

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 浦崎 明宏

転移性遺伝因子は、非相同的 DNA 組換え反応により DNA 上のある部位から他の部位に挿入するのみならず、因子に隣接する領域に欠失や逆位を起こしたりすることによってゲノムの再編成を引き起こすため、ゲノムの進化に重要な役割を果たしてきたと考えられる。細菌には挿入配列 (insertion sequence: IS) と呼ばれる小型の様々な因子が存在するが、それらはいくつかのファミリーに分けられている。ISY100 (947 bp) はシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 で見出された挿入因子で、IS630 ファミリーに属する因子の特徴を持つ。即ち、両端に 24 bp の不完全な逆向き反復配列 (inverted repeat: IR) を、内部に IS630 の転移を司る酵素トランスポゼースに相同性のあるタンパク質をコードし、転移の標的とされる 2 塩基配列 TA が因子の両側に見られる。本論文は、ISY100 が実際 IS630 ファミリーに属する因子であることを確認すると共に、その転移の分子機構を明らかにしたものであり、6 章からなる。

第 1 章で研究の背景を述べた後、第 2 章で、ISY100 の大腸菌における転移について述べている。まず ISY100 が、大腸菌細胞内においてトランスポゼースの発現下で標的プラスミドに高頻度で転移することを示した。また、生じた転移産物を解析し、ISY100 が、IS630 ファミリーに属する因子と同様、TA 配列を標的としてその配列を重複する形で挿入していることを示した。ISY100 が大腸菌の細胞中で転移するという事実から、この因子の転移にシアノバクテリア特異的宿主因子は必要でないことが示唆された。

この解析中に、ISY100 を運ぶプラスミドからトランスポゼースに依存して ISY100 の直鎖状分子が生じること、その分子の 3' 端は因子の末端と一致するが、5' 端は末端から 2 塩基分内側であることを見出した。このことから ISY100 は、トランスポゼースにより両端での DNA 2 重鎖切断をうけ、3' 側が 2 塩基突出した形の直鎖状分子として切り出されることが示唆された。

第 3 章と 4 章において、ISY100 トランスポゼースをヒスチジンタグ融合タンパク質としてアフィニティー精製をし、ISY100 を運ぶ供与体プラスミドと標的プラスミドを含む反応液に加えると、ISY100 が、*in vivo* の場合と同様、TA を標的に転移し、TA を両端に重複することを示した。さらに、ISY100 を運ぶ閉環状プラスミドからトランスポゼースにより、*in vivo* の場合と同様、直鎖状 ISY100 分子が切り出されるが、この分子の生成に先立って因子両端の 5' 端側で切断されている開環状プラスミド分子が生じることを見出した。このことから ISY100 は、まず因子両端の 5' 端を持つ方の鎖 (nontransferred strand: NTS) が、次に因子両端の 3' 端をもつ方の鎖 (transferred strand: TS) が切断されるという機構で直鎖状分子を作り出すことが示唆された。

第5章において、末端標識した IR を含む短い 2 本鎖 DNA 断片を基質として、トランスポゼースが TS 鎖においては丁度因子の 3' 末端を切断するが、NTS 鎖においては因子の 5' 末端から 2 塩基分内側、あるいは、数塩基分外側で切断することを明らかにした。また、NTS 側にニックあるいはギャップの入った基質を用いると TS は効率よく切断されるのに対して、逆に TS 側にニックあるいはギャップの入った基質を用いると NTS はほとんど切断されないことを示した。これらの結果から ISY100 では、NTS が切断された後に TS が切断されるという上記の示唆が確認された。

さらに、3' 側が 2 塩基突出した構造を持つ IR 断片が、トランスポゼースの存在下で効率よく標的プラスミドに転移することを示し、これによってトランスポゼースによる 2 本鎖切断で生じた直鎖状分子が転移の中間体であることが示唆された。また、IR を含む DNA 断片を用いたゲルシフトアッセイにより、因子の 2 つの末端が近接したような形で IR 断片とトランスポゼースをそれぞれ 2 つもつ複合体（トランスポソーム）が形成されることを明らかにした。第6章では、得られた結果全体の総括をしている。

以上、本論文は、ISY100 が TA 配列を標的として転移する IS630 ファミリーの因子であることを確認し、因子の 5' 端側、次に 3' 端側がトランスポゼースにより切断されるという分子機構を明らかにしたものである。これらの切断反応はトランスポソーム内部で起こると考えられるが、因子の転移はこのトランスポソームが標的 DNA を捕捉した後 DNA 鎖連結反応により起こると考えられる。本研究で明らかにされた転移機構は、他の IS630 ファミリーに属する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。