

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 峰松 寛

---

挿入配列 (Insertion Sequence, IS) は原核生物のゲノムに存在する小型の転移性遺伝因子で、DNA 上のある部位から別の部位へと転移する能力を持つ。これらはいくつかのファミリーに分類されるが、IS3 は最大規模のファミリーの代表である。IS3 は、全長 1258 bp で両端に組換えに必須の 39 bp の不完全な逆向き配列 (Inverted Repeat; IR) を持つ。IS3 は、内部に転移を司る酵素、トランスポゼース、をコードする。IS3 はトランスポゼースの作用により、その両端に 3 bp の介在配列を挟み込んだ形の環状 IS3 分子を生じ、それが直鎖化された後、標的 DNA に挿入すると考えられている。環状 IS3 分子は、IS3 を運ぶレプリコン上で IS3 の一方の IR の 3' 末端に切れ目が入り他方の IR の 5' 末端から 3 塩基離れた部位に繋ぎ換わり一本鎖のみ環状化した「8 の字形分子」を中間体として形成されると考えられている。8 の字形分子は左右どちらの 3' 末端からの組換えでも生じるため、2 種類存在すると考えられる。

トランスポゼースは、一般に転移性遺伝因子の両方の IR に結合した後にタンパク質同士の相互作用により両 IR が近接したようなタンパク質-DNA 複合体 (トランスポソーム) を形成し、転移反応を促すと考えられている。しかし、IS3 によるトランスポソームの構造と機能についての詳細は不明である。本研究は *in vitro* において IS3 の転移中間体形成の分子機構をトランスポソームの形成に焦点を当て解明したもので 5 章からなる。

第 1 章で研究の背景を述べた後、第 2 章ではトランスポゼースの精製について述べている。トランスポゼース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、大腸菌破碎液の可溶性画分からアフィニティー精製した。精製した MBP 融合トランスポゼースは、IS3 のそれぞれの末端の IR を含む DNA 断片に特異的に結合する活性と、環状 IS3 分子をサークルジャンクション部分で切断し、直鎖状 IS3 分子を生成する活性があることを示した。

第 3 章では 8 の字形分子の *in vitro* での形成について述べている。IS3 を運ぶプラスミドに精製したトランスポゼースを作用させて得た標品を制限酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動することによって、移動度の遅い特異的な分子が生じていること、また 8 の字形分子内のサークルジャンクション領域に特異的にハイブリダイズするプローブがこの分子にハイブリダイズすることから、生じた反応産物は 8 の字形分子であると推定した。さらに、反応産物内のサークルジャンクションを含む配列を、IS3 内部から外向きに伸長するプライマー対を用いた PCR で増幅し、生じた産物の塩基配列を解析することによって、増幅産物には左右両末端のどちらかから組換わって生じたと考えられる配列がほぼ半量ずつ含まれていることを示した。このことから 8 の字形分子が一本鎖での組換えによ

り形成されていることが確認された。

第4章では8の字形分子の形成におけるトランスポソームの関与について述べている。トランスポソームの形成に関与する IR 内部の色々な領域に変異を導入した IS3 を作成し、それを運ぶプラスミドを基質としてトランスポゼースを作用させることによって、IR 内には組換えに必要な機能的に異なる 2 つの領域（末端に近い領域 A とその内側の領域 B）が存在することを見出した。また、左の IR の末端からの組換えには左の IR の領域 A と右の IR の領域 B が必要であり、右の末端からの組換えには逆に右の A と左の B の領域が必要であることを示した。これらの結果から、2 分子の IS3 のトランスポゼースがそれぞれ一方の IR の領域 A と他の IR の領域 B に結合する形で安定したトランスポソームが形成されるというモデルを提示した。第5章では以上の結果を踏まえて総括している。

以上本論文は、IS3 による *in vitro* での組換え反応系を確立し、環状分子から直鎖状分子への変換反応、環状 IS3 分子の前駆体である8の字形分子の形成反応、を明らかにした。本研究で示されたトランスポゼースが両 IR の架け橋となりトランスポソームを形成し転移を促すという機構は、他の様々な転移過程を持つ広範な転移性遺伝因子にも共通することが示唆されるもので、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。