

論文審査の結果の要旨

氏名 石川 健

本論文は3章からなる。第1章は「複製フォーク型 DNA の I 型制限酵素による切断」について、第2章では「ゲノム比較と無細胞発現系による新しい機能と構造を持つ制限酵素の発見」についての研究成果が述べられている。第3章はディスカッションであり「反制限酵素としてのクロマチン構造」という仮説が提案されている。

第1章について、申請者は I 型制限酵素 EcoR124I が複製フォークを模した DNA を分岐点近くで切断する事を、試験管内実験で発見した。従来、生体内の現象から制限酵素による DNA 切断と複製には何らかの関係があると示唆されて来たが、制限酵素と分岐型 DNA との生化学的な相互作用は明らかになっていなかった。I 型制限酵素は、未メチル認識配列に結合し、DNA をたぐり寄せ、数百から数千塩基離れた位置で DNA を切断するという奇妙な反応で知られていた。申請者は長い複製フォーク型 DNA を調製する独自の手法を確立し、これを基質に用いて上記の反応を発見した。さらに、基質の構造を変化させる事により、この切断の性質を明らかにした。実験は先行研究の情報に基づき、注意深くデザインされており、1)切断は認識配列に依存する、2)片方の腕のみで切断が起きる、3)分岐構造に依存して切断する、4)認識配列と分岐点が近すぎると切れない、5)分岐点の移動性は影響しない、6)メチル化により切断が抑制される、7)分岐点の極近傍で切断する、といった性質を明らかにするのに十分な結果を示している。

この現象の生物学的な意義に関する考察として、1)侵入 DNA の増殖過程への攻撃 2)不安定な染色体を持つ細胞の排除による正常な染色体の維持、という可能性について論じられている。特に 2)については、バクテリアに置ける制限酵素という枠組みに限定されず、複製フォークの切断が損傷を受けた染色体の「修復」と「破壊」の選択に関わる可能性を問題提起しており、高等生物を含む生物一般の関係する現象の理解に繋がると評価できる。

第2章について、申請者は新しい基本立体構造と機能をもつ制限酵素を探索する方法を確立し、発見された新奇制限酵素の機能を明らかにした。制限酵素は立体構造の多様性が大きいと考えられて来たが、従来は新しい基本立体構造を持つ制限酵素を探すための手法は確立されていなかった。申請者は、アミノ酸配列相同性に依存しない新しいアプローチでこの方法を確立した。これは動く遺伝子としての制限修飾遺伝子に注目したもので、近縁種のゲノム比較からゲノム多型を探し、修飾酵素遺伝子と挙動を共にする機能未知遺伝子を制限酵素候補として選ぶ方法である。また、従来困難であった制限酵

素の発現を無細胞タンパク質合成で行う新しい方法を活性の検出及び機能解析に用いている。

その結果、発見された制限酵素 **PabI** の機能を申請者は明らかにした。この酵素は Mg^{2+} 非要求、TA3'突出の断端の生成という新しい機能を持つ事が示されている。また共同研究者により、この酵素が新しいフォールド（基本立体構造）を持つ事が示されており、この探索方法が新しい機能と構造をもつ制限酵素を発見するのに有用であると評価できる。（ただし、立体構造解析に関しては、この論文中では述べられていない。）

申請者の制限酵素の探索方法は、他の微生物に応用することにより、さらに新しい機能と基本立体構造を持つ酵素が発見されると期待される。これは DNA 結合タンパク質の立体構造多様性の理解に貢献すると期待される。

第3章について、真正細菌、古細菌、真核生物のクロマチン構造と制限酵素の関係について、仮説が提案されている。真正細菌では制限酵素遺伝子を持つ種のゲノム配列からその制限酵素の認識配列が排除される傾向が知られている。これは、制限酵素による染色体切断の頻度を減らすための適応と考えられている。**PabI** 遺伝子を持つ古細菌 *P. abyssi* では、**PabI** の認識配列はゲノムから排除されていないが、**PabI** ホモログを持つ真正細菌 *H. pylori* の株では、認識配列の排除が見られる。この結果から、クロマチン構造を持つ古細菌と真核生物は制限酵素による染色体切断を受けにくいという可能性を述べている。申請者はクロマチン構造が制限酵素による染色体切断に対する防御機構として、獲得されたという仮説を提案し、「なぜクロマチン構造を持つ生物がいるのか」という問題について、制限酵素との相互作用という新しい視点で述べている。

なお、第1章は半田直史・小林一三、第2章は渡部美紀・黒板敏弘・内山郁夫・川上文清・宮園健一・Jan Kosinski・加茂昌之・澤崎達也・永田宏次・Janusz M. Bujnicki・遠藤弥重太・田之倉優・小林一三、第3章は小林一三との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できるものと認める。