

論文内容の要旨

申請者氏名 柳原 芳充

自然突然変異における DNA 複製の役割を研究する過程で、大腸菌の複製酵素 DNA ポリメラーゼⅢ (Pol III) の α サブユニットをコードする *dnaE* 遺伝子に生じた非常に強力なミューテーター変異 (*dnaE173*) が単離されている。*dnaE173* 株では様々な種類の自然突然変異が極めて高い高頻度で生じ、その頻度は、Pol III の校正機能の欠損株やミスマッチ修復機構の欠損株に匹敵する事が知られている。 α サブユニットは Pol III ホロ酵素の DNA 鎖伸長活性の触媒サブユニットであることから、*dnaE173* 変異は DNA 複製の誤り (複製エラー) を高頻度に誘発する可能性が考えられたが、*dnaE173* 変異型 DNA ポリメラーゼⅢホロ酵素の生化学的解析から、*dnaE173* 変異は Pol III の校正機能を著しく低下させていることが示された。しかし、校正機能が欠損した *dnaQ* 変異株とは異なり、偽逆向き反復配列の存在する部位で生じる配列置換変異の頻度が *dnaE173* 株では大幅に上昇する。さらに、変異型 Pol III は、校正機能の影響以外に、鎖伸長速度が低下している事、ストランドディスプレースメント DNA 合成活性を獲得している事、連続的な DNA 合成に必要なサブユニットが働かない条件でも野生型より連続的に DNA 合成出来る事など多様な生化学的性質が変化している事が明らかになり、これらのことが配列置換変異の発生に何らかの関係を持つことが予想された。本研究は、*dnaE173* 株が配列置換変異を高頻度で誘発する理由を明らかにする事を目的として、野生型と変異型の α サブユニットをそれぞれ精製して生化学的性質の詳細な比較を行なった。まず、Pol III で見られた連続的な DNA 合成能などが、他のサブユニットとの相互作用を介さず、 α サブユニット単独の性質の変化として現れている事を明らかにした。次に、膜結合アッセイを用いて、変異型の α サブユニットはプライマー/鋳型 DNA と安定な複合体を形成することを見いだした。野生型の α サブユニットと DNA の複合体は全く検出することができなかった。変異型の Pol III ホロ酵素の多様な生化学的性質の変化は、プライマー/鋳型 DNA への結合能の上昇の結果であると考えたと全て説明出来る。よってこの複合体形成能が、変異型において生じている多様な生化学的性質の変化の原因であると考えられる。さらに、配列置換変異の発生過程では、プライマー末端の数塩基しか鋳型鎖に会合出来ない構造の DNA が形成されるのだが、変異型 α サブユニットは、この特殊な構造のプライマー/鋳型 DNA から効率良く DNA 合成を行なえるという性質を見出した。酵素学的な解析などから、変異型の DNA への安定な結合の結果、このプライマー/鋳型 DNA から効率的な DNA 合成を行なう事が出来るようになったと考えられる。この性質により、*dnaE173* 株において配列置換変異が高頻度で誘発されたと考えたと考えると、配列置換変異の発生に関する多くの疑問を理解する事が出来る。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 柳原 芳充

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 の忠実度制御機構を解明することと、偽逆向き反復配列間で生じる配列置換変異の発生機序を理解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* が配列置換変異を特異的に誘発する分子機構を生化学的に研究したものである。

まず、過剰生産株より野生型および *dnaE173* 変異型 α サブユニットを高純度に精製し、DNA 合成活性の詳細な解析を行っている。以前の研究から、変異型 Pol III 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ていた。申請者の研究により、このプロセッシビティの上昇は変異型 α サブユニットだけでも観察されること、その原因は変異型 α サブユニットがプライマー・鋳型 DNA と安定に結合することによることが明らかにされた。酵素学的解析をさらに進めて、変異型 α サブユニットは dNTP に対する親和性も大幅に上昇していること、誤った塩基対形成を起こす頻度は野生型とほとんど変わらないか、むしろ低下していることを明らかにした。配列置換の発生プロセスには、短い長さのプライマーからの DNA 鎖伸長が予想されるが、変異型 α サブユニットは 2 塩基対程度のプライマー末端からも DNA 鎖伸長を効率よく触媒することが明らかになった。野生型 α サブユニットは最低でも 4 塩基対以上の長さのプライマーを必要とすることから、*dnaE173* 変異株で配列置換が特異的に誘発される原因の一つと考えられる。申請者は、以上の結果などから、DNA ポリメラーゼには配列置換や重複・欠失を引き起こす過程で必須である異所性の不適切なプライマーからの DNA 合成を抑制する機能が備わっており、その働きも DNA 複製の忠実度に重要な役割を果たしている可能性を提唱している。

以上のように、本論文は配列置換変異の発生と抑制に DNA ポリメラーゼが関与すること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。