

論文内容の要旨

申請者氏名 Lim Chew Theng

真核生物のゲノム中に頻繁に見いだされる長い逆向き反復配列 (LIR) は、遺伝的に不安定であり、発がんの原因の一つと考えられている。LIR は DNA の二次構造としてのヘアピン構造や十字構造を形成できることから、これらの構造変化が遺伝的不安定性をもたらすと考えられている。大腸菌においては、ゲノム中に LIR は存在せず、外部から導入した DNA に含まれる LIR は速やかに排除される。この仕組みには SbcC と SbcD から構成される SbcC₂D₂ (SbcCD) 複合体が関与することが知られている。SbcC は SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) ファミリーに属するタンパク質で、2つの長いコイルドコイルドメインが折れ曲がった V 字型構造を持ち、末端に ATPase ドメインを持つ。SbcD はフォスフォエステラーゼ活性を持つ。これまでの研究から、SbcCD は DNA 分解活性を持つことが知られており、特にヘアピン構造のステム-ループ接合部の 5'側にニックを入れ、そこから 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性により、一部の DNA を分解されると報告されている。

申請者は SbcCD が LIR によって生じる長い十字構造にもヘアピン構造と同様に作用する可能性を考え、精製した SbcCD を用いて生化学的解析を行った。まず、246 bp の LIR を持つ pIR246 プラスミド DNA を塩存在下で加熱・冷却して十字構造を形成させ、生化学的解析の基質を作成した。これを用いて、SbcCD による DNA 分解を調べた結果、予想外のことが判明した。短いヘアピン DNA を用いた場合と異なり、長い十字構造 DNA では、ステム-ループ接合部から少し離れた部位から、ステムの両鎖が同時に切断され、ループ側から十字構造の根元へ向けて 10 bp の間隔で連続的に二本鎖切断が生じていることが分かった。この反応は Mn イオンと ATP に依存していることも示された。これまでに全く報告されていない新たな DNA 分解活性であることから、この活性を **binary exo-endonuclease activity** と命名し、短いヘアピン構造での活性の違いをもたらす要因の解明を中心に、詳細な生化学的解析を行い、以下の結果を得た。1) この活性には、十字構造を構成するループ構造を必要としない。2) この活性は十字構造に依存せず、ループを含めた DNA 末端を持つ二本鎖 DNA に作用する。3) この活性は 40 bp 以上の二本鎖 DNA で見られるが、それ以下の長さでは 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性のみが観察される。これらの結果から、SbcCD の **binary exo-endonuclease activity** は、ループ構造を含む末端を持つ DNA の長さが一定以上必要であると結論した。SMC ファミリータンパク質である SbcCD の構造生物学的解析結果が他グループにより発表されており、その結果を考慮して SbcCD が持つ **binary exo-endonuclease activity** の分子機構に関するモデルを提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Lim Chew Theng

本論文は、大腸菌ゲノム DNA から長い逆向き反復配列を排除する働きを持ち、DNA 組換えや染色体不安定性に関与すると考えられてきた SbcCD タンパク質の詳細な生化学的解析を行ったものであり、従来報告されていたヘアピン構造を持つ DNA の分解活性とは全く異なる様式や性格を持つ新規の DNA 分解活性を発見している。当初の研究目的は長い逆向き反復配列により生じる十字構造 DNA に対しての SbcCD の作用を解明することにあつたが、予想外の結果として、ATP 依存的に二本鎖 DNA の両鎖を同時に切断する活性を見いだしている。この活性は基質 DNA 上でプロセッサに働き、10 bp の間隔で二本鎖切断を行うため、基質 DNA は 10 bp のきわめて小さな DNA 断片として分解される。制限酵素とは異なり、塩基配列に依存しない。このような酵素活性を示す DNA 分解酵素はこれまで報告されていないことから、この活性を binary exo-endonuclease activity と名付けている。過去に報告されている 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性などと同じ活性中心が使われていることを部位特異的変異導入法を用いて証明している。どのような因子が binary exo-endonuclease 活性に必要であるのかを詳細に検討しており、末端を持つ二本鎖 DNA であることと、その長さが 40 bp 以上であることを明らかにしている。40 bp 以下の DNA では 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が働くことも示している。最後に、最近報告された SbcCD のタンパク質構造を参考にして、SbcCD の binary exo-endonuclease 活性の分子モデルを提唱している。

SbcCD は広く生物界に保存されており、ヒトでは Rad50-Mre11 として二本鎖 DNA 切断の修復や DNA 損傷応答のシグナル伝達に関与することが知られている。また、ヒトの神経変性や発がんを引き起こす重篤な遺伝病の原因遺伝子でもあることから、Rad50-Mre11 タンパク質の作用機序の解明は細胞生物学および医学上の重要な課題となっている。しかしながら、真核生物の Rad50-Mre11 タンパク質の精製が困難な点などから、その生化学的な解析はあまり進んでいない。本論文で発見された SbcCD の新規酵素活性やその研究方法は真核生物の Rad50-Mre11 タンパク質の研究に大いに役立つものと思われる。

以上のように、本論文は大腸菌の SbcCD の新規酵素活性を発見したものであり、どのようにして SbcCD が大腸菌ゲノム上から長い逆向き反復配列を排除するのかを生化学的に説明できる分子メカニズムを提唱したものと言える。DNA 構造のダイナミクスや配列依存的な遺伝的不安定性の理解などの学術上、さらにはヒトの重篤な遺伝病の解明などの応用上の点で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。