The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular Analysis of the Escherichia coli ruvC Gene, Which Encodes a Holliday Junction-Specific Endonuclease
Author(s)	高萩, 眞彦
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38156
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【7】

氏　　名	高　萩　眞　彦（たか　はぎ　まさ　ひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　10615　号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Molecular Analysis of the *Escherichia coli ruvC* Gene, Which Encodes a Holliday Junction-Specific Endonuclease **（Holliday 構造特異的エンドヌクレアーゼをコードする大腸菌 *ruvC* 遺伝子の構造と機能の解析）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　中田　篤男 （副査） 教　授　島田　和典　　教　授　杉野　明雄

論　文　内　容　の　要　旨

（目　　的）

大腸菌における遺伝的組換えとDNA損傷の組換え修復に関与する新たな遺伝子（*ruvC*）の構造とその遺伝子産物の機能解析を目的とした。

（方法ならびに成績）

大腸菌の*ruv*遺伝子は尾辻らによって，紫外線や化学変異原に感受性を示す突然変異として遺伝子地図上41分にマップされた。*ruv*変異株は遺伝的組換え（相同組換え）率が野生型株と比べて，単独の突然変異ではやや低下するに過ぎないが，*recBC*／*sbcBC*あるいは*recG*突然変異と組み合わせると顕著に低下することから，これらとは別の組換えの経路に関与していることが示唆された。その後，*ruvA-ruvB*の2個のシストロンがオペロンを構成しており，それらの遺伝子産物は組換え中間体の分枝点移動（branch migration）を促進することを当研究室で明らかにした。一方，R.Lloyd（英）らは多数の*ruv*突然変異株を分離した。その中から，彼らと平行して当研究室で*ruvA-ruvB*によっては相補されない株を見いだした。この突然変異は，*ruvA-ruvB*近傍にマップされる新しい遺伝子，*ruvC*，であると予想された。

著書は，この近傍領域約3kbのDNA断片をクローニングし，その塩基配列を決定し，相補性テストによって*ruvC*領域を同定した。さらに，RuvC蛋白質が組換え中間体の十字型構造（Holliday構造）を切断することを証明した。

この領域の遺伝子構成は，*orf17-orf26-orf19*（*ruvC*）*-orf23-ruvA-ruvB*となっており，相補性テストからorf19が*ruvC*であると同定した。マキシセル法によって，RuvCは19kDaの，Orf17とOrf26はそれぞれ17kDaと33kDaのポリペプチドをコードしていることを確認した。orf23が他とは逆方向に転写翻訳されることを*lacZ*（β－ガラクトシターゼ）との融合遺伝子の解析から確認して，*ruvC*は*ruvAB*とは別のオペロンであることを証明した。*lacZ*をレポーター遺伝子として*ruv*Cの発現を調べると，*ruvC*は*ruvAB*とは異なり，マイトマイシンC処理などのDNA損傷によって発現誘導が起こらず，また，少なくとも2個のプロモーターによって発現していた。T7ファージのプロモーターを利用して*ruvC*を高発現させ，RuvC蛋白質を各種のクロマトグラフィーにより高度に精製した。

*ruvC*遺伝子群が組換えの後期に働き，RuvA／RuvB複合体がHolliday構造の分枝点移動に働くことからRuvCもまたHolliday構造に何らかの作用をすると考えた。そこで，RuvA／RuvBの機能の解析に用いたHolliday構造

様の十字型構造を含むプラズミッドDNA（逆方向反復配列［Inverted Repeat］をもつプラズミッドcccDNAを熱処理し，遅速冷却した）を作成し，マグネシウム存在下においてRuvCで処理したところ，プラズミッドDNAの二本鎖の切断が認められた。その切断は，十字構造の交叉点の対照的な位置でおこり，DNAリガーゼによる再結合が可能な状態（5′端がPO_4，3′端がOH）の切断であった。

また，一本の鎖にギャップのある環状二本鎖DNAと，それと相同な塩基配列をもつ線状2本鎖DNAをRecA蛋白質で処理(*in vitro*で）して，相同な鎖の一部を交換したより自然に近い組換え中間体を作成した。RuvCはこのHolliday構造アナログの十字型構造に対して，可能な二方向の（splice型とpatch型の組換え産物を形成するような）切断様式を示した。

Holliday構造（DNAの十字型構造）は二つの相同なDNA分子間でRecAによって形成される組換えの中間体であると考えられている。以上の結果は，このHolliday構造が形成された後に，RuvCがその十字型交叉点を対称的な位置で切断して，二つのDNA分子に分離することを示している。RuvCによる切断で生じた組換え体DNA分子のギャップはDNAリガーゼによって再結合されて組換え反応が完了すると考えられる。

（総　　括）

遺伝的組換えは，あらゆる生物で普遍的にみられる基本的な生命現象の一つである。原核細胞では相同組換えが主体となっており，相同組換えはまた，ジーンターゲッティングという実用面からも最近特に注目されている。相同組換えについては，古くからHolliday モデルが提唱されていたが，分子レベルでの実証はなかった。本研究では，組換えの後期過程に関与する*ruvC*遺伝子の構造を明らかにし，RuvC蛋白質が組換え中間体であるHolliday構造を切断することを*in vitro*の実験によって証明した。RecAによる組換え中間体の形成，RuvA／RuvB複合体による分枝点移動と合わせて，相同組換えの一つの経路が明らかになったといえよう。

論文審査の結果の要旨

紫外線照射やマイトマイシンC 処理などによって生じたDNA損傷の修復に働く遺伝子が大腸菌では多数知られている。その一つである*ruv*遺伝子は組換え修復に関与していることがR.Lloydらによって示唆された。遺伝的組換え，すなわち，homologous recombinationは，相同な塩基配列をもつ2つのDNA分子の間で一本鎖を相互に交換することにより十字型の中間体DNA（Holliday構造）を形成する過程と，その交叉した部分が切断されて2つのDNA分子に解離する過程とに大別される。

本論文は，合計3個見つかっている*ruv*遺伝子（*ruvA, ruvB, ruvC*）のうち，*ruvC*遺伝子領域の塩基配列を決定し，*ruvC*が*ruvAB*とは異なるオペロンにあり，その発現も独自の調節を受けていることを明らかにし，さらに，遺伝子産物（RuvC）を精製して，それがHolliday構造を切断する機能をもつことを，*in vitro*の実験により証明したものである。

大腸菌やバクテリオファージでは相同組換えの分子機構の研究が古くから分子生物学の主要なテーマとなっている。本論文のRuvCがHolliday構造の解離過程に働いているという証明は，RuvA／RuvBの機能（Holliday構造の解離以前の過程に働く）と合わせて相同組換えの一つの経路の分子機構を明らかにしたもので，学位に値する研究であると評価する。