

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

槌田 謙

挿入配列(IS; insertion sequence)は、DNA 上のある部位から他の部位へ転移することが可能な固有の DNA 塩基配列であり、いくつかのファミリーに分類されている。IS3 はその中でも最大のファミリーの代表格であり、両端に 39 塩基対の逆向き配列 IR を、内部に二つの orf (*orfA*, *orfB*) を有する。二つの orf が重なる領域での翻訳レベルのフレームシフトにより、転移を司る酵素トランスポゼース(Tnp)が産生される。フレームシフトが起こらない場合には OrfA タンパク質が生じるが、これは転移を抑制する働きをする。

Tnp は、IS3 の一方の IR の 3' 末端に切れ目を入れ、他方の IR の 5' 末端から 3 塩基離れた部位に繋ぎ換え、8 の字形分子の形成を促す。Tnp の結合部位 IR には二つのドメイン(端から A と B)が在るが、一方の IR の A ドメインと他方の IR の B ドメインは、A に接する IR の端から他端の 3 塩基対離れた部位への繋ぎ換えに必要である。この反応は 2 つのトランスポゼースと両 IR からなる複合体内で起こると考えられている。8 の字形分子からは IS3 がその両端で 3 塩基対を挟み込む形で環状化した分子が生じる。Tnp は環状 IS3 分子の 3 塩基対の部分(サークルジャンクション)を切断し、標的部位への挿入を促すと考えられている。

本論文は、IS3 が DNA 複製を伴わないで単純挿入体を形成するのみならず、DNA 複製を伴い IS3 を運ぶプラスミドと標的プラスミドとの融合体を形成する能力をも持つことを明らかにすると共に、単純挿入体・融合体の形成に関わる Tnp-IR 複合体の構造を解明したもので 4 章からなる。

第 1 章で研究の背景を述べた後、第 2 章では IS3 による融合体形成について述べている。まず、大腸菌に Tnp を過剰産生できる IS3 変異体 (IS3-1) を運ぶプラスミドと標的プラスミドを共存させた場合に、両プラスミドの融合体が生じることを示した後、DNA シークエンシングによって、融合体には 2 種類存在することを見出した。その一つは両プラスミドの境界に IS3-1 を 1 コピーずつ持つ完全な構造を持つものであり、もう一つは二つのプラスミドの一方の境界領域に完全長の IS3-1 が存在するが、他方には IS3-1 の一部と共に標的プラスミド配列の一部も欠失したものであった。欠失を持つ融合体は、恰も完全な融合体上の短い(4~9bp)相同配列間での非相同組換えにより生じたものであることを示した。また、これらの融合体は、Tnp の存在下で、ミニ IS3 (クロラムフェニコール耐性遺伝子を両 IR 間に持つ変異体) を運ぶプラスミドと標的プラスミド間でも生じることを示した。

一方、IS3 の内部をほぼ完全に除いた変異体が完全な構造の融合体のみを高頻度で形成することを見出した。そこで、IS3 内部の様々な領域を欠失した変異体 IS3 を用い、生じる融合体を解析することによって、欠失を持つ融合体の生成に IS3 内部の複数の配列が関与していることを明らかにした。

以上の結果から、IS3 の内部配列が融合体形成の中間体において IS3 DNA の複製を停止させ、その結果複製フォークが切断され、生じた DNA 末端が標的プラスミド上の他の短い相同領域と組み換えを起こした結果、IS3 の一方に欠失を持つ融合体が生ずるというモデルを提示した。このモデルにおいて、もし生じた DNA 末端が、切断されなかった方の IS3 配列と組み換えを起こし、IS3 を運ぶプラスミドの IS3 以外の配列が除外されれば、融合体ではなく単純挿入体が生じるという可能性も指摘されている。

第3章と4章では Tnp 及び OrfA タンパク質と IR との複合体の解析について述べている。まず、Tnp をマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として精製し、それが低濃度では比較的移動度の早い Tnp-IR DNA 複合体 (複合体 I) を形成するが、高濃度では移動度の遅い複合体 (複合体 II) を形成することをゲルシフト法により示した。一方、OrfA と MBP との融合タンパク質も精製し、それが高濃度でのみ1種の OrfA-IR DNA 複合体を形成することを示した。

さらに、DNase I フットプリント法によって、Tnp が IR 内の全域に結合していることを見出した。また、IR 内の A と B ドメインに変異を導入した DNA 断片を用いたゲルシフト法によって、B ドメイン内の特定の配列が複合体 I, II の形成に、A と B ドメインの境界に位置する部位が複合体 II の形成に重要であることを示した。これらと他の結果から、IS3 においては Tnp がまず片方の IR の B ドメインに結合した後、Tnp タンパク質の相互作用を介してもう片方の IR の A ドメインに結合し、その結果高次の Tnp-IR 複合体が形成されるというモデルを提示した。

以上本論文は、IS3 が複製を伴わずに単純挿入体を与える転移の他に、複製を伴い融合体を与える能力を持つことを示すと共に、IS3 の高次の Tnp-IR 複合体の構造と形成過程を明らかにしたもので、学術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 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。