

氏 名 瀧 景 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第336号

学位授与の日付 平成10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 複製フォークの進行阻害により誘導されるSOS応答の研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 飯 田 滋
教 授 堀 内 嵩
教 授 野 田 昌 晴
教 授 山 森 哲 雄

論文内容の要旨

生物の基本の一つは、一つの細胞が二つになることであろう。原始細胞一個からこれまで、営々として分裂が繰り返され、現在の生物界が形成された。分裂の一つの基本は遺伝情報の倍加とその分配によって、同一の遺伝情報を娘細胞に伝達することであり、もう一方の基本は、細胞が分裂することである。これらの2つのプロセスは本来は別個のものであろう。というのは、染色体の倍加が起こっても、細胞の方が分裂しない場合もあるし、また逆に核のない細胞も作り出すことが出来るからである。しかし正常の条件下では、この独立したプロセスは協調的に進むことが知られていて、共役（カップリング）と呼ばれ、細胞周期の調節の中に組み込まれている。その中でも、複製が種々の原因で順調に進まなくなった場合、それを感知し、細胞分裂の起こるのを一時停止する系の存在は、細菌から人まで普遍的に存在し、真核生物ではG2/Mブロック、原核生物ではSOS応答と呼ばれている興味ある機構である。その中でも大腸菌を用いたSOS応答の系は詳細に調べられており、DNAの傷害や複製の進行阻害によっていかに、細胞分裂の阻害が共役して起こるかについては、一点を残してほとんど解かれてしまっていると言って過言ではない。SOS応答の引き金は、DNAの傷害や複製の進行阻害によって引き起こされるRecAタンパク質の活性化にある。このステップが未解決の問題として最後に残されたままである。真核生物、特に酵母でも同様の解析が進んでいるが、同じくこのステップは不明のままである。それには理由がある。例えばDNAに傷害を与える場合、傷害はランダムな場所に起こる。同様に複製の進行阻害においても、阻害剤や複製の温度感受性変異株を利用してきたが、阻害部位はやはりランダムであった。ランダムな場所での傷害やフォーク阻害は、その解析、特にDNA側にある構造のSOS誘導開始反応に対する影響を解析するには、ほとんど絶望的な困難を伴う。

大腸菌は特異的な22bの配列からなる複製終結点(Ter)を持つ。その配列を認識結合するTusタンパク質との複合体は、複製フォークの進行を終結させる。この系は、特異的部位でのフォーク阻害を可能にした。実際、これまで大腸菌の染色体上に合成した終結点を新たに導入し、常時複製フォークの阻害が起こっている株を作成したところ、予想どおりこの株では常時SOS応答が誘導されていることが認められた。この事実から、この系を用いることのより均一な部位でのフォーク阻害が実現され、SOS誘導の初期反応の解析が可能となると思われた。しかし、この系には次の不利な点が二つあった。一つはフォーク阻害部位が特定できると言ってもゲノムが巨大なため、分子レベルの解析に困難が伴うこと。もう一つは、この株に*recA*、*lexA*等の変異を導入すると致死性を示すことである。後者の性質はSOS誘導とそれに関わる遺伝子の機能を調べるためには不利に働く。

これらの不利な点を克服し、かつより単純な系を作ったのがこの研究の目的のひとつである。つまり、上述の系をプラスミド上で再現することである。pUC系のベクタープラスミド上に合成した終結配列を挿入し、一方向のプラスミドの複製フォークを阻害するプラスミドを作成した。さらに、終結点結合タンパク質の構造遺伝子を別のプラスミドのアラビノースプロモーターの下流に挿入し、アラビノースの有無で、終結タンパクの生産をオンオフ出来るプラスミドを作成し、これら2つのプラスミドを共存させることで、フォーク阻害をオンオフ出来る系を作成した。この2種のプラスミドを、SOS誘導が β -ガラクトシダーゼ活性で測定できる大腸菌に導入した。この株をグルコース培地で培養後、アラビノ

ース培地に移し、Tusタンパク質を誘導すると、確かにSOS応答が誘導されることが判明した。この誘導されたSOS応答は、終結点と終結タンパクに依存すること、またSOS誘導の特徴として知られていたRecAとLexAタンパク質への依存も確認できた。

この系を用いて調べたところ、SOS誘導能は、プラスミドの複製起点から複製方向に向かう終結点までの距離におよそ比例することが判明した。さらに、これとは別に終結点付近の配列も、SOS誘導能に強く影響を及ぼす示唆を得た。以上のことから、この系の有用性が明らかとなり、これを用いることでSOS誘導の初期反応への解析が可能になったものと思われる。

論文の審査結果の要旨

瀧景子さんは、大腸菌のSOS誘導の初期反応に関する研究を、複製終結点を挿入したプラスミドを用いて行った。生物は、紫外線や種々のDNAに傷害を与える物質等にさらされると、一時細胞分裂を停止し、生じた傷害を修復する能力を新たに誘導する一連の応答を起こすが、この機構は真核原核生物を問わず広く存在し、それぞれ G2/Mブロック或いはSOS応答と呼ばれている。特に、大腸菌を用いたSOS応答の解析は最も良くなされ、その分子機構は詳細に判明しており、刺激に応答する遺伝子発現制御の一つの代表例ともなっている。しかし、このSOS応答の一連の反応の中でも未解決の部分がある。それは、最も初期に起こる反応、即ち傷害なり複製フォークの進行阻害なりが起こり、それが引き金となって RecAタンパク質を活性化するステップの機構が不明のままである。それには理由があり、傷害やフォークの進行阻害がランダムに起こることがその解析を困難にしてきた。

本論文は、(1) その初期ステップの機構を解明するため、特異的な部位で複製フォークの進行を阻害する大腸菌の複製終結点をプラスミドに挿入することで、均一な場所でのフォーク阻害によってSOS誘導される系を確立した。その系を用いてSOS誘導の初期に必要な条件を求めた結果、(2) SOS誘導には複製開始点から終結点までの距離が約2.5kb以上である必要があり、それ以上の長さにおいては、SOS誘導能と長さとが比例することを見出した。(3) この系では、終結点に特異的な22塩基の配列を挿入したものを使用しているが、その代わりに大腸菌の終結点を含む0.6kb領域を挿入した場合、開始点-終結点の距離が充分長くても、SOS誘導が起こらないことを見出した。このことは、フォーク阻害点領域の構造がSOS誘導に影響を与えることを示唆している。

新しい考えに基づくSOS誘導系の確立とそれを用いて得た新しい知見は、この分野に新しい手法を導入し、これまで得られなかったオリジナルな結果を得ており、今後のこの系の有用性を示していると思われ、評価できる。以上のことから、本論文は博士(理学)の学位に相応しいものと判断した。

また、学位論文として提出された研究結果について口頭発表させた後、4名の審査委員が論文内容について諮問した。さらに、申請者の関連分野の一般知識及びその背景となる基礎的知識についても応答諮問により審査した。これらの諮問に対する申請者の応答は適切であった。英語に関する能力は、本論文は邦文で書かれているが、投稿論文や投稿準備中の論文等から博士の学位に足る十分な能力を有するものと判定した。