

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成27年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 基盤研究(C)（一般） 4. 補助事業期間 平成25年度～平成28年度

5. 課題番号

2	5	4	4	0	0	0	9
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 DNA損傷応答によりDNA複製フォークの進行をスローダウンする機構の解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
8 0 2 7 3 8 3 7	アキヤマ マサヒロ 秋山 昌広	バイオサイエンス研究科	准教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

平成27年度の研究では、複製フォーク進行をスローダウンする機構について、dinBが働く経路と、recAが働く経路をそれぞれ分子遺伝学的な手法で解析した。そして、それぞれの遺伝子にコードされた酵素のどのような活性が減速に働くかを明らかにした。

(1) dinB遺伝子によるスローダウン機構
 dinB遺伝子は、極めて遅い速度でDNA合成を行うDinBタンパク質（DNAポリメラーゼIV）をコードしている。本研究で構築したプラスミドを用いたdinB遺伝子の発現系を使用して、変異型のdinB遺伝子をSOS応答レベルにeCOMB細胞で過剰発現して、eCOMB法で複製フォークの進行速度を解析した。その結果、複製フォーク進行のスローダウンに、DinBタンパク質の遅いDNA合成活性は必要ないことが明らかとなった。一方、複製フォークと相互作用して複製装置のDNAポリメラーゼIIIとの入れ替わる活性は必要であった。この結果は、DinBがDNAポリメラーゼIIIを複製装置から離脱させることで複製フォークを減速していることを示している。

(2) recA遺伝子によるスローダウン機構
 recA遺伝子は、DNA相同組換えに働くRecAリコンビナーゼをコードしており、一本鎖DNA結合活性を持ち、一本鎖DNA上にRecAフィラメントを形成する。このフィラメント形成はATPの加水分解活性（ATPase）によって調節されている。RecAフィラメントはさらに二本鎖DNAと結合して、DNA相同組換え反応を触媒する。dinB遺伝子と同様に、プラスミドを用いた発現系を使用して、変異型のrecA遺伝子をSOS応答レベルにeCOMB細胞で過剰発現して、eCOMB法で複製フォークの進行速度を解析した。その結果、複製フォーク進行のスローダウンに、ATPase活性や二本鎖DNA結合活性は必要ないが、一本鎖DNA結合活性は重要であることが明らかとなった。このことは、RecAタンパク質が複製フォークに露出する一本鎖DNAを介して複製フォークの減速に働いている可能性を示している。

10. キーワード

- | | | | |
|-------------|---------------|--------------|--------------|
| (1) DNA複製 | (2) DNA複製フォーク | (3) 分子マシナリー | (4) レプリソーム |
| (5) DNA損傷応答 | (6) SOS応答 | (7) チェックポイント | (8) DNAコーミング |

11. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

平成27年度の研究では、dinBが複製フォーク進行のスローダウンに働く経路を分子遺伝学的手法で、recAが働く経路を分子遺伝学的手法および生化学的手法でそれぞれ解析することを計画した。以下の達成度から、平成27年度の研究は概ね順調に進展したと判断した。

(1) dinBが複製フォーク進行をスローダウンする機構：dinB遺伝子は、極めて遅い速度でDNA合成を行うDinBポリメラーゼ(DNAポリメラーゼIV)をコードしている。この酵素は、複製フォークで複製装置のDNAポリメラーゼIIIと入れ替わる活性を持ち、入れ替わった後に遅いDNA合成を行う。そこで、前年度に、DNA合成活性と、複製フォークへの局在活性に注目することを計画した。その計画通りに、これらの既知の活性をそれぞれ欠損した酵素をコードする変異dinB遺伝子を過剰発現した細胞を解析して、複製フォーク進行のスローダウンに働くDinBタンパク質の活性を特定できた。

(2) recAが複製フォーク進行をスローダウンする機構

(2-1) 分子遺伝学的手法：recA遺伝子は、RecAリコンビナーゼをコードしている。この酵素は、一本鎖DNA結合活性を持ち、一本鎖DNA上にRecAフィラメントを形成する。このフィラメント形成はATP加水分解活性によって調節されている。RecAフィラメントはさらに二本鎖DNAと結合して、DNA相同組換え反応を触媒する。そこで、これらの既知の酵素活性に注目するという前年度の計画通りに、それぞれの活性を欠損した酵素をコードする変異recA遺伝子を解析して、複製フォーク進行のスローダウンに働くRecAタンパク質の活性を特定できた。

(2-2) 生化学的手法：試験管内で再構成した複製フォークにRecAタンパク質を加えて、DNA合成を調べることによって、RecAが作用している複製タンパク質を特定することを計画した。しかし、RecAタンパク質が試験管内の複製反応を非特異的に阻害するために、複製フォーク速度への影響を評価できなかった。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

DNA損傷応答による複製フォーク進行の遅延はDNA複製を時間的に遅らせて、その間にDNAの傷を修復することでゲノム安定性の維持に寄与している可能性が高い。しかし、複製フォークの進行が減速すると、ゲノムが遺伝的に不安定になることも知られている。一方、dinBとRecA遺伝子の本来の機能はゲノム安定性の維持である。これまでの本研究で、DinBは複製酵素のDNAポリメラーゼIIIを複製装置から離脱させることで複製フォークを減速すること、RecAタンパク質は複製フォークに露出する一本鎖DNAを介して複製フォークの減速に働いていることを示した。この複製フォークの減速に、DinBのDNA合成活性やRecAの相同組換え活性は必要でなかった。これらの活性を持たないDinBとRecAは複製フォークを減速できるが、DinBとRecAの本来の機能であるゲノム安定性の維持に働くことができない。そこで、野生型のDinBあるいはRecAタンパク質の過剰生産によって複製フォークの速度が減少したときに遺伝的な不安定性を生じるかを突然変異の頻度を指標に解析する。そして、ゲノム安定性の維持に働けない変異型の酵素によって複製フォーク進行が遅速したときの突然変異と比較する。さらに、野生型あるいは変異型の酵素を過剰発現している細胞のゲノムDNAに損傷を与えて突然変異頻度を比較する。これらの研究から、DinBあるいはRecAタンパク質による複製フォーク進行の減速の生理的な意義、および、ゲノム安定性の維持との関係について検討する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

当初の実験計画に沿って、平成27年度に「複製フォークへのRecAタンパク質の効果を試験管内で解析する実験系」の構築を試みたが、当初予想できなかったRecAタンパク質の複製反応系への影響が明らかとなり、目的の実験系の構築に成功しなかった。そのため、研究を当初の想定通りに展開できなかったことによって、計上した経費の一部を平成27年度中に使用できなかった。そこで、実験計画を変更して、DinBあるいはRecAタンパク質による複製フォーク進行の減速の生理的な意義について平成28年度に遺伝学的手法で検討する。そのために、試験管内での解析に使用予定であった平成27年度予算の一部を繰り越して平成28年度に使用する。

(使用計画)

DNA損傷応答していない野生型の細胞でdinBあるいはrecA遺伝子をSOS応答時のレベルに過剰発現すると、複製フォークの速度が減少する。このときにゲノムに遺伝的な不安定性を生じるかを解析する。遺伝的な不安定性は、抗生物質リファンピシンあるいはストレプトマイシンに耐性となる突然変異の発生頻度によって調べる。次に、ゲノム安定性の維持に働けない変異型のdinBあるいはrecA遺伝子の過剰発現で複製フォーク進行が遅速したとき、同様に突然変異を解析して、野生型遺伝子の場合の突然変異と比較する。さらに、野生型あるいは変異型のこれらの遺伝子を過剰発現している細胞のゲノムDNAに損傷を与えて突然変異頻度を同様に解析する。DNAの損傷は紫外線や過酸化水素によって導入する。DNAへの損傷の導入は、これらの遺伝子の過剰発現だけで突然変異頻度に変化を検出できないときのバックアップ計画としても位置づける。

(課題番号： 25440009)

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(0)件/うち査読付論文 計(0)件/うち国際共著 計(0)件/うちオープンアクセス 計(0)件

著者名		論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
オープンアクセス						

(学会発表) 計(5)件/うち招待講演 計(0)件/うち国際学会 計(0)件

発表者名		発表標題	
Tan Kang Wei, Pham Minh Tuan, 古郡麻子, 真木寿治, 秋山昌広		recAまたはdinB遺伝子の過剰発現による複製フォーク速度の低下	
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会・第87回大会	2015年09月25日	東北大学(宮城県仙台市)	

発表者名		発表標題	
Tan Kang Wei, Pham Minh Tuan, 古郡麻子, 真木寿治, 秋山昌広		大腸菌のrecAまたはdinB遺伝子の過剰発現による複製フォーク進行の遅延	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第38回・日本分子生物学会年会	2015年12月01日	神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)	

発表者名	発表標題	
布瀬翔平、Tom Conrad、安藤さやか、豊本奈美江、中村葵、秋山昌広、真木壽治	大腸菌の栄養環境が酸化DNA損傷と活性酸素種に与える影響	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本遺伝学会・第87回大会	2015年09月26日	東北大学(宮城県仙台市)

発表者名	発表標題	
Tan Kang Wei、Pam Minh Tuan、古郡麻子、真木壽治、秋山昌広	DNA損傷応答による複製マシナリーの進行速度の低下	
学会等名	発表年月日	発表場所
第12回21世紀大腸菌研究会	2015年06月04日	琵琶湖グランドホテル(滋賀県大津市)

発表者名	発表標題	
古郡麻子、池田美央、秋山昌広、片山勉、Robert P. Fuchs、真木壽治	大腸菌損傷乗り越え型DNA Polymerase IVの複製フォークにおける役割	
学会等名	発表年月日	発表場所
第12回21世紀大腸菌研究会	2015年06月04日	琵琶湖グランドホテル(滋賀県大津市)

(図書) 計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

(課題番号: 25440009)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(4/5)

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: -

17. 備考

原核生物分子遺伝学研究室 http://bsw3.naist.jp/maki/
