

Title	DNAポリメラーゼ $\eta$ の個体レベル及び分子・細胞レベルでの解析
Author(s)	金尾, 梨絵
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49676">https://hdl.handle.net/11094/49676</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〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	かな お り え 金 尾 梨 絵
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 2 8 7 2 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	DNA ポリメラーゼ $\eta$ の個体レベル及び分子・細胞レベルでの解析
論文審査委員	(主査) 教 授 八木 清仁 (副査) 教 授 山元 弘 教 授 土井 健史 教 授 水口 裕之

### 論 文 内 容 の 要 旨

遺伝情報の担い手であるDNAは、様々な要因によって損傷を受けている。DNA上の損傷は転写や複製を阻害し、突然変異や癌化、老化、細胞死などをもたらす恐れがある。生物は、DNA上の損傷をDNA修復機構により修復しているが、損傷がすべて修復される前に複製が開始されたり、複製中に損傷を受けたりすると、損傷により複製が阻害されてしまう。損傷による複製阻害を回避する手段として損傷乗り越え複製(TLS)があり、損傷のある鋳型に対して塩基を重合することのできる特殊なDNAポリメラーゼ(TLSポリメラーゼ)が担っている。TLSポリメラーゼが損傷に対して正しい塩基を重合すれば突然変異を誘発しないが、誤った塩基を重合すると変異を誘発する。TLSポリメラーゼのひとつであるDNAポリメラーゼ $\eta$  (Pol $\eta$ )は色素性乾皮症バリアント群(XP-V)の責任遺伝子産物として同定され、*in vitro*で紫外線損傷のひとつであるチミン-チミンCPDに対して正しい塩基を重合することができる。本研究では、個体レベル、及び分子・細胞レベルでPol $\eta$ の機能を解析した。

Pol $\eta$ のバラログであるDNAポリメラーゼ $\iota$  (Pol $\iota$ )は高等真核生物にのみ存在し、*in vitro*でCPDやもうひとつの紫外線損傷である(6-4)光産物に対して、1または2塩基を重合する活性を持つが、その生体内での機能はほとんど明らかになっていない。我々のグループでは、Pol $\eta$ 及びPol $\iota$ の生体内での機能を明らかにするためにノックアウトマウスを作成し、解析を行っている。これまでに、Pol $\eta$ 及びPol $\iota$ 欠損マウスを用いた紫外線誘発皮膚発癌実験を行い、Pol $\eta$ 欠損及びPol $\eta$  Pol $\iota$ 二重欠損マウスでは高頻度に皮膚腫瘍が発生するが、野生型、Pol $\iota$ 欠損マウスでは皮膚腫瘍は生じないことを明らかにしている。本研究では、腫瘍発生の原因となると考えられる突然変異が、どのように生成、または抑制されているのかを明らかにするため、個体レベルでの解析として、Pol $\eta$ 欠損、Pol $\iota$ 欠損、及びPol $\eta$  Pol $\iota$ 二重欠損マウスのゲノムDNA上に、紫外線によって誘発される突然変異を解析した。まず、ゲノム中に突然変異検出マーカーを持つトランスジェニックマウスとの交配により、それぞれの遺伝子型の突然変異解析用のマウスを作成した。これらのマウスの皮膚に紫外線を照射し、回収した表皮から得たゲノムDNA上の突然変異を解析した。紫外線で誘発される突然変異発生頻度は、Pol $\eta$ 欠損マウスとPol $\eta$  Pol $\iota$ 二重欠損マウスで野生型マウスよりも著しく高くなっていた。一方、Pol $\iota$ 欠損マウスでは、野生型マウスと同程度の変異発生頻度を示した。これらの結果から、上皮組織では紫外線によって誘発される突然変異の抑制には主にPol $\eta$ が関与しており、Pol $\iota$ はほとんど関与しないことが示唆された。さらに、Pol $\eta$  Pol $\iota$ 二重欠損マウスでは、Pol $\eta$ 欠損マウスと比較すると突然変異発生頻度が有意に低下しており、Pol $\iota$ はPol $\eta$ が欠損した場合、突然変異を誘発する機構の一部に関与することが示唆された。突然変異スペクトラムの解析から、Pol $\eta$ が欠損すると、紫外線損傷が主に生じる部位である、ジピリミジン部位での塩基置換発生頻度が著しく上昇すること、特に、G:C→T:A transition変異が高頻度に起こっていることが示された。また、Pol $\eta$  Pol $\iota$ 二重欠損マウスではG:C→T:A transition変異発生頻度がPol $\eta$

欠損マウスより低下することを明らかにした。これらの結果から、Pol $\eta$ が生体内でCに生じた紫外線損傷に対して正しい塩基であるGを重合する反応に関与しており、Pol $\eta$ が欠損すると、他のTLSポリメラーゼが紫外線損傷に対して誤った塩基を重合し、特にCに生じた紫外線損傷にAを重合する反応が多く起こっていることが示唆された。また、この反応には、Pol $\iota$ が一部関与していることが示唆された。

Pol $\eta$ の生体内での制御機構やTLSの分子機構はまだ不明な部分が多く残されている。さらに、免疫グロブリン遺伝子の体細胞超突然変異生成や、相同的組換え反応など、Pol $\eta$ がTLS以外の機能に関与していることが近年示唆されている。細胞内でのPol $\eta$ の制御機構や、Pol $\eta$ の未知の機能を解明するため、分子・細胞レベルでの解析としてPol $\eta$ と相互作用する因子の解析を行った。Yeast two-hybrid screeningで、ミスマッチ修復因子であるMLH1をヒトPol $\eta$ と相互作用する新規の因子として見出し、組換えタンパク質を用いた実験からPol $\eta$ とMLH1がタンパク質同士、直接結合することを示した。MLH1はPMS2とヘテロダイマーを形成してミスマッチ修復において機能することが知られているが、Pol $\eta$ がこのヘテロダイマーであるMutL $\alpha$ とも相互作用することを、組換えタンパク質を用いた結合実験により明らかにした。タグを付加したPol $\eta$ を発現した細胞を用いた免疫沈降により、この相互作用が細胞内でも見られることを示した。さらにPol $\eta$ が、ミスマッチ修復でミスペアの認識に働くヘテロダイマーであるMutS $\alpha$ とも、細胞内で同一複合体中に含まれることを示した。Pol $\eta$ の欠変異体を用いた相互作用領域の解析により、MLH1との相互作用領域はPol $\eta$ の301-490アミノ酸の間に含まれることを示し、この領域内のアミノ酸のうち、種間で保存性の高いものを置換した、点変異体組換えタンパク質との相互作用の解析により、MutL $\alpha$ との相互作用能の低下したPol $\eta$ [K317A]変異体を同定した。Pol $\eta$ [K317A]変異体をXP-V患者由来の細胞に発現させた細胞株を樹立し、その細胞株が野生型Pol $\eta$ を発現させた細胞株と同様に、XP-V細胞の紫外線感受性を相補することを示した。このことから、Pol $\eta$ とMutL $\alpha$ との相互作用は、Pol $\eta$ による紫外線損傷のTLSには必要ではなく、他の未知の機構に関与する可能性が示唆された。さらに、同調した細胞のクロマチン画分からの免疫沈降により、クロマチン上でのPol $\eta$ とMutL $\alpha$ 、及びMutS $\alpha$ の相互作用がS期に増加することを示し、Pol $\eta$ とミスマッチ修復因子がS期にクロマチン上で協調して働いていることが示唆された。

本研究では、個体レベルの解析として、上皮系組織におけるPol $\eta$ 、Pol $\iota$ の紫外線損傷に対する役割を明らかにし、分子・細胞レベルの解析として、Pol $\eta$ とMLH1の相互作用を見出し、Pol $\eta$ がミスマッチ修復因子と協調する未知の機能の存在が示唆された。今後さらに解析を進めることでPol $\eta$ の機能の理解が進むものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

学位申請者である金尾梨絵はDNA損傷乗り越え複製に際し損傷のある鋳型に対して塩基を重合する特殊なDNAポリメラーゼ（TLSポリメラーゼ）の機能について詳細な解析を行った。色素性乾皮症の責任遺伝子産物として同定されたDNAポリメラーゼ $\eta$  (Pol $\eta$ )とそのパラログであるDNAポリメラーゼ $\iota$  (Pol $\iota$ )の生体内での機能を明らかにするためにノックアウトマウスを用いた解析を行い、上皮組織では紫外線によって誘発される突然変異の誘発の抑制には主にPol $\eta$ が関与することを示した。またPol $\eta$ が欠損するとジピリミジン部位での塩基置換発生頻度が顕著に上昇することを明らかとした。さらにPol $\eta$ 欠損により他のTLSポリメラーゼが紫外線損傷に対して誤った塩基を重合すること、そしてこの反応にPol $\iota$ が関与していることを示した。

申請者は細胞内でのPol $\eta$ の制御機構や未知の機能を明らかとするためPol $\eta$ と相互作用する因子について分子生物学的な解析を行った。その結果ミスマッチ修復因子であるMLH1がPol $\eta$ と相互作用することを示し、ミスマッチ修復でミスペアの認識に働くMutS $\alpha$ とPol $\eta$ が相互作用することも明らかとした。

本研究は個体レベル、分子・細胞レベルでPol $\eta$ 、Pol $\iota$ の紫外線損傷時の役割を詳細に解析し、TLSポリメラーゼの機能について新規な知見を得ている点で学位論文にふさわしい内容であると判断した。