

論文内容の要旨

申請者氏名 坪 田 智 明

真核細胞では少なくとも 3 種の DNA ポリメラーゼ α 、 δ 、 ϵ が染色体の DNA 複製に関与することが知られており、DNA ポリメラーゼ α は RNA プライマー合成とそれに続く DNA 複製初期過程に働くのに対し、DNA ポリメラーゼ δ (Pol δ) と ϵ (Pol ϵ) はその後のリーディング鎖およびラギング鎖の合成を行うと考えられている。主として遺伝学的な解析から、Pol ϵ は DNA 鎖伸長だけでなく DNA 複製の開始や細胞周期チェックポイント制御に関与することが示されており、細胞増殖における様々な重要な機能を担う多機能タンパク質として捉えられてきた。しかし、これらの諸機能の分子レベルでの理解やそれぞれの機能の相互関係については不明な点が多い。最近になり、出芽酵母から精製した Pol ϵ の生化学的解析から、Pol ϵ は鋳型 DNA との結合とは異なる部位で二本鎖 DNA に安定に結合することが見いだされた。DNA ポリメラーゼ α および δ にはこのような二本鎖 DNA 結合能は見られていない。これらのことから、Pol ϵ の安定な二本鎖 DNA 結合能は DNA 鎖伸長反応に直接関与するのではなく、Pol ϵ に特有の細胞機能に必要な機能として働いている可能性が示唆されている。

本論文は Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の分子基盤を明らかにすることを目的として、Pol ϵ の二つのアクセサリサブユニット Dpb3p および Dpb4p の精製および生化学的解析を行ったものである。両サブユニットのアミノ酸配列中に Histone Fold Motif (HFM) が存在することから、ヒストンおよびヒストン様蛋白質での HFM と同様に Dpb3p と Dpb4p がヘテロ二量体を形成し Pol ϵ の安定な二本鎖 DNA 結合能に関与する仮説を立て、その検証を行っている。まず、両サブユニットの遺伝子をクローン化して、それぞれを別々に大腸菌細胞内で発現させたところ、Dpb3p は可溶性ではあるものの巨大な多量体を形成するために精製は不可能であったが、Dpb4p は均一な蛋白質として精製できた。次に、両サブユニットを大腸菌細胞内で共発現させたところ、Dpb3p と Dpb4p はモル比 1:1 の複合体を形成することが分かり、均一な複合体として精製することができた。これら精製標品を用いて、ゲルろ過法およびショ糖密度勾配遠心分離法による水力的解析を行なった。その結果、Dpb4p はホモ二量体の構造を、また Dpb3p-Dpb4p 複合体はヘテロ二量体の構造を取ることが示された。両者ともに顕著な非球状の構造を持つことも明らかになった。さらに、Dpb3p および Dpb4p とアミノ酸配列の相同性が高い HFM を持つヒストン H2A-H2B の結晶解析図をもとに Dpb3p および Dpb4p の HFM の構造予測を行ったところ、両者の HFM の相互作用によりヘテロ二量体が容易に形成されることが示唆された。また、予測される構造の上で HFM 同士の相互作用に関与することが示唆された部位でアミノ酸置換が導入された Dpb4p は Dpb3p との複合体の安定性が低下することも分かった。これらのことから、Dpb3p および Dpb4p

は HFM を介してヘテロ二量体を形成していることが強く示唆された。次に、精製した Dpb3p-Dpb4p 複合体と DNA との相互作用をゲルシフト法によって調べたところ、Dpb3p-Dpb4p 複合体は二本鎖 DNA 結合能を有していることが判明し、これまで全く不明であった両サブユニットの生化学的機能が明らかになった。この二本鎖 DNA 結合能の詳細な解析から、この結合は DNA 塩基配列に非依存的であり、DNA 鎖の末端を必要としないことを示した。また、一本鎖 DNA によって二本鎖 DNA 結合は阻害されることから、Dpb3p-Dpb4p 複合体は一本鎖 DNA と弱い結合をすることが見出された。一方、Dpb4p ホモ二量体にも DNA 結合能が見出され、この場合には二本鎖 DNA と同程度に一本鎖 DNA に結合した。したがって、Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合の鎖選択性は Dpb3p によって規定されている可能性が示唆された。本研究で示された Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合能の性質は Pol ϵ の DNA 結合能の性質と共通であることから、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能は Dpb3p-Dpb4p 複合体に担われていることが考えられる。しかし、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能は Pol ϵ が示す結合能よりも非常に弱いため、両者の真の関係を検証する必要性が生じた。そこで、Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合能を低下させる 2 種類の Dpb4p のアミノ酸置換 K57A と Q64E を利用して、変異型 Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合を検討した。新規に開発された Pol ϵ の精製法を用いて高純度の変異型 Pol ϵ の精製を行ったところ、二つの変異型 Pol ϵ はともに Dpb3p と Dpb4p ならびに他の二つのサブユニットからなるヘテロ四量体構造を取っており、DNA 合成活性も野生型 Pol ϵ と全く違いはなかった。それぞれの二本鎖 DNA 結合も野生型 Pol ϵ との違いを示さなかった。以上の結果から、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能における Dpb3p-Dpb4p 複合体の役割を明らかにすることはできなかったが、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合には Dpb3p と Dpb4p 以外のサブユニットも関与することが強く示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 坪 田 智 明

真核生物の DNA 複製に関与する DNA ポリメラーゼの中で、DNA ポリメラーゼ ϵ は染色体複製において DNA 鎖伸長反応だけでなく複製開始や複製フォークの正常な進行、複製阻害のモニターの役割を果たしていることが示されている。また、最近になり姉妹染色体のコヒージョンやヘテロクロマチン領域での遺伝子サイレンシングにも関与することが報告されている。Pol ϵ のこれらの細胞機能は細胞分裂に伴う遺伝情報の正確な伝達にきわめて重要なものであるが、それらの分子機構についてはほとんど不明である。出芽酵母 Pol ϵ の触媒サブユニットの触媒活性に関与するドメインを除く触媒サブユニットの C 末端領域と三つのアクセサリーサブユニット (C 末端複合体) が上記の細胞機能に関与することが遺伝学的に示されているが、Pol ϵ やそれぞれのサブユニットの精製が困難であったために、生化学的機能に関する解析が立ち遅れている。本論文は、最近発見された Pol ϵ の C 末端複合体が関与する二本鎖 DNA 結合活性の分子基盤を解明することを目的として、出芽酵母 Pol ϵ の二つのアクセサリーサブユニット Dpb3p および Dpb4p の精製と生化学的解析を行ったものであり、以下の成果をあげている。

1) Dpb4p および Dpb3p-Dpb4p 複合体の精製に成功し、それらの水力学的解析から、それぞれホモ二量体とヘテロ二量体を形成していることを示した。

2) 精製された Dpb4p および Dpb3p-Dpb4p 複合体は DNA との相互作用をすることを明らかにし、特に Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合能は Pol ϵ の DNA 結合能の様々な特徴と共通することから、Dpb3p-Dpb4p 複合体が Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の分子基盤となっている可能性を示した。

3) Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能を低下させるアミノ酸置換を導入した Pol ϵ を高純度に精製し、その生化学的解析結果を Dpb3p および Dpb4p のヒストンフォールドモチーフの構造予測の結果と対比させて考察した。

以上のように、本論文は出芽酵母 Pol ϵ の Dpb3p および Dpb4p サブユニットに関して、それらの構造と生化学的機能を詳細に明らかにしたもので、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。