OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒトDNAポリメラーゼ ・イータの構造に基づく損傷乗り越え複製機構の解析
Author(s)	美島, 一太
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52233
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕ヒトDNAポリメラーゼ・イータの構造に基づく損傷乗り越え複製機構の解析

学位申請者　　美　島　一　太

遺伝子DNAは、常に様々な内的・外的要因によって損傷を受けている。これらの損傷は複製や転写などのDNA代謝を阻害し、細胞死や突然変異などをもたらす。生物はこうした事態を防ぐため、DNA損傷に対する複数の防御機構を備えている。真核生物においては、DNA上に損傷が生じると、チェックポイント機構によって細胞周期を一時的に停止させ、その間に損傷を修復する。しかし、複製DNAポリメラーゼが損傷に遭遇した場合、特殊なDNAポリメラーゼが損傷を乗り越えて複製の阻害を一時的に解消して、ひとまず複製を完了させる機構が存在する。これを損傷乗り越え複製(translesion synthesis; TLS)という。このとき損傷は修復されず、とりあえず複製を完了させておいて後に損傷の除去を行う。ヒトにはPolηとPolι、Polκ、REV1およびREV3-REV7複合体であるPolζといった複数のTLSポリメラーゼが存在し、それぞれ異なった特異性と正確さを持っている。ポリメラーゼの構造解析により、DNA付加物と非Watson-Crick塩基対に対応する、広い範囲の活性部位が明らかになってきている。私の所属する研究グループでは米国のグループと共同で、*cis-syn*シクロブタンチミン二量体(cyclobutane pyrimidine dimer; CPD)を乗り越えてDNAを合成中のヒトPolηの高分解能結晶構造を明らかにした。

私は、PolηによるTLSの分子機構をより詳細に解明するために、ヒトPolηと、DNA基質やヌクレオチドとの結合に重要と思われるアミノ酸残基に注目して様々な変異体を作成し、細胞レベルと生化学的な実験を通してPolηの損傷乗り越え反応を解析した。XP-V患者由来線維芽細胞XP2SA SV3はヒト正常線維芽細胞WI-38 VA13に比べ著しく紫外線(ultraviolet; UV)感受性が高く、UV照射量依存的に分裂能が低下した。DNAとの結合に重要だと考えられるヒトPolηアミノ酸残基42番目のトリプトファンと64番目のトリプトファン、378番目のロイシンが複製の鋳型DNAと相互作用している可能性が考えられ、それぞれアラニン、アラニンとセリン、アラニンとグリシンに置換した変異体をXP2SA SV3に発現させた。その結果、hPolη W42Aを発現させたXP2SA SV3はWI-38 VA13に近いUV感受性を示した。一方、hPolη W64A/Sを発現させたXP2SA SV3は、WI-38 VA13に比べて有意に高いUV感受性を示した。hPolη L378Aを発現させたXP2SA SV3は、XP2SA SV3にかなり近いUV感受性を示した。この結果から、64番目のトリプトファン、378番目のロイシンは複製の鋳型DNAと相互作用して、TLS機構に関与していることが示唆された。

ヒトPolη変異体がDNA結合活性とポリメラーゼ活性を有するかどうかを明らかにするため、ヒトPolηの野生型とアミノ酸置換変異体の組換えタンパク質を精製して、それらを用いてゲルシフトアッセイによるDNA結合活性測定とプライマー伸長反応を行った。W42とW64はアミノ酸置換によりDNA結合活性が低下し、hPolη W42AのDNA結合活性はhPolη W64AとhPolη W64SのDNA結合活性よりも低かった。野生型hPolηとhPolη L378AでのDNA結合活性に顕著な差は認められなかった。CPDが存在する鋳型DNAと、それに相補的でCPDの手前までの16 merのプライマーを使用したプライマー伸長反応の結果、L378Aを除く全ての変異体で17 merの生成物の蓄積がみられた。以上の結果から、CPDに対してPolη単独でTLSを完了する経路の効率が悪い場合には、CPDの最初のチミンに対する取り込み後に他のDNAポリメラーゼがDNA伸長反応を行うことが示唆された。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名（　美島　一太　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　招へい教授　花岡　文雄 副査　教授　八木　健 副査　特任教授　田中　亀代次 副査　教授　升方　久夫	

論文審査の結果の要旨

DNAポリメラーゼ・イータ（Polη）は、紫外線による主な損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体（CPD）を効率よく、また比較的正確に乗り越えることが出来る唯一の酵素である。申請者は既に明らかにされたヒトPolηと鋳型DNAにCPDを含む鋳型-プライマー型DNAとの共結晶構造から、ヒトPolηと鋳型DNAとの結合に重要と思われるアミノ酸残基に注目して様々な変異体を作成し、生化学的な実験と細胞レベルの実験を通してヒトPolηの損傷乗り越え反応を解析した。その結果、W42、W64、L378はヒトPolηの鋳型DNAとの相互作用とCPDを含む鋳型DNAに対するプライマー伸長反応に機能していることが示唆された。一方、これらのアミノ酸変異体を発現させた細胞は、紫外線感受性や紫外線誘発突然変異頻度に関して、必ずしも野生型ヒトPolηに比べて大きな欠陥を示さず、*in vitro*の活性と*in vivo*の活性に違いが認められた。*In vitro*実験ではヒトPolη（全長713aa）のN末から511番目のアミノ酸まで（1-511）を用いており、C末端部位には他のタンパク質との相互作用に働いていると考えられるモチーフがあるので、そのあたりに*in vitro*と*in vivo*の差を埋める鍵があると考えられる。以上の結果は、ヒトPolηの損傷乗り越え機構の解明に寄与するものであり、学位授与に値すると評価された。