The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ATP-dependent resolution of R-loops at the ColE1 replication origin by Escherichia coli RecG protein, a Holliday junction-specific helicase
Author(s)	福應, 温
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41695
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

【 12 】

氏　　名	福（ふく）　應（おう）　温（あつし）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　14253　号
学位授与年月日	平成11年2月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科　生理系専攻
学 位 論 文 名	ATP-dependent resolution of R-loops at the ColE1 replication origin by *Escherichia coli* RecG protein, a Holliday junction-specific helicase (大腸菌RecG蛋白質によるColE1複製起点におけるR-loopのATP依存的解消)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授　品川日出夫 (副査) 教 授　杉野　明雄　　教 授　野島　　博

論 文 内 容 の 要 旨

[目　的]

大腸菌RecGは遺伝学的および生化学的解析から相同組換えにおいて組換え中間体であるホリデー構造の分岐点移動反応を促進するDNAヘリカーゼであると考えられている。本研究において我々はRecGを大量発現させるとColE1-typeの複製開始様式を持ついくつかのプラスミドのコピー数が劇的に減少することを発見した。この現象は組換えに関与すると考えられている酵素であるRecGがColE1プラスミドのDNA複製にも関与している事を示唆している。そこで，プラスミドDNA複製に対するRecGの作用を*in vitro*で解析した。

[方法ならびに成績]

まず，ColE1プラスミドの複製開始の*in vitro*再構成系（DNAポリメラーゼIとRNAポリメラーゼおよびRNaseHの反応系）にRecGを種々の濃度で加えたところ，RecGの濃度に依存的なDNAの合成阻害がみられた。ColE1プラスミドやp15Aプラスミドの複製の開始にはプライマーRNAの前駆体と鋳型DNAとが安定なRNA-DNAハイブリッドを形成し，DNA鎖が開裂した構造（R-loop）をとることが必要であることがわかっている。そこで，複製起点においてプライマーRNA前駆体との間で形成されるR-loopを調製し，これにDNAポリメラーゼIとRNaseH，dNTP，および種々の濃度のRecGを加えてdTTPの取り込みを計測したところ，同様にRecG依存的なDNA合成の阻害がみられた。これにたいして，テンプレート・プライマーを用いたDNA合成へのRecGの効果を調べたところ，RecGはDNAポリメラーゼIのDNA鎖伸長反応を阻害しないことがわかった。これらの結果はRecGがColE1プラスミドの複製開始，特にRNAポリメラーゼによってプライマーRNAの前駆体が合成され，DNAポリメラーゼIによってDNA鎖が伸長するまでの間に作用することを示めしている。

RNaseH活性の低下した変異株（*rnhA1*変異）で活性化される大腸菌染色体の構成的安定DNA複製（cSDR）はRNaseHによってR-loopが除去されにくくなるために安定なR-loopが形成されて起ると考えられている。*rnhA*と*recG*の二重変異が致死性を示すことや，RecGの欠損株においてもcSDRが活性化されるというこれまでの報告は

RecG が R-loop の解消に関与していることを示唆している。これらの報告から，RecG が R-loop を解消する活性をもち，複製の開始に必要な安定な R-loop の形成を阻害するのではないかと考え，DNA の合成阻害を調べた時と同一の方法で調製した R-loop と RecG とを *in vitro* で反応させた。プライマー RNA の前駆体をラベルしておき，ATP 存在下で反応させた場合，R-loop の位置のバンドが消失することがアガロースゲル電気泳動で確認できた。一方，ATP を ADP や ATPγS で置き換えた，ATP の加水分解がない条件下で R-loop と RecG とを反応させた場合にはバンドの消失は見られず，RecG が ATP の加水分解によって生じるエネルギーを利用して R-loop を解消することがわかった。また，同一のサンプルを変性ゲルで分離して反応産物を検出したところ，RecG との反応産物には RNaseH との反応産物に見られるような短い切断片は検出されなかった。以上の結果は，RecG が R-loop からプライマー RNA の前駆体をヘリカーゼ活性によって解離させることによって R-loop を解消していることを示している。また，基質過剰条件で R-loop と種々の濃度の RecG とを反応させたところ，低濃度の RecG で効率良く R-loop を解消することがわかった。このことは，RecG による R-loop の解消が酵素的反応であることを示している。また，R-loop の解消に必要な RecG 濃度は DNA の合成阻害に必要な濃度と対応していた。

［総　括］

以上の実験結果から RecG が RNA-DNA ハイブリッドをヘリカーゼ活性によって解離するというユニークな活性を持ち，プライマー RNA の前駆体を複製起点から解離させることによって R-loop を解消し，プラスミド DNA の複製開始を阻害する事が分かった。この結果は，RecG の大量発現によるプラスミドのコピー数の劇的な減少の原因が，RecG が R-loop を解消することにあることを示している。さらに，RecG が R-loop を解消する活性を持つことは，*recG* 欠損株で cSDR がおこるという事実をうまく説明できる。つまり，*recG* 欠損株では野生株ならば RecG のヘリケース活性によって取り除かれるはずの RNA-DNA ハイブリッドが安定に存在し，cSDR が活性化するのであろう。

論文審査の結果の要旨

DNA の相同組換えは，その基本機構が原核生物からヒトを含めた真核生物にまで保存されている普遍的現象である。また，相同組換えは生物の多様性をもたらす減数分裂期の遺伝的組換えの本質であり，二重鎖切断などの DNA 損傷を相同な DNA を用いて修復する働きをも担っている。大腸菌 RecG 蛋白質は，相同組換えにおいて，組換え中間体の分岐点移動反応を触媒するヘリカーゼである事が知られていたが，本研究は RecG 蛋白質が ColE1 プラスミドの複製開始点で作られた RNA-DNA ハイブリッドをヘリカーゼ活性によって乖離させる酵素活性をもち，origin からプライマー RNA 前駆体を除去することによって，複製開始を抑制する事を明らかにした。本研究は組換え酵素である RecG 蛋白質が DNA 複製の開始を抑制することを *in vivo* 及び *in vitro* で証明している。遺伝学的な解析によって DNA の組換えと複製との間には密接な相互作用があることがわかっているが，分子レベルでの解析はほとんど行われていない。本研究は組換えに関与する酵素によって制御される DNA 複製開始機構を分子レベルで解析し，そのメカニズムを初めて明らかにした重要な研究である。よって，本論文を学位に値するものと認める。