

Title	DNAポリメラーゼηのin vivo、in vitroでの機能解析
Author(s)	近藤, 雄二
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45687">https://hdl.handle.net/11094/45687</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</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	近藤雄二
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 19422 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学系研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	DNA ポリメラーゼ $\eta$ の <i>in vivo</i> 、 <i>in vitro</i> での機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 山元 弘 教授 松田 敏夫 教授 岡部 勝

## 論文内容の要旨

細胞内の DNA は紫外線などによって絶えず損傷を受けている。DNA 損傷は DNA の複製を阻害して細胞死を引き起こしたり、複製時に変異を導入することで癌化の原因ともなる。細胞内には細胞周期チェックポイント、DNA 修復経路、損傷乗り越え複製 (TLS) など DNA 損傷による傷害を回避する様々な機構がある。本研究では TLS に働く DNA ポリメラーゼ  $\eta$  (Pol  $\eta$ ) について *in vivo*、*in vitro* の両観点から解析した。ヒト Pol  $\eta$  は皮膚癌を高発する疾患、色素性乾皮症バリエーション群 (XP-V) の責任遺伝子産物であり、紫外線によって生じる主要な DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) の TLS に関与する。

まず *in vivo* の解析として、マウス Pol  $\eta$  をコードする遺伝子 *mPOLH* 欠損マウスの作出とその分子病態の解析について報告する。我々は機能的に *mPOLH* 遺伝子を破壊するため、各生物種間の Pol  $\eta$  でよく保存されている領域を含む exon 8 内にネオマイシン耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターを作成し、このベクターをマウス 129/Sv 由来の ES 細胞に導入した。ネオマイシン耐性のクローンを単離し、ゲノム DNA を調製してサザンブロットにより相同組換え体を同定した。相同組換えが確認された ES 細胞を BDF1 マウスより採取した受精後 3.5 日目の胚盤胞に導入しキメラマウスを作出した。そしてキメラマウスと C57BL/6J 雌マウスで戻し交配を行い、*mPOLH* 遺伝子についてヘテロ接合体のマウスを得た。その後、これらを交配させ *mPOLH*<sup>+/+</sup>、*mPOLH*<sup>+/-</sup>、*mPOLH*<sup>-/-</sup> マウスを作出した。

初期マウス胚性線維芽細胞 (MEF) は妊娠 13.5 日目の胎児から採取した。胎児を細断して MEF を採取し、それに継代を重ねて無限増殖系へ転じた細胞を得た。作製した MEF から抽出したゲノムを用いてマウスの遺伝子型をサザンブロッティングにより確認した。また MEF から mRNA を精製し、*mPOLH* 遺伝子の発現をノーザンブロッティングで調べ、*mPOLH* の遺伝子破壊が成功したことを確認した。さらに MEF の UV 感受性について、DNA 合成量を測定することにより比較した。その結果、*mPOLH*<sup>-/-</sup> 細胞において *mPOLH*<sup>+/+</sup>、*mPOLH*<sup>+/-</sup> のものと比較して顕著な紫外線感受性が認められた。

8-12 適齢のマウスの背中を一週間に一度剃毛し、皮膚に 2,000 J/m<sup>2</sup>/day の UV-B を 20 週間照射し、UVB 誘発皮膚腫瘍発症実験を行った。その結果、紫外線照射開始後 22 週までの観察期間において *mPOLH*<sup>+/+</sup> および *mPOLH*<sup>+/-</sup> マウスにおいては全く皮膚腫瘍の発症が認められなかったが、*mPOLH*<sup>-/-</sup> マウスにおいては全例発生した。生

じた皮膚腫瘍の病理診断の結果、そのほとんどは扁平上皮癌であることがわかった。

続いて *in vitro* の解析として Pol  $\eta$  の機能ドメイン解析について報告する。Pol  $\eta$  はヒトでは全長 713 アミノ酸よりなるが、当研究室のこれまでの解析から、*in vitro* では N 末側の 511 アミノ酸だけでも全長と同程度の損傷乗り越え複製能を持つことがわかっている。しかし、そのアミノ酸配列は Pol  $\eta$  以前に発見されていたポリメラーゼと一次構造が大きく異なり、アミノ酸配列から機能発現に重要な役割を果たすアミノ酸を推定することができなかった。また Pol  $\eta$  には種を越えて保存されている A から G と呼ばれる七つの領域が見られ、これらが活性に重要な役割を果たしていると推測された。そこで点突然変異タンパク質を大腸菌で発現させ、精製して解析を行った。本論文では A・B 領域と F・G 領域について解析を行った結果についてそれぞれ報告する。

A・B 領域については 38 番目のグルタミンもしくは 61 番目のアルギニンをアラニンに置換した点変異 Pol  $\eta$  の解析結果を報告する。作製した点変異 Pol  $\eta$  は 2 例とも CPD を乗り越えて複製する能力を示した。次に、これらのヌクレオチドに対する親和性及び忠実度について酵素反応速度論を用いて調べた。その結果、Pol  $\eta$ /WT や Q38A に比較して Pol  $\eta$ /R61A では忠実度の上昇が観察された。また、Pol  $\eta$ /Q38A では WT や R61A と比較して鋳型鎖上の CPD の 5' 側 T において伸長が停止している割合が高く見られ、CPD の 5' 側 T を効率よく乗り越える能力が低下していると考えられた。

F 及び G 領域の中で、各生物種間の Pol  $\eta$  で比較的保存性が高い 8 個のアミノ酸に注目して変異を導入した。作製した点突然変異 Pol  $\eta$  の DNA 合成能及び TLS 活性を測定したところ、323 番目のリジンもしくは 351 番目のアルギニンをアラニンに置換した点変異タンパク質において DNA 合成能の大幅な低下が認められた。TLS 活性に関しては、全例において CPD を乗り越える能力を保持していた。次にこれらの変異タンパク質の DNA 合成能の違いの原因を探るため、DNA との親和性を調べた。その結果、Pol  $\eta$ /K323A と Pol  $\eta$ /R351A において結合力の低下が見られた。このことから、hPol  $\eta$  の 323 番目のリジンと 351 番目のアルギニンは DNA との結合に関わることが示唆された。

*In vivo* の解析結果として、*mPOLH* 遺伝子欠損マウスの作出とその分子病態の解析を報告した。これによって、TLS を欠損した生物の発癌機構の詳細な解明に向け、有望な材料を確立することができたと考える。今後はマウスならではの特性を活かし、他の TLS ポリメラーゼや修復系を欠損したマウスと掛け合わせて、DNA 修復系のクロストークなどの解明を期待できる。また、*in vitro* での解析として Pol  $\eta$  の機能ドメインの解析を行い、DNA 合成の忠実度や CPD への効率の良い乗り越え複製、DNA との結合に関わる機能性アミノ酸残基を同定することができた。今後はさらなる解析を通じて、Y ファミリーポリメラーゼの個々の TLS 活性を特徴づけるアミノ酸残基が同定され、TLS 機構の構造と機能の相関が明らかにされることを期待している。

## 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パリアント群患者由来細胞の 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 ; 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、Pol  $\eta$  の機能を *in vivo*、*in vitro* の両方の視点から詳細に研究し、以下のような結果を得た。

- 1) まずマウス Pol  $\eta$  をコードする遺伝子 *mPOLH* 欠損マウスの作出に成功した。これまで当研究室では、長い間、その試みを行っていたが、成功しなかった。本申請者は、各生物種間の Pol  $\eta$  でよく保存されている領域を含む exon 8 内にネオマイシン耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターを作成し、それを ES 細胞に導入する手法により、キメラマウスを作出、ヘテロ欠損マウスを得た後、その掛け合わせにより *mPOLH* ホモ欠損マウスを作出した。このマウスより得られた MEF 細胞は、野生型およびヘテロ欠損細胞に比べて紫外線に感受性を示し

た。また *mPOLH* ホモ欠損マウスは、正常に成長し、生殖能も有していたが、UVB の長期間照射により背中と耳に高頻度に腫瘍を発生し、病理診断の結果、そのほとんどが扁平上皮癌であった。一方、同じ条件下で、野生型およびヘテロ欠損マウスは皮膚に腫瘍を発生しなかった。

- 2) Pol  $\eta$  には A から G までの 7 つの保存された領域が存在する。本申請者は、このうち A・B 領域と F・G 領域について、点変異を入れた変異ヒト Pol  $\eta$  を作成し、それらの生化学的な性質を調べた。その結果、損傷乗り越えに重要なアミノ酸残基や複製の忠実度に関係したアミノ酸残基、DNA との結合に関係した残基などが同定された。類似の酵素で X 線結晶構造解析が行われているものを参照しつつ、これらのアミノ酸残基の機能とタンパク質上での位置とを論ずることが出来た。

以上のように、本論文は哺乳類 Pol  $\eta$  の機能に関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考えます。