

論文内容の要旨

申請者氏名 八木 義彦

DNA は生体内外の様々な要因により、絶えず損傷を受けている。損傷は様々な修復機構により排除されるが、修復されずに損傷が DNA 上に残ると、DNA 複製時に複製フォークが損傷部位で停止して DNA 合成が阻害されることになり、それは細胞死につながる。これまでの研究から、細胞には DNA 修復に加えて DNA 損傷による複製阻害からの回復機構が備わっており、それらの働きにより細胞増殖阻害や細胞死から免れることが可能になることが示されている。DNA 損傷による複製阻害の回復機構の一つとして、バイパス DNA 合成経路がある。この経路では、忠実度の低い DNA ポリメラーゼによって損傷部位に対して塩基を挿入する過程 (insertion) と損傷と塩基が対合したプライマー末端から DNA 伸長させる過程 (extension) の二段階の反応を経て損傷による複製阻害をバイパスし、複製フォークの進行を再開させるモデルが考えられている。近年、脊椎動物には少なくとも 7 種類以上のバイパス DNA ポリメラーゼが存在することが明らかになっている。しかし、これらの生体内での役割については不明な点が多い。申請者は DNA 複製や修復に関わる酵素群が大量に含まれており、生化学的解析に適しているアフリカツメガエル卵母細胞を使って、細胞内で起こる、DNA の UV 損傷に対するバイパス DNA 合成活性の全容を明らかにしようと考え、UV 損傷 (CPD もしくは、(6-4) 光産物) を含む鋳型 DNA のプライマー伸長活性をもつ因子の精製と同定を行った。その結果、卵母細胞中には少なくとも 4 種類のバイパス DNA 合成活性 (TLS 活性) が含まれていることがわかった。申請者はこれら 4 種の TLS 活性の特徴付けと、活性を担うバイパス DNA ポリメラーゼの同定を進めた。TLS1 活性は鋳型 DNA 上の損傷の 12 塩基上流から DNA 合成を開始させる「ランニング反応条件」で CPD と (6-4) 光産物をバイパスすることができるが、損傷の直前から DNA 合成を開始させる「スタンディング反応条件」でプライマー伸長することはできない。精製の過程で複数の要因が関与することが分かった。TLS2 活性は、(6-4) 光産物だけを「スタンディング反応条件」のみでバイパスするが、DNA ポリメラーゼ α がこの活性と挙動を共にしていた。TLS3 活性と TLS4 活性は両方とも CPD を特異的にバイパスする。これらの活性の精製を進めたところ、TLS3 は CPD を「スタンディング反応条件」および「伸長反応条件」でプライマー伸長する活性で、TLS4 は CPD を「伸長反応条件」でプライマー伸長する活性であった。両方ともにバイパスの効率は高く、エラーフリーのバイパスを行うことが分かった。CPD の直前からのヌクレオチド挿入によるバイパス活性は、細胞抽出液には TLS3 のみが大部分を担い、その次の伸長過程には TLS3 と TLS4 がほぼ同様のレベルの活性を担う。抗体によるウエスタンブロットや免疫除去実験および TLS 活性の阻害実験から TLS3 に Pol η 、TLS4 に Pol κ が関与することが示唆された。さらに大腸菌で発現させて精製したアフリカツメガエルの Pol η と Pol κ はそれぞれ TLS3 そして TLS4 と同様の TLS 活性を示した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 八木 義彦

紫外線による突然変異の誘発機構は大腸菌を材料にして、長年にわたり研究されてきたが、数年前になって、DNA 損傷を乗り越えて DNA 合成を行う新規の DNA ポリメラーゼが関与することが分かったばかりである。同じころに、ヒトでも同様のバイパス DNA ポリメラーゼが発見され、その後、脊椎動物には複数のバイパス DNA ポリメラーゼが存在することが分かった。しかしながら、これらの DNA ポリメラーゼは細胞内に微量にしか存在しないことや、脊椎動物での遺伝学的・細胞学的解析の困難さから、複数のバイパス DNA ポリメラーゼの生体内での実際の働きや相対的な貢献度、役割分担などについては不明な点が多い。申請者は、細胞内にどの程度の強さのバイパス DNA 合成活性が存在しているのか、さらに、複数存在すると考えられているバイパス DNA ポリメラーゼがどのような役割分担をしているのかを明らかにすることを目的に、アフリカツメガエル卵母細胞抽出液を材料にして生化学的な解析を行っている。その結果、以下の成果をあげている。

1) 紫外線による 2 種類の DNA 損傷に対するバイパス DNA 合成活性が細胞抽出液中に存在することが確認された。今回の研究で開発された単純で直接的なアッセイ法での検出が定量的な解析や精製を可能にすることが示された。

2) 細胞抽出液のバイパス DNA 合成活性を分画することにより、細胞抽出液には少なくとも 4 種類の異なる活性 (TLS1-4) が存在することを示した。

3) TLS1 は、損傷部位の手前からの DNA 鎖伸長反応に依存した極めて効率の良いバイパス DNA 合成を行うもので、反応過程の特徴から新規のバイパス DNA 合成活性であると考えられる。複数の因子が関与することが示唆された。

4) TLS2 は DNA ポリメラーゼ α によることが示唆されたが、バイパス効率が低い点と鋳型の配列によっては検出できないこともあるものの、反応様式はこれまでに報告がない新規のものである。

5) TLS3 と TLS4 はアフリカツメガエルの Pol η および Pol κ 、あるいはそれらに関連する酵素による活性であることが示唆された。紫外線 DNA 損傷のうち、CPD に対する損傷直前からのバイパス合成活性は、アフリカツメガエル細胞抽出液中においては TLS3 と TLS4 が主要な活性であることが示された。TLS4 は損傷バイパス後の伸長過程に特に高い効率を示すことも明らかになった。

以上のように、本論文は脊椎動物の細胞抽出液中の複数のバイパス DNA 合成活性を直接検出し、それらの性格付けを初めて行ったもので、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。