

氏 名	明 石 基 洋
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (バイオサイエンス)
学 位 記 番 号	甲 第 750 号
学位授与の日付	平成 29 年 6 月 20 日
学位論文題目	<b>DNA 修復・組換え遺伝子 <i>recA</i> の進化的起源に関する遺伝学的及び分子系統学的解析</b>
論文審査委員	主査 教 授・農 学 博 士 千葉櫻 拓 教 授・博士 (農学) 矢 嶋 俊 介 准 教 授・博士(バイオサイエンス) 渡 辺 智 理 学 博 士 柴 田 武 彦*

## 論文内容の要旨

### 第 1 章 序論 相同組換え酵素遺伝子はどこから来たのか

本論文では、相同組換え酵素遺伝子 *recA* とトランスポゾン *IS256Bsu1* の分子遺伝学的解析に基づき、生物が相同組換え酵素遺伝子の獲得プロセスについて述べる。相同組換え酵素はすべての細胞性生物に見られる普遍的な DNA 修復・組換え 因子である。然るに、この因子は細胞性生物の成立の過程に深く関与したと考えられるが、その進化史を明らかにするのは困難を極める。バクテリアには *recA* と呼ばれる遺伝子にこの因子の遺伝情報が存在する。筆者は、枯草菌に *IS256Bsu1* と呼ばれるトランスポゾン (染色体上の自身の DNA 情報を移動させたり複製する遺伝子の一種) の細胞内における転移反応に *recA* が必須であるという事実から研究を開始し、その必須性の要因を遺伝学的に検証するとともに、遺伝子の変異と多様化についての研究を通して、DNA 修復・組換え 因子の進化プロセスの解明を試みた。

### 第 2 章 本論-1

#### トランスポゾン *IS256Bsu1* を用いた実験の妥当性、およびトランスポゾンの転移と相同組換え酵素の関係性について

##### *IS256Bsu1* の転移頻度と培地種の関係について

まず、トランスポゾンの *in vivo* 検出系である *Jumping cat assay* について概説する。*Jumping cat assay* は 大河内 悠貴 氏 (平成 22 年度修士課程修了) および茂木俊丞氏 (平成 23 年度修士課程修了) らにより構築された検出系である。本実験系では枯草菌の Shine-Dalgarno (SD) 配列を接続した chloramphenicol 耐性遺伝子を、40 bp の *IS256Bsu1* の逆向き反復配列 (Inverted repeat; IRR / IRL) で挟んだ配列が転移する (mini-IS と呼ぶ)。

\*理化学研究所 名誉研究員

一方、IS256Bsu1にコードされるトランスポゼース遺伝子 (*tnp*) はラクトースのアナログである IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) 誘導性のプロモータ配列 *Phyper-spank* に繋がれている。これらの構造は枯草菌ゲノム上の *amyE* 遺伝子内に挿入されている。*tnp* 遺伝子が発現し、mini-IS が転移してゲノム上の他の遺伝子内に挿入されると、転写融合が起きた場合のみ細胞の表現型が chloramphenicol 耐性 (Cm<sup>r</sup>) となり、コロニーとして検出される。

まず、Jumping *cat* assay による転移頻度を 3 種類の培地で比較した (LB 培地, 2xSG 培地, CI 培地)。その結果、CI 培地 (枯草菌のコンピテンス誘導培地) における転移頻度が最も高い値を示すことが分かった。LB 培地を用いた場合は CI 培地に対して有意に低い値を示した ( $p < 0.05$ )。また、2xSG 培地 (孢子形成培地) を用いた場合、CI 培地と同程度の転移頻度を示すが、検出された Cm<sup>r</sup> 菌の約 50% が孢子を形成していないことが分かった。以上の結果を踏まえ、本研究では CI 培地を用いることとした。

#### IS256Bsu1 の重複配列の検出

IS が転移すると、IS の両側に短い重複配列 (Direct repeat sequence; DR) を生じることが知られる。もし、Jumping *cat* assay により得られた Cm<sup>r</sup> コロニーが mini-IS の転移に由来するならば、これらのコロニーにおける mini-IS の挿入位置の両側にも重複配列が検出されるはずである。一方で、mini-IS が相同組換えなどにより他の遺伝子内に転座あるいは挿入された結果 Cm<sup>r</sup> コロニーが生じたならば、重複配列は生じず、検出される mini-IS の近傍に、*amyE* 内の mini-IS 周辺の配列が見出されると考えられる。そこで、12 個の Cm<sup>r</sup> コロニーについてシーケンス解析を行い、mini-IS の両端に重複配列が存在するかを確認した。その結果、6 コロニーから mini-IS を検出することに成功し、重複配列の種類は 6 種類であった。つまり、検出できた転移 mini-IS の両側には常に重複配列が観察された。また、重複配列は常に 8 bp であったが、配列の保存性は見られなかった。以上から、mini-IS の転移は IS256Bsu1 の転移により引き起こされていることが示唆された。

#### IS256Bsu1 の転移頻度とコンピテンス関連遺伝子/相同組換え遺伝子の関係性

CI 培地を用いて Jumping *cat* assay を行った場合、他の培地と比べて mini-IS の転移が高頻度に検出された。従って、CI 培地は形質転換を誘導する培地 (competence-induction medium) である事を考慮すると、mini-IS の転移に関与する枯草菌の遺伝子は、コンピテンスに関与するものである可能性が高いと考えられる。コンピテンスとは、自然形質転換、つまり細胞外に存在する DNA を自ら細胞内に取り込み、形質転換を引き起こす一連の反応のことを指す。コンピテンスに関与する 5 種の遺伝子 (*comP*, *comA*, *comK*, *rok*, *recA*) を破壊した Jumping *cat* assay システム導入株では、野生株と比較して有意に転移頻度が

低下した。中でも、*recA* 欠損株における転移頻度は 5 種の株の中で最も低く、約 0.001 倍まで低下した。このことから、形質転換能の誘導に関与する遺伝子 (*comP*, *comA*, *comK*, *rok*) の破壊株において WT よりも TPF が低下したのは、これらの遺伝子の欠損による正常なコンピテンス誘導の阻害により、*recA* の発現量が低下したためであると解釈できる。

続いて、相同組換え反応と mini-IS の転移について検証するため、*recA* と共に相同組換えに関与する因子をコードする *recO* と *recU* に注目した。いずれも相同組換え反応に関わる因子であり、相同組換え反応が mini-IS の転移に関与する場合、これらの因子の破壊でも mini-IS の転移が検出されなくなるか、あるいは転移頻度の著しい低下が予想された。しかし、*recO* または *recU* を破壊した Jumping cat assay システム導入株の転移頻度は、いずれも野生株と比べて有意に高いことが分かった ( $p < 0.05$ )。従って、mini-IS の転移には相同組換え反応が関与しているのではなく、*recA* そのものが必須であることが示唆された。

#### *recA* 変異株を用いた IS256*Bsu1* の転移頻度の検証

*recA* そのものが mini-IS の転移に必須である可能性が考えられた。このことを受け、大腸菌と枯草菌の RecA 配列の比較を元に、Jumping cat assay システム導入株上で 10 種類の活性部位変異株を作成し、その転移頻度を測定、野生株と比較した。RecA は ATPase 活性を有するが、ATPase 活性欠損となる変異株 (R58C, K70R) の転移頻度は、いずれも野生株と比べて有意に転移頻度が低下した。一方、ssDNA 結合領域の活性部位 (E154R, E154V, G155R, G155P, G202I) や RecA 間の結合 (F215Q), D-loop 形成に関わる活性部位 (R243Q K245N) の変異株における転移頻度を野生株と比較すると、E154V, G155R は有意に高いが、他のものは有意差が見られないことが分かった。また、RecA の DNA 結合活性を、ssDNA ではなく dsDNA に偏らせる変異株 (D159A) における転移頻度は、野生株と比べて有意に高いことが分かった (約 2 倍,  $p < 0.05$ )。以上の結果から、mini-IS の転移において必要な RecA の機能は、ATPase 活性及び RecA が dsDNA へと結合することであると考えられた。

### 第 3 章 本論-2

#### バクテリオファージ Mu にコードされる *muB* 遺伝子と相同組換え酵素遺伝子の分子系統学的関係性、およびトランスポゾンの転移における *muB* 遺伝子の相同組換え酵素遺伝子に対する相補性について

##### バクテリオファージ Mu にコードされた *muB* と *recA* を含む相同組換え因子の系統解析

以上の結果から、IS256*Bsu1* の転移には *recA* が必須であるが、その必須性は RecA の ATPase 活性及び dsDNA 結合活性に関わるものであり、相同組換えとは関係がないことが

示唆された。筆者は、*recA* が mini-IS の転移において果たす役割について迫る上で、バクテリオファージ Mu に着目した。Mu ファージは IS と同様、ゲノム上を転移することで自身の DNA を複製する。この時、トランスポゼースである MuA とファージゲノムの複合体を、宿主ゲノム上の別領域へと誘導するのが MuB である。*muB* は *recA* と同様、P-loop dNTPase をコードする遺伝子である。

まず、*muB* と *recA* の系統関係を明らかにするため、相同組換えに関与することが知られる 4 種の遺伝子 (*recA*, *radA*, *rad51*, *UvsX*) と *muB* の配列を、バクテリア、古細菌、真核生物、バクテリオファージのゲノムから収集し、406 の生物種からなる分子系統樹を作成した。その結果、これら 5 種類の遺伝子はそれぞれクレードを形成し、独立していることが分かった。*muB* のクレードは *UvsX* (T4 バクテリオファージの持つ組換え酵素遺伝子) の近傍に位置することが分かり、生物の有する相同組換え酵素遺伝子よりもバクテリオファージのものに近縁であることが分かった。また、得られた系統樹と解析した遺伝子の GC 含量の相関性を調査したところ、*recA* 及び *radA* のクレード内で、系統樹の枝分かれが進むに従って配列の GC 含量が増加していることが分かった。従って、相同組換え酵素遺伝子の多様化の過程では、ランダムではない突然変異が生じていた可能性があることが示唆された。

#### IS256Bsu1 の転移における *muB* と *recA* の相補性の検証

分子系統解析の結果から、*muB* と *recA* が各々独立に進化した遺伝子であり、*muB* は既存の相同組換え酵素遺伝子から進化したわけではないことが明らかとなった。そこでまず、Jumping cat assay システム導入株上で *recA* と *muB* を完全に置換した株を作出し、転移頻度を測定した。その結果、*recA::muB* 置換株の転移頻度は、野生株と同程度であることが分かった (0.93 倍,  $p = 0.40$ )。従って、*muB* は mini-IS の転移において *recA* が果たす役割を相補可能であることが分かった。続いて、*recA::muB* 置換株が野生株と同等の紫外線耐性を有するかを確認した。しかし、*recA::muB* 置換株の紫外線耐性能は *recA* 欠損株と同等であった。以上から、*muB* には *recA* 同様 mini-IS の転移を可能にする一方で、DNA 損傷修復は無いことが明らかとなった。IS256Bsu1 の転移における RecA の役割は、バクテリオファージ Mu における MuB の場合と同様、トランスポゼース-DNA 複合体をゲノム上の標的領域に誘導することであると考えられる。また、前述の分子系統解析結果を踏まえると、相同組換え酵素遺伝子の祖先配列は、MuB のようなバクテリオファージの増殖に関わる DNA 結合型 ATPase であり、相同組換え能は祖先配列を得た後に獲得された機能であると考えられる。

#### **第 4 章 本論-3 ゲノム上の突然変異、そのランダム性について**

相同組換え酵素遺伝子の分子系統解析結果より、GC 含量が系統的に増加するような突然

変異の存在が示唆された。このことは、非ランダムな突然変異が生じたことを意味する。ランダムとは観察される事象の発生確率が互いに等しいということの意味する。しかし、相同組換え遺伝子の進化は長大な時間の中で生じたものであり、再現することは困難である。そこで、GC 含量の偏るような突然変異選択が存在するか、さらに、突然変異がゲノム上でランダムに生じているのではなく、ゲノム構造上に偏って存在することを、以下の研究で示す。

### GC 含量と高頻度突然変異株の研究

突然変異の要因は様々あるが、DNA 複製の誤りはすべての生物が内包する変異の要因である。そこでまず、バクテリアに保存される DNA 複製酵素 (DnaE, PolC) と修復酵素 (MutL, MutS, DnaQ) の保存性を 70 種類のバクテリアゲノム上で調べた。その結果、フェルミクテス門のバクテリア (低 GC グラム陽性菌) は他のバクテリアとは異なり、DNA 複製ドメインと校正ドメインを持つ PolC を DnaE, DnaQ とともに保存すること、データベース上のすべての放線菌に属すバクテリアは誤対合修復因子 MutS と MutL を持たないことが分かった。放線菌群はバクテリアの中でも極めて高い GC 含量の高いゲノムを有し (> 60%), 高 GC グラム陽性菌群と呼ばれる。

これらの解析結果から、誤対合修復因子の欠損が GC 含量上昇の要因ならば、これらの因子を欠損した株の突然変異は GC に偏ったものとなることが予想される。この仮説を確認するため、GC 含量の低いバクテリアである枯草菌 (約 40%) において *mutS* 遺伝子欠損株を作成、リファンピシン耐性菌が持つ *rpoB* 遺伝子上の突然変異をシーケンス解析により調査した (野生株: 20 株, *mutS*: 30 株)。その結果、*mutS* 欠損株は野生株とは異なり、GC 含量の増加する変異が多く生じていることが分かった。反対に、野生株は *mutS* と比較して GC 含量の低下する変異が多い。さらに、突然変異株の遺伝型の内訳を調べると、*mutS* 欠損株の *rpoB* 上の変異は *rpoB* A1406G (46.7%) と *rpoB* A1445G (36.7%) に集中しており、野生株よりも有意に多いことが分かった ( $p < 0.05$ )。以上から、*rpoB* 上の変異はランダムではなく、DNA 修復因子に関わる遺伝子の遺伝型によって傾向が変わるものであることが示唆された。ゲノム全体の GC 含量の決定要因は定かでは無いが、例えば、*mutS* や *mutL* のような DNA 修復因子の組み合わせにより決定されると考えられる。

### 突然変異が特定のゲノム構造内に存在する高頻度突然変異領域 (Hotspot) に発生したと仮定した場合におけるゲノム上の突然変異分布状況のシミュレーション

続いて、ゲノム全体における突然変異を研究するため、ヒトゲノムの染色体上の SNPs の分布について研究を行った。もしも SNPs がゲノム上にランダムに生じるならば、SNPs 間距離の頻度の分布は一様分布になる。ところが、ヒトゲノムの SNPs 間距離の頻度を調べるとべき分布 (指数分布) であることが分かったが、その原因は不明であった。そこで、筆者

はヒトゲノム上の SNPs 間距離の分布がべき分布である原因が、ヒトゲノムの細胞内における立体構造内に高頻度変異領域 (ホットスポット) が存在することを仮定して SNPs 分布のシミュレーションを行った。ヒトゲノムの立体構造はヒルベルト曲線と呼ばれる規則的な立体構造を取ることが知られる。そこで、ヒルベルト曲線上に等間隔に座標を割り当てた 16x16 のマトリクスを作成し、高頻度変異領域と仮定した円に内包された座標を求め、座標間距離の分布を調べた。その結果、シミュレーション上の SNPs 間距離の分布は、ヒトゲノムのデータと同様にべき分布となることが分かった。また、マトリクス上をランダムに選択し、座標間距離の頻度をプロットした場合、近似直線の傾きは前者と比べて明らかに低く (円: -3.75, ランダム: -0.57)、一様分布に近い。以上から、ゲノム上に高頻度変異領域 (ホットスポット) を仮定すると SNPs の分布と構造の関係を説明し得ることが示唆された。以上の研究は、DNA 修復因子の遺伝型やゲノム構造によって、突然変異が一定の偏りを持つことを意味する。

## 第 5 章 総合討論, および結論 相同組換え酵素の進化プロセスについて

以上の研究結果を踏まえ、相同組換え酵素遺伝子の祖先配列の獲得から相同組換え能獲得までのプロセスを考える。相同組換え酵素遺伝子の分子系統解析結果から、各相同組換え酵素遺伝子は独立に進化した (収斂進化) と考えられる。ここで、*recA* に注目する。*recA* クレードにおける OTU (Operational Taxonomic Unit) はまだらであることから、*recA* 遺伝子はバクテリア間で水平伝播したことが示唆された。*recA* クレードの根元側のクレードには、ミトコンドリア (植物) に続いてシアノバクテリアと葉緑体がある。つまり、相同組換え酵素遺伝子の祖先配列を初期段階で獲得したのはミトコンドリアのような ATP を過剰に生産するバクテリアであったということになる。細胞内の過剰な酸化は、DNA 損傷の要因となる。実験において、MuB に DNA 損傷修復能は見られなかったことから、組換え酵素遺伝子の祖先配列は、ATP を消費し DNA を保護する因子として利用された可能性が考えられる。ミトコンドリアの次に光合成バクテリア (シアノバクテリア、葉緑体) のクレードが存在することから、ATP を過剰に生産するバクテリアから光合成バクテリアが組換え酵素遺伝子の祖先配列を受け取り、紫外線や放射線など、細胞外に要因のある DNA 損傷に対応できるようになったと考えられる。以上の研究から、組換え酵素遺伝子の祖先配列はバクテリオファージに保存された DNA 結合型 ATPase であり、*recA* の場合、DNA 損傷修復能獲得のきっかけは細胞内の過剰な酸化 (ATP) による DNA 損傷から保護することであったと考える。バクテリアの DNA 損傷修復能は、光合成を行う過程で浴びる紫外線や放射線を選択圧として高められたと考えられる。

## 審査報告概要

本論文では、DNA 修復・組換えに関わる *recA* 遺伝子についての新たな機能を解明すると共に、その進化的起源を明らかにすることを目的とした。納豆菌のインサーションシーケンス (IS) およびトランスポゾン材料としたトランスポゾン転移解析系を用いて、IS 転移に関わる因子を探索した結果、*recA* が転移に必要であること、RecA タンパク質の二本鎖 DNA 結合活性が重要であることを初めて明らかにした。さらに *recA* と相同な遺伝子 *muB* をバクテリオファージから見出し、トランスポゾン転移において *recA* と同様の機能を持つことを示すとともに、分子系統解析から *recA* 遺伝子の進化を考察した。また、分子系統解析および、突然変異体の出現頻度の測定からゲノムの突然変異とそのランダム性についての新たなモデルを提唱した。本研究で得られた結果は、遺伝子やゲノムの進化を分子レベルで理解する上で先駆的なものであり、有用微生物の分子育種等の応用に向けた展開も期待できる。主査および副査から審査報告がなされ、専攻内可否を審議した。その結果、学位請求者の経歴や学術業績が学位記申請の要項を満たしていること、外国語を含む最終試験に合格していること、学位請求論文の研究内容や発表会での質疑応答の内容が十分であることが認められた。よって、審査員一同は博士 (バイオサイエンス) の学位を授与する価値があると判断した。