

# 論文審査の結果の要旨

氏名 張 英彪

本論文は、次のように構成されている。

Introduction

Materials and methods

Results

Discussion

うち、Results は次の項からなる。

1 Mesophilic R.PabI homologs has endonuclease (AP lyase) activity

2 Restriction of phage and chromosome *in vivo*

3 Difficulty in repair by rejoining of the cleavage ends

制限酵素は、分子生物学で中心的な役割を果たして来た。張氏がかつて属した小林研究室（メディカル情報生命専攻・微生物ゲノムシステム学分野）などの研究により、制限酵素と修飾酵素からなる制限修飾系が、利己的な動く遺伝子として振る舞う事、細菌の適応に重要な役割を果たす事が示されている。当該研究室は、制限修飾系が動く遺伝子であることに基づいて、ゲノム配列比較から、新しいタンパク基本立体構造（フォールド）であるハーフパイプ構造をもつ制限酵素スーパーファミリーを発見した。この制限酵素と DNA との共結晶の解析から、この制限酵素が認識配列内の塩基を切り出すことが明らかになった。これまで知られているすべての制限酵素は、ヌクレオチド単位を連結するリン酸ジエステル結合を加水分解し、3'-OH, 5'-P の段端を残すものであった。この制限酵素はまったく新しいクラスの制限酵素であり、restriction glycosylase と名付けられた。

しかし、この制限酵素の制限作用における鎖切断の役割については、明らかでなかった。ひとつの報告では、この制限酵素による鎖切断は、塩基切り出しによってできる脱塩基サイトの熱による加水分解によるものであり、この酵素はエンドヌクレアーゼではないと結論づけられた。この制限酵素 R.PabI は、超好熱古細菌由来であり、切断の最適温度は 85C である。別の論文は、この酵素自体に、脱塩基サイトを切断し、非典型的な断端を作るエンドヌクレアーゼ(AP リアーゼ)活性を検出した。しかし、この酵素で中温域(37C)で処理した鎖切断をひとつも持たないプラスミド DNA は、大腸菌へのトランスフォーメーション活性を失った。

このスーパーファミリーによる制限と鎖切断の関係を明らかにするために、本研究では超好熱古細菌でなく、中温菌の系をもちいた。

まず、張氏は、中温菌であるカンピロバクター・コリとピロリ菌のこの酵素のホモログ(R.CcoLI, R.HpyAXII)を発現、精製した。それらが、鎖切断活性、塩基切り出し活性、AP リアーゼ活性を 37C で持つ事を示した。

R.PabI あるいは R.CcoLI を発現する大腸菌で、導入するファージおよび内在染色体の制限を示した。R.PabI による制限には、大腸菌の AP endonucleases (Endonuclease IV および Exonuclease III) が関与していた。さらに、プラスミドを R.PabI で 37C で処理した場合にも、制限に大腸菌の AP endonucleases が関与していた。これらの結果は、これら R.PabI ファミリーの制限活性に、エンドヌクレアーゼが関与すること、そのエンドヌクレアーゼは、酵素自身のもつ AP リアーゼだけでなく、AP endonuclease でもありうることを強く示唆している。これらは、以前の論文での「R.PabI がエンドヌクレアーゼではない」という主張を否定する。

さらに、プラスミドを 37C で、R.CcoLI で処理したとき、あるいは R.PabI で処理してから AP endonuclease (Endonuclease IV) で処理したときの、形質転換能の減少は、リガーゼ処理で回復しなかった。これは、この制限酵素の生物学的意義が、再結合による修復が困難な切断を侵入非メチル DNA にもたらすことにある事を示唆した。

これらの結果は、これらの新しいクラスの制限酵素の作用機構と生物学的意義の解明に大きく寄与し、新しい研究分野を切り開いたオリジナルで質の高いものと評価出来る。

なお、本論文 Results 1 は、井出博、中野敏彰 Tomoyuki Matsuzaka、矢野大和、石川健、小林一三との共同研究、Results 2 および 3 は、矢野大和、福世真樹、高橋規子、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（医科学）の学位を授与できると認める。

以上 1929 字