

(別紙1)

論文内容の要旨

申請者氏名 Pham Minh Tuan

細胞分裂においてゲノム DNA は正確に娘細胞に伝達されなければならないが、そのために DNA 複製は最も重要な役割を果たしている。二本鎖 DNA の複製は多数のタンパク質から構成されるレプリソームが Y 字型の複製フォークで作用することにより行われる。DNA 複製の分子機構の解明に、大腸菌をモデル系とした研究が大きな役割を果たしてきた。最近になり、*in vitro* で再構成した大腸菌のレプリソームを用いて複製フォークの動的挙動を一分子解析の手法で解明する研究が可能となっている。しかし、*in vitro* 系で用いる DNA は均一で有り、ゲノム DNA に含まれる様々な繰り返し配列などの特異的な配列や DNA 損傷などを含まない。また、この系では DNA 複製以外の転写や修復、超らせん構造の制御などは含まれないので、実際の細胞内での複製フォークの動的挙動を必ずしも反映しない。そこで、Pham は生細胞内での複製フォークの動態を直接解析するための新しい *in vivo* 一分子解析技術を開発し、それを用いて複製フォークの進行速度を制御する機構の解明を目指した研究を開始した。

ヨウ素、塩素、臭素などで修飾したヌクレオシドアナログを大腸菌にパルスラベルの手法で取り込ませ、染色体 DNA を回収して DNA コーミング法によりラベル DNA をカバーガラス表面に伸長した状態で付着させ、蛍光標識抗体を用いてラベル DNA の長さを直接に顕微鏡で測定する方法で、一分子解析技術の確立に取り組んだ。そのために、ヌクレオシドアナログの取り込み効率を大幅に向上させた大腸菌 eCOMB 株を多重遺伝子ノックアウトの技術で作成した。さらに、様々な技術改良の試行錯誤により、大腸菌生細胞内での複製フォークの進行速度を一分子解析できる実験系の開発に成功した。この系を用いて、37°C で対数増殖期の野生型大腸菌での複製フォークのスピードを解析した結果、複製フォークの進行速度はかなり均一でおよそ 640 nt/s をピークとする混合正規分布を示すことが分かった。また、DNA ポリメラーゼ III の DNA 鎖伸長速度が低下した変異株を用いた解析から、複製フォークの進行速度は主として DNA ポリメラーゼ III の DNA 鎖伸長速度が規定していることを明らかにした。

真核生物では DNA が損傷を受けると細胞周期チェックポイントが作動して、DNA 複製中の細胞では複製フォークのスピードが抑制されることが知られている。しかし、その分子機構はほとんど解明されていない。Pham は大腸菌の DNA 損傷応答である SOS 応答に着目し、SOS 応答が構成的になっている *lexA* 欠損株での複製フォークの進行速度を測定した。その結果、SOS 応答構成株ではフォークの速度が野生株の半分にまで低下していることを発見した。さらに、進行速度低下には *recA* 遺伝子と *dinB* 遺伝子がそれぞれ独立に作用することを明らかにした。これらから、大腸菌にも S 期チェックポイントが存在することを明らかにし、それに関与する因子を同定することに成功した。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Pham Minh Tuan

DNA複製や転写、遺伝子組み換えなどのDNAの重要な機能は、多数のタンパク質因子から構成される超分子複合体マシナリーによる極めて複雑な反応プロセスが基盤となっている。近年、このような生体内マシナリーの反応機構を解明するために一分子解析の技術が開発され、大きな成果をあげている。DNA複製においても、大腸菌の再構成レプリソームを用いたDNA複製フォークでのレプリソームの動態解析が報告されている。申請者は、細胞内でのゲノムDNA複製における複製フォークの進行速度を厳密に計測できる技術を開発することにより、*in vivo*でのDNA複製マシナリーの一分子解析が可能となると考え、以下に示す新たな研究手法の開発ならびにそれを用いた重要な知見を得ている。

- 1) チミンの合成系に関わる遺伝子に加え、ハロゲン修飾ヌクレオシドを分解する反応に関与する遺伝子を欠損することにより、従来の *thyA* 欠損株に比較して17倍ものハロゲン修飾ウリジン取り込み効率を示す菌株を樹立した。
- 2) DNAコーミング法を大腸菌染色体DNAに適応することに成功し、ハロゲン修飾ウリジンでパルスラベルしたDNAの長さの測定により複製フォークの速度を定量する実験技術を確立した。
- 3) 1000分子を超える複製フォークの速度を統計的に解析し、フォーク速度の分布を世界で初めて示すことに成功した。また、平均速度を厳密に定量した。
- 4) *dnaE173* 変異株を用いた解析により、複製フォークの速度がDNAポリメラーゼIIIのDNA鎖伸長速度に大きく規定されることを示した。
- 5) 大腸菌のDNA損傷応答であるSOS応答が構成的に誘導されている細胞では、複製フォークの速度が通常約半分に低下していることを発見した。さらに、このフォーク速度の低下に *recA* と *dinB* 遺伝子が関与していることを明らかにした。

以上の結果から、細菌におけるDNA複製の細胞内動態を新たな視点で解析することが可能な新規研究技術を開発し、その技術が有用性の高いものであることを示した。また、未解明であった複製フォークの速い進行速度がどのようにして実現されているかについて明快な回答を示すことができた。さらに、S期チェックポイントが細菌にも存在することを世界に先駆けて発見した。これは、細菌のストレス抵抗性機構や細胞死誘発機構の解明につながる画期的な発見である。

以上のように、本論文はヌクレオシド取り込みの効率が飛躍的に高くなった大腸菌株とDNAコーミング法を用いて *in vivo*での複製フォークの動態を解析する新規の研究技術を確立し、それを用いて細菌でのS期チェックポイントの存在を明らかにしたものであり、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。