Osaka University Knowledge Archive

Title	Molecular and cellular function analysis of DNA polymerase X involved in DNA repair
Author(s)	Nakane, Shuhei
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/577
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【45】

氏　　名	中　根　修　平（なか　ね　しゅう　へい）
博士の専攻分野の名称	博　士（理学）
学　位　記　番　号	第　２５２０７　号
学位授与年月日	平成24年３月22日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Molecular and cellular function analysis of DNA polymerase X involved in DNA repair （DNA 修復系で働く DNA ポリメラーゼ X の分子機能・細胞機能解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　倉光　成紀 （副査） 教　授　升方　久夫　　教　授　福山　恵一　　准教授　増井　良治

論　文　内　容　の　要　旨

背景

DNA ポリメラーゼには 7 種類のファミリーが存在し、DNA の複製や修復に関わっている。*Thermus thermophilus* HB8 は複製に関わる DNA polymerase III α subunit (C ファミリー)、複製と修復に関わる DNA polymerase I (ttPolI) (A ファミリー)、修復に関わると予想される DNA polymerase X (ttPolX) (X ファミリー) の 3 種類の DNA ポリメラーゼのみを持ち、機能の重複は少ないと思われる。哺乳類には PolX だけでも 6 種類存在し、塩基除去修復系 (BER) などで重要な機能を担ってい

る。全ての PolX はコアドメインである POLXc ドメインを持ち、N 末端の 8-kDa サブドメインがあることで BER への関与が可能になる (図 1, 図 3)。近年のゲノム解析によりバクテリア PolX の存在が明らかとなったが、大腸菌が PolX を持たないためかその研究は進んでいなかった。また、アミノ酸配列より、バクテリア PolX には真核生物 PolX の持たない PHP ドメインが存在し (図 1)、モチーフからはホスホエステラーゼ活性を持つと予想された。バクテリア PolX も 8-kDa サブドメインを持つことから BER への関与が予想されるが、PHP ドメインを持つことで活性、構造や BER での機能がどのように変化するかは不分明であった。本研究では、ttPolX を中心として、機能の重複が予想される ttPolI やその他の DNA 修復酵素との活性や機能がどのように異なるかを調べることで、バクテリア BER の全容解明を目指した。

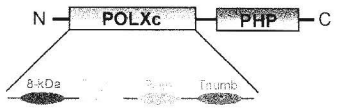

図 1. バクテリア型 PolX のドメイン構造

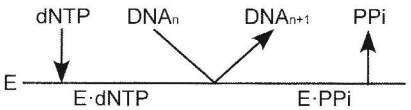

図 2. ttPolX の持つ Theorell-Chance 機構

結果と考察

ttPolX の BER での働きを調べるため、まず、POLXc ドメインの活性を調べた。ttPolX は高い gap filling 活性と、BER で必要とされる dRP lyase 活性を示した。一方、ttPolI は、gap DNA ではポリメラーゼ活性は阻害され、前方の鎖をはがしながら合成を進める鎖置換合成を示した。さらに、ttPolX は DNA 非存在下で Mg-dNTP に対して、 ttPolI よりも 1,000 倍以上強く結合した。通常、DNA ポリメラーゼは DNA, dNTP の順に結合するが、ある PolX では dNTP, DNA の順に結合することが知られている。ttPolX でも同様の機構が働いていると考え、定常状態の速度論と dead end 阻害、生成物阻害を組み合わせた解析を行うことにより、最初に dNTP に結合した ttPolX が "ヒットエンドラン" 的に 1 塩基 gap DNA と反応する Theorell-Chance 機構に従うことを明らかにした (図 2)。この反応機構における最初の中間体である ttPolX, dGTP 二者複合体と、次の中間体に類似した ttPolX, ddGTP, 1 塩基 gap DNA 三者複合体の X 線結晶構造をそれぞれ 1.4, 2.7 Å 分解能で明らかにした。両者の立体構造を比較した結果、ttPolX は *syn* 型と *anti* 型どちらの dGTP とも結合できるが、塩基対を形成するときには *anti* 型である必要があることが分かった。さらに、この dNTP への結合様式やその強い結合能に、バクテリア PolX で高度に保存された Lys-263 が関与していることが分かった。ttPolX はこのような機構を利用して効率よく gap を埋めていることが想像される。

次に、PHP ドメインの活性について調べた結果、3'-5' exonuclease と、BER でも必要とされる 3'-phosphatase, AP endonuclease 活性を持つことが分かった (図 3)。*T. thermophilus* には同様の活性を持つ EndoIV が存在するため、遺伝子破壊株や免疫除去を行った細胞抽出液を用いて活性を比較した。その結果、3'-phosphatase として ttPolX, EndoIV どちらも働きうるが、EndoIV の方が活性が高いこと、細胞内に ttPolX, EndoIV 以外の 3'-phosphatase は存在しない可能性が高いことが分かった。また、細胞内の AP endonuclease 活性の大部分は EndoIV 由来であった。同様に細胞抽出液中の ttPolI と ttPolX の活性を比較したところ、鎖置換活性を持たない ttPolX の方が、ttPolI よりも効率よく修復を行えることが分かった。また、抽出液中において、DNA 修復で働ける DNA ポリメラーゼは ttPolI と ttPolX のみであった。さらに、Δ*ttpolX* は脱アミノを誘発する亜硝酸や、酸化障害を引き起こす過酸化水素に対して感受性を示したことから、*in vivo* においても ttPolX が BER の複数の経路において働いていることが示唆された。

最後に、ttPolX 抗体を用いた免疫沈降、プルダウンアッセイにより、ttPolX が BER を開始させる DNA グリコシラーゼである UDGB, MutM と相互作用している可能性が示唆された。UDGB, MutM はそれぞれウラシル、8-オキソグアニンを認識するため、Δ*ttpolX* の感受性とも一致し、ttPolX が BER で働く他の酵素とも協力して効率よく修復を進めていることが予想される (図 3)。

本研究により、ttPolX は BER で必要とされる様々な活性を持つ中心的な酵素であることが明らかとなった。また、ttPolI とは異なる活性を持ち、ttPolX の方が BER で効率よく働けること、EndoIV とは同じ活性を持つが、ttPolX はバックアップなどで働いていることが明らかとなった。

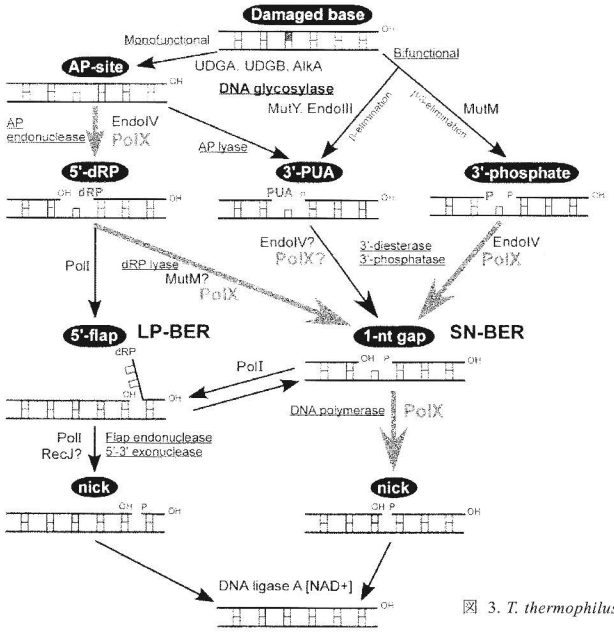

図 3. *T. thermophilus* の塩基除去修復系

論文審査の結果の要旨

近年のゲノム解析により、大腸菌を除く細菌にも X ファミリーに属する DNA ポリメラーゼ (PolX) が存在し、この細菌型 PolX は、真核生物型の PolX とは異なるドメインを余分に持つことが明らかとなっていたが、そのドメインを含む細菌型 PolX の機能はこれまで不明であった。中根修平君は、細菌型 PolX で初となる基質結合型 PolX の結晶構造解析に成功するとともに詳細な分子機能解析を行い、PolX が塩基除去修復過程で生じる gap を埋めることによって、DNA 修復系で重要な役割を果たすことを明らかにした。

本博士学位論文には、PolX の立体構造解析や分子機能解析による多くの発見がまとめられている。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。