

論文の内容の要旨

論文題目 非相同的組換えの制御機構

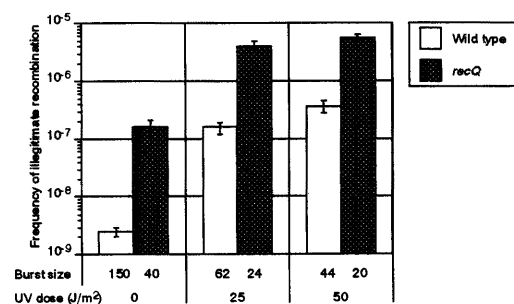
氏名 花田 克浩

非相同的組換えとは、DNA の配列に依存しない組換えや非常に短い相同性に依存して起こる組換えのことで、紫外線等の DNA ダメージによって誘導されることが知られている。非相同的組換えは原核生物から真核生物に至る多くの生物種で起きる現象であり、染色体異常の原因の 1 つである。染色体異常は癌や細胞死などを引き起こすことから、非相同的組換えはそれを精巧に制御する機構によって抑制されていると考えられている。しかしながら、その制御機構については、ほとんど明らかになっていない。そこで、解析が容易な大腸菌を用いてそのメカニズムを明らかにすることにした。

1. RecQ による非相同的組換えの抑制効果

RecQ は、3'→5'の方向に DNA を巻き戻すヘリカーゼという酵素で、相同組換えの RecF 経路で作用する酵素である。近年、ヒトの遺伝病で染色体異常を高頻度を起こすブルーム症候群、ウェルナー症候群、ロスムンド-トムソン症候群の原因遺伝子が同定され、*recQ* 遺伝子と相同性をもっていつことが明らかになった。RecQ が非相同的組換えを抑制するかどうかを検討するために、*recQ* 変異株を用いて非相同的組換えの頻度を測定した。その結果、*recQ* 変異株では紫外線照射の有無に関わらず、非相同的組換えの頻度が上昇していた (図 1)。このことから、RecQ は自然誘発、および、紫外線によって誘導される非相同的組換えを抑制する機能があることが明らかになった。

(a) AB1157 *attB::λ cl857*



(b) AB1157 *proB::λ cl857*

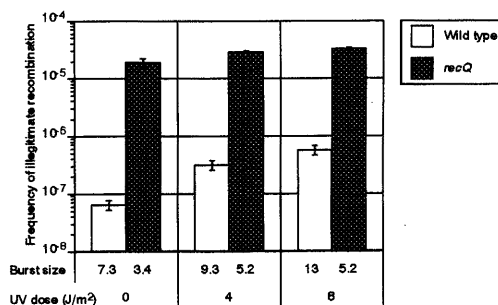


図 1. *recQ* 変異株における非相同的組換えの頻度.

非相同的組換えの頻度は、ラムダ・ファージが非相同的組換えを起こすことによって生じる特殊形質導入ファージの形成頻度を測定した。(a) ラムダ・ファージを染色体上の *attB* 部位に導入した株を用いて測定した非相同的組換えの頻度。(b) ラムダ・ファージを染色体上の *attP* 部位に導入した株を用いて測定した非相同的組換えの頻度.

2. UvrAB による非相同的組換えの抑制効果

非相同的組換えは紫外線照射によって誘導されることから、紫外線による DNA のダメージが非相同的組換えを誘導することが考えられる。UvrAB は、紫外線による DNA の傷を排除する除去修復に関与する因子である。除去修復と非相同的組換えとの関連性を検討するために、*uvrA* ~ *uvrD* 変異株を用いて非相同的組換えの解析を行った。その結果、*uvrA* および *uvrB* 変異株では野生株に比べて紫外線照射条件下での組換えの頻度が上昇していた (図 2 a, b)。一方、*uvrC* および *uvrD* 変異株では組換えの頻度の上昇が観察されなかった (図 2 a)。次に、UvrA と UvrB との関係を明らかにするために *uvrA uvrB* 二重変異株の解析を行ったところ、自然誘発条件下での組換え抑制機能に関して両者は相乗効果をもつことが明らかになった (図 2 c)。このことから、UvrA および UvrB は、除去修復とは独立に非相同的組換えを抑制する機能を持つことが示唆される。さらに、UvrA および UvrB と RecQ との関係を、*uvr recQ* 二重変異株を用いて検討した。その結果、*uvrA recQ* 二重変異株でのみ組換えの抑制機能に関して相乗効果をもつことが明らかになった (図 2 d)。これらの結果から、UvrA および UvrB は、RecQ と協調して非相同的組換えを抑制することが明らかになった。

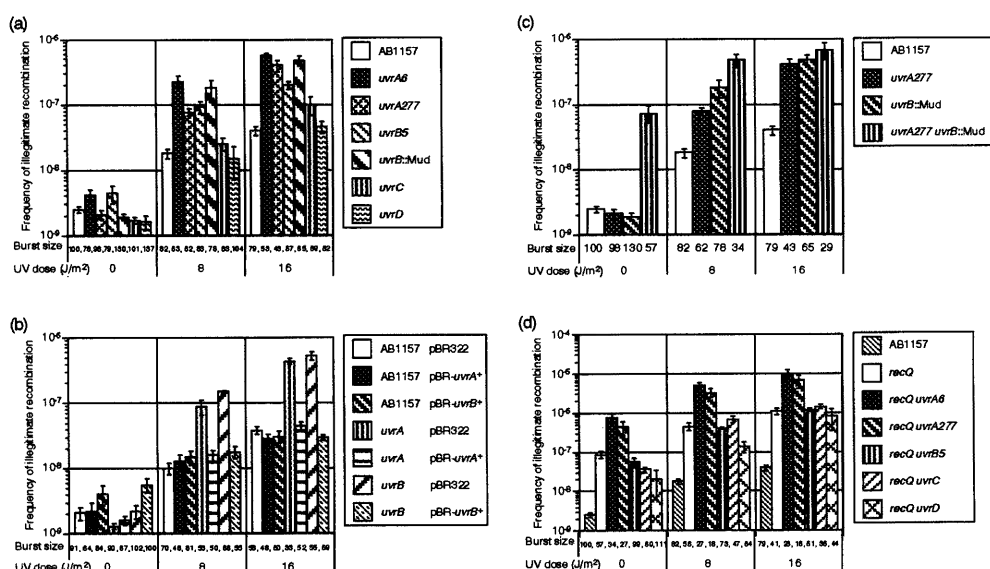


図 2. *uvr* 変異株における非相同的組換えの頻度.

(a) *uvr* 変異株における非相同的組換えの頻度. (b) 非相同的組換えにおける *uvrA* および *uvrB* 変異の相補正試験. (c) *uvrA uvrB* 二重変異株における非相同的組換えの頻度. (d) *uvr recQ* 二重変異株における非相同的組換えの頻度.

3. RecJ に依存する非相同的組換え経路に対する RecQ の役割

紫外線照射条件下の非相同的組換えは、RecJ 5'→3' 1 本鎖 DNA 特異的エキソヌクレアゼによって誘導される。RecJ と RecQ との関係を検討するために、*recQ recJ* 二重変異株を作成し非相同的組換えの頻度を測定した。その結果、紫外線照射条件下における *recQ recJ* 二重変異株の組換え頻度は *recQ* 変異株と比べて低下していた。このことから、RecQ は紫外線照射条件下で RecJ に依存する非相同的組換えを抑制することが明らかになった。しかしながら、自然誘発条件下での *recQ recJ* 二重変異株の組換え頻度は、*recQ* 変異株と同等であり、野生株や *recJ* 変異株に比べて上昇していた。このことは、自然誘発条件下では、RecJ に依存しない組換え経路が存在することを示唆しており、その経路は RecQ によって抑制されていることを示唆している。

4. RecJ に依存する非相同的組換え経路に対する UvrB の役割

UvrAB も RecJ に依存する非相同的組換えを抑制している可能性が考えられる。そこで、*uvrB recJ* 二重変異株を作成し非相同的組換えの解析を行った。その結果、*uvrB recJ* 二重変異株における組換え頻度は、*recJ* 変異株における組換え頻度よりも上昇していた。このことから、UvrB は、少なくとも紫外線照射条件下で RecJ に依存しない非相同的組換えを抑制することが示唆される。さらに、*recQ recJ uvrB* 三重変異株を用いてその効

果を検討したところ、紫外線照射条件下における *recQ recJ uvrB* 三重変異株の組換え頻度は、*recQ recJ* 二重変異株や *uvrB recJ* 二重変異株における頻度よりも上昇していた。

5. 非相同的組換えにおける RecJ と RecE の役割

RecE 5'→3' 2 本鎖 DNA 特異的エキソヌクレアーゼも非相同的組換えを促進することが知られている。そこで、RecE と、RecJ との関連性の検討を試みた。本研究で使用している菌株は *recE* 遺伝子を持たない系統であることから、RecE を発現するベクターを導入しその効果を解析した。まず、野生株で RecE を発現したところ、RecE の発現によって非相同的組換えの頻度が上昇した。次に、*recJ* 変異株で RecE を発現したところ、紫外線照射条件下では *recJ* 変異株と同等のレベルにまで組換え頻度が低下した。これらの実験から RecE は紫外線の有無に関わらず非相同的組換えを促進することと、紫外線照射条件下における RecE によって促進される組換えは RecJ と同一の経路であることが明らかになった。

本研究によって明らかになったこと

大腸菌では、非相同的組換えは非常に低い頻度の抑えられている。しかしながら、紫外線照射等の DNA ダメージによってその頻度は上昇する。これは、DNA ダメージにより DNA の二重鎖切断が増加するからだと考えられている。非相同的組換えは、切断された DNA が二重鎖切断修復の経路ではなく、末端同士で再結合されることによって引き起こされると考えられている。本研究で、RecQ は非相同的組換えを抑制することを明らかにした。RecQ は DNA ヘリカーゼであることから、切断された DNA 末端の会合を壊すことによって非相同的組換えを抑制していると考えられる。また、RecQ は、RecJ に依存する経路を抑制していることも明らかにした。同時に、自然誘発の組換えは RecJ に依存しないことを発見し、RecQ はこの経路も抑制することを発見した。さらに、UvrAB が RecQ と協調して非相同的組換えを抑制することも明らかにした。この効果は、UvrAB がもつ除去修復の機能とは独立のものであることも示した。興味深い点は、RecQ および UvrAB の双方共にヘリカーゼ活性を持つことである。このヘリカーゼ活性が非相同的組換えの抑制に貢献している可能性も考えられる。また、本研究によって RecE による組換えは RecJ の機能に依存することを示した。これらの実験から、非相同的組換えは 5'→3' エキソヌクレアーゼで促進されることから、その産物である 3'-突出型の 1 本鎖 DNA 末端が非相同的組換えを促進に関して重要な役割を持つことが明らかになった。さらに、1 本鎖 DNA 末端によって引き起こされる非相同的組換えは、RecQ や UvrAB ヘリカーゼによって阻害されるということも明らかにした。