


# 論文内容要旨 (和文)

平成 12 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生要素科学講座

氏 名 氏家義史 

論文題目 大腸菌プラスミドの複製阻害による組換え活性化  
に関する分子遺伝学的研究

生物にとって染色体 DNA の複製が滞りなく進行することは、生物の生存を保障する上で重要なプロセスである。その進行の遅延や停止は、生物の生存の危機に直結しかねない。そのような危機を回避または乗り越える機構が生物にあることが分かっており、この機構が解明されつつある。

これまで複製の進行を人為的に阻害する目的で、複製阻害部位が利用されてきた。堀内ら(1994)は、大腸菌の複製阻害部位 (*Ter*) での複製阻害によって、*Ter* 部位で染色体の DNA 末端が露出し、その結果 *Ter* 近傍での組換えが活性化されることを報告した。その後 Bidnenko ら(2002)は、*Ter* 部位で複製が阻害された後、次に開始された複製が追い付くことで、線状染色体が出現 (DNA 末端が露出) することを実験的に示した。ところで真核生物の染色体や細菌のプラスミドでは、複製が一旦終了するまで、次の複製は開始されないとされている。そのような系で複製が阻害されたとき、次の複製開始により DNA 末端が露出しないため、*Ter* 部位での組換えの活性化は起こらないことが予測される。

そこで我々は、その活性化の有無を調べるために、*Ter* 依存的な組換え活性化を検出できるプラスミドを作製した。このプラスミドを大腸菌野生株へ導入したところ、22bp の *TerA* 配列 [*TerA*(22)] の挿入によって複製阻害されたプラスミドの組換え頻度は、複製阻害のないプラスミドに比べ組換えが 4.74 倍上昇していた。この活性化に必要な遺伝子を同定するため、様々な組換え遺伝子の変異株を用いて複製阻害したプラスミドの組換え頻度を調べたところ、野生株の背景に *recA*, *recFOR*, *recJ* を変異させた株では、その頻度が野生株に比べて約 1/4 に低下し、*recBC<sup>-</sup> sbcBC<sup>-</sup>* 株背景においては、それらの変異株では、1/10 に低下していた。このことから、それらの遺伝子産物が組換え活性化に必須であると結論した。

ところで瀧と堀内(1997, 1999)は *TerA*(22) を挿入したプラスミドを有する大腸菌では SOS が誘導されるのに対し、*TerA*(0.6k) を挿入したプラスミドでは、SOS 誘導能が消失することを見出している。SOS 誘導とは、DNA の傷害や複製阻害などにより、修復、組換え、細胞分裂阻害等に関わる一群の遺伝子の発現が誘導される現象である。そこで我々は *TerA*(0.6k) を挿入したプラスミドを作成し、そのプラスミドを大腸菌野生株に導入したところ、複製阻害による組換えの上昇は消失した。これらの結果は、*TerA*(22) で複製阻害した場合おそらく一本鎖 DNA や DNA 末端の露出が起こるが、*TerA*(0.6k) の場合 *TerA* 周辺の配列や構造によりそれらの露出が抑制されることを示唆している。以上のことから、大腸菌における複製阻害から組換え活性化に至る機構を検討した。

# 論文内容要旨 (英文)

平成 12 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生要素科学講座

氏 名 氏家義史 

論文題目 Molecular genetic study on recombination enhanced by blockage of replication at the *Ter* site on *E. coli* plasmids.


In order to elucidate effect of replication arrest, which is of frequent and spontaneous occurrence, replication blocking sites have been frequently used. In *E. coli*, when the bi-directional replication forks are blocked at the two flanking replication blocking (*Ter*) sites, a second round of replication forks then arrive at the *Ter* sites, producing giant linear DNA molecules, whose terminus ends recombine and overcome the blockage at the *Ter* site through an unknown mechanism. On the other hand, eukaryotic chromosomes, and probably bacterial plasmids also, do not initiate the second round of replication until the previous replication completes. When their replication is arrested at the blocking sites, it is not known whether recombination is enhanced or not. Here, we investigated whether recombination is stimulated when bacterial plasmid replication is inhibited by a 22 bp *TerA* sequence and, if the recombination is activated, what kinds of recombinational genes are required for the activation by using various *rec*-defective mutants as host. The results were (1) the recombination is enhanced 5 – 7 folds by the fork block, (2) the enhancement is dependent on *recA*, *recF*, *recO*, *recR* and *recJ*, but not *recBC* and *recQ*, and (3) the enhancement disappeared when the 22 bp *TerA* sequence was replaced by a 0.6 kb *E. coli* chromosome fragment containing *TerA* site. The last result indicates that, in plasmids, multiple rounds of replication are prohibited. The mechanism by which recombination is enhanced by replication blockage at the 22 bp *TerA* sequence, but not the 0.6 kb *E. coli* chromosome fragment containing the *TerA* site, is discussed.

# 学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成17年2月18日

理工学研究科長 殿

## 課程博士論文審査委員会

主 査	工藤 喜弘	
副 査	長谷川 典巳	
副 査	和泉 義信	
副 査	坪内 芳	
副 査		

学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

### 記

#### 1. 論文申請者

専攻名 地球共生圏科学専攻  
氏名 伊家 義史

#### 2. 論文題目 (英文の場合は、その和訳を併記すること。)

大腸菌プラスミドの複製阻害による組換え  
活性に關する分子遺伝学的研究

#### 3. 学位論文公聴会

開催日 平成17年2月14日  
場 所 理学部 13番教室

#### 4. 審査年月日

論文審査 平成17年1月25日 ~ 平成17年2月14日  
最終試験 平成17年2月14日 ~ 平成17年2月14日

#### 5. 学位論文の審査及び最終試験の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

(1) 学位論文審査 合格  
(2) 最終試験 合格

#### 6. 学位論文の審査結果の要旨 (1,200字程度)

別紙のとおり

#### 7. 最終試験の結果の要旨

別紙のとおり

## 別紙

専攻名	地球共生圏科学専攻	氏名	氏家義史
学位論文の審査結果の要旨			
<p>細胞増殖には、その前提としてゲノムの倍加が必要である。しかし、ゲノムの倍加（複製）の過程において、様々な原因により阻害が起こることが知られている。その阻害を生物は回避したり、原因を取り除いたりするが、その機構はまだ充分理解されていない。その解明の方法の一つに、複製阻害点の利用がある。複製阻害点は、多くの生物のゲノム上にあり、それを用いると任意の場所で、複製を阻害できる利点を有する。最も良く解析されている大腸菌の阻害点（Ter）は、ゲノム上に複数個あり、特異的な約22塩基からなる。そこに複製阻害タンパク（Tus）が特異的に結合することで、複製の進行を阻害する。これまでの解析から、複製がTerで阻害されることにより、Ter近傍の組換えが活性化されることが判明している。この組換え反応はその複製阻害を乗り越えるために働くと推定されている。原核生物では複製ラウンドが複数起こり、最初の複製の終了を待たないで、次のラウンドの複製が開始される。したがって、最初の複製がTerで阻害されると、その部位で次のラウンドの複製が追いつく。すると複製DNAの先端部分が線状で飛び出し、その露出した末端が組換えの引き金になることが明らかにされた。本研究では、複数ラウンドの複製が起こらない真核生物やプラスミドにおいて、複製阻害による組換えの活性化がどうなるかを、プラスミドを用いて調べた。</p> <p>複製がTerで阻害されることにより、活性化される組換えアッセイ用のプラスミドを構築した。具体的には、テトラサイクリン抵抗性遺伝子を2つに分断し、分断場所の一部に共通配列を有する構造のテトラサイクリン遺伝子（テトラサイクリン感受性）を有するプラスミドに、22塩基のTer配列を挿入した。このプラスミドは、複製阻害によって組み換えが活性化されると、元の活性有るテトラサイクリン遺伝子が再生され、宿主菌はテトラサイクリン抵抗性となる。このプラスミドを用いて組換えアッセイを行った結果、（1）プラスミドにおける複製阻害により、確かに5～7倍の組換えが活性化されることを見出した。次にこの活性化に必要な組み換え遺伝子を調べたところ、（2）これまでプラスミド特異的な組み換えに必要なとされてきた、recA、recF、recO、recR、recJを、この場合も必要とすること、一方、プラスミド組み換えに必要ないとされてきたrecBCやrecQは、この場合も必要とされなかった。この結果は、通常のプラスミド組換えの原因が、自然に起こる複製阻害にあることを示唆している。次に（3）プラスミド上の22塩基のTer配列の代わりに、大腸菌ゲノム上にあるTer配列を含む600塩基の断片を、同じ場所に挿入したプラスミドを構築し、それを用いて組換えを測定したところ、組換えの活性化が消失した。これら2種類のプラスミドでは、複製阻害は同程度起こること、また後者のプラスミドの場合、組み換えの活性化が消失した原因が、Terと組み換え領域間の距離が長くなったことではないことを確かめる一連の実験を行い、Ter配列を囲む周辺の配列に、組換えを抑制する活性があるという結論に達した。これらの成果は、複製ラウンドの複製を行う細菌を用いて行われた従来の研究では解明しにくい、複数ラウンドの複製を行わない生物における複製阻害時に起こる生物反応の機構に示唆を与える新しい重要な知見である。</p> <p>氏家君の当初の興味は真核生物のプロテオーム解析であったが根源を追及し続けた結果現在の成果に到達した。成果の一部は英文論文として公表され、その後の成果は投稿準備中である。</p> <p>これらの研究成果は、学術的に大きな価値があり、本論文を博士（理学）論文として合格と判定する。</p>			

### 最終試験の結果の要旨

まず、申請者により博士課程で行った実験の背景、実験の目的と実験方法、その結果と考察が述べられ、質疑応答がなされた。実験に関する質問に対しては適切に答えていた。ただ背景となる基本的な事柄に対する質疑応答では、初めは質問者、委員の両方に若干のとまどいがあったが、最終的には実質的な議論に高まった。発表に加えたほうが望ましい幾つかの項目に関して委員からの助言があり、それへの対応から申請者の将来性を予見できた。総合的に見て、広い視野のもとに、新しい系を用いて幾つもの重要な知見を得、それらはこの分野の進展に寄与していることが明らかであり、博士（理学）に値する業績と判断して合格とする。