

Title	XPV遺伝子産物DNAポリメラーゼ・イータの生化学的解析
Author(s)	楠本, 理加
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44156
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	楠 本 理 加
博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)
学位記番号	第 17771 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	XPV 遺伝子産物 DNA ポリメラーゼ・イータの生化学的解析
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 前田 正知 教授 土井 健史 教授 山口 明人

論文内容の要旨

バリエント群色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum variant ; XP-V) は紫外線過敏を主症状とする高発がん性の常染色体性劣性遺伝病である。XP-V 患者の細胞は、紫外線照射後の DNA 複製に異常があり、紫外線照射により突然変異の発生頻度が上昇することが知られていた。しかし、原因遺伝子は同定されていなかった。1999 年、当研究室では XP-V の原因遺伝子産物を単離、同定した。そして、XPV 遺伝子産物が紫外線により生じるシクロブタン型ピリミジン二量体 (cyclobutane pyrimidine dimer ; CPD) の損傷を乗り越えて DNA 合成を行うこと (translesion synthesis ; TLS) を明らかにし、DNA ポリメラーゼ・イータ (η) と命名した。また、 $\text{pol } \eta$ はチミン・チミンの CPD に対して正しいヌクレオチドである dAMP を取込むことも示した。このことと、 $\text{pol } \eta$ に欠損を示す XP-V 患者細胞が紫外線により突然変異率が上昇することから、細胞内で $\text{pol } \eta$ は突然変異を起こさないように機能していると考えられる。本研究では、 $\text{pol } \eta$ がどのようなメカニズムで TLS を行っているのか、分子レベルで明らかにすることを目的として解析を行った。

まず、様々な損傷 DNA を用いて $\text{pol } \eta$ の TLS 反応を詳細に解析した。紫外線により主に生じる CPD、CPD に次いで頻繁に生じる (6-4) 光産物、脱塩基部位を安定化したアナログ (AP アナログ)、かさ高い化合物であるアセチルアミノフルオレンを付加したグアニン (AAF-G)、抗がん剤であるシスプラチンを鎖内架橋した 2 つのグアニン (cisPt-GG)、チミンが酸化して生成されるチミングリコール (Tg)、これらの損傷について $\text{pol } \eta$ が TLS を行うことができるのか検討した。その結果、CPD に加え、 $\text{pol } \eta$ は (6-4) 光産物以外の損傷を乗り越えて DNA 合成を行うことができた。また、定量的な解析により、 $\text{pol } \eta$ は損傷塩基に対して正しいヌクレオチドを主に取込み、損傷塩基に対して正しいヌクレオチドが取込まれたプライマーを主に伸長することがわかった。これは $\text{pol } \eta$ が損傷に対するヌクレオチドの取込み反応と損傷からの伸長反応の二段階の反応において TLS を正確に行っていることを示している。これらの損傷の中で、 $\text{pol } \eta$ は CPD を最も効率良く乗り越えることもわかり、このことから $\text{pol } \eta$ の活性中心は CPD に最も適していると考えられる。

次に、 $\text{pol } \eta$ による損傷を含まない DNA の複製についても解析を行った。ゲノムの複製を担うことが明らかにされている複製型の DNA ポリメラーゼと比較したところ、 $\text{pol } \eta$ による複製のほうが誤りがちであることがわかった。このことから細胞内では、損傷のない DNA の複製は正確な複製型の DNA ポリメラーゼが担い、損傷に遭遇すると替わって $\text{pol } \eta$ が TLS を行い、再び複製ポリメラーゼに入れ替わると推測できる。この DNA ポリメラーゼスイッチ

グのメカニズムの一端を明らかにするため、まず、 $\text{pol } \eta$ 自身の DNA 結合活性について調べた。DNA ポリメラーゼが基質とするプライマー/テンプレート DNA をプローブとして、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行った。 $\text{pol } \eta$ はプライマーの長さが CPD の手前までのときは、CPD があっても、ないときと同程度の結合活性を示した。しかし、プライマーの長さを伸ばし、CPD に対してヌクレオチドが取込まれた状態の DNA に対する $\text{pol } \eta$ の DNA 結合活性を調べたところ、損傷のない DNA より安定して結合することがわかった。さらにプライマーを伸ばしていくと、この結合の安定化は CPD を乗り越えてから 1 ヌクレオチドだけ DNA 合成が行われた状態の DNA まで続き、CPD を乗り越えてから 2 ヌクレオチド DNA 合成が行われた状態の DNA からは解離しやすいことがわかった。これらは、 $\text{pol } \eta$ による DNA 合成が損傷近傍の数ヌクレオチドに抑えられていることを示唆している。また、 $\text{pol } \eta$ はチミンの CPD に対して正しい塩基であるアデニンが取込まれていると安定して結合し、シトシン、グアニン、チミンが取込まれていると解離しやすいという結果も得られ、 $\text{pol } \eta$ が DNA の結合において、正確に DNA 合成が行われた DNA を選択できることを示唆した。これは前半で示した変異抑制メカニズム（損傷に対し主に正しい塩基を取込み、正しい塩基が取込まれたときに DNA 鎖伸長反応を続ける）と非常によく一致している。

本研究により、 $\text{pol } \eta$ による正確な TLS の分子メカニズムと、DNA ポリメラーゼスイッチングのメカニズムの一端を明らかにすることができた。これらを礎に、様々な複製関連因子と損傷乗り越え DNA ポリメラーゼによる、DNA ポリメラーゼスイッチングも含めた TLS 全体のメカニズムを明らかにできると大いに期待される。

論文審査の結果の要旨

DNA 上に生じた損傷は、DNA 複製時において DNA 複製装置の進行を阻害することが知られている。細胞は、損傷による複製の阻害を組換え反応や、損傷を乗り越える複製反応 (translesion synthesis ; TLS) により回避していると考えられている。このような反応は総称して「複製後修復」と呼ばれ、これまで大腸菌や酵母を用いた遺伝学的な解析が主であった。当研究室では、ヒト高発がん性遺伝的疾患である色素性乾皮症バリエーション患者由来細胞の TLS 欠損を相補するタンパク質を単離し、それが紫外線により生じるシクロブタン型ピリミジン二量体 (cyclobutane pyrimidine dimer ; CPD) を乗り越えて複製する新規 DNA ポリメラーゼ (DNA ポリメラーゼ・イータ ; $\text{pol } \eta$) であることを見出し、その遺伝子クローニングに成功した。

著者は、 $\text{pol } \eta$ がどのようなメカニズムで TLS を行っているのかを分子レベルで明らかにすることを目的として、ヒト $\text{pol } \eta$ cDNA をバキュロウイルスの系で発現、組換え $\text{pol } \eta$ を精製し、これを用いて生化学的な実験を行い、以下の結果を得た。

- 1) ヒト $\text{pol } \eta$ は、CPD だけでなく、脱塩基部位を安定化したアナログ (AP アナログ)、嵩高い化合物であるアセチルアミノフルオレンを付加したグアニン、抗がん剤であるシスプラチンを鎖内架橋した 2 つのグアニン、チミンが酸化して生成されるチミングリコールなどの様々な DNA 損傷についても TLS を行うことが出来た。その際、AP アナログの場合を除いて、損傷塩基に対して正しい塩基を取り込み易いこと、また正しい塩基を取り込んだ場合に伸長反応を起こし易いことを明らかにした。
- 2) ゲルモビリティシフトアッセイでヒト $\text{pol } \eta$ の DNA 結合活性を調べたところ、DNA ポリメラーゼの基質であるプライマー・テンプレート型 DNA に親和性が高く、テンプレートに CPD がある場合にも、CPD がない場合と同様の親和性を示した。さらにプライマーの長さを伸ばして CPD に対してヌクレオチドが取り込まれた状態の DNA では、損傷がない DNA よりも安定して結合した。
- 3) 上記の CPD を含む DNA に対する $\text{pol } \eta$ の結合の安定化は、CPD を乗り越えてさらに 1 ヌクレオチドだけ DNA 合成が行われた状態まで続き、それ以上の合成が行われると DNA から解離しやすくなることが分った。

以上のように、本論文はヒト $\text{pol } \eta$ による DNA 損傷乗り越え複製機構に対して、多くの有用な知見を明らかにしており、博士 (薬学) の学位を授与するに相応しいものとする。