

Title	Roles of the recG gene product of Escherichia coli in recombination repair : Effects of the Δ recG mutation on cell division and chromosome partition
Author(s)	石岡, 賢
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3128877
DOI	10.11501/3128877
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	石岡賢
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 12977 号
学位授与年月日	平成 9 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	Roles of the <i>recG</i> gene product of <i>Escherichia coli</i> in recombination repair: Effects of the $\Delta recG$ mutation on cell division and chromosome partition (組換え修復における大腸菌 <i>recG</i> 遺伝子産物の役割: 細胞分裂と染色体分配における <i>recG</i> 遺伝子の欠失による影響)
論文審査委員	(主査) 教授 品川日出夫 (副査) 教授 島田 和典 教授 杉野 明雄

論文内容の要旨

【目的】

DNA の遺伝的組換え(相同組換え)は、全ての生物に見られる普遍的現象で種の多様性に寄与するばかりではなく、DNA に損傷が起こった場合の修復(組換え修復)にも働いている。また、近年、相同組換えが DNA の複製や染色体の分配などの他の生命現象にも関わっていることを示唆する報告が蓄積しつつある。相同組換え反応において、RecA タンパク質は相同な二本鎖 DNA の一方の相同な鎖どうしを交換し組換え中間体である Holliday 構造を形成する働きを担っている。*recG* 遺伝子は遺伝学的解析から遺伝的組換えや組換え修復に関与すると考えられている。また、生化学的解析から RecG タンパク質は、RuvAB タンパク質複合体と同様 Holliday 構造に特異的に結合し ATP 依存的なヘリケース(一本鎖 DNA に対して 3' → 5' の極性をもつ)活性によりこの構造の分岐点移動を促進し組み換え体の生成に関与すると考えられている。RecG タンパク質の *in vitro* での生化学的な研究に比べると *in vivo* での *recG* 遺伝子機能に関する研究はいまだに不十分であると思われる。本研究では *in vivo*、特に組み換え修復における *recG* 遺伝子の役割について、細胞の形態という観点から明らかにすることを目的として行った。

【方法】

RecG タンパク質の残存活性を排除するため *recG* 遺伝子の完全欠失変異株(以下 *recG* 株)を作成し用いた。また、*recG* 変異を含む多重変異株は P1 ファージによる形質導入によって作成した。細胞の形態の観察は菌体を回収しメタノールで固定した後、DAPI(4', 6-diamino-2-phenyl-indole)で核を染色し、蛍光位相差顕微鏡で観察した。細胞の長さや無核細胞の割合は顕微鏡写真から算出した。*recG* 株や他の組換え修復欠損変異株の紫外線感受性は $10^7 \sim 10^8$ / ml の細胞に対して紫外線を照射したのち LB プレート上で培養し生菌数をカウントした。

【成績】

- 1) *recG* 株の紫外線感受性は野生型株と比べ高いが *ruv* 株よりは低かった。また、*recA* 株は *ruv* 株よりさらに感受性が高く、*recG ruv* 株と *recG recA* 株は *recA* 株とほぼ同程度の感受性を示した。
- 2) *recG* 株は低線量の紫外線照射後、融合した多核が細胞の中央に局在したフィラメント状細胞となった。さらに培養を続けると約 10% 位の割合で無核細胞を産出した。通常の培養条件下において *recG* 株は野生型株と比べ菌体の

長いものの割合が多く、無核細胞の割合も多く（1.5%）また染色体の分離にも異常が認められた。

3) *recA* 株は細胞の長さが野生型株とほぼ同程度であったが、無核細胞の割合が高く約7%ほどであった。*recG recA* 株は *recA* 単独変異株の表現型と同様であった。

4) *recG* 株に *sfiA* (= *sulA*: SOS 応答の際の細胞分裂の阻害に関与) 変異を導入した二重変異株の細胞は *recG* 株に比べて長いものの割合が減ったものの無核細胞の割合は変化しなかった。

5) *recG* 株に *ruvAB*, *ruvC* 変異を導入した場合、無核細胞の割合が *recG*, *ruvAB*, *ruvC* 単独変異の時より多かった。

6) *recG polA* (Ts) は42°Cで致死であるが、この変異株を42°Cで培養した時、その形態は *recG* 株に紫外線を照射した時と非常によく似ていた。

【総括】

紫外線照射により *recG* 株は融合した多核が細胞の中央に局在したフィラメント状細胞や無核細胞を産出する。この現象は *ruv* 株でも見られる。このことは *recG* 株や *ruv* 株ではDNAの組換え修復の中間体である Holliday 構造のプロセッシングの効率が低いため染色体の不分離が起きた結果と考えられる。*recA* 株で染色体の不分離が見られないのは組換え修復の中間体が形成されないためであろう。*in vitro* の生化学的研究から組換え修復において RecG タンパク質は RecA タンパク質の関与するステップの後に働いていると考えられているが、今回 *recG recA* 株の形態学的な表現型が *recA* 単独変異株と同様になることから支持された。*recA*, *recG recA*, *recG ruvC* 株の紫外線に対する感受性はほぼ同程度であった。このことは RecA を介した組換え修復の過程において Holliday 構造をプロセスする経路は少なくとも RecG と Ruv の二つの経路が存在し、この二つの経路でその殆ど全てが行われていることを示している。

論文審査の結果の要旨

相同的組換えと組換え修復において、2つのDNA分子が相同な単鎖を交換することにより、Holliday 構造と呼ばれる組換え反応の中間体が形成される。大腸菌においては、最近の研究より、RecG タンパク質および RuvABC タンパク質は Holliday 中間体に特異的に作用して、組換え中間体を分離させて、組換え反応を完了させる働きを持つと考えられるようになってきた。

本研究においては、RecG タンパク質の組換え修復における役割を *in vivo* で解析するために、*recG* 単独変異株および種々の組換えに関与する遺伝子との二重変異株を作成し、DNA修復能や修復過程での、細胞および核の形態を研究した。本研究により、組換え中間体の形成には RecA タンパク質の機能が必須であり、組換え中間体がプロセスされないと染色体分離が阻害され、組換え中間体のプロセッシングは RecG および RuvABC タンパク質の関与する2つの経路で大部分が行われることを *in vivo* で細胞学的に示した。本研究は、Holliday 構造の形成と分離の過程を *in vivo* で細胞学的に研究したきわめてユニークな研究であり、学位の授与に値するものと認める。