

所 属 (主指導教官)	原核生物分子遺伝学講座 (真木寿治 教授)		
氏 名	菅谷 豊	提 出	平成14年 1月 8日
題 目	大腸菌 <i>dnaE173</i> ミューテーター変異型DNA ポリメラーゼIII ホロ酵素のDNA鎖伸長反応における運動特異性		
<p>要旨</p> <p>大腸菌の染色体複製を担うDNAポリメラーゼIII (PolIII) ホロ酵素は、1) 極めて高いプロセッシビティー、2) 速いDNA鎖伸長反応、3) 高い複製の忠実度、などの複製酵素としての特徴を有しており、これらの特徴はこの酵素を構成している10種のサブユニットの協調的な作用によると考えられている。その忠実度は酵素に内在の校正機能により非常に高く保たれているが、ごく稀に生じた複製エラーがミスマッチ修復等により修正されない場合、突然変異として固定される。自然突然変異の発生部位が塩基配列に強く依存する当研究室の観察結果等から、複製エラーの起こり易さは鋳型配列の構造に大きく影響を受けると考えられる。また校正機能を欠損した変異型PolIIIは配列特異的に極めて高頻度に突然変異を誘発することが明らかになっている。</p> <p>著者らは、PolIIIホロ酵素の鋳型DNA上での運動特異性が複製エラーの発生に深く関与している可能性を検証し、PolIIIホロ酵素の運動性に対する校正機能の関与を明らかにする目的で、野生型及び校正機能を欠損した<i>dnaE173</i>及び<i>dnaQ32</i>の両ミューテーター変異型の精製PolIIIホロ酵素を用いて、PolIIIホロ酵素の鎖伸長反応における運動特異性の解析を行った。</p> <p>DNAポリメラーゼ活性を担うαサブユニットに欠損を生じた<i>dnaE173</i>変異型PolIIIホロ酵素は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は正常であるにも関わらず校正機能をほぼ完全に失っていることが明らかになっている。この変異型酵素が複製開始複合体からの同調的DNA鎖伸長反応で野生型酵素と顕著に異なる運動特異性を示すことを見出した。変異型酵素は野生型に比較してDNA鎖伸長速度が約1/3に低下し、DNA合成のポージングに強い抵抗性を獲得していた。さらにこの変異型酵素は、クランプとして働くβサブユニットが存在しない場合でも極めて高いプロセッシビティーを示した。一方、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を担うϵサブユニット内の活性中心における点突然変異により</p>			

校正機能を欠損した*dnaQ32*変異型PolIIIホロ酵素は、配列依存的にポーシングする傾向が強く、著しいプロセッシビティーの低下が示唆されたが、酵素学的性質は野生型PolIIIホロ酵素に類似していた。これらのことから、校正機能の働きがDNA合成のポーシングおよびプロセッシビティーに大きく影響を与えていることが示唆され、DNA合成機構の新たなモデルを構築するに至った。

また、DNA鎖伸長反応におけるPolIIIホロ酵素の鋳型上での動態と複製エラーの発生の相関を検証するために、これまで前進突然変異検出に用いてきた大腸菌*rpsL*遺伝子上でのPolIIIホロ酵素の挙動の解析を試みた。*rpsL*遺伝子のいずれか一方の鎖を含むM13ファージ由来のssDNAを鋳型とした開始複合体からの同調的DNA鎖伸長反応産物を、変性ゲル電気泳動及びサザンハイブリダイゼーション法を用いて観察する系を構築した。野生型及び*dnaE173*変異型PolIIIホロ酵素を用いた解析において、高速度のDNA合成過程においてもDNA合成中間産物の蓄積量には塩基配列ごとに有意な差が観察され、鋳型塩基配列がDNA鎖伸長反応の速度やPolIIIの挙動に影響を与えていることが明らかになった。両酵素間において若干の差異も観察されたが、突然変異発生との明らかな相関は観察されなかった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 菅 谷 豊

DNA 複製の忠実度制御の分子機構の解明は突然変異の発生と抑制に関わる細胞機能を理解する上で基本的に重要である。また、発癌や各種の遺伝病の原因は様々なヒト遺伝子上で生じた突然変異が原因であるが、これらの発生にも DNA 複製の際のエラーが関与する場合もあることが示されている。したがって、DNA 複製の正確さを保障する仕組みの理解は医学の上でも重要な課題である。本論文は大腸菌での DNA 複製において主要な役割を果たしている DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素の忠実度制御機構を解明することを目的として、その触媒サブユニットをコードする *dnaE* 遺伝子に生じたミューテーター変異 *dnaE173* の作用機序を生化学的に研究したものである。

まず、*dnaE173* 変異株から DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素を高純度に精製し、野生株から分離したホロ酵素を標準として校正機能および 3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を検討している。その結果、*dnaE173* ホロ酵素は 3'→5'エクソヌクレアーゼ活性は野生型ホロ酵素と同程度の活性を示すにも関わらず、校正機能はほぼ完全に失われていることが明らかにされた。次に単鎖環状ファージ DNA を鋳型として同調開始連続 DNA 合成（バースト DNA 合成）のタイムコースおよび産物 DNA の詳細な分析がなされている。その結果、以下のことが明らかになった。1) 変異型ホロ酵素は野生型ホロ酵素の約 1/3 の DNA 鎖伸長速度を示す。2) 変異型ホロ酵素は野生型ホロ酵素に比較して基質 dNTP に対する親和性が高い。3) 野生型ホロ酵素は鋳型 DNA を一周する DNA 合成の後に DNA 鎖伸長を停止するのに対し、変異型ホロ酵素は新生鎖をほどきながらローリングサークル合成を続ける。4) 変異型ホロ酵素によるバースト DNA 合成は単鎖 DNA 結合タンパク質に対する依存性が低く、高イオン強度下でも強い阻害を受けない。これらの結果から、変異型ホロ酵素は鋳型 DNA に対する高い親和性を獲得して DNA 鎖伸長反応のプロセッシビティを上昇させていることが結論された。さらにこの高いプロセッシビティは β サブユニットが存在しないときにも見出され、触媒サブユニット自身が高いプロセッシビティを示すポテンシャルを有することが初めて見出された。触媒サブユニットの単一のアミノ酸置換が校正機能の欠損と DNA 鎖伸長活性の大きな変化を引き起こすことから、校正機能と DNA 鎖伸長反応には共通するステップが存在することが強く示唆された。

以上のように、本論文は DNA ポリメラーゼの DNA 鎖伸長反応と校正機能の強いリンクを初めて明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。