トポイソメラーゼ IV は絡まった姉妹染色体 DNA 鎖を解消する役割を持つ。トポイソメラーゼ III は負の超らせん構造解消に関わるとされているが、その機能や役割はよくわかっていない。二つ目は核様体タンパク質 (nucleoid-associated protein : NAP) と呼ばれるタンパク質群による大腸菌ゲノム DNA の折りたたみ機構である。大腸菌は真核生物のようにヒストンを持たないが、核様体タンパク質 (nucleoid-associated protein : NAP) と呼ばれるタンパク質群がゲノム DNA を実際に折りたたみ、コンパクトな構造に凝縮している。大腸菌の核様体タンパク質は少なくとも 12 種類存在すると言われている [Verma et al., 2019]。特に解析が

進んでいる核様体タンパク質として HU、IHF、H-NS や Fis などが知られている。

これらのタンパク質はいずれも DNA 結合活性を持つが、DNA 配列や DNA の立体構造に対する結合親和性や、DNA を折りたたむメカニズムが異なる。また核様体タンパク質のほかに、次に紹介する SMC ファミリータンパク質も核様体の形成に関与する。

1-3 SMC ファミリータンパク質

Structural maintenance of chromosomes (SMC) ファミリータンパク質は染色体の高次構造形成に関わるタンパク質群であり、バクテリアからヒトまで保存されている [Hirano, 2006; Graumann and Knust, 2009]。このファミリーに属するタンパク質は N 末端と C 末端に球状のヘッドドメインを持ち、中央部はコイルドコイルドメインで構成されており、リング状の複合体を形成する (図 3A)。コイルドコイルドメインは主に α ヘリックスで構成されており、コイルドコイルの中間で折り返すことで α ヘリックスが逆並行に連なったような構造になっている。このコイルドコイルが折り返している部分はヒンジと呼ばれており、この位置で対合することでホモまたはヘテロダイマーを形成する (図 3A)。立体構造を形成する際はポリペプチド鎖がヒンジで折り返す構造を取っているため、SMC ファミリータンパク質のヘッドドメインは N 末端と C 末端で会合する形

で形成されている。このヘッドドメインは ABC ATPase と呼ばれる ATP 加水分解活性を持つ領域を形成しており、Walker A、Walker B、Signature motif (motif C) とよばれるモチーフで構成されている。SMC ファミリータンパク質はヘッド間でも相互作用を形成するが、このヘッド間の相互作用には ATP の結合が必要であり、2つのヘッドが ATPase ドメインを介して ATP を挟み込むようにして会合する。したがって、SMC ファミリータンパク質はヒンジとヘッドの2カ所で会合しており、ホモまたはヘテロダイマー複合体はリング状の閉じた構造になっている。SMC タンパク質はこのリング構造の開閉を行って DNA をリングの中空に通すことで結合する [Graumann and Knust, 2009; Lehmann, 2005]。この結合様式はトポロジカル DNA 結合と呼ばれており、SMC タンパク質が持つ DNA の高次構造制御に必須の機能となっている。真核生物における代表的な SMC ファミリータンパク質として、複製によって生じた染色体のコピーである姉妹染色分体の接着やループ形成による転写制御を行うコヒーシン複合体と、染色体の凝集や娘細胞への分配において機能するコンデンシン複合体が知られている [Graumann and Knust, 2009; Lehmann, 2005; Davidson et al., 2019; Kagey et al., 2010] (図 3B)。

(1) コヒーシン

コヒーシンは真核生物が持つ SMC 複合体の一つであり、SMC タンパク質である SMC1 と SMC3 のヘテロダイマーと、クレイシンサブユニット、HEAT リピーターサブユニットで構成されている。コヒーシンはリング中空に DNA を通す、トポロジカル結合と呼ばれる DNA 結合様式を持つことが知られているが、コヒーシン複合体単体ではトポロジカル結合を行うことができず、コヒーシンローダーと呼ばれるタンパク質複合体を必要とする [Murayama and Uhlmann, 2014; Murayama et al., 2018]。また、コヒーシンは二本鎖 DNA へのトポロジカル結合に加えて、二本鎖 DNA と一本鎖 DNA をリング中空に入れこんでつなぎとめる DNA テザリング活性を有しており、この活性が姉妹染色体の接着に必須であると考えられている [Murayama et al., 2018] (図 4A)。コヒーシンは細胞周期の S 期開始直前にクロマチンヘリクルートされる [Murayama, 2018; Singh and Gerton, 2015]。その後、DNA 複製が開始されると、複製フォークの進行と共役してコヒーシンによる姉妹染色体の接着が起こる [Srinivasan et al., 2020]。コヒーシンによる姉妹染色体の接着は細胞周期の M 期中期まで維持されるが、M 期後期になるとセパレーズと呼ばれるプロテアーゼがコヒーシンのリング構造を切断し、姉妹染色体の接着を解除する [Singh and Gerton, 2015; Ciosk et al., 1998; Uhlmann et al., 1999]。また近年、コヒーシンはそのリング構造を介してゲノム DNA 上のプロモーターとエンハンサー領域を近接させ、転写を促進する機能を

持つことや、クロマチンループを介した染色体の高次構造形成を行っていることも報告されている [Davidson et al., 2019] (図 4B)。

(2) コンデンシン

コンデンシン複合体は SMC2 と SMC4 のヘテロダイマーに加えて、非 SMC サブユニットとしてコンデンシン独自のクレイシンと HEAT リピートタンパク質で構成される (図 3B)。電子顕微鏡を用いた先行研究より、コンデンシンはリング状構造に加えて、ヘッドドメインを介して重合する活性を持つことも知られている [Hirano, 2006; Stray et al., 2005]。コンデンシン複合体にはコンデンシン I とコンデンシン II がある [Hirano, 2006; Ono et al., 2003]。どちらもコアサブユニットである SMC タンパク質は SMC2 と SMC4 だが、それぞれ固有の非 SMC サブユニットを持つ。また、コンデンシン I とコンデンシン II を持つかどうかは生物種によって異なる。植物や脊椎動物などはコンデンシン I とコンデンシン II の双方を持つが、出芽酵母や分裂酵母などの菌類はコンデンシン II を持たず、コンデンシン I のみを持つ [Ono et al., 2003; Nishide and Hirano, 2014; Hirano, 2016]。さらに、コンデンシン I とコンデンシン II の双方を持っても、どちらのコンデンシン複合体が体細胞分裂に必須なのは生物種によって異なる [Nishide and Hirano, 2014; Fujiwara et al., 2013; Sakamoto et al., 2011]。精製タンパク質を用

いた生化学的解析より、コンデンシンは ATP とトポイソメラーゼ I 依存的に正の超らせん構造を形成することが知られている [Kimura and Hirano,1997]。さらに、枯草菌のコンデンシンに関する先行研究より、コンデンシンは分子内のみではなく、分子間のヘッドドメインでも相互作用することが知られている [Hirano, M and Hirano T, 1998]。したがって、コンデンシンはこれらの活性を介して DNA に超らせん構造を作り出し、それらを寄り集めることで染色体の凝集を行っていると考えられている [Hirano, 2006](図 4C)。またこの染色体凝集活性の他にも、DNA 損傷修復においても機能することも報告されている [Kakui et al., 2020]。

(3) その他の真核 SMC タンパク質

この他にも真核生物の SMC タンパク質として、SMC5/SMC6 複合体や RAD50 が知られている。SMC5/SMC6 はコヒーシンやコンデンシンによく似た構造を持つ複合体であり、主に DNA 損傷修復に関与すると考えられているが、詳細な機能はよくわかっていない。RAD50 は相同組換え修復において DSB 末端を削り込むヌクレアーゼ複合体である MRN (MRX) 複合体のサブユニットとして知られており、MRN (MRX) 複合体のヌクレアーゼ活性や DNA 結合活性を制御している [Lim et al., 2011]。

(4) 原核生物における SMC タンパク質

原核生物においても SMC タンパク質や、類似した構造を持つタンパク質の存在は報告されている [Hirano, 2006; Graumann and Knust, 2009; Lehmann, 2005]。原核生物の SMC タンパク質も、SMC サブユニットと非 SMC サブユニットで構成された複合体であり、N 末端と C 末端で形成されたヘッドドメインがコイルドコイルでつながれている構造を取っている。原核生物の SMC タンパク質複合体は、真核生物の SMC タンパク質と同様にリング状の複合体を形成するが、ヘテロダイマーを形成する真核生物の SMC タンパク質複合体とは異なり、原核生物の SMC タンパク質複合体の多くはホモ二量体で形成される (図 3B)。大腸菌においては少なくとも MukB、SbcC、RecN の三種類の SMC タンパク質が存在することが知られている [Nolivos and Sherratt, 2014]。MukB は非 SMC サブユニットに相当する MukE、MukF と MukBEF 複合体を形成し、核様体の凝縮を行う [Niki et al., 1991; Petrushenko et al., 2010; Badrinarayanan et al., 2012]。MukBEF は真核生物におけるコンデンシンに相当するといわれており、リング構造の中空に DNA を取り込む活性や複数分子の MukBEF 複合体で相互作用して連結することで、ループ構造やらせん構造を形成し、それらを寄り集めることで DNA をコンパクトに折りたたんでいると考えられている [Hirano, 2006]。細胞内において、MukBEF 複合体は 2 分子で 1 つのユニットで存在しており、この MukBEF ダイ

マーのユニットは MukF を介して形成されている [Verma et al., 2019, Badrinarayanan et al., 2012]。また、MukBEF 変異による致死・無核細胞形成の表現型は I 型トポイソメラーゼである TopA の変異によって抑制される [Sawitzke and Austin 2000]。詳細なメカニズムは不明だが、TopA 変異によって負の超らせん構造の増加が染色体の凝集や分配に影響を与えていることが関連していると考えられている。

SbcC は SbcDヌクレアーゼと共に複合体を形成しており、複製フォークに生じたヘアピン構造を切断することが知られている [Connelly and Leach 1996; Lim et al., 2011; Connelly et al., 1998]。また、この複合体は真核生物において DSB 末端の削り込みに関与する Rad50-Mre11 複合体に類似した構造を持つことから、エキソ/エンドヌクレアーゼ活性を介した DSB 末端の削り込み等に関わっている可能性が示唆されている。

1-4 大腸菌 SMC 様タンパク質 RecN

RecN はバクテリア間で高度に保存されている SMC タンパク質である [Pellegrino et al., 2012]。コイルドコイルドメインが他の SMC タンパク質よりも 1/3 以下の長さである点異なるが、他の SMC タンパク質と同様に ATPase 活性を有するヘッドドメインを持つ [Rostas et al., 1987; Courcelle et al., 2001] (図 5A-

C)。非常に高い放射線耐性を持つことで知られるバクテリア種である *Deinococcus radiodurans* から RecN の立体構造が解かれており、RecN モノマー同士がヒンジ-ヒンジ間、ヘッド-ヘッド間で相互作用することが示されている [Pellegrino et al., 2012]。また、大腸菌 RecN の精製タンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーで解析したところ、RecN タンパク質は最大で 4 量体を形成し得ることが示されている [Keyamura and Hishida, 2019]。さらに、RecN のコイルドコイルドメインは他の SMC 複合体よりも短く、ホモ二量体では 2 本以上の DNA 分子をリング構造内に取り込むのは難しい可能性がある。これらのことから、RecN はヒンジとヘッドを介して 4 量体でリング構造を形成していると考えられている [Keyamura and Hishida, 2019]。

大腸菌 *recN* は SOS 遺伝子群の一つであり、遺伝子上流のプロモーター領域には 3 つの SOS ボックスが存在する [Rostas et al., 1987; Courcelle., 2001; Odsbu 2014]。SOS ボックスには LexA リプレッサーが結合しており、通常、RecN の発現誘導は抑制されている。しかし、DNA 損傷が起こると、LexA が分解されて SOS 応答が起こり、RecN の発現が誘導される。また、RecN は C 末端側に ClpXP プロテアーゼによって認識される分解シグナルを有しており、DNA 損傷修復後は速やかに分解される [Neher et al., 2006; Nagashima et al., 2006; Warr et al., 2019]。これらのことから、RecN の発現は DNA 損傷条件下においてのみ起こるよう厳

密に制御されており、DNA 損傷修復において特異的に働くタンパク質であると考えられている。

recN の変異体は電離放射線や I-Sce I スクレアーゼによるゲノム DNA の切断、マイトマイシン C (MMC) による複製阻害に対して高感受性を示す [Warr et al., 2019; Sargentini and Smith, 1983; Meddows et al., 2005]。また、大腸菌の核様体を 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色して観察した先行研究より、MMC で処理した $\Delta recN$ 細胞は細胞の伸長に加えて異常な核様体構造を示し、3 個以上の拡散した短い核様体断片を示すことが知られている (核様体の断片化) [Keyamura et al., 2013]。また、大腸菌細胞を MMC で処理した時、野生型細胞では複製フォーク周辺の姉妹染色体 DNA 鎖が接着される様子が観察されるが、*recN* 欠損株では姉妹染色体の接着が見られず、複製フォーク周辺の DNA 鎖が解離している様子が観察される [Vickridge et al., 2017]。さらに、大腸菌細胞を MMC で処理した時の RecN の細胞内局在を調べた先行研究より、SOS 応答に依存して発現誘導された RecN は核様体上に局在することが分かっている [Keyamura et al., 2013]。また、これに加えて、*Caulobacter crescentus* を用いて DSB が生じたときの RecA 細胞内局在の変化をリアルタイムで観察した先行研究より、RecN は RecA フィラメントの動態を制御しており、RecA による相同鎖探索には RecN が必要であることが分かっている [Chimthanawala et al., 2022]。これらのことから、

RecN は相同組換え修復の中期に関与しており、DSB が生じたときに、DNA 鎖の接着を介して核様体構造を維持する役割を担っていることが示唆されている。

近年、RecN の精製タンパク質を用いた先行研究より、RecN のタンパク質としての活性が明らかになりつつある。RecN は環状一本鎖 DNA、環状二本鎖 DNA に対して DNA 結合活性を示すが、直鎖上二本鎖 DNA に対してはほとんど結合活性を示さない。また、RecN と環状二本鎖 DNA の複合体に対して制限酵素処理を行い、二本鎖 DNA を直鎖化した場合でも、RecN は二本鎖 DNA から解離する [Keyamura and Hishida, 2019]。一方で、RecN は RecA と物理的に相互作用でき、RecA 存在下では RecN の直鎖上 DNA からの解離は抑制される。これらのことから、RecN は二本鎖 DNA に対してトポロジカル DNA 結合の様式で結合して二本鎖 DNA 上を滑空しており、RecA が RecN を DNA 末端に留めていることが示唆されている。さらに、RecN は RecA 依存的な D-loop 形成や鎖交換反応を促進することが分かっている [Reyes et al., 2010; Uranga et al., 2017; Keyamura and Hishida, 2019]。これらの実験事実を踏まえた上で、現在では、RecN はゲノム DNA の二本鎖 DNA に対してトポロジカル結合し、二本鎖 DNA 上を滑空して移動することで RecA がフィラメントを形成している一本鎖 DNA 領域にリクルートされ、その後 RecA 依存的な組換え反応を促進するというモデルが提唱されている [Keyamura and Hishida, 2019] (図 5D)。

RecN は DNA 損傷に応答して発現誘導され、相同組換え修復の促進を介して核様体の高次構造を維持する役割を担っていると考えられている。本研究では RecN の発現誘導タイミングの変化が細胞にもたらす影響を調べるために、アラビノース依存的に下流の遺伝子を発現誘導するプロモーターである P_{BAD} プロモーターを活用し、RecN の発現誘導を時期特異的に発現する大腸菌株を構築した。この大腸菌株を用い、DSB 存在下における RecN の発現誘導タイミングを変化させた時の核様体構造や細胞生存率、RecN や RecA の細胞内局在を調べた。その結果、長時間の MMC 処理によって断片化した核様体が、RecN の発現誘導によって元の状態に再構築された。これに伴い、細胞生存率も野生型細胞と同程度になるまで回復した。これらの事から、 $\Delta recN$ 細胞で観察されるような核様体の断片化は、DNA 分解等で染色体構造が完全に崩壊した状態を反映しているのではなく、相同組換えの再活性化によって再構築が可能な状態にあることが示唆された。また、この核様体が再構築される過程において RecN と RecA は断片化した核様体の間の領域に局在していた。このことから、RecN はゲノム DNA に DSB が生じたときに、RecA 依存的な組換え反応の促進を介して損傷部位周辺の DNA 鎖構造を時空間的に制御していることが示唆された。

第2章 材料及び実験方法

2-1 株及び培地

本研究で示した大腸菌株は Table 1 に示した。大腸菌の培地は LB 培地を用いた。LB 培地には必要に応じて ampicillin (50 µg/mL)、chloramphenicol (100µg/mL)、kanamycin (30µg/mL) を加えた。

2-2 PCR

精製した大腸菌ゲノム DNA またはプラスミドを鋳型として PCR を行った。使用したプライマーは Table 3 に示した。PCR の反応組成と反応プログラムは以下に示す。アガロースゲル電気泳動で目的の長さの DNA 断片が増幅されていることを確認した後、PCR 産物を Wizard®SV Gel and PCR Clean up System (Promega) を用いて精製した。精製した DNA 断片は NanoDrop 8000 (Thermo SCIENTIFIC) を用いて DNA 濃度の測定を行った。PCR 反応には Pyrobest™ DNA Polymerase (Takara) を用いた。

PCR反応組成

滅菌MilliQ水	74 µl
10x Pyrobest buffer II	10 µl
dNTP mixture	10 µl
50 pmol/µl Forward プライマー	2 µl
50 pmol/µl Reverse プライマー	2 µl
ゲノムDNA or Plasmid DNA	1 µl
Pyrobest polymerase	1 µl
Total	100 µl

PCR反応プログラム

95°C	1 min	} 25 サイクル
95°C	30 sec	
55°C	10 sec	
68°C	1 min/1kb	
68°C	5 min	
4°C	∞	

2-3 コロニーPCR

大腸菌株目的の DNA 断片が挿入されていることを確認するため、コロニー PCR を行った。lambda RED リコンビナーゼ法により得られたコロニーを爪楊枝で少量とり、25 μ l の反応液が入ったチューブに懸濁し、PCR 法によって DNA 断片の増幅を行った。PCR の反応組成と反応プログラムは以下に示す。アガロース電気泳動で目的の長さの DNA 断片が増幅されているのかを確認した。使用したプライマーは Table 3 に記載した。

PCR反応組成		PCR反応プログラム	
滅菌MilliQ水	4.55 μ l	94°C	2 min
2x KOD buffer	6.25 μ l	98°C	10 sec
dNTP mixture	1.25 μ l	60°C	30 sec
50 pmol/ μ l Forward プライマー	0.1 μ l	68°C	1 min/1kb
50 pmol/ μ l Reverse プライマー	0.1 μ l	68°C	3 min
KOD FX polymerase	0.25 μ l	8°C	∞
Total	12.5 μ l	} 35 サイクル	

2-4 PCR site direct mutagenesis 法

pUC19ndeX-RecN または pBAD-RecN を鋳型として PCR を行った。使用したプライマーは Table 3 に記載した。PCR の反応組成と反応プログラムは以下に示す。アガロース電気泳動で目的の長さの DNA 断片が増幅されていることを確認した後、PCR 産物に対する Dpn I を 2 μ l 加え、37°Cで一晩インキュベートした。

その後、Wizard®SV Gel and PCR Clean up System（Promega）を用いて精製し、精製した DNA で大腸菌（XL1-blue）を形質転換した。得られたコロニーを培養し、Wizard®SV Gel and PCR Clean up System（Promega）を用いてプラスミド DNA を精製した。精製したプラスミド DNA は制限酵素処理後にアガロースゲル電気泳動で目的の長さの DNA 断片の存在を確認した。その後、シーケンス解析により、正確な遺伝子改変が行われたことを確認した。シーケンス解析に使用したプライマーは Table 3 に示した。

PCR反応組成

滅菌MilliQ水	74.8 µl
10x Pyrobest buffer II	10 µl
dNTP mixture	10 µl
50 pmol/µl Forward プライマー	2 µl
50 pmol/µl Reverse プライマー	2 µl
ゲノムDNA or Plasmid DNA	0.2 µl
Pyrobest polymerase	1 µl
Total	100 µl

PCR反応プログラム

95°C	1 min	} 30 サイクル
95°C	30 sec	
55°C	10 sec	
68°C	1 min/1kb	
68°C	5 min	
4°C	∞	

2-5 lambda RED リコンビナーゼ法

遺伝子破壊を行う大腸菌株を pKD46 プラスミドで形質転換した。pKD46 プラスミドは RecBCD を阻害する活性を持つ Gam 複合体をアラビノース依存的に発現誘導するプラスミドで、温度感受性の複製起点を持つ。得られた形質転換体を 10mM のアラビノースを含む SOB+Amp 培地で OD600=0.6 程度になるまで培養した。その後、氷冷 10% glycerol で細胞を 3 回洗浄し、菌体を 100 µl の氷冷 10%

glycerol で懸濁した後、PCR で作製した遺伝子破壊用の DNA 断片を 1 μ l 加えた。

さらに、エレクトロポレーター (Eppendorf) を用いて 2500V でエレクトロポレーションを行った後、速やかに SOC 溶液を 900 μ l 加えて 37°C で 1 時間培養した後、LB_Km 寒天培地に菌液を塗布して 37 で一晩培養した。その後、得られたコロニーを LB_Km 寒天培地に塗りなおして 42°C で一晩培養することで、pKD46 プラスミドを除去した。

2-6 MECS123 $\Delta recN$ 株の作製

MECS123 株 (MG1655 hupA-mCherry frt-Kan^R) 株は九州大学大学院の片山勉教授、尾崎省吾准教授から提供していただいたものを使用した。MECS123 $\Delta recN$ 株の作製は lambda RED リコンビナーゼ法 [Datsenko and Wanner, 2000] に基づいた方法で作製した。まず、*recN* 遺伝子破壊用に用いる DNA 断片を作製するために、MECS123 のゲノム DNA を鋳型として、frtKmN_F と frtKmN_R をプライマーとして用いて PCR 反応を行い、カナマイシン耐性遺伝子 (Kan^R)、*recN* 遺伝子の上流、下流と相同な配列と、その両端に FLP リコンビナーゼ認識配列 (frt) を持つ DNA 断片 (frt-Kan^RN 断片) を増幅した。次に、MECS123 株からカナマイシン耐性遺伝子を取り除くために、MECS123 株を pCP20 プラスミド形質転換した。pCP20 プラスミドは FLP リコンビナーゼを発現誘導するプラスミドで、

温度感受性の複製起点を持つ [Datsenko and Wanner, 2000]。この操作により MECS123 株から *frt* 配列に挟まれているカナマイシン耐性遺伝子 Kan^R をゲノム DNA から取り除いた。その後、この株に対して lambda RED リコンビナーゼ法を行い、*frt*-Kan^RN 断片を用いてカナマイシン耐性遺伝子を *recN* 遺伝子座に組換えすることで *recN* 遺伝子を破壊した。最終的に得られたカナマイシン耐性コロニーは *recN*_+50F、*Kan_in676* を用いてコロニーPCR を行うことで、*recN* が破壊できていることを確認した。

2-7 BW25113 $\Delta recN \Delta ruvC$ 株の作製

BW25113 $\Delta recN \Delta ruvC$ 株の作製は lambda RED リコンビナーゼ法 [Datsenko and Wanner, 2000] に基づいた方法で作製した。まず、*ruvC* 遺伝子破壊用に用いる DNA 断片を作製するために、MECS123 のゲノム DNA を鋳型として、*frtKmC_F2* と *frtKmC_R2* をプライマーとして用いて PCR 反応を行い、カナマイシン耐性遺伝子 (Kan^R)、*ruvC* 遺伝子上流、下流と相同な配列と、その両端に FLP リコンビナーゼ認識配列 (*frt*) を持つ DNA 断片 (*frt*-Kan^RC 断片) を増幅した。次に、BW25113 $\Delta recN::frt-Km^R$ 株からカナマイシン耐性遺伝子を取り除くために、この株を pCP20 プラスミドで形質転換した。この操作により $\Delta recN::frt-Km^R$ 株から *frt* 配列に挟まれているカナマイシン耐性遺伝子 Kan^R をゲノム DNA から取り除

いた。その後、この株に対して lambda RED リコンビナーゼ法を行い、*frt-Kan^RC* 断片を用いてカナマイシン耐性遺伝子を *ruvC* 遺伝子座に組換えることで *ruvC* 遺伝子を破壊した。最終的に得られたカナマイシン耐性コロニーは *ruvC up76_F*、*Kan_in676* を用いてコロニーPCR を行うことで、*recN* が破壊できていることを確認した。

2-8 プラスミド DNA

本研究に用いたプラスミド DNA は以下の手順で作製した。作製に用いたオリゴ DNA の配列や、作製したプラスミド DNA の構成は Table 2 に示した。プラスミド DNA の配列・構造は DNA シーケンス法により確認した。

2-8-① pSOS-RecN プラスミドの作製

大腸菌 BW25113 株のゲノム DNA を鋳型とし、*RecN* (F) *Bam*HIと *RecN* (R) *Bam*HIをプライマーとして用いて PCR を行うことで *recN* 遺伝子と SOS プロモーターを含む DNA 断片を増幅した。pUC19 に存在する *Nde*Iサイトを破壊するために、site-direct mutagenesis 法で *Nde*Iサイトに点変異を導入した pUC19 プラスミド (pUC19ndeX) を作製した。DNA 断片とプラスミドそれぞれを *Bam*HIで処理したものを用いてライゲーション反応を行うことで、pUC19ndeX の *Bam*HI

サイトに *recN* 遺伝子と SOS プロモーターを含む DNA 断片を挿入した pUC19ndeX-RecN Nde とした。次に、pUC19ndeX-RecN Nde に対して site-direct mutagenesis を行い、*recN* 遺伝子内にある *NdeI* サイトを削除した後、*recN* 遺伝子の開始コドンの位置に *NdeI* サイトを導入し、pUC19ndeX-RecN とした。この pUC19ndeX-RecN を *Bgl*III と *Bam*HI で処理し、得られた断片を切り出して精製した後、*Bam*HI で処理した pSTV28 プラスミドと共にライゲーション反応を行うことで、pSTV28 プラスミドの *Bam*HI サイトに SOS プロモーターと *recN* 遺伝子を挿入し、pSOS-RecN とした。

2-8-② pBAD-RecN プラスミドの作製

ベクター用として、pBAD28 プラスミドをベースとしたプラスミドを作製した [Guzmann et al., 1995]。はじめに、site-direct mutagenesis 法で pBAD24 プラスミドのマルチクローニングサイトの *NcoI* サイトを *NdeI* サイトに置換した。マルチクローニングサイトを *Cla*I、*Hind*III で切り出し、*P_{BAD}* プロモーターと *NdeI*、*Hind*III サイトを含むマルチクローニングサイトを持つ DNA 断片を精製した。この DNA 断片と、*Cla*I、*Hind*III で処理した pBAD28 プラスミドを用いてライゲーション反応を行うことで、pBAD28 の *Cla*I、*Hind*III サイトに *P_{BAD}* プロモーターとマルチクローニングサイトを挿入し、pTF200 とした。インサート用の DNA 断片とし

て、pSOS-RecN プラスミドを *Nde*I、*Hind*III で処理することで *recN* 遺伝子を含む DNA 断片を切り出し、精製した。この DNA 断片と *Nde*I、*Hind*III で処理した pTF200 プラスミドを用いてライゲーション反応を行うことで *Nde*I、*Hind*III サイトに *recN* 遺伝子を挿入し、pBAD-RecN とした。

2-8-③ pSOS-RecN^{K35A}、pBAD-RecN^{K35A} プラスミドの作製

pUC19ndeX-RecN に対して *recNK35A_F* と *recNK35A_R* をプライマーとして用いて site-direct PCR を行うことで RecN の 35 番目のコドンである AAA (Lys) を GCA (Ala) に置換し、pUC19ndeX-RecN^{K35A} とした。その後、pUC19ndeX-RecN^{K35A} を *Nde*I、*Bam*HI で処理して *recN*^{K35A} 断片を切り出して精製した。これに加えて、pSOS-RecN を *Nde*I、*Bam*HI で処理してベクター側を切り出すことで SOS プロモーターを含む pSTV28 断片を切り出して精製した。これらの断片を用いてライゲーション反応を行うことで、SOS プロモーターを持つ pSTV28 プラスミドの *Nde*I、*Bam*HI に *recN*^{K35A} 遺伝子をクローニングし、pSOS-RecN^{K35A} とした。pBAD-RecN^{K35A} は pBAD-RecN に対して *recNK35A_F* と *recNK35A_R* をプライマーとして用いて site-direct PCR を行うことで直接変異を導入し、作製した。

2-8-④ pSOS-GFP-RecN, pBAD-GFP-RecN プラスミドの作製

5'側と 3'側に *NdeI* の認識配列を持つ GFP 遺伝子断片を *NdeI* で処理した (GFP タグ)。GFP タグを同じく *NdeI* で処理した pSOS-RecN、pBAD-RecN プラスミドに挿入した。RecA と RecN の共局在を観察する際 (図 12E) は、pBAD-RecN からアンピシリン耐性遺伝子を削除したプラスミド (pBAD-RecN Amp-) を使用した。pBAD-RecN を *HindIII* と *FpsI* で処理してベクター側の DNA 断片を切り出した後、DNA Blunting Kit (Takara Bio) を用いて末端平滑化を行った。その後、ライゲーション反応を行って得られたプラスミドを pBAD-RecN Amp-とした。

2-8-⑤ pRecA プラスミドの作製

大腸菌 BW25113 株のゲノム DNA を鋳型とし、RecA_F1 と RecA_R1 を用い PCR を行い、*recA* 遺伝子を含む DNA 断片を増幅した。得られた PCR 産物を *NdeI*、*BamHI* で処理し、同じく *NdeI*、*BamHI* で処理した pT7-7 ベクターに挿入した。

2-8-⑥ pRecA-mCherry プラスミドの作製

MECS123 株のゲノム DNA を鋳型とし、mCherry_F3 と mCherry_R2 を用い PCR を行うことで、G-S-T のリンカー配列と mCherry 遺伝子 (開始コドンと終止コド

ンを除く)を含む DNA 断片を増幅した。これと並行して pRecA プラスミドを鋳型とし、pT7-7_F1 と pT7-7_R1 をプライマーとして用いて PCR を行うことで pRecA ベクター断片を作製した。このベクターは 5'末端側に RecA の終止コドンを、3'末端側に終止コドンから一つ手前のコドンを有している。このベクターに、PCR で作製した mCherry 断片を In fusion kit (Takara Bio) を用いて挿入し、pRecA-mCherry とした。

2-9 大腸菌の形質転換

大腸菌細胞を LB 液体培地で対数増殖期になるまで培養し、細胞を回収した後、3 ml の氷冷 0.1M CaCl₂ で懸濁して 1 時間氷上に置いた。その後、遠心して細胞を回収し、300μl の 0.1M CaCl₂ で懸濁した後、懸濁液を 50μl ずつ分注した。さらに、プラスミド DNA を 1μl 加えて 30 分間氷上に置いた。その後、懸濁液を 42°C で 45 秒インキュベートし、氷上に 2 分間置き、450μl の LB 液体培地を加えて 37°C で 30 分間インキュベートした後、菌液 100μl を LB_Cm または LB_Amp 培地に塗布して 37°C で一晩培養した。これらの操作により得られた形質転換体のコロニーをその後の実験に使用した。

2-10 細胞生存率測定

RecN 発現プラスミドで BW25113 $\Delta recN$ 株を形質転換し、LB_Cm プレート上で一晩培養した。その後、LB_Cm プレート上のコロニーを LB_Cm 液体培地に接種して一晩培養した。この培養液を 1/500 に希釈し、対数増殖期（OD600 = 0.25-0.35）になるまで 37°C で培養した後、MMC（Wako）を終濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう加えた。その後 90 分培養した後、アラビノース（Wako）を終濃度 0.05% になるよう加えてさらに 60 分間培養した。MMC を加えた時間を 0 分とし、30 分ごとに菌液を回収して M9 buffer（48 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22 mM KH_2PO_4 , 19 mM NH_4Cl , 8.6 mM NaCl ）で段階希釈した後、LB_Cm プレート上に塗布した。このプレートを 37°C で 20 時間培養した後、プレート上のコロニー数を計測した。コロニー数と希釈率から各時間における生菌数を計算し、これを 0 分の時の生菌数で除することで細胞生存率を算出した。

2-11 ウェスタンブロット

RecN 発現プラスミドで BW25113 $\Delta recN$ 株を形質転換し、LB_Cm プレート上で一晩培養した。その後、LB_Cm プレート上のコロニーを LB_Cm 液体培地に接種して一晩培養した。この培養液を 1/500 に希釈し、対数増殖期（OD600 = 0.25-0.35）になるまで 37 °C で培養した後、MMC（Wako, 終濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）ま

たはアラビノース（Wako, 終濃度 0.05 %）になるよう加え、さらに 30 分培養した。MMC またはアラビノースを加えた時間を 0 分とし、10 分ごとに菌液を回収して SDS denaturation buffer（40 mM Tris-HCl/pH 6.8, 7 M Urea, 2 M thio-urea, 0.3 M NaCl, 2 % SDS, 0.1 % bromophenol blue, 10 % glycerol, and 2 % 2-mercaptoethanol）で懸濁し、100°Cでボイルすることで SDS-PAGE 用の細胞溶解液を得た。この細胞溶解液を用いて SDS-PAGE（分離ゲルアクリルアミド濃度：10 %または 12 %）を行った後、泳動後のゲルを PVDF メンブレン（Immobilon P; Merck）へと転写し、メンブレンを 2.5 %のブロッキングパウダーを含む T-TBS 溶液（20 mM Tris-HCl/pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween20）に浸し、1 時間で振とうした。T-TBS で洗浄後、1/2500 に希釈した一次抗体（Anti-His RecN または Anti-RecA）と 4°Cで一晩培養した。その後 T-TBS で 15 分ごとに 2 回洗浄し、1/100000 に希釈した二次抗体（Anti-rabbit Ig, Amersham Bioscience）と常温で 1 時間反応させた。反応後 T-TBS で 10 分ごとに 3 回洗浄した。Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate : TAKARA を用いて反応させ、検出はルミノ・イメージアナライザー（LAS-4000 mini : GE Healthcare）を用いて行った。

2-12 蛍光顕微鏡観察

RecN 発現プラスミドで BW25113 $\Delta recN$ 株を形質転換し、LB_Cm プレート上

で一晩培養した。その後、LB_Cm プレート上のコロニーを LB_Cm 液体培地に接種して一晩培養した。この培養液を 1/500 に希釈し、対数増殖期 (OD₆₀₀ = 0.25-0.35) になるまで 37°C で培養した後、MMC (Wako, 終濃度 1.0 µg/mL) で 90 分処理した。その後 M9 buffer で細胞を洗浄した後、アラビノース (Wako, 終濃度 0.05%) を含む LB_Cm 液体培地でさらに 60 分間培養した。菌液は指定された時間で回収した後、M9 buffer で洗浄し、1/1000 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, Wako) を含む 70% EtOH で固定した。蛍光顕微鏡で観察する際は M9 buffer で再び洗浄してから観察に用いた。蛍光顕微鏡は Axioplan2 (Zweiss) または BZ-X710 (Keyence) を、画像の編集には Lumina Vision (Mitani) または BZ-X analyzer (Keyence) を用いた。細胞あたりの核様体数や RecN, RecA の細胞内局在の分類は 100 個以上の細胞を観察して決定し、これをもとに各分類の割合を算出した。

2-13 タイムラプス撮影

RecN 発現プラスミドで MECS123 $\Delta recN$ 株を形質転換し、LB_Cm プレート上で一晩培養した。その後、LB_Cm プレート上のコロニーを LB_Cm 液体培地に接種して一晩培養した。この培養液を 1/500 に希釈し、対数増殖期 (OD₆₀₀ = 0.25-0.35) になるまで 37°C で培養した後、MMC (Wako, 終濃度 1.0 µg/mL) で

90 分処理した。その後 M9 buffer で細胞を洗浄した後、アラビノース (Wako, 終濃度 0.05%) を含む LB_ Cm 液体培地でさらに 30 分間培養した。その後菌液を OD600=0.1 程度になるよう希釈した後、1% アラビノース (Wako) と M9 buffer を含むアガロースパッドに 1 μ l 滴下した後、BZ-X710 蛍光顕微鏡 (Keyence) で観察した。撮影時のカメラ設定はゲイン :x16 (24dB)、ビニング :2x2 で行い、各種蛍光を観察する際の露光時間は明視野 :1/4000s、mCherry :1/10s、GFP :1/5s とした。タイムラプス画像は 1 分ごとに撮影した。

第3章 結果

3-1 アラビノース依存的に RecN を発現誘導する大腸菌株の構築

大腸菌 *recN* は DNA 損傷依存的に発現が誘導される SOS 遺伝子群の一つであり、DNA 損傷と同時に発現誘導される。本実験では RecN の発現誘導のタイミングの変化を変化させたとき、細胞にどのような影響を与えるのかを検証するために、*recN* 遺伝子の発現を単糖の一種であるアラビノースによって誘導できる P_{BAD} プロモーターの制御下に置いたプラスミド (pBAD-RecN) を構築した (図 6A)。また、通常の野生型細胞で見られる DNA 損傷に依存した RecN の発現に関しては、大腸菌ゲノムに存在する SOS プロモーター制御下の *recN* 遺伝子を持つプラスミド (pSOS-RecN) を使用した (図 6B)。さらに、野生型の *recN* に加えて、ATPase ドメイン内に存在する Walker A モチーフのリシンをアラニンに置換した変異体 (*recN*^{K35A}) を pSOS、pBAD プラスミドのプロモーターの下流にクローニングしたものも作製した。

次に、これらのプラスミドを大腸菌 $\Delta recN$ 株に導入し、各細胞株における RecN の発現量を抗 RecN 抗体を用いたウエスタンブロットで調べた。対数増殖期の各大腸菌培養液培地に MMC またはアラビノースを加え、10 分ごとに細胞を回収して細胞溶解液を得た後、これを用いてウエスタンブロットを行った。その結果、 $\Delta recN$ /pBAD-RecN および $\Delta recN$ /pBAD-RecN^{K35A} 細胞において、RecN タンパク

質はアラビノースの添加後に発現量が増加していた (図 6C)。また、 $\Delta recN/pSOS-$ RecN および $\Delta recN/pSOS-RecN^{K35A}$ 細胞においても、RecN タンパク質は MMC 添加後に発現量が増加していた。さらに、 P_{BAD} プロモーター由来の RecN と、SOS プロモーターから発現されている RecN の発現量は同程度であることが分かった (図 6C)。これらのことから、構築した $\Delta recN/pBAD-RecN$ 、 $\Delta recN/pSOS-RecN$ 株はそれぞれ DNA 損傷、アラビノース添加に応答して RecN を同程度の量で発現しており、目的の大腸菌株が構築できていることが分かった。

次に、今回構築した $\Delta recN/pBAD-RecN$ 、 $\Delta recN/pSOS-RecN$ 株の MMC に対する感受性をスポットテストにより調べた。これらの形質転換体を液体培地で一晩培養後、段階希釈したものを MMC 及びアラビノースを含む LB_Cm 培地にスポットし、37°Cで一晩培養した。その結果、アラビノース非存在下において $\Delta recN/pBAD-RecN$ は MMC に対して高感受性を示していた一方で、アラビノース存在下では $\Delta recN/pSOS-RecN$ と同程度まで MMC に対する耐性を獲得していた (図 6D)。さらに、 $\Delta recN/pBAD-RecN^{K35A}$ と $\Delta recN/pSOS-RecN^{K35A}$ 株は、アラビノースの存在/非存在に関わらず高感受性を示した (図 6D)。このことから、RecN の発現誘導を P_{BAD} プロモーターの制御下に置いた場合でも、SOS プロモーターから発現誘導された場合と同様に細胞内で機能していることが分かった。

3-2 RecN 発現誘導時期を変化させたときの細胞生存率への影響

次に、 P_{BAD} プロモーター制御下の *recN* 発現系を用いて、RecN 発現誘導のタイミングの変化が細胞生存率に及ぼす影響を調べた。それぞれの大腸菌細胞を 90 分間 MMC の存在下で培養後、アラビノースを添加してさらに 60 分間培養した。MMC を培地に加えた時間を 0 分として、30 分ごとに細胞を回収し、LB 寒天培地に塗布した後に 37°C で 20 時間培養した。そして、各時間ごとのサンプルが寒天培地上に形成した大腸菌コロニー数をもとに、0 分の生菌数を 100% とした細胞生存率を算出した (図 7)。その結果、空ベクターを導入した *recN* 欠損細胞 ($\Delta recN$ /vector) の細胞生存率は、MMC の長時間処理によって 150 分時点で 0.1 % 以下になるまで低下した。 $\Delta recN$ /pSOS-RecN の生存率はアラビノース添加の有無に関わらず、 $\Delta recN$ /vector より高い細胞生存率を示した。興味深いことに、 $\Delta recN$ /pBAD-RecN の生存率は、MMC 処理開始後 90 分の段階では $\Delta recN$ /vector と同程度であったが、アラビノースを添加後に生存率が有意に上昇し、アラビノース添加後 30 分と 60 分 (MMC 添加後 120 分と 150 分) の段階では、 $\Delta recN$ /pSOS-RecN と同程度になるまで回復した (図 7)。一方で、 $\Delta recN$ /pBAD-RecN^{K35A} はアラビノースを添加した場合でも、生存率の回復が見られず、 $\Delta recN$ /vector と同程度の生存率を示した。これらのことから、*recN* 欠損細胞の生存率は、長時間の MMC 処理によって大きく低下した後でも、RecN の発現誘導によって回復でき

ることが分かった。

3-3 DSB によって断片化した核様体は、RecN 発現誘導によって再構築される

大腸菌の核様体は DAPI で染色を行うことで、蛍光顕微鏡を用いて観察することができる。対数増殖期にある野生型大腸菌細胞の核様体を DAPI で染色すると、1 細胞あたり 1-2 個の核様体が観察される。MMC やブレオマイシン処理を受けた野生型細胞は、SOS 応答による細胞の伸長を示すが、1 細胞あたりの核様体の数は 1~2 個で維持されている様子が観察される (図 8)。先行研究より、MMC で処理した *recN* 欠損細胞は細胞が伸長することに加えて、3 個以上の拡散した短い核様体断片が観察されるようになる (核様体の断片化)。このような核様体の断片化は、ブレオマイシンで $\Delta recN$ 細胞を処理した場合でも観察された (図 8)。このことから、SOS プロモーター制御下の RecN は、DSB が生じた際に迅速に発現誘導されることで、核様体の断片化を防いでいると考えられている。そこで、RecN の発現誘導タイミングを変化させた時の核様体構造を観察した。pSOS-RecN または pBAD-RecN プラスミドで形質転換した大腸菌細胞を 90 分間 MMC の存在下で培養後、アラビノースを添加してさらに 60 分間培養した。MMC を培地に加えた時間を 0 分として、30 分ごとに細胞を回収した後に核様体を DAPI で染色した後、蛍光顕微鏡で核様体構造を観察した。MMC 未処

理時においては、 $\Delta recN/pBAD-RecN$ 細胞と $\Delta recN/pSOS-RecN$ 細胞は一つの細胞あたり 1~2 個の核様体を持ち、細胞長軸の 1/4 と 3/4 に位置していた(図 9A)。

MMC を加えてから 90 分培養を行った段階では、 $\Delta recN/pSOS-RecN$ は伸長した細胞になっているものの、1~2 個の核様体を有する細胞が多く観察された(図 9A)。このような細胞の割合は MMC 添加後 120 分や 150 分の段階でも大きく変化せず、1~2 個の核様体を有する細胞の割合は WT/vector では 70%以上、 $\Delta recN/pSOS-RecN$ では 80 %以上の細胞で観察された(図 9B)。一方で、 $\Delta recN/vector$ や $\Delta recN/pBAD-RecN$ は、MMC を加えてから 90 分培養を行った段階で 80 %以上が核様体の断片化を示していた(図 9A, B)。しかし、この後にアラビノース添加後 30 分と 60 分後(MMC 添加後 120 分と 150 分)の段階では、 $\Delta recN/vector$ は大部分の細胞の核様体が断片化していたままであったのに対し、 $\Delta recN/pBAD-RecN$ では核様体が断片化している細胞の割合が減少し、1~2 個の核様体を有する細胞の割合が WT/vector や $\Delta recN/pSOS-RecN$ と同程度になるまで増加していた(図 9A, B)。一方で、 $\Delta recN/pBAD-RecN^{K35A}$ 細胞では、アラビノースを添加した後も核様体が断片化している細胞の割合は減少しなかった。これらの結果は、核様体の断片化は不可逆的な現象ではなく、RecN の発現誘導によって断片化している核様体は再構築できる事を示している。また、RecN の発現誘導によって核様体の再構築が起きるタイミングと、MMC 処理によって低下

した細胞生存率が回復するタイミングも一致している。

3-4 RecN は組換え過程の中期から後期への移行を促進している

3-2、3-3 の結果より、断片化した核様体は RecN の発現誘導によって再構築され、それに伴い細胞生存率も回復することが分かった。RecN が相同組換え修復に関与していることを踏まえると、*recN* 欠損細胞で観察される核様体の断片化は相同組換え修復が中断された状態を反映しており、RecN 発現誘導に依存した核様体の再構築は、相同組換え修復の再活性化によって起きたという可能性が考えられた。

RecN は RecA と相互作用することが示されていることから、RecN の発現によって組換え中期以降が再活性化されていることが考えられる。RuvC タンパク質は RuvABC 複合体のヌクレアーゼサブユニットであり、相同組換え経路後期の組換え中間体解消の過程に関わっている [Shinagawa and Iwasaki, 1996; West 1997; Ishioka et al., 1998; Otsuji et al., 1974] (図 2C)。DAPI で核様体構造を染色して観察した先行研究より、*ruvC* 欠損細胞を MMC で処理すると細胞内に組換え中間体が蓄積し、細胞内部の中央に凝集した核様体を持つ細胞や、無核細胞が観察されることが知られている [Ishioka et al., 1998]。*ruvC* 欠損株に対して *recN* 欠損変異を加えたときに、MMC 処理時の核様体構造に与える影響を調べるために、

recN ruvC 二重欠損株を構築した。*recN* 欠損株、*ruvC* 欠損株、*recN ruvC* 二重欠損株の MMC に対する感受性をスポットテストで調べたところ、これらの欠損株はいずれも MMC に対して高い感受性を示しており、*recN* 欠損株、*ruvC* 欠損株と *recN ruvC* 二重欠損株の感受性は同程度であった (図 10A)。次に、*recN* 欠損細胞、*ruvC* 欠損細胞、*recN ruvC* 二重欠損細胞を MMC 処理した時の核様体構造を観察した。野生型細胞、*recN* 欠損細胞、*ruvC* 欠損細胞、*recN ruvC* 二重欠損細胞を MMC で 90 分間処理した後に細胞を回収して DAPI で核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果、先行研究の結果や 3-3 における観察結果と同様に、野生型細胞では核様体構造が維持されている様子が、*recN* 欠損細胞では核様体が断片化している様子が観察された (図 10B)。また、*ruvC* 欠損細胞を MMC で処理すると、核様体が細胞中央に凝集している細胞や、無核細胞が観察された。一方で、 $\Delta recN \Delta ruvC$ 二重欠損細胞を MMC で処理すると、 $\Delta ruvC$ で見られる核様体の凝集ではなく、 $\Delta recN$ で見られるような核様体の断片化が観察された (図 10B)。これらことから、RecN は相同組換えにおける組換え中間体解消の過程よりもより早期の段階に関与していることが示唆された。

RecN は RecA が DSB の削り込み部位でフィラメント構造を形成した後に発現誘導が起こるため (図 2)、相同組換え修復において RecN が関与する過程は前期よりも後の過程であると考えられている。さらに、RecN は RecA 依存的な

鎖交換反応の促進に関わっていることも踏まえると、RecN は組換え過程が中期から後期に移行するために必要であると考えられる [Keyamura et al., 2013; Uranga et al., 2017; Keyamura and Hishida, 2019]。もし 3-3 で観察されたような核様体の再構築が、RecN 発現誘導によって相同組換え修復が再び進行したことを反映しているのであれば、長時間の MMC 処理によって核様体が断片化した $\Delta recN \Delta ruvC$ 細胞で RecN を発現誘導すると、MMC 処理した $\Delta ruvC$ 細胞で見られるような核様体の凝集をもたらすはずである。これを検証するために、 $\Delta recN \Delta ruvC/pBAD-RecN$ 細胞の核様体を MMC 処理によって断片化させた後に RecN を発現誘導した時の核様体構造を観察した。 $\Delta recN \Delta ruvC/pBAD-RecN$ 細胞を MMC で 90 分間処理した後に M9 buffer で細胞を洗浄した後、アラビノースを含む培地で 60 分間培養した。その後細胞を回収し、核様体を DAPI で染色した。その結果、MMC 処理を 90 分行った段階では伸長した細胞と断片化した核様体が観察された (図 10C)。しかし、アラビノースを含む培地に移してから 30 分及び 60 分後の段階では、断片化した核様体を持つ細胞の数は減少し、 $\Delta ruvC$ で見られるような凝集した核様体を持つ細胞や無核細胞の数が増加した (図 10C, D)。これらの事から、RecN は組換え過程の中期から後期へ進行を促進する役割を担っており、図 9 で見られたような断片化した核様体が元の状態へ再構築される過程は、一度停滞した相同組換え修復の過程が RecN の発現誘導によって再

び進行したことが示唆された。

3-5 核様体の再構築過程において、RecN は核様体断片の間に局在する

DSB が生じた時、SOS 応答由来で発現された GFP-RecN は核様体上に局在することが知られている [Nagashima et al., 2006; Keyamura et al., 2013]。これは、核様体上に生じた DSB にリクルートされた RecN を反映していると考えられている。また、この核様体上への局在は RecA に依存していることが分かっている [Keyamura et al., 2013]。そこで、核様体が断片化した後に RecN を発現誘導した時、RecN がどのような細胞内局在を示すのかを調べるために、pBAD-RecN にある *recN* 遺伝子の N 末端側に GFP を付加したプラスミド (pBAD-GFP-RecN) を作製した。さらに、コントロール用として、pSOS-RecN にある *recN* 遺伝子の N 末端側に GFP を付加し、DNA 損傷依存的に GFP-RecN を発現誘導するプラスミドを作製した。まず、これらのプラスミドを *recN* 欠損株に導入し、スポットテストで MMC 感受性を調べたところ、 $\Delta recN$ /pBAD-GFP-RecN は、アラビノース非存在下では MMC に対して高感受性を示した一方で、アラビノース存在下では $\Delta recN$ /pSOS-RecN と同程度の MMC 耐性を獲得していた (図 11A)。一方で、 $\Delta recN$ /pBAD-GFP-RecN^{K35A} と $\Delta recN$ /pSOS-GFP-RecN^{K35A} 株は、アラビノースの存在/非存在に関わらず、高感受性を示した (図 11A)。これらのことから、GFP-

RecN は、その発現制御が P_{BAD} プロモーターと SOS プロモーターのいずれの制御下に置かれた場合でも、タグなしの RecN と同様に細胞内で機能していることが分かった。この結果は先行研究とも一致している。 [Nagashima et al., 2006; Keyamura et al., 2013]。

次に、RecN の発現誘導を MMC 処理と同時にを行ったときと、MMC 処理によって核様体が断片化した後に行ったときの RecN の細胞内局在を調べた。まず、 $\Delta recN/pBAD\text{-}GFP\text{-}RecN$ 株において、MMC 処理と同時に GFP-RecN を発現誘導した場合、GFP-RecN は核様体上に局在するのかを調べた。 $\Delta recN/pBAD\text{-}GFP\text{-}RecN$ 細胞を MMC で 10 分間処理した後に M9 バッファーで洗浄し、アラビノースを含む培地で 30 分間培養した後に細胞を回収した後、核様体を DAPI で染色した。その結果、50%以上の細胞で核様体上にドット状の輝点を形成する GFP-RecN が観察された（図 11B, C）。 $\Delta recN/pSOS\text{-}GFP\text{-}RecN$ 細胞に対しても同様の処理を行ったところ、先行研究で報告されたように、70%以上の細胞で核様体上に GFP-RecN が局在している様子が観察された（図 11B, C） [Nagashima et al., 2006; Keyamura et al., 2013]。また、 $\Delta recN/pSOS\text{-}GFP\text{-}RecN^{K35A}$ 細胞に対しても同様の処理を行ったが、先行研究の報告通り、この場合でも RecN は核様体上に局在していた（図 11D） [Keyamura et al., 2013]。これらの事から、RecN は DNA 損傷と同時に発現誘導された場合は核様体上に局在することが分かった。

次に、MMC 処理によって核様体が断片化した後に GFP-RecN を発現誘導した時の細胞内局在を観察した。 $\Delta recN$ /pBAD-GFP-RecN 細胞を MMC で 90 分処理し、M9 buffer で洗浄した後にアラビノースを含む培地に移して 60 分間培養後、回収した細胞し、核様体を DAPI で染色した後に蛍光顕微鏡で観察した。MMC 未処理時および MMC 処理を 90 分行った段階では、GFP の蛍光は観察されなかった (図 12A 左)。一方、アラビノースを含む培地に移してから 30 分及び 60 分培養すると、核様体断片の間にドット様の輝点を形成する GFP-RecN や、細胞長軸に連なるように局在を形成している GFP-RecN が観察された (図 12A 左)。以降、核様体断片の端と、核様体断片の間にある DAPI の蛍光が検出されない部分を含む領域を核様体ギャップ領域と定義する。また、アラビノースを含む培地で 60 分培養した段階では、30 分培養した段階よりも核様体上に RecN が局在している細胞の割合が有意に増加していることが分かった (図 12B)。また、 $\Delta recN$ /pBAD-GFP-RecN^{K35A} 細胞も用いて同様の実験を行ったところ、 $\Delta recN$ /pBAD-GFP-RecN と同様に、アラビノースを含む培地に移してから 30 分及び 60 分培養した後に、核様体ギャップ領域の RecN 局在が観察された (図 12A 右)。しかし、 $\Delta recN$ /pBAD-GFP-RecN 細胞では 30 分から 60 分にかけて核様体上に RecN が局在している細胞の割合が増加したのに対し、 $\Delta recN$ /pBAD-GFP-RecN^{K35A} 細胞では核様体上に RecN が局在している細胞の割合が増加する傾向

は見られず、野生型 RecN を発現した場合よりも有意に低いことが分かった（図 12B 右）。これらのことから、核様体断片のギャップ領域に局在する RecN は DSB 上にリクルートされたものを反映しており、RecN^{K35A} 変異体は核様体のギャップ領域に存在する DSB 部位にリクルートはされるものの、その後の組換え過程を促進できないために、核様体の再構築が行えないことが示唆された。

3-6 核様体断片のギャップ領域に存在する RecN は核様体断片を再構築する

RecN の細胞内局在を観察した結果より、核様体断片のギャップ領域に RecN が局在していることから、この位置で相同組換え修復の促進や、核様体の再構築が起きている可能性が示唆された。この可能性を検証するために、核様体タンパク質である HU に mCherry タグを付加した大腸菌株を用いて、RecN 発現によって核様体が再構築される過程をリアルタイムで観察することを試みた。核様体タンパク質 HU は HupA、HupB から構成されるヘテロまたはホモ二量体であり、ゲノム DNA 上に均一に結合する [Fisher et al., 2013; Verma et al., 2019, Taniguchi et al., 2019]。先行研究よりゲノム DNA 上の *hupA* 遺伝子に mCherry タグを挿入した大腸菌株（MECS123）が構築されており、生細胞の核様体を可視化することができる [Fisher et al., 2013]。まず、この大腸菌株に *recN* 欠損変異を導入し、MECS123 $\Delta recN$ 株 (*hupA*-mCherry $\Delta recN$) を作製した。この株の MMC 感受性を

スポットテスト確認したところ、これまでの実験で使用してきた BW25113 *recN* 欠損株と同程度の MMC 感受性を示すことが確認できた(図 13A)。さらに、*hupA*-mCherry $\Delta recN$ 株に pSOS-GFP-RecN、pBAD-GFP-RecN 株に対してもスポットテストを行ったところ、アラビノース非存在下では *hupA*-mCherry $\Delta recN$ /pBAD-GFP-RecN 株は MMC に対して高感受性を示した一方で、アラビノース存在下では *hupA*-mCherry $\Delta recN$ /pSOS-GFP-RecN 株と同程度の MMC 耐性を獲得しており、BW25113 株と同様の結果が得られた。

次に、*hupA*-mCherry $\Delta recN$ 細胞の核様体構造を観察した。*hupA*-mCherry $\Delta recN$ 細胞に対して MMC 処理を 90 分間行った後に蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果、この大腸菌株でも MMC 処理によって断片化した核様体が mCherry の蛍光を介して観察された(図 14A)。また、断片化した核様体の間に HU-mCherry が低輝度で存在する領域が観察された(図 14A)。DAPI で核様体を染色して観察したところ、この領域は DAPI 蛍光を介した画像では確認できない領域であった(図 14A)。このことから、核様体ギャップ領域は DNA が存在しない領域ではなく、DNA が低い密度で存在している可能性が示唆された。

次に、*hupA*-mCherry $\Delta recN$ 株に pBAD-GFP-RecN を導入し、RecN を発現誘導したときの生細胞の核様体構造と、RecN の細胞内局在をリアルタイムで観察した。*hupA*-mCherry $\Delta recN$ /pBAD-GFP-RecN 細胞を MMC で 90 分間処理して M9

buffer で細胞を洗浄した後、アラビノースを含む培地で 30 分間培養した。その後、菌液を希釈し、M9 buffer とアラビノース (1 % w/v) を含むアガロースパッドに滴下した後、1 分間隔のタイムラプス撮影で GFP-RecN と HU-mCherry の細胞内局在を追跡した。その結果、アガロースパッドに滴下した直後の段階では、RecN は核様体のギャップ領域に局在していたが、時間が経過するにつれて核様体断片のギャップ領域が解消され、断片同士が結合する様子が観察された (図 14B)。同様の実験条件において核様体が断片化している細胞の割合を調べたところ、アガロースパッドに滴下してから 40 分後 (アラビノース添加後 70 分) には、核様体が断片化している細胞の割合が有意に低下している傾向が見られた (図 14C)。これらの結果から、RecN 局在が存在する位置で核様体の再構築が起きていることが示唆された。これに加えて、*hupA*-mCherry Δ *recN* に pBAD-GFP-RecN^{K35A} を導入した細胞に対しても同様の実験を行った。その結果、GFP-RecN^{K35A} は核様体断片のギャップ領域で局在が観察されたものの、核様体の再構築は起こらず、局在もギャップ領域に残ったままであった (図 14B)。同様の実験条件において核様体が断片化している細胞の割合を見ても、アガロースパッドに滴下してから 70 分経っても断片化した核様体の数は減少せず、むしろ増加した (図 14C)。これらの事から、RecN は核様体断片のギャップ領域に存在する DSB 部位にリクルートされることで組換え反応を再活性化し、断片化した核

様体を再構築していることが示唆された。

3-7 ギャップ領域にある DSB は相同組換え修復の基質として維持されている

RecN の DSB 部位へのリクルートは RecA に依存する [Keyamura et al., 2013]。また、RecA と RecN は物理的に相互作用することが知られているため、RecA もまた核様体のギャップ領域に局在する可能性が考えられた [Uranga et al., 2017; Keyamura and Hishida, 2019]。これを検証するために、RecA を恒常発現するプラスミド (pRecA) を用いた [Shibata T et al., 2005]。このプラスミドは T7 プロモーターの下流に RecA 遺伝子を持っており、非誘導条件でも RecA を一定量、恒常的に発現する。また、先行研究よりこの pRecA プラスミドを導入した $\Delta recA$ 株は UV や MMC に対して耐性を示すことが分かっている [Shibata et al., 2005, Keyamura et al., 2013]。このプラスミドから発現される RecA の発現量を評価するため、pRecA または空ベクターを導入した野生型株または $\Delta recA$ 株を MMC の存在下で 90 分培養後、各サンプルを抗 RecA 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。その結果、MMC 処理前の段階においては、WT/vector における RecA 発現量よりも、 $\Delta recA$ /pRecA における RecA の発現量の方がわずかに多かった (図 15A)。しかし、MMC 処理を行った場合では、 $\Delta recA$ /pRecA における RecA 発現量は WT/vector のものと同程度であった (図 15A)。このことから、

pRecA プラスミドから発現する発現量は内因性の RecA と同程度であることが分かった。次に、RecA の細胞内局在を観察するために、pRecA 上にある RecA 遺伝子の C 末端側に mCherry タグを挿入したプラスミド (pRecA-mCherry) を作製した。この pRecA-mCherry プラスミドを大腸菌株に導入してスポットテストを行うことで、このプラスミドが $\Delta recA$ 株の MMC 高感受性を相補できるか調べた。その結果、RecA-mCherry は野生型株や pRecA を導入した株よりも MMC に対する感受性がやや高いものの、*recA* 欠損を部分的に相補できることが分かった (図 15B)。一方で、UV に対する感受性は野生型株や $\Delta recA$ /pRecA と同程度であった (図 15C)。得られた結果は先行研究と一致している [Amarh et al., 2018]。これらのことから、mCherry を付加した RecA は、SOS 応答については mCherry を付加していない RecA と同等の活性を保持しており、組換え活性についても mCherry を付加していない RecA よりは活性が低下しているものの、細胞内で機能できていることが分かった。

次に、MMC 処理時における RecA-mCherry の細胞内局在を観察した。MMC 濃度はスポットテストの結果を考慮し (図 15B)、pRecA-mCherry が $\Delta recA$ の MMC 高感受性を完全に相補できる濃度 (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で実験を行った。pRecA-mCherry プラスミドを導入した $\Delta recA$ 細胞に対して MMC で 90 分間処理した後、細胞を回収して核様体で DAPI を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、MMC 処

理を行っていない $\Delta recA$ /pRecA-mCherry 細胞においては、RecA は主に細胞の極に局在していた (図 16A)。一方で、MMC 処理を行った場合では、RecA は核様体上に局在していることが分かった (図 16A)。核様体上の RecA 局在を持つ細胞の割合は、MMC 未処理時は 15%以下であったのに対し、MMC 処理時は約 60%であった (図 16B)。このことから、核様体上に局在している RecA は DSB 部位に局在しているものを反映していることが示唆された。次に、 $\Delta recA \Delta recN$ 細胞にも pRecA-mCherry プラスミドを導入し、同様の処理を行うことで MMC 存在下における RecA-mCherry の細胞内局在を観察した。その結果、MMC 処理後の段階において、細胞の伸長と共に断片化した核様体がされた (図 16C)。また、RecA-mCherry は核様体上に加えて、核様体断片のギャップ領域にも局在していた (図 16C)。核様体断片のギャップ領域に RecA が局在している細胞の割合は、MMC 未処理時は 20 %以下であったのに対し、MMC 処理時は 60 %以上であった (図 16D)。これらの事から、核様体のギャップ領域には DSB が存在しており、この領域に存在する DSB は RecA による相同組換え修復の標的であることが示唆された。

3-8 RecN は RecA と共にギャップ領域に局在し、協調して核様体を再構築する
RecA と RecN が核様体のギャップ領域で共局在するかどうかを検証するために、

pRecA-mCherry と pBAD-GFP-RecN プラスミドを $\Delta recA \Delta recN$ 細胞に導入し、RecA と RecN の細胞内局在を観察した。pRecA-mCherry と pBAD-GFP-RecN プラスミドを導入した $\Delta recA \Delta recN$ 細胞を MMC で 90 分間処理し、M9 buffer で洗浄した後、アラビノースを含む培地に移して 60 分間培養して細胞を回収し、核様体を DAPI で染色した後に蛍光顕微鏡で観察した。その結果、MMC 未処理時または MMC で 90 分間処理をした段階では、GFP-RecN の局在は観察されず、RecA-mCherry は核様体上と核様体断片のギャップ領域に観察された (図 17)。アラビノースを含む培地に移してから 30 分及び 60 分の段階になると、GFP-RecN の局在が観察され、RecA と共にギャップ領域に共局在していることが分かった (図 17)。これらの結果から、核様体のギャップ領域に存在する DSB 部位に結合している RecA が RecN を DSB 部位にリクルートしていることが示唆された。しかし、この実験において RecA と RecN が共局在した後に、核様体構造が回復する様子までは観察できなかった。また、RecA-mCherry と GFP-RecN を共発現させた場合、 $\Delta recA \Delta recN$ の DSB 修復欠損を相補することができず、MMC に対して高感受性を示す (図 18A)。しかし、GFP-RecN または RecA-mCherry のどちらか単体を発現させた場合は DSB 修復が機能しており、どちらも *recN* 欠損のバックグラウンドにおいて核様体のギャップ領域に局在することが示されている (図 12、図 14、図 16)。また、pRecA-mCherry と pSOS-GFP-RecN を導入

した $\Delta recA \Delta recN$ 細胞を MMC で処理した場合は核様体上で共局在する (図 18B)。

これらのことから、MMC で処理した $\Delta recN$ 細胞で観察されるような核様体ギャップ領域には DSB が存在しており、この DSB は相同組換えによって修復されることが示唆された。また、RecA は RecN を核様体のギャップ領域に存在する DSB にリクルートし、協調して相同組換え修復を促進することで、断片化した核様体構造を回復させていることが示唆された。

第4章 考察

RecN は相同組換えを介した DSB 修復において必須の役割を持っており、SMC ファミリータンパク質であるコヒーシンやコンデンシンと類似した構造を持つタンパク質であることから、染色体の高次構造制御を介して DSB 修復に関与すると考えられてきた。実際に DSB を誘導する MMC やブレオマイシンで処理した野生型細胞は、フィラメント状に伸長した細胞内において核様体構造が維持された状態で存在する一方で、*recN* 欠損細胞では、核様体が断片化した様子が観察される。野生型細胞では、RecN は DNA 損傷依存的に活性化される SOS プロモーターの制御下に置かれているため、DSB に応答して発現が誘導され、核様体上に局在することが示されている（図 11） [Keyamura et al., 2013]。さらに、MMC で処理した大腸菌細胞において、RecN は姉妹染色体間の接着を行っていることが先行研究から報告されている[Vickridge et al., 2017]。以上の結果より、RecN は DSB によって生じる核様体の断片化を防ぐ上で重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、 $\Delta recN$ 細胞において核様体の断片化が引き起こされる原因や、断片化した核様体が細胞死を伴った不可逆的な構造体を反映したものであるかは不明であった。

4-1 DSB 修復における核様体構造の動態と RecN の役割

本研究では「DNA 損傷時の核様体構造維持に関与する RecN の役割」に焦点を当て、RecN を時期特異的に発現誘導できる大腸菌株を構築し、RecN の発現誘導時期を変化させた際の RecN の細胞内局在と核様体構造の動態について詳細に解析を行った。これまでの研究から、MMC で処理した $\Delta recN$ 細胞では、核様体の断片化と細胞生存率の低下が顕著に観察されており、このことから、核様体の断片化は細胞死を伴う核様体構造の崩壊を反映したものと考えられてきた。

しかしながら、核様体の断片化が生じている $\Delta recN$ 細胞において RecN をアラビノース添加によって人為的に発現させた場合、驚くべきことに断片化した核様体は元の状態へと再構築され、生存率も野生型細胞レベルにまで回復することが分かった。さらに、組換え後期に関与する RuvC を欠損した $\Delta recN \Delta ruvC$ 二重欠損株において同様の実験を行ったところ、RecN の発現誘導により断片化した核様体を持つ細胞から *ruvC* 欠損株で見られるような凝集した核様体を持つ細胞や、無核細胞に変化した。さらに、RecN 発現誘導によって断片化した核様体が再構築される過程において、RecN は RecA と共に断片化した核様体のギャップ領域に局在していた。よって、MMC 処理した $\Delta recN$ 細胞で見られた核様体の断片化は、核様体が不可逆的に崩壊した状態ではなく、RecA 依存的な相同組換えが一時的に中断されている状態を反映していると考えられる。したがって、相同

組換えにおいて、RecA フィラメントが持つ相同鎖探索と鎖交換反応という 2 つの機能が時間的・空間的に分離可能であり、SMC 様タンパク質の RecN が RecA フィラメントと核様体の両者の動態を制御することで、一連の反応を促進していることが示唆された (図 20)。

4-2 なぜ核様体ギャップ領域が形成されたのか？

MMC で *recN* 欠損細胞を処理すると、核様体に DAPI で染色されないギャップ領域が出現し、結果として核様体が断片化したような状態が観察された。MMC は複製フォークの進行を阻害する複製阻害剤であるが、DSB のほかに一本鎖 DNA ギャップなどの損傷も引き起こす。しかし、ラジカル形成を介して DSB を引き起こすブレオマイシンで *recN* 欠損細胞を処理した場合でも、核様体の断片化が観察された。また、DSB を引き起こさない紫外線を *recN* 欠損細胞に照射しても核様体の断片化は起こらない。これらのことから、核様体の断片化は DSB によって引き起こされる現象であると考えられる。

DAPI 染色で観察された核様体の断片化に関して、核様体に結合するヒストン様タンパク質である HU-mCherry を用いて核様体を観察したところ、核様体のギャップ領域に低輝度ながらも HU-mCherry の蛍光が観察された。大腸菌の核様体は、HU などの核様体タンパク質による DNA の折りたたみや、トポイソメラー

ぜなどによる DNA 超らせん構造の形成によってゲノム DNA が折りたたまれた結果形成される構造であり、蛍光顕微鏡で観察される HU-mCherry の輝度の違いは DNA 密度を反映している[Dillon and Dorman, 2010, Fisher et al, 2013]。このように、HU-mCherry が低輝度で存在する一方で、DAPI で染色できない核様体ギャップ領域は、DNA が存在しないのではなく、低密度で DNA が存在していると考えられる。したがって、核様体のギャップ領域は、DSB が生じたことで、その周辺領域の DNA の折りたたみや高次構造、DNA の超らせん構造が崩壊し、DNA の密度が低下したことにより形成されたと考えられる。さらに、もう一つの可能性として、DSB 周辺の超らせん構造を解消したり、核様体タンパク質を DSB 周辺の領域から解離させるなど、相同組換え修復タンパク質の DSB へのリクルートやはたらきを促進するために、より積極的なメカニズムが存在する可能性も考えられる。特に、後者の DNA に結合するタンパク質を解離させる機構は真核生物で報告されており、DNA 損傷修復の際はクロマチンリモデラーと呼ばれるタンパク質群がヒストンを DNA から解離させていることが分かっている [Sinha et al.,2009; Hayashi et al., 2021]。

4-3 RecN の発現誘導によってなぜ核様体は再構築されたのか？

本研究の結果より、核様体が断片化した後であったとしても、RecN 発現誘導に

よって核様体が元の状態に再構築されることが示された。この時、核様体の再構築における RecN の役割については、以下の 2 つのメカニズムが考えられる。1 つは、RecN の発現誘導によって再び相同組換え修復が進行して DSB が修復され、周辺の染色体高次構造が回復した結果、核様体構造が回復したというメカニズムである。本研究の結果で示した通り、核様体の再構築過程において RecN は RecA と共に核様体ギャップ領域に共局在していた。また、RecN を発現誘導する前の段階から RecA は核様体のギャップ領域に局在していたことも踏まえると、この核様体ギャップ領域には相同組換え修復の標的となる DSB 部位が存在しており、この位置に共局在する RecA と RecN が協調して働くことで相同組換え修復を行い、DSB を修復していると考えられる。そして、DSB が修復されると、DNA 超らせん構造や核様体タンパク質によるゲノム DNA の折りたたみが再び可能となり、DNA の折りたたみや高次構造、および DNA の密度が元の状態へ回復されるという可能性が考えられる。実際に、本研究におけるタイムラプス撮影の結果から、RecN はギャップ領域に局在を形成しており、局在があった位置で核様体断片が結合する様子が観察された。これらのことから、断片化した核様体の再構築には DSB の修復が必須であり、RecN は DSB にリクルートされた後、中断された相同組換え修復の再活性化を引き起こす重要な役割を担っていると考えられる。2 つ目のメカニズムとして、RecN が DSB 周辺の DNA 鎖を

束ねたり、折りたたむことで核様体の再構築に直接関与している可能性が考えられる。実際に、RecN タンパク質と DNA の複合体をゲルシフトアッセイで検出した実験結果より、RecN-DNA 複合体のバンドは電気泳動を行ってもほとんど移動せず、ウェルに蓄積した様子が観察される [Keyamura and Hishida, 2019]。おそらく、この RecN-DNA 複合体は複数の DNA 分子が束ねられた状態にあるか、高次構造を形成していると考えられる。したがって、RecN は DNA の高次構造形成や、複数の DNA 分子を束ねる活性を介して DSB 部位周辺の DNA 密度を回復させている可能性も考えられた。

4-4 RecN の ATPase 活性が持つ役割について

本研究では Walker A 変異体である RecN^{K35A} 変異体の細胞内局在も観察した。MMC 処理で核様体を断片化した後に RecN^{K35A} 変異体を発現誘導したところ、RecN^{K35A} 変異体は核様体のギャップ領域に局在するものの、その後の核様体を再構築する過程は促進できなかった。このことは、RecN の ATP への結合もしくは ATP 加水分解活性は DSB 部位への結合には不要なものの、以降の組換え反応や核様体の再構築に必須であることを示唆している。この結果と一致して、以前の研究から、SOS 応答により発現した GFP-RecN^{K35A} は核様体上に局在はする一方で、核様体の断片化が生じることが示されている (図 12) [Keyamura et al.,

2013]。さらに、RecN の一本鎖 DNA に対する結合活性は ATP 非依存的であることが示されている [Keyamura and Hishida 2019]。以上の結果を踏まえると、RecN の ATP 結合／加水分解活性は、DSB 部位への結合には関与していないと考えられる。一方で、RecN が持つ一本鎖 DNA と二本鎖 DNA のテザリング活性は ATP 依存的であり、この活性は DSB 部位と鋳型となる相同鎖間の結合において重要であると考えられる。したがって、RecN の ATP 結合／加水分解活性は、DSB 部位への結合以降の RecA による相同組換え修復や核様体の構造維持・回復の過程において重要な役割を果たしていると考えられる。

4-4 核様体再構築過程における相同組換え修復

RecA は DSB 末端のプロセッシングによって生じた ssDNA 領域にフィラメント状に結合し、相同鋳型鎖の探索及び鎖交換反応という組換え修復において中心的な役割を果たしている。本研究で行った野生型細胞における RecA-mCherry の蛍光顕微鏡観察より、MMC に依存して核様体上にドット様の RecA 局在が観察された。一方、MMC 処理した $\Delta recN$ 細胞においては、核様体上に加えてギャップ領域にフィラメント状やドット様の RecA 局在が観察された。このようなフィラメント状の RecA 局在は先行研究でも報告されており、フィラメント状の RecA 局在は MMC で処理した $\Delta recN$ で観察されるが、野生型細胞では観察され

ないことが分かっている[Vickridge et al., 2017]。また近年の報告より、RecA-ssDNA はそのフィラメント状の構造を引き延ばして RecA バンドルと呼ばれる束構造を形成し、ダイナミックに動くことで離れた位置にある相同鋳型鎖との対合を促進していることが報告されている[Lesterlin et al., 2014; Wiktor et al., 2021]。RecN は MMC 存在下で姉妹染色体間に関与している過去の結果を踏まえると、[Vickridge et al., 2017]、野生型細胞で DSB が生じた場合でも核様体が断片化しないのは、RecN によって姉妹染色体が接着されていて、DSB 周辺の核様体構造が崩壊する前に相同組換え修復を促進しているためであると考えられる。一方、RecN 欠損細胞では DSB に依存した姉妹染色体 DNA 鎖の接着が行えず、DSB 周辺領域の高次構造が崩壊すると考えられる。このような状態では相同鋳型鎖を用いた組換え修復が行えないため、結果として一本鎖 DNA に結合した RecA フィラメントが核様体のギャップ領域に結合し、DNA を保護して分解を防ぐことで相同組換えの過程を損傷 DNA 鎖と姉妹染色体 DNA 鎖が対合する直前のステップに留めていると考えられる。そのため、RecN が RecA との相互作用によってギャップ領域にリクルートされると、RecN による DNA 鎖の接着や RecA フィラメントの動態制御が促進され、RecA 依存的な相同組換えの再活性化が引き起こされることが考えられる。実際に、RecN は RecA のフィラメント構造の動態制御を担っていることが近年の先行研究でも報告されており、このフィラメント

構造の制御が相同鎖の探索を可能にしていると考えられている。

[Chimthanawala et al., 2022]。さらに、*in vitro* の先行研究から RecN は RecA-ssDNA フィラメントに結合し、RecA が結合している一本鎖 DNA と二本鎖 DNA を ATP 依存的にテザリングすることで RecA 依存的な鎖交換反応を促進することが分かっている [Uranga et al., 2017; Keyamura and Hishida, 2019]。これらの結果から、RecN は自身が有する姉妹染色体の接着機能や RecA フィラメント構造制御の活性を介することで、相同組換え修復を促進していると考えられる。しかし、これらの詳細なメカニズムについては更なる解析と検証が必要である。

本研究では、RecN が核様体構造にもたらす影響と、相同組換え修復において担っている役割の関連を詳細に解析した。染色体構造が崩壊した後でも RecN は核様体ギャップ領域の DSB に局在し、RecA 依存的な組換えの過程を促進することで相同組換えを再活性化させることが明らかとなった。これらの事から相同組換えは損傷 DNA 鎖と鋳型 DNA の対合以前と以後の 2 つの過程で時空間的に分離することができ、RecN は自身の染色体構造や DSB 部位周辺の DNA 構造を制御する活性を介してこの 2 過程を接続していることが示唆された。しかし、本項目でも述べたが、*recN* 欠損細胞において、相同組換え修復の停滞によって DSB が修復されないまま残った結果、なぜそれが核様体のギャップ領域、しいては DNA の密度が低い領域が形成されたのか、それに至る過程などについては

仮説の域を出ず、さらなる解析が必要である。また、真核生物に存在する SMC タンパク質の中でも、コヒーシンやコンデンシン、SMC5/6 などは DSB 修復や 相同組換え修復に関与することが報告されているが、詳細なメカニズムについてはほとんど分かっていない。これらの複合体を形成するタンパク質は生存に 必須であるため、遺伝学的な解析が難しいという背景がある。RecN が相同組換え においてどのような貢献をしているのかについて更なる解析を行うことで、 これらの SMC タンパク質が DNA 修復においても普遍的な機構を明らかにす ることが期待できる。

参考文献

- Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., & Ishihama, A. (1999) . Growth phase-dependent variation in protein composition of the Escherichia coli nucleoid. *Journal of bacteriology*, **181** (20) , 6361–6370.
- Amarh, V., White, M. A., & Leach, D. R. F. (2018). Dynamics of RecA-mediated repair of replication-dependent DNA breaks. *The Journal of cell biology*, **217**(7), 2299–2307.
- Amundsen, SK., and Smith, GR (2003) Interchangeable parts of the Escherichia coli recombination machinery *Cell* **112**, 741-744
- Ayora, S., Carrasco, B., Cardenas, PP., Cesar, CE., Canas, C., Yadav, T., Marchisone, C., and Alonso, JC (2011) Double-strand break repair in bacteria: a view from Bacillus subtilis *FEMS Microbiol Rev* **35**, 1055-1081
- Badrinarayanan, A., Reyes-Lamothe, R., Uphoff, S., Leake, M. C., & Sherratt, D. J. (2012) . In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. *Science (New York, N.Y.)* , **338** (6106) , 528–531.
- Badrinarayanan, A., Reyes-Lamothe, R., Uphoff, S., Leake, MC., and Sherratt, DJ (2012) In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins *Science* **338**, 528-531
- Bell, J. C., & Kowalczykowski, S. C. (2016). RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine. *Trends in biochemical sciences*, **41**(6), 491–507.
- Bennett, R. J., Dunderdale, H. J., & West, S. C. (1993) . Resolution of Holliday junctions by RuvC resolvase: cleavage specificity and DNA distortion. *Cell*, **74** (6) , 1021–1031.

- Bessho T. (2003). Induction of DNA replication-mediated double strand breaks by psoralen DNA interstrand cross-links. *The Journal of biological chemistry*, **278**(7), 5250–5254.
- Chimthanawala, A., Parmar, J. J., Kumar, S., Iyer, K. S., Rao, M., & Badrinarayanan, A. (2022). SMC protein RecN drives RecA filament translocation for in vivo homology search. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**(46), e2209304119.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., & Nasmyth, K. (1998) . An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*, **93** (6) , 1067–1076.
- Connelly, J. C., & Leach, D. R. (1996). The sbcC and sbcD genes of Escherichia coli encode a nuclease involved in palindrome inviability and genetic recombination. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, **1**(3), 285–291.
- Connelly, J. C., Kirkham, L. A., & Leach, D. R. (1998) . The SbcCD nuclease of Escherichia coli is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95** (14) , 7969–7974.
- Cortez D. (2015). Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity. *DNA repair*, **32**, 149–157.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O., & Hanawalt, P. C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient Escherichia coli. *Genetics*, **158**(1), 41–64.

- Cox M. M. (2007). Regulation of bacterial RecA protein function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **42**(1), 41–63.
- Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J., & Mariani, K. J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*, **404**(6773), 37–41.
- Cromie, GA., Connelly, JC., and Leach, DR (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans *Mol Cell* **8**, 1163-1174
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(12), 6640–6645.
- Davidson, I. F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., & Peters, J. M. (2019). DNA loop extrusion by human cohesin. *Science (New York, N.Y.)*, **366**(6471), 1338–1345.
- Dillingham, M. S., & Kowalczykowski, S. C. (2008). RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **72**(4), 642–671.
- Dillon, S. C., & Dorman, C. J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature reviews. Microbiology*, **8**(3), 185–195.
- Donaldson, J. R., Courcelle, C. T., & Courcelle, J. (2006). RuvABC is required to resolve holliday junctions that accumulate following replication on damaged templates in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, **281**(39), 28811–28821.
- Dronkert, M. L., & Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation research*, **486**(4), 217–247.
- Finch, P. W., Chambers, P., & Emmerson, P. T. (1985). Identification of the *Escherichia*

- coli recN gene product as a major SOS protein. *Journal of bacteriology*, **164**(2), 653–658.
- Fisher, J. K., Bourniquel, A., Witz, G., Weiner, B., Prentiss, M., & Kleckner, N. (2013). Four-dimensional imaging of E. coli nucleoid organization and dynamics in living cells. *Cell*, **153**(4), 882–895.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Kuroiwa, T., & Hirano, T. (2013). Spatiotemporal dynamics of condensins I and II: evolutionary insights from the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Molecular biology of the cell*, **24**(16), 2515–2527.
- Graumann, P. L., & Knust, T. (2009). Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, **17**(2), 265–275.
- Grewal, S. I., & Elgin, S. C. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Current opinion in genetics & development*, **12**(2), 178–187.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology*, **177**(14), 4121–4130.
- Hammel, M., Amlanjyoti, D., Reyes, F. E., Chen, J. H., Parpana, R., Tang, H. Y., Larabell, C. A., Tainer, J. A., & Adhya, S. (2016). HU multimerization shift controls nucleoid compaction. *Science advances*, **2**(7), e1600650.
- Hayashi, M., Keyamura, K., Yoshida, A., Ariyoshi, M., Akanuma, G., & Hishida, T. (2021). A Conserved Histone H3-H4 Interface Regulates DNA Damage Tolerance and Homologous Recombination during the Recovery from Replication Stress. *Molecular and cellular biology*, **41**(4), e00044-20.

- Hirano T. (2016). Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. *Cell*, 164(5), 847–857.
- Hirano, M., & Hirano, T. (1998). ATP-dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer. *The EMBO journal*, 17(23), 7139–7148.
- Hirano, T (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 311-322
- Hishida, T., Han, Y. W., Fujimoto, S., Iwasaki, H., & Shinagawa, H. (2004) . Direct evidence that a conserved arginine in RuvB AAA+ ATPase acts as an allosteric effector for the ATPase activity of the adjacent subunit in a hexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101** (26) , 9573–9577.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0403584101>
- Hwang, D. S., & Kornberg, A. (1992). Opening of the replication origin of Escherichia coli by DnaA protein with protein HU or IHF. *The Journal of biological chemistry*, **267**(32), 23083–23086.
- Ishioka, K., Fukuoh, A., Iwasaki, H., Nakata, A., & Shinagawa, H. (1998). Abortive recombination in Escherichia coli ruv mutants blocks chromosome partitioning. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, **3**(4), 209–220.
- Iwasaki, H., Takahagi, M., Shiba, T., Nakata, A., & Shinagawa, H. (1991). Escherichia coli RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure. *The EMBO journal*, **10**(13), 4381–4389.
- Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S., Taatjes, D. J., Dekker, J., & Young, R. A. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin

- architecture. *Nature*, **467**(7314), 430–435.
- Kakui, Y., Barrington, C., Barry, D. J., Gerguri, T., Fu, X., Bates, P. A., Khatri, B. S., & Uhlmann, F. (2020). Fission yeast condensin contributes to interphase chromatin organization and prevents transcription-coupled DNA damage. *Genome biology*, **21**(1), 272.
- Keyamura, K., & Hishida, T. (2019). Topological DNA-binding of structural maintenance of chromosomes-like RecN promotes DNA double-strand break repair in *Escherichia coli*. *Communications biology*, **2**, 413.
- Keyamura, K., Sakaguchi, C., Kubota, Y., Niki, H., & Hishida, T. (2013). RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry*, **288**(41), 29229–29237.
- Kim, S. H., Ahn, T., Cui, T. J., Chauhan, S., Sung, J., Joo, C., & Kim, D. (2017). RecA filament maintains structural integrity using ATP-driven internal dynamics. *Science advances*, **3**(9), e1700676.
- Kimura, K., & Hirano, T. (1997). ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell*, **90**(4), 625–634.
- Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**(4), 693–705.
- Kuzminov A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **63**(4), 751–813.
- Lee, J. Y., Qi, Z., & Greene, E. C. (2016). ATP hydrolysis Promotes Duplex DNA Release by the RecA Presynaptic Complex. *The Journal of biological chemistry*, **291**(42), 22218–22230.

- Lehmann A. R. (2005). The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. *DNA repair*, **4**(3), 309–314.
- Lesterlin, C., Ball, G., Schermelleh, L., & Sherratt, D. J. (2014). RecA bundles mediate homology pairing between distant sisters during DNA break repair. *Nature*, **506**(7487), 249–253.
- Lim, H. S., Kim, J. S., Park, Y. B., Gwon, G. H., & Cho, Y. (2011). Crystal structure of the Mre11-Rad50-ATP γ S complex: understanding the interplay between Mre11 and Rad50. *Genes & development*, **25**(10), 1091–1104.
- Lyubchenko, Y. L., Shlyakhtenko, L. S., Aki, T., & Adhya, S. (1997). Atomic force microscopic demonstration of DNA looping by GalR and HU. *Nucleic acids research*, **25**(4), 873–876.
- Macvanin, M., Edgar, R., Cui, F., Trostel, A., Zhurkin, V., & Adhya, S. (2012). Noncoding RNAs binding to the nucleoid protein HU in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, **194**(22), 6046–6055. <https://doi.org/10.1128/JB.00961-12>
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **7**(18), 2902–2906.
- Maslowska, K. H., Makiela-Dzbenska, K., & Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and molecular mutagenesis*, **60**(4), 368–384.
- Mazin, A. V., & Kowalczykowski, S. C. (1998). The function of the secondary DNA-binding site of RecA protein during DNA strand exchange. *The EMBO journal*, **17**(4), 1161–1168.
- McLean, E. K., Lenhart, J. S., & Simmons, L. A. (2021). RecA Is Required for the

- Assembly of RecN into DNA Repair Complexes on the Nucleoid. *Journal of bacteriology*, **203**(20), e0024021.
- Meddows, T. R., Savory, A. P., Grove, J. I., Moore, T., & Lloyd, R. G. (2005). RecN protein and transcription factor DksA combine to promote faithful recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Molecular microbiology*, **57**(1), 97–110.
- Miller, J.H. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*.
- Murayama Y. (2018). DNA entry, exit and second DNA capture by cohesin: insights from biochemical experiments. *Nucleus (Austin, Tex.)*, **9**(1), 492–502.
- Murayama, Y., & Uhlmann, F. (2014). Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature*, **505**(7483), 367–371.
- Murayama, Y., Samora, C. P., Kurokawa, Y., Iwasaki, H., & Uhlmann, F. (2018). Establishment of DNA-DNA Interactions by the Cohesin Ring. *Cell*, **172**(3), 465–477.e15.
- Nagashima, K., Kubota, Y., Shibata, T., Sakaguchi, C., Shinagawa, H., & Hishida, T. (2006). Degradation of Escherichia coli RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance. *The Journal of biological chemistry*, **281**(41), 30941–30946.
- Nagashima, K., Kubota, Y., Shibata, T., Sakaguchi, C., Shinagawa, H., & Hishida, T. (2006). Degradation of Escherichia coli RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance. *The Journal of biological chemistry*, **281**(41), 30941–30946.

- Niki, H., Jaffé, A., Imamura, R., Ogura, T., & Hiraga, S. (1991). The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *The EMBO journal*, **10**(1), 183–193.
- Nishide, K., & Hirano, T. (2014). Overlapping and non-overlapping functions of condensins I and II in neural stem cell divisions. *PLoS genetics*, **10**(12), e1004847.
- Nolivos, S., & Sherratt, D. (2014). The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes. *FEMS microbiology reviews*, **38**(3), 380–392.
- Nolivos, S., Upton, A. L., Badrinarayanan, A., Müller, J., Zawadzka, K., Wiktor, J., Gill, A., Arciszewska, L., Nicolas, E., & Sherratt, D. (2016). MatP regulates the coordinated action of topoisomerase IV and MukBEF in chromosome segregation. *Nature communications*, **7**, 10466.
- O'Donnell, M., Langston, L., & Stillman, B. (2013). Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **5**(7), a010108.
- Odsbu, I., & Skarstad, K. (2014). DNA compaction in the early part of the SOS response is dependent on RecN and RecA. *Microbiology (Reading, England)*, **160**(Pt 5), 872–882.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M. P., Neuwald, A. F., & Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*, **115**(1), 109–121.
- Otsuji, N., Iyehara, H., & Hideshima, Y. (1974). Isolation and characterization of an *Escherichia coli* *ruv* mutant which forms nonseptate filaments after low doses of ultraviolet light irradiation. *Journal of bacteriology*, **117**(2), 337–344.
- Parsons, C. A., Stasiak, A., Bennett, R. J., & West, S. C. (1995). Structure of a

- multisubunit complex that promotes DNA branch migration. *Nature*, **374**(6520), 375–378.
- Passarge E. (1979). Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *American journal of human genetics*, **31**(2), 106–115.
- Payne-Dwyer, A. L., Syeda, A. H., Shepherd, J. W., Frame, L., & Leake, M. C. (2022). RecA and RecB: probing complexes of DNA repair proteins with mitomycin C in live *Escherichia coli* with single-molecule sensitivity. *Journal of the Royal Society, Interface*, **19**(193), 20220437.
- Pellegrino, S., Radzimanowski, J., de Sanctis, D., Boeri Erba, E., McSweeney, S., & Timmins, J. (2012). Structural and functional characterization of an SMC-like protein RecN: new insights into double-strand break repair. *Structure (London, England : 1993)*, **20**(12), 2076–2089.
- Petrushenko, Z. M., Cui, Y., She, W., & Rybenkov, V. V. (2010). Mechanics of DNA bridging by bacterial condensin MukBEF in vitro and in singulo. *The EMBO journal*, **29**(6), 1126–1135.
- Prieto, A. I., Kahramanoglou, C., Ali, R. M., Fraser, G. M., Seshasayee, A. S., & Luscombe, N. M. (2012). Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. *Nucleic acids research*, **40**(8), 3524–3537.
- Renzette, N., Gumlaw, N., Nordman, J. T., Krieger, M., Yeh, S. P., Long, E., Centore, R., Boonsombat, R., & Sandler, S. J. (2005). Localization of RecA in *Escherichia coli* K-12 using RecA-GFP. *Molecular microbiology*, **57**(4), 1074–1085.
- Reyes, E. D., Patidar, P. L., Uranga, L. A., Bortoletto, A. S., & Lusetti, S. L. (2010). RecN

- is a cohesin-like protein that stimulates intermolecular DNA interactions in vitro. *The Journal of biological chemistry*, **285**(22), 16521–16529.
- Rice, P. A., Yang, S., Mizuuchi, K., & Nash, H. A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell*, **87**(7), 1295–1306.
- Rostas, K., Morton, S. J., Picksley, S. M., & Lloyd, R. G. (1987). Nucleotide sequence and LexA regulation of the Escherichia coli recN gene. *Nucleic acids research*, **15**(13), 5041–5049.
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L. H., & Löbrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology*, **23**(16), 5706–5715.
- Sakamoto, T., Inui, Y. T., Uraguchi, S., Yoshizumi, T., Matsunaga, S., Mastui, M., Umeda, M., Fukui, K., & Fujiwara, T. (2011). Condensin II alleviates DNA damage and is essential for tolerance of boron overload stress in Arabidopsis. *The Plant cell*, **23**(9), 3533–3546.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., and Maniatis, T (1989) Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2nd Edn., 2nd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York*
- Sanders, J. T., Freeman, T. F., Xu, Y., Gollosi, R., Stallard, M. A., Hill, A. M., San Martin, R., Balajee, A. S., & McCord, R. P. (2020). Radiation-induced DNA damage and repair effects on 3D genome organization. *Nature communications*, **11**(1), 6178.
- Sargentini, N. J., & Smith, K. C. (1983). Characterization of an Escherichia coli mutant (radB101) sensitive to gamma and uv radiation, and methyl methanesulfonate. *Radiation research*, **93**(3), 461–478.
- Sawitzke, J. A., & Austin, S. (2000). Suppression of chromosome segregation defects of Escherichia coli muk mutants by mutations in topoisomerase I. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(4), 1671–1676.
- Shan, Q., & Cox, M. M. (1997). RecA filament dynamics during DNA strand exchange reactions. *The Journal of biological chemistry*, **272**(17), 11063–11073.
- Sharples, G. J., Ingleston, S. M., & Lloyd, R. G. (1999). Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA. *Journal of bacteriology*, **181**(18), 5543–5550.
- Shibata, T., Hishida, T., Kubota, Y., Han, Y. W., Iwasaki, H., & Shinagawa, H. (2005). Functional overlap between RecA and MgsA (RarA) in the rescue of stalled replication forks in *Escherichia coli*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, **10**(3), 181–191.
- Shida, T., Iwasaki, H., Saito, A., Kyogoku, Y., & Shinagawa, H. (1996). Analysis of substrate specificity of the RuvC holliday junction resolvase with synthetic Holliday junctions. *The Journal of biological chemistry*, **271**(42), 26105–26109.
- Shinagawa, H., & Iwasaki, H. (1996). Processing the holliday junction in homologous recombination. *Trends in biochemical sciences*, **21**(3), 107–111.
- Shinohara, T., Ikawa, S., Iwasaki, W., Hiraki, T., Hikima, T., Mikawa, T., Arai, N., Kamiya, N., & Shibata, T. (2015). Loop L1 governs the DNA-binding specificity and order for RecA-catalyzed reactions in homologous recombination and DNA repair. *Nucleic acids research*, **43**(2), 973–986.
- Simmons, L. A., Goranov, A. I., Kobayashi, H., Davies, B. W., Yuan, D. S., Grossman, A. D., & Walker, G. C. (2009). Comparison of responses to double-strand breaks between *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* reveals different requirements for SOS induction. *Journal of bacteriology*, **191**(4), 1152–1161.
- Singh, V. P., & Gerton, J. L. (2015). Cohesin and human disease: lessons from mouse

- models. *Current opinion in cell biology*, **37**, 9–17.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S., Gaudier, M., Kowalczykowski, S. C., & Wigley, D. B. (2004). Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature*, **432**(7014), 187–193.
- Sinha, M., Watanabe, S., Johnson, A., Moazed, D., & Peterson, C. L. (2009). Recombinational repair within heterochromatin requires ATP-dependent chromatin remodeling. *Cell*, **138**(6), 1109–1121.
- Smith G. R. (2012). How RecBCD enzyme and Chi promote DNA break repair and recombination: a molecular biologist's view. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **76**(2), 217–228.
- Srinivasan, M., Fumasoni, M., Petela, N. J., Murray, A., & Nasmyth, K. A. (2020). Cohesion is established during DNA replication utilising chromosome associated cohesin rings as well as those loaded de novo onto nascent DNAs. *eLife*, **9**, e56611.
- Stray, J. E., Crisona, N. J., Belotserkovskii, B. P., Lindsley, J. E., & Cozzarelli, N. R. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Smc2/4 condensin compacts DNA into (+) chiral structures without net supercoiling. *The Journal of biological chemistry*, **280**(41), 34723–34734.
- Taniguchi, S., Kasho, K., Ozaki, S., & Katayama, T. (2019). *Escherichia coli* CrfC Protein, a Nucleoid Partition Factor, Localizes to Nucleoid Poles via the Activities of Specific Nucleoid-Associated Proteins. *Frontiers in microbiology*, **10**, 72.
- Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K., & Mizuno, T. (1996). Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *Journal of molecular biology*, **263**(2), 149–162.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., & Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at

- anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, **400**(6739), 37–42.
- Uranga, L. A., Reyes, E. D., Patidar, P. L., Redman, L. N., & Lusetti, S. L. (2017). The cohesin-like RecN protein stimulates RecA-mediated recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Nature communications*, **8**, 15282.
- Verma, S. C., Qian, Z., & Adhya, S. L. (2019). Architecture of the Escherichia coli nucleoid. *PLoS genetics*, **15**(12), e1008456.
- Vickridge, E., Planchenault, C., Cockram, C., Junceda, I. G., & Espéli, O. (2017). Management of E. coli sister chromatid cohesion in response to genotoxic stress. *Nature communications*, **8**, 14618.
- Wald, J., Fahrenkamp, D., Goessweiner-Mohr, N., Lugmayr, W., Ciccarelli, L., Vesper, O., & Marlovits, T. C. (2022). Mechanism of AAA+ ATPase-mediated RuvAB-Holliday junction branch migration. *Nature*, **609**(7927), 630–639.
- Wang, Q., Mordukhova, E. A., Edwards, A. L., & Rybenkov, V. V. (2006). Chromosome condensation in the absence of the non-SMC subunits of MukBEF. *Journal of bacteriology*, **188**(12), 4431–4441.
- Warr, A. R., Klimova, A. N., Nwaobasi, A. N., & Sandler, S. J. (2019). Protease-deficient SOS constitutive cells have RecN-dependent cell division phenotypes. *Molecular microbiology*, **111**(2), 405–422.
- West S. C. (1997). Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annual review of genetics*, **31**, 213–244.
- Wiktor, J., Gynnå, A. H., Leroy, P., Larsson, J., Coceano, G., Testa, I., & Elf, J. (2021). RecA finds homologous DNA by reduced dimensionality search. *Nature*, **597**(7876), 426–429.

- Wiktor, J., Gynnå, A. H., Leroy, P., Larsson, J., Coceano, G., Testa, I., & Elf, J. (2021). RecA finds homologous DNA by reduced dimensionality search. *Nature*, **597**(7876), 426–429.
- Yang, H., Zhou, C., Dhar, A., & Pavletich, N. P. (2020). Mechanism of strand exchange from RecA-DNA synaptic and D-loop structures. *Nature*, **586**(7831), 801–806.
- Zeman, M. K., & Cimprich, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology*, **16**(1), 2–9.
- Zhao, B., Zhang, D., Li, C., Yuan, Z., Yu, F., Zhong, S., Jiang, G., Yang, Y. G., Le, X. C., Weinfeld, M., Zhu, P., & Wang, H. (2017). ATPase activity tightly regulates RecA nucleofilaments to promote homologous recombination. *Cell discovery*, **3**, 16053.

Table 1

strain	Background	Genotype	Source
ME9062	BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda-, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514$	NBRP
JW2669-KC	BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda-, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514 \Delta recA::Kan^R$	NBRP
JW5416-KC	BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda-, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514 \Delta recN::Kan^R$	NBRP
JW1852-KC	BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda-, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514 \Delta ruvC::Kan^R$	NBRP
SN001	BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda-, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514 \Delta recA::Kan^R \Delta recN::Tet^R$	Laboratory collection
SN002	BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda-, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514 \Delta recN \Delta ruvC::Kan^R$	This study
MECS123	MG1655	$\lambda-, rph-1 hupA-mCherry$	T. Katayama, S. Ozaki
SN003	MG1655	$\lambda-, rph-1 hupA-mCherry \Delta recN::Kan^R$	This study

Table 2

Name	Plasmid構成		備考	Source
pSTV28	pSTV28	<i>Cm^R p15A ori</i>		Laboratory collection
pSOS-RecN	pSTV28-SOS-RecN	<i>Cm^R p15A ori P_{SOS}-recN</i>		Laboratory collection
pSOS-RecN ^{K35A}	pSTV28-SOS-RecN ^{K35A}	<i>Cm^R p15A ori P_{SOS}-recNK35A</i>		Laboratory collection
pSOS-GFP-RecN	pSTV28-SOS-GFP-RecN	<i>Cm^R p15A ori P_{SOS}-GFP-recN</i>		Laboratory collection
pSOS-GFP-RecN ^{K35A}	pSTV28-SOS-GFP-RecN ^{K35A}	<i>Cm^R p15A ori P_{SOS}-GFP-recNK35A</i>		Laboratory collection
pTF200	pTF200	<i>Cm^R Amp^R p15A ori</i>		Laboratory collection
pBAD-RecN	pTF200-RecN	<i>Cm^R Amp^R p15A ori P_{BAD}-recN</i>		Laboratory collection
pBAD-RecN K35A	pTF200-RecN ^{K35A}	<i>Cm^R Amp^R p15A ori P_{BAD}-recN^{K35A}</i>		Laboratory collection
pBAD-GFP-RecN	pTF200-GFP-RecN	<i>Cm^R Amp^R p15A ori P_{BAD}-GFP-recN</i>		Laboratory collection
pBAD-GFP-RecN K35A	pTF200-GFP-RecN ^{K35A}	<i>Cm^R Amp^R p15A ori P_{BAD}-GFP-recN^{K35A}</i>		Laboratory collection
pBAD-RecN Am-	pTF200-RecN Amp-	<i>Cm^R p15A ori P_{BAD}-recN</i>		This study
pBAD-GFP-RecN Am-	pTF200-GFP-RecN Amp-	<i>Cm^R p15A ori P_{BAD}-GFP-recN</i>		This study
pT7-7	pT7-7	<i>pBR322ori Amp^R P_{T7}</i>		Laboratory collection
pRecA	pT7-7-RecA	<i>pBR322ori Amp^R P_{T7}-RecA</i>		Laboratory collection
pRecA-mCherry	pT7-7-RecA-mCherry	<i>pBR322ori Amp^R P_{T7}-RecA-mCherry</i>	RecAとmCherryの間にG-S-Tのリンカー配列あり	This study
pUC19ndeX-RecN	pUC19ndeX-RecN	<i>pUC19 Amp^R</i>	Nde I サイトなし	Laboratory collection
pCP20	pCP20	<i>Cm^R Amp^R oriR101 repA101-ts</i>	複製起点が37-42℃で温度感受性	Laboratory collection
pKD46	pKD46	<i>Amp^R oriR101 repA101-ts</i>	複製起点が37-42℃で温度感受性	Laboratory collection

Table 3

Name	Sequence	Length
example	5'--3'	
RecN(F) BamH I	5'-TGGGACACCCACGGATCCCCTGCACTGA-3'	29
RecN(R) BamH I	5'-TTCGTACCAAATGGATCCGACATCAGCGGT-3'	30
ecoRecN seq_F1	5'-CTTGAAGACGGGCATGAATGTTTGC-3'	27
ecoRecN seq_F2	5'-ATCGACGAAGAGTACAAACGTCTGG-3'	27
ecoRecN seq_F3	5'-ATCGACGAAGAGTACAAACGTCTGG-3'	27
ecoRecN seq_F4	5'-AAGTGGATGTAGGGATTAGCGGTCC-3'	27
ecoRecN seq_R1	5'-GTCTCGCCAGTTATTACGGTCATGC-3'	27
ecoRecN seq_R2	5'-CTTGAAGACG GGCATGAATGTTTGC-3'	27
ecoRecN seq_R3	5'-CTTGAAGACGGGCATGAATGTTTGC-3'	27
mCherry_F3	5'-ACTAACGAAGATTTTGGGAGCATCGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAAC-3'	48
mCherry_R2	5'-GATCCAACAAGACGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'	38
recA in 686_F1	5'-CGGCGCGGTGAAAGAGGGCGAAAAC-3'	25
mCh in 456_R1	5'-GGGCGCCGTCCTCGGGGTACATCCG-3'	25
AmCh_F1	5'-CGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTG-3'	25
AmCh_F2	5'-CCTGCTGTGCTCCCAGCCGACACC-3'	25
AmCh_F3	5'-GCGCCGTTTAAACAGGCTGAATTCC-3'	25
AmCh_F4	5'-CGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGC-3'	25
AmCh_F5	5'-GCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGC-3'	25
AmCh_R1	5'-CGGTCTTCACCCAGGCGCATGATGG-3'	25
AmCh_R2	5'-GTGAGAGTCGCCGATTTTCGCCTTCG-3'	25
AmCh_R3	5'-CTTTACCCTGACCGATCTTCTCACC-3'	25
AmCh_R4	5'-CACGTAGGCCTTGGAGCCGTACATG-3'	25
AmCh_R5	5'-GGTGATGTCCAACCTGATGTTGACG-3'	25
recNK35A_F	5'-CTGGCGAGACCGGCGCGGGTGCATCTATTGCAATAGATGC-3'	40
recNK35A_R	5'-GCATCTATTGCAATAGATGCACCCGCGCCGGTCTCGCCAG-3'	40
frtKmN_F	5'-CAATAACAGTAATGGTTTTTTCATACAGGAAAACGACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'	58
frtKmN_R	5'-GTTTTGCTGTTTACTCTGACCGTGAAGCAGGAAAAAAGTCATATGAATATCCTCCTTAG-3'	57
recN_+50F	5'-CGCCAGCCTCTTTACTGTATATAAAACCAG-3'	30
Kan_in676	5'-GTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCC-3'	30
frtKmC_F2	5'-GATGAGGCCTGCTAAACAGCAAAACGGAGACGCGTGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'	61
frtKmC_R2	5'-GAAACGCCTCAGCCGGAAGTACCGAGGCGGTATAACCATATGAATATCCTCCTTAGTTC-3'	61
ruvC_up76_F	5'-CATAACGGTGAAATCTCTGATGAGGTGC-3'	28

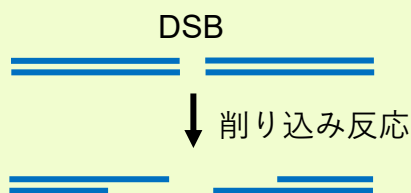
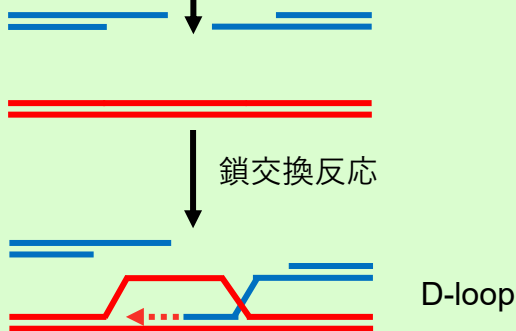
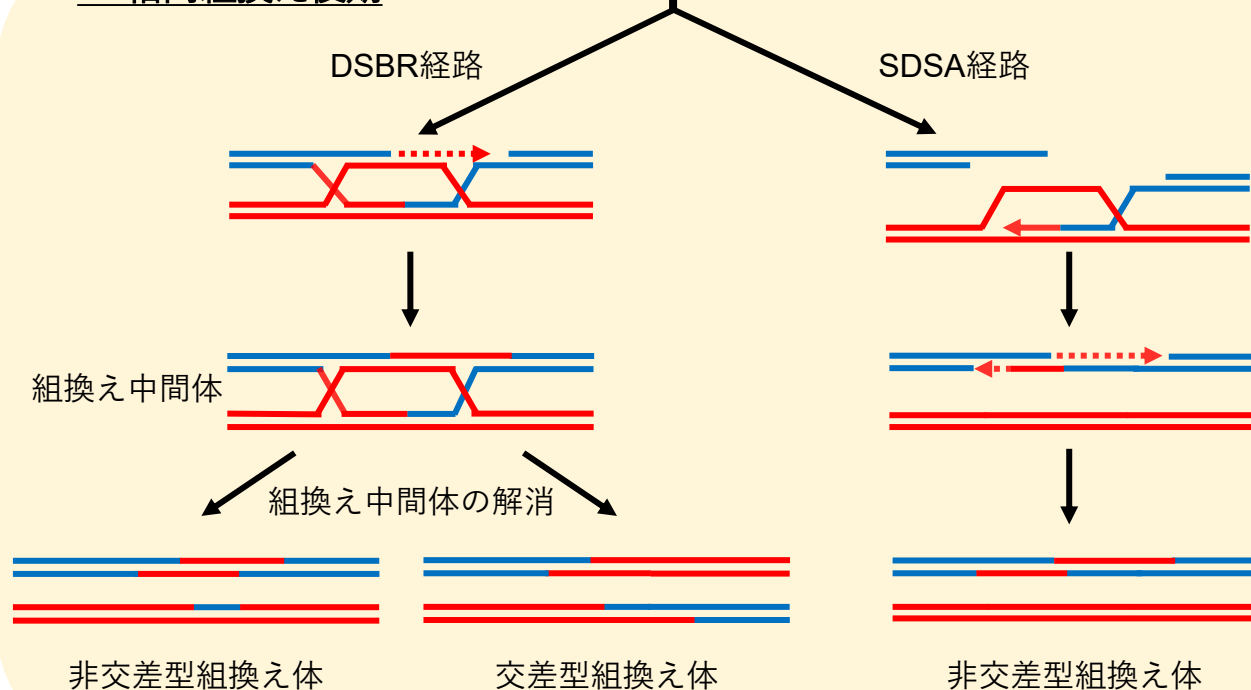
A. 相同組換え前期**B. 相同組換え中期****C. 相同組換え後期**

図1

相同組換え修復のモデル図。まずはじめにヌクレアーゼによってDSB末端が削り込まれる。その後、形成された一本鎖DNA領域が姉妹染色体にある相同領域に侵入する(D-loopの形成)。姉妹染色体DNA鎖を鋳型にしたDNA修復合成が起こった後、DSBR経路とSDSA経路に分岐する。DSBR経路の場合はD-loopの形成が維持されたままDNA合成が進み、組換え中間体を形成する。その後この構造に特異的なヌクレアーゼが組換え中間体を切断することで解消されるが、切断する位置によって非交叉型組換え体と、交叉型組換え体を生じる場合がある。

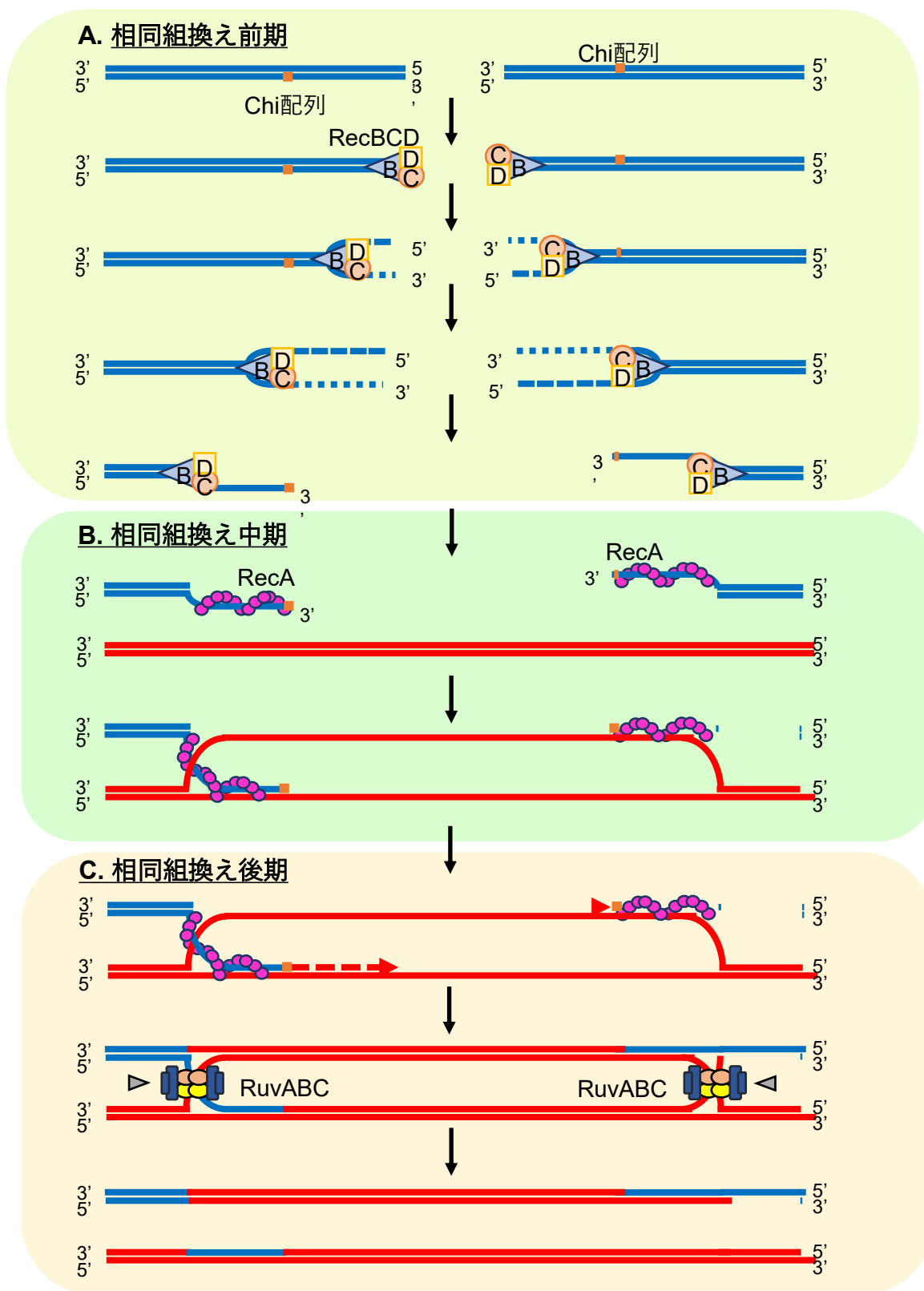
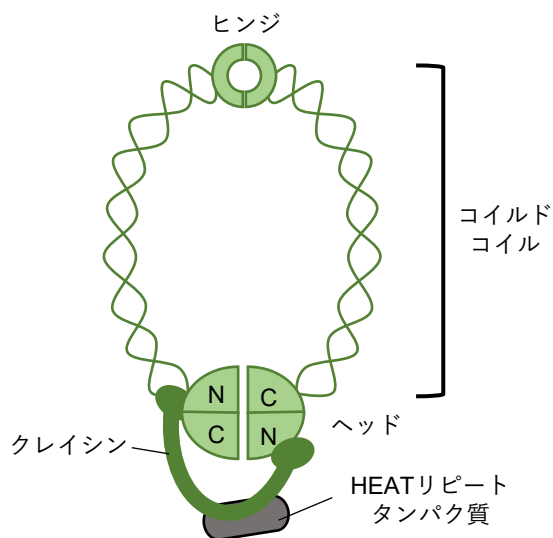


図2
大腸菌における相同組換え修復のモデル図。Chi配列を認識するまで、RecBCDはDNAの5'側と3'側の双方を分解する。Chi配列を認識すると5'側のみを削り込むようになり、一本鎖DNA領域を形成するようになる。この一本鎖DNA領域上にRecAが結合し、フィラメントを形成すると、鎖交換反応が起こる。その後のDNA修復合成を経て形成された組換え中間体はRuvABC複合体によって解消される。

A



B

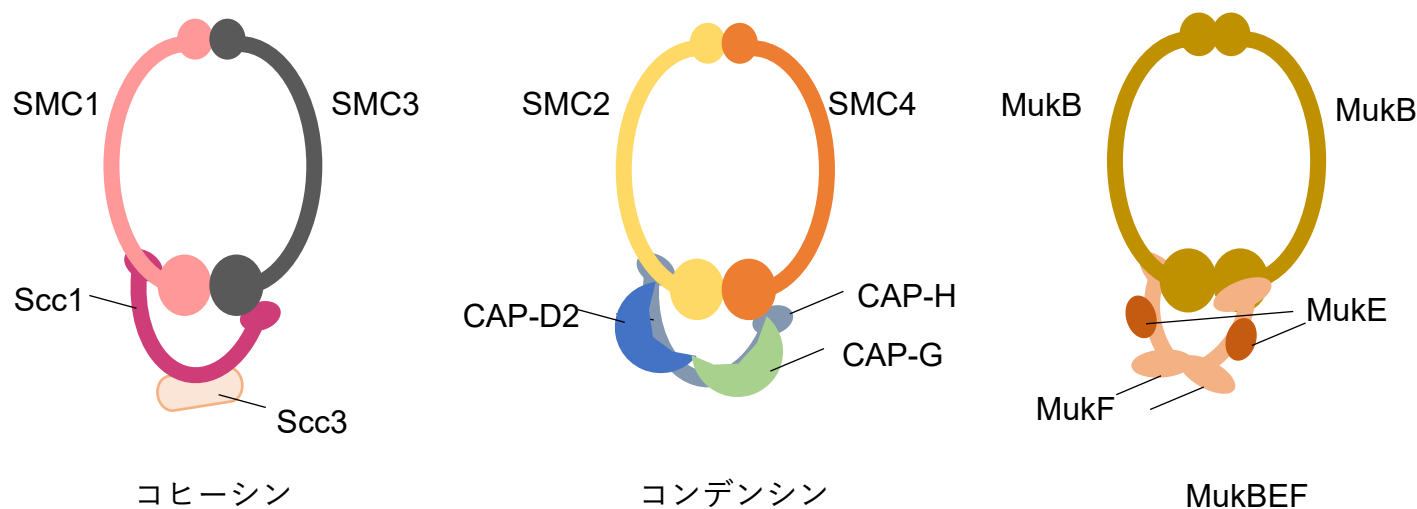


図3

- (A) SMC複合体の構造を示した図。コアサブユニットであるSMCタンパク質と、付属タンパク質である非SMCタンパク質から構成されている。SMCタンパク質のヘテロダイマーはヘッドとヒンジで対合しており、非SMCタンパク質はヘッド部分に結合している。
- (B) コヒーシン複合体（左）コンデンシン I 複合体（中央）、MukBEF複合体（右）の構造を示した図。コヒーシン、コンデンシンのSMCサブユニットはヘテロダイマーであるのに対して、MukBEFはホモダイマーで構成されている。

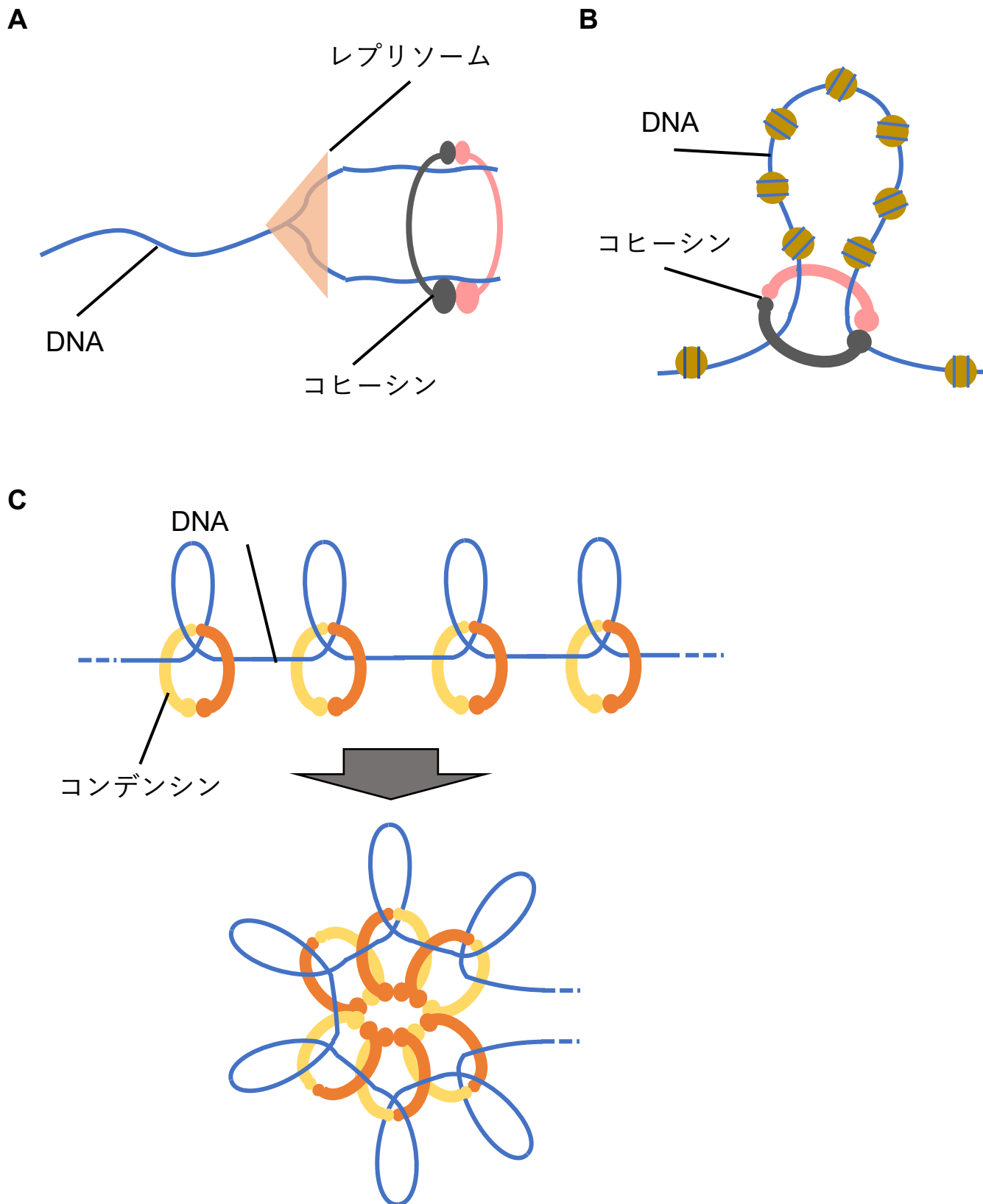


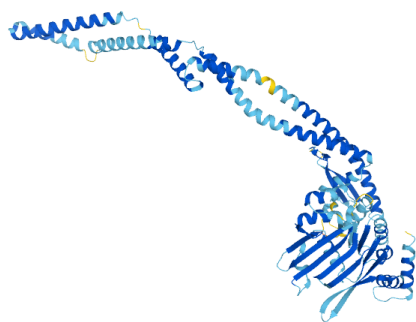
図4

- (A) コヒーシンによる姉妹染色体の接着。DNA複製によって生じた姉妹染色体DNA鎖をリング中空に閉じ込めてつなぎとめている。
- (B) コヒーシンによるDNAループ形成。リング中空にループ構造を入れ込むことによってDNAのループ構造を安定化する。この活性を介してクロマチンループ形成を行う。
- (C) コンデンシンによるDNA凝縮。コンデンシンはDNAに結合し、ループ構造を形成させる。その後、ヘッドドメインを介してコンデンシン分子間で相互作用し、ロゼッタ状の構造を形成する。

A



B



C

N-MLAQLTISNFAIVRELEIDFHSGMTVITGETGAGKSIAIDALGLCLGGRAEADMVRTGAA
 RADLCARFSLKDTPAALRWLEENQLEDGHECLLRVVISSDGRSRGFINGTAVPLSQLREL
 GQLLIQIHGQHAHQLLTKPEHQKFLLDGYANETSLLQEMTARYQLWHQSCRDLAHHQQLS
 QERAARAELLQYQLKELNEFNPPGFEQIDEEYKRLANSQGQLLTTSQNALALMADGEDA
 NLQSQLYTAKQLVSELIGMDSKLSGVLDMLEEATIQIAEASDEL RHYCDRLDLDPNRLF
 LEQRISKQISLARKHHVSPALPQYYQSLLEEQQQLDDQADSQETLALAVTKHHQQALEI
 ARALHQQRQQYAEELAQLITDSMHALSMPHGQFTIDVKFDEHHLGADGADRIEFRVTNTP
 GQPMQPIAKVASGGELSRIALAIQVITARKMETPALIFDEVVDVGISGPTAAVVGKLLRQL
 GESTQVMCVTHLPQVAGCGHQHYFVSKETDGAMTETHMQSLNKKARLQELARLLGGSEVT
 RNTLANAKELLAA-C

図5

- (A) 大腸菌RecNのドメイン構造。他のSMCタンパク質と同様に、RecNはATPase活性を持つヘッドドメインとコイルドコイルドメインで構成されている。C末端側ヘッドドメインの先端にはヘリックスターンヘリックス(HTH)モチーフが存在している。
- (B) Alpha fold 2で予測された大腸菌RecNの立体構造。
- (C) RecNのアミノ酸配列。緑は上からN末端側のヘッドドメインとC末端側のヘッドドメイン、黄色はコイルドコイルドメイン、赤字はWalker Aモチーフ、紫はSignatureモチーフ、青はWalker Bモチーフを示している

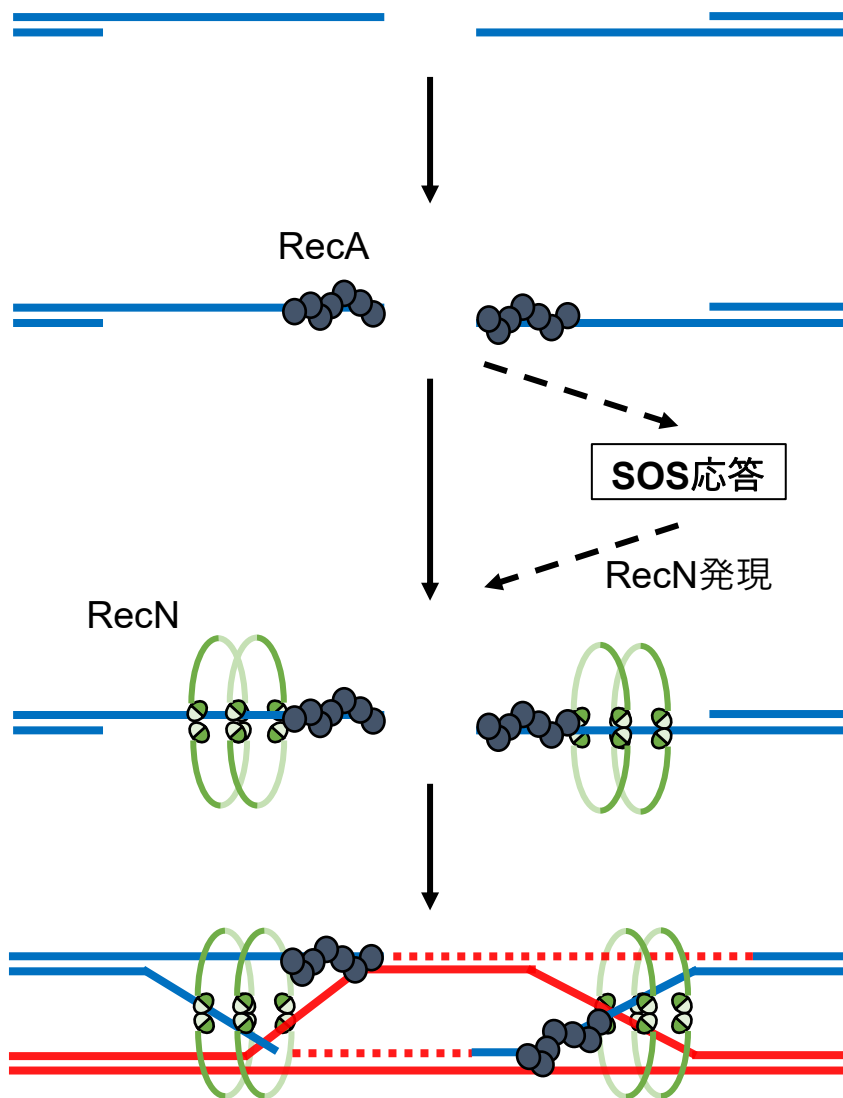


図5

(D) RecNが相同組換えを促進するモデル図。RecNはRecAによってDSB部位にリクルートされた後、組換え修復の際に鋳型となる姉妹染色体DNA鎖をリング中空に取り込み、DSB部位と姉妹染色体DNA鎖をテザリングする。

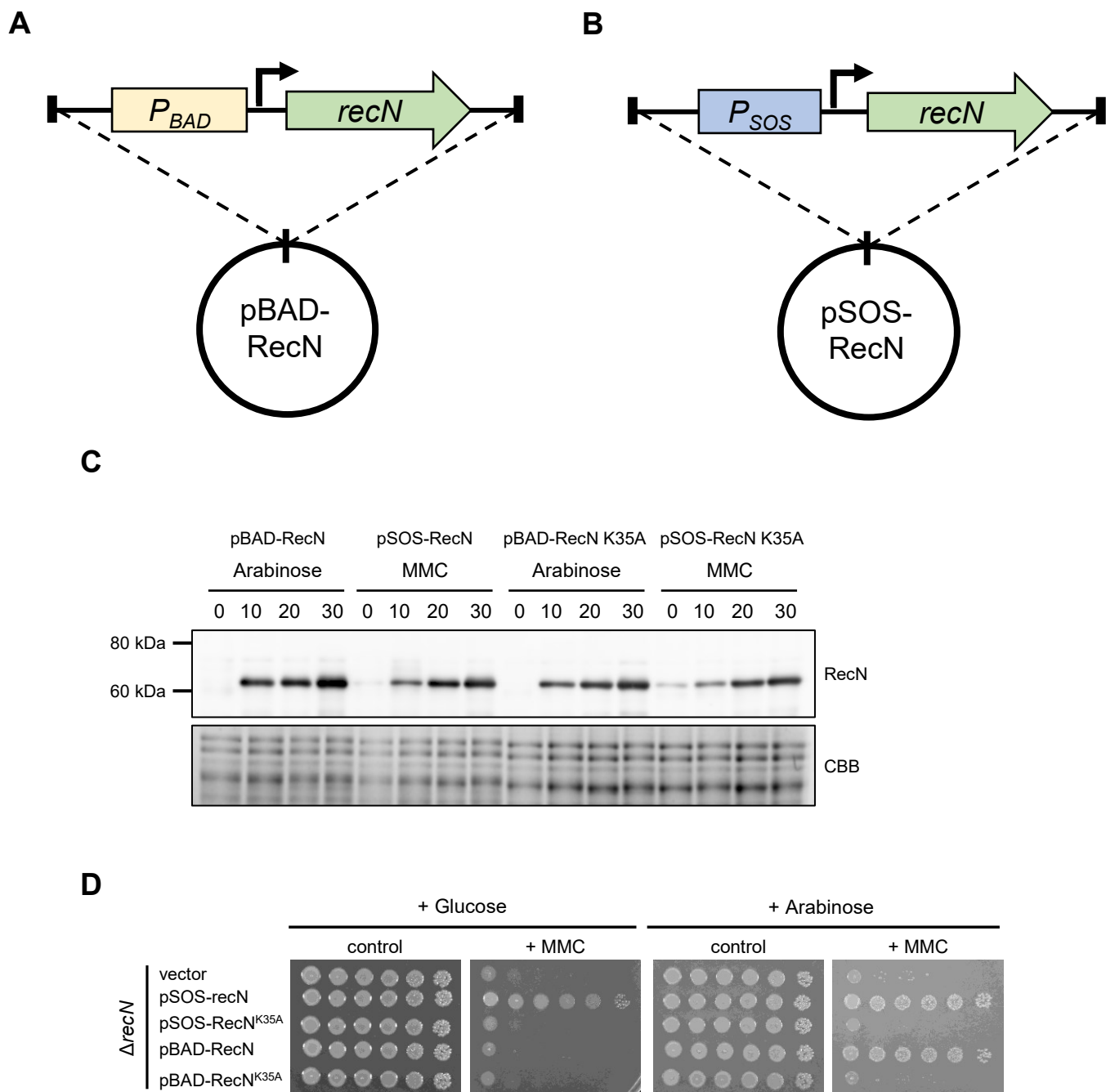


図6

(A) アラビノース依存的にRecNを発現誘導するプラスミドの構造模式図。アラビノース依存的に活性化されるプロモーター(P_{BAD})の下流にRecN遺伝子が挿入されている。

(B) DNA損傷依存的にRecNを発現誘導するプラスミドの構造模式図。DNA損傷依存的に活性化されるSOSプロモーター(P_{SOS})の下流にRecN遺伝子が挿入されている。

(C) P_{BAD} プロモーターから発現したRecNの発現量確認。RecN発現プラスミドで形質転換した $\Delta recN$ 株をLB_Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度: 1.0 $\mu\text{g/ml}$)またはアラビノース(終濃度: w/v 0.05%)を加えて30分間培養した。この間、菌液の一部を指定された時間で回収し、細胞溶解液を作製した後、ウェスタンブロットに使用した。マーカーは80 kDaと60 kDaを示しており、RecNの検出には抗RecN抗体を使用した。ローディングコントロールとしてCBB染色を行った電気泳動画像を示している。

(D) RecN発現プラスミドを導入した $\Delta recN$ 株のMMC感受性テスト。段階希釈した菌液をMMC(終濃度: 0.5 $\mu\text{g/ml}$)を含むLB_Cm寒天培地にスポットし、37°Cで一晩培養した。

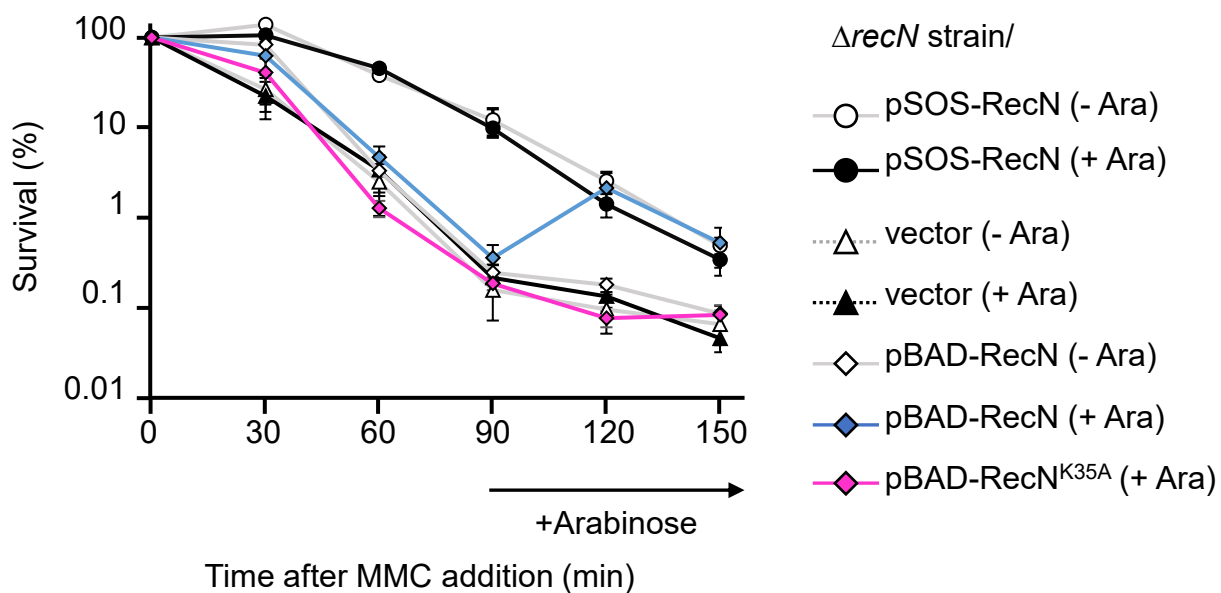


図7

RecN発現プラスミドを導入した $\Delta recN$ 株をLB_Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度：1.0 $\mu\text{g/ml}$)を加えて90分間培養した。その後アラビノース(終濃度：w/v 0.05%)を加えてさらに60分間培養した。この間、菌液の一部を指定された時間で回収し、M9 bufferで希釈した後にLB_Cm寒天培地に塗布して一晩培養した。各時間における生菌数と細胞生存率は寒天培地で生育している大腸菌コロニーの数から算出し、0分における生菌数を細胞生存率100 %として計算した。

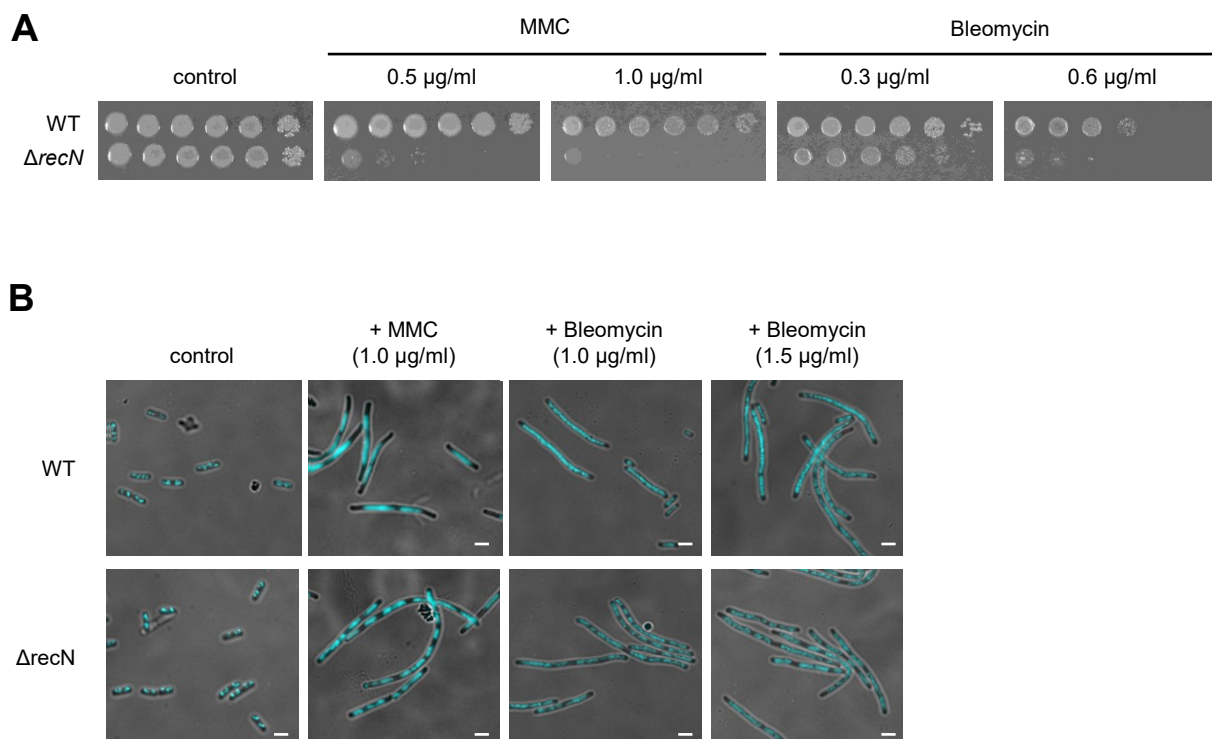
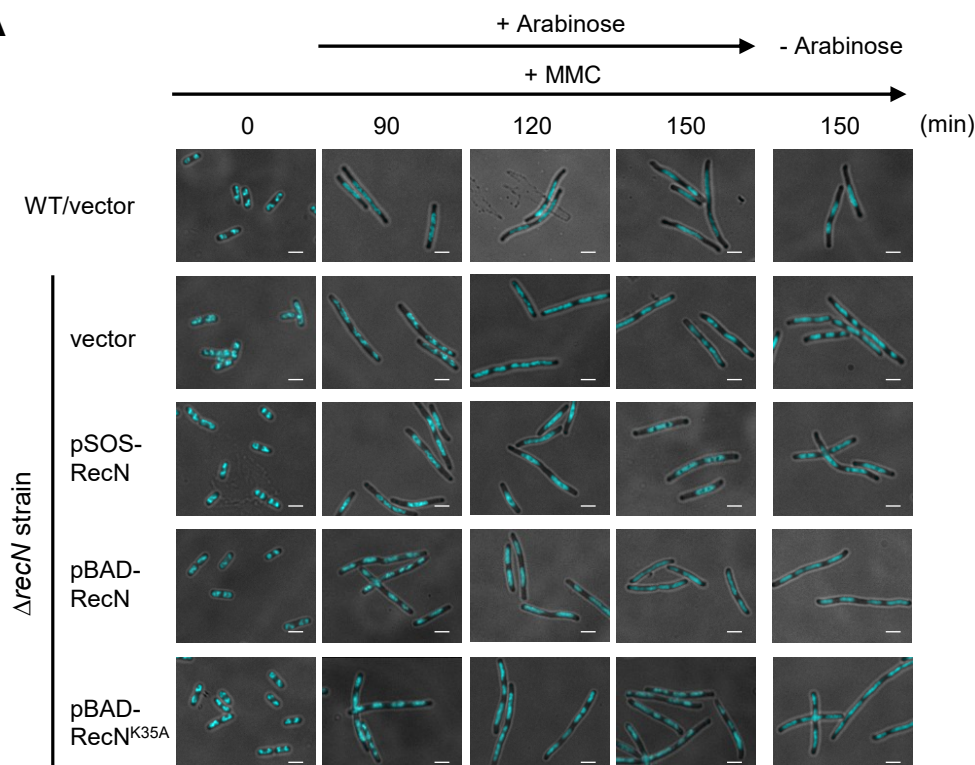


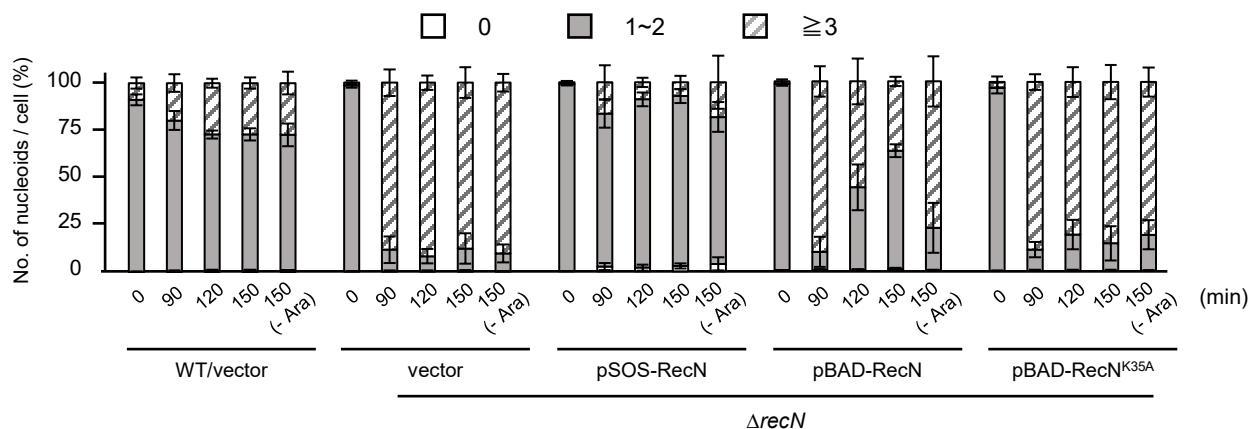
図8

- (A) 野生型および ΔrecN 株のMMC感受性テスト。段階希釈した菌液をMMC(終濃度：0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 $\mu\text{g/ml}$)またはブレオマイシン(終濃度：0.3 $\mu\text{g/ml}$, 0.6 $\mu\text{g/ml}$)を含むLB_Cm寒天培地にスポットし、37°Cで一晩培養した。
- (B) ΔrecN 株、 ΔruvC 株および $\Delta\text{recN} \Delta\text{ruvC}$ 二重変異株の核様体構造。各株をLB_Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度：1.0 $\mu\text{g/ml}$)またはブレオマイシン(終濃度：1.0 $\mu\text{g/ml}$, 1.5 $\mu\text{g/ml}$)を加えて90分間培養した。菌液の一部を回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。核様体は水色で示している。スケールバーは2.5 μm 。

A



B



9

- (A) RecN発現プラスミドを導入した $\Delta recN$ 細胞の核様体構造。RecN発現プラスミドで形質転換した $\Delta recN$ 株をLB_Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度: 1.0 $\mu g/ml$)を加えて90分間培養した。その後アラビノース(終濃度: w/v 0.05%)を加えてさらに60分間培養した。この間、菌液の一部を指定された時間で回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。核様体は水色で示している。スケールバーは2.5 μm 。
- (B) 1細胞あたりの核様体数を定量化したグラフ。一回の実験で100個以上の細胞を観察し、細胞内に存在する核様体の数を数えた。棒グラフは核様体を持たない細胞(0)、核様体が1-2個の細胞(1-2)、核様体が3個以上の細胞(≥ 3)の割合を示している。グラフは3回の実験の平均を示し、標準偏差をエラーバーで示した。

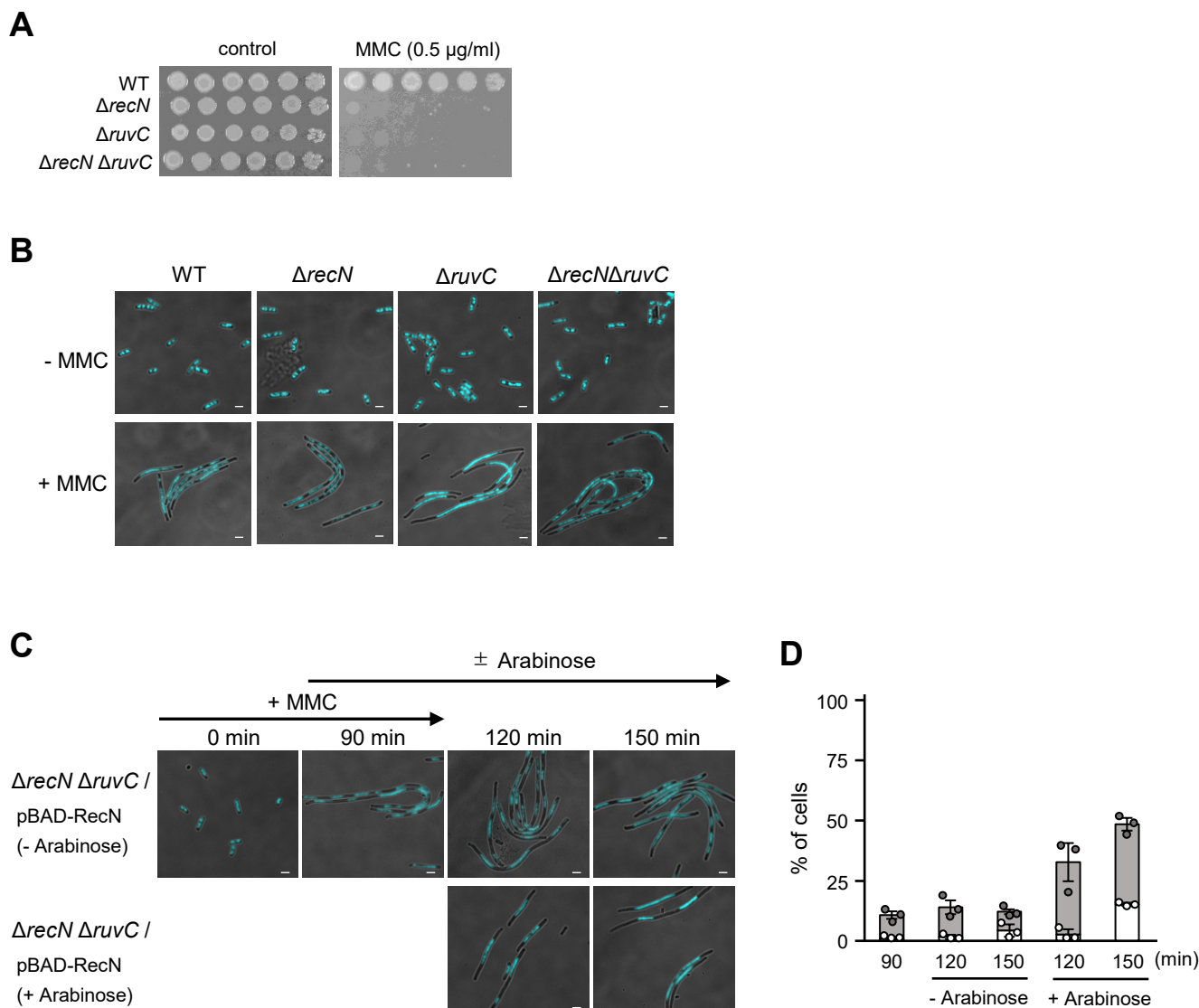
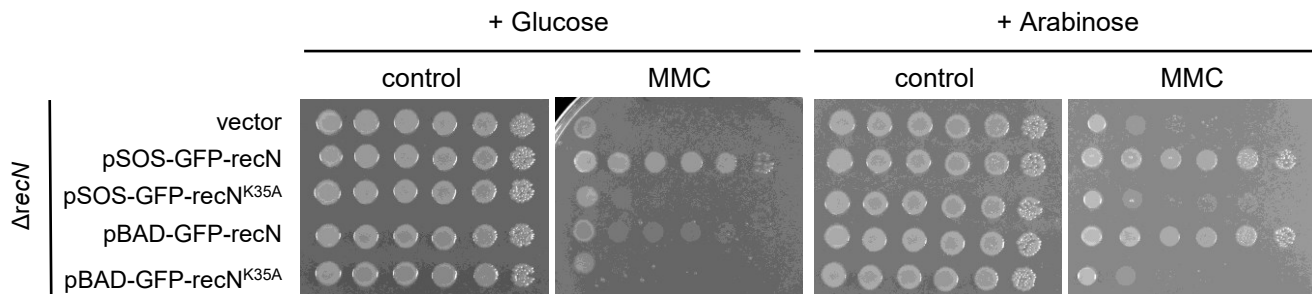


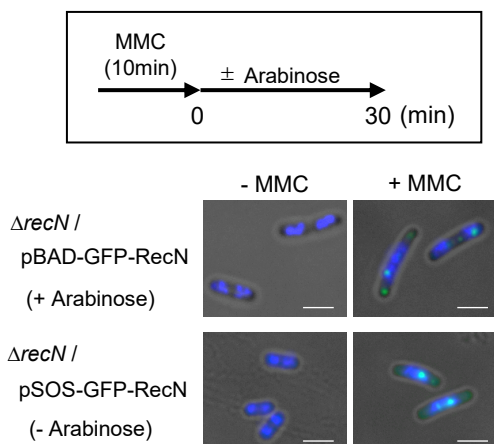
図10

- (A) Δ*recN*株、Δ*ruvC*株およびΔ*recN* Δ*ruvC*二重変異株のMMC感受性テスト。段階希釈した菌液をMMC(終濃度：0.5 μg/ml)を含むLB_Cm寒天培地にスポットし、37°Cで一晩培養した。
- (B) Δ*recN*株、Δ*ruvC*株およびΔ*recN* Δ*ruvC*二重変異株の核様体構造。各株をLB_Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度：1.0 μg/ml)を加えて90分間培養した。菌液の一部を回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。核様体は水色で示している。スケールバーは2.5 μm。
- (C) pBAD-RecNを導入したΔ*recN* Δ*ruvC*細胞の核様体構造。菌液を対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度：1.0 μg/ml)を加えて90分間培養した。その後、M9 bufferで細胞を洗浄した後、アラビノース(0.05 %)を含む培地でさらに60分間培養した。この間、菌液の一部を指定された時間で回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。核様体は水色で示している。スケールバーは2.5 μm。
- (D) (C)の蛍光顕微鏡画像を定量化したグラフ。一回の実験で100個以上の細胞を観察し、細胞内に存在する核様体の数を数えた。白の棒グラフは無核細胞の割合、グレーの棒グラフは核様体が細胞中央の位置で凝集した核様体を持つ細胞の割合を示している。グラフは3回の実験の平均を示し、標準偏差をエラーバーで示した。

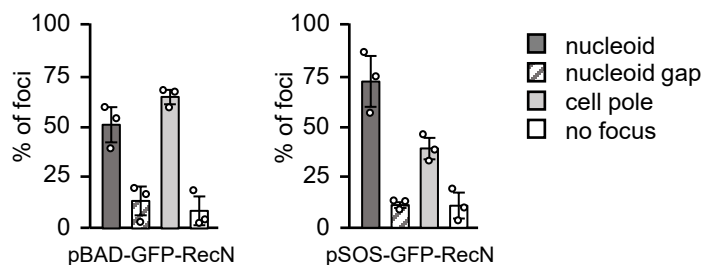
A



B



C



D

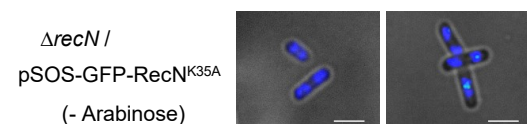
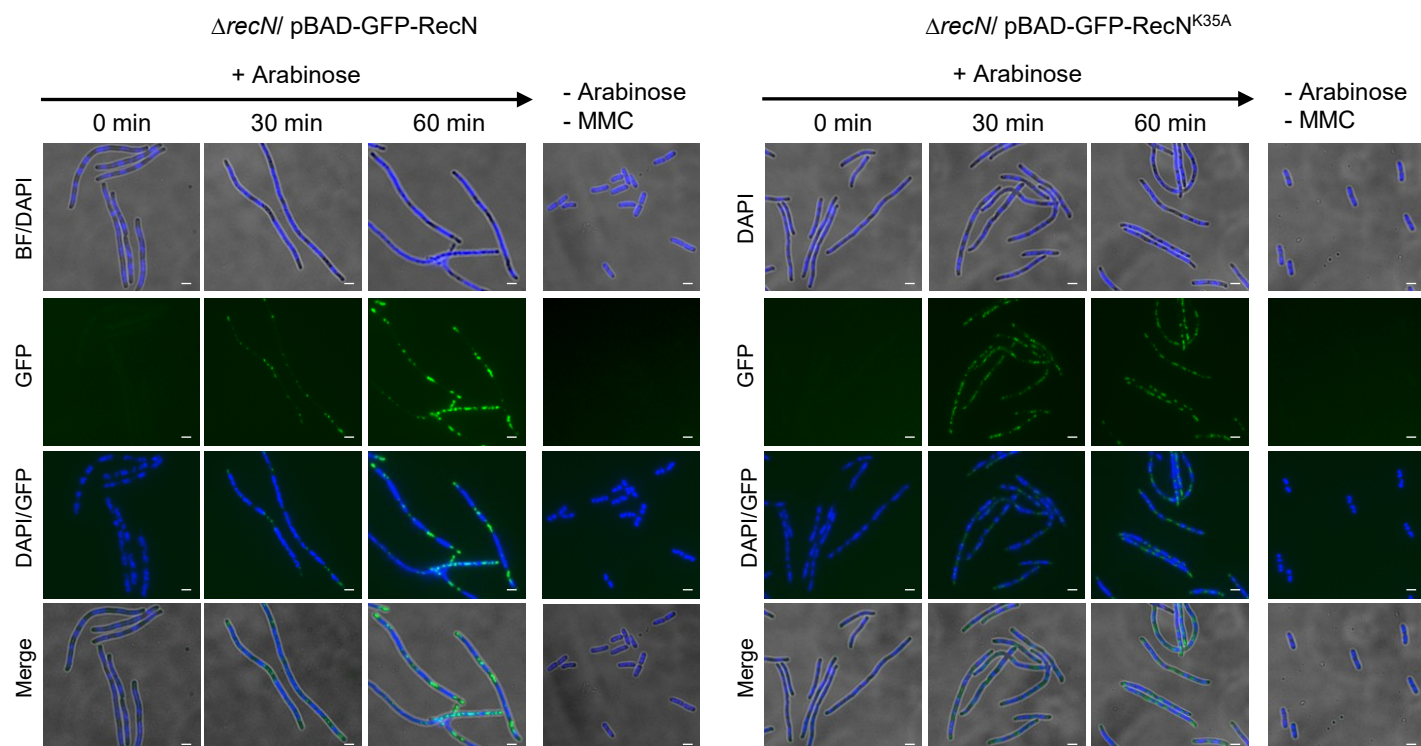


図11

- (A) GFP-RecN発現プラスミドを導入した $\Delta recN$ 株のMMC感受性テスト。段階希釈した菌液をMMC(終濃度: 0.5 $\mu\text{g/ml}$)を含むLB L Cm寒天培地にスポットし、37°Cで一晩培養した。
- (B) GFP-RecN発現プラスミドを導入した $\Delta recN$ 株をLB_Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度: 1.0 $\mu\text{g/ml}$)を加えて10分間培養した。その後、M9 bufferで細胞を洗浄した後、アラビノース(終濃度: w/v 0.05%)を加えてさらに30分間培養した。この間、菌液の一部を指定された時間で回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。DAPIは青色で、GFPは緑で示している。スケールバーは2.5 μm 。
- (C) (B)の結果を定量化したグラフ。GFP-RecNの細胞内局在ごとに細胞を分類し、その割合を定量化した。一回の実験で100個以上の細胞を観察し、細胞内に存在する核様体の数を数えた。棒グラフはGFP-RecN局在を核様体上に持つ細胞(nucleoid)、核様体断片の間に持つ細胞(nucleoid gap)、細胞極に持つ細胞(cell pole)、局在を持たない細胞(no focus)を示している。グラフは3回の実験の平均を示し、標準偏差をエラーバーで示した。

A



B

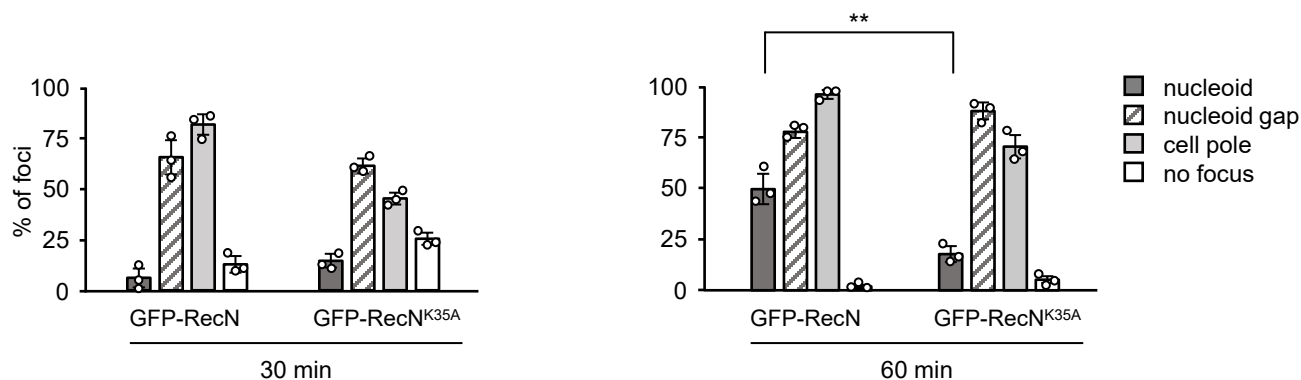
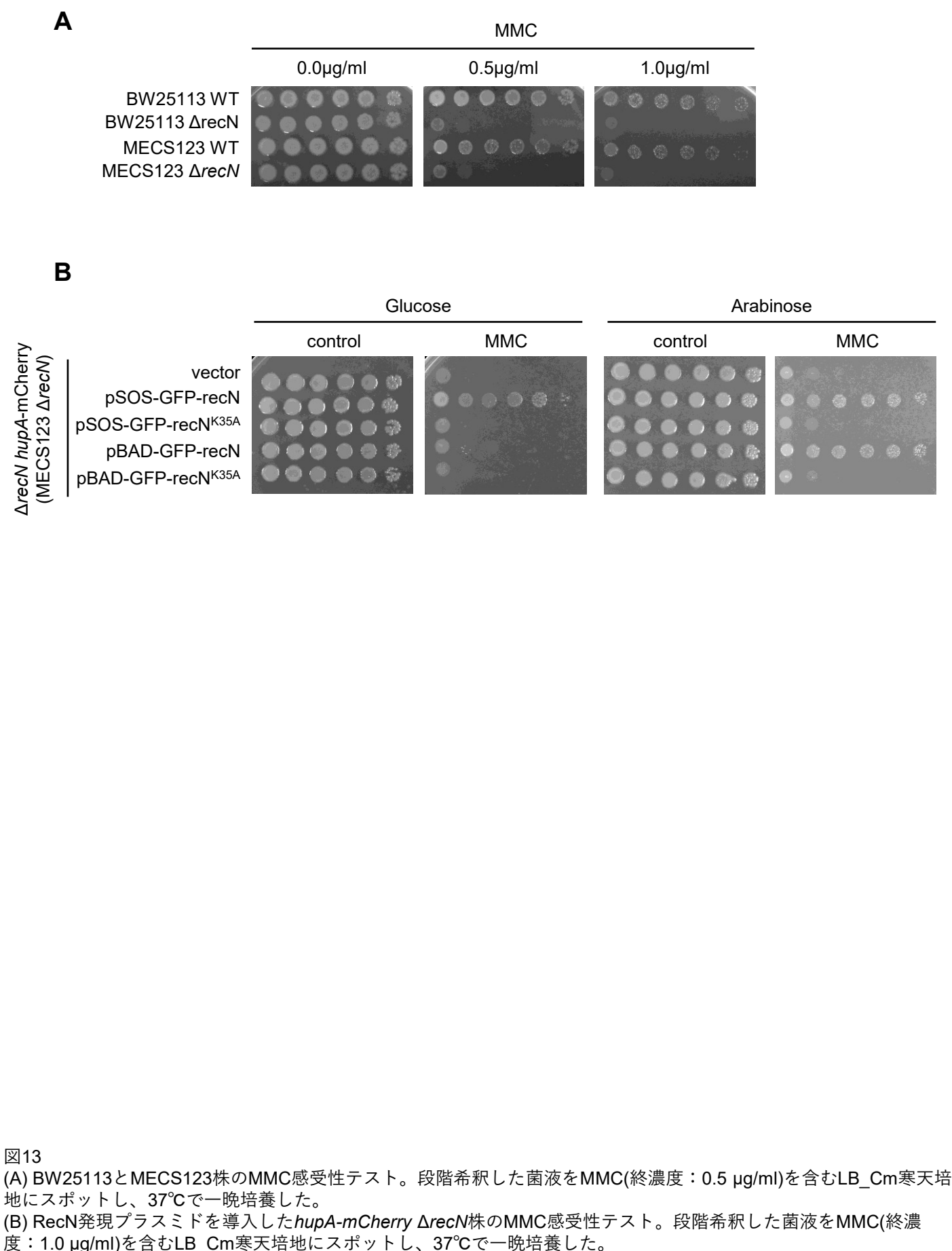


図12

(A) pBAD-GFP-RecNを導入した $\Delta recN$ 細胞の核様体構造とGFP-RecNの細胞内局在。GFP-RecN発現プラスミドで形質転換した $\Delta recN$ 株をLB_Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度: 1.0 $\mu\text{g/ml}$)を加えて90分間培養した。その後、M9 bufferで細胞を洗浄した後、アラビノース(0.05 %)を含む培地でさらに60分間培養した。この間、菌液の一部を指定された時間で回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。DAPIは青色で、GFPは緑で示している。スケールバーは2.5 μm 。

(B) (A)の結果を定量化したグラフ。GFP-RecNの細胞内局在ごとに細胞を分類し、その割合を定量化した。一回の実験で100個以上の細胞を観察し、細胞内に存在する核様体の数を数えた。棒グラフはGFP-RecN局在を核様体上に持つ細胞(nucleoid)、核様体断片の間に持つ細胞(nucleoid gap)、細胞極に持つ細胞(cell pole)、局在を持たない細胞(no focus)を示している。グラフは3回の実験の平均を示し、標準偏差をエラーバーで示した。*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$



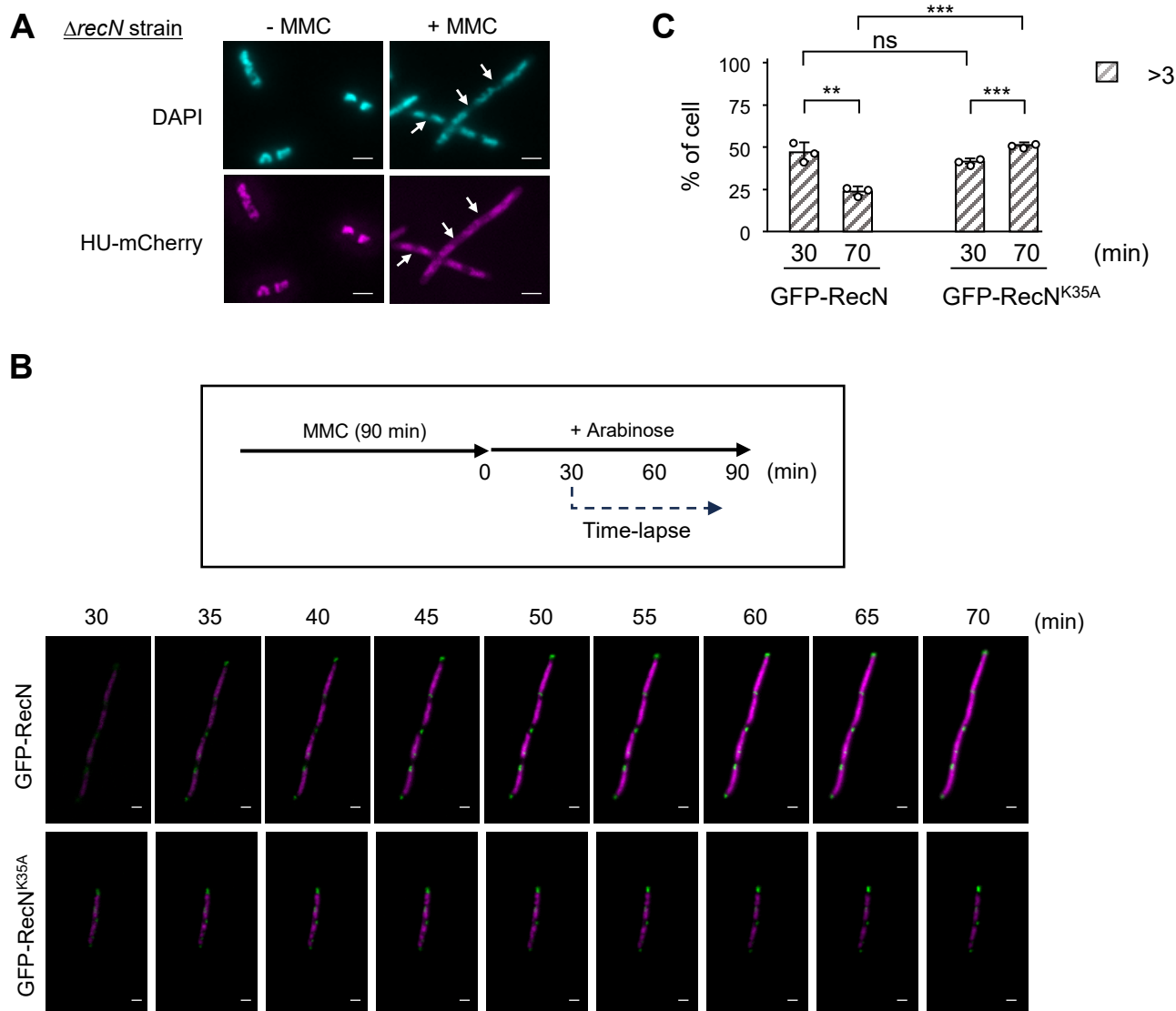


図14

- (A) HU-mCherryを発現する $\Delta recN$ (MECS123 $\Delta recN$)細胞の核様体構造。菌液をLB_Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度：1.0 $\mu\text{g/ml}$)を加えて90分間培養した。その後、菌液の一部を回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。白の矢印はmCherryのフィルターで蛍光が観察されたが、DAPIのフィルターでは蛍光が観察されなかった領域。HU-mCherryでスケールバーは2.0 μm 。
- (B) RecN発現誘導によって断片化した核様体が再構築される様子をリアルタイムで観察した結果。MECS123 $\Delta recN$ 株をpBAD-RecNで形質転換した細胞をLB_Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養し、アラビノースを含む培地で30分培養した後、アラビノース(1.0 % w/v)とM9 bufferを含むアガロースパッドに滴下し、タイムラプス撮影を行った。タイムラプス撮影は100倍の油浸対物レンズを用い、1分間ごとに画像を撮影した。画像はmCherryとGFPのマージ画像であり、上段はpBAD-RecN、下段はpBAD-RecN^{K35A}を導入した細胞を示している。
- (C) (B)のタイムラプス撮影において、1細胞あたりの核様体数を定量化したグラフ。一回の実験で100個以上の細胞を観察し、細胞内に存在する核様体の数を数えた。棒グラフは核様体を持たない細胞(0)、核様体が1-2個の細胞(1-2)、核様体が3個以上の細胞(≥ 3)の割合を示している。グラフは3回の実験の平均を示し、標準偏差をエラーバーで示した。*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$

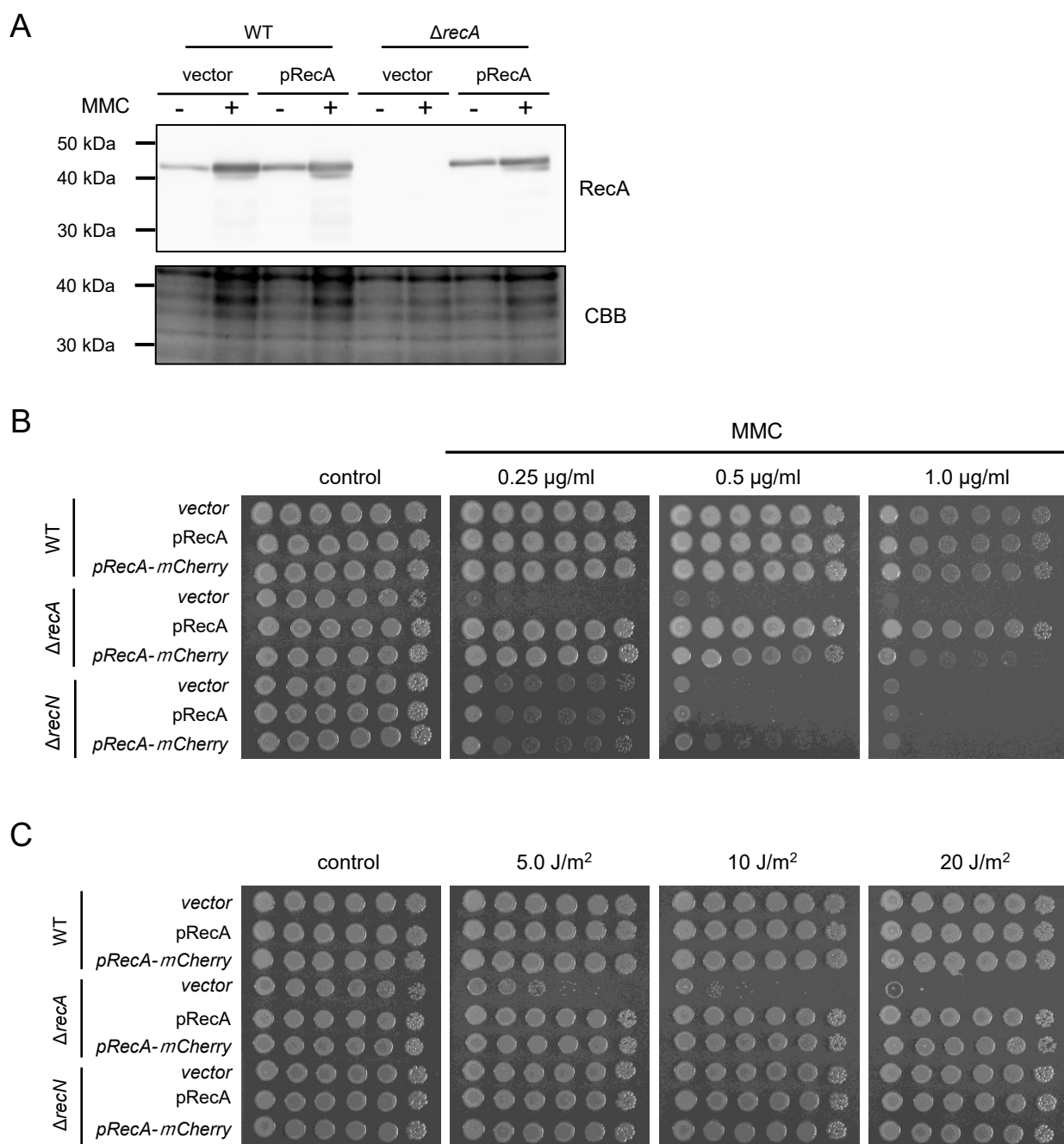


図15

- (A) pT7プラスミドから発現したRecAの発現量確認。RecA発現プラスミドで形質転換した野生型または $\Delta recA$ 株をLB_Amp液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度：1.0 $\mu\text{g/ml}$)を加えて90分間培養した。この間、菌液の一部を指定された時間で回収し、細胞溶解液を作製した後、ウエスタンブロットに使用した。マーカーは50, 40, 30 kDaを示しており、RecAの検出には抗RecA抗体を使用した。ローディングコントロールとしてCBB染色を行った電気泳動画像を示している。
- (B) RecA発現プラスミドを導入した野生型株、 $\Delta recA$ 、 $\Delta recN$ 株のMMC感受性テスト。段階希釈した菌液をMMC(終濃度：0.5 $\mu\text{g/ml}$)を含むLB_Amp寒天培地にスポットし、37°Cで一晩培養した。
- (C) RecA発現プラスミドを導入した野生型株、 $\Delta recA$ 、 $\Delta recN$ 株のUV感受性テスト。段階希釈した菌液をLB_Amp寒天培地にスポットし、UVを5.0~20 J/m^2 で照射した後、37°Cで一晩培養した。

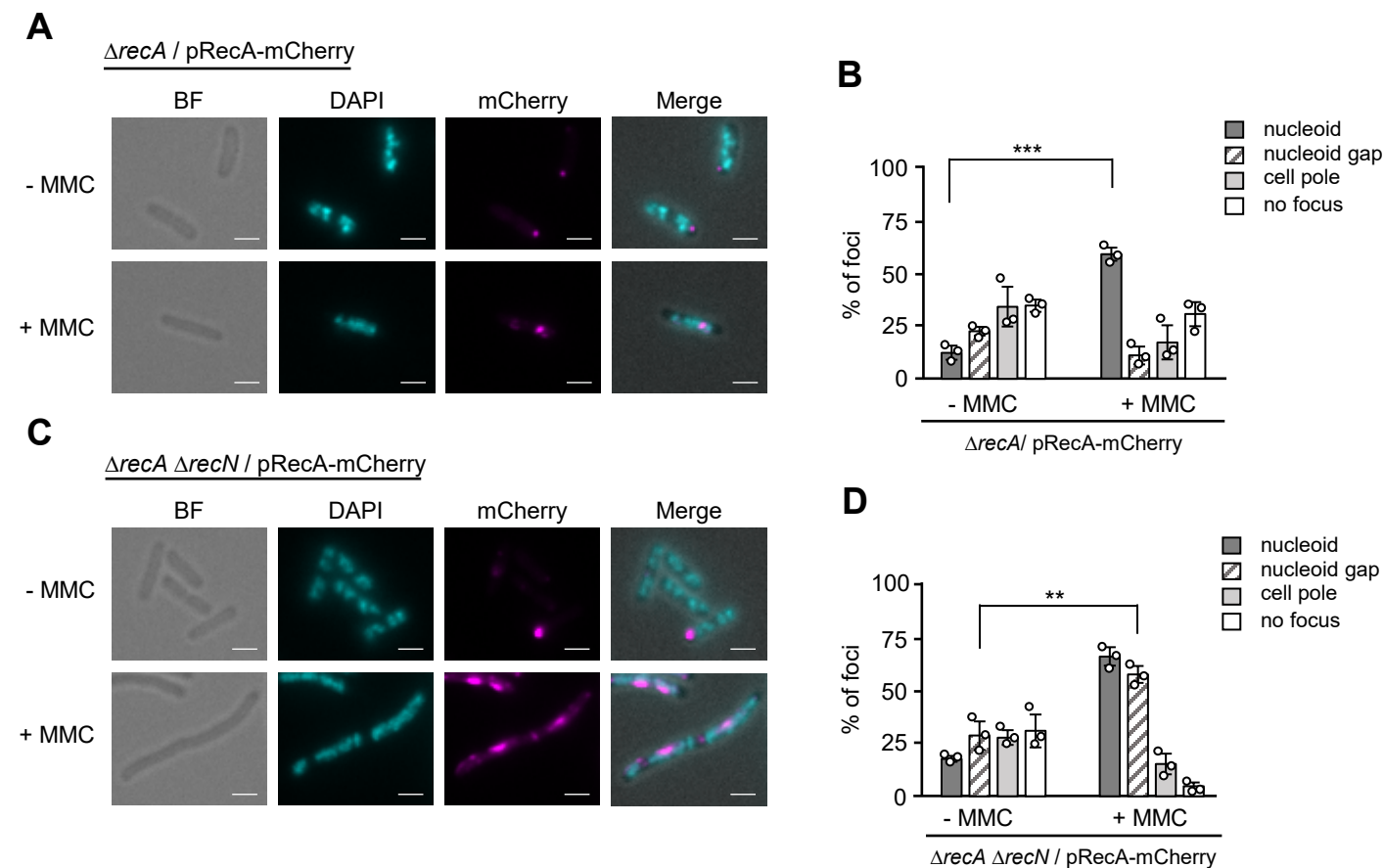


図16

- (A) pRecA-mCherryで形質転換した $\Delta recA$ 細胞をLB_Amp液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度: 1.0 $\mu\text{g/ml}$)を加えて90分間培養した。菌液の一部を回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。DAPIは水色、mCherryはマゼンタで示している。スケールバーは2.0 μm 。
- (B) (A)の画像で観察されたRecA-mCherryの細胞内局在ごとに細胞を分類し、その割合を定量化したグラフ。一回の実験で100個以上の細胞を観察し、細胞内に存在する核様体の数を数えた。棒グラフはGFP-RecN局在を核様体上に持つ細胞(nucleoid)、核様体断片の間に持つ細胞(nucleoid gap)、細胞極に持つ細胞(cell pole)、局在を持たない細胞(no focus)を示している。グラフは3回の実験の平均を示し、標準誤差をエラーバーで示した。*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$
- (C) pRecA-mCherryで形質転換した $\Delta recA \Delta recN$ 細胞をLB_Amp液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度: 1.0 $\mu\text{g/ml}$)を加えて90分間培養した。菌液の一部を回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。核様体は水色で示している。スケールバーは2.0 μm 。
- (D) (C)の画像で観察されたRecA-mCherryの細胞内局在ごとに細胞を分類し、その割合を定量化したグラフ。一回の実験で100個以上の細胞を観察し、細胞内に存在する核様体の数を数えた。棒グラフはGFP-RecN局在を核様体上に持つ細胞(nucleoid)、核様体断片の間に持つ細胞(nucleoid gap)、細胞極に持つ細胞(cell pole)、局在を持たない細胞(no focus)を示している。グラフは3回の実験の平均を示し、標準偏差をエラーバーで示した。*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$

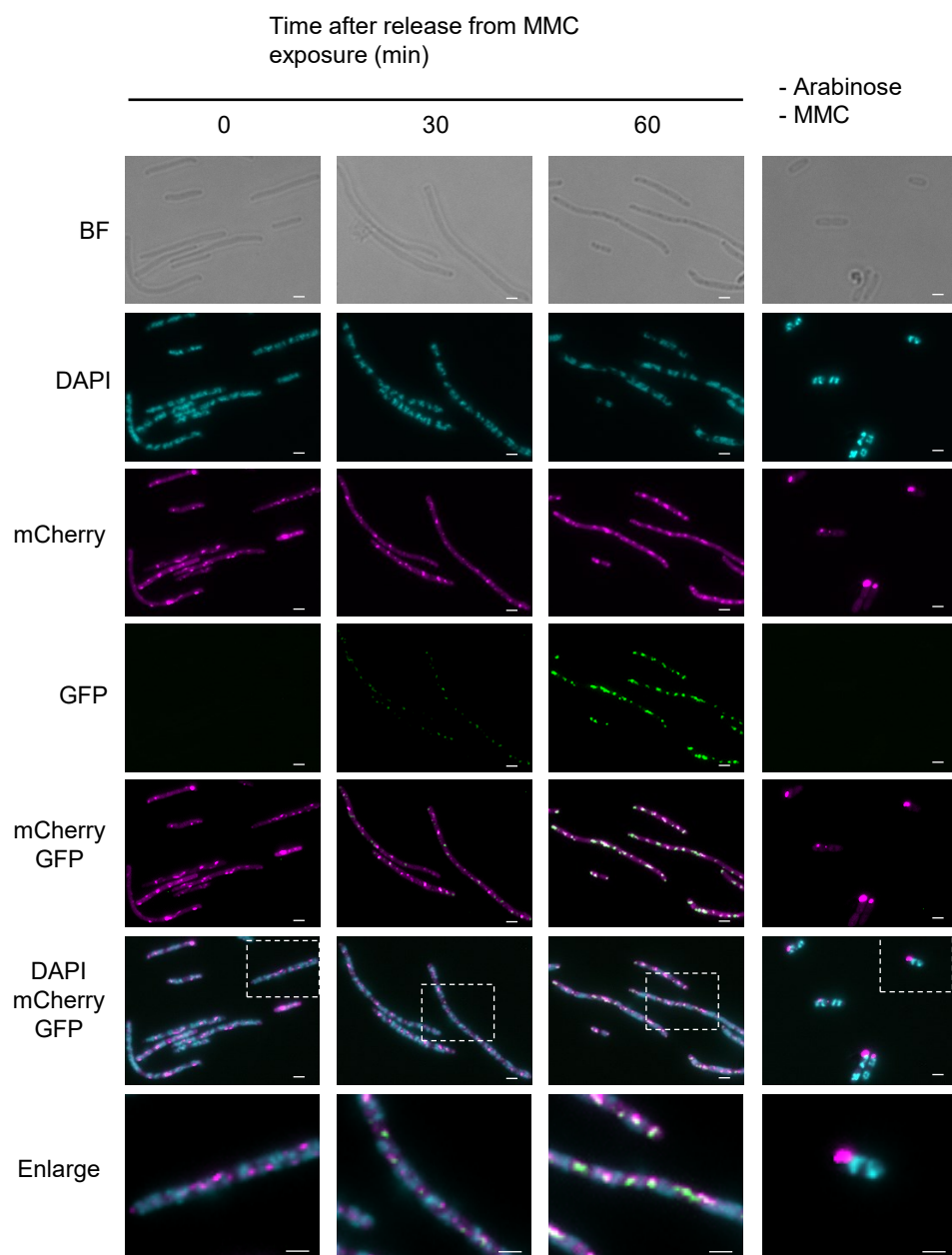
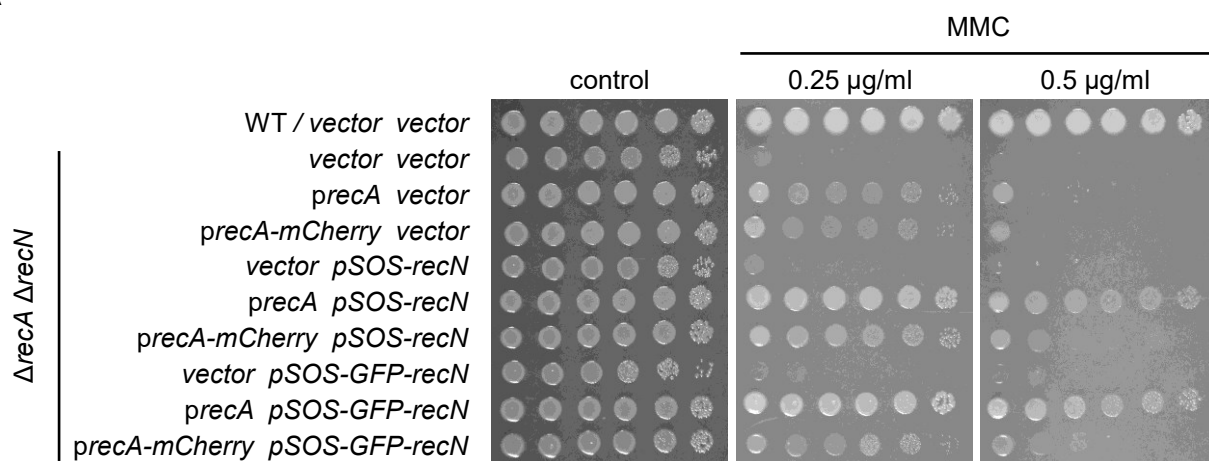


図17

RecAとRecNが核様体ギャップ領域で共局在する様子を撮影した画像。pBAD-GFP-RecNとpRecA-mCherryで形質転換した $\Delta recA \Delta recN$ 細胞をLB_Amp + Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度：1.0 $\mu\text{g/ml}$)を加えて90分間培養した。その後、M9 bufferで細胞を洗浄した後、アラビノース(0.05 %)を含む培地でさらに60分間培養した。この間、菌液の一部を指定された時間で回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。核様体は水色で、GFPは緑、mCherryはマゼンタで示している。スケールバーは2.0 μm 。

A



B

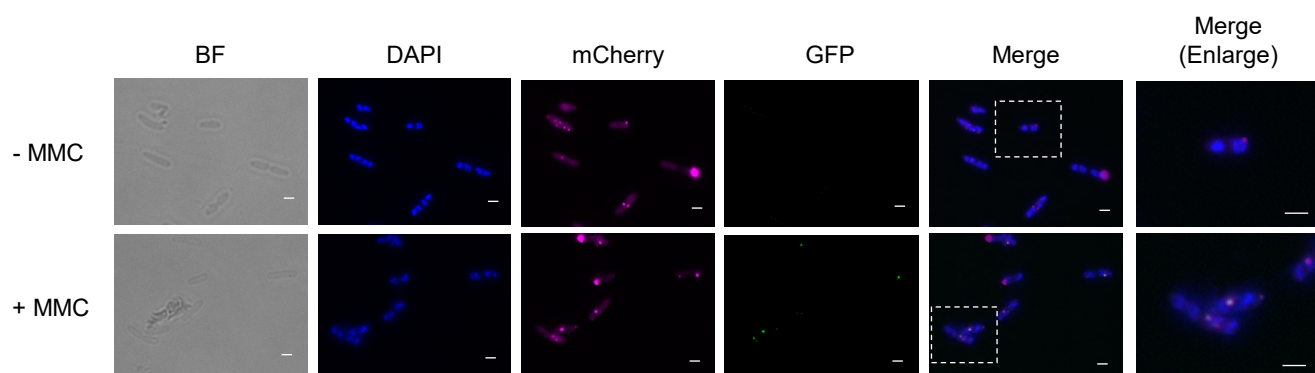
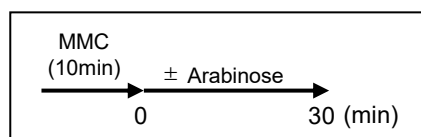


図18

- (A) RecA-mCherry発現プラスミドとGFP-RecN発現プラスミドを導入した $\Delta recA \Delta recN$ 株のMMC感受性テスト。段階希釈した菌液をMMC(終濃度: 0.5 $\mu\text{g/ml}$)を含むLB L Cm寒天培地にスポットし、37°Cで一晩培養した。
- (B) RecAとRecNが核様体上で共局在する様子を撮影した画像。pSOS-GFP-RecNとpRecA-mCherryで形質転換した $\Delta recA \Delta recN$ 細胞をLB_Amp + Cm液体培地で対数増殖期になるまで培養した後、MMC(終濃度: 1.0 $\mu\text{g/ml}$)を加えて10分間培養した。その後、M9 bufferで細胞を洗浄し、さらに30分間培養した。この間、菌液の一部を指定された時間で回収し、DAPIで核様体を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。核様体は水色で、GFPは緑、mCherryはマゼンタで示している。スケールバーは2.0 μm 。

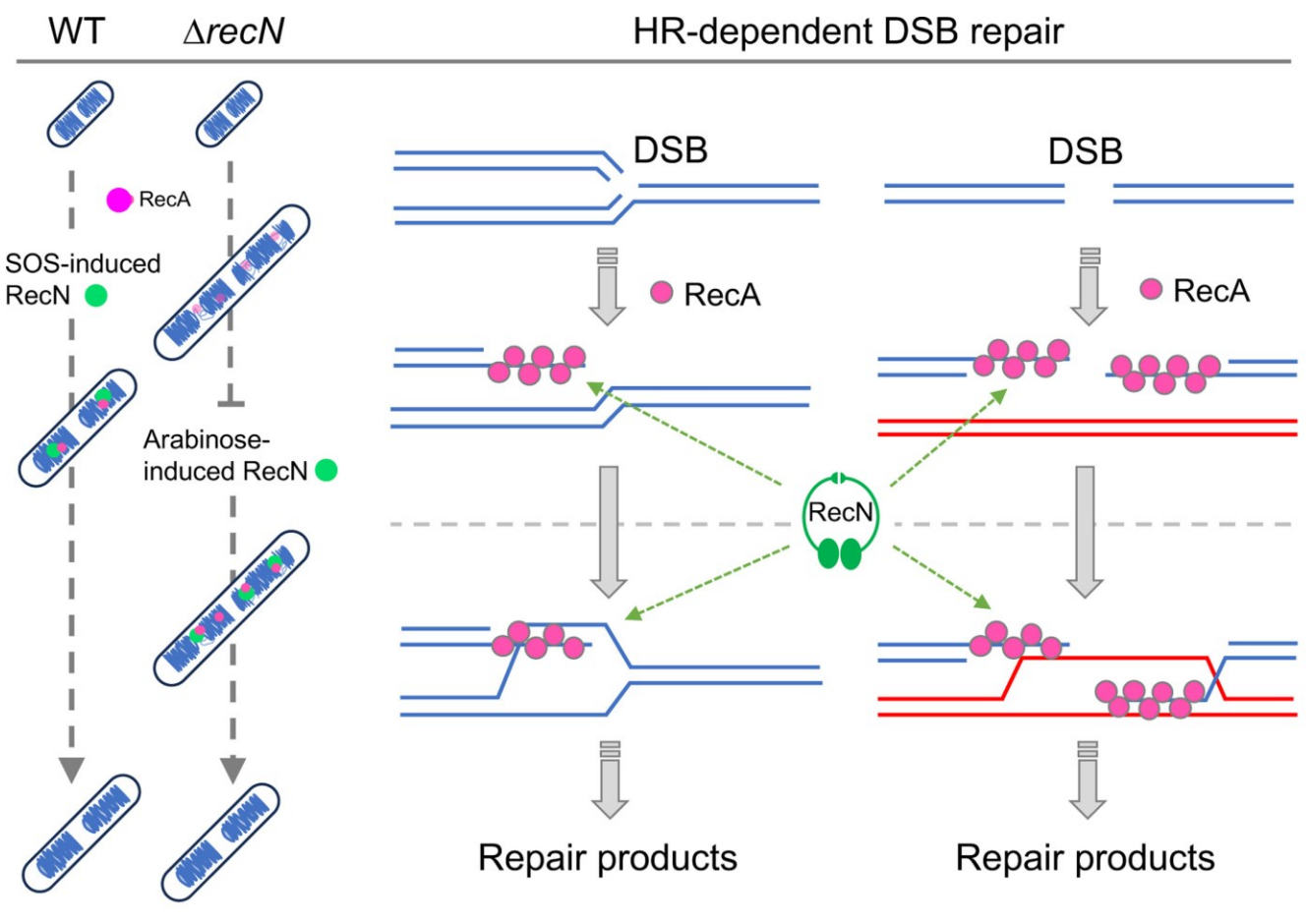


図19

RecA依存的な相同組換え修復におけるRecNの役割を示したモデル図。MMCが引き起こすDSBの様式として、末端が一つの場合と末端が二つ形成される場合が考えられる。末端が一つ形成されるケースはDNA複製時に生じる。*recN*欠損細胞においては、相同組換え修復がRecAフィラメント形成を行う段階で中断されており、これによってDSB部位周辺の核様体の高次構造が崩れ、核様体の断片化を引き起こす。この段階でRecNを発現誘導すると、相同組換え修復が再活性化され、核様体の再構築が起こる。

謝辞

本博士論文は、学習院大学大学院 自然科学研究科 生命科学専攻 分子生物学研究室において、行った研究をまとめたものです。本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導と多くの助言を頂きました菱田卓教授、赤沼元気助教並びに毛谷村賢司博士に深く感謝申し上げます。

タイムラプス撮影に用いた大腸菌株は九州大学の片山勉教授と尾崎省吾准教授に提供をしていただきました。深く感謝申し上げます。

最後になりましたが、6年間の研究室活動にあたり、たくさんの協力をして下さった分子生物学研究室のメンバー、スタッフの皆様にも心より感謝申し上げます。

ありがとうございました。