

論文内容の要旨

ヒト DNA polymerase δ (pol δ) は DNA 複製反応において、PCNA (増殖細胞核抗原) 依存的に RF-C (複製因子 C) と協同して数千塩基の DNA 鎖を合成でき、SV40 ウィルスの *in vitro* 複製反応では、リーディング鎖、ラギング鎖の合成に関与することが示されている。しかし実際の染色体上で複製フォークの進行時に形成される pol δ を含んだ高次のタンパク質複合体の構成とその機能についてはほとんど明らかにされていない。そこで、真核生物における複製フォークの機能制御の理解を目的として、私はヒト pol δ 複合体の再構成、およびその機能解析を行った。

ヒト pol δ は分子量 125 kDa の触媒サブユニット (p125) および分子量 50 kDa サブユニット (p50) からなるヘテロ 2 量体であると報告されていた。そこで p125 および p50 の cDNA をバキュロウィルスベクターに組み込みこれらの発現を行った。各組換えウィルス感染あるいは共感染による昆虫細胞抽出液を調製しこれらの DNA 合成活性をみたところ、p125 および p50 を共発現した細胞抽出液のみが、PCNA に依存した DNA 合成活性を持つことが判明した。したがってこの 2 つのサブユニットのみで PCNA 依存的な活性型 pol δ を再構成できることが示された。しかしながらこれらのみでは複合体が不安定で、活性型の pol δ は精製できなかった。したがって活性型 pol δ 複合体には他のサブユニットの存在が必要と思われ、上の結果が支持された。

この研究の進行中に、出芽酵母では第 3 の、分裂酵母から第 3、第 4 の pol δ サブユニットが同定された。マウスの培養細胞および仔牛胸腺でも分子量 66~68 kDa のタンパクを含む pol δ が精製された。決定された分子量 66~68 kDa のペプチドのアミノ酸配列は、すでに報告されているヒト由来の EST 配列 (KIAA0039) と一致した。この DNA にコードされるタンパク質は、pol δ 第 3 サブユニットである分裂酵母、cdc27 および出芽酵母、Pol32p と相同性が見られ、特にそれぞれの PCNA 結合配列を含む C 末部の領域と高い相同性を有した。実際に、当研究室では PCNA アフィニティークラムを用いて分画したヒトの pol δ フラクシオンに、p125 および p50 の 2 つのサブユニットと共に、分子量 66 kDa のペプチド (p66) が存在していることを見いだし、このサブユニットに相当すると考えられた。そこで、KIAA0039 の遺伝子産物を大腸菌で発現し、それを抗原としてモノクローナル抗体を作製した。まず、得られた抗 p66 抗体は、PCNA アフィニティークラム分画をさらに monoQ カラムで精製した高精製度の pol δ に含まれる 66 kDa のポリペプチドと反応した。このことからヒト細胞中においてもマウス、仔牛胸腺同様、分子量 66 kDa の KIAA0039 産物が pol δ のサブユニットとして機能すると考えた。この抗 p66 モノクローナル抗体によるヒト培養細胞抽出液の免疫沈降では、p66 と共に p125、p50 が PCNA 依存的 DNA 合成活性を伴って共沈降した。したがってこれら 3 つのペプチドは細胞抽出液中で複合体を形成していることが明らかになった。これらのペプチドは PCNA 依存的 DNA 合成活性と共に、細胞抽出液のゲルろ過分画で 430 kDa、グリセロール密度勾配遠心による分画で 210 kDa に相当する分画に回収された。得られた 2 つの見かけ上の分子量の違いは、分子形状による分画のずれを反映していると考えられる。これを経験

値からくる補正式にあてはめると、分子量 230 kDa の分子に相当することが得られた。この数値は p125、p66 および p50 の分子量の合計にほぼ相当することから、ヒト pol δ は細胞抽出液中では、酵母で見られる様なヘテロ 3 量体の 2 量体ではなく、少なくとも 3 つのペプチドの複合体が単量体として存在していると考えられる。

次に pol δ 複合体における p66 の役割を解析するため、p66 発現バキュロウィルスを用いて pol δ の再構成を試みた。p125、p66 およびヒスチジンタグを融合した p50 (His-p50) を組み込んだバキュロウィルスを共感染した昆虫細胞抽出液より、Ni²⁺ レジンカラムおよび monoQ を用いて分画したところ、この 3 つのペプチドと共に PCNA に依存した DNA 合成活性が回収された。グリセロール密度勾配遠心による分画ではこの活性は 180 kDa に溶出された。これに対して p125 および His-p50 のみを発現した場合、monoQ の段階ですでに活性は 3 量体型に比べて 1/10 以下に低下しており、その分画のグリセロール密度勾配遠心による分画からは活性は回収されなかった。SDS-PAGE による泳動パターンから p125 および His-p50 は解離していることが示された。以上より p66 が加わることで活性型 pol δ がより安定な形で存在していることが示された。

再構成された pol δ はグリセロール密度勾配遠心による分画で分子量 180 kDa に溶出され、これはヒト細胞抽出液での分画における活性ピーク 210 kDa より低分子量であった。この結果は再構成した pol δ と天然型 pol δ の間で構造的な違いがあることを示しており、ヒト pol δ にさらに他のサブユニットが存在することを予想させる。実際、仔牛胸腺由来の pol δ には 12 kDa のサブユニットが報告されている。また、3 量体型組換え pol δ の比活性は天然型ヒト由来のものに比べて 1/10、仔牛胸腺由来と比べて 1/300 であり pol δ としては不完全な活性しか示さない。しかしながら組換え型はヒト天然型と同様に仔牛胸腺由来の pol δ より高い processivity を示した。

pol δ のサブユニット間、およびそれらと PCNA との相互作用を解析したところ、p125-p50、p66-p50 は複合体形成し、p66 の存在下で p125-p50 の複合体の安定化が見られた。また、PCNA 結合配列を持つ p125 および p66 はそれぞれで PCNA と相互作用するが、p125-p66-p50 の 3 者複合体でそれぞれ 1.5~2 倍効率よく PCNA と相互作用することが分かった。

以上より、p66 はヒト pol δ の機能的サブユニットであり、単独で p50 と PCNA への結合活性を有し、pol δ 複合体形成時には p125-p50 複合体の安定化および PCNA への結合を促進する活性を示すことが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

真核生物の染色体 DNA 複製の分子機構は酵母細胞による遺伝生化学的な研究と、哺乳類細胞の生化学的な研究によって進展し、複製にかかわる多くの蛋白質因子が明らかになり、巨大な蛋白複合体による複製装置の存在が示唆されている。複製の機構は原核生物からヒトまで、基本的には共通であるが、真核生物の複製装置は極めて複雑で、多様化していると考えられる。このことは複製の制御にかかわる重要な課題であり、高等生物細胞の複雑な増殖・分化を理解するには、複製装置の構造と機能を理解することが不可欠である。複雑な複合体の機能を解析するには、複合体を構成するサブユニット蛋白を分離精製し、*in vitro* で細胞をミミックした機能を再構成することが必要である。四方君は複製装置の中核にあって、リーディング、ラギング両鎖の合成に必須であるポリメラーゼ δ が当初の予想以上に複雑な複合体を作り、複製の場を形成する PCNA と多様な相互作用をする可能性を持っていることに興味をもち、ネイティブな複合体構成因子の同定と因子間及び PCNA との相互作用を精製蛋白を用いた再構成実験によって明らかにすることを試みた。

DNA ポリメラーゼ δ は 125KDa(p125)と 50KDa(p50)の 2 サブユニットからなることは既に知られていたが、この研究の進行中に酵母、マウス、及び仔牛胸腺から精製された活性酵素から 66-68KDa(p66)の第 3 サブユニットが発見された。四方はこの情報を利用して、ヒトゲノム EST 配列 Data base からヒトオルソログを推定し、クローニングに成功した。こうしてクローニングされたヒト DNA ポリメラーゼ δ の 3 つのサブユニットを昆虫細胞に単独、あるいは複数共発現させ、種々の組み合わせで、蛋白（複合体）を大量に調整、精製して、複合体を *in vitro* で再構成し、構造と機能の相関を明らかにした。その結果、活性で安定な酵素の再構成には 3 つのサブユニットが当量必要であること。新しく発見された p66 は、p50 と PCNA に強い結合性をしめし、ポリメラーゼ δ ヘテロ 3 量体を安定化すると共に PCNA への結合を助ける機能を持つことを明らかにした。さらに、再構成複合体と、細胞から分離精製したヒト及び仔牛胸腺のネイティブな 3 量体複合体との比活性と重合反応のプロセッシビティーを詳細に比較解析し、p66 と他のサブユニット及び PCNA との相互作用の違いによって、酵素機能に変化が生じることを示し、p66 が酵素の多様性を調節する機能を持つことを示唆することが出来た。

このように、本論文は DNA ポリメラーゼ δ の第三のサブユニットの発見には一歩遅れをとったが、ヒトの酵素複合体についていち早くその必要性を明らかにすると共に、*in vitro* 再構成を行って複合体の機能を初めて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。