



Title	The second subunit of DNA polymeraseIII (δ) is encoded by the HYS2 gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	橋本, 恵至
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40696
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

氏名	橋本恵至
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13700号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	The second subunit of DNA polymerase III (δ) is encoded by the HYS2 gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母DNAポリメラーゼIII(δ)の第2サブユニットはHYS2遺伝子によってコードされる)
論文審査委員	(主査) 教授 杉野 明雄
	(副査) 教授 品川日出夫 教授 花岡 文雄

論文内容の要旨

【目的】

出芽酵母では3つのDNAポリメラーゼI(α), II(ϵ), III(δ)が生育および染色体DNA複製に必須である。これらのうちDNAポリメラーゼIII(δ)は増殖細胞核抗原(PCNA)および複製因子C(RF-C)と共にホロ酵素を形成しプロセッシビティの高いDNA合成を行うことからリーディング鎖あるいはラギング鎖を合成する主なDNAポリメラーゼと考えられている。DNAポリメラーゼIIIはCDC2(POL3)遺伝子によってコードされた125kDaのポリペプチドでポリメラーゼ活性と共に3'→5'エキソヌクレアーゼの触媒活性を持つことが解っているが、その正確なサブユニット構造や他のサブユニットの機能およびコードする遺伝子は未だ明らかにされていない。そこで本研究ではDNAポリメラーゼIIIの第2のサブユニットをコードする遺伝子を同定し、その機能を解明することを目的とした。

【方法ならびに成績】

まず出芽酵母細胞4kgから粗抽出液を調整し、SP Sepharose, Q Sepharose, Mono S, HydroxyapatiteおよびHeparin Sepharoseを用いてカラムクロマトグラフィーを行いDNAポリメラーゼIIIを精製した。この標品をさらに0.1mlのMono Sカラムで濃縮し酵素活性と挙動を共にする125kDaおよび55kDaのポリペプチドをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって切り出しアミノ酸配列を部分的に決定した。その結果125kDaのポリペプチドからは8アミノ酸と10アミノ酸のポリペプチドの配列が得られ、これらはCDC2遺伝子の塩基配列から推測されるアミノ酸配列と一致した。この結果はCDC2遺伝子とその遺伝子産物(Cdc2蛋白質)を直接結び付ける最初の証明である(これまでcdc2突然変異株を用いた解析から遺伝子が同定されていた。)一方、55kDaのポリペプチドからは9アミノ酸と5アミノ酸のポリペプチドの配列が得られ、これらを基にデータベースを検索したところ、HYS2遺伝子(生育に必須でDNA複製に関与することが示唆されていた)の塩基配列から推測される連続した14個のアミノ酸配列と完全に一致した。次に大腸菌で発現させたHys2ポリペプチドに対するポリクローナル抗体をウサギで作製し、Hys2蛋白質が精製の途中でDNAポリメラーゼIII活性と共に精製されるかどうかをウェスタンプロット法を用いて調べた。その結果Q Sepharose, Mono S, Superose6カラムクロマトグラフィーにおいて、Hys2蛋白質はDNAポリメラーゼIII活性およびCdc2蛋白質と共に精製されることが解った。以上の結果からDNAポリメラーゼIII活性

と共に精製される55kDaのポリペプチドはHYS2遺伝子によってコードされ、Hys2蛋白質はDNAポリメラーゼⅢの第2のサブユニットであることが確立された。

HYS2遺伝子は生育に必須で *hys2-1* 温度感受性突然変異株はDNA複製に欠損があるので、この株ではDNAポリメラーゼⅢ活性が温度感受性であることが期待された。そこで *hys2-1* 株からDNAポリメラーゼⅢ活性を精製することを試みたが、Cdc2蛋白質と突然変異を持った Hys2-1 蛋白質を共に含む分画にはDNAポリメラーゼの酵素活性がほとんど検出できなかった。このことからおそらく、Hys2-1 蛋白質が突然変異のために抽出段階で変性しDNAポリメラーゼⅢ活性を阻害したと考えられる。同様の結果が *hys2-2* 温度感受性突然変異株の場合にも得られた。一方、Cdc2蛋白質を含み Hys2蛋白質を含まない DNAポリメラーゼⅢ活性が *hys2* 突然変異株からだけでなく野生株からも検出された。この Hys2蛋白質を含まない DNAポリメラーゼⅢは複合体型の DNAポリメラーゼⅢ（Cdc2蛋白質と Hys2蛋白質を共に含む）とは違った機能（例えばDNA修復や組換え）を持つことが考えられる。単一のプライマーを持つ ϕ X174单鎖DNAを鋳型としたとき、この Hys2蛋白質を含まない DNAポリメラーゼⅢ活性にPCNA, RF-A（单鎖DNA結合蛋白質）、RF-Cを加えてもDNA合成の促進が見られなかった。Cdc2蛋白質と Hys2蛋白質を共に含む DNAポリメラーゼⅢ複合体の場合にはDNA合成の促進が見られることから、DNAポリメラーゼⅢが PCNA, RF-A, RF-Cと共に触媒するプロセッシビティの高いDNA合成にはDNAポリメラーゼⅢ複合体中にHys2蛋白質が必要であることが示唆された。

hys2 突然変異を多コピーで抑圧する遺伝子を探査したところ、*CDC2* 遺伝子が単離された。*CDC2* 遺伝子は多コピーで *hys2-1*, *hys2-2* いずれの突然変異も抑圧したが、单コピーでは抑圧しなかった。また *hys2-2* 突然変異は *cdc2-2* あるいは *pol3-t* 突然変異と組み合わせると合成致死となった。これらの結果は Hys2蛋白質がDNAポリメラーゼⅢの第2のサブユニットであるという結論と合致した。

【総括】

DNAポリメラーゼⅢ（ δ ）の第2のサブユニットはHYS2遺伝子によってコードされる 55kDa のポリペプチドであり、DNAポリメラーゼⅢ（ δ ）がPCNA, RF-A, RF-Cと共に触媒するプロセッシビティの高いDNA合成にはDNAポリメラーゼⅢ（ δ ）複合体中にHys2蛋白質が必要であることを示した。

論文審査の結果の要旨

出芽酵母を用いた遺伝学的研究により、真核生物染色体DNA複製には構造と機能が異なる3つのDNAポリメラーゼが必須であることが明らかにされている。本研究はそれらのうち、SV40の試験管内DNA複製系を用いた研究からリーディング鎖及びラギング鎖合成に必須であることが明らかにされているDNAポリメラーゼ δ の出芽酵母ホモログ、DNAポリメラーゼⅢ（ δ ）のサブユニット構造とそれらの機能解析を行なったものである。まず、高度に精製したDNAポリメラーゼⅢ（ δ ）は3つ以上のサブユニットから成ることを明らかにした。この複合体のうち第1のサブユニットである 125 kDa の触媒ポリペプチドは *CDC2* 遺伝子によってコードされ、第2のサブユニットである 55kDa のポリペプチドはHYS2遺伝子によってコードされることを明らかにした。更に、他の3つの複製因子PCNA, RF-A, RF-Cが共存するとプロセッシビティの高いDNA合成反応を行なうことができるDNAポリメラーゼⅢ（ δ ）複合体には第2サブユニットの Hys2蛋白質が必要であることを示した。このように、本研究は真核生物の染色体DNA複製反応において中心的役割を果たすDNAポリメラーゼⅢ（ δ ）の構造と機能を理解するための重要な知見をもたらしたものであり、学位授与に値するものと認める。