

様式 Z - 7

平成26年度科学研究費助成事業 実績報告書（研究実績報告書）

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(B) 4. 研究期間 平成25年度～平成27年度
5. 課題番号

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 5 | 2 | 9 | 1 | 0 | 7 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
6. 研究課題名 DNA複製および転写に伴うDNAトポロジー変化に起因する染色体再編誘発機構

7. 研究代表者

| 研究者番号 | 研究代表者名 | 所属部局名 | 職名 |
|-----------------|--------|-------------|----|
| 2 0 1 9 9 6 4 9 | マキ ヒサジ | バイオサイエンス研究科 | 教授 |
| | 真木 寿治 | | |

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

染色体再編に重要な役割を果たすと考えられているDNAの二本鎖切断が細胞内で生じるプロセスを理解することを目的として、DNA上の逆向き反復配列に依存した十字型DNA構造の形成とそれが引き起こす二本鎖切断と遺伝的不安定性の解析を進めており、以下の成果を得た。

1) 逆向き反復配列に依存した染色体異常を特異的に検出する実験系の構築：遺伝子改変が容易に行えるようにrpsL変異検出系を改変し、rpsL遺伝子配列の後半部を含む逆向き反復配列をrpsL遺伝子配列の下流に導入して、逆向き反復配列に依存した染色体異常を特異的に検出・解析する実験系を開発することにした。実験系に用いる大腸菌株の作成がほぼ完成したので、SbcCDとDNAトポイソメラーゼの効果解析の準備をすすめている。

2) SbcCDタンパク質の生化学的解析：精製したSbcCDと十字構造やヘアピン構造を含む各種DNA基質を用いて、詳細な酵素学的解析を行った。その結果、SbcCDは二本鎖DNAの長さに依存してヘアピンを含むDNA末端でのヌクレアーゼ反応のモードを変えることが明らかになった。

3) 逆向き反復配列IR-246に依存した十字構造の発生機構を解析するin vitro実験系の構築：タグ付きのTusタンパク質とタグにアフィニティを持つ磁気ビーズを用いて、複製装置が結合した状態での複製中間体をインタクトな状態で分離する技術を開発した。さらに、in vitro oriC系での反応をDNAジャイレースを加えずに進めた際に生じる複製フォークの進行が停止した複製中間体の定量解析を行い、この条件で複製中間体が安定して存在することを確認した。さらに、タグ付きのTusタンパク質を用いた分離法により、DNAジャイレース非存在下で生じる複製中間体を分離する実験を行い、この実験系が十分に解析に用いることができることを示した。

10. キーワード

- (1) 染色体再編・維持 (2) 遺伝的不安定性 (3) 繰り返し配列 (4) _____
 (5) _____ (6) _____ (7) _____ (8) _____

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(1/6)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

in vivoでの解析については、DNAジャイレース阻害剤を用いた実験が思うような結果を生み出さなかったが、新たな変異検出系を開発して、逆向き反復配列に依存する染色体異常の発生を定量的に解析できるようになったので、成果が期待できると判断している。in vitroでの解析では、SbcCDの生化学的解析で新たな知見が得られ、現在、論文投稿中である。複製中間体の実験系もほぼ完成したので、今後の解析結果が期待される。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今後も遺伝学的解析と並行しながら、生化学的解析を進めて行く計画である。両方共に新しい実験系が完成しつつあり、順調に研究計画が進展している。このことから、ほぼ計画通りに研究を進めていく予定である。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

遺伝学的解析において、変異頻度の解析や塩基配列決定にかなりの額の研究費を予定していたが、26年度は実験系の開発が主であったために、次年度以降に計画が繰り越されることになったため。

(使用計画)

変異頻度の解析や塩基配列決定に必要な試薬の購入、および生化学的解析に似強うな物品費として使用する。

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件 うち査読付論文 計(2)件

| 著者名 | | 論文標題 | | | |
|--|-------|---|------|-----------|--|
| Ikeda M, Furukohri A, Philippin G, Loechler E, Akiyama MT, Katayama T, Fuchs RP, Maki H. | | DNA polymerase IV mediates efficient and quick recovery at N2-dG adducts. | | | |
| 雑誌名 | 査読の有無 | 巻 | 発行年 | 最初と最後の頁 | |
| Nucleic Acids Research | 有 | 42 | 2014 | 8461-8472 | |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) | | | | | |
| 10.1093/nar/gku547 | | | | | |

| 著者名 | | 論文標題 | | | |
|--|-------|---|------|-----------|--|
| Tan K.W., Pham M.T., Furukohri A, Maki H. and Akiyama T.M. | | Recombinase and translesion DNA polymerase decrease the speed of replication fork progression during the DNA damage response in Escherichia coli cells. | | | |
| 雑誌名 | 査読の有無 | 巻 | 発行年 | 最初と最後の頁 | |
| Nucleic Acids Research | 有 | 43 | 2015 | 1715-1725 | |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) | | | | | |
| 10.1093/nar/gkv044 | | | | | |

(学会発表) 計(8)件 うち招待講演 計(1)件

| 発表者名 | | 発表標題 | |
|---|---------------------------|--|--|
| Hang, L.P., Furukohri, A., Masuda, Y., Maki, S., Katayama, T., Fuchs R.P., and Maki, H. | | A short CCG run in the Huntingtin gene is an obstacle for replicative DNA polymerases, potentially hampering fork progression. | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 | |
| DNA polymerases: Biology, Diseases and Biomedical Application Conference 2014 | 2014年08月31日 ~ 2014年09月04日 | Robinson college, Cambridge (England) | |

| 発表者名 | 発表標題 | |
|---|--|---------------------------------------|
| Furukohri, A., Ikead, M., Akiyama, M., Katayama, T., Fuchs R.P., and Maki, H. | Escherichia coli DNA polymerase IV mediates quick recovery of repliation forks stalled at N2-dG adducts. | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 |
| DNA polymerases: Biology, Diseases and Biomedical Appliatuon Conference 2014 | 2014年08月31日 ~ 2014年09月04日 | Robinson college, Cambridge (England) |

| 発表者名 | 発表標題 | |
|--|---|---------------------------------------|
| Pham, T.M., Tan, K.W., Sakumura, Y., Okumura,K., Furukohri, A., Maki, H.,and Akiyama, T.M. | A single molecule approach to DNA replication in Escherichia coli cells demonstrated that DNA polymerae III is a major determinant of fork speed. | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 |
| DNA polymerases: Biology, Diseases and Biomedical Appliatuon Conference 2014 | 2014年08月31日 ~ 2014年09月04日 | Robinson college, Cambridge (England) |

| 発表者名 | 発表標題 | |
|---|--|-------------------|
| Furukohri, A., Ikead, M., Akiyama, M., Katayama, T., Fuchs R.P., and Maki, H. | Escherichia coli DNA polymerase IV mediates quick recovery of repliation forks stalled at N2-dG adducts. | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 |
| The 9th 3R International Symposium | 2014年11月11日 ~ 2014年11月21日 | 御殿場高原ホテル・静岡県・御殿場市 |

| 発表者名 | 発表標題 | |
|--|---|-------------------|
| Pham, T.M., Tan, K.W., Sakumura, Y., Okumura,K., Furukohri, A., Maki, H.,and Akiyama, T.M. | A single molecule approach to DNA replication in Escherichia coli cells demonstrated that DNA polymerae III is a major determinant of fork speed. | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 |
| The 9th 3R International Symposium | 2014年11月11日 ~ 2014年11月21日 | 御殿場高原ホテル・静岡県・御殿場市 |

| 発表者名 | 発表標題 | |
|---|--|-----------------|
| 古郡麻子、池田美央、西川義人、秋山昌広、片山 勉、Robert P. Fuchs、真木寿治 | 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 |
| 日本遺伝学会 第86回大会 | 2014年09月17日～2014年09月19日 | 長浜バイオ大学・滋賀県・長浜市 |

| 発表者名 | 発表標題 | |
|--|-------------------------|-----------------|
| Tang Kang Wei, Pham Minh Tuan, 古郡麻子、奥村克純、真木寿治、秋山昌広 | 大腸菌のSOS応答による複製フォーク速度の減速 | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 |
| 日本遺伝学会 第86回大会 | 2014年09月17日～2014年09月19日 | 長浜バイオ大学・滋賀県・長浜市 |

| 発表者名 | 発表標題 | |
|--|----------------------------|------------------|
| Tang Kang Wei, Pham Minh Tuan, 古郡麻子、奥村克純、真木寿治、秋山昌広 | 大腸菌のSOS応答による複製フォークの進行速度の低下 | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 |
| 第37回 日本分子生物学会年会(招待講演) | 2014年11月25日～2014年11月27日 | パシフィコ横浜・神奈川県・横浜市 |

〔図書〕計(0)件

| 著者名 | 出版社 | |
|-----|-----|-------|
| | | |
| 書名 | 発行年 | 総ページ数 |
| | | |

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.備考

| |
|--|
| |
|--|