

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440009

研究課題名(和文) DNA損傷応答によりDNA複製フォークの進行をスローダウンする機構の解明

研究課題名(英文) Study of mechanisms that decrease speed of replication fork progression in DNA damage response

研究代表者

秋山 昌広 (Akiyama, Masahiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：80273837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：複製フォーク進行の異常は、ゲノム不安定性から疾患に繋がる。そこでDNA損傷応答機構は、その異常に対処してゲノムを安定に保つ。しかし、複製フォークの細胞内動態や、その動態への損傷応答の影響は不明である。この問題を大腸菌で解明するため、複製フォーク速度を正確に測る新しい方法を開発した。そして、細胞内の複製フォークの速度分布はかなり均一であること、また、その速度は主に複製装置のDNAポリメラーゼIIIが決めることを明らかにした。さらに、DNA損傷応答では、dinBによるDNAポリメラーゼIIIの複製フォークからの解離、および、recAの新規機能が、複製フォーク速度の減少に働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：When replication fork progression is aberrant, genome becomes instable by replication stress, leading to pathological disorders. Thus, the DNA damage response ensures genomic stability under replication stress. However, the dynamics of fork movements in cells and impact of the damage response on the dynamics remains unknown in any organism. To approach these problems in *Escherichia coli* cells, I had developed a new technique to accurately measure fork speed in the cells. Here, using the technique, we found that speed distribution of individual forks is relatively uniform but contains three subpopulations that have different speeds. A major determinant of fork speed was DNA polymerase (Pol) III in the replication machinery. Furthermore, onset of the DNA damage response uniformly decreased speed of individual forks. The slowdown mechanism was operated by detachment of the major speed determinant, Pol III, from forks by DinB (pol IV), and a noble function of RecA recombinase.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 複製フォーク DNA損傷応答 SOS応答 一分子解析 DNAコーミング DNAポリメラーゼ DNA組換え酵素

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 複製フォークの細胞内動態

染色体の複製では、DNA ポリメラーゼなどの多数の複製酵素が巨大な複合体を形成して、新生 DNA 鎖を合成しながら Y 字型の複製フォークと共に染色体上を移動する (Kornberg and Baker, 1992)。大腸菌での DNA 複製の生化学的な解析は、個々の複製酵素の基本的な働きの解明に多大な貢献をしてきた (Higuchi *et al.*, 2003; van Oijen & Loparo, 2010)。そして、その知見は真核生物にも概ね当てはまる (O'Donnell *et al.*, 2013)。

ところが、これらの生化学的な解析では、DNA 基質は多様な塩基配列やトポロジーを持つ細胞内の DNA を反映していない。また、細胞内のゲノム DNA は裸でなく、バクテリアで核様体タンパク質、あるいは、真核生物でヒストンにより凝集した染色体構造を形成している。さらに、細胞内の複製フォークは、転写装置の RNA ポリメラーゼとの衝突、DNA の損傷、あるいは、細胞応答などによって影響を受けている (Mirkin and Mirkin, 2007; Branzei and Foiani, 2010)。

一方、複製フォークの進行阻害がゲノム不安定性を生むと、ヒトでは発癌等の疾患に繋がる (Gaillard *et al.*, 2015)。そのため、細胞内での複製フォーク動態の解明は、DNA 複製とゲノム安定性の関係を理解するために重要である。しかし、細胞の生理条件に依存した動的変動を含めて、複製フォークの細胞内動態の全体像はバクテリアでも真核生物でも未解明であり、複製酵素の生化学的な解析などから想像されるレベルに留まっている。

### (2) DNA 損傷応答時の DNA 複製

DNA の傷などにより DNA 複製が阻害されると、ゲノムを安定に保つために、バクテリアは SOS 応答、真核生物はチェックポイントと呼ばれる DNA 損傷応答機構を活性化する (Friedberg *et al.*, 2006)。チェックポイントでは、複製フォークの速度がスローダウンする。この DNA 損傷応答による複製フォーク進行の調節は、損傷した染色体 DNA の複製によって生じるゲノム不安定性の抑制と関係している。しかし、その分子機構はいずれの生物種でも解明されていない。約 50 年前に提唱されて最も解明が進んでいる大腸菌の SOS 応答は、複製フォークの速度調節の観点からこれまで研究されておらず、複製フォーク速度のスローダウンさえも証明されていなかった (Kreuzer, 2013)。

### (3) 大腸菌細胞内の複製フォーク

大腸菌は真核生物よりも単純なゲノム構造を持ち、DNA 複製の理解が進んでいるにも拘らず、細胞内の複製フォークの動態解明は進んでいない。正常時および DNA 損傷応答時の大腸菌細胞内での複製フォークの動態

は未解明のままである。それは、増殖速度の速い大腸菌で、真核生物よりも 10 倍以上も速い複製フォークの速度を正確に測ることが困難なためであった。そこで、大腸菌細胞内で複製フォークの速度を一分レベルで正確に測定して、その生理的な動態を議論できる方法が望まれていた。

### (4) 大腸菌の DNA 複製研究の新局面

本研究の代表者は、大腸菌を用いた細胞内の複製フォーク動態の解明を目指して、本研究の準備段階で、一分子レベルで大腸菌細胞内の複製フォーク速度を正確に測定できる新しい実験系 (eCOMB 法、イーコム法) を開発した。そして、人為的に SOS 応答を恒常的に誘導すると、複製フォークの平均速度が有意に減少すること、さらに、その減速に進化的に保存された少なくとも二つの遺伝子 (*dinB* と *recA*) が働くことを予備的に明らかにした。しかし、この予備的な実験で、SOS 応答は恒常的に誘導されており、生理的な条件とは異なっていた。また、SOS 応答では *dinB* と *recA* を含む 40 種類の遺伝子 (SOS 遺伝子群) の発現が上昇しており、*dinB* と *recA* 以外の遺伝子の発現上昇も減速に関わっている可能性を研究開始当初は否定できなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、複製フォークの速度を正確に測る新規の実験法を用いて、大腸菌細胞で正常時と SOS 応答時の複製フォーク動態の詳細を解明する。さらに、*dinB* と *recA* 遺伝子が SOS 応答時に複製フォークの進行をスローダウンする機構についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA 分子コーミング法

DNA 分子コーミング法 (DNA molecular combing) では、複製開始の頻度や細胞内の複製フォークの数に影響を受けずに、複製フォークごとに単分子速度 (single-molecule rate) を決定できる (Bensimon *et al.*, 1994)。この方法では、プロモ・デオキシウリジン (BrdU) などのチミジンの類似体でパルス標識した細胞のゲノム DNA を真っ直ぐに伸張して、ガラス表面に一分子ずつファイバー状に固定する。その DNA ファイバーに対してチミジン類似体に対する蛍光抗体を反応させてから、顕微鏡でチミジン類似体を可視化してパルス標識された DNA ファイバーの長さを測る。つまり、細胞内の 1 分子の複製フォークでパルス標識時間あたりに合成された DNA の長さを可視化して、1 分子の複製フォークの速度を正確に求める。

### (2) eCOMB 法

DNA 合成速度の速い大腸菌に DNA 分子コーミング法を適用するためには、BrdU を数分間で取り込む大腸菌株が必要である。しかし、そのような細胞株はこれまでに存在しな

かった。そこで、野生型 K12 株である MG1655 細胞をゲノム改変技術 (Datsenko and Wanner, 2000) で改変して、BrdU を数分間に非常に高い効率で取り込む新規のチミジン要求性の大腸菌株 eCOMB (イコーム, *E. coli for combing*) を作製した (Pham *et al.*, 2013)。この eCOMB 細胞と DNA 分子コーミングによって複製フォークの速度を極めて正確に測定できる新しい実験法 (eCOMB 法) を本研究の解析に使用した (Pham *et al.*, 2013)。複製フォークの平均速度は、経時的に BrdU で標識した eCOMB 細胞を用いて求めた。また、様々な変異をゲノム改変技術で eCOMB 細胞に導入して複製フォークの動態解析に使用した。

### (3) *dinB* と *recA* 遺伝子の過剰発現

SOS 応答では、LexA リプレッサーの不活性化によって、*dinB* と *recA* 遺伝子を含む 40 種類以上の SOS 遺伝子群の発現が上昇する (Kreuzer, 2013)。*dinB* と *recA* 遺伝子が複製フォーク速度を減速する機構を解明するために、*dinB* と *recA* 遺伝子だけを SOS 応答と生理的に同じレベルに過剰発現する。そのために、LexA リプレッサーが結合するプロモーター部位を変異させた遺伝子をプラスミドにクローン化して、1 コピーで細胞に導入して eCOMB 法で複製フォークの動態を解析した。また、このプラスミドの遺伝子に様々な変異を導入して同様に eCOMB 法で複製フォークの動態を解析した。さらに、*dinB* を過剰発現した細胞の突然変異は、抗生物質リファンピシリンに対する耐性変異頻度によって解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 正常な大腸菌の複製フォークの動態：

本研究では、複製フォークの単分子速度を極めて正確に測定できる eCOMB 法 (Pham *et al.*, 2013) を用いて、複製フォークの動態を解明した。まず、正常な大腸菌細胞内で、複製フォーク速度の分布を初めて決定した。その結果、個々の複製フォーク進行の速度はかなり均一であった。さらに、速度分布の統計的な解析から、複製フォークの速度分布は少なくとも 3 つの速度集団から構成されていることが初めて示された。このうち最も遅い速度集団の複製フォークは、染色体上の転写装置などの要因によって進行を阻害されて減速されている可能性がある。

### (2) 大腸菌の複製フォーク進行の駆動力：

大腸菌の複製フォークで働く複製装置の中で分子モーターは、六量体 ATPase の DnaB DNA ヘリカーゼ、ヌクレオチドを重合する DNA ポリメラーゼ III (Pol III)、RNA プライマーを合成する DnaG プライマーゼである (Patel *et al.*, 2011)。これらのどの分子モーターが複製フォーク進行の駆動力に最も貢献しているかは明らかでなかった。そこで、ヌクレオチドの重合速度が 1/3 に低下した

Pol III の *dnaE173* 変異 (Sugaya *et al.*, 2002) を eCOMB に導入して、複製フォークの速度を eCOMB 法で解析した。その結果、複製フォークの平均速度は 1/3 に低下していたことから、DNA ポリメラーゼのヌクレオチド重合活性が細胞内の複製フォークの推進力に主要な貢献をしていることが初めて明らかとなった。

さらに、この *dnaE173* 細胞では、複製フォークの速度が減少しても、細胞体積あたりの平均 DNA 合成量が野生株と同等であることを見出した。この結果は、細胞内の複製フォークの進行速度の変化に合わせて複製開始のタイミングを調節して、染色体 DNA 量を一定に保つ機構があることを示唆する。

### (3) SOS 応答時の細胞のフォーク動態：

DNA 損傷時に蓄積する一本鎖 DNA に RecA タンパク質が結合すると活性化される。この活性化された RecA は LexA リプレッサーを自己切断させる。その結果、LexA リプレッサーによって発現抑制されていた 40 種類以上の SOS 遺伝子群の発現が上昇して、一過的に SOS 応答が誘導される。準備段階で、LexA リプレッサーをコードする *lexA* 遺伝子を eCOMB 細胞で欠損させて人為的に恒常的な SOS 応答を誘導して、複製フォークの速度を解析した。そして、複製フォークの速度は SOS 応答によって有意に半減することを予備的に明らかにした。

本研究では、SOS 応答のマスター遺伝子である *recA* 遺伝子の温度感受性変異 *recA441* (Lavery and Kowalczykowski, 1988) を eCOMB 細胞に導入して、温度シフトによって一過的に SOS 応答を誘導して eCOMB 法で複製フォークの速度を解析した。その結果、生理的な条件と同様に RecA を介して一過的に誘導された SOS 応答時でも複製フォークの速度は有意に半減することを明らかにした。さらに、SOS 応答時の複製フォークの速度分布を決定したところ、その分布の全体が低速領域にシフトしており、個々の複製フォーク進行が SOS 応答で一様に減速することが明らかとなった。

前述のように、複製装置の DNA ポリメラーゼの *dnaE173* 変異によって複製フォークの速度が減少しても、細胞体積あたりの平均 DNA 合成量が野生株と同等であった。しかし、SOS 応答を発現している細胞で複製フォークの速度が減少した際には、平均 DNA 合成量は野生株と比べて減少していた。これは、複製開始タイミングを調節する機構が SOS 応答では働かず、複製フォーク速度の減少が DNA 複製の遅延に結びつくことで、DNA 損傷によるストレスに対処している可能性を示唆している。

### (4) *dinB* 又は *recA* による複製の減速：

*dinB* と *recA* 遺伝子を SOS 応答時と同じ生理的なレベルに過剰発現するプラスミドを、損傷応答していない正常な eCOMB 細胞に導

入して、DNA複製フォークの速度を測定した。その結果、いずれのプラスミドでも複製フォークの進行は減速した。この本研究での結果から、SOS応答時の *dinB* と *recA* 遺伝子の発現上昇だけが、それぞれ独立に複製フォーク進行のスロウダウンに必要であり、それら以外の SOS 遺伝子群の発現上昇は減速に必要ないと結論できた。

一般的に、DNA損傷などによる複製フォークの進行阻害はゲノム不安定性に繋がる (Friedberg *et. al.*, 2006)。そこで、SOS 応答時の *dinB* 遺伝子による複製進行の阻害がゲノム安定性を生じるかを、*dinB* 遺伝子を SOS 応答時と同じレベルに過剰発現した eCOMB 細胞で生じる突然変異を検出して検討した。その結果、*dinB* 遺伝子の生理的なレベルでの過剰発現は、突然変異頻度にほとんど影響しないことが明らかとなった。このことは、SOS 応答時の複製フォーク進行の調節はゲノム安定性に影響せずに、一般的な複製阻害とは異なることを示唆している。

#### (4) *dinB* によるフォーク進行の減速機構:

試験管内の生化学的な解析から、*dinB* にコードされた DNA ポリメラーゼ IV (Pol IV、または DinB) は、Pol III よりも遅いヌクレオチド重合活性、さらに、Pol III を複製フォークから解離させる活性を持つことが解っている (Furukohri *et. al.*, 2008; Uchida, *et. al.*, 2008)。Pol IV の遅いヌクレオチド重合活性が複製フォーク進行のスロウダウンに必要なことを遺伝学的に解析するために、DNA 合成活性を欠損した変異型の *dinB* 遺伝子を本研究で作成したプラスミド発現系で発現させて DNA 複製の速度を測定した。その結果、この変異型の *dinB* でも複製フォークの減速を生じた。この結果は、Pol III よりも遅い Pol IV 活性のヌクレオチド重合は複製フォークの速度低下の原因でないことを示す。

Pol IV が Pol III を複製フォークから解離させる活性には Pol IV の C 末端のアミノ酸配列が関与している。そこで次に、この C 末端配列を欠損した変異型の *dinB* 遺伝子をプラスミド発現系で過剰発現して、複製フォークの速度を解析した。その結果、この Pol IV の領域は複製フォーク速度の減少に必要なことを明らかにした。これまでの生化学的な解析結果と合わせて考えると

(Furukohri *et. al.*, 200; Uchida, *et. al.*, 2008)、Pol IV による複製フォークの減速には、Pol III を複製フォークから解離して、複製フォーク進行への駆動力提供を一時的に阻害することが関与している。しかし、Pol IV のヌクレオチド重合は減速に関与しないことから、Pol IV が Pol III と入れ変わって、遅いヌクレオチド重合によって小さな駆動力を複製フォークに提供することが減速に大きく寄与していない。

#### (5) *recA* によるフォークの減速機構:

*recA* は SOS 応答のマスター遺伝子であると

共に、DNA 相同組換えに働く RecA リコンビナーゼをコードしている (Cox, 2007)。*recA* には様々な変異遺伝子が単離されており、それらが細胞中の多様な RecA 機能の理解に役立ってきた (Cox, 2007)。RecA のどのような機能が複製フォーク進行のスロウダウンと関係しているかを、既知の様々な *recA* 変異遺伝子を eCOMB 細胞に導入して、eCOMB 法で複製フォークの速度を測って、複製フォーク進行のスロウダウンに寄与する *recA* の機能を遺伝学的に検討した。

*recA441* 変異を持つ細胞は 42 度で培養すると、通常細胞に存在する生理的なレベルの一本鎖 DNA に対する RecA の結合が促進されて、RecA タンパク質が DNA 損傷なしでも活性化されて SOS 応答が誘導される (Lavery and Kowalczykowski, 1988)。この *recA441* 変異を eCOMB 細胞に P1 形質導入法で導入して、eCOMB *recA441* 細胞を作成した。この細胞を 42 度で培養して、複製フォークの進行を調べたところ、その速度は *lexA* を欠損した eCOMB 細胞と同等に低下していた。しかし、活性化された RecA で自己切断されない *LexA* をコードする *lexA51* 変異を eCOMB *recA441* 細胞に導入すると、42 度でも SOS 応答は誘導されず、複製フォークの速度は野生株並みに回復した。この結果から、*recA* の一本鎖 DNA への結合や、RecA の活性化自体は複製フォークの速度低下に直接関与しないことが明らかとなった。

DNA 組換え反応には RecA の ATPase 活性と二本鎖 DNA 結合活性が必須である。次に、それぞれの活性を欠損した変異型 *recA* を eCOMB で過剰発現して複製フォークの速度を測定したところ、両方の活性は複製フォーク進行の減速に関与しないことが明らかとなった。これらの結果は、*recA* による複製フォーク進行の減速が、DNA 鋳型に結合した RecA による物理的なフォーク進行阻害によって生じている可能性を否定する。さらに、RecA による SOS 応答時の複製フォークの減速機構には、DNA 相同組換え以外の RecA の新規の機能が働いていることを示す。

#### <引用文献>

Bensimon, A., Simon, A., Chiffaudel, A., Croquette, V., Heslot, F., and Bensimon, D. (1994) Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, **265**, 2096-2098.

Branzei, D. and Foiani, M. (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 2018-2019.

Cox, M.M. (2007) Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 41-63.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal

genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Procs. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 6640-6645.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A. and Ellenberger, T. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*. second ed. American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.

Furukohri, A., Goodman, M.F. and Maki, H. (2008) A dynamic polymerase exchange with *Escherichia coli* DNA polymerase IV replacing DNA polymerase III on the sliding clamp. *J. Biol. Chem.*, **283**, 11260-11269.

Gaillard, H., Garcia-Muse, T. and Aguilera, A. (2015) Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 276-289.

Higuchi, K., Katayama, T., Iwai, S., Hidaka, M., Horiuchi, T., and Maki, H. (2003) Fate of DNA replication fork encountering a single DNA lesion during *oriC* plasmid DNA replication *in vitro*. *Genes Cell*, **8**, 437-449.

Kreuzer, K.N. (2013) DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harb. Perspect.*, **5**, a012674.

Kornberg, A., and Baker, T. (1992) *DNA Replication*. W. H. Freeman and Company, New York.

Lavery, P.E. and Kowalczykowski, S.C. (1988) Biochemical basis of the temperature-inducible constitutive protease activity of the RecA441 protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **203**, 861-874.

Mirkin, E.V., and Mirkin, S.M. (2007) Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**, 13-35.

O'Donnell, M., Langston, L. and Stillman, B. (2013) Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a010018.

Patel, S.S., Pandey, M., and Nandakumar, D. (2011) Dynamic coupling between the motors of DNA replication: hexameric helicase, DNA polymerase, and primase. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 595-605.

Pham T.M., Tan K.W., Sakumura Y., Okumura K., Maki H. and Akiyama M.T. \* (2013) A single-molecule approach to DNA replication in *Escherichia coli* cells demonstrated that DNA polymerase III is a

major determinant of fork speed. *Mol. Microbiol.*, **90**, 84-596.

Sugaya, Y., Ihara, K., Masuda, Y., Ohtsubo, E., and Maki, H. (2002) Hyper-processive and slower DNA chain elongation catalysed by DNA polymerase III holoenzyme purified from the *dnaE173* mutator mutant of *Escherichia coli*. *Genes Cells* **7**, 385-399.

Uchida, K., Furukohri, A., Shinozaki, Y., Mori, T., Ogawara, D., Kanaya, S., Nohmi, T., Maki, H. and Akiyama, M. (2008) Overproduction of *Escherichia coli* DNA polymerase DinB (Pol IV) inhibits replication fork progression and is lethal. *Mol. Microbiol.*, **70**, 608-622.

van Oijen, A.M., and Loparo, J.J. (2010) Single-molecule studies of the replisome. *Ann. Rev. Biophys.*, **39**, 429-448.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に下線)

(雑誌論文) (計 4 件)

① Akiyama, M. T. \*, Ohima, T., Chumsakul, O., Ishikawa, S. and Maki, H., Replication fork progression is paused in two large chromosomal zones flanking the DNA replication origin in *Escherichia coli*. *Gene to Cells*, **21**, 907-914 (2016). doi: 10.1111/gtc.12388. (査読あり)

② Tan, K. W., Pham, T. M., Furukohri, A. Maki, H. and Akiyama, M. T. \*, Recombinase and translesion DNA polymerase decrease the speed of replication fork progression during the DNA damage response in *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*, **43**, 1714-1725 (2015). doi: 10.1093/nar/gkv044. (査読あり)

③ Ikeda M., Furukohri A., Philippin G., Loechler E., Akiyama M.T., Katayama T., Fuchs R. and Maki H., DNA polymerase IV mediates efficient and quick recovery of replication forks stalled at N2-dG adducts. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8461-8472 (2014). doi: 10.1093/nar/gku547. (査読あり)

④ Pham T.M., Tan K.W., Sakumura Y., Okumura K., Maki H. and Akiyama M.T. \*, A single-molecule approach to DNA replication in *Escherichia coli* cells demonstrated that DNA polymerase III is a major determinant of fork speed. *Mol. Microbiol.*, **90**, 84-596 (2013). doi: 10.1111/mmi.12386. (査読あり)

(学会発表) (計 15 件)

① 秋山昌広、Profiling of DNA replication

fork、第10回・3R国際シンポジウム、2016年11月14日、ホテル一畑(島根県・島根市)。

② 秋山昌広、大腸菌ゲノム上の複製フォークの動態プロファイリング、日本遺伝学会・第88回大会、2016年9月9日、日本大学(静岡県・三島市)。

③ Tan Kang Wei, Pham Mihn Tuan, 古郡麻子、真木寿治、秋山昌広、大腸菌の *recA* または *dinB* 遺伝子の過剰発現による複製フォーク速度の遅延、第38回・日本分子生物学会年会、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)。

④ 布瀬翔平、Tom Conrad、安藤さやか、豊本奈美江、中村葵、秋山昌広、真木寿治、大腸菌の栄養環境が酸化DNA損傷と活性酸素種に与える影響、日本遺伝学会・第87回大会、2015年9月26日、東北大学(宮城県・仙台市)。

⑤ 秋山昌広、Tan kang Wei, Pham Mihn Tuan, 古郡麻子、真木寿治、大腸菌の *recA* または *dinB* 遺伝子の過剰発現による複製フォーク速度の低下、日本遺伝学会・第87回大会、2015年9月25日、東北大学(宮城県・仙台市)。

⑥ Tan Kang Wei, Pham Mihn Tuan, 古郡麻子、真木寿治、秋山昌広、大腸菌の SOS 応答による DNA 複製フォークの進行速度の低下、第37回日本分子生物学会年会、2014年12月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。

⑦ Ikeda M., Furukohri A., Philippin G., Loechler E., Akiyama MT., Katayama T., Fuchs R. and Maki H. (2014) *Escherichia coli* DNA polymerase IV mediates quick recovery of replication forks stalled at N2-dG adduct. 第9回・3R国際シンポジウム、2014年11月21日、御殿場高原ホテル(静岡県・御殿場市)。

⑧ Pham TM., Tan KW., Sakumura Y., Okumura K., Maki H. and Akiyama MT., A single-molecule approach to DNA replication in *E. coli* cells demonstrated that DNA polymerase is a major determinant of fork speed. 第9回・3R国際シンポジウム、2014年11月20日、御殿場高原ホテル(静岡県・御殿場市)。

⑨ Tan kang Wei, Pham Mihn Tuan, 古郡麻子、真木寿治、秋山昌広、大腸菌の SOS 応答による DNA 複製フォーク速度の減速、日本遺伝学会・第86回大会、2014年9月18日、長浜バイオ大学(滋賀県・長浜市)。

⑩ 古郡麻子、池田美央、西川義人、秋山昌広、片山勉、Fuchs Robert、真木寿治、大腸菌損傷乗り越え DNA Polymerase IV の複製フォークにおける役割、日本遺伝学会・第86回大会、2014年9月17日、長浜バイオ大学(滋

賀県・長浜市)。

⑪ Ikeda M., Furukohri A., Philippin G., Loechler E., Akiyama MT., Katayama T., Fuchs R. and Maki H., DNA polymerase IV mediates efficient and quick recovery of replication forks stalled at N2-dG adduct. 3rd Zing conference on DNA polymerases, 2014年9月1日、ケンブリッジ大学(ケンブリッジ市・イギリス)。

⑫ Pham TM., Tan KW., Sakumura Y., Okumura K., Maki H. and Akiyama MT., A single-molecule approach to DNA replication in *E. coli* cells demonstrated that DNA polymerase is a major determinant of fork speed. 3rd Zing conference on DNA polymerases, 2014年9月1日、ケンブリッジ大学(ケンブリッジ市・イギリス)。

⑬ Pham Mihn Tuan, Tan Kang Wei, 作村論一、奥村克純、真木寿治、秋山昌広、大腸菌細胞における DNA 複製フォークの進行速度に関する一分析解析、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)。

⑭ Pham Mihn Tuan, Tan Kang Wei, 作村論一、奥村克純、真木寿治、秋山昌広(2013年)大腸菌細胞の DNA 複製フォーク速度の単分子解析、日本遺伝学会・第85回大会、2013年9月20日、慶応大学(神奈川県・横浜市)。

⑮ Pham Mihn Tuan, Tan Kang Wei, 作村論一、奥村克純、真木寿治、秋山昌広、DNA polymerase III is a major determinant of replication fork speed in *Escherichia coli*, 日本遺伝学会・第85回大会、2013年9月19日、慶応大学(神奈川県・横浜市)。

【図書】(計0件)

【産業財産権】(計0件)

【その他】

ホームページ <http://bsw3.naist.jp/maki/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

秋山 昌広 (Masahiro Akiyama)  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科・准教授  
研究者番号：80273837

### (2)連携研究者

真木 寿治 (Hisaji Maki)  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科・教授  
研究者番号：20199649

片山 勉 (Tsutomu Katayama)  
九州大学  
薬学研究科(研究院)・教授  
研究者番号：70264059