

論文内容の要旨

申請者氏名 樋口久美子

DNA 傷害による生存力の低下や変異の誘発には DNA 複製フォークの進行阻害が重要な役割を果たしていると考えられている。生物種を問わず、DNA 傷害による複製フォークの進行阻害は細胞機能によりモニターされ、その程度により DNA 修復能の誘導や細胞周期の一時的停止を含む DNA 損傷応答が発動したり、場合によっては細胞死の誘発が生じる。また、複製フォークの進行阻害が生じた細胞では、DNA 複製を回復するために組換え修復や損傷乗り越え DNA 複製の働きが高まり、その結果として複製阻害回復過程のエラーが生じ、ゲノムの再編や点突然変異が発生しやすくなると考えられている。しかしながら、実際に複製フォークが DNA 傷害に出会った時にどのようなことが生じるのかは良く分かっていない。本論文は、DNA 鎖伸長反応を阻害する DNA 損傷が複製フォークの進行にどのような影響をおよぼすかについて、大腸菌の複製開始領域 *oriC* を持つプラスミドを用いた試験管内 DNA 複製系での生化学的な解析を行ったものである。*oriC* プラスミド DNA を鋳型とする *in vitro* 複製系は、現在唯一の全て完全に精製された複製タンパク質から再構成された実験系である。申請者は、18 種の異なるタンパク質を調製し、この *in vitro* 系での複製反応の最適化を行っている。その結果、*oriC* から両方向に複製フォークが進行し、リーディング鎖とラギング鎖が同時共役して合成されることが示されている。次に、1つの複製フォークの動きに焦点をあてた解析を行うために、大腸菌の複製終結配列 *TerB* を *oriC* プラスミドに導入し、この配列に結合して複製フォークの進行をブロックする *Tus* タンパク質の存在下に複製反応を行った。その結果、準双方向複製 (semi-bidirectional DNA replication) の確立に成功した。この実験系を用いて、プラスミドの特定の部位に、リーディング鎖あるいはラギング鎖上に単一の脱塩基損傷を導入した鋳型プラスミド DNA を調製し、その上での複製フォークの挙動を解析している。その結果、ラギング鎖上の脱塩基損傷は一回の岡崎フラグメント合成だけを途中で停止させるが、複製フォークの進行には全く影響を与えず、最大でも岡崎フラグメントの長さ分のギャップをラギング鎖上に生み出すことが明らかになった。一方、リーディング鎖上の脱塩基損傷はリーディング鎖合成をほとんど完全にブロックし、複製フォークの進行を強く阻害することが示された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 樋口久美子

突然変異や染色体異常などに代表される DNA 損傷が細胞におよぼす影響は損傷自体が直接引き起こすものではなく、転写や DNA 複製の阻害を通じて細胞が様々な応答をする結果により生じることが明らかになっている。この DNA 損傷応答の中でも中心的な役割を果たすものとして、DNA 損傷により進行が阻害された DNA 複製フォークの回復過程の存在が明らかになり、その過程でのエラーが突然変異や染色体の再編につながると考えられている。本論文は、DNA 鎖伸長反応を阻害する DNA 損傷が複製フォークの進行にどのような影響をおよぼすかについて、大腸菌の複製開始領域 *oriC* を持つプラスミドを用いた試験管内 DNA 複製系での生化学的な解析を行ったものであり、以下の成果をあげている。

1) 大腸菌の複製集結領域配列 *TerB* とそれに特異的に結合して複製フォークの進行を方向特異的に阻害する Tus タンパク質を試験管内 *oriC* プラスミド DNA 複製系に適用することにより、鋳型プラスミド上の特定の方向の複製フォークの進行およびリーディング鎖とラギング鎖の DNA 鎖伸長反応を解析する実験系を確立した。

2) 上記の実験系を用いて、ラギング鎖上の DNA 損傷の影響を解析した結果、この場合には損傷周辺での岡崎フラグメントの合成は阻害されるがリーディング鎖合成や損傷の下流の領域のラギング鎖合成は影響を受けないことが判明した。

3) 一方、リーディング鎖上の損傷はリーディング鎖の伸長反応を強く阻害するだけでなく、複製フォークの進行にも大きな影響をおよぼすことが示された。しかし、損傷の下流の領域での岡崎フラグメント合成はある程度進行することも明らかになった。

以上のように、本論文は DNA 損傷による複製フォークの進行阻害に関して世界で初めて体系的な解析を行い、それらの構造的特徴を詳細に明らかにしたもので、学術上、応用上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。