

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		ゲノムの高レベル進化速度に寄与する相同組換えの分子機構			
研究テーマ (欧文) AZ		Molecular mechanism of homologous recombination in highly genome plastic microorganism			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	ハンダ	ナオフミ	研究期間 B	2009 ~ 2010 年
	漢字 CB	半田	直史	報告年度 YR	2011年
	ローマ字 CZ	HANDA	NAOFUMI	研究機関名	東京大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻バイオ医療知財分野・特任助教			
<p>概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)</p> <p>世界のおよそ半数の人の胃に感染しているピロリ菌は、慢性胃炎や胃癌の原因菌とも言われている。この細菌は、自然形質転換能を有し、環境中の DNA を自己ゲノムに容易に取り込む。我々は、複数の日本人から得られたピロリ菌の全ゲノム配列を明らかにし、その構造的特徴を明らかにするとともに、高頻度組換えの証拠を得た (BMC Microbiology 2011、投稿中)。この解析の中で、相同組換えを介して遺伝子が新生、あるいは破壊される新しいモデルを発表することができた (PNAS 2011)。</p> <p>その高い相同組換えを可能にする分子機構を明らかにするために、大腸菌の組換え関連遺伝子と相同性のあるピロリ菌 (26695 株) の RecA、RecO、RecR、RecJ、RecN、SSB 遺伝子が大腸菌用の発現ベクターにクローニングした。作成された発現ベクターから目的遺伝子産物の発現を確認することができた。これらピロリ菌遺伝子によって大腸菌の各遺伝子欠損株の紫外線感受性を相補することはできなかったが、発現ベクターには精製を容易にするためのタグが付加されているので、そのために生物的活性が抑えられている可能性がある。</p> <p>タグを切断して精製されたピロリ菌の RecA タンパク質は、大腸菌由来の RecA タンパク質と同程度の効率で相同 DNA 鎖の対合反応を行うことができた。ピロリ菌は胃のような低い pH 環境下で活動しているが、タンパク質に耐酸性能があるわけではなく、中性域で効率よく反応した。このことは、ピロリ菌が自分の周りを中和して生育しているという観察と合う。驚いたことに、ピロリ菌由来の RecA タンパク質で作られた組換え中間体は、大腸菌のもので作られたそれよりも長く安定に存在し、また、より多くの相同鎖を対合させる可能性が示唆された。このことはピロリ菌の高い組換え能と関係があるのかもしれないが、他の組換えタンパク質との協調反応により更に詳細に検討する必要がある。</p> <p>最後に、ピロリ菌のゲノム構造の高度な可塑性を明らかにするために、継代培養しているピロリ菌のゲノムDNAを適当な制限酵素で処理して、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて解析したが、培養中のピロリ菌ゲノムは非常に壊れやすく、パルスフィールドゲル電気泳動用の穏やかな方法を使っても壊れていない状態のゲノムDNAを解析することができなかった。</p>					
キーワード FA	相同組換え	ゲノム再編	ピロリ菌		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入して下さい）									
雑誌	論文標題 GB	Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: <i>Helicobacter pylori</i> East Asian genomes.							
	著者名GA	Kawai M et al. (他11名)	雑誌名GC	BMC Microbiology					
	ページGF	104 (28頁)	発行年GE	2	0	1	1	巻号GD	11
雑誌	論文標題 GB	Birth and death of genes linked to chromosomal inversion							
	著者名GA	Furuta et al. (他11名)	雑誌名GC	Proc Natl Acad Sci USA					
	ページGF	1501~1506	発行年GE	2	0	1	1	巻号GD	108
雑誌	論文標題 GB	Cleavage of a model DNA replication fork by a methyl-specific endonuclease							
	著者名GA	Ishikawa, Handa et al. (他3名)	雑誌名GC	Nucleic Acids Research					
	ページGF	5489~5498	発行年GE	2	0	1	1	巻号GD	39
雑誌	論文標題 GB	相同組換え初期反応に重要なリセクション							
	著者名GA	半田直史	雑誌名GC	生化学(日本生化学会)					
	ページGF	5~9	発行年GE	2	0	1	0	巻号GD	82-2
図書	著者名HA								
	書名HC								
	出版者HB		発行年HD					総ページHE	

欧文概要EZ（ワープロ作成原稿の切り貼りで結構です。）

Helicobacter pylori, a popular bacterium causing many gastric diseases, has natural competence to uptake DNA from environment. We sequenced whole genome nucleotide sequence of some independent strains from Japanese patients. As results, we revealed structure of their individual genome and found evidences of highly frequent recombination (Kawai et al. BMC Microbiology 2011). Furthermore, we could propose a model of birth or death of gene by recombination (Furuta et al. PNAS 2011).

To reveal molecular mechanism of the high frequent recombination, I cloned and expressed all recombination related genes, *recA*, *recO*, *recR*, *recJ*, *recN* and *ssb* from a *H. pylori* strain, 26695. Probably due to the expression vector added tag sequence to the protein, they could not complement UV sensitivity of the corresponding gene defective *E. coli* cells.

The purified RecA^{hp} protein without tag showed ability of homologous DNA strand exchange comparable to *E. coli* RecA protein. I found that the RecA protein is active at natural pH, but is inactive under lower pH suggesting that they live in the neutralized local environment. Surprisingly, the recombination intermediate products made by the *H. pylori* RecA was stable than that made by *E. coli* RecA. Furthermore, it may include more homologous DNA stretches. These could contribute to their high frequency of the recombination. Further investigation with some other Rec proteins should provide insight into the detail of the mechanism.

Finally, I tried to analyze real-time genome structural change during culture by using a pulsed-field gel electrophoresis. However, it was too hard to recover intact genome DNA even cell was lysed in gel plug to isolate genomic DNA gently.