

## 論文内容の要旨

申請者氏名     Tan Kang Wei

DNA 複製は、多数のタンパク質が染色体上に集合してできた複製装置（レプリソーム）により行われる。レプリソームは、複製フォークの先頭において、二本鎖 DNA を連続的に解裂しながら、両鎖を鋳型とした DNA 合成を触媒して DNA 複製を進めていく。細胞内の酸素ラジカルや反応性の高い代謝中間物、および細胞外からの紫外線や放射線により、DNA は恒常的に損傷を受けている。このような DNA 損傷の大部分は複製フォークの進行を妨げ、遺伝情報の正確な伝達ができなくなるだけでなく、細胞分裂そのものが阻害されることになる。そのため、細胞には DNA 損傷の影響を最小限に抑える細胞機能が備わっており、その中でも DNA 損傷の程度に応じて各種の細胞機能を制御する DNA 損傷応答が中心的な役割を果たしている。DNA 損傷応答は DNA 損傷を除去したり、DNA 複製阻害を回避したりする各種の DNA 修復機構の制御に加えて、DNA 修復を効率よく進めるための細胞周期制御も含んでいる。原核生物の DNA 損傷応答である SOS 応答については、細胞分裂の阻害が広く知られているが、真核生物の S 期チェックポイントに相当する DNA 複製の抑制については全く報告がなかった。

当研究室の Pham は、DNA コーミング法を用いた大腸菌細胞内での DNA 複製フォークの進行速度測定技術を開発し、それを用いて世界で初めて大腸菌の複製フォーク速度が約 650ntd/sec であることを示した。さらに、SOS 応答が恒常的に発現している  $\Delta$ lexA 変異株ではフォーク速度が 45% も低下していることを見だし、このフォーク速度の低下には *recA* 遺伝子と *dinB* 遺伝子が関与することを明らかにした。このことにより、原核生物にも S 期チェックポイントと同様な仕組みが存在する可能性が浮かんできたが、SOS 応答が恒常的に誘導されている特殊な細胞での現象である可能性も否定できない状況であった。

本研究においては、まず、SOS 応答が誘導される状況でもフォーク速度が低下することを遺伝学的な手法により明らかにし、原核生物の S 期チェックポイントの存在を確定させた。さらに、*recA* 遺伝子と *dinB* 遺伝子のそれぞれを SOS 応答レベルで発現させた時のフォーク速度を測定することにより、RecA タンパク質と DinB タンパク質がそれぞれ単独でフォーク速度を低下させる能力を持つことを示した。また、フォーク速度低下にはこの二つのタンパク質以外には SOS 応答により誘導されるタンパク質は必要ないことも示した。さらに、ATPase 活性欠損 *recA* 変異株の解析から、RecA タンパク質のフォーク速度低下の効果は DNA 上で形成される RecA フィラメントの安定性が重要であることを示唆する結果を得た。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Tan Kang Wei

本論文は、原核生物の DNA 損傷応答である SOS 応答について、DNA コーミング法を利用した細胞内複製フォーク速度の測定データにより、これまで知られていなかった DNA 複製フォークの進行を抑制する機能が存在することを明らかにしたものである。また、SOS 応答で発現誘導する遺伝子産物の中で、RecA タンパク質と DinB タンパク質がそれぞれ単独に複製フォークの進行速度を低下させる働きを持つことを見いだしている。さらに、RecA タンパク質がどのようにして複製フォークの進行速度を低下させるのかについても、*recA* 変異株を用いた分子遺伝学的解析を行い、分子モデルを提案している。

DNA 損傷応答は全ての生物に備わった重要な細胞機能であり、細胞分裂に伴って遺伝情報を娘細胞に正確に伝達・分配するために必須なものである。歴史的には、大腸菌の SOS 応答の発見からスタートしたが、出芽酵母やヒト培養細胞を材料にした研究から、真核生物では非常に複雑な複数の経路から構成されるものであることが明らかにされている。SOS 応答と同様に、DNA が損傷された細胞では DNA 修復能が活性化されることも重要であるが、真核生物の場合には、細胞周期制御を変化させることで DNA 修復のための時間を持たせたり、DNA 複製や転写の影響を最小限にして DNA 修復が円滑に進行することを可能にしている。そのため、真核生物の DNA 損傷応答は細胞周期チェックポイント制御と呼ばれている。すでに S 期が始まった細胞では、DNA 損傷応答により、新たな複製開始を抑制すると同時に複製フォークの進行速度を抑制することが知られており、S 期チェックポイントと呼ばれる。しかしながら、その分子機構はほとんど未解明である。一方で、原核生物には細胞周期チェックポイント制御は細胞分裂の隔壁形成を阻害する仕組み以外には存在しないと考えられてきた。本論文の研究により、原核生物では SOS 応答に依存して複製フォークの進行速度が大幅に抑制されることが示され、原核生物にも S 期チェックポイントと同様の仕組みが存在することが明らかとなった。さらに、RecA および DinB に相当するタンパク質が真核生物の S 期チェックポイントの分子機構に関与する可能性も提唱された。

以上のように、本論文は原核生物での S 期チェックポイントの存在を発見したものであり、S 期チェックポイントでの複製フォークの進行速度抑制の分子機構に組換えタンパク質 (RecA) と損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ (DinB) が関与することを明確に示したものである。DNA 損傷応答や細胞周期制御の理解などの学術上、さらには遺伝的不安定性や細胞死の観点から発がんの予防・治療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。