

論文内容の要旨

申請者氏名 Lai Pey Jiun

ヒトなどの高等真核生物のゲノム中には、長い逆向き反復配列 (LIR) が高い頻度で存在しているが、大腸菌のゲノム中には 40 bp を超えるような LIR は存在しない。しかしながら、*sbcC* 遺伝子の変異株では、ヒトゲノムに由来するものも含めて、LIR をプラスミドや染色体中に安定に保持することができる。SbcC タンパク質は SbcD タンパク質とヘテロ二量体を形成して、ヘアピン DNA を切断する活性を持つことから、LIR は大腸菌細胞内でヘアピン構造を高頻度に形成し、それを SbcCD が破壊することで大腸菌ゲノム中から LIR を排除していると考えられている。最近の研究より、LIR は大腸菌、出芽酵母、およびヒト細胞内で DNA 複製フォークの進行を阻害することが明らかになった。これらのことから、LIR は複製フォークが通過した直後に、まだ一本鎖状態のラギング鎖上でヘアピンを形成し、それが複製フォークの進行を阻害するという仮説が提唱されている。しかし、細胞内での LIR の複製についての詳細な解析は困難であるために、具体的な証拠は得られておらず、LIR の遺伝的不安定性の分子機構は明らかにされていない。本研究では、*oriC* プラスミド DNA を鋳型にした試験管内 DNA 複製系を用いて、鋳型 DNA に挿入した LIR が複製フォークの進行にどのような影響を与えるのか、また、複製に依存してラギング鎖上にヘアピン構造が形成されるのかどうかを明らかにすることを目的とした。

まず、111 bp の配列が 24 bp のスペーサーを挟んで逆向きに配置された LIR を *oriC* プラスミドに導入し、*sbcC* 変異株中で増幅することにより、鋳型 DNA (pIR246) を調製した。LIR の片方の繰り返し配列を全く異なる配列に置き換えたコントロール用のプラスミド (pCNS) も同様に調製した。プラスミドの精製法を検討し、pIR246 DNA 標品は十字構造を検出限界以下にしか含んでいないことを確認した。次に、標準的な反応条件および短鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) や DNA ジャイレースの濃度を変化させる条件などでの DNA 合成産物を解析したところ、以下の結果を得た。

- 1) pIR246 を鋳型にした場合も大部分の複製フォークは複製終結点まで進む。
- 2) ラギング鎖においては、LIR による DNA 鎖伸長阻害は観察されない。これは SSB の濃度を低下させても同じであった。
- 3) リーディング鎖合成は一時的に LIR の最初および内部で大幅に速度が低下する。この DNA 鎖伸長速度の低下は DNA ジャイレースの濃度が高い時に顕著であった。
- 4) ラギング鎖上の LIR の内部ではプライマー形成部位が顕著に変化する。

以上の観察結果から、LIR は複製フォークが到達する前にリーディング鎖とラギング鎖の両方でヘアピン構造を形成していることが強く示唆された。複製フォークの進行は、LIR で生じた十字構造により一時的に停滞するが、リーディング鎖は DNA Pol III の strand displacement により、ラギング鎖は DnaB ヘリカーゼにより、十字構造が解消されて、複製フォークの進行が回復することも示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Lai Pey Jiun

原核生物、真核生物を問わず、ゲノム DNA 中には各種の繰り返し配列が存在する。繰り返し配列の中には、通常の B 型 DNA とは異なる DNA 構造を生み出すものがあり、それらが発がんや遺伝病に関連する遺伝的脆弱部位に頻繁に見出されることから、ゲノム中の繰り返し配列が遺伝的不安定性の重要な原因の一つと考えられてきた。繰り返し配列間での相同組換えによる染色体再編については詳細な研究が進められているが、発がんや遺伝病の原因としては、相同組換えが関与しないタイプの繰り返し配列に依存する遺伝的不安定性の方が重要であると考えられている。本論文では、ヒトゲノムの *Alu* 配列のような比較的長い繰り返し配列が逆向きに配位した反復配列 (LIR) の遺伝的不安定性について、DNA 複製に及ぼす影響の観点から研究を行っている。

LIR が DNA 複製に及ぼす影響については、これまで遺伝学的な解析しかなされておらず、有力な仮説として広く知られている「複製フォークが LIR を通過した後でラギング鎖上にヘアピンが形成され、その影響により複製フォークの進行が阻害される」という機構は生化学的な証拠に乏しいだけでなく、矛盾点が多い。本論文では、LIR が DNA 複製にどのような影響を及ぼすかについて、試験管内 DNA 複製系を用いて直接的な解析を行い、世界で初めて LIR での複製フォークのダイナミクスの詳細を明らかにしている。申請者は、様々な生化学的解析法を駆使した実験により、LIR は DNA 複製に依存してラギング鎖だけではなく、リーディング鎖にもヘアピン構造を形成することを明確に示した。さらに、両鎖でのヘアピン形成は複製フォークが LIR に到達する前に生じるため、LIR は複製に依存して十字構造に変換されることも明らかにしている。LIR が十字構造に変換されるためには負の超らせん構造の存在が必要であるが、複製反応に加えて DNA ジャイレースが重要な役割を果たすことを示唆するデータも得ている。これらのことから、従来の定説とは全く異なる仕組みにより LIR が DNA 複製に大きな影響を与えることを明らかにし、新たなモデルとして、複製フォークの進行により蓄積する正の超らせん構造を DNA ジャイレースが解消する際に十字構造が形成される可能性を提唱している。なお、これらの成果は、申請者が筆頭著者である論文 (A long inverted repeat transiently stalls DNA replication by forming hairpin structures on both leading- and lagging-strands. 2015 年 *Genes to Cells* 印刷中) にて報告されている。

以上のように、本論文は長い逆向き反復配列の遺伝的不安定性について、生化学的解析を詳細に行うことで、遺伝的不安定性の仕組みを分子レベルで明らかにし、今後の繰り返し配列の研究に大きな影響を与えるモデルを提唱したものであり、学術上、さらには応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。