

氏 名 大 住 克 史

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第275号

学位授与の日付 平成9年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 大腸菌RNaseH欠損株における組み換えホットスポットの1つHotH
の解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 鈴木 義昭
教 授 飯田 滋
教 授 野田 昌晴
教 授 堀内 嵩
教 授 饗場 弘二（名古屋大学）

論文内容の要旨

大腸菌の野性株における染色体の複製は、DnaAタンパク質に依存して*oriC*からのみ開始される。従って、*oriC*またはDnaAのどちらか一方でも欠損した株は、生育出来ない。しかし、DNA-RNA雑種分子のRNA分子のみを選択的に分解する酵素として同定されたRNaseHを欠損した株 (*rnh⁻*株) は、*oriC*部位やDnaAタンパク質欠損の条件下でも正常に生育できるという興味深い表現型を示す。これは、大腸菌染色体上に複数個存在しているRNaseHに特異的な複製開始点の活性化が原因だと考えられている。これまでに、*rnh⁻*株で高い相同組み換え活性 (Hot活性という) を有する染色体由来のDNA断片が8種類 (HotA-H) 同定されており、それらの活性化機構の解析が進められてきた。本研究では、そのうちの一つであるHotHの解析を行った。HotHは他のHotDNAが全て複製終結領域に位置しているのに対し、一つだけ染色体上約91分に存在している。

塩基配列の解析から、rRNA遺伝子 (*rrnD*オペロン) の3'末端領域を含み、その約650塩基下流に、組み換えのホットスポット配列であるChi配列を一つ有していることが判明した。Chi配列はRecBCD酵素に作用し、この酵素の持つヌクレアーゼ活性を抑制することでその近傍の組み換え頻度を上昇させる機能を有している。そこで、Chi配列に変異を導入し、HotHのホットスポット活性を調べたところ、その活性は10%以下に減少していた。このこととChi活性の極性から考えて、Chiの位置より*rrnD*オペロン側の部位で、RecBCD酵素が侵入するための二本鎖DNA末端が露出すると推測された。そこで二本鎖末端の露出、おそらくDNAに二本鎖切断が生じるような事象の発生の有無を見るため、ゲノム上のHotH部分での複製フォークの進行状況を二次元寒天ゲル電気泳動法を用いて調べた。*oriC*から開始される正常な複製フォークの方向は*rrnD*オペロンの転写とは同方向である。しかし*rnh⁻*株においては、正常なフォークとは逆方向のフォークがHotH部分を通過し、しかもその進行が*rrnD*オペロンの転写部分で阻害されることが明らかになった。さらに*rrnD*のプロモーター部分を欠失すると、転写活性の低下と共にフォークの阻害活性とHotH活性が同時に減少した。以上のことから、*rnh⁻*株特異的に活性化される新たな複製開始点からスタートするフォークと*rrnD*オペロンの転写との衝突が、フォークの進行阻害を引き起こし、それがおそらくDNAの二本鎖切断につながり、最終的にHotH領域の組み換えを著しく活性化すると結論した。

審査結果の要旨

大住君は、大腸菌の rnh^- 株で高い相同組み換え活性を有するDNA断片8種類(HotA-H)のうち、HotHについての解析を行った。塩基配列の解析から、 $rrnD$ オペロンの3'末端領域を含み、その約650bp下流に組み換えホットスポット配列であるChi配列を検出した。このChi配列に変異を導入すると、HotHホットスポット活性は10%以下に減少した。Chiの位置より $rrnD$ オペロン側の部位で、RecBCDが侵入するための二本鎖DNA末端が露出すると推測している。そこで、HotH部分での複製フォークの進行状況を二次元電気泳動法で調べ、 rnh^- 株においては、正常とは逆方向のフォークがHotH部分を通過し、しかもその進行が $rrnD$ オペロンの転写部分で阻害されることを明らかにした。以上のことから、 rnh^- 株特異的に活性化されるフォークと、 $rrnD$ オペロン転写との衝突がフォークの進行阻害を生じ、それが二本鎖切断につながり、HotH領域の組み換えを活性化すると推論している。

以上の結果は、学位を授与するに適するものであると判定した。

また、提出された論文の内容についての発表の後、実験成果について、ならびにその背景となるべき学術的知識について、口頭により試問し、適切なる解答を得た。

提出された論文中の記述およびスライド中の記述から、英語の学力についても適正であると判断した。