

様 式 F - 7 - 1

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 26 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) 4. 補助事業期間 平成 25 年度～平成 27 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

1. 複製フォークの進行が細胞の平均DNA合成量へ与える影響： 平成25年度の研究で、複製装置の変異細胞では複製フォークの速度が減少しても、複製開始のタイミングを調節して、細胞体積あたりの平均DNA合成量が野生型と同等であることを見出した。一方、SOS応答を発現している細胞ではrecAとdinB遺伝子の発現により、複製フォークの速度が減少する。この細胞のDNA合成を詳細に解析したところ、平均DNA合成量は野生型にくらべて減少していた。これは、SOS応答では複製開始タイミングを調節する機構が働かず、DNA複製が遅くなることでDNA損傷によるストレスに対処している可能性を示している。 2. recAによる複製フォーク進行のスローダウン機構： これまでに、LexAリプレッサーの欠損株（ΔlexA）によってSOS応答を誘導した細胞で、recAとdinB遺伝子の発現上昇によって複製フォークの速度が減少することを明らかにした。recA441変異を持つ細胞は42度で培養すると、一本鎖DNAへのRecA結合が促進されて、RecAタンパク質がDNA損傷ストレスなしで活性化されてSOS応答を誘導する。この変異をeCOMB細胞に導入して（recA441株）42度で培養して、DNAコーミングを用いたeCOMB法で複製フォークの進行を調べたところ、その速度はΔlexA株と同等に低下していた。さらに、RecAの活性化によって切断されないlexA51変異をrecA441株に導入すると、複製フォークの速度は野生株並みに回復した。これらの結果から、recAの活性化は複製フォークの速度低下に直接必要ないことがと明らかとなった。 3. これらのΔlexAおよびrecA441株の解析結果をまとめて、国際科学雑誌に論文を発表した。 4. さらに、dinB遺伝子によりコードされる酵素の活性を解析して、国際科学雑誌に論文を発表した。

10. キーワード

- | | | | |
|-------------|---------------|--------------|--------------|
| (1) DNA複製 | (2) DNA複製フォーク | (3) 複製装置 | (4) 分子マシナリー |
| (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. 現在までの達成度

(区分) (2) おおむね順調に進展している。

(理由)

平成26年度の研究では、recA、および、dinBが複製フォーク進行をフローダウンする機構を遺伝学的または生化学的な手法で解明することを目指した。

(1) recA441変異をeCOMBに導入して、eCOMB法で複製フォークの進行速度を解析した。そして、一本鎖DNAに結合する活性について、複製フォーク進行の調節との関係を始めて明らかにできた。生化学的なアプローチについては、試験管内で再構成した複製フォークの実験系にRecAタンパク質を加えるために、RecAタンパク質を準備できた。

(2) dinBについては、プラスミドを用いたdinB遺伝子の発現系を使用して、変異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することを計画した。平成26年度では、多様な変異型のDNAポリメラーゼIVを過剰発現できるプラスミドを準備できた。

(3) recAとdinBにより複製フォーク速度の低下した細胞では、DNA合成が低下していた。これにより、SOS応答では、複製フォークの進行を制御してDNA複製を遅延していることを明らかにした。

変異型のrecA遺伝子を用いた細胞の複製フォーク速度の解析は順調に進展した。試験管内でのRecAタンパク質による複製フォーク阻害の解析、および、変異型のDNAポリメラーゼIVをコードする遺伝子を用いた細胞の複製フォーク速度の解析は準備まで進んだ段階であり、やや計画よりも遅れている。これは、計画自体に不都合を生じたためではなく、これまでの成果を論文に発表するために、当初計画していなかった実験（SOS応答時のDNA合成量の測定実験など）に取り組んだためである。これらの点から、本研究は概ね順調に進展していると自己評価した。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

1 . recAが複製フォーク進行をフローダウンする機構：

(1) 試験管内で再構成した複製フォークの実験系にRecAタンパク質を加えて、複製フォークでのDNA合成を調べる。まず、野生型のRecAを再構成系に加えて、DNA合成量を調べる。阻害がみられた場合、RecAが作用している複製タンパク質を特定する。

(2) 変異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する。変異遺伝子では、RecAの生理活性に重要なATPaseなどの酵素活性の欠損に注目する。

2 . dinBが複製フォーク進行をフローダウンする機構：

変異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する。DNAポリメラーゼ活性の欠損や、複製フォークへの局在活性の低下した酵素をコードする変異dinB遺伝子に注目する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

実験計画が一部予定通りに進行しなかったため、その解析に予定していた経費を平成27年度の研究に使用する。

(使用計画)

平成27年度に繰り越した経費は、平成26年度に完了しなかった実験計画を平成27年度に遂行するために物品費（消耗品の購入）に充てられる。

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			
Mio Ikeda, Asako Furukohri, Gaelle Philippin, Edward Loechler, Masahiro Tatsumi Akiyama, Tsutomu Katayama, Robert P. Fuchs, and Hisaji Maki		DNA polymerase IV mediates efficient and quick recovery of replication forks stalled 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			
Kang Wei Tan, Tuan Minh Pham, Asako Furukohri, Hisaji Maki and Masahiro Tatsumi Akiyama		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	1714-1725
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(7)件 うち招待講演 計(0)件

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		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)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Tang Kang Wei, Pham Minh Tuan, 古郡麻子、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	
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	
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 polymerase 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	
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 polymerase 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 Application Conference 2014	2014年08月31日～2014年09月04日	Robinson collage (Cambridge, England)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Furukohri, A., Ikeya, M., Akiyama, M., Katayama, T., Fuchs R.P., and Maki, H.	Escherichia coli DNA polymerase IV mediates quick recovery of replication 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 Application Conference 2014	2014年08月31日～2014年09月04日	Robinson collage (Cambridge, England)

(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

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