

出芽酵母 DNA ポリメラーゼ ϵ のサブアセンブリー

Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能

坪田 智明

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 原核生物分子遺伝学講座

(真木 寿治 教授)

平成 15 年 1 月 7 日提出

所属 (主指導教官)	原核生物分子遺伝学講座(真木寿治)		
氏名	坪田智明	提出	平成 15年 1月 7日
題目	出芽酵母 DNA ポリメラーゼ ϵ のサブアセンブリー Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能		
<p> DNA ポリメラーゼは染色体 DNA 複製において DNA 鎖伸長を直接触媒する酵素であることから、その研究は細胞増殖の分子機構や細胞分化の制御、細胞の環境応答の理解に不可欠である。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。興味深いことに、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。Pol ϵ の第 3 サブユニットをコードする <i>dpb3</i> の欠損株ではヘテロクロマチンであるテロメア領域近傍のサイレンシングをエピジェネティックに維持する機構に支障をきたすことから、Pol ϵ のヘテロクロマチンの維持や制御への関与も示唆されている。このように、Pol ϵ の生理学的役割の重要性は遺伝学や細胞生物学的なアプローチにより明らかになってきたが、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ほとんど不明である。この点を明らかにするために、当研究室では出芽酵母から精製した Pol ϵ を用いて詳細な生化学的解析が行われてきた。その過程で、Pol ϵ は鋳型 DNA と安定な複合体を形成する以外に、他の DNA ポリメラーゼとは異なり、様々な様式で DNA と相互作用することが見出された。その内の一つは、Pol ϵ が鋳型 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である。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、複製の開始過程やヘテロクロマチンの維持・制御などに必要な機能として働いている可能性が考えられた。 </p> <p> 本研究の目的は Pol ϵ の多面的な細胞機能の分子機構を解明することを目指して、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の分子基盤を明らかにすることである。Pol ϵ は 4 つのサブユニット (Pol2p、Dpb2p、Dpb3p および Dpb4p) からなるタンパク質複合体であるが、その内の Dpb3p および Dpb4p のアミノ酸 </p>			

配列中には Histone Fold Motif の存在が見出されている。Histone Fold Motif はヒストンおよびヒストン様蛋白質に保存され、Histone Fold Motif を持つタンパク質二量体の形成および DNA 結合やクロマチン結合に関わるモチーフとして知られている。このことから、Pol ϵ の安定な二本鎖 DNA 結合能は Dpb3p および Dpb4p サブユニットに担われている可能性が考えられた。そこで、この可能性を検証するために、Dpb3p、Dpb4p および両者の複合体の精製を試みた。Dpb3p および Dpb4p をそれぞれ単独で大腸菌細胞内で過剰発現した場合、Dpb3p は非常に不安定で精製途中で分解および凝集するために精製は困難であったが、Dpb4p はホモ二量体として精製することに成功した。さらに、両サブユニットを大腸菌細胞内で共発現させると、Dpb3p と Dpb4p はモル比 1:1 の複合体として精製することができた。ゲルろ過法およびショ糖密度勾配遠心分離法を用いて分子量を解析したところ、Dpb3p-Dpb4p 複合体はヘテロ二量体の構造を取ることが示唆された。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た。この結合は DNA 塩基配列に非依存的であった。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。これらのことは、Pol ϵ の DNA 結合能の性質と共通である。以上のことから、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強く示唆された。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弱いため、他のサブユニットもまた、Dpb3p-Dpb4p 複合体の構造安定化などを通して Pol ϵ の安定な二本鎖 DNA 結合に関与していると考えられる。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。以上の結果より、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能には Dpb3p と Dpb4p が関与することが明らかとなり、恐らくは両サブユニットがヒストン様二量体タンパク質に共通な様式で DNA と相互作用するものと考えられる。ヒストン様二量体蛋白質はクロマチンリモデリング複合体や転写制御因子に含まれ、これらの因子がクロマチンに結合する際に重要な役割を果たす。したがって、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能は、この酵素とクロマチンとの相互作用の分子基盤となっている可能性が考えられる。

目次

I. 序論-----	1-14
1. はじめに	
2. DNA ポリメラーゼ ϵ	
2-1. 総論	
2-2. Pol ϵ の分子構造	
2-3. Pol ϵ の生物学的役割	
a. 複製開始	
b. 複製フォークの円滑な進行	
c. 染色体上の特殊な領域の DNA 複製	
d. 姉妹染色分体のコヒージョン形成	
e. S 期チェックポイント	
f. DNA 修復と組換え	
g. サイレンシングとクロマチン再編	
2-4. Pol ϵ の生化学的解析	
a. PCNA との相互作用	
b. 単鎖 DNA センシング	
3. 本研究の目的	
3-1. Pol ϵ と DNA の相互作用	
3-2. Dpb3p と Dpb4p の二本鎖 DNA 結合能	
II 材料と方法-----	15-25
1. 試薬、酵素、その他の材料	
2. 培地	
3. 蛋白質精製に用いたバッファー	
4. 菌株	
4-1. 大腸菌株	
4-2. 出芽酵母株	
5. プラスミド DNA	
6. Dpb3p および/または Dpb4p の大腸菌内発現用プラスミドの構築	
7. Dpb3p および/または Dpb4p の大腸菌内発現	
8. Dpb3p-Dpb4p 複合体の精製	
8-1. GSTrap FF カラムクロマトグラフィー	
8-2. Mono S カラムクロマトグラフィー	

- 8-3. Mono Q カラムクロマトグラフィー
- 9. Dpb4p の精製
 - 9-1. GSTrap FF カラムクロマトグラフィー
 - 9-2. Mono Q カラムクロマトグラフィー
 - 9-3. Mono S カラムクロマトグラフィー
- 10. Dpb3p-Dpb4p 複合体および Dpb4p のゲル濾過クロマトグラフィーによる解析
- 11. Dpb3p-Dpb4p 複合体および Dpb4p のショ糖密度勾配遠心分離法による解析
- 12. ゲルシフトアッセイ
 - 12-1. DNA 結合反応に用いた基質 DNA
 - 12-2. Dpb3p-Dpb4p 複合体および Dpb4p の DNA 結合反応およびゲル電気泳動
 - 12-3. Pol ϵ および p145 の DNA 結合反応とゲル電気泳動
- 13. ヌクレオチド結合アッセイ
- 14. ATP 加水分解活性の測定
- 15. 出芽酵母 *dpb4* 変異 (K57A または Q64E) 株の作成
- 16. 変異型 Pol ϵ の精製
 - 16-1. 出芽酵母の培養および細胞破碎液の調製
 - 16-2. Anti-Flag M2 affinity gel カラムクロマトグラフィー
 - 16-3. Heparin Sepharose 4B カラムクロマトグラフィー
- 17. DNA ポリメラーゼ活性の測定
- 18. 蛋白質、DNA の定量および SDS-PAGE

III. 結果-----26-64

- 1. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能
 - 1-1. Pol ϵ の二本鎖 DNA 能には Pol2p の C-末端ドメインおよび/あるいはアセサリーサブユニット (Dpb2p、Dpb3p、Dpb4p) が関与する
 - 1-2. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合は DNA 末端に非依存的である
 - 1-3. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合は DNA 塩基配列に非依存的である
 - 1-4. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合は一本鎖 DNA によって競合的に阻害される
- 2. Dpb3p-Dpb4p 複合体の精製
 - 2-1. 大腸菌細胞内における Dpb3p および Dpb4p の共発現
 - 2-2. Dpb3p および Dpb4p は複合体を形成する
- 3. Dpb4p の発現と精製
- 4. Dpb3p の発現と精製
- 5. Dpb3p-Dpb4p 複合体および Dpb4p の分子量の算出
 - 5-1. Dpb3p-Dpb4p 複合体

5-2. Dpb4p

6. Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合活性

6-1. Dpb3p-Dpb4p 複合体は二本鎖 DNA に結合する

6-2. Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合能の構造特異性

6-3. Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合は特定の塩基配列に依存しない

6-4. Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能は DNA 末端に対する結合ではない

6-5. NaCl、 Mg^{++} 、およびヌクレオチドの二本鎖 DNA 結合能への影響

6-6. Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能は Pol ϵ の結合活性よりも非常に弱い。

7. Dpb4p の DNA 結合能

8. 酵母細胞を用いた変異型 Pol ϵ の精製およびその DNA 結合能

8-1. Dpb3p-変異型 Dpb4p 複合体の機能解析

8-2. 変異株 Pol ϵ の精製

8-3. 変異型 Pol ϵ の DNA 結合活性

IV. 考察-----65-78

1. Dpb3p-Dpb4p 複合体の分離とその構造

2. Dpb3p-Dpb4p 複合体に見出された二本鎖 DNA 結合能

3. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能と Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能の関係

4. Pol ϵ および Dpb3p-Dpb4p 複合体に見出された二本鎖 DNA 結合能の生理学的意義

5. HF タンパク質としての Dpb3p-Dpb4p 複合体

6. 今後の展望と課題

謝辞-----79

参考文献-----80-85

1. 序 論

1. はじめに

ゲノムを忠実に複製することは、細胞の増殖および個体と種の維持に必須である。それと同時に、複製中にまれに生じる変異は進化の原動力でもある。DNA ポリメラーゼは DNA 鎖伸長を直接触媒する酵素であることから、その研究は細胞増殖の分子機構や細胞分化の制御、さらには遺伝情報の維持機構や細胞の環境応答の理解に不可欠である。

細胞の増殖は、細胞容量の増加、DNA の複製、細胞の分裂といった一連の現象を周期的に繰り返すことで進行し、この周期を細胞周期と呼ぶ(Weinert and Hartwell 1989)。DNA 複製は細胞増殖に必須の過程であり、そのタイミングは細胞周期によって厳密に制御されている。また、広く知られているように、休止期 (G_0) の細胞が細胞周期を開始する過程は S 期の開始により制御されている。さらに、細胞の分化は細胞周期の停止や減速に伴って引き起こされるが、DNA 複製の開始制御が細胞分化の制御に大きな影響を与えることが知られている。

DNA は環境中の因子(紫外線、 γ 線、化学物質など)や内在性の因子(活性酸素など)により一定の頻度で傷を受ける(Maki 2002)。これらの DNA 損傷は突然変異を誘発する原因にもなるが、DNA 複製を阻害することにより細胞死を引き起こして細胞の生存を脅かす。細胞はヌクレオチド除去修復や塩基除去修復などの複数の修復経路を発達させることにより、DNA 損傷による遺伝的影響や細胞死から細胞自身を防御している(Friedberg et al. 1995)。DNA 修復に対して、DNA 複製は大きく二つの役割を果たしている。その一つは、DNA 複製の阻害が細胞の損傷応答(細菌での SOS 応答や真核生物での DNA 損傷チェックポイント)の最初のシグナルとなっていることである(Cox 2001; Katou et al. 2003; Tercero et al. 2003)。多くの DNA 修復経路は損傷応答システムの働きにより遺伝子発現や機能発現が誘導される。もう一つの役割は、修復経路のうち、除去修復の過程で修復 DNA 合成に関与することである(Aboussekhra et al. 1995; Shivji et al. 1995)。ヌクレオチド除去修復やミスマッチ修復では、損傷部位の除去により生じた DNA 上のギャップ領域を DNA 複製により元通りに復元することが必要となる。さらに、二本鎖 DNA が切断された場合には、相同組換え機構が主要な修復経路として働く。この過程にも組換え依存型 DNA 複製と呼ばれる複製機構が重要な役割を果たす(George et al. 2001)。

以上述べたように、DNA 複製は細胞周期制御や DNA 損傷応答と密接な関係があり、相互依存的である。したがって、DNA 複製の研究は細胞の増殖や環

境応答の中心的な課題であるが、その中で DNA 複製装置の構造や機能、細胞内での働きについての理解は最も基本的な問題である。複製装置の根幹をなす DNA ポリメラーゼに関する研究は、1956 年に A. Kornberg らによって DNA ポリメラーゼ I (Pol I) が発見されてから始まった。その後、現在までに大腸菌では五種類、真核生物では十四種類の DNA ポリメラーゼが同定されている (Hubscher et al. 2002)。全てのポリメラーゼが細胞増殖に必須であるわけではないが、様々な環境下において DNA 複製を滞りなく遂行するためには、このような多数の DNA ポリメラーゼを必要とするのであろうと考えられている。DNA ポリメラーゼには染色体複製に直接関与するものの他に、主として DNA 修復や遺伝的組換えに関与するもの、あるいは DNA 損傷を乗り越えるバイパス DNA 合成のためのポリメラーゼやミトコンドリア DNA の複製を行うもの等があり、ある程度の役割分担がなされている。さらに、ごく最近になり、姉妹染色分体が接着しているコヒージョン領域やヘテロクロマチン領域などの特殊領域での複製には、それらの複製に特異的なポリメラーゼが機能していることが示唆されている (Edwards et al. 2003; Fuss and Linn 2002)。

これら多種多様な DNA ポリメラーゼの生理学および生化学的機能を詳細に解明することの重要性は明白であるが、複製装置を構成する DNA ポリメラーゼの理解は焦眉の研究課題である。最近までの様々な研究により、複製装置は単に DNA 鎖を合成するだけでなく、複製開始制御の重要なステップに関与していることや、DNA 損傷などによる複製阻害のセンサーとして働くことが明らかになってきた (Masumoto et al. 2000; Navas et al. 1996; Navas et al. 1995)。複製装置は、染色体複製の際に必ず一度だけはゲノム DNA の全領域を通過することから、ゲノム上で起こっている様々な生化学的プロセスに影響を与えたり、積極的に関与していることが考えられる。例えば、転写とその制御、クロマチンの形成と再編成、DNA トポロジーの変動と維持などについては具体的な証拠が見いだされ始めており、多くの研究者の注目を集めている。

複製に関与するポリメラーゼの中でも、出芽酵母 DNA ポリメラーゼ ϵ は染色体複製以外にも様々な細胞機能を果たすことが示されており、複製装置の多様な生理機能を解明する上で最も活発に研究が進められてきた。しかしながら、遺伝学的な研究の成果に比べて、この DNA ポリメラーゼの生化学的解析は必ずしも十分でなく、手がかりが捕まえられつつある細胞内での複製装置の役割に対して分子的な基盤はまだほとんど与えられていないのが現状である。

2. DNA ポリメラーゼ ϵ

2-1. 総論

DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) は真核生物の染色体複製に関与する 3 種の DNA ポリメラーゼの一つである (Bell and Dutta 2002; Hubscher et al. 2002; Sugino 1995)。真核生物の染色体複製は細胞増殖阻害剤であるアフィジコリンにより強く阻害されることが知られている。研究の初期に真核生物から見いだされていた DNA ポリメラーゼ α (Pol α)、 β (Pol β)、と γ (Pol γ) の内、Pol α だけがアフィジコリンに感受性を示すことから、真核生物の染色体複製を担当するポリメラーゼは Pol α のみであろうと考えられていた。しかしながら、原核生物の複製型ポリメラーゼとは大きく異なり、Pol α は忠実な DNA 複製に必要な校正機能を持っておらず、DNA 合成のプロセッシビティ (processivity: DNA 鎖伸長のヌクレオチド重合を鋳型から解離せずに連続的に行える指標) が極めて低いことから、染色体複製には甚だ不十分な能力しか備えていない。1970 年代になると、出芽酵母では Pol α とは分子量や精製での挙動が異なるアフィジコリン感受性の DNA ポリメラーゼの活性が報告された。このポリメラーゼは校正機能を持ち、DNA 合成のプロセッシビティも高く、原核生物の複製型ポリメラーゼに類似の能力を有していた。実際に、この時に見いだされていた活性が Pol ϵ の活性であったが、Pol α 以外の複製型ポリメラーゼとして DNA ポリメラーゼ δ (Pol δ) の存在が哺乳動物細胞で発見されるまでは、菌類に特異的な特殊な事象と解釈され、ほとんど注目されなかった。哺乳動物でも、1987 年の Pol δ の発見に先立って、1985 年にウサギの骨髄細胞抽出液中に Pol ϵ の活性が見出されていたが、しばらくの間は DNA ポリメラーゼ δ (Pol δ) のサブクラスとして認識されていた。その後、この活性は Pol δ とは全く異なる別のポリメラーゼに担われていることが示され、1990 年に Pol ϵ と命名された (Burgers et al. 1990)。同年、出芽酵母を材料にして、高純度の Pol ϵ 精製標品の調製が成功し、それを契機にして出芽酵母での遺伝学を含めた詳細な研究が開始された (Hamatake et al. 1990; Morrison et al. 1990)。その後の研究により、Pol ϵ が Pol δ とともに出芽酵母での染色体複製および細胞増殖に必須の役割を果たしていることが証明されている (Karthikeyan et al. 2000; Morrison et al. 1991; Morrison and Sugino 1994; Ohya et al. 2002; Waga et al. 2001)。現在 Pol α は、プライマーゼ活性を有するサブユニットと複合体を形成することが明らかにされ、複製において主としてプライマー形成のためのプライマーゼとして機能することが示されている (Frick and Richardson 2001; Hubscher et al. 2002)。

出芽酵母で解明された Pol ϵ の性質や、Pol ϵ のサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列の情報は、ヒトやマウスでの Pol ϵ の研究の発展に大きく貢献

している。これまでの研究結果からは、Pol ϵ の構造や生化学的特徴は、出芽酵母からヒトにいたるまで広く真核生物界で高度に保存されていることが示されている。Pol ϵ のポリメラーゼ活性を担うサブユニットのアミノ酸配列中には Pol α と Pol δ とに共通するポリメラーゼモチーフが存在し、その特徴から、これら3種のポリメラーゼは type B DNA ポリメラーゼに分類されている。しかし、Pol ϵ と Pol δ だけには、DnaQ ファミリーのエキソヌクレアーゼモチーフがアミノ酸配列中に見いだされ、実際に校正機能として働く 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が検出されている。両者ともに試験管内 DNA 合成での忠実度は高く、出芽酵母の遺伝学的研究から、それぞれの校正機能を欠損した変異株はどちらも自然突然変異頻度が野生株よりも顕著に上昇すること、両者の校正機能が欠損すると変異頻度の上昇の程度は相乗的に大きくなることが示されている (Karthikeyan et al. 2000; Morrison et al. 1991; Morrison and Sugino 1994)。忠実度の高い DNA 合成を細胞内でも行っていることは、Pol ϵ と Pol δ の両方が複製型ポリメラーゼとして働いていることの証拠にもなっている。現時点では、Pol ϵ と Pol δ が染色体複製においてどのような役割分担をしているかは不明であるが、両者の違いは単独での DNA 合成のプロセッシビティが異なることである (Hamatake et al. 1990; Tan et al. 1986)。Pol δ は、SV40 ウイルスゲノム DNA の試験管内複製系での研究で最初に発見された時から、それ単独ではプロセッシビティが低い DNA 合成活性しか示さないことが知られている。プロセッシビティの高い DNA 合成を行うには、Pol δ を DNA につなぎ止める役割を担う PCNA (proliferating cell nuclear antigen) タンパク質と、PCNA (クランプ) を DNA に導入するクランプローダーである RF-C (replication factor C) を必要とし、ATP の加水分解に強く依存する。一方、Pol ϵ は単独でもプロセッシビティの高い DNA 合成を行うことができる。また、ATP およびその加水分解は必要としない。ただし、Pol ϵ でも PCNA に依存する反応条件が見出されており、PCNA と直接相互作用することも示されている (Lee et al. 1991; Eissenberg et al. 1997)。どちらにしても、Pol ϵ と Pol δ は真核細胞ではプロセッシビティの高い DNA 合成を行うことができる DNA ポリメラーゼであることから、染色体複製において中心的な役割を担うにふさわしい酵素であると言える。プロセッシビティの観点以外に Pol ϵ と Pol δ の違いが顕著である点は、後述するように、Pol ϵ は DNA 複製以外にも細胞周期制御や DNA 損傷応答、DNA 修復にも重要な役割を果たしていることである。

2-2. Pol ϵ の分子構造

Pol ϵ は、出芽酵母より最初に完全精製が成功したが、その後、分裂酵母、ショウジョウバエなどの昆虫細胞とヒトを含めた哺乳類動物からも精製されている。以前の報告では、出芽酵母での精製を除くと、完全な酵素ではなく部分的に分解された標品が得られる場合が多かったが、かなりの種で Pol ϵ をコードする遺伝子のクローニングが成功したことにより、出芽酵母以外の種でも Pol ϵ の詳細な分子構造が明らかにされつつある (Jokela et al. 1998; Kesti et al. 1993; Li et al. 1997; Li et al. 2000)。

Pol ϵ は 4 個の異なるサブユニットが 1 分子ずつ会合したヘテロ四量体の構造を取っていることが、精製標品の詳細な流体力学的解析から示されている (Chilkova et al. 2003)。図 1 A に出芽酵母の Pol ϵ のサブユニット構造の模式図を示す。DNA 合成活性と 3'-5' エキソヌクレアーゼ活性は分子量約 256 kDa の Pol2p サブユニットに担われている (Hamatake et al. 1990)。残り 3 種のアクセサリーサブユニット Dpb2p、Dpb3p、Dpb4p (それぞれ 80、23、22 kDa) については、生化学的活性は見いだされていない。遺伝学的な解析から、Pol2p および Dpb2p は細胞増殖に必須であることが示されているが、Dpb3p と Dpb4p についてはそれぞれをコードする遺伝子の欠失株は分離可能であることから細胞増殖に必須ではない。

前述したように、Pol2p には type B DNA ポリメラーゼに保存されている 8 つの領域と、エキソヌクレアーゼに保存されている 3 つの領域が存在する。これらの領域は、それぞれの活性中心に相当するが、Pol2p の N 末端側に偏って分布している。type B DNA ポリメラーゼの中で、Pol ϵ に特徴的な点は、他のポリメラーゼには全く相同性が認められない約 100 kDa の領域を C 末端側に持つことである (図 1B)。細胞から Pol ϵ を精製する過程で、この C 末端部分を失った N 末端側の 145 kDa のポリペプチド、p145 を分離することができる。活性中心が含まれることに一致して、p145 は単独で Pol ϵ とほとんど同様なポリメラーゼおよびエキソヌクレアーゼ活性を示す。また、p145 には他のサブユニットが結合していないことから、触媒サブユニットの C 末端部分には他のサブユニットとの結合部位が存在すると考えられている (図 1A) (Araki et al. 1991a; Araki et al. 1991b; Dua et al. 2000; Dua et al. 1998; Dua et al. 1999; Dua et al. 2002)。

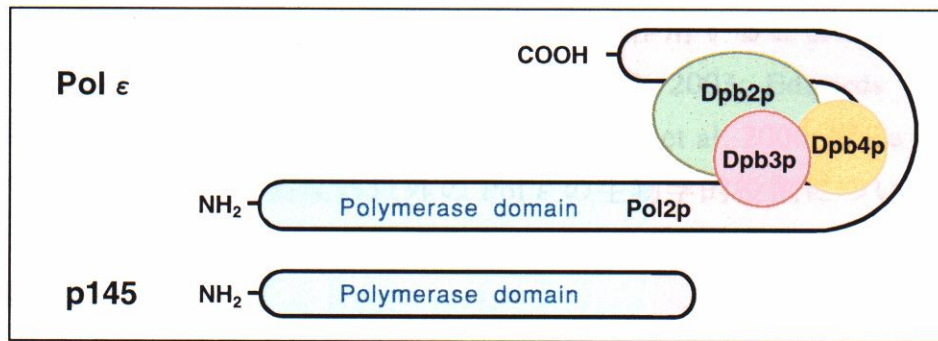


図 1A. Pol ε と p145 の構造

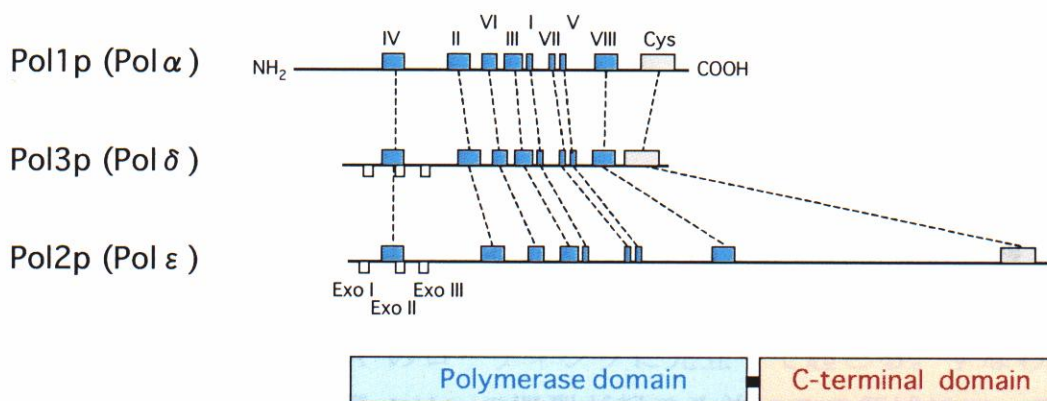


図 1B. 複製型 DNA ポリメラーゼの触媒サブユニットの構造

2-3. Pol ε の生物学的役割

Pol ε は、Pol α および Pol δ とともに、真核細胞の染色体複製に直接関与する。Pol α はプライマーゼと複合体を形成しており、RNA プライマー合成とそれに続く短い DNA 合成を行う。Pol ε と Pol δ は、その後のリーディング鎖およびラギング鎖の伸長を行うと考えられている (Bell and Dutta 2002; Hubscher et al. 2002; Sugino 1995)。

Pol ε は DNA 複製における鎖伸長反応だけでなく、細胞周期チェックポイント制御、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復等の修復系、相同組み換え機構などにも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いる。さらに近年には、DNA 複製の開始機構や遺伝子のサイレンシング、姉妹染色分体間のコヒージョンにも重要な役割を果たすことが示された。DNA 鎖伸長反応は Pol2p の N 末端領域が中心的な役割を果たすのに対し、それ以外の様々な細胞機能に対する関与には Pol2p の C 末端領域およびアクセサリーサブユニット同士の協調的な作用が重要であると考えられている。DNA 鎖伸長反応以外の Pol ε の働きについては、

その分子機構はほとんど不明であるが、Pol2p の C 末端領域およびアクセサリーサブユニットが DNA や他のタンパク質と相互作用することが重要であろうと予想されている(Araki et al. 1995; Asahara et al. 2003; Edwards et al. 2003; Kamimura et al. 1998; Takayama et al. 2003; Vlatkovic et al. 2000; Wada et al. 2002)。以下に、単なる DNA 鎖伸長反応以外の Pol ϵ の生物学的役割について述べる。

a. 複製開始

出芽酵母の DNA 複製の初期過程は、複製開始領域に pre-RC(pre-replication complex)が形成されることから始まる。そこに Cdc45 やサイクリン依存性キナーゼその他多数のタンパク質が作用して複製開始領域での二本鎖 DNA 開裂が生じた後、一本鎖 DNA 結合タンパク質である RP-A が結合する。その後、Pol α -プライマーゼ複合体や他の DNA ポリメラーゼのローディングを伴って DNA 合成が開始すると考えられている。

興味深いことに、クロマチン免疫沈降法 (CHIP) を用いた解析から、出芽酵母およびアフリカツメガエルにおいて Pol ϵ は Pol α よりも前に複製開始領域に結合していることが明らかになった(Masumoto et al. 2000)。しかもこの Pol ϵ のローディングは RP-A のローディングに先立って起こる。すなわち、Pol ϵ は複製開始領域の二本鎖 DNA の開裂が起こる前にこの領域にローディングされることになる。さらに、このことが Pol α の開始領域への結合に必須であることが示された。以上のことから、Pol ϵ は複製開始過程におけるレプリソーム構築の過程にも重要な役割を果たすことが明らかになった。

b. 複製フォークの円滑な進行

Pol2p の N 末端領域が欠損した出芽酵母の変異株は、増殖速度が極めて遅いが、分離して各種の解析が可能である(Kesti et al. 1999)。通常 Pol ϵ のポリメラーゼ活性は染色体複製に必須であると考えられているが、この変異株では Pol ϵ の触媒サブユニットのポリメラーゼ活性ドメインが欠損しているためにおそらく Pol δ が不完全ではあるもののその代役を務めていると想像されている。この変異株では、細胞周期の S 期が顕著に長くなっており、DNA 合成速度が著しく低下している(Ohya et al. 2002)。また、CHIP を用いた解析により、変異株での複製フォークの進行が顕著に遅くなることが示されている。さらに、アフリカツメガエルの卵抽出液から Pol ϵ を免疫除去した場合にも、全体の DNA 合成量が顕著に低下し、短い DNA 断片の蓄積や、染色体上に Pol α が異常に蓄積したりすることが観察されている(Waga et al. 2001)。これは進行が異常になった複製フォーク中間体の蓄積によるものと考えられている。これらのこと

から、Pol ϵ は単に複製フォークにおいて DNA 鎖の伸長を行うに止まらず、複製フォークの進行に必要な未知の機能を有することが考えられている。

c. 染色体上の特殊な領域の DNA 複製

ヒト培養細胞の核内での Pol ϵ の分布の解析から、Pol ϵ は核内で局在して存在する場合があります、顕著なフォーサイ (foci) 形成が見られた (Fuss and Linn 2002)。このフォーサイは細胞周期の S 期に観察されるが、必ずしも Pol δ のフォーサイや PCNA の分布とは挙動が一致するわけではない。特に、Pol ϵ のフォーサイはヘテロクロマチン領域が複製される S 期の後期になってヘテロクロマチンが局在する領域によく観察され、これらのフォーサイは PCNA とも共局在を示す。また、出芽酵母の Pol ϵ の変異株を用いた解析から、出芽酵母ではテロメアやその周辺領域の複製や維持に Pol ϵ が重要な役割を果たしていることが示唆されている (Ohya et al. 2002)。

d. 姉妹染色分体のコヒージョン形成

Pol2p の C 末端領域の役割を明らかにする目的で、C 末端断片と相互作用する因子のスクリーニングが行われ、姉妹染色分体のコヒージョン形成に必須である DNA ポリメラーゼ σ (Pol σ) が同定された (Edwards et al. 2003)。Pol σ と Pol ϵ は直接結合し、さらに Pol2p の C 末端が一部分欠失した変異株では、コヒージョンが欠損して染色体分離が異常になることも示された。これらのことから、Pol2p の C 末端領域およびアクセサリサブユニットがコヒージョン形成の制御に重要な役割を果たすことが考えられる。

e. S 期チェックポイント

野生型酵母に、DNA 複製にストレスを与える薬剤、ヒドロキシウレア (HU) を加えた場合、細胞周期が S 期で停止してそのストレスを取り除くための時間を稼ぐ S 期チェックポイントが発動する。それに対して、POL2 遺伝子の C 末端が欠けた Pol ϵ 変異株では、細胞周期の停止が起こらず、DNA 複製が未完のまま M 期に入るために細胞は急速に死ぬ (Navas et al. 1996; Navas et al. 1995)。以上のことから、Pol ϵ は S 期チェックポイント制御に重要な役割を果たすこと、この機能に Pol2p の C 末端領域および/あるいはアクセサリサブユニットが関与することが示唆されている。

f. DNA 修復と組換え

出芽酵母の DNA ポリメラーゼ変異株の解析から、Pol ϵ は化学物質や紫外線

による DNA 損傷を修復する過程に関与することがわかった(Budd and Campbell 1995)。また、出芽酵母抽出液を用いた試験管内 DNA 修復系において、*pol2* 変異株からの抽出液は塩基除去修復やヌクレオチド除去修復の活性が低下した(Wang et al. 1993)。さらに、精製したヒト由来の酵素および DNA ポリメラーゼを用いてヌクレオチド除去修復を再構成したところ、Pol ϵ が最も効率よく修復を完了させた(Aboussekhra et al. 1995; Shivji et al. 1995)。以上のことから Pol ϵ は塩基除去修復およびヌクレオチド除去修復に対して重要な役割を果たすことが示された。

また、哺乳類動物から、二本鎖 DNA 切断の組換え修復に関与するタンパク質複合体が精製されているが、この中に Pol ϵ が含まれていた(Jessberger et al. 1996; Jessberger et al. 1993)。出芽酵母の DNA ポリメラーゼ変異株の解析からは、Pol ϵ 変異株が最も二本鎖 DNA 切断の修復効率を低下させることが示された(Holmes and Haber 1999)。これらのことから、Pol ϵ は二本鎖 DNA 切断の組換え修復にも機能することが明らかになった。

g. サイレンシングとクロマチン再編

出芽酵母での rDNA 領域のサイレンシングを解除する変異として *dpb3* 変異が同定され、Pol ϵ がサイレンシングに関与することが示されている(Smith et al. 1999)。サイレンシングは、遺伝子の発現制御の機構であり、転写制御因子などによる発現制御とは独立に作用して、通常はゲノム上のある一定の領域の転写抑制として働く。サイレンシング領域は特殊なクロマチン構造をとることで転写制御因子や転写装置などの結合を阻害し、この領域に含まれる遺伝子の発現を抑制する。サイレンシングのもう一つの特徴は、エピジェネティックな情報伝達(epigenetic inheritance)に関与することである。エピジェネティクスとは、遺伝子の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の発現を活性化したり不活性化したりする後生的修飾のことであり、例えば、クロマチンの主要な構成因子であるヒストンの種々の化学修飾(メチル化、アセチル化、リン酸化等)などが含まれる。Pol ϵ がどのようにサイレンシング制御に関与するのかは不明であるが、今後の重要な課題の一つである。

興味深いことに、マウス Pol ϵ の Dpb2p がヒストン脱アセチル化酵素複合体と相互作用することが最近明らかになった(Wada et al. 2002)。ヒストン脱アセチル化酵素はヒストンを脱アセチル化してヒストンと DNA との結合を強め、サイレンシング形成に貢献する酵素である。Pol ϵ はヌクレオソームタンパク質との相互作用を通じてクロマチン再編に関与することが示唆される。

2-4. Pol ϵ の生化学的解析

上に述べたような Pol ϵ の様々な生物学的機能の分子基盤を明らかにするためには、Pol ϵ やそれと相互作用する様々な因子の生化学的解析が不可欠である。しかしながら、細胞内での量が少ない Pol ϵ を細胞から精製することは長い間、困難であった。また、DNA 合成やエキソヌクレアーゼ活性の測定以外には、上記の生物学的機能に関連する何らかの生化学的活性を見いだすことも難しかった。したがって、Pol2p の N 末端領域に触媒活性が存在すること以外には、それぞれのサブユニットの生化学的機能については不明であった。

出芽酵母においては、大量の細胞抽出液から極めて少量ではあるが4つのサブユニットからなる Pol ϵ の高純度標品を調整することは可能である。しかし、収率の低さと、操作にかなりの労力と時間がかかることが大きな問題点であった。最近になって、サブユニットの一つに Flag タグを付加して発現させた細胞を用いることで、高い効率で出芽酵母から Pol ϵ を精製する方法が当研究室で確立された。さらに、出芽酵母の Pol ϵ と Pol2p の N 末端領域に相当する p145 が示す DNA 合成活性の詳細な比較から、Pol2p の C 末端領域およびアクセサリサブユニットの生化学的機能に関する新しい知見が得られている。これらに関して次に述べる。

a. PCNA との相互作用

PCNA は三量体からなるリング上の構造をとるタンパク質で、このリングの穴に DNA を通すことによって DNA 上をスライドすることができる。これによって、PCNA と結合している DNA ポリメラーゼを DNA 上につなぎ止めておき、プロセッシビティの高い DNA 合成能を可能にする。先に述べたように、Pol δ の高いプロセッシビティでの DNA 合成は PCNA に完全に依存する。それに対して、Pol ϵ は PCNA に依存しないプロセッシビティの高い DNA 合成を行うことができるが、高イオン強度のアッセイ条件では PCNA に依存的な DNA 合成を検出することが可能である。この条件を用いて Pol ϵ と p145 を比較すると、p145 は PCNA に対する依存性が顕著に弱くなっていることが示された(大槻千鶴、修士論文)。このことから、Pol2p の C 末端領域およびアクセサリサブユニットには PCNA と相互作用する働きが存在することが示唆される。PCNA は DNA 複製だけでなく、DNA 修復や損傷応答などにも関与することが知られており、Pol ϵ が DNA 修復などに作用する場合に重要な役割を果たしているのかも知れない。

b. 単鎖 DNA センシング

Pol ϵ は、DNA 合成を行っていない時にも鋳型 DNA と安定に結合して複合体を形成するが、その複合体が形成された後でさらに別の単鎖 DNA を加えると単鎖 DNA を感知して鋳型 DNA から積極的に解離する(図 2A)(Maki et al. 1998)。つまり、Pol ϵ には鋳型 DNA 結合部位とは別に単鎖 DNA と相互作用する部位が存在し、そこでの単鎖 DNA 結合が Pol ϵ のコンフォメーションの変化を発動すると考えられる。この単鎖 DNA の感知により誘発される鋳型 DNA からの解離は p145 ではほとんど観察されない。このことから、単鎖 DNA の感知とその後のシグナル伝達には Pol2p の C 末端領域およびアクセサリーサブユニットが関与すると考えられる。この生化学的機能の実際の生物学的意義は今後の研究を待たねばならないが、Pol2p の C 末端領域に欠損を持つ *POL2* 遺伝子の変異やアクセサリーサブユニットの変異が S 期チェックポイントに欠損を示すことから、Pol ϵ は、複製フォークの進行が阻害された場合に、それによって生じた単鎖 DNA を感知することによって、チェックポイントのセンサーとしての役割を果たしているのかもしれない(図 2B)。

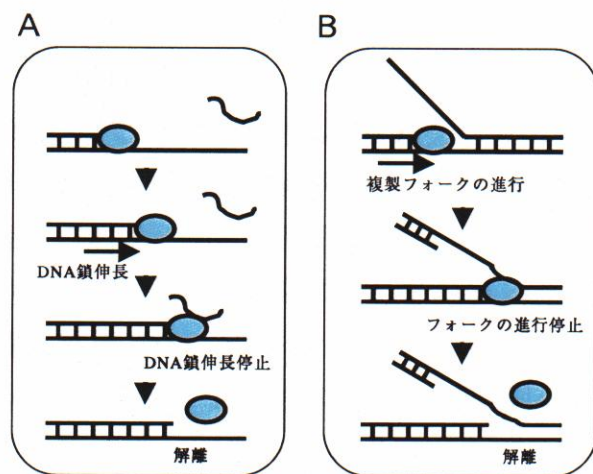


図 2. Pol ϵ の単鎖 DNA センシング能

3. 本研究の目的

3-1. Pol ϵ と DNA の相互作用

Pol ϵ の生物学的役割の重要性は、主として遺伝学的な研究により明らかになってきたが、それらの細胞機能における Pol ϵ の役割の分子レベルでの理解はほとんど進んでいない。この点を明らかにするために、当研究室では出芽酵母から精製した Pol ϵ を用いて詳細な生化学的解析が行われてきた。その過程で、Pol ϵ は鋳型 DNA と安定な複合体を形成する以外に様々な様式で DNA と

相互作用することが見出された。これは、Pol ϵ が他の DNA ポリメラーゼとは異なるユニークな細胞機能を有することを強く示唆する。

Pol ϵ の DNA との相互作用の中でとりわけ興味深いことは、Pol ϵ が鋳型 DNA との結合部位とは異なる場所で二本鎖 DNA に強く結合することである(図 3)。DNA ポリメラーゼは酵素として DNA 鎖伸長反応を触媒することから、これまでに研究されたほとんどの DNA ポリメラーゼは合成産物である二本鎖 DNA に対する親和性を持たない。その理由は、DNA 鎖伸長反応において 1 ヌクレオチド残基の重合の後、次のヌクレオチドを重合するためには伸長中の二本鎖 DNA 上を 1 残基分だけすぐに移動しなければならないからである。加えて、鋳型 DNA の複製が完了した後に別の鋳型に再結合して DNA 合成を再開するには産物の二本鎖 DNA から速やかに解離する必要があることも、DNA ポリメラーゼが二本鎖 DNA に対して親和性を持たない理由である。当研究室での研究からは、Pol ϵ の DNA 合成活性は二本鎖 DNA により阻害されないことが示されていることから、Pol ϵ は DNA 合成に直接関与する部分には影響しない形で二本鎖 DNA に結合するのか、あるいは DNA 合成中の Pol ϵ は二本鎖 DNA に結合しなくなる可能性が考えられている。

さらに興味深いことに、この二本鎖 DNA 結合能は Pol ϵ では容易に検出されるが、p145 では全く検出できなかった。このことから、Pol ϵ の強い二本鎖 DNA 結合能には Pol2p の C 末端領域およびアクセサリーサブユニット(以下、「C 末端アセンブリー」と呼ぶ(図 3))が Pol ϵ の生理機能において何らかの意味を持つ可能性が考えられる。

Pol ϵ の C 末端アセンブリーが関与すると思われる生化学的機能としては、PCNA との相互作用と単鎖 DNA センシングに次いで 3 番目の機能として見いだされた二本鎖 DNA 結合能は、Pol ϵ の生物学的役割の分子基盤の解明に大きな手がかりを与えてくれることが期待される。

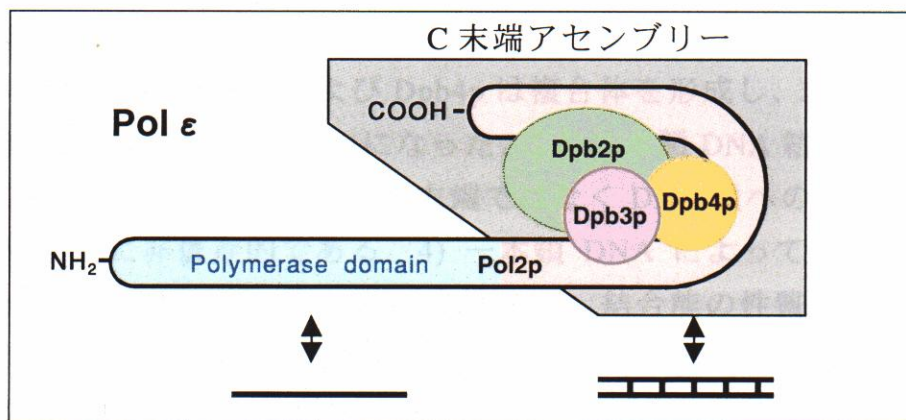


図 3. Pol ϵ の一本鎖 DNA 結合と二本鎖 DNA 結合

3-2. Dpb3p と Dpb4p の二本鎖 DNA 結合能

本研究の目的は、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の生物学的意義を解明することを目指し、その分子基盤を明らかにすることである。この候補と考えたのが Dpb3p および Dpb4p サブユニットである。近年、両サブユニットがヒストンフォールドモチーフ (Histone-Fold motif, HF モチーフ) を持つことが報告された (Li et al. 2000; Ohya et al. 2002)。HF モチーフはコアヒストン中に見出された構造モチーフで、HF モチーフを持つタンパク質間での二量体形成およびタンパク質結合や DNA 結合、クロマチン結合に関わるモチーフとして知られる (図 4) (Arents and Moudrianakis 1995; Gangloff et al. 2001; Luger et al. 1997)。このことから、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能は Dpb3p および Dpb4p サブユニットに担われている可能性が考えられた。

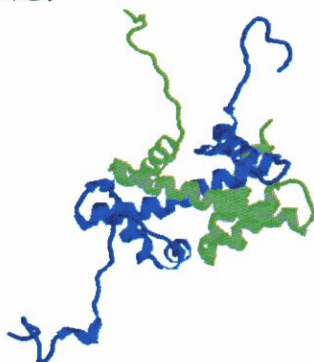


図 4. ヒストン H2A および H2B のヒストンフォールドモチーフ

この可能性を検証するために、両サブユニットを大腸菌細胞内で発現させ、それぞれのサブユニットおよび両サブユニットの複合体の精製を行い、DNA 結合能を詳細に解析することにした。これまでに、Dpb3p および Dpb4p サブユニットの昆虫細胞内での発現と複合体を形成することは報告されているが、精製や構造解析、生化学的解析はなされていない。したがって、意味のある複合体形成が両サブユニットによってなされているかについても詳細な構造解析を行うことにした。

本研究の結果から、Dpb3p および Dpb4p は複合体を形成し、また二本鎖 DNA への結合能を有することが明らかになった。この二本鎖 DNA 結合能は、1) DNA 塩基配列に非依存的である、2) DNA 末端ではなく DNA 鎖への結合である、3) Mg⁺⁺ および ATP に非依存的である、4) 一本鎖 DNA によって阻害される、という特徴を持ち、これらは Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の性質と共通である。以上のことから、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示唆される。しかし、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能は Pol ϵ の結合能よりも非常に弱いことから、他のサブユニットもまた、

Dpb3p-Dpb4p 複合体の構造安定化などを通して Pol ϵ の強い二本鎖 DNA 結合に関与していることが考えられる。

そこで次に、Dpb3p-Dpb4p 複合体と Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能が真に一致するものなのか、また Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合能の生物学的役割は何であるのかを明らかにするために、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能が低下する一アミノ酸置換変異を酵母染色体に導入して、変異型 Pol ϵ の精製と生化学的解析を行うことにした。現在まだ解析途中であるが、この結果も合わせて本論文に記載した。

以上の研究結果から、Dpb3p-Dpb4p 複合体および Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の生物学的役割について考察した。また、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能における HF モチーフの役割に関する考察も行った。

II 材料と方法

1. 試薬、酵素、その他の材料

一般的な試薬は和光純薬株式会社、有機溶媒はナカライテスク株式会社のも
のを使用した。培地用の試薬は Difco 社のものを用いた。BSA (Fraction V)、IPTG、
Tris base (TRIZMA)、ampicillin、kanamycin、chloramphenicol、還元型グルタチ
オンは SIGMA 社、EDTA、HEPES、MOPS は同仁化学株式会社のものを用い
た。Ultrapure dNTP および NTP (minimal diphosphate, sodium salt)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$
(800 Ci/mmol)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ (3000 Ci/mmol)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}\gamma\text{S}$
(3000 Ci/mmol)、poly(dA)₃₀₀ (sodium salt)、poly(dT)₃₀₀ (sodium salt)は
Amersham Pharmacia Biotech 社のものを用いた。Oligo(dT)₁₀ は Sigma Genosys社
に合成を依頼した。φX174 RFI DNA は New England Biolabs 社から購入した。
制限酵素 *EcoRI*、*BamHI*、*StuI*、*BglIII* は Takara、制限酵素 *NcoI* および T4 DNA
ligase は Toyobo のものを用いた。解析に用いた出芽酵母 Pol ε および p145 タ
ンパク質は当研究室、真木智子によって精製された (Maki et al. 1998)。抗 Pol ε
血清は大阪大学、杉野明雄先生より分与していただいた。

2. 培地

大腸菌の培養に用いた培地は Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989) の記
載に従った。一般的な培養には LB 培地 (1% (w/v) Bacto Tryptone、0.5% Bacto
Yeast Extract、0.5% NaCl)を用いた。寒天培地として使用する場合には LB 培地
に 1.5%の Bacto Agar を加えた。必要に応じてアンピシリン、カナマイシン、
クロラムフェニコールを終濃度が 50 μg/ml となるように加えた。エレクトロ
ポレーション後の培養は SOC 培地 (2% Bacto tryptone、0.5% Bacto Yeast Extract、
0.05% NaCl、0.25 mM KCl、10 mM MgCl₂、20 mM glucose)を用いた。

酵母の培養に用いた培地は Methods in Yeast Genetics (Rose et al. 1990) の記
載に従った。一般的な培養には YPD 培地 (1% Bacto Yeast Extract、2% Bacto
Peptone、2% glucose)を用いた。必要に応じて、ウラシルを含まない完全合成
培地 (SC-Ura 培地 ; 0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids、0.2%
uracil dropout mix、2% glucose)を用いた。寒天培地として使用する場合には 2 %
の Bacto Agar を加えた。SC-Ura 寒天培地を作成する際には、オートクレーブ
滅菌する前に 5 N NaOH を用いて pH7.0 に調整した。*URA3* 遺伝子マーカーを
失って Ura^rの表現型を獲得したクローンの選択には 5-フルオロオロチン酸 (5-
FOA)を含有する寒天培地 (0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids、
0.2% uracil dropout mix、50 μg/ml uracil、0.1% 5-FOA、2% glucose、2% Bacto Agar)

を使用した。5-FOA 寒天培地を作成する場合、寒天以外の試薬を 1/2 容量の水に溶解したものを PES メンブレンフィルター (0.22 μm) (CORNING 社) で濾過滅菌し、オートクレーブした 1/2 容量の 4%寒天液を混合した。

3. タンパク質精製に用いたバッファー

- Buffer F: 50 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 300 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.005% NP-40, 10% (v/v) glycerol, 1 mM DTT
- Buffer FP: Buffer F, 1 \times protease inhibitor cocktail (complete, EDTA-free) (Roche), 1% (v/v) protease inhibitor cocktail for fungal and yeast cells (Sigma), 2 mM β -glycerophosphate, 2 mM NaF, 0.4 mM Na_3VO_4 , 0.5 mM Na-pyrophosphate
- Buffer G: 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 1mM DTT, 150 mM NaCl
- Buffer HP: 0.1 M Na-phosphate (pH7.0), 10% (v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
- Buffer P: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 (pH7.3)
- Buffer Q: 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 1mM DTT, 5% (v/v) glycerol
- Buffer S: 50 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% (v/v) glycerol

4. 菌株

4-1. 大腸菌株

プラスミド DNA 調製の際の宿主としては大腸菌 DH5 α を用い、タンパク質発現には大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) を用いた。BL21-CodonPlus(DE3)-RIL は大腸菌 BL21(DE3)由来の菌株にアルギニン、イソロイシン、ロイシンの tRNA およびクロラムフェニコール耐性遺伝子を含むプラスミドを導入したものである。

4-2. 出芽酵母株

変異型 Pol ϵ を精製するための酵母変異株作製の親株としては YRT1 (YTI189 background *dpb3::DBP3-5FLAG*) (当研究室、田島理絵作製) を用いた。YTI189 (*MATa leu2 Δ trp1 Δ ura3052 prb1-1122 pep1 Δ -3 gal2 Δ*) は国立遺伝学研究所、荒木弘之博士より分与を受けた。

5. プラスミド DNA

YCplac111-*DPB3* は *DPB3* 遺伝子が YCplac111 (Gietz and Sugino, 1988) プラスミドに組み込まれたプラスミドであり、pBluescript-*DPB4* は *DPB4* 遺伝子が pBluescript (Stratagene) プラスミドに組み込まれたプラスミドである。両プラスミドは大阪大学の杉野明雄博士より分与を受けた。タンパク質発現用ベクターとしては pET28a(+) (NOVAGEN) および pGEX6p-1 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。酵母 *dpb4* 変異株作製のための変異導入用プラスミドとしては YIplac211-*dpb4*(K57A) および YIplac211-*dpb4*(Q64E) (当研究室、久保田元作製) を用いた。

6. Dpb3p および/または Dpb4p の大腸菌内発現用プラスミドの構築

YCplac111-*DPB3* プラスミド DNA を鋳型にして *DPB3*-forward および *DPB3*-reverse プライマー(表 I)を用いて *DPB3* 遺伝子領域を PCR 増幅した。*DPB3*-forward プライマーと *DPB3*-reverse プライマーは 5'末端近傍にそれぞれ *Nco*I および *Bam*HI の切断部位を持つ。精製した PCR 産物を *Nco*I および *Bam*HI で切断し、pET28a(+)発現用ベクターの *Nco*I および *Bam*HI 部位にクローニングした。構築された pET28a(+)-*DPB3* プラスミドを pTT1 と銘々した。このプラスミドはカナマイシン抵抗性マーカーを有する。次に pBluescript-*DPB4* プラスミド DNA を鋳型にして *DPB4*-forward および *DPB4*-reverse プライマーを用いて *DPB4* 遺伝子領域を PCR 増幅した。*DPB4*-forward プライマーと *DPB4*-reverse プライマーは 5'末端近傍にそれぞれ *Eco*RI および *Bam*HI の切断部位を持つ。精製した PCR 産物を *Eco*RI および *Bam*HI で切断し、pGEX6p-1 発現用ベクターの *Eco*RI および *Bam*HI 部位にクローニングした。このプラスミドはアンピシリン抵抗性マーカーを有し、また、*DPB4* 遺伝子を、その N 末端に glutathione S-transferase (GST)が融合した GST-Dpb4p として発現する。この融合タンパク質の GST と Dpb4p との境界領域には PreScission protease により認識される切断配列が存在する。構築された pGEX6p-1-*DPB4* プラスミドを pTT2 と銘々した。

表 I プライマーリスト

<i>DPB3</i> forward (34 mer):	[5'-CCACCACCATGGCCAACTTAGTTAAAGAAAAGC-3']
<i>DPB3</i> reverse (33 mer):	[5'-GGAGGAGGATCCCCTAAGGATCGGTGCTTTTC-3']
<i>DPB4</i> forward (31 mer):	[5'-GGAGGAGGATCCATGCCACCAAAGGTTGGA-3']
<i>DPB4</i> reverse (33 mer):	[5'-GAAGAAGAATTCTTACGTTTGCTCAAGGTTTTG-3']

7. Dpb3p および/または Dpb4p の大腸菌内発現

Dpb3p および GST-Dpb4p タンパク質の大腸菌内で同時に発現させる場合は、pTT1 および pTT2 プラスミドを BL21-CodonPlus(DE3)-RIL に導入した。形質転換には Gene Pulser (BioRad)を用いたエレクトロポレーション法 (2.5 kV パルス)を用いた。二つのプラスミドを持つ形質転換体はカナマイシン、アンピシリン、クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地で選択して分離した。Dpb3p または Dpb4p を単独で発現させる場合は、pTT1 または pTT2 プラスミドを BL21-CodonPlus(DE3)-RIL に導入し、それぞれカナマイシン、クロラムフェニコールまたはアンピシリン、クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地で形質転換体を選択した。形質転換効率は、単独形質転換の場合は約 5×10^8 cfu/ μ g で、共形質転換の場合は 4×10^7 cfu/ μ g であった。

Dpb3p と GST-Dpb4p タンパク質の共発現を誘導する際には上記の形質転換体をカナマイシン、アンピシリン、クロラムフェニコール含有 LB 寒天培地上に約 1000 colony/plate になるようにまき、30℃にて約 24 時間培養した。得られたコロニーをかき集めて 3 ml の LB 液体培地に懸濁し、1 l のカナマイシンおよびアンピシリン含有 LB 液体培地に O.D.₆₀₀ が 0.2 になるように接種して 30℃にて培養を行い、O.D.₆₀₀ が 0.6 になった時点で IPTG を終濃度 1 mM になるように添加し、Dpb3p および GST-Dpb4p の共発現を誘導した。発現誘導開始後、2 時間経過したところで培養液を 4℃に冷却して集菌し、これを氷冷した Buffer P に懸濁した。懸濁液を氷上にて超音波処理 (出力コントロール 5、1 秒 pulse + 1 秒 interval を 15 セット) (ASTRASON ultrasonic processor model XL2020、MISONIX)して細胞破碎し、遠心後に上清を集めた。SDS-PAGE により Dpb3p および GST-Dpb4p タンパク質の発現を確認した。

GST-Dpb4p あるいは Dpb3p の単独発現も基本的に共発現の場合と同様に行った。

8. Dpb3p-Dpb4p 複合体の精製

8-1. GSTrap FF カラムクロマトグラフィー

精製行程の操作は全て 4℃にて行った。7 で得た上清を Buffer P にて平衡化した GSTrap FF カラム (5 ml) にアプライした。10 カラム容量の Buffer G で洗った後、600 U の PreScission protease を含む 1 カラム容量の Buffer G をカラムに注入して、バッファーを流すのを止め、カラム内で protease による GST tag の切断反応をおこなった (4℃、4 時間)。その後、Buffer G にて溶出を行ったところ、Dpb4p と Dpb3p が挙動を同じくして回収された。

8-2. Mono S カラムクロマトグラフィー

GSTrap FF カラムから溶出したピーク画分を透析して塩濃度を 20 mM まで下げた。この時点では大腸菌由来の DnaK タンパク質が一部の Dpb3p あるいは Dpb4p タンパク質に結合しているため、この結合をはずすために 2 mM ATP および 2 mM $MgCl_2$ をサンプルに加えて氷上に 10 分間置いた後、Buffer S + 20 mM NaCl にて平衡化した Mono S (1 ml) カラムにアプライした。Buffer S + 20 mM を 7 カラム容量流して遊離した DnaK を溶出した後、Buffer S + 70 mM NaCl を 15 カラム容量流したところ Dpb3p と Dpb4p が挙動を同じくして単一ピークとして溶出された。その後、500 mM NaCl まで塩濃度を上げながら溶出を継続すると Dpb3p と複合体を形成していない Dpb4p が約 200 mM の塩濃度の時点で溶出された。Dpb3p と Dpb4p を含むピーク画分を回収した。

8-3. Mono Q カラムクロマトグラフィー

8-2 で得たサンプルを Buffer Q + 150 mM NaCl にて平衡化した MonoQ カラム (0.1 ml) にアプライした。2 カラム容量の平衡化バッファーでカラムを洗った後、塩濃度を 150 mM から 500 mM に 10 カラム容量かけて徐々に上昇させると約 350 mM NaCl の時点で Dpb3p と Dpb4p が挙動を同じくして溶出された。このピーク画分を回収し、少量ずつ分注した後、液体窒素中でこれを凍らせ、 $-80^{\circ}C$ にて保存した。SDS-PAGE の結果を NIH image software を用いて解析したところ、タンパク質の純度は 95% 以上であった。1 l の大腸菌培養液から 1.3 mg の Dpb3p-Dpb4p 複合体を得た。

9. Dpb4p の精製

9-1. GSTrap FF カラムクロマトグラフィー

精製行程の操作は全て $4^{\circ}C$ にて行った。7 で得た上清を Buffer P にて平衡化した GSTrap FF カラム (5 ml) にアプライした。10 カラム容量の Buffer G でカラムを洗った後、600 U の PreScission protease を含む 1 カラム容量の Buffer G をカラムに注入してバッファーを流すのを止め、カラム内で GST tag の切断反応を行った ($4^{\circ}C$ 、4 時間)。その後、Buffer G を再び流して Dpb4p を含む溶出画分を回収した。

9-2. Mono Q カラムクロマトグラフィー

9-1 で得られたサンプルを Buffer Q + 150 mM NaCl にて平衡化した MonoQ カラム (8 ml) にアプライした。10 カラム容量の平衡化バッファーでカラムを洗った後、NaCl 濃度を 150 mM から 500 mM に 15 カラム容量かけて徐々に上

昇させると、約 250 mM NaCl の時点で Dpb4p が単一ピークとして溶出された。

9-3. Mono S カラムクロマトグラフィー

Mono Q から溶出されたサンプルを透析して塩濃度を 100 mM 相当にまで下げ、Buffer S + 100 mM NaCl にて平衡化した MonoS カラム (0.1 ml) にアプライした。平衡化バッファでカラムを洗った後、20 カラム容量をかけて NaCl 濃度を 100 mM から 500 mM まで上昇させると、約 150 mM で Dpb4p が溶出した。ピーク画分を回収し、分注した後、液体窒素でこれを凍らせて -80℃ にて保存した。SDS-PAGE の結果からタンパク質の純度は 99% 以上であると判断した。11 の大腸菌培養液から 9.6 mg の Dpb4p が得られた。

10. Dpb3p-Dpb4p 複合体および Dpb4p のゲル濾過クロマトグラフィーによる解析

すべての操作は 4℃ で行った。精製した Dpb3p-Dpb4p 複合体または Dpb4p を含む 30 μ l 溶液を Buffer Q + 150 mM NaCl にて平衡化した Superdex 200 PC 3.2/30 カラム (2.4 ml) にアプライし、流速 10 μ l/ml で溶出した。40 μ l を 1 画分として回収し、これを SDS-PAGE で解析した。Colloidal Blue により染色したタンパク質バンドを NIH image software を用いて定量した。用いたマーカータンパク質の分子量およびストークス半径はそれぞれ、thyroglobulin (669 kDa、85.0 Å)、catalase (232 kDa、52.2 Å)、BSA (67 kDa、35.5 Å)、chymotrypsinogen A (25 kDa、20.9 Å) である。プラスミド DNA、pET15b(+) をボイド容量検出のためのマーカーとして用いた。

11. Dpb3p-Dpb4p 複合体および Dpb4p のシヨ糖密度勾配遠心分離法による解析

すべての操作は 4℃ で行った。精製した Dpb3p-Dpb4p 複合体または Dpb4p を含む 20 μ l 溶液を 10-40% のシヨ糖密度勾配をかけた 2 ml の Buffer V (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 5 mM DTT) 上にアプライして、TLS-55 rotor を用いて TL-100 超遠心機 (Beckman) にて 55000 rpm で 15 時間遠心を行った。遠心管の底から勾配液をポンプで吸い上げ 3 滴を 1 画分として回収し、SDS-PAGE で解析した。Colloidal Blue 染色したバンドを NIH image software を用いて定量した。マーカータンパク質の沈降係数はそれぞれ、thyroglobulin (19.2 S)、catalase (11.3 S)、aldolase (7.3 S)、BSA (4.3 S)、RNase A (1.8 S) である。

12. ゲルシフトアッセイ

12-1. DNA 結合反応に用いた基質 DNA

基質 DNA として用いたオリゴマー-DNA は Sigma Genosys 社に依頼して合成した。オリゴマー-DNA の配列は以下に示した。オリゴマーの名前の末尾に 'F' の文字があるものはその 5'-末端が FITC (fluorescein 5(6)-isothiocyanate) により標識されていることを示す。

oligomer 7 (7F):	5'-GACGC TGCCG AATTC TACCA GTGCC TTGCT AGGAC ATCCT TGCCC ACCTG CAGGT TCACC C-3'
oligomer 71:	5'-GGGTG AACCT GCAGG TGGGC AAAGA TGTCC TAGCA AGGCA CTGGT AGAAT TCGGC AGCGT C-3'
oligomer T ₆₀ (T ₆₀ F):	homodeoxyoligomer of 60 thymine nucleotides
oligomer A ₆₀ (A ₆₀ F):	homodeoxyoligomer of 60 adenine nucleotides

オリゴマー-DNA のアニーリングは 7.5 mM [in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM KCl] に調製した各オリゴマー溶液を 1:1 の容量比で混ぜ、98°C、5 分、75°C、30 分、さらに 55°C、30 分処理した後、ゆっくりと室温まで冷却することにより行った。アニーリング産物は非変性 PAGE によりその構造を確認した。アニーリングしていない余剰のオリゴマー-DNA はいずれの場合も検出限界以下であった。必要に応じてこれを HPLC (TSKgelDNA-NPR カラム, Tosoh) により精製した。二本鎖 DNA 結合を調べるための基質として oligomer 7F (61 mer) とこれに相補的な配列を持つ oligomer 71 (61 mer) をアニーリングさせて 7F + 71 を調製した。また、oligomer T₆₀F と oligomer A₆₀ をアニーリングさせて、T₆₀F + A₆₀ を調製した。

Competitor DNA として用いた ϕ X174 RFI DNA は *StuI* で一カ所切断 (blunt end) した後、フェノール：クロロホルム抽出を行った後、HPLC (TSKgelDNA-NPR カラム, Tosoh) により精製した。環状 ϕ X174 DNA を用いる場合は topoisomerase I により負のスーパーコイルを解消させたものを、フェノール：クロロホルム抽出して、HPLC により精製した。

12-2. Dpb3p-Dpb4p 複合体および Dpb4p の DNA 結合反応およびゲル電気泳動

DNA 結合反応液 (5 μ l) は 20 mM HEPES-KOH (pH7.4)、0.5 mM EDTA、0.05% NP-40、10% (v/v) glycerol、60 μ g/ml BSA、0.3 mM 蛍光標識 DNA および、それぞれの実験において記載した量の Dpb3p-Dpb4p 複合体あるいは Dpb4p タン

パク質を含む。この反応液を氷上で 10 分間反応させた後、loading buffer [35 mM Bis Tris-HCl (pH6.3), 20% (v/v) sucrose, 1 mg/ml bromophenol blue] を 0.5 μ l 添加し、予め 18 mA で 2 時間、前泳動しておいた 4 % の非変性アクリルアミドゲル (15 x 15 x 0.1 cm) にアプライした。泳動は冷室 (4 $^{\circ}$ C) において 100 V で 1 時間行った。泳動バッファの組成は 6.72 mM Tris-HCl (pH7.9), 3.3 mM NaOAc (pH7.9), 1 mM EDTA である。泳動後のゲルは FMBIO II Multi-View Fluorescence Image Analyzer (Hitachi) によって解析し、バンドの蛍光強度は FMBIO analysis software で定量した。

12-3. Pol ϵ および p145 の DNA 結合反応とゲル電気泳動

DNA 結合反応液 (5 μ l) は 35 mM Bis Tris-HCl (pH6.3), 2 mM DTT, 10% (v/v) glycerol, 20 mM potassium phosphate, 100 μ g/ml BSA 0.3 μ M 蛍光標識 DNA および、それぞれの実験において記載した量の Pol ϵ あるいは p145 タンパク質を含む。この反応液を氷上で 10 分間反応させた後、loading buffer [35 mM Bis Tris-HCl (pH6.3), 20% (v/v) sucrose, 1 mg/ml bromophenol blue] を 0.5 μ l 添加し、予め 100 V で 2 時間、前泳動しておいた 4 % の非変性アクリルアミドゲル (15 x 15 x 0.1 cm) にアプライした。泳動は冷室 (4 $^{\circ}$ C) において 120 V で 3 時間行った。泳動バッファの組成は 50 mM Tris base、0.38 M glycine、2 mM EDTA である。泳動後のゲルは 12-2 と同様に解析した。

13. ヌクレオチド結合アッセイ

反応液 (20 μ l) は、20 mM HEPES-KOH (pH7.4)、0.5 mM EDTA、0.05% NP-40、10% (v/v) glycerol、60 μ g/ml BSA、50 μ M [α - 32 P]ATP (2.6×10^4 cpm/pmol)、{あるいは、[α - 32 P]ADP または [α - 32 P]ATP γ S} および Dpb3p-Dpb4p 複合体を含む。実験によってはさらに 5 mM MgCl₂ および/あるいは二本鎖 DNA (7F + 71) を加えた。25 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた後、あらかじめ洗液 [20 mM HEPES-KOH (pH7.4)] に浸しておいたニトロセルロースメンブレンフィルターをポンプの吸引部に注意深く置き、吸引しながら反応液 16 μ l をフィルター上に添加した。その後、速やかに洗液を 2 ml 流し、フィルターを洗った。反応液に MgCl₂ が存在する場合は、洗液にも 5 mM MgCl₂ を加えた。メンブレンフィルターは自然乾燥させ、5 ml のアクアゾル II シンチレーションカクテル (Packard) に浸した後、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。ポジティブコントロールとして以前に精製した BsMutS タンパク質を用いた。

14. ATP 加水分解活性の測定

反応液 (20 μ l) は、20 mM HEPES-KOH (pH7.4)、0.5 mM EDTA、0.05% NP-40、10% (v/v) glycerol、60 μ g/ml BSA、0.1 mM [α - 32 P]ATP (1.3×10^4 cpm/pmol)、Dpb3p-Dpb4p 複合体を含む。反応は 25°C で行った。反応開始後、経時的に反応液 2 μ l をサンプリングし、100 mM EDTA、2 μ l に加えて反応を止めた。4 μ l 中の 2 μ l を PEI-Cellulose F TLC plate (MERCK) にスポットし、20 分間展開した。TLC の展開溶媒は 1 M ギ酸、0.4 M LiCl を使用した。展開後、TLC プレートを IP plate に 6 時間接触させ、BAS2000 イメージアナライザー (Fuji) で解析した。ポジティブコントロールとして以前に精製した BsMutS タンパク質を用いた。

15. 出芽酵母 *dpb4* 変異 (K57A または Q64E) 株の作成

dpb4 変異株の作製は基本的に Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 1987) に従い、「2 ステップ法」で行った。まず、YIplac211-*dpb4*(K57A) あるいは YIplac211-*dpb4*(Q64E) プラスミドを *Bgl*III で切断した後、酢酸リチウム法で酵母 YRT1 株に導入して、SC-Ura 寒天培地上にまき 30°C で二日間培養し、表現型が Ura⁺ に形質転換したクローンを選択した。形質転換効率は $10^2 \sim 10^3$ cfu/ μ g であった。次にこの形質転換体を YPD 液体培地で培養した後、5FOA 寒天培地にまき、*URA3* マーカーを失った株を選択した。得られたコロニーより、コロニー PCR 法で *DPB4* 遺伝子領域を増幅してその塩基配列を決定し、K57A あるいは Q64E の変異が導入された *dpb4* 変異株を同定した。*dpb4*K57A 変異株を YTT1、*dpb4*Q64E 変異株を YTT2 と銘々した。

16. 変異型 Pol ϵ の精製

16-1. 出芽酵母の培養および細胞破碎液の調製

YRT1、YTT1 および YTT2 の一夜培養液を、それぞれ O.D.₆₀₀ が 0.05 となるように 1.3 l \times 4 本の YPD 液体培地に接種し、30°C で培養した。O.D.₆₀₀ が 2 になった時点で集菌した。全培養液から 40 g (10 g \times 4 本) の菌体ペレットが得られた。これらを -80°C で保存した。この後の操作は全て 4°C で行った。細胞破碎液の調製は 10 g の菌体を単位として行い、これを合計 4 回連続して行った。10 g の菌体ペレットに Buffer FP を 10 ml 加えて懸濁した後、この懸濁液にガラスビーズ (直径 0.5 mm) (安井器械株式会社) を 40 g 加え、マルチビーズシヨッカー (安井機器) を用いて細胞破碎した (2500 rpm、30 秒 ON + 30 秒 OFF を 7 セット)。ガラスビーズを取り除くため、細胞破碎液を 27000 \times g にて 20 分遠心して上清を回収した。得られた上清に、Buffer FP で平衡化した Sepharose 4B

(Pharmacia)を 5 ml 容量加え、これを回転させながら一時間混ぜた後、CV10 μm JC フィルター (Millipore)で濾過して Sepharose 4B 樹脂を除いた後、さらに 0.45 μm HV フィルター (Millipore) で濾過した。40 g の菌体より、60~70 ml の細胞破碎液を得た。総タンパク質量は 6000~7000 mg であった。

16-2. Anti-Flag M2 affinity gel カラムクロマトグラフィー

精製行程の操作は全て 4°C にて行った。16-1 で調製した細胞破碎液を Buffer F にて平衡化した Anti-Flag M2 affinity gel (Sigma)カラム (1 ml) にアプライした。5 カラム容量の Buffer FP + 0.1 mg/ml BSA でカラムを洗った後、さらに 10 カラム容量の Buffer F でカラムを洗った。次に 250 U の PreScission protease を含む 1 カラム容量の Buffer F をカラムに注入してバッファーを流すのを止めてカラム内で 4 時間 FLAG tag の切断反応を行った。その後、Buffer F を 0.1 ml/min の流速で流して溶出タンパク質を含むピーク画分を回収した (0.5 ml/画分)。このピーク画分を SDS-PAGE により解析したところ Pol ϵ の 4 つのサブユニットがすべて確認された。

16-3. Heparin Sepharose 4B カラムクロマトグラフィー

Heparin カラムは、p1000 チップの先端を切ってナイロン綿を詰めたものに Heparin Sepharose 4B (Pharmacia)を 150 μl (50 % slurry) 加えて作成した。16-2 で得られたピーク画分を Buffer HP + 300 mM NaCl にて平衡化した Heparin カラムにアプライした。14 カラム容量の平衡化バッファーでカラムを洗った後、Buffer HP + 600 mM NaCl で Pol ϵ を溶出した。一画分の容量は約 35 μl (一滴)で流速は約 35 $\mu\text{l}/\text{min}$ である。総タンパク質の回収率は 70~80%であった。

17. DNA ポリメラーゼ活性の測定

poly(dA)₃₀₀oligo(dT)₁₀(5 : 1)を鋳型にして、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ の取り込み活性を測定した。反応液 (20 μl) は 35 mM Bis Tris-HCl (pH6.3)、5 mM MgCl_2 、10% (v/v) glycerol、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA、2 mM DTT、50 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ (~4000 cpm/pmol)、200 ng poly(dA)₃₀₀oligo(dT)₁₀ を含む。この反応液をあらかじめ 30°C に 5 分間置いた後、Pol ϵ を加えて 30°C で 10 分間反応させた。その後、0.1 ml の反応停止液 (50 mM sodium phosphate、25 mM EDTA、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ calf thymus DNA)を加えた。さらに、1 ml の 10% TCA を加え、氷上で 1 時間静置して DNA を酸沈殿させ、これをグラスファイバーフィルター (Whatman) にて濾過し、1 M HCl、100 mM sodium phosphate を含む洗液とエタノールで洗浄した。グラスファイバーフィルター上に回収された酸沈殿物の放射活性を液体シンチレーションカ

ウンター (Beckman) を用いて測定した。1 U の DNA ポリメラーゼ活性は 30℃ において、1 時間に 1 nmol の dTTP を取り込む活性と定義する。

18. タンパク質、DNA の定量および SDS-PAGE

一般的なタンパク質定量は IgG を標準タンパク質として Protein Assay Kit (BioRad) を用いて行った。Pol ϵ の最終精製標品に関しては、SDS-PAGE を行い、Novex Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen) を用いて染色したゲルのバンドを NIH image software で定量した。精製した BSA を標準タンパク質として、同じゲルにアプライして、そのバンドの濃さとの比較により Pol ϵ 中の Pol2p サブユニットの濃度を決定した。Pol ϵ は Pol2p、Dpb2p、Dpb3p、Dpb4p の 4 つのサブユニットが 1:1:1:1 の割合で含まれる (Chilkova et al. 2003) 複合体であるから、得られた Pol2p の濃度から Pol ϵ 複合体の濃度を計算して求めた。DNA 濃度は A_{260} を分光光度計を用いて測定して求めた。SDS-PAGE には NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen) および MOPS-SDS 泳動バッファーを用いた。

III. 結 果

1. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能

Dpb3p および Dpb4p の解析に先立ち、その土台となった Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の詳細について解析を行った。

1-1. Pol ϵ の二本鎖 DNA 能には Pol2p の C-末端ドメインおよび/あるいはアセサリーサブユニット (Dpb2p、Dpb3p、Dpb4p) が関与する

Pol ϵ の DNA 結合活性は蛍光標識した一本鎖 DNA または二本鎖 DNA オリゴマーをプローブとして、ゲルシフト法により解析した(図 5A)。DNA 結合反応に加える Pol ϵ の量を増加させるに従って、一本鎖オリゴマー-DNA (7F) および二本鎖 DNA オリゴマー (7F + 71) のシフトバンド量が増加した。0.52 pmol の Pol ϵ を反応に加えた場合、0.24 pmol の一本鎖 DNA オリゴマー、あるいは 0.33 pmol の二本鎖 DNA オリゴマーのシフトが見られた。このことは Pol ϵ は一本鎖 DNA のみならず、二本鎖 DNA にも安定に結合することを示唆する。一方、触媒サブユニット Pol2p の N-末端ドメインである p145 ポリペプチドを用いて同様のアッセイを行ったところ、一本鎖 DNA のバンドシフトが認められたのに対し、二本鎖 DNA のバンドシフトは全く認められなかった。図 5B に示すように、免疫前血清を反応に加えた場合、シフトバンドの移動度は影響を受けないが、抗 Pol ϵ 血清を加えた場合、シフトバンドはゲルのウエルの位置に止まった。このことは、二本鎖 DNA オリゴマーのバンドシフトが確かに Pol ϵ の結合によるものであることを示している。一定量の Pol ϵ 存在化で DNA オリゴマーの titration を行い、Pol ϵ と DNA オリゴマーとの親和性 (K_D)を測定したところ、Pol ϵ は一本鎖 DNA に対しても二本鎖 DNA に対しても同等の親和性を示した ($K_D =$ 約 10 nM)。p145 と一本鎖 DNA の親和性も約 10 nMであった (data not shown)。

さらに、二本鎖 DNA オリゴマーに対する Pol ϵ の結合がオリゴマー末端の開裂などにより生じた短い一本鎖 DNA 領域に対する結合ではないことを確認するために、Pol ϵ と 7F + 71 の結合反応に ϕ X174 二本鎖 DNA を competitor DNA として加える実験を行った (図 5C)。 ϕ X174 二本鎖 DNA は *StuI* で一カ所切断したものをを用いた。この時生じる DNA 末端は blunt end である。7F + 71 と等量 (57 ng) の ϕ X174 二本鎖 DNA を加えたところ、シフトバンドは 20%にまで低下した。この場合 competitor DNA の DNA 末端濃度は 7F + 71 の 1/100 であるので Pol ϵ はオリゴマー-DNA の末端の一本鎖 DNA に結合しているのではないことが示された。一方、p145 の一本鎖 DNA 結合に対しては、10 倍量の ϕ X174

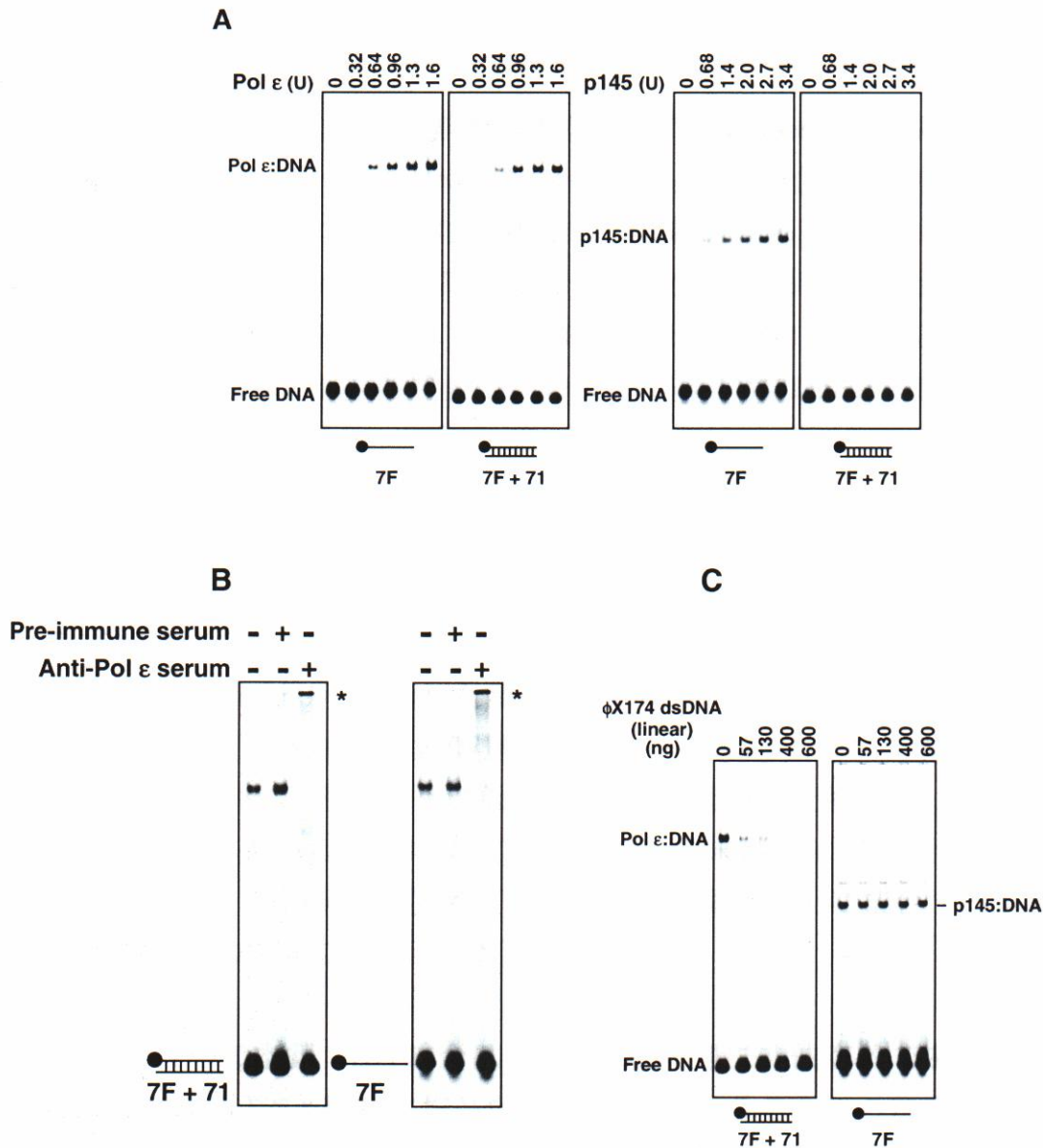


図5. Pol ε とp145のDNA結合能の比較

- A ; Pol ε またはp145の一本鎖DNA(7F)または二本鎖DNA(7F+71)に対する結合能を"材料と方法"に記載したゲルシフトアッセイによって比較した。図示してあるように酵素量を増加させて反応を行った。Pol ε およびp145のそれぞれ、1.6 Uおよび2.7Uが0.52 pmol に相当する。
- B ; Pol ε 抗体を用いたsuper-shiftアッセイを行った。7F+71または7Fと1.1 UのPol ε の反応液に、1 μlの免疫前血清(Pre-immune serum)またはPol ε 抗体を加えて反応を行った。星印はsuper-shiftバンドを示す。
- C ; Pol ε の二本鎖DNA結合およびp145の一本鎖DNA結合に対する競合試験を行った。φX174二本鎖DNA(blunt end)を図示してある量加えた。1.1および2.1UのPol ε およびp145を使用した。7Fまたは7F+71はそれぞれ、28または56 ng加えた。

二本鎖 DNA を加えても全く影響が出なかった。competitor DNA として poly(dT) を用いると、p145 の一本鎖 DNA プローブに対する結合は競合的に阻害された。以上の結果から、p145 は一本鎖 DNA にのみ結合するのに対し、Pol ϵ は一本鎖 DNA だけでなく二本鎖 DNA にも結合することが明らかになった。したがって、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合には、p145 には存在せず、Pol ϵ 複合体に存在する領域、すなわち、Pol2p の C-末端ドメインおよび/あるいは Dpb2p、Dpb3p、Dpb4p サブユニットが関与する。

1-2. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合は DNA 末端に非依存的である

図 5C で示した結果より、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能は二本鎖 DNA 末端への結合ではないことが強く示唆された。これをさらに確かめるために、topoisomerase I により relax した環状の ϕ X174 二本鎖 DNA を用いた競合試験を行った(図 6A)。7F+71 とほぼ等量 (64 ng) の環状 ϕ X174 二本鎖 DNA を加えた場合、シフトバンドは 52%に低下し、10 倍量加えた場合には 8.4%に低下した。これらの結果から、Pol ϵ は二本鎖 DNA の末端ではなく鎖の部分に結合することが明らかになった。加えて、Pol ϵ が二本鎖 DNA に結合する際には DNA 末端は必要ではないことが示された。

1-3. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合は DNA 塩基配列に非依存的である

Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合は塩基配列特異的なものであるのかを調べるために、60 個のチミンヌクレオチドが連なったオリゴマー DNA である T₆₀F とその相補鎖 A₆₀ をアニーリングした二本鎖 DNA をプローブとして使用した。図 6B に示すように、Pol ϵ は T₆₀F + A₆₀F に対して 7F + 71 と同様の結合を示したため、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合は塩基配列に非依存的であることが明らかになった。さらに、この結合は Mg⁺⁺イオンおよび ATP 存在下でも影響を受けないことが示された(data not shown)。また、150 mM NaCl 存在化においてもシフトバンドの量、質ともに変化が見られなかった。

1-4. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合は一本鎖 DNA によって競合的に阻害される

Pol ϵ と二本鎖 DNA オリゴマーとの結合反応に competitor DNA として非標識一本鎖 DNA を加えたところ、シフトバンドの量が減少した(図 6C)。一本鎖 DNA による競合阻害の程度は、コントロール実験として行い、二本鎖 DNA による阻害と同程度であった。このことは Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合部位には一本鎖 DNA が同程度の親和性で結合することを示唆する。

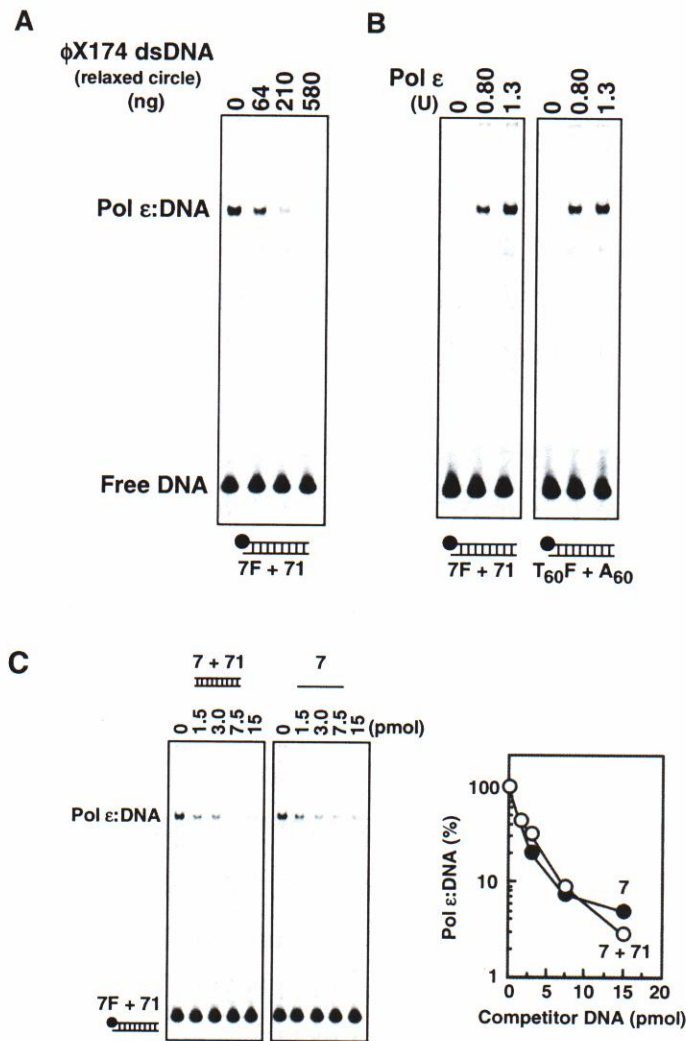


図6. Pol ε の二本鎖DNA結合能の性質

- A ; 環状のφX174二本鎖DNAを用いてPol ε の二本鎖DNA結合に対する競合試験を行った。1.3 UのPol ε を56 ngの7F+71および図示した量のφX174二本鎖DNAを加えて反応させた。
- B ; 7F+71またはT₆₀F+A₆₀とPol ε との結合反応を行った。
- C ; 7+71または7を用いてPol ε の二本鎖DNA結合に対する競合試験を行った。1.4 UのPol ε を1.5 pmolの7F + 71および図示した量の競合DNAを加えて反応を行った。
右にシフトバンドの定量結果を示した。

2. Dpb3p-Dpb4p 複合体の精製

Pol εの二本鎖 DNA 結合がどのサブユニットによって担われているのかを知ることが、その生理学的役割を解明する上で非常に重要である。Pol εの二本鎖 DNA 結合に関わると考えられるアクセサリサブユニットの中で、Dpb3p および Dpb4p はヒストンフォールドモチーフと呼ばれる構造モチーフを持つことが報告されている。このモチーフは元々ヒストンタンパク質中に見いだされたモチーフで、ヒストン二量体の形成に必要であり、また、形成された二量体はヌクレオソーム構築の際の DNA 結合に関わることが知られている。そこで Pol εの二本鎖 DNA 結合に Dpb3p および Dpb4p サブユニットが関わる可能性が考えられた。

まず、はじめにヒストンフォールドタンパク質である Dpb3p および Dpb4p がヒストンの場合と同様に複合体を形成するかどうかについて検討した。

2-1. 大腸菌細胞内における Dpb3p および Dpb4p の共発現

DPB3 遺伝子または GST-DPB4 遺伝子を含むプラスミド、pTT1 (Kan^r) および pTT2 (Amp^r) を同時に大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL に導入した形質転換体 (図 7) を液体培養し、O.D.₆₀₀ が 0.6 となったところで IPTG を添加して、Dpb3p および GST-Dpb4p の発現誘導を開始した。経時的に培養液をサンプリングしてタンパク質発現の様子を SDS-PAGE で解析した結果を図 8A に示した。誘導開始後、Dpb3p と GST-Dpb4p の分子量に対応する位置のバンドが増加しその量は 2 時間後にほぼ一定量に達した。そのため誘導開始後 2 時間で細胞を回収して、超音波処理によって細胞を破碎した後、破碎液を遠心して上清 (可溶性画分) とペレット (不溶性画分) に分画した (図 8B)。大部分の Dpb3p と GST-Dpb4p は可溶性画分に回収された。

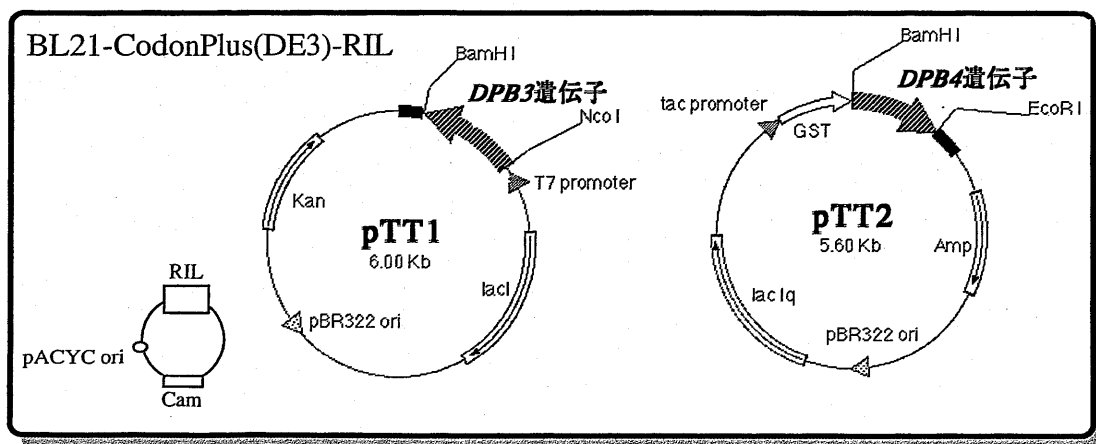


図 7. Dpb3p および GST-Dpb4p タンパク質の共発現系

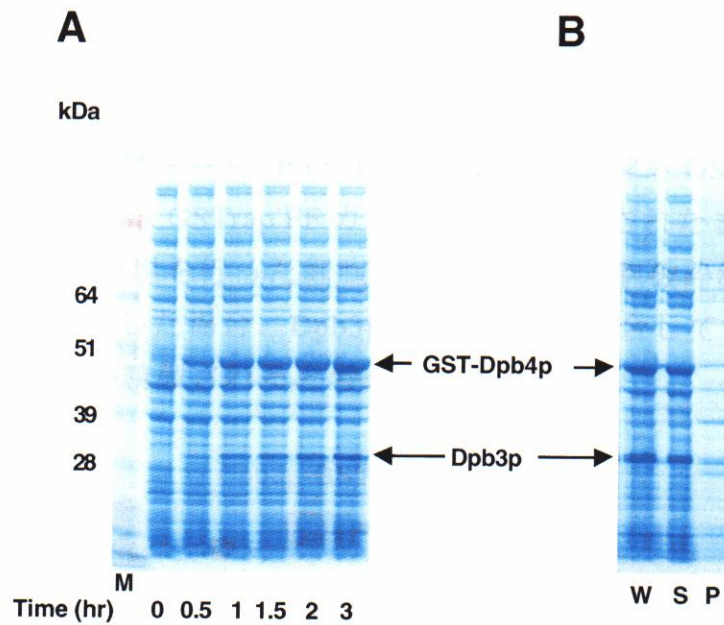


図8. Dpb3pおよびDpb4pの共発現

- A ; IPTGによるDpb3pおよびGST-Dpb4pの共発現誘導を始めた時間を0として、発現が誘導される様子を3時間までSDS-PAGE解析した。
- B ; 発現誘導後、2時間で回収した細胞の破碎液を遠心して可溶性画分(S)と不溶性画分(P)に分画し、SDS-PAGE解析した。Wは全細胞抽出液を示す。

2-2. Dpb3p および Dpb4p は複合体を形成する

GST はグルタチオンと特異的に結合するため、GST-Dpb4p タンパク質は GSTrap FF カラム (Sepharose 担体にグルタチオンを結合させたカラム) (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてアフィニティー精製をすることができる(図 9)。また、GST tag と Dpb4p の境界領域には 8 アミノ酸からなる PreScission protease 認識配列が挿入されているため、PreScission protease によって GST tag と Dpb4p を切断することができる。したがって、この protease をカラムの中で GST-Dpb4p に作用させるとカラムに吸着していた Dpb4p を GST tag と切り離して溶出することができる。PreScission protease 自身も GST との融合タンパク質であるため、これは GSTrap FF カラムにトラップされたままとなる。Dpb3p と GST-Dpb4p の共発現を行った細胞より調製した細胞破碎液上清を、GSTrap FF カラムにアプライした場合、Dpb3p と Dpb4p が結合しているのであれば、Dpb4 と共に Dpb3p が精製されることが考えられる。

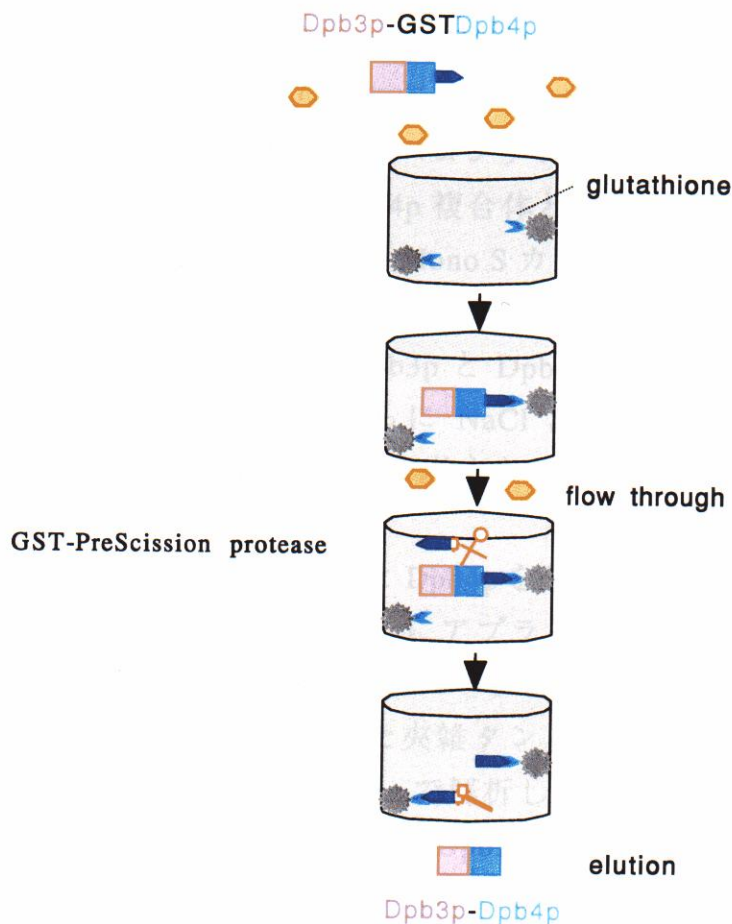


図 9. GSTrap FF カラムを用いた精製

まず最初に、GSTrap カラムを用いて GST-Dpb4p と Dpb3p との相互作用を調べた。共発現細胞の細胞破碎液の可溶性画分を GSTrap カラムにアプライした後、グルタチオンによって GST-Dpb4p を溶出したところ、溶出画分には Dpb3p が含まれていた (図 10A)。したがって、Dpb3p と Dpb4p は相互作用することが示唆された。そこで次に、カラムに吸着した GST-Dpb4p タンパク質にカラム内で PreScission protease を作用させ、GST tag と Dpb4p を切り離し、Dpb4p を溶出したところ、同時に Dpb3p タンパク質も溶出された (図 10B)。溶出された両タンパク質の分子比はやや Dpb4p の割合が多いものの、ほぼ 1:1 であった。抗 Pol ε 血清を用いたウェスタンブロッティングによってこれらのタンパク質が Dpb3p および Dpb4p であることを確認した (data not shown)。Dpb4p を溶出した後、カラムをグルタチオンで洗浄したところ、カラムに吸着していた GST tag、および GST-PreScission protease が溶出された。GST-Dpb4p はほとんど検出されなかったため、カラム内での protease 反応は効率よく行われていると判断した。

引き続きこの複合体を MonoS 陽イオン交換カラムおよび Mono Q 陰イオン交換カラムを用いて精製した。GSTrap カラムから溶出された Dpb3p-Dpb4p 複合体の標品には大腸菌由来のシャペロンタンパク質である DnaK が少量含まれていた。分子比 1:1 の Dpb3p-Dpb4p 複合体と DnaK とを分離するため、この標品に ATP-Mg⁺⁺を加えた後、これを Mono S カラムにアプライした (図 11)。DnaK タンパク質はすべてカラム素通り画分に溶出された。また、バッファの NaCl 濃度を 70 mM 上げたところ、Dpb3p と Dpb4p を 1:1 の分子比で含む画分が比較的広範に渡り溶出された。さらに NaCl 濃度を徐々に上昇させたところ、Dpb3p と複合体を形成していないと考えられる Dpb4p は 200 mM NaCl 付近で溶出された。

MonoS 溶出画分のうち、Dpb3p と Dpb4p を分子比 1:1 で含む画分 (fr.22 -33) を集めて、MonoQ 陰イオンカラムにアプライした (図 12)。Dpb3p-Dpb4p 複合体は約 350 mM の NaCl 濃度で単一ピークとして溶出された。また、このステップにおいて、少量含まれていた夾雑タンパク質を除くことができた。CBB 染色したゲルを NIH image software で解析した結果、Dpb3p と Dpb4p の分子比は 1.0 : 1.0 であった。したがって、Dpb3p および Dpb4p は等分子比で複合体を形成することが示唆された。このことは後述 (5-1) のゲル濾過クロマトグラフィーによる解析によってさらに確認された。11 の大腸菌培養液から 1.3 mg の Dpb3p-Dpb4p 複合体を得た (表 2)。

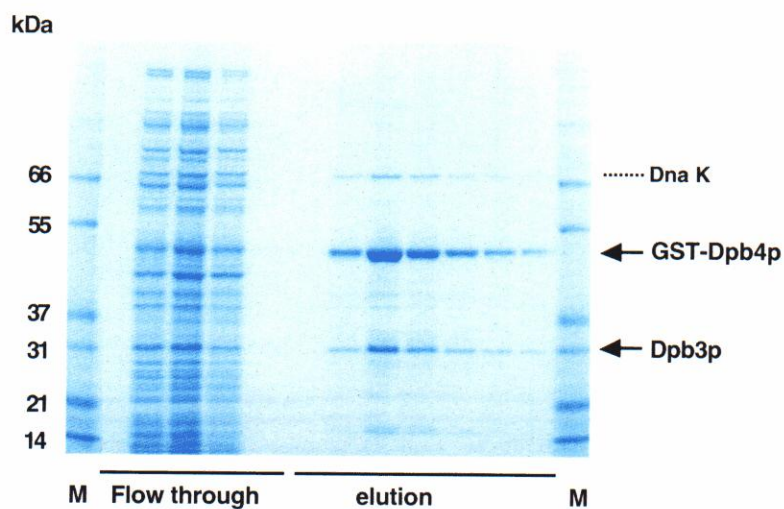
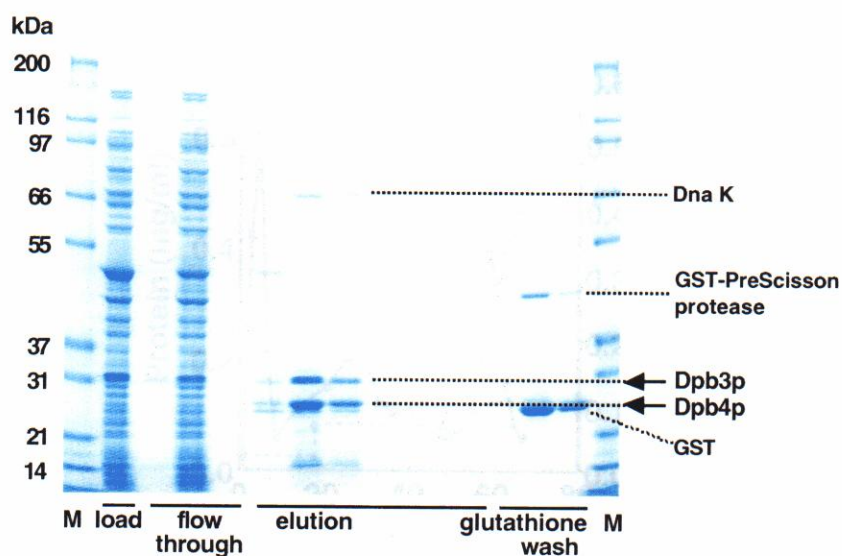
A**B**

図10. Dpb3pおよびDpb4pのGSTrap FFカラム精製

- A ; 細胞破碎液の可溶性画分をGSTrapカラムにかけてGST-Dpb4pをカラム内に吸着させた後、還元型グルタチオンによってGST-Dpb4pを溶出し、SDS-PAGE解析した。
- B ; PreScission proteaseによってGSTタグとDpb4pを切り離して溶出し、SDS-PAGE解析した。Dpb4pを溶出後のカラムは還元型グルタチオンで洗った。

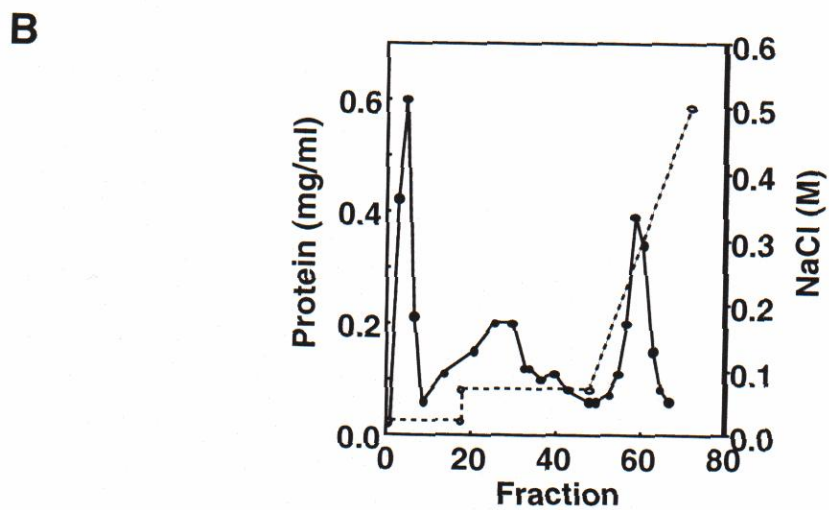
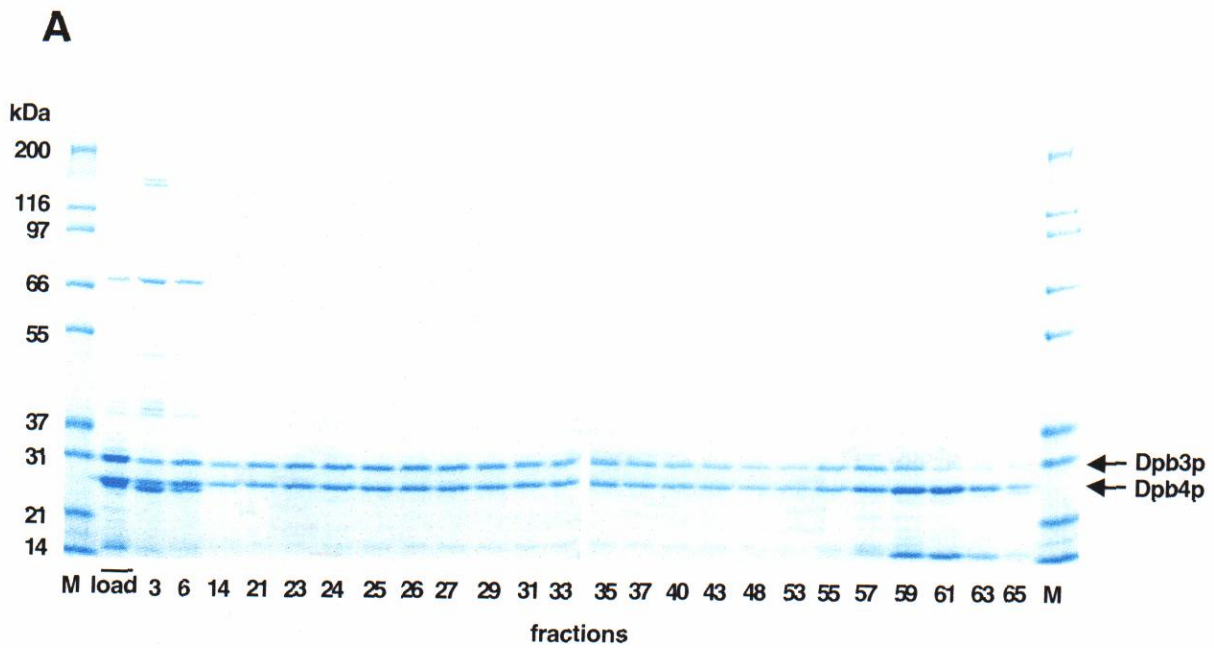
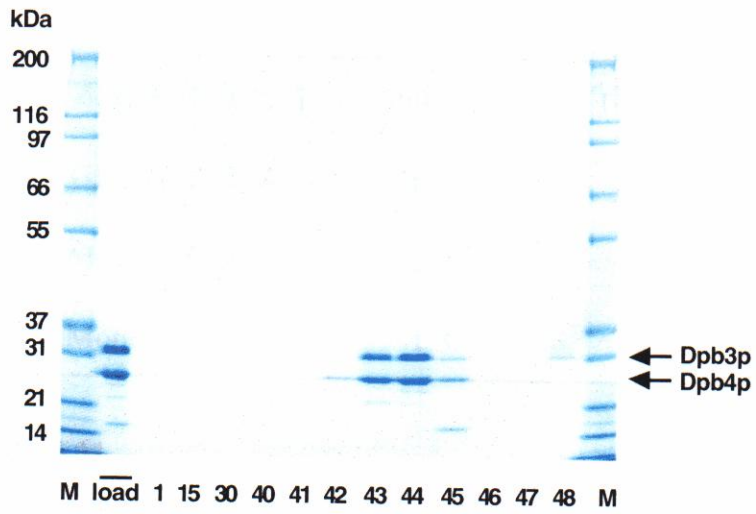


図11. Dpb3p-Dpb4p複合体のMono Sカラム精製

A ; PreScission protease で切断して得られたDpb3p-Dpb4p複合体の GSTrapカラム溶出画分をMonoS陽イオン交換カラムにかけ、 SDS-PAGE解析した。

B ; タンパク質溶出プロファイルを示す。

A



B

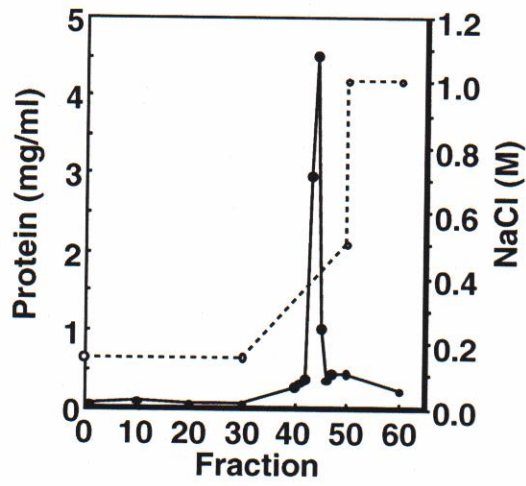


図12. Dpb3p-Dpb4p複合体のMono Qカラム精製

A; MonoS溶出画分を、MonoQ陰イオン交換カラムにかけてSDS-PAGE解析した。

B; タンパク質プロファイリングを示す。

表 2. Dpb3p-Dpb4p 複合体の精製

Fraction		総タンパク質量 (mg)	回収率 (%)
Fr. I	細胞破碎液上清	560	100
Fr. II	GSTrap カラム	20	3.5
Fr. III	MonoS カラム	2.2	0.40
Fr. IV	MonoQ カラム	1.3	0.24

3. Dpb4p の発現と精製

多くの場合、ヒストンフォールドタンパク質はそれ自身でホモ二量体を形成しないが、まれにはホモ二量体を形成する例が報告されている。ヒストンフォールドタンパク質としての構造上の興味から、大腸菌内で Dpb4p のみを発現させて、その精製を試みた。

Dpb4p の単独発現および精製は基本的に Dpb3p-Dpb4p の発現と精製の場合と同様に行った。まず、BL21-CodonPlus(DE3)-RIL に pTT2 を導入した形質転換体を培養後、IPTG による発現誘導をかけて経時的に集菌し、細胞破碎を行い可溶性画分と不溶性画分に分けた(図 13)。その結果、GST-Dpb4p タンパク質の分子量に相当するバンドの位置にタンパク質の発現誘導が観察された。発現誘導開始後 4 時間までこのタンパク質の発現は徐々に増加し、また、そのほとんどが可溶性画分に回収された。誘導開始後 2 時間の可溶性画分を GSTrap カラムにアプライし、グルタチオンによる溶出を行ったところ、GST-Dpb4p タンパク質が溶出された(図 14A)。PreScission protease で GST タグを切り離して溶出したところ、Dpb4p タンパク質が溶出された(図 14B)。PreScission protease 処理後の溶出画分を MonoQ カラムにかけたところ、約 250 mM NaCl の時点で Dpb4p が単一ピークとして溶出された(図 15)。このピーク画分を回収して透析後に MonoS カラムにアプライしたところ、Dpb4p は約 150 mM NaCl の時点で溶出した(図 16)。CBB 染色したゲルより、タンパク質純度は 99%以上であると判断した。11 の大腸菌培養液から 9.6 mg の Dpb4p タンパク質を得た (表 3)。通常、ヒストンフォールドタンパク質は二量体を形成しない限りヒストンフォールドモチーフ領域の疎水的性質のために凝集体を形成して、均一なタンパク質標品として精製ができないことが知られている。Dpb4p タンパク質の精製が可能であったことは、このタンパク質がそれ自身で二量体を形成していることを示唆するものである。

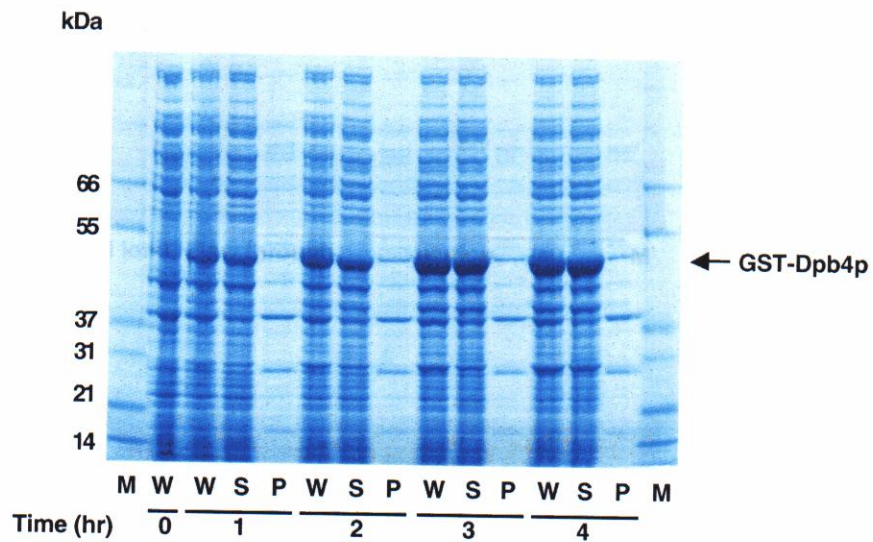
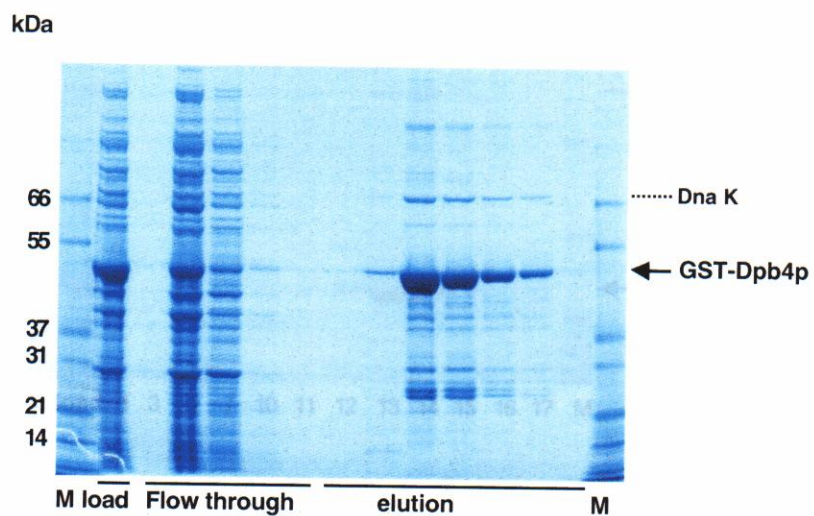


図13. GST-Dpb4pの単独発現および可溶化試験

IPTGによるGST-Dpb4pの単独発現誘導を始めた時間を0として、発現および可溶化試験の様子を4時間までSDS-PAGE解析した。Wは全細胞抽出液、Sは可溶性画分、Pは不溶性画分を示す。

A



B

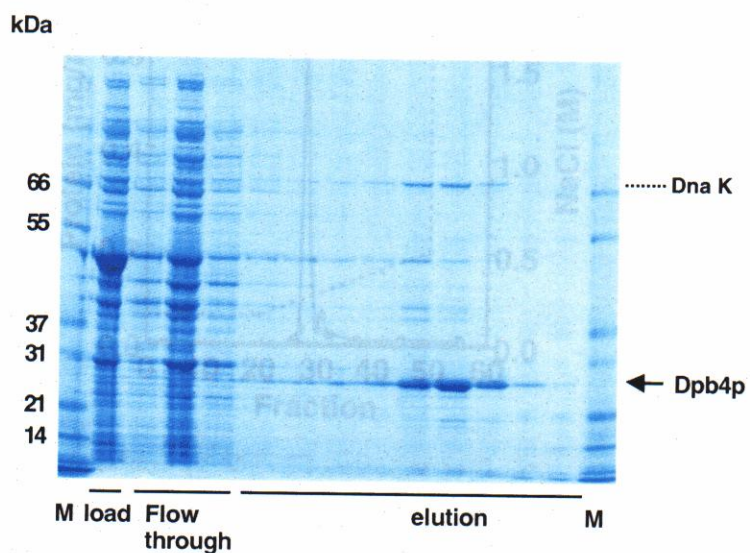
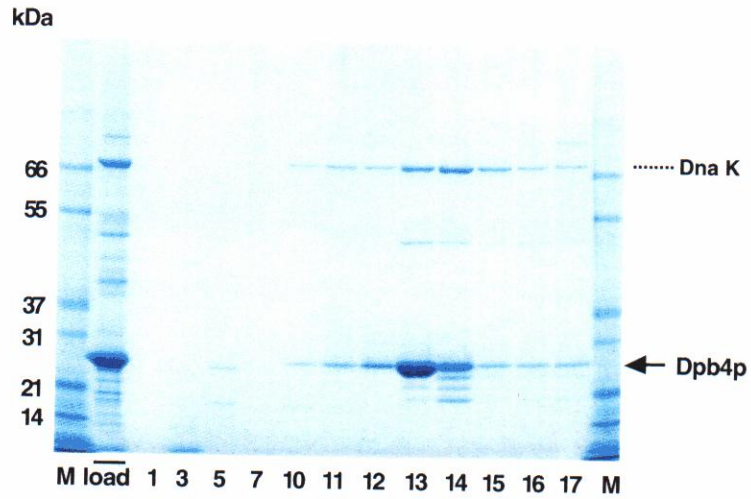


図14. Dpb4pのGSTrap FFカラム精製

- A ; 細胞破碎液の可溶性画分をGSTrapカラムにかけた後、還元型グルタチオンによってGST-Dpb4pを溶出してSDS-PAGE解析した。
- B ; PreScission proteaseによってGSTタグとDpb4pを切り離して溶出してSDS-PAGE解析した。

A



B

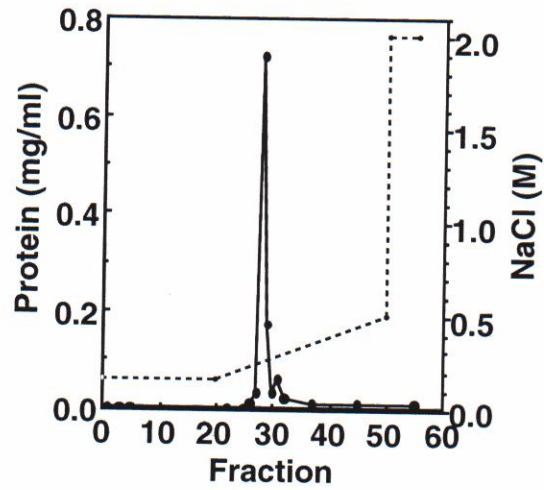


図15. Dpb4pのMono Qカラム精製

A ; PreScission protease 処理後のGSTrapカラム溶出画分を MonoQカラムにかけてSDS-PAGE解析した。
B ; タンパク質プロファイルを示す。

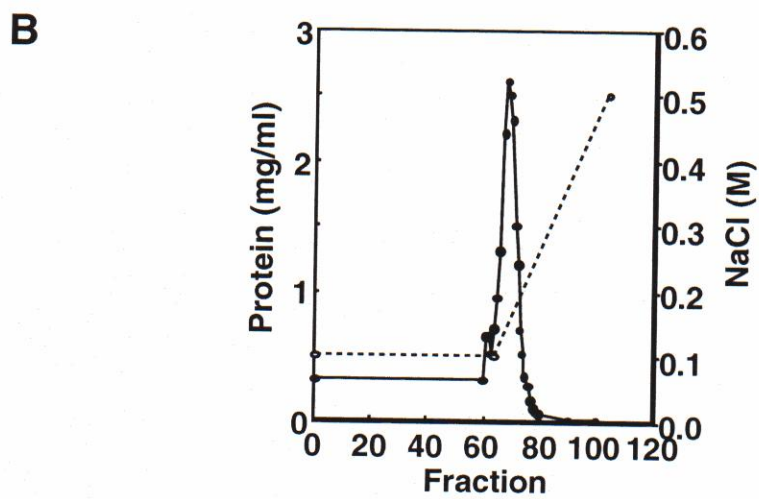
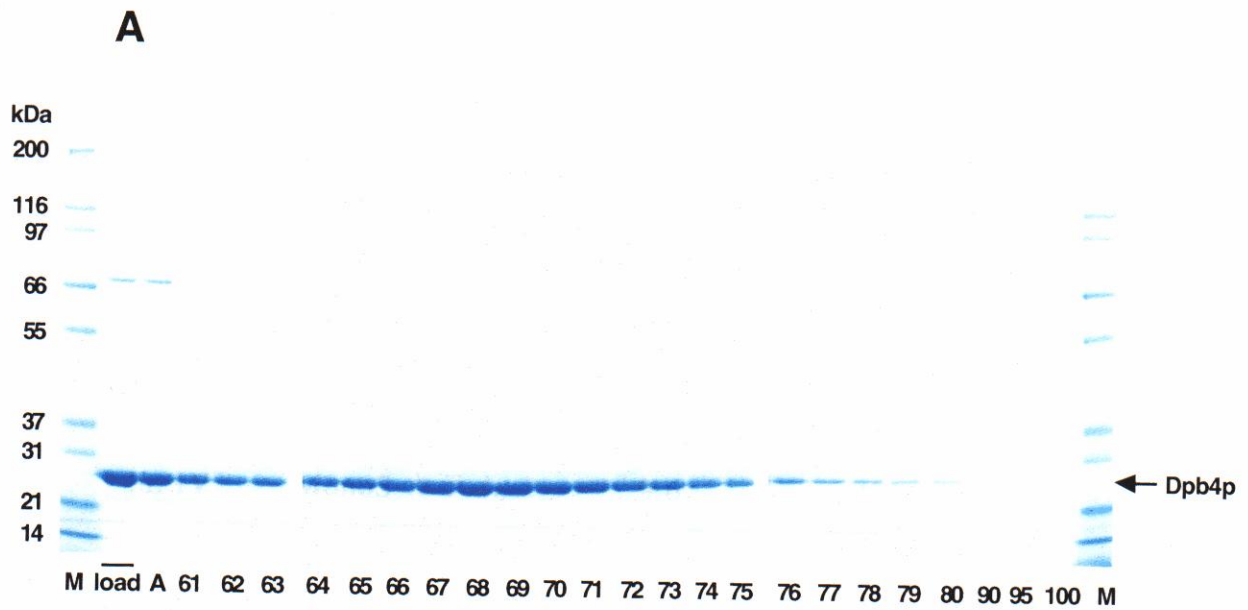


図16. Mono Sカラムを用いたDpb4pの精製

A ; Mono Qカラムの溶出画分をMono SカラムにかけてSDS-PAGE解析した。A ; fr.1-60を集めた画分。
 B ; タンパク質プロファイリングを示す。

表 3. Dpb4p の精製

Fraction		総タンパク質量 (mg)	回収率 (%)
Fr. I	細胞破碎液上清	780	100
Fr. II	GSTrap カラム	83	11
Fr. III	MonoQ カラム	43	5.5
Fr. IV	MonoS カラム	9.6	1.2

4. Dpb3p の発現と精製

Dpb3p についても同様の興味から、その単独発現と精製を試みた。前述のとおり細胞破碎液を調製し、その可溶性画分と不溶性画分を SDS-PAGE で解析したところ、Dpb3p の分子量に相当するバンドの位置にタンパク質の発現誘導が見られ、そのほとんどが可溶性画分に回収された。しかし、その後のカラムクロマトグラフィーにおいて、Dpb3p の精製度の上昇は認められず、また、Dpb3p の分解産物と思われるペプチド断片が多量に検出された。Dpb3p の部分精製標品をゲルろ過により解析したところ、ボイド容量付近に他の混在タンパク質と共に溶出され、Dpb3p が他のタンパク質と大きな凝集体を形成していることが判明したため、Dpb3p の精製は中止した (data not shown)。Dpb3p はホモ二量体を形成することができないと推測される。

5. Dpb3p-Dpb4p 複合体および Dpb4p の分子量の算出

Dpb3p-Dpb4p 複合体および Dpb4p をゲルろ過クロマトグラフィーおよびシヨ糖密度勾配遠心法により解析し、求めた流体力学的パラメーターにより分子量の算出を行った。

5-1. Dpb3p-Dpb4p 複合体

精製した“Dpb3p-Dpb4p 複合体”を Superdex 200 カラムにてゲルろ過を行った(図 17A)。Dpb3p と Dpb4p は挙動を同じくして、単一ピークとして溶出された。CBB 染色したバンドの定量より、これらのタンパク質の分子比が 1.0:1.0 であることを再度確認した。タンパク質の回収率は 70%であった。以上の結果より、Dpb3p と Dpb4p はそれぞれのタンパク質が 1:1 の割合で含まれる安定な複合体を形成することが明らかになった。

マーカートンパク質との比較から、ストークスの半径を求めると 47.1 Å であった (図 17C)。Dpb3p-Dpb4p 複合体が球状タンパク質と仮定した場合、このストークス半径から予測される分子量は約 200 kDa である。アミノ酸配列から予測される Dpb3p および Dpb4p の分子量はそれぞれ 23 kDa と 22 kDa であるので、それぞれ 1 分子ずつの分子量の和 (45kDa) と比べると値に大きな開きがある。

一方、Dpb3p-Dpb4p 複合体を 10-40% のショ糖密度勾配中を沈降させた場合、ゲル濾過と同様に Dpb3p と Dpb4p は同じ挙動で沈降した。タンパク質の回収率はほぼ 100% であった。マーカートンパク質との比較から、沈降係数は 3.4 S であることがわかった (図 18A, C, D)。沈降係数から予測される球状タンパク質の分子量は 40 kDa であった。

求めた 2 つの流体力学的パラメーターより Dpb3p-Dpb4p 複合体の分子量を D. J. Winzor の式 (Winzor et al. 1968) を用いて算出することができる。その式を次に示した。

$$MW = \frac{6\pi\eta aNS}{1 - \bar{v}\rho}$$

π :	円周率(3.14)
η :	粘性(1 ; 水)
a :	ストークス半径
N :	アボガドロ数(6.0×10^{23})
S :	沈降係数(水、20°C)
\bar{v} :	0.73
ρ :	密度(0.9982 ; 水)

D. J. Winzor の式

ストークスの半径および沈降係数をこの式に代入して Dpb3p-Dpb4p 複合体の分子量を算出したところ、67000 という値が得られた。Dpb3p-Dpb4p 複合体に含まれる両タンパク質の分子比は 1:1 であることから、Dpb3p-Dpb4p 複合体はヘテロ二量体であることが示唆された。Dpb3p-Dpb4p 複合体のストークス半径と、算出された分子量に大きな隔たりがあることから、この複合体は球状とは異なる構造を取ることが推定される。酵素の摩擦係数 f と完全な球体の摩擦係数 f_0 の比 f/f_0 が 1 から離れるほど酵素の形状は非球状であると評価される。Dpb3p-Dpb4p 複合体の摩擦比 f/f_0 は 1.75 であり、このことから、複合体の構造は非球状であることが明らかになった。

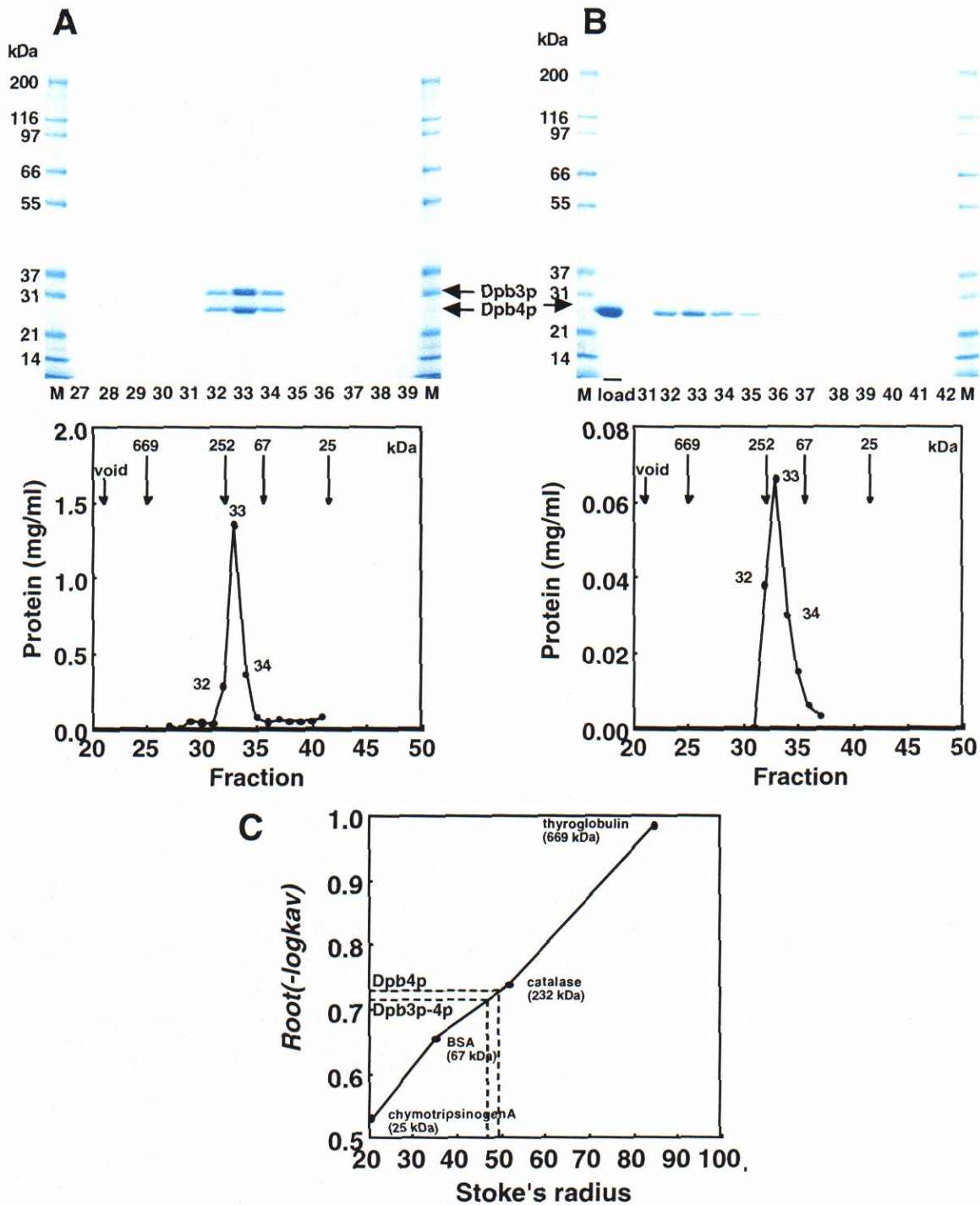


図17. Dpb3p-Dpb4p複合体およびDpb4pのゲル濾過解析

- A; ゲル濾過したDpb3p-Dpb4p複合体のSDS-PAGE解析およびタンパク質プロファイリングを示す。
- B; ゲル濾過したDpb4p複合体のSDS-PAGE解析およびタンパク質プロファイリングを示す。
- C; Dpb3p-Dpb4p複合体およびDpb4pのゲル濾過解析結果からストークスの半径を求めた。Root(-log kav)はゲル濾過の溶出パターンから得られるパラメータ。

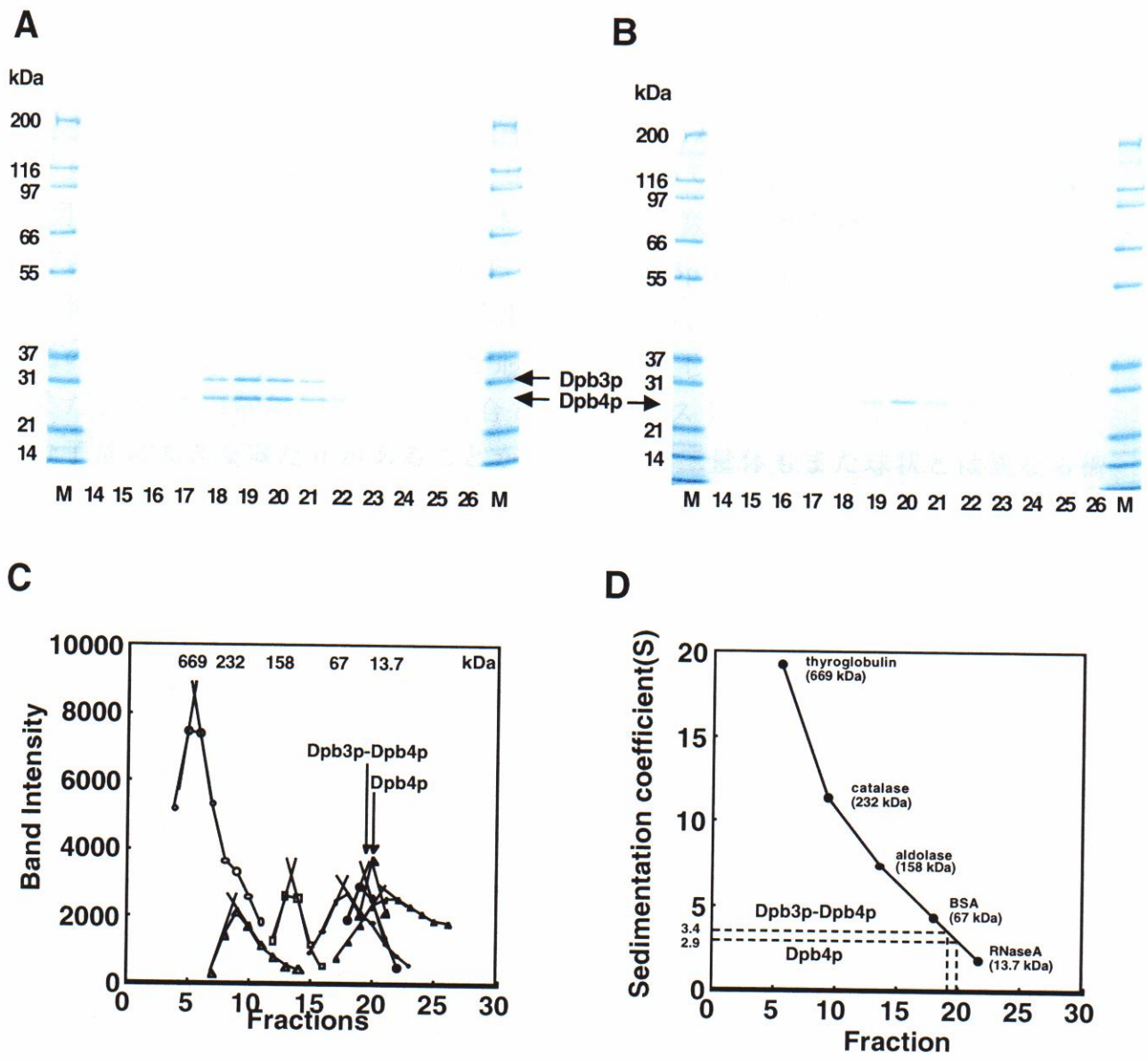


図18. Dpb3p-Dpb4p複合体およびDpb4pのシヨ糖密度勾配遠心分離解析

A ; Dpb3p-Dpb4p複合体をシヨ糖密度勾配遠心分離してSDS-PAGE解析した。

B ; Dpb4pをシヨ糖密度勾配遠心分離してSDS-PAGE解析した。

C ; CBB染色したゲルのバンド強度をNIH image解析した。

D ; Dpb3p-Dpb4p複合体およびDpb4pのシヨ糖密度勾配遠心分離解析結果から沈降係数を求めた。

5-2. Dpb4p

精製した Dpb4p タンパク質についても同様に Superdex 200 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーおよび 10-40% ショ糖密度勾配遠心分離法にて解析した。その結果、Dpb4p はいずれの場合も高い回収率で単一ピークとして回収された(図 17B、18B、C)。ストークス半径および沈降定数はそれぞれ 49.6 Å および 2.9S であった(図 17C、図 18D)。これらの値は Dpb3p-Dpb4p 複合体の値と非常によく似ている。Dpb4p の分子量を算出したところ、60000 という値が得られた。この結果は Dpb4p がホモ二量体を形成して存在していることを示唆している。また、Dpb3p-Dpb4p 複合体の場合と同様に、ストークス半径と、算出された分子量に大きな隔たりがあることから、Dpb4p 二量体もまた球状とは異なる構造を取ることが推定される。また、Dpb4p の摩擦比 f/f_0 は 1.69 であることから、Dpb4p 二量体の構造もまた非球状であることが明らかになった。

6. Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合活性

6-1. Dpb3p-Dpb4p 複合体は二本鎖 DNA に結合する

精製した Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合能をゲルシフトアッセイによって解析した。まずはじめに、5-1 で行った Superdex 200 ゲル濾過クロマトグラフィーの Dpb3p-Dpb4p 複合体のピーク画分用いて、蛍光標識した二本鎖 DNA オリゴマー (7F + 71) に対する結合を調べた。その結果、溶出された Dpb3p-Dpb4p 複合体の濃度の増減に一致してシフトバンドの増減が見られた(図 19A)。さらに、反応液に Pol ϵ に対する抗血清を加えたところ、バンドシフトの阻害が見られた(図 19B)。免疫前血清はバンドシフトを阻害しない。このことは、二本鎖 DNA をシフトさせているのは確かに Dpb3p-Dpb4p 複合体であることを示している。以上のことから、Dpb3p-Dpb4p 複合体が二本鎖 DNA 結合能を有することが示唆された。

6-2. Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合能の構造特異性

6-1 で得られた知見をさらに確認するため、Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合活性の構造特異性を解析した。二本鎖 DNA オリゴマー (7F + 71) に対して Dpb3p-Dpb4p 複合体を加えてゆくと、加えた複合体の量に対応してバンドシフトが観察された(図 20)。さらに、competitor DNA として ϕ X174 RFI DNA を制限酵素 *StuI* で一カ所切断したものを、二本鎖 DNA オリゴマー (7F + 71) とほぼ当量 (60 ng) 反応系に加えたところ、シフトバンドの量は competitor DNA を加えない場合の 32% に低下した(図 21)。

一方、一本鎖 DNA オリゴマー (7F) を DNA 結合の基質として用いた場合、

Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA への結合はほとんど検出されなかった。Dpb3p-Dpb4p 複合体を 27 pmol 加えた時に、かろうじて検出できる程度のシフトバンドが見られた。一本鎖 DNA 基質としてチミンヌクレオチドの 60-mer である T₆₀F を用いた場合も Dpb3p-Dpb4p 複合体によるバンドシフトは観察されなかった。しかしながら、二本鎖 DNA 基質 (7F + 71) に対する Dpb3p-Dpb4p 複合体の結合反応に、一本鎖 DNA である非標識オリゴマー 7 あるいは poly(dT) を加えたところ、大過剰の一本鎖 DNA 存在化においてバンドシフトの阻害が認められた。7F + 71 に対して 10 倍量 (モル比) のオリゴマー 7 を加えた時、シフトバンドは 49% に減少した。37 倍量 (ng 数) の poly(dT) を加えた時、シフトバンドは 47% に減少した (図 21)。

以上のことから、Dpb3p-Dpb4p 複合体は二本鎖 DNA にほぼ特異的に結合すること、また、非常に弱いながら、一本鎖 DNA とも相互作用することが明らかになった。

6-3. Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合は特定の塩基配列に依存しない

T₆₀F と A₆₀ をアニーリングさせた二本鎖 DNA オリゴマー (T₆₀F + A₆₀) を用いた場合、7F + 71 を用いた場合と同様の DNA 結合が観察された (図 20)。従って Dpb3p-Dpb4p の二本鎖 DNA 結合能は特定の塩基配列には依存しない結合であることが明らかになった。

6-4. Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能は DNA 末端に対する結合ではない

6-2 で示した ϕ X174 DNA (*Stu*I で一カ所切断したもの) を用いた競合実験において、二本鎖 DNA オリゴマー (7F + 71) とほぼ当量 (60 ng) の ϕ X174 DNA を反応に加えたところ、シフトバンドの量は competitor DNA を加えない場合の 32% に低下したことは既に述べた (図 21)。この実験で、60 ng の ϕ X174 DNA に含まれる DNA 末端量は 0.03 pmol であり、これは反応液中の 7 + 71 (56 ng、1.5 pmol) の DNA 末端量の 100 分の 1 である。このことから、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合は DNA 末端に対する結合ではなく、DNA 鎖そのものに対する結合であることが明らかになった。

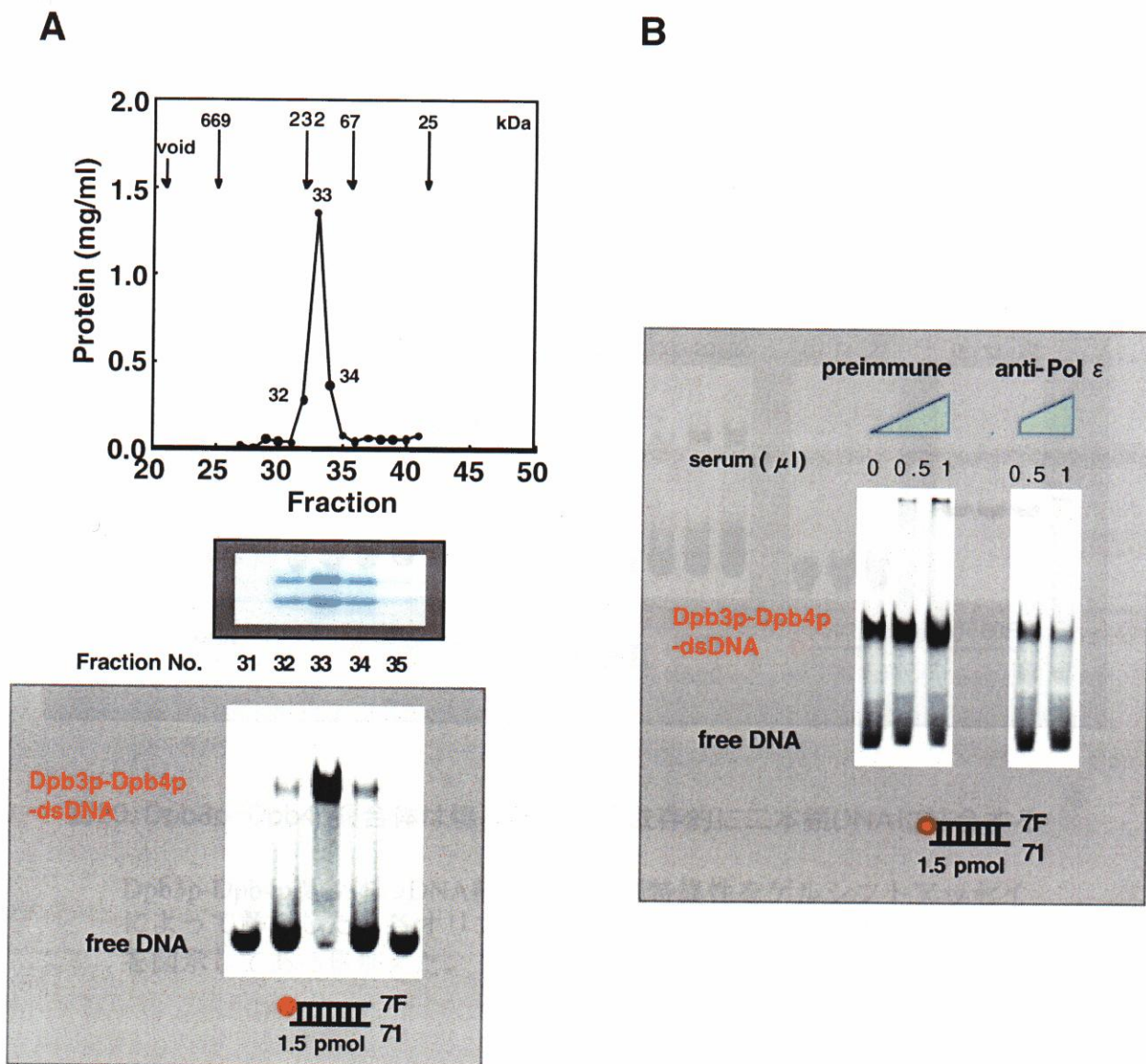


図19. Dpb3p-Dpb4pは二本鎖DNA結合能を有する

- A ; Dpb3p-Dpb4p複合体のゲル濾過精製画分(fr.31-35)、各 $1\mu\text{l}$ (Dpb3p-Dpb4p複合体 ; $0\sim 30\text{ pmol}$) を7F + 71と反応させて、ゲルシフトアッセイを行った。
- B ; 反応液に免疫前血清、またはPol ϵ に対する抗血清を加えてゲルシフトアッセイを行った。Dpb3p-Dpb4p複合体は 27 pmol 加えた。

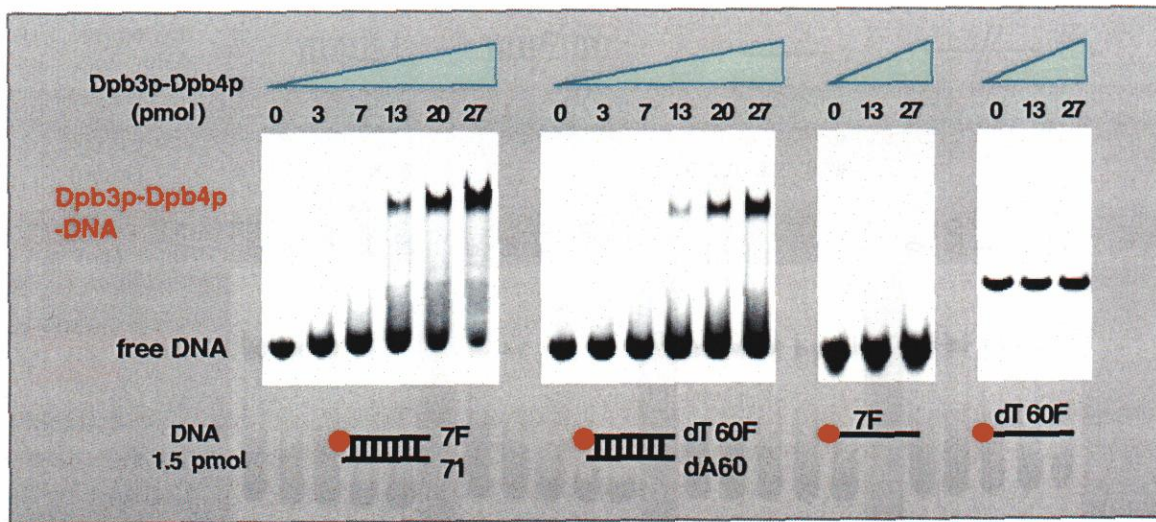


図20. Dpb3p-Dpb4p複合体は塩基配列に非依存的に二本鎖DNAに結合する

Dpb3p-Dpb4p複合体のDNA結合活性の鎖特異性をゲルシフトアッセイによって解析した。各オリゴマーDNAに対して、Dpb3p-Dpb4p複合体を図示してある量加えた。

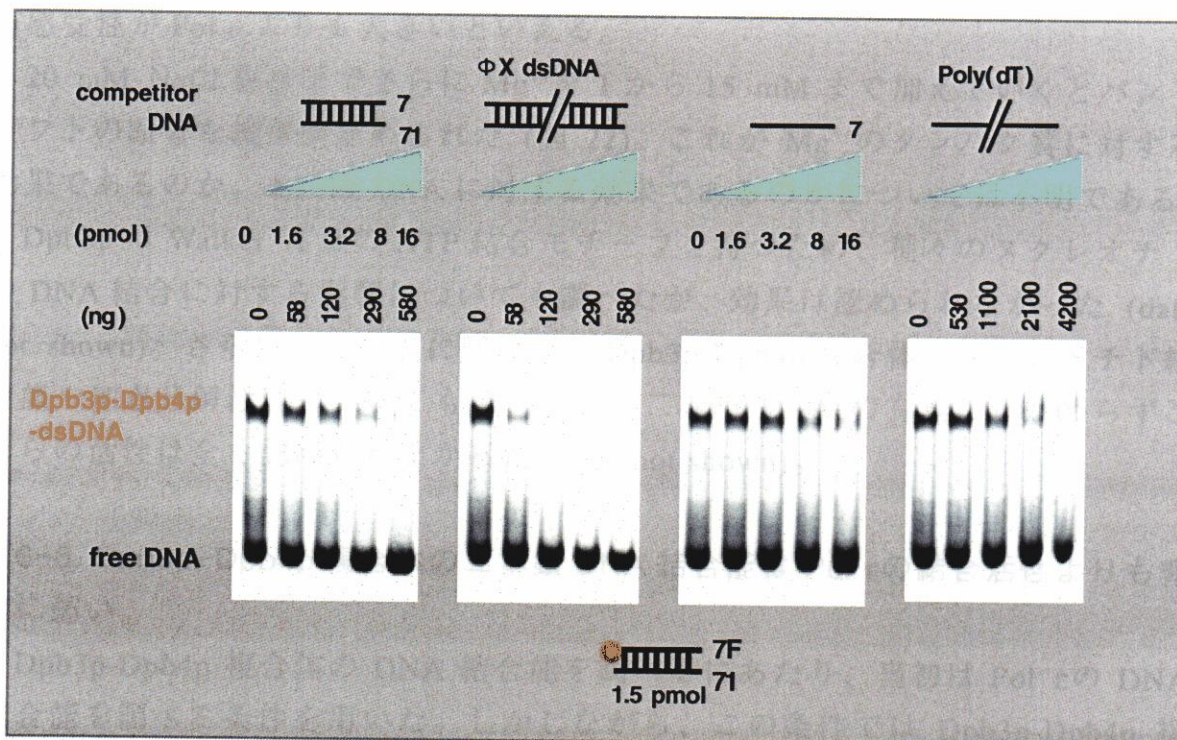


図21. Dpb3p-Dpb4p複合体の二本鎖DNA結合に対する競合試験

Dpb3p-Dpb4p複合体の二本鎖DNA結合に対する競合試験を行った。1.5 pmol (56 ng)の7F + 71に対して、7 + 71、 ϕ X二本鎖DNA、7、poly(dT)を図示した量加えた後、Dpb3p-Dpb4p複合体を17 pmol加えて反応を行った。

6-5. NaCl、Mg⁺⁺、およびヌクレオチドの二本鎖 DNA 結合能への影響

二本鎖 DNA 結合能に対する塩濃度の影響を調べた(図 22)。NaCl 濃度を 35mM まで上げるとシフトバンドは 70%に減少した。シフトバンドは、160 mM NaCl 存在化で消滅する(data not shown)。Pol ε によるバンドシフトは 200 mM NaCl 存在化においても全く影響を受けないので、Dpb3p-Dpb4p 複合体は塩に対する感受性が Pol ε よりも大きいといえる。

20 mM NaCl 存在下でさらに Mg⁺⁺を 1 から 15 mM まで加えていくとバンドシフトの顕著な減少が認められた(図 22)。これが Mg⁺⁺のタンパク質に対する効果であるのか、または DNA に対する効果であるのかについては不明である。

Dpb3p は Walker A 型の NTP 結合モチーフを持つため、種々のヌクレオチドの DNA 結合に対する影響についても調べたが、効果は認められなかった(data not shown)。さらに、この点に関連して Dpb3p-Dpb4p 複合体のヌクレオチド結合能や加水分解活性についても調べたが、二本鎖 DNA の有無にかかわらずこれらの活性は全く認められなかった(data not shown)。

6-6. Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能は Pol ε の結合活性よりも非常に弱い。

Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合能を調べるにあたり、当初は Pol ε の DNA 結合能を調べる条件を用いた。しかしながら、この条件では Dpb3p-Dpb4p 複合体と DNA との結合によるバンドシフトはようやく検出できる程度であった(図 23)。そこで、ゲルシフトアッセイの電気泳動に用いる泳動バッファーをイオン強度の低いものに変えたところ、図 20 に見られるようなバンドシフトが観察された。さらに、DNA 結合反応の条件の至適化を行い、Dpb3p-Dpb4p 複合体のゲルシフトアッセイの条件は Pol ε のそれとは異なるものを採用している(材料と方法の項参照)。しかしながら、この条件下においても反応に加えた Dpb3p-Dpb4p 複合体と基質 DNA との間には分子量論的關係が成立していない。すなわち、図 20 に示すように、1.5 pmol (0.3 μM)の二本鎖 DNA オリゴマーに対して、27 pmol の Dpb3p-Dpb4p 複合体を加えた時、検出されるシフトバンドの量は 1.3 pmol であり、タンパク質が結合していない基質 DNA がまだ残っている状態である。この結果は、Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA との親和性が非常に弱い、あるいは複合体標品中の大部分が失活していることを示す。後者の可能性を検討するために、Dpb3p-Dpb4p 複合体標品を二本鎖 DNA カラムを用いて精製することにした。もしこの標品中に失活型 Dpb3p-Dpb4p 複合体が存在するのであれば、これは DNA カラムに吸着することなく通り抜け、活性型のみがカラムに吸着するはずである。しかし、本標品の 90%以上はカラ

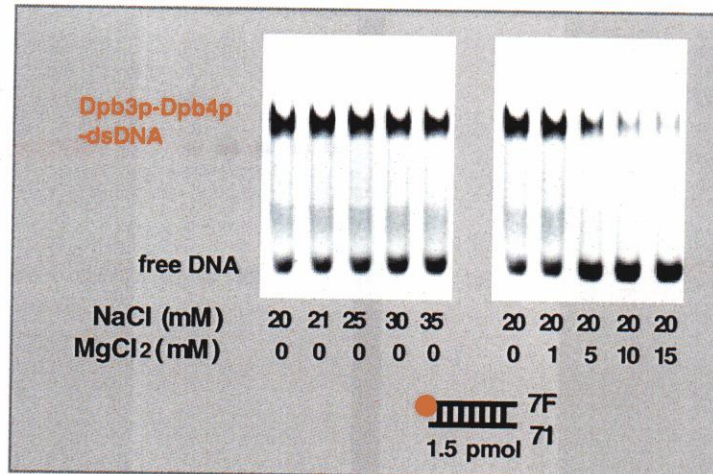


図22. Dpb3p-Dpb4p複合体の二本鎖DNA結合能に対する塩の影響

Dpb3p-Dpb4p複合体の二本鎖DNA結合能に対する塩の阻害効果をゲルシフトアッセイで調べた。図示した濃度のNaClおよびMgCl₂を加えた。Dpb3p-Dpb4p複合体は20 pmolを使用した。

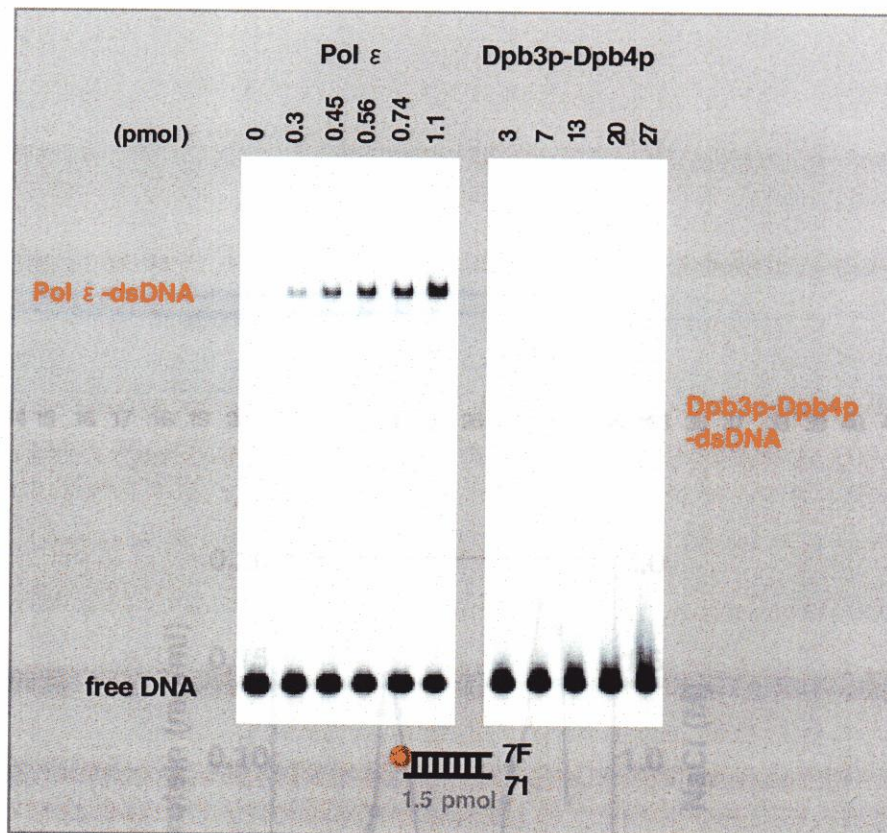


図23. Dpb3p-Dpb4p複合体の二本鎖DNA結合能はPol εの結合能よりも非常に弱い

Dpb3p-Dpb4p複合体の二本鎖DNA結合能とPol εの結合能を比較した。本実験のゲルシフトアッセイは反応液のpHが低く、泳動バッファの塩濃度が高い条件（「材料と方法」、12-3）で行った。

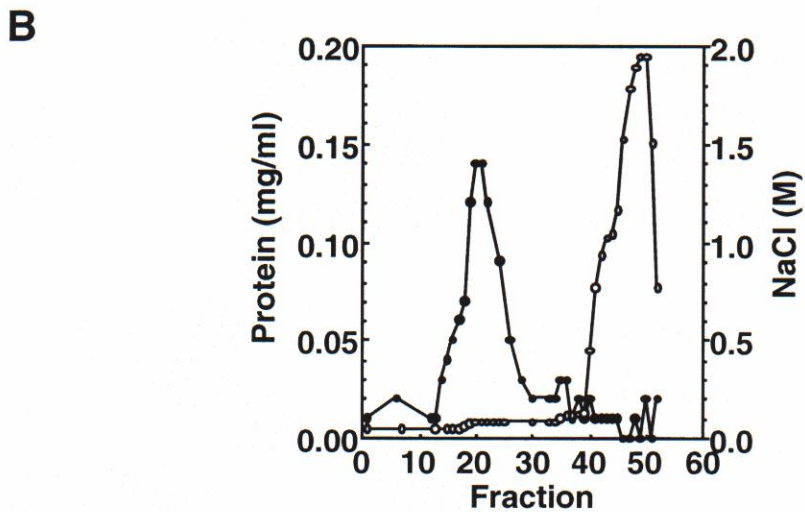
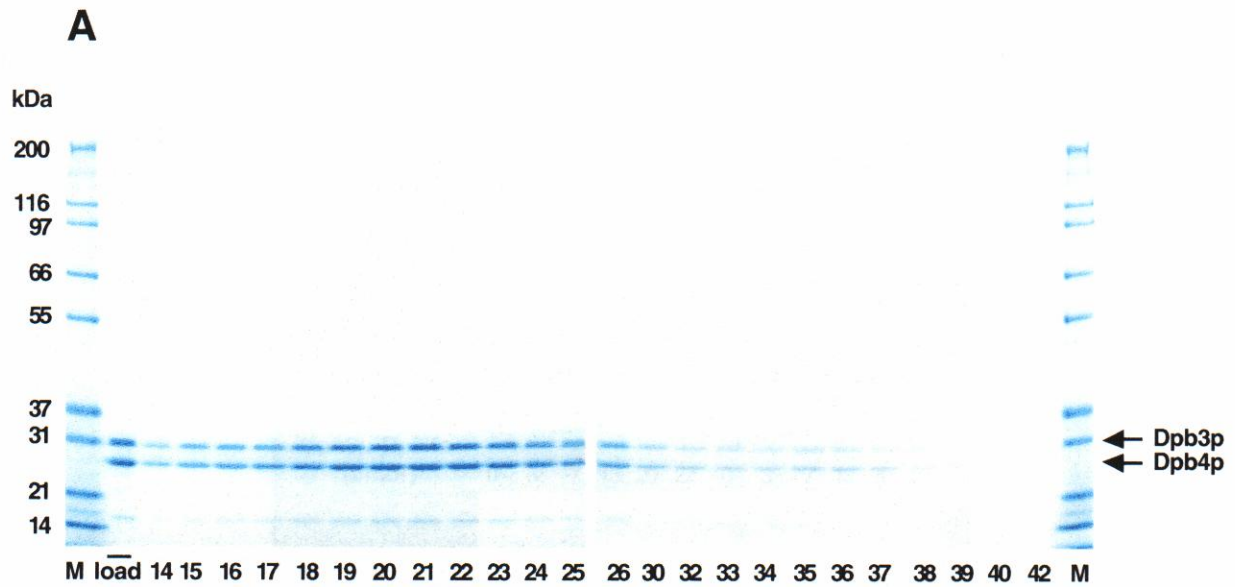


図24. 二本鎖DNA-セルロースカラムを用いたDpb3p-Dpb4p複合体の精製

A ; Mono Sカラム溶出画分を、二本鎖DNA-セルロースカラムにかけてSDS-PAGE解析した。

B ; タンパク質 プロファイリングを示す。

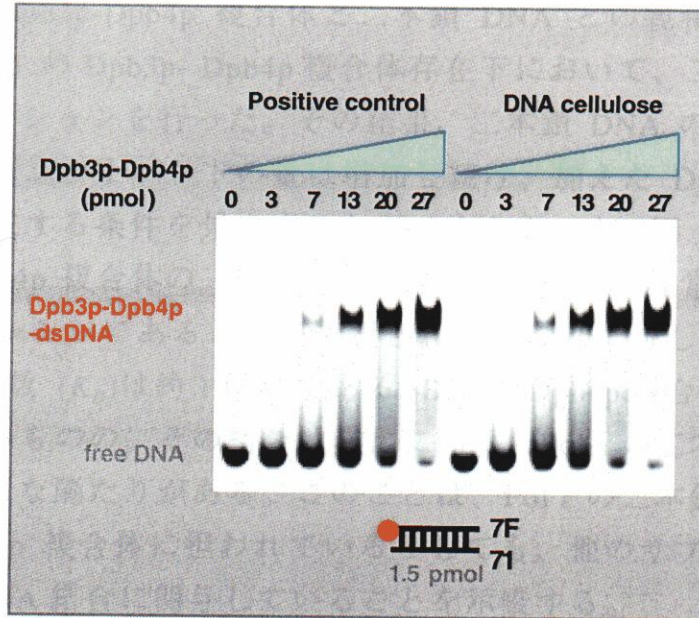


図25. 二本鎖DNA-セルロースカラム溶出画分の二本鎖DNA結合能

二本鎖DNA-セルロースカラムの溶出画分を回収して、カラムにかけていない評品(positive control)との二本鎖DNA結合能の比較を行った。

ムに結合し、単一のピークを形成した (図 24)。このピーク画分を MonoQ カラムで濃縮して二本鎖 DNA 結合能を解析したところ、DNA カラムにかけていない標品と同じ DNA 結合活性を示した(図 25)。このことは、本標品は二本鎖 DNA 合成に関する限り失活型を含まない、均一な標品であることを示すものである。

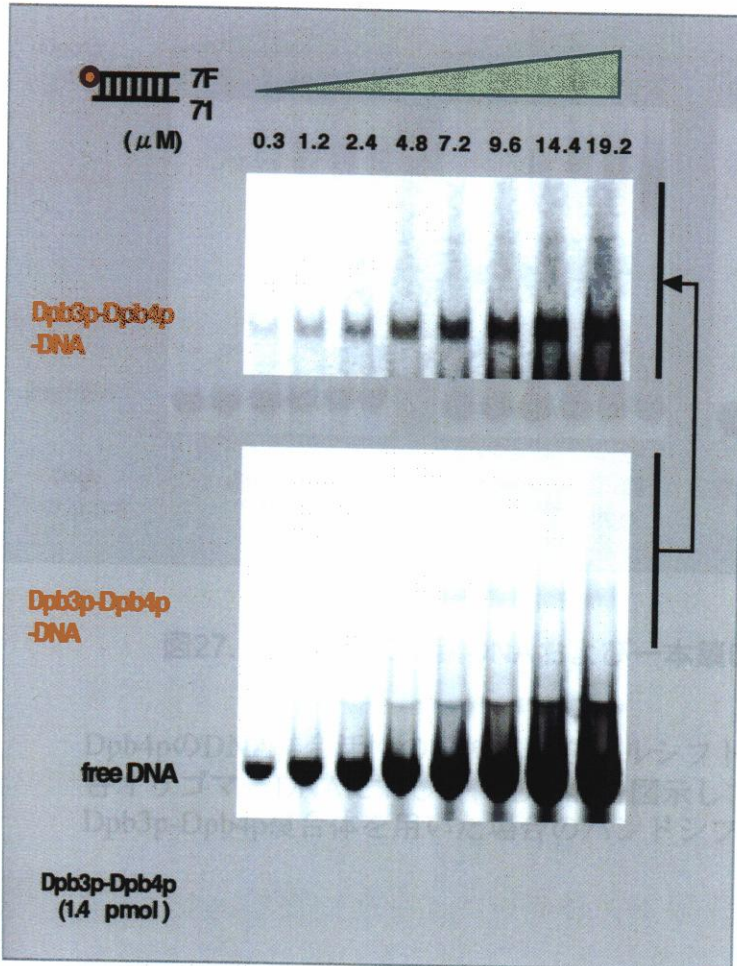
そこで次に、Dpb3p-Dpb4p 複合体と二本鎖 DNA との親和性を解析した。0.28 μ M (1.4 pmol) の Dpb3p- Dpb4p 複合体存在下において、二本鎖 DNA (7F + 71) のタイトレーションを行った。その結果、二本鎖 DNA の濃度を 19.2 μ M まで上昇させてもシフトバンドの量は増加し続け、加えた Dpb3p-Dpb4p がすべて複合体を形成する条件を見出すことができなかった (図 26)。以上の結果より、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA に対する結合は非常に弱く、解離定数 (K_D)は μ M のレンジであることが予想される。これに対して、Pol ϵ と二本鎖 DNA の解離定数 (K_D)は約 10 nM である。Dpb3p-Dpb4p 複合体は二本鎖 DNA 結合活性を有するものの、その結合は非常に弱く、Pol ϵ の二本鎖 DNA に対する親和性とは大きな隔たりがある。このことは、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能が仮に Dpb3p-Dpb4p 複合体に担われているとしても、他のサブユニットもまた Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合に関与していることを示唆する。

7. Dpb4p の DNA 結合能

5-2 において精製した Dpb4p タンパク質はホモ二量体を形成していることが示唆された。そこで Dpb4p と DNA との相互作用についてゲルシフト法を用いて調べた (図 27)。まず、二本鎖 DNA オリゴマー、7F + 71、に対する Dpb4p の結合を調べたところ、シフトバンドが検出された。さらに T₆₀F + A₆₀を用いたところ、同様にシフトバンドが検出された。7F + 71 に比べ T₆₀F + A₆₀を用いた場合の方がシフトバンドの量が多いが、この意味については不明である。また、Dpb3p-Dpb4p 複合体によるシフトバンドに比べ、バンドがシャープではなく広がっている。これは Dpb4p の DNA に対する結合の結果、DNA に曲がりが生じることを示唆している。すなわち、DNA 上のどの位置に Dpb4p が結合するかによって、DNA の曲がり異なるため、バンドの移動度が一定しないと考えられる。興味深いことに、Dpb4p は一本鎖 DNA オリゴマーに対しても二本鎖 DNA の場合と同等、あるいはそれ以上に結合した。この場合、シフトバンドは広がっていない。いずれの場合も Dpb4p の DNA 結合能は、Dpb3p-Dpb4p 複合体の場合と同様に非常に弱いものである。

Dpb4p のシフトバンドの移動度は DNA の種類にかかわらず、Dpb3p-Dpb4p 複合体のシフトバンドのそれよりも遅かった。通常ゲルシフトアッセイのシフ

A



B

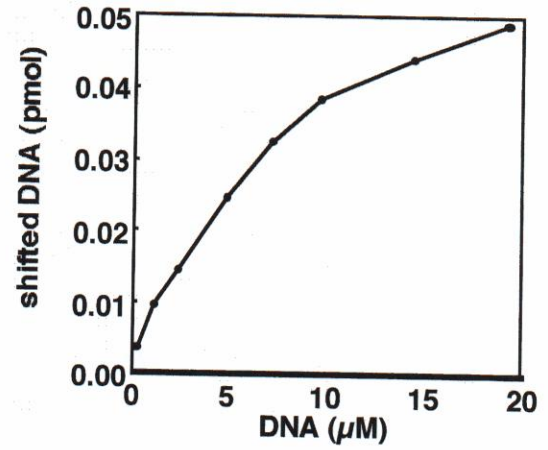


図26. 酵素学的解析

A ; 1.4 pmolのDpb3p-Dpb4p複合体に対して、7F+71のタイトレーションを行い、ゲルシフト解析した。下図右に記した縦線部分の感度を上げた場合を上図に示した。7F+71の19.2 μ Mは96 pmolに相当する。
 B ; シフトバンドの定量結果を示す。

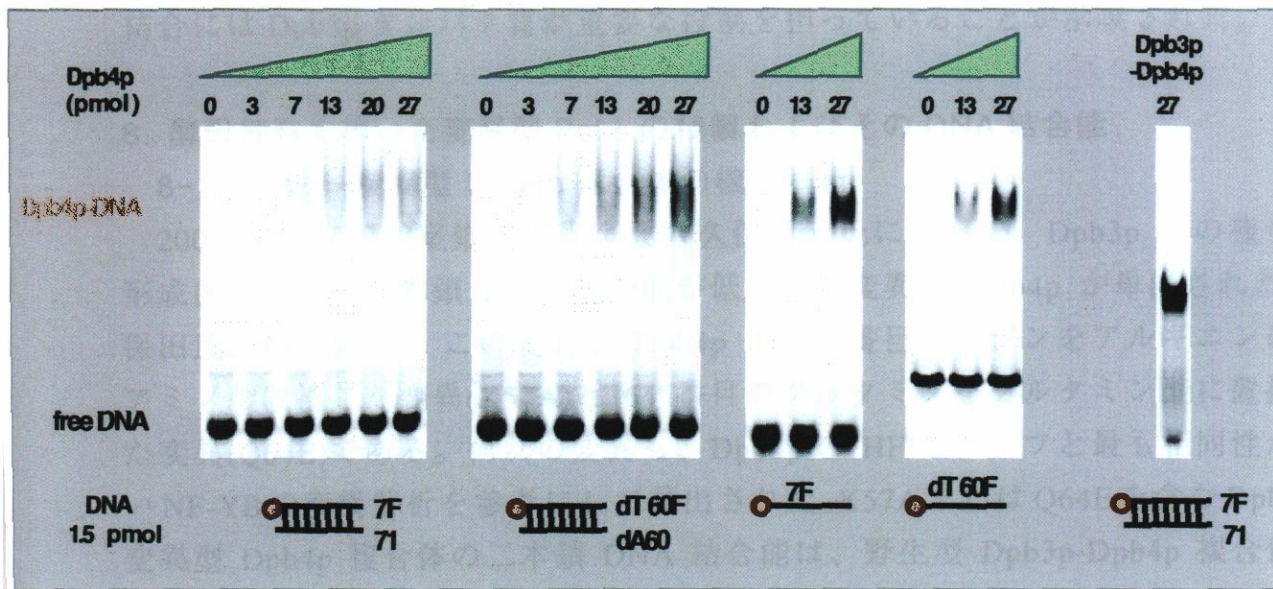


図27. Dpb4pは二本鎖DNAおよび一本鎖DNAに結合する

Dpb4pのDNA結合活性の鎖特異性をゲルシフトアッセイによって解析した。各オリゴマーDNAに対して、Dpb4pを図示してある量加えた。右端にDpb3p-Dpb4p複合体を用いた場合のバンドシフトの様子を示した。

トバンドの位置は、DNA に結合したタンパク質の分子量に規定される。DNA 上の Dpb4p はホモ二量体よりも大きな複合体を形成しているのかもしれない。Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合と Dpb4p の DNA 結合の性質の違いが、これらのタンパク質のどのような構造上の違いによってもたらされているのかについては今後の課題であるが、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 特異的な DNA 結合には Dpb3p タンパク質が重要な役割を担っていることが示唆された。

8. 酵母細胞を用いた変異型 Pol ϵ の精製およびその DNA 結合能

8-1. Dpb3p-変異型 Dpb4p 複合体の機能解析

2003 年度本研究室修士課程卒業の久保田元氏によって、Dpb3p との複合体形成能はあるが二本鎖 DNA 結合能が低下する変異型 Dpb4p が単離された(久保田氏、修士論文)。この変異は Dpb4p の 57 番目のリジンをアルギニンに一アミノ酸置換した変異(K57A)と 64 番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した変異(Q64E)である。何れの変異も、Dpb4p の HF モチーフと最も相同性が高い NF-YB の変異解析を参考にして見出された。K57A または Q64E を含む Dpb3p-変異型 Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能は、野生型 Dpb3p-Dpb4p 複合体に対してそれぞれ約 50% および 10% に低下した (図 28)。Q64E 変異を用いた場合、特に高塩濃度下(300 mM)において野生型 Dpb3p-Dpb4p 複合体よりも複合体形成能が不安定であった。

8-2. 変異株 Pol ϵ の精製

前述の二つの変異、K57A または Q64E を酵母 YRT1 株(DPB3 遺伝子の C 末端に Flag タグが結合している株で本研究室の田島理絵氏および真木智子助手により作成)に一つずつ導入し、得られた YTT1(K57A)株および YTT2(Q64E)株を用いて変異型 Pol ϵ を発現させた。YTT1 株および YTT2 株は 30°C においても 37°C においても野生型 YRT1 株と同じ生育速度を示した。

細胞破碎液を Flag 抗体カラムにアプライした後、PreScission protease によって Dpb3p と Flag タグを切り離して Pol ϵ を溶出した。バッファー中の NaCl 濃度が 300 mM の条件下においても両変異型 Pol ϵ を野生型 Pol ϵ と同様に安定に精製することができた(図 29)。Flag 抗体カラムの溶出画分を Heparin カラムクロマトグラフィーによりさらに精製した。両変異型 Pol ϵ とともに野生型 Pol ϵ と同様に安定に、かつ高純度に精製することができた(図 30)。この変異型 Pol ϵ を用いて、DNA 合成活性を測定したところ、野生型 Pol ϵ および K57A、Q64E 変異型 Pol ϵ の DNA 合成活性は、それぞれ、21000、28000、29000 U/ μ g であり、変異型 Pol ϵ も野生型 Pol ϵ と同等の活性を示した。

8-3. 変異型 Pol ϵ の DNA 結合活性

ゲルシフトアッセイにより、野生型 Pol ϵ および K57A、Q64E 変異型 Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能を比較した(図 31)。野生型 Pol ϵ と変異型 Pol ϵ 間での二本鎖 DNA 結合能に差は見られなかった。また、塩濃度に対する感受性に関しても三者に変化はなかった(data not shown)。

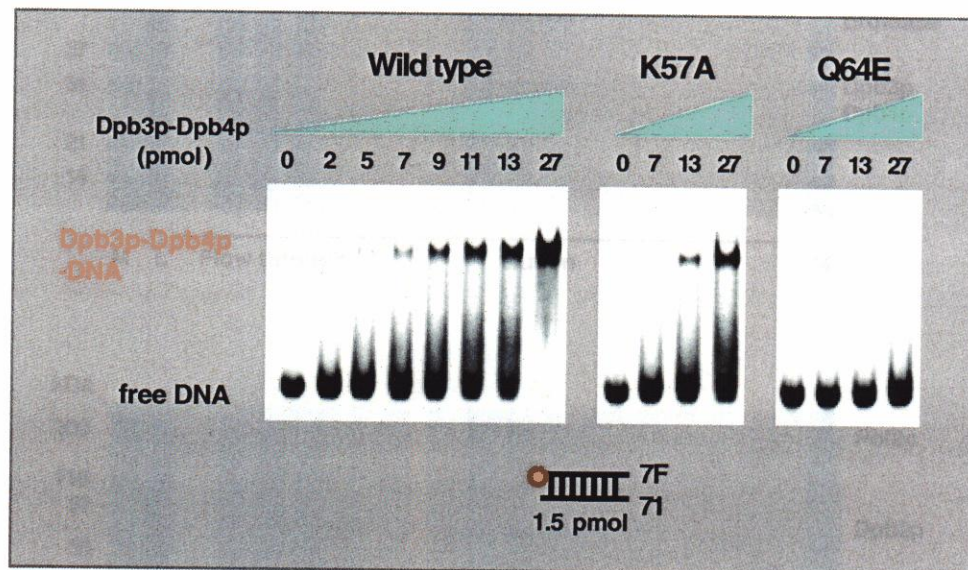


図28. Dpb3p-変異型Dpb4pの二本鎖DNA結合能

Dpb3p-変異型Dpb4p (K57A)およびDpb3p-変異型Dpb4p (Q64E)の二本鎖DNA結合能を野生型Dpb3p-Dpb4p複合体と比較した。

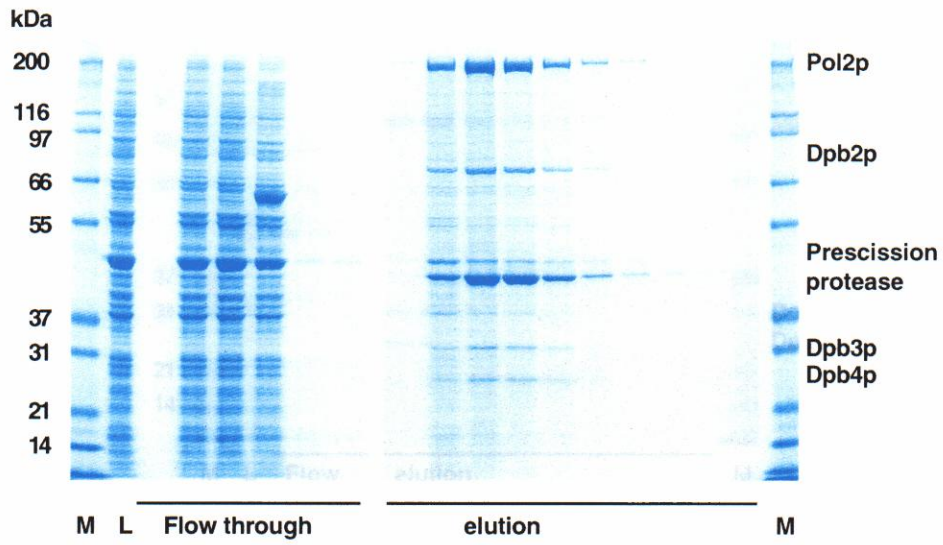
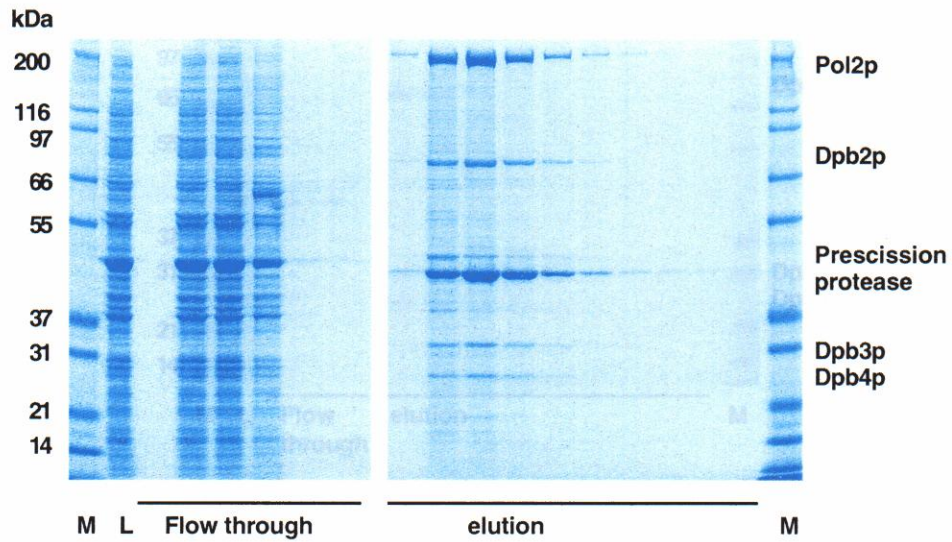
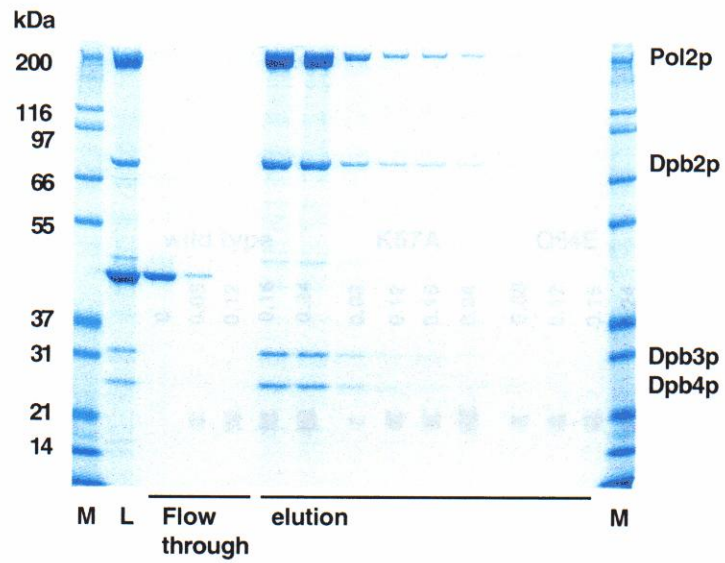
A**B**

図29. Flag抗体カラムを用いた変異型Pol ϵ の精製

A ; 変異型Pol ϵ (K57A)をFlag抗体カラム精製してSDS-PAGE解析した。
カラムからの溶出はPreScission proteaseによって、Dpb3pとFlagタグ
を切り離すことで行った。Lはロードサンプル。

B ; 変異型Pol ϵ (Q64E)をFlag抗体カラム精製してSDS-PAGE解析した。

A



B

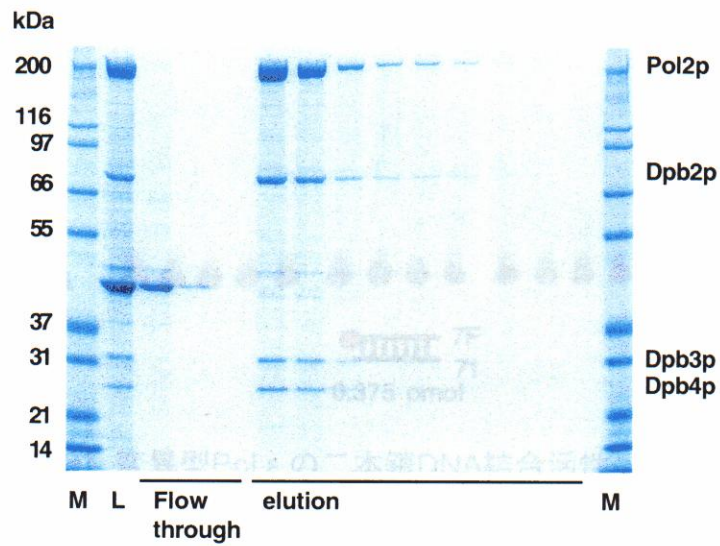


図30. Heparinカラムを用いた変異型Pol ε の精製

- A ; Flag抗体カラムから溶出した変異型Pol ε (K57A)をHeparinカラムにかけてSDS-PAGE解析した。Lはロードサンプル。
 B ; Flag抗体カラムから溶出した変異型Pol ε (Q64E)をHeparinカラムにかけてSDS-PAGE解析した。

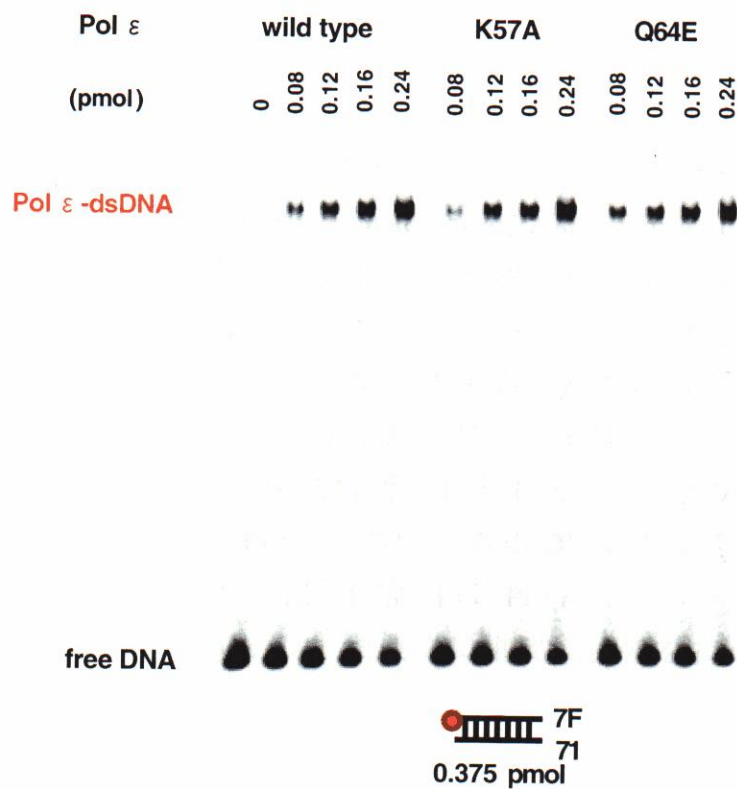


図31. 変異型Pol ϵ の二本鎖DNA結合活性

野生型Pol ϵ と変異型Pol ϵ (K57AおよびQ64E)の二本鎖DNA結合能を比較した。本ゲルシフトアッセイでは、7F+7Iを75 nM (0.375 pmol)使用した。

IV. 考 察

DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) は、正確に染色体 DNA を複製するために必須の DNA ポリメラーゼであるが、染色体複製以外にも、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復等の修復系、相同組換え機構、細胞周期チェックポイント制御、さらには DNA 複製の開始機構や遺伝子のサイレンシング、姉妹染色分体間のコヒージョン形成にも関与することが知られている (Aboussekhra et al. 1995; Edwards et al. 2003; Ehrenhofer-Murray et al. 1999; Holmes and Haber 1999; Jessberger et al. 1996; Jessberger et al. 1993; Navas et al. 1996; Navas et al. 1995; Shivji et al. 1995; Smith et al. 1999; Wada et al. 2002; Wang et al. 1993)。Pol ϵ が細胞増殖において染色体複製以外の様々な局面で重要な役割を果たしていることは、他の真核生物 DNA ポリメラーゼには見られない Pol ϵ のユニークな特徴である。このような Pol ϵ の多彩な生理機能の分子レベルでの理解や、それぞれの生理機能の関係を明らかにするために、当研究室では出芽酵母から精製した Pol ϵ を用いて詳細な生化学的解析が行われてきた。その過程で、多くの DNA ポリメラーゼとは異なり、Pol ϵ が強い二本鎖 DNA 結合能を有していることが見いだされた。この新規の生化学的活性は Pol ϵ にユニークであることに加えて、染色体複製以外の Pol ϵ の生理機能に重要な役割を持つと考えられてきた Pol2p サブユニットの C 末端領域および 3 種のアクセサリーサブユニット (C 末端アセンブリー) が関与することも示され、Pol ϵ の多彩な生理機能の解明に有力な手がかりとなることが考えられた。そこで、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能が Pol ϵ の生理機能にどのような役割を果たしているのかを解明することを目標として、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本研究の目的とした。

Pol ϵ の中で二本鎖 DNA 結合能を担う実体の候補と考えたのがヒストンフォールド (HF) モチーフを持つ Dpb3p および Dpb4p サブユニットである (Li et al. 2000; Ohya et al. 2002)。HF モチーフは HF モチーフを持つタンパク質間での二量体形成を導くと同時に、HF 二量体が別のタンパク質や DNA と結合する分子間インターフェースとして働く (Arents and Moudrianakis 1995; Corona et al. 2000; Gangloff et al. 2001; Poot et al. 2000)。このことから、Dpb3p と Dpb4p が二量体を形成して HF タンパク質として機能するならば、Pol ϵ の強い二本鎖 DNA 結合能は両サブユニットの HF モチーフに担われている可能性が高いと考えられた。そこで、1) Dpb3p および Dpb4p は HF タンパク質として二量体を形成するのか、2) 複合体を形成するならば、その Dpb3p-Dpb4p 複合体自身が二本鎖 DNA 結合能を持つのか、を当初の課題として本研究に取り組んだ。

1. Dpb3p-Dpb4p 複合体の分離とその構造

Dpb3p および Dpb4p をそれぞれ単独で大腸菌細胞内で過剰発現した場合、Dpb3p は非常に不安定で精製途中で分解および凝集するために精製は困難であったが、Dpb4p は精製することに成功した。また、両サブユニットを大腸菌細胞内で共発現した場合には、両サブユニットは容易に複合体を形成し、Dpb3p-Dpb4p 複合体として精製することが可能であることが分かった。Dpb4p もホモ二量体を形成していたため、Dpb3p と Dpb4p の HF モチーフは他の HF タンパク質で観察されるように二量体形成を導くものであろうと考えられる。ただし、Dpb3p の HF モチーフはホモ二量体を形成できない。

今回のタンパク質精製において、最初のステップとして GSTrap カラムを用いた。このカラムは、GST 融合タンパク質を短時間で効率的に精製することができ、本研究においても威力を発揮した。さらに、陽イオン交換カラムおよび陰イオン交換カラムを用いることで、最終的に純度が 95 %以上の標品を得ることができた。また、本研究で確立した発現・精製法では、1 l の大腸菌培養液から 1.3 mg の Dpb3p-Dpb4p 複合体を精製することが可能であり、X 線結晶解析や NMR での構造解析に欠かすことのできない大量精製の目処も立てることができた。

最終精製評品を SDS-PAGE で分離し、タンパク質染色での定量分析を行った結果、Dpb3p および Dpb4p は分子比 1:1 で複合体を形成することが明らかになった。そこで、今回分離した Dpb3p-Dpb4p 複合体の分子構造および分子量について流体力学的解析を行った。ゲル濾過およびショ糖密度勾配遠心分離法での解析結果から、Dpb3p-Dpb4p 複合体は 47.1 Å のストークス半径と 3.4 S の沈降係数を持つことが分かった。両パラメーターから Dpb3p-Dpb4p 複合体の分子量は 67 kDa であることが計算された。アミノ酸配列から予測される Dpb3p および Dpb4p の分子量はそれぞれ 23 および 22 kDa であることと、Dpb3p および Dpb4p が等分子比で複合体を形成することを考え合わせると、Dpb3p-Dpb4p 複合体はヘテロ二量体であると結論した。複合体の分子量の推定値が大きめにでた理由は、Dpb3p-Dpb4p 複合体が極端な非球状の構造をとるためであろうと考えられる。複合体のストークス半径（推測される球状タンパク質の分子量は約 200 kDa）と沈降係数（推測される分子量は 40 kDa）に大きな隔たりがあることが、その強い証拠である。また、Dpb3p-Dpb4p 複合体の摩擦係数比 f/f_0 は 1.75 という大きなものであり、Dpb3p-Dpb4p 複合体は棒状あるいは扁平な構造をしていると考えられる。Dpb3p-Dpb4p 複合体の分子量は Pol ϵ の分子量の 12 %を占めるにすぎないのに対し、ストークス半径は Pol ϵ のストークス半径の 63 %に相当する。

以上の結果から、最初の課題に対する答えとして、Dpb3p および Dpb4p は HF タンパク質としてヘテロ二量体を形成することが明らかになった。さらに、この複合体は非球状の特異な構造をしていることが示された。

大腸菌細胞内で単独で発現させた Dpb4p についても、基本的に共発現の場合と同様の方法で精製を行い、最終的に純度 99 %以上の標品を取得することができた。Dpb4p タンパク質のストークス半径および沈降係数のどちらの流体力学的パラメーターも Dpb3p-Dpb4p 複合体の結果と非常に類似したものとなり(それぞれ 49.6 Å と 2.9 S)、その分子量の推定値は 60 kDa となった。Dpb4p も非球状型の構造を取ることが明らかであり、Dpb3p-Dpb4p 複合体と同様に二量体を形成している可能性が高い。

Dpb3p の発現量が過剰でない限りは、出芽酵母細胞内でも Dpb4p ホモ二量体が存在する可能性が考えられる。精製された Pol ϵ は Dpb4p と Dpb3p を等分子比で含む。このことから、Pol ϵ には Dpb3p-Dpb4p ヘテロ二量体は取り込まれるが、Dpb4p ホモ二量体は取り込まれないか、取り込まれても不安定な Pol ϵ になることが予想される。*dpb3* 完全欠失株から分離された Pol ϵ は Dpb4p を含むが、Pol ϵ 複合体としては不安定であることが報告されている (Araki et al. 1991b)。Dpb4p ホモ二量体は Pol ϵ とは独立した場面で機能する可能性も否定できないが、Pol ϵ のサブユニットとして機能する場合には Dpb3p とヘテロ二量体を形成する必要があるものと考えられる。

2. Dpb3p-Dpb4p 複合体に見出された二本鎖 DNA 結合能

Dpb3p-Dpb4p 複合体を分離することができたため、第二番目の課題であった、この複合体が果たして二本鎖 DNA 結合を有するか否かをゲルシフト法を用いて検討した。最初は、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合を解析する際の条件を用いたために、二本鎖 DNA 結合は検出することが困難であったが、アッセイ条件の検討の結果、低イオン強度のゲルを用いれば二本鎖 DNA 結合が検出可能であることが判明した。ゲル濾過画分を用いた解析では、Dpb3p-Dpb4p 複合体の溶出パターンとゲルシフト活性の溶出パターンが完全に一致した。さらに、Pol ϵ 特異的な抗血清により Dpb3p-Dpb4p 標品のゲルシフト活性が阻害された。これらの結果より、Dpb3p-Dpb4p 複合体は二本鎖 DNA 結合能を有すると結論された。

各種の DNA を用いて、Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合の特異性を検討したところ、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合は DNA の塩基配列には依存性を示さず、DNA 末端を必要としないことが分かった。また、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合を容易に検出できる実験条件でも、一本鎖 DNA へ

の結合は検出が困難であった。しかし、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合は一本鎖 DNA によって競合阻害されることが示されたことから、Dpb3p-Dpb4p 複合体は一本鎖 DNA とともに結合するが、それは二本鎖 DNA 結合よりも非常に弱いことが示された。

Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合は、Pol ϵ の場合と異なり、イオン強度に感受性を示し、反応液に 160 mM の NaCl の添加するとほぼ完全に DNA 結合が阻害される。低イオン強度の条件下でも、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合は Pol ϵ の場合に比べて顕著に弱いことが見いだされた。Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合の解離定数は nM オーダーであるのに対し、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合の解離定数は μ M オーダーであると推定された。今後、BIACORE などを用いて Dpb3p-Dpb4p 複合体の DNA 結合の反応速度論的解析が必要である。

Dpb3p には NTP 結合モチーフの候補となる部位が存在するため (Araki et al. 1991b)、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合に対する Mg イオンおよび ATP の影響を調べた。MgCl₂ を 5 mM 加えると二本鎖 DNA 結合能は 50 % に低下し、10 mM では 25 % に低下した。また、ATP による顕著な促進や阻害の効果は見られなかった。以上のことから、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合は Mg イオンおよび ATP に依存するものではないと結論した。さらに、Dpb3p-Dpb4p 複合体自身の ATP 結合および ATP 加水分解活性に関しても調べたが、そのような活性は検出することはできなかった。Dpb3p-Dpb4p 複合体中においては、Dpb3p の NTP 結合モチーフは機能していない可能性が高い。

3. Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能と Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能の関係

Dpb3p-Dpb4p 複合体に二本鎖 DNA 結合能が見いだされたことにより、当初の研究課題に答えを与えることができた。次の課題の一つは Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能が Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の真の基盤となっているのか否かということである。

Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能は、1) DNA 塩基配列に非依存的である、2) DNA 末端ではなく DNA 鎖への結合である、3) Mg イオンおよび ATP に非依存的である、4) 一本鎖 DNA によって阻害される、という特徴を持ち、これらは Pol ϵ の DNA 結合能の性質と共通である。以上のことから、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示唆される。しかし、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能は Pol ϵ の結合能よりも非常に弱いことから、今回の結果からだけでは Dpb3p-Dpb4p 複合体が Pol ϵ の二

本鎖 DNA 結合活性を直接担っているとは断定できない。

この Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能が弱い原因は不明であるが、いくつかの可能性が考えられる。その一つは、今回用いた Dpb3p-Dpb4p 複合体は大腸菌から精製しているため、本来の二本鎖 DNA 結合活性には翻訳後修飾が必要である可能性である。しかし、SDS-PAGE 上での移動度から見る限り、出芽酵母から精製した Pol ϵ に含まれる Dpb3p および Dpb4p と Dpb3p-Dpb4p 複合体に含まれるものとに差異は見いだされない。もう一つの可能性は、Pol2p の C 末端領域あるいは Dpb2p が、Dpb3p-Dpb4p 複合体の構造安定化などを通して、Pol ϵ の強い二本鎖 DNA 結合に関与している可能性である。実際に、そのようなケースが存在することが報告されている (Caretto et al. 1999; Romier et al. 2003)。

Dpb3p および Dpb4p の HF モチーフと最もアミノ酸配列の相同性が高い HF タンパク質は、それぞれ NF-Y 複合体に含まれる NF-YC および NF-YB である (Mantovani 1999)。NF-Y 複合体は NF-YA、NF-YB、NF-YC の三サブユニットからなるヘテロ三量体を形成し、多数の遺伝子のエンハンサー領域に含まれる CCAAT 配列に結合して転写を活性化する転写因子である。NF-YB および NF-YC は HF タンパク質であり、ヘテロ二量体を形成する。しかしながら、NF-YC-NF-YB 複合体はそれだけでは DNA への結合を検出することはできない (Caretto et al. 1999; Romier et al. 2003)。NF-YA も単独では DNA に結合できないが、3 つのサブユニットが全て揃っている場合にのみ CCAAT 配列依存的な二本鎖 DNA 結合を行う。この結合は非常に強くその結合定数は 10^{-10} M オーダーである。このことから、NF-YC-NF-YB 複合体の場合と同様に、Dpb3p-Dpb4p 複合体は Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能を担っているものの、それ単独では Pol ϵ の結合能よりは非常に弱い結合能しか示さない可能性が考えられる。

Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能と Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の関係を明らかにする有力な方法は、Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能が低下するような Dpb3p あるいは Dpb4p のアミノ酸置換を引き起こす変異株を分離し、その変異株から精製した Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能が低下するかどうかを調べることである。この目的のために、当研究室において変異株のスクリーニングが行われ、Dpb3p との複合体形成は可能であるが、複合体の二本鎖 DNA 結合能を低下させる変異として、*DPB4* 遺伝子の K57A および Q64E 変異が分離された (久保田元、修士論文)。両変異は Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能を、それぞれ野生型 Dpb3p-Dpb4p 複合体の場合の約 50% および 10% に低下させた。これらの変異を持つ出芽酵母細胞から変異型 Pol ϵ を精製して、それらの二本鎖 DNA 結合能を解析した。その結果は、変異型 Pol ϵ と野生型

Pol ϵ に二本鎖 DNA 結合能に明らかな差異は認められないというものであった。しかし、これらの結果は必ずしも Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合能と Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能が無関係であることを結論するものではない。

Dpb3p と Q64E 変異型 Dpb4p は複合体を形成することができるものの、その安定性は野生型の Dpb3p-Dpb4p 複合体に比べ低いことが、この複合体の精製の過程でわかっている (久保田元、修士論文)。後述するように、Q64E 変異は複合体形成に重要な中央の α ヘリックスの中心付近に位置することも、このことを支持する。Dpb3p と Q64E 変異型 Dpb4p の複合体の二本鎖 DNA 結合能の低下はこの複合体の不安定性が原因であるのかもしれない。しかし、この変異型複合体が Pol ϵ の中で存在する場合には、Dpb3p と変異型 Dpb4p の相互作用が他のサブユニットの存在により安定化されるため、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の顕著な低下が見られないのかもしれない。実際、Q64E 変異型 Dpb4p を含む変異型 Pol ϵ は野生型と同じく安定に分離することができた。K57A 変異を持つ変異型 Dpb4p は Dpb3p と安定な複合体を形成することができる (久保田元、修士論文)。したがって、K57 は DNA との直接的な結合にある程度重要な働きをなすアミノ酸であることが考えられる。後述する構造予測図からも、K57 は相互作用する DNA と近い場所に位置している。それにも関わらず、K57A 変異型 Pol ϵ での二本鎖 DNA 結合能の低下は検出されなかった。この原因としては、まず、K57A 変異型 Dpb4 と Dpb3p からなる複合体ではその二本鎖 DNA 結合能の低下は高々 1/2 であることが挙げられる。構造予測図から分かるように Dpb3p-Dpb4p 複合体は複数のアミノ酸残基を通じて DNA と結合することから、その内の一つを置換させても二本鎖 DNA 結合には影響が出ないという可能性が考えられる。いずれにせよ、現時点で結論を出すことは不可能であり、さらに複数のアミノ酸置換を Dpb3p および Dpb4p に導入した変異型 Pol ϵ を用いた解析が必要であると思われる。

既に、複合体形成能は全く影響を受けないが、その二本鎖 DNA 結合能が 10% 以下にまで減少する *dpb3* 変異株や、DNA 結合能が著しく低下するような二重変異株も分離しているので、これらの株より変異型 Pol ϵ を精製し、その DNA 結合能を解析したい。また、*DPB3* および *DPB4* 遺伝子の二重欠損株より Pol ϵ を精製する系の構築も進めている。もし、Pol2p-Dpb2p 複合体が分離できれば、Dpb3p-Dpb4p 複合体と Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能の関係を明らかにする上で進展が期待される。

Dpb3p-Dpb4p 複合体以外に Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能に関与する可能性がある領域としては、Pol2p サブユニットの C-末端領域に存在する Zinc-finger 構造が考えられる (Dua et al. 2000; Dua et al. 1998; Dua et al. 1999; Dua et al. 2002)。

4. Pol ϵ および Dpb3p-Dpb4p 複合体に見出された二本鎖 DNA 結合能の生理学的意義

Pol ϵ が示す二本鎖 DNA 結合活性は、かなり小さな解離定数を示し、生理的イオン強度では阻害がみられないほどに高イオン強度に抵抗性を持つことから、細胞内でも十分に活性を示すことが予想される。前に述べたように、この二本鎖 DNA 結合には Pol2p の C 末端領域とアクセサリタンパク質が関与することから、この活性が DNA 鎖伸長反応以外の Pol ϵ の生理機能と関連がある可能性が考えられる。

二本鎖 DNA 結合活性は他の多くの DNA ポリメラーゼでは観察されないが、単純ヘルペス (Herpes simplex) ウイルスの DNA ポリメラーゼに結合してプロセッシビティ因子として働く UL42 タンパク質は DNA 塩基配列に非依存的な強い二本鎖 DNA 結合能を持つ (Randell and Coen 2001)。UL42 は結合定数が nM オーダーの強力な二本鎖 DNA 結合活性を示す。それにも関わらず、UL42 は DNA 上を自由に滑ることができ、ポリメラーゼと複合体を形成して、DNA 合成のプロセッシビティを飛躍的に高める。UL42 のプロセッシビティ増加作用の分子機構は不明な点が多いが、Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能にもプロセッシビティを高める機能があるかどうかを考慮するべきであろう。しかし、この可能性については、二本鎖 DNA 結合能を示さない p145 による DNA 合成のプロセッシビティは、低イオン強度においては Pol ϵ ホロ酵素による場合とほとんど同程度に高いこと (Maki et al. 1998) や、高イオン強度において Pol ϵ ホロ酵素は PCNA によるプロセッシビティの増加も可能である (大槻千鶴、修士論文) ことから、二本鎖 DNA 結合能がプロセッシビティを上昇させる機能を持つとしても、それは PCNA による促進効果だけではポリメラーゼのプロセッシビティが不十分であるような特殊な環境が存在する場合に発揮されると思われる。

前に述べたように、DNA 修復や組換え依存的 DNA 合成に Pol ϵ が関与することが知られているが (Aboussekhra et al. 1995; Holmes and Haber 1999; Jessberger et al. 1996; Jessberger et al. 1993; Shivji et al. 1995; Wang et al. 1993)、それらの過程に二本鎖 DNA 結合活性が有利に作用する可能性が考えられる。例えば、塩基除去修復の過程で生じる 1 塩基ギャップの修復 DNA 合成に Pol ϵ が関与する経路では、多くの修復酵素が DNA 上をスライドあるいはジャンプしながら損傷部位をサーチするように、Pol ϵ が DNA 上のギャップ部位をサーチしているのかも知れない。Pol ϵ の変異株を用いた遺伝学的解析では、チェックポイント制御に関連した事象を除けば必ずしも DNA 損傷に対して強い感受性を示すデータは得られていない。修復過程には複数の経路が存在することから、変異株の解析結果の解釈を困難にすることは良く知られているので、

二本鎖 DNA 結合活性と DNA 修復の関連については今後の詳細な研究を待たねばならないと思われる。

Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合活性は Pol ϵ のもつ染色体複製の開始制御における機能と関連していることも考えられる。既に序論において述べたように、Pol ϵ は複製開始点において DNA 鎖の開裂が起こる前にこの領域に結合することが知られている (Masumoto et al. 2000; Mimura et al. 2000)。この結合が他のタンパク質との相互作用を通じて起こる可能性は否定できないが、同時にこの過程に Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合能が関与していることも考えられる。

二本鎖 DNA 結合能は Pol ϵ が関与する上記以外の生理機能、S 期チェックポイント制御、コヒジヨン形成、複製フォークの速やかな進行などにも関与する可能性も考えられる。しかしながら、いずれの場合も Dpb3p あるいは Dpb4p が積極的に関与していることを示す証拠は乏しい。これらのサブユニットをコードする *DPB3* および *DPB4* 遺伝子の破壊株を用いた遺伝学的解析からは、両遺伝子ともに必須遺伝子ではないが、遺伝子破壊により細胞周期の進行や染色体複製の進行が遅延することが報告されている (Araki et al. 1991b; Ohya et al. 2000)。しかし、これら遺伝子破壊株では Pol ϵ ホロ酵素自体が細胞内で不安定になることも知られているので (Araki et al. 1991b)、必ずしもこのような観察結果が Dpb3p-Dpb4p 複合体の自身の機能欠損の結果であるとは断定できない。今回の研究でも予備的に解析を進めたように、Pol ϵ あるいは Dpb3p-Dpb4p 複合体の二本鎖 DNA 結合にだけ影響を与えるような *dpb3* あるいは *dpb4* 変異株を用いた詳細な遺伝学および生化学的解析を行うことが必要である。

Pol ϵ の生理機能の中にはクロマチンとの相互作用をうかがわせるものが知られている。ヒト細胞の核内での Pol ϵ と PCNA の局在が S 期後半に重なってくることから、S 期後半に複製されるヘテロクロマチン領域の複製に Pol ϵ が機能している可能性が示唆されている (Fuss and Linn 2002)。また、出芽酵母 rDNA 領域のサイレンシングを解除する変異が *DPB3* 遺伝子に生じていたことから、サイレンシングの成立や維持に関わるクロマチンの修飾や再編の過程に Pol ϵ が関与することも示唆されている (Smith et al. 1999)。最近になって、*DPB3* および *DPB4* 遺伝子の欠損株ではテロメア近傍領域のサイレンシングが解除されることも明らかになった。さらに、マウス Pol ϵ の Dpb2p がヒストン脱アセチル化酵素複合体と相互作用することが示され、Pol ϵ とクロマチンの相互作用を示唆する状況証拠が蓄積しつつある (Wada et al. 2002)。Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合は、Pol ϵ がクロマチンに対してアクセスすることを助けるのかも知れない。さらに想像を膨らませれば、HF タンパク質としての Dpb3p-Dpb4p 複合体の働きの中に、二本鎖 DNA 結合も含めたクロマチンとの結合が実際には

意味を持っているのかも知れない。この点については後のセクションでさらに詳しく考察した。今後の実験が必要であることは論を待たないが、核内局在やサイレンシングだけでなく、複製開始制御やS期チェックポイント、複製フォークの速やかな進行などにおける Pol ϵ の働きにもクロマチンとの相互作用が絡んでくることも考慮すべき点であろう。

5. HF タンパク質としての Dpb3p-Dpb4p 複合体

本研究の成果の一つは、HF モチーフを持つ Dpb3p および Dpb4p がヘテロ二量体を形成することを示した点にある。このヘテロ二量体形成が両サブユニットの HF モチーフを実際に介して行われているかについては、今後のタンパク質構造解析や体系的な変異解析が必要である。しかし、Dpb3p-Dpb4p 複合体が塩基配列非依存的な二本鎖 DNA 結合活性を有することや、Dpb4p の HF モチーフ中のアミノ酸置換が二本鎖 DNA 結合活性に影響を与えることから、この複合体の中で HF モチーフが機能している可能性は高いと思われる。

HF モチーフは 3 つの α ヘリックスが二つの短いループ DNA でつながれた構造をとる (Arents and Moudrianakis 1995; Gangloff et al. 2001; Luger et al. 1997)。HF モチーフ同士は head-to-tail 様式で結合して二量体を形成し、これに伴って生じたタンパク質表面により DNA あるいは他のタンパク質と相互作用できるようになる。HF タンパク質の全てが DNA と相互作用するわけではないが、DNA と相互作用する場合には、DNA と物理的に近い場所に位置する特定のアミノ酸残基が重要な役割を果たすことが知られている (Luger et al. 1997)。

前に述べたように、HF タンパク質の中で Dpb3p および Dpb4p に最も構造的にホモロジーが高いものは NF-Y 複合体に含まれる NF-YC および NF-YB であり、もう一つのサブユニット NF-YA とヘテロ三量体を形成した時にのみ二本鎖 DNA 結合活性が検出されている。最近、NF-YC-NF-YB 複合体の構造が X 線結晶解析によって解かれた (Romier et al. 2003)。その結果、NF-YC-NF-YB 複合体はヒストン H2A-H2B 複合体と構造的に極めて類似したヘテロ二量体構造をとることが判明した。ヒストンに関しては、DNA と結合した状態の結晶解析が以前に発表されている (Luger et al. 1997)。そこで、H2A-H2B-二本鎖 DNA 複合体の結晶解析図をもとに、Dpb3p-Dpb4p-二本鎖 DNA 複合体の構造予測を、情報科学研究科、タンパク質機能予測学講座の川端猛助教授および同講座所属大学院生の福原直志氏に実施していただいた(図 32)。Dpb3p および Dpb4p の HF モチーフ以外の領域は構造予測図から除かれている。構造予測にあたって、まずヒストン H2A および H2B と二本鎖 DNA との結合に重要なアミノ酸残基が LeeRich プログラムを用いて調べられ、その後、それらのアミノ酸残基と

Dpb3p および Dpb4p の相同部位のアミノ酸残基を比較した結果、両者に相同性が認められることが確認されている。完成した構造予測図を用いて、Dpb3p および Dpb4p の疎水アミノ酸残基を検索した結果、複合体の内側に面した部位に集中して存在していた。このことから、この構造予測図は信憑性の高いものであることが確認された。

構造予測図の中で、本研究の変異解析で用いた K57A および Q64E の位置を比較すると、K57A は DNA と近い場所にあるが、Q64E は DNA とは離れた位置にあり、むしろ二量体形成に重要な中央の α ヘリックスの中心付近に位置している(図 32B)。このことから、Dpb3p-Q64E 変異型 Dpb4p 複合体で見られた DNA 結合能の低下は、二量体形成の不安定化による二次的な効果であることが示唆される。さらに、今回の構造予測に関する解析結果から、Dpb3p および Dpb4p の一次構造上に、DNA との相互作用に関与する領域をそれぞれ三カ所ずつ見出すことができた。K57A もその内の一つであるが、他の二カ所での相互作用が完全であれば、K57A だけでは二本鎖 DNA 結合能が大きく損なわれることはないことが予想される。Dpb3p-変異型 Dpb4p(K57A)複合体の活性は、野生型複合体の二本鎖 DNA 結合活性の約 50%に低下するだけであることと良く一致する。

NF-YC-NF-YB 複合体と Dpb3p-Dpb4p 複合体の関係は、HF モチーフのホモロジーが高いだけでなく、構造予測においても今回得られた実験結果をうまく説明することから、実際の高次構造や機能においても相同性が高いことが考えられる。この点をふまえて、NF-Y 複合体の機能の観点から Pol ϵ の二本鎖 DNA 結合活性の役割やクロマチンとの相互作用の可能性について考察した。

前に述べたように、NF-YC-NF-YB 複合体はそれだけでは二本鎖 DNA への結合は検出されない。しかし、興味深いことに、NF-YC-NF-YB 複合体とヒストン H3-H4 複合体およびヌクレオソームとの結合は検出することができる (Caretti et al. 1999)(Motta et al. 1999)。このヌクレオソーム結合は CCAAT 配列に非依存的である。一方、NF-Y ヘテロ三量体もヌクレオソームに結合する点は同じであるが、NF-YA の働きで CCAAT 配列依存的になる。

NF-Y 複合体は基本転写因子である TFIID やヒストンアセチル化酵素(HAT)と相互作用して転写を活性化する (Mantovani 1999)。この作用は、HF タンパク質である NF-YC-NF-YB 複合体に NF-YA が加わることにより、NF-Y 複合体が DNA およびヌクレオソームと結合できるようになり、CCAAT 配列周辺のヌクレオソーム構造の再編や、その周辺に他のタンパク質群をリクルートすることを通じて行われる。

Mantovani らは、このような生化学的機能は H2A-H2B 型の HF タンパク質の

特性ではないかという仮説をたてた。そこで彼らは、NF-YB および NF-YC とそれぞれ非常に相同性の高い(e^{-11} と e^{-14})HF タンパク質 YBL1(NF-YB like 1) および YCL1(NF-YC like 1)をマウスから単離し、機能解析を行ったところ、この YBL1-YCL1 複合体も NF-YB-NF-YC 複合体の機能と同様の機能を持つことが判明した(Bolognese et al. 2000)。異なる点は、YBL1-YCL1 複合体はマウスの NF-YA とは相互作用せず、また極めて弱い二本鎖 DNA への結合活性が検出されたことである。さらに、YBL1 および YCL1 と四種類のコアヒストンとの結合能を解析した結果、YBL1 にはヒストン H2B および H3 に対する結合能があることが明らかになった。

YBL1 および YCL1 の機能解析と時を同じくして、これらのタンパク質がクロマチンリモデリング複合体である CHRAC 中の二つの HF タンパク質、p17 および p15 と同一であることがわかった(Bolognese et al. 2000; Fuss and Linn 2002)。さらに、興味深いことに、CHRAC の p17 はヒト Pol ϵ 中の Dpb4p と同一のものであることが判明した (Fuss and Linn 2002; Poot et al. 2000)。つまり、YBL1 は Dpb4p のマウスにおけるホモログである。CHRAC の p15 はヒト Pol ϵ 中の Dpb3p とは異なるタンパク質であるが、両者の相同性は非常に高い。以上のことから、Dpb4p はヒストン H2B および H3 と結合する可能性が高いと考えられる。また、Dpb3p-Dpb4p 複合体も YCL1-YBL1 複合体と同様にヒストンおよびヌクレオソームへの結合能が存在する可能性が考えられる(表 4)。

表 4. HF タンパク質の役割

	CBF-C-CBF-A 複合体(マウス)	CBF ホロ酵素	Dpb3p-Dpb4p 複合体	Pol ϵ ホロ酵素
二本鎖DNA結合能	×	○	△	○
ヒストンおよび ヌクレオソーム結合能	○	○	?	?
ヒストン修飾酵素との 結合能	○	○	?	○
機能	ゲノム構造の修飾		?	

それでは、Pol ϵ がヒストン、あるいはヌクレオソームと相互作用する証拠はあるのだろうか？最近、酵母の大規模なプロテオミクス解析の結果が発表された(Ho et al. 2002)。これは、ヒトまで保存された 1143 遺伝子を含む 1739 遺伝子をそれぞれ対象にして、酵母細胞内でタグをつけた状態で発現させてアフ

イニテーター精製を行い、得られたタンパク質複合体を質量分析(MALDI-TOF)したものである。ヒストン H2B をコードする HTB2 遺伝子を対象にした解析結果には、ヒストン H2B と複合体を形成するタンパク質として、Pol2p、Dpb2p、Dpb4p が含まれていた。このことから、少なくとも、ヒストン H2B と Pol ϵ は相互作用することが示された。以上のことから、Pol ϵ とヌクレオソームが相互作用する可能性は極めて高いと考えられる。同様に、この相互作用に Dpb3p-Dpb4p 複合体が機能している可能性も高いと思われる。

6. 今後の展望と課題

これまでに考察してきたように、Pol ϵ および Dpb3p-Dpb4p 複合体に見いだされた二本鎖 DNA 結合活性は、この酵素の生理学的役割を説明するには至っていない。Dpb3p および Dpb4p は広く真核生物の Pol ϵ に保存されていることから、同様の活性はヒトも含めた他の真核生物の Pol ϵ でも同じであろうと思われる。したがって、今回見いだされた二本鎖 DNA 結合活性の生理学的役割を出芽酵母の系で明らかにしていくことは極めて重要なことである (図 33)。特に、出芽酵母では遺伝学的解析が有効で強力な方法であるので、今後は Dpb3p および Dpb4p のアミノ酸置換の影響を変異株を体系的に作成して調べていく必要がある。この点からも、構造解析から得られる知見は非常に大きいと考えられる。今回の構造予測図は Dpb3p-Dpb4p 複合体の HF モチーフの予測となっており、Dpb3p および Dpb4p とも 70 アミノ酸の HF モチーフ以外に N 末端側に 20 アミノ酸程度、C 末端側に 100 アミノ酸程度の領域を持ち、その構造は不明である。特に C 末端にはグルタミン酸が 20 アミノ酸程度連なった興味深い領域も残されており、HF モチーフを含めたタンパク質全体の構造を解析することは、非常に有意義であると考えられる。

もう一つの重要な課題は、Dpb3p-Dpb4p 複合体および Pol ϵ とクロマチンとの相互作用を調べることである。今後は、ヌクレオソーム構造を再構成した DNA を用いた解析が必要となるであろう。ヒストンおよびヌクレオソームへの結合が実際に検出されるのならば、そのことと二本鎖 DNA 結合能との関係や、生理学的役割について変異株を組み合わせた解析を進めることも可能になるであろう。

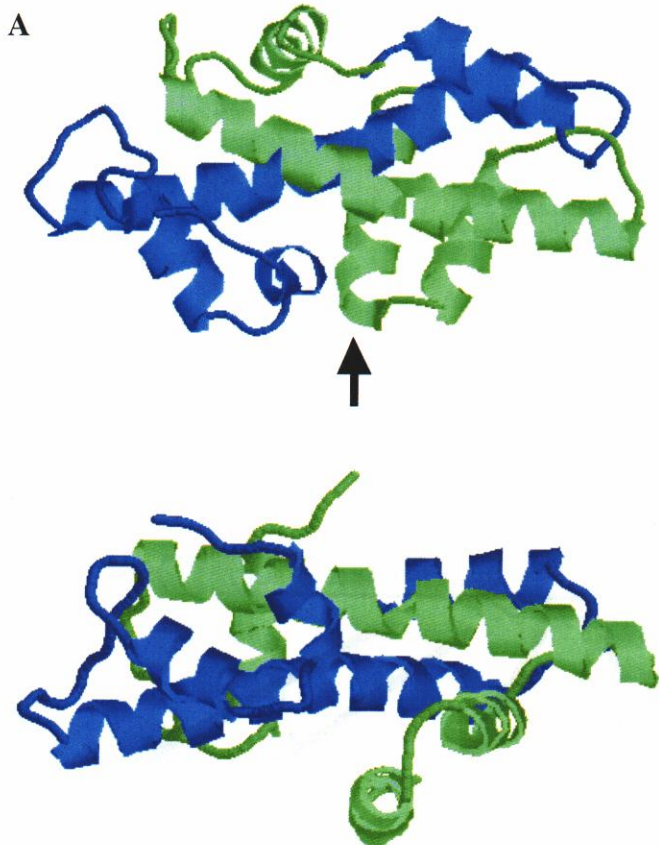
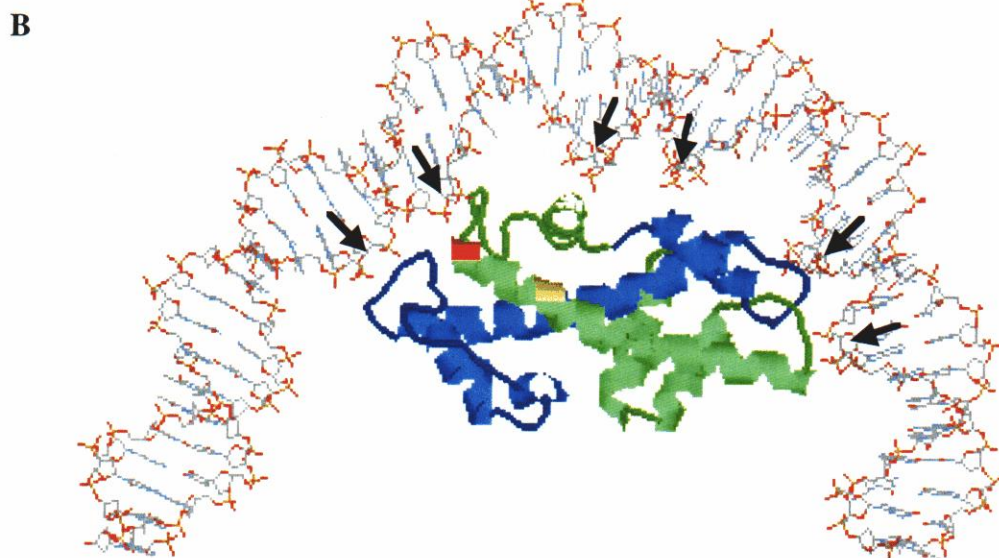


図32. Dpb3p-Dpb4p複合体の構造予測図

A: ヒストンH2A-H2B複合体の構造解析結果をもとにしたDpb3p-Dpb4p複合体の構造予測図。上図の矢印の方向から見た場合を下図に示した。青がDpb3p、緑がDpb4pである。らせん状の構造が α ヘリックス、線状の構造がDNAループである。

B: ヒストンH2A-H2B-DNA複合体の構造解析結果をもとにしたDpb3p-Dpb4p-DNA複合体の構造予測図。Dpb3p-Dpb4p複合体の周りのwireframeで示したものが二本鎖DNAである。赤はDpb4pの57番目のリジン(K57)、黄色は64番目のグルタミン(Q64)を示す。矢印はDNA結合に重要だと考えられる領域を示す。DNAは45 bpである。



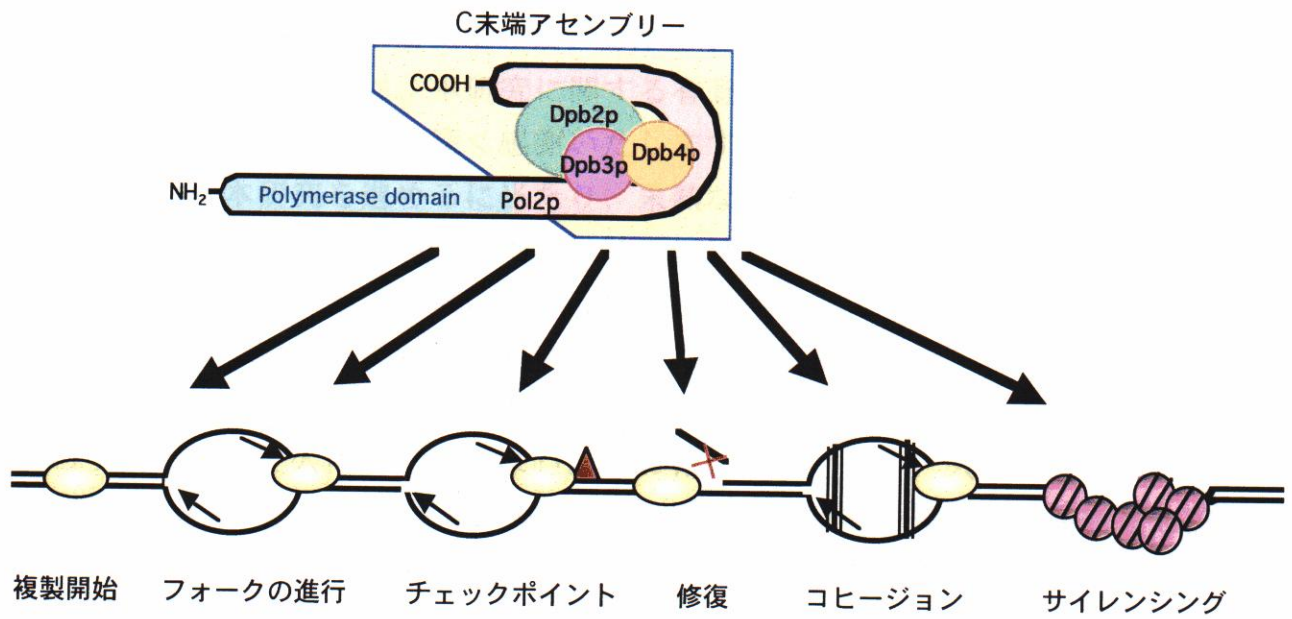


図33. Dpb3p-Dpb4p複合体の二本鎖DNA結合能の生理機能は何だろうか？

V. 謝 辞

本研究を進める上で適切なお助言を賜りました原核生物分子遺伝学講座、真木寿治教授に心より感謝申し上げます。真木寿治教授には、科学者としての物事の捉え方、考え方に対する丁寧なご指導をいただきました。さらにこれを通して、様々な環境に面した場合に、一人の人間としてどう対応すべきかということについても非常に大きな道標を示して頂いているように感じています。

また、同講座の秋山昌弘助教授、梅津桂子助手、中島淑美秘書、井田慶子氏、ならびに諸先輩方には、本研究に関する有意義な議論に加え、研究環境の整備などへのご尽力に対し、深く感謝いたします。

とりわけ本研究を進めるに当たり、未熟な私を常に暖かく見守って下さり、研究へと導いていただいた真木智子助手には心よりお礼申し上げます。真木智子助手には、特に細胞現象に対する生化学的なアプローチに関する考え方を具体的にかつ丁寧にご指導頂き、深く、深く感謝しています。

また、本研究に関する有意義な議論に加え、同じ学生の立場として公私を問わず支え合った久保田元氏には心よりお礼申し上げます。久保田元氏は本研究でも用いられた *dpb4* 変異を単離し、これに関する研究を修士論文発表後も黙々と続け、酵母染色体に導入できるプラスミドの構築を完成させました。

さらに、現在 Pol ϵ に関する研究仲間である田島理恵氏および大出功友氏、ならびに原核生物分子遺伝学講座の学生の皆様には、本研究に関する有意義な議論をいただき、深く感謝致します。

Dpb3p-Dpb4p 複合体の構造予測をして頂いた情報研究科、タンパク質機能予測学講座(郷グループ)の川端猛客員助教授および福原直志氏に、厚くお礼申し上げます。また、構造予測を行うに当たって、有意義な情報を頂きました細胞遺伝学講座の川合良和氏および松尾芳隆氏に感謝いたします。

プラスミドおよび酵母菌株を分与して下さり、有益な議論をしていただいた大阪大学の杉野明雄博士、および国立遺伝学研究所、荒木弘之博士、飯田哲士博士に、この場を借りてお礼申し上げます。

最後に、本研究を進める上で、常に私の精神的および物理的な支えになっている家族の支援に対して、心より感謝致します。

参考文献

- Aboussekhra, A., M. Biggerstaff, M. K. Shivji, J. A. Vilpo, V. Moncollin *et al.*, 1995 Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**: 859-868.
- Araki, H., R. K. Hamatake, L. H. Johnston and A. Sugino, 1991a DPB2, the gene encoding DNA polymerase II subunit B, is required for chromosome replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4601-4605.
- Araki, H., R. K. Hamatake, A. Morrison, A. L. Johnson, L. H. Johnston *et al.*, 1991b Cloning DPB3, the gene encoding the third subunit of DNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **19**: 4867-4872.
- Araki, H., S. H. Leem, A. Phongdara and A. Sugino, 1995 Dpb11, which interacts with DNA polymerase II(epsilon) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11791-11795.
- Arents, G., and E. N. Moudrianakis, 1995 The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11170-11174.
- Asahara, H., Y. Li, J. Fuss, D. S. Haines, N. Vlatkovic *et al.*, 2003 Stimulation of human DNA polymerase epsilon by MDM2. *Nucleic Acids Res* **31**: 2451-2459.
- Ausubel, F. M., 1987 *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Bell, S. P., and A. Dutta, 2002 DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374.
- Bolognese, F., C. Imbriano, G. Caretti and R. Mantovani, 2000 Cloning and characterization of the histone-fold proteins YBL1 and YCL1. *Nucleic Acids Res* **28**: 3830-3838.
- Budd, M. E., and J. L. Campbell, 1995 DNA polymerases required for repair of UV-induced damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**: 2173-2179.
- Burgers, P. M., R. A. Bambara, J. L. Campbell, L. M. Chang *et al.*, 1990 Revised nomenclature for eukaryotic DNA polymerases. *Eur J Biochem* **191**: 617-618.
- Caretti, G., M. C. Motta and R. Mantovani, 1999 NF-Y associates with H3-H4 tetramers and octamers by multiple mechanisms. *Mol Cell Biol* **19**: 8591-8603.
- Chilkova, O., B. H. Jonsson and E. Johansson, 2003 The quaternary structure of DNA polymerase epsilon from *S. cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 14082-14086.
- Corona, D. F., A. Eberharter, A. Budde, R. Deuring, S. Ferrari *et al.*, 2000 Two

- histone fold proteins, CHRAC-14 and CHRAC-16, are developmentally regulated subunits of chromatin accessibility complex (CHRAC). *Embo J* **19**: 3049-3059.
- Cox, M. M., 2001 Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu Rev Genet* **35**: 53-82.
- Dua, R., S. Edwards, D. L. Levy and J. L. Campbell, 2000 Subunit interactions within the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon (pol ϵ) complex Demonstration of a Dimeric pol. *J Biol Chem* **275**: 28816-28825.
- Dua, R., D. L. Levy and J. L. Campbell, 1998 Role of the putative zinc finger domain of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon in DNA replication and the S/M checkpoint pathway. *J Biol Chem* **273**: 30046-30055.
- Dua, R., D. L. Levy and J. L. Campbell, 1999 Analysis of the essential functions of the C-terminal protein/protein interaction domain of *Saccharomyces cerevisiae* pol epsilon and its unexpected ability to support growth in the absence of the DNA polymerase domain. *J Biol Chem* **274**: 22283-22288.
- Dua, R., D. L. Levy, C. M. Li, P. M. Snow and J. L. Campbell, 2002 In vivo reconstitution of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon in insect cells. Purification and characterization. *J Biol Chem* **277**: 7889-7896.
- Edwards, S., C. M. Li, D. L. Levy, J. Brown, P. M. Snow *et al.*, 2003 *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon and polymerase sigma interact physically and functionally, suggesting a role for polymerase epsilon in sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol* **23**: 2733-2748.
- Ehrenhofer-Murray, A. E., R. T. Kamakaka and J. Rine, 1999 A role for the replication proteins PCNA, RF-C, polymerase epsilon and cdc45 in transcriptional silencing in *saccharomyces cerevisiae* [In Process Citation]. *Genetics* **153**: 1171-1182.
- Eissenberg, J. C., R. Ayyagari, X. V. Gomes and P. M. Burgers, 1997 Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase delta and DNA polymerase epsilon. *Mol Cell Biol* **17**: 6367-6378
- Elledge, S. J. 1996 Cell cycle checkpoint : preventing an identity crisis, 1664-1672
- Frick, D. N., and C. C. Richardson, 2001 DNA primases. *Annu Rev Biochem* **70**: 39-80
- Friedberg, E. C., G. C. Graham and W. Siede, 1995 DNA repair and mutagenesis. 135-357.

- Fuss, J., and S. Linn, 2002 Human DNA polymerase epsilon colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase. *J Biol Chem* **277**: 8658-8666.
- Gangloff, Y. G., C. Romier, S. Thuault, S. Werten and I. Davidson, 2001 The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem Sci* **26**: 250-257.
- George, J. W., B. A. Stohr, D. J. Tomoso and K. N. Kreuzer, 2001 The tight linkage between DNA replication and double-strand break repair in bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8290-8297
- Hamatake, R. K., H. Hasegawa, A. B. Clark, K. Bebenek, T. A. Kunkel *et al.*, 1990 Purification and characterization of DNA polymerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the catalytic core and a possible holoenzyme form of the enzyme. *J Biol Chem* **265**: 4072-4083.
- Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore *et al.*, 2002 Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180-183.
- Holmes, A. M., and J. E. Haber, 1999 Double-strand break repair in yeast requires both leading and lagging strand DNA polymerases. *Cell* **96**: 415-424.
- Hubscher, U., G. Maga and S. Spadari, 2002 Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**: 133-163.
- Jessberger, R., G. Chui, S. Linn and B. Kemper, 1996 Analysis of the mammalian recombination protein complex RC-1. *Mutat Res* **350**: 217-227.
- Jessberger, R., V. Podust, U. Hubscher and P. Berg, 1993 A mammalian protein complex that repairs double-strand breaks and deletions by recombination. *J Biol Chem* **268**: 15070-15079.
- Jokela, M., M. Makiniemi, S. Lehtonen, C. Szpirer, U. Hellman *et al.*, 1998 The small subunits of human and mouse DNA polymerase epsilon are homologous to the second largest subunit of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon. *Nucleic Acids Res* **26**: 730-734.
- Kamimura, Y., H. Masumoto, A. Sugino and H. Araki, 1998 Sld2, which interacts with Dpb11 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for chromosomal DNA replication. *Mol Cell Biol* **18**: 6102-6109.
- Karthikeyan, R., E. J. Vonarx, A. F. Straffon, M. Simon, G. Faye *et al.*, 2000 Evidence from mutational specificity studies that yeast DNA polymerases delta and epsilon replicate different DNA strands at an intracellular replication fork. *J*

- Mol Biol **299**: 405-419.
- Katou, Y., Y. Kanoh, M. Bando, H. Noguchi, H. Tanaka *et al.*, 2003 S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. Nature **424**: 1078-1083.
- Kesti, T., K. Flick, S. Keranen, J. E. Syvaoja and C. Wittenberg, 1999 DNA polymerase epsilon catalytic domains are dispensable for DNA replication, DNA repair, and cell viability. Mol Cell **3**: 679-685.
- Kesti, T., H. Frantti and J. E. Syvaoja, 1993 Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of human DNA polymerase epsilon. J Biol Chem **268**: 10238-10245.
- Lee, S. H., Z. Q. Pan, A. D. Kwong, P. M. Burgers and J. Hurwitz, 1991 Synthesis of DNA by DNA polymerase epsilon in vitro. J Biol Chem **266**: 22707-22717.
- Li, Y., H. Asahara, V. S. Patel, S. Zhou and S. Linn, 1997 Purification, cDNA cloning, and gene mapping of the small subunit of human DNA polymerase epsilon. J Biol Chem **272**: 32337-32344.
- Li, Y., Z. F. Pursell and S. Linn, 2000 Identification and cloning of two histone fold motif-containing subunits of HeLa DNA polymerase epsilon. J Biol Chem **275**: 23247-23252.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond, 1997 Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. Nature **389**: 251-260.
- Maki, H., 2002 Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. Annu Rev Genet **36**: 279-303.
- Maki, S., K. Hashimoto, T. Ohara and A. Sugino, 1998 DNA polymerase II (epsilon) of *Saccharomyces cerevisiae* dissociates from the DNA template by sensing single-stranded DNA. J Biol Chem **273**: 21332-21341.
- Mantovani, R., 1999 The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. Gene **239**: 15-27.
- Masumoto, H., A. Sugino and H. Araki, 2000 Dpb11 controls the association between DNA polymerases alpha and epsilon and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. Mol Cell Biol **20**: 2809-2817.
- Mimura, S., T. Masuda, T. Matsui and H. Takisawa, 2000 Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. Genes Cells **5**: 439-452.

- Morrison, A., J. B. Bell, T. A. Kunkel and A. Sugino, 1991 Eukaryotic DNA polymerase amino acid sequence required for 3'----5' exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9473-9477.
- Morrison, A., and A. Sugino, 1994 The 3'-->5' exonucleases of both DNA polymerases delta and epsilon participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **242**: 289-296.
- Navas, T. A., Y. Sanchez and S. J. Elledge, 1996 RAD9 and DNA polymerase epsilon form parallel sensory branches for transducing the DNA damage checkpoint signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 2632-2643.
- Navas, T. A., Z. Zhou and S. J. Elledge, 1995 DNA polymerase epsilon links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell* **80**: 29-39.
- Ohya, T., Y. Kawasaki, S. Hiraga, S. Kanbara, K. Nakajo *et al.*, 2002 The DNA polymerase domain of pol(epsilon) is required for rapid, efficient, and highly accurate chromosomal DNA replication, telomere length maintenance, and normal cell senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 28099-28108.
- Ohya, T., S. Maki, Y. Kawasaki and A. Sugino, 2000 Structure and function of the fourth subunit (Dpb4p) of DNA polymerase epsilon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **28**: 3846-3852.
- Poot, R. A., G. Dellaire, B. B. Hulsmann, M. A. Grimaldi, D. F. Corona *et al.*, 2000 HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *Embo J* **19**: 3377-3387.
- Randell, J. C., and D. M. Coen, 2001 Linear diffusion on DNA despite high-affinity binding by a DNA polymerase processivity factor. *Mol Cell* **8**: 911-920.
- Romier, C., F. Cocchiarella, R. Mantovani and D. Moras, 2003 The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J Biol Chem* **278**: 1336-1345.
- Shivji, M. K., V. N. Podust, U. Hubscher and R. D. Wood, 1995 Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* **34**: 5011-5017.
- Smith, J. S., E. Caputo and J. D. Boeke, 1999 A genetic screen for ribosomal DNA silencing defects identifies multiple DNA replication and chromatin-modulating factors. *Mol Cell Biol* **19**: 3184-3197.
- Sugino, A., 1995 Yeast DNA polymerases and their role at the replication fork. *Trends Biochem Sci* **20**: 319-323.

- Takayama, Y., Y. Kamimura, M. Okawa, S. Muramatsu, A. Sugino *et al.*, 2003 GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes Dev* **17**: 1153-1165.
- Tan, C. K., C. Castillo, A. G. So and K. M. Downey, 1986 An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem* **261**: 12310-12316.
- Tercero, J. A., M. P. Longhese and J. F. Diffley, 2003 A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* **11**: 1323-1336
- Vlatkovic, N., S. Guerrero, Y. Li, S. Linn, D. S. Haines *et al.*, 2000 MDM2 interacts with the C-terminus of the catalytic subunit of DNA polymerase epsilon. *Nucleic Acids Res* **28**: 3581-3586.
- Wada, M., H. Miyazawa, R. S. Wang, T. Mizuno, A. Sato *et al.*, 2002 The second largest subunit of mouse DNA polymerase epsilon, DPE2, interacts with SAP18 and recruits the Sin3 co-repressor protein to DNA. *J Biochem (Tokyo)* **131**: 307-311.
- Waga, S., T. Masuda, H. Takisawa and A. Sugino, 2001 DNA polymerase varepsilon is required for coordinated and efficient chromosomal DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4978-4983.
- Wang, Z., X. Wu and E. C. Friedberg, 1993 DNA repair synthesis during base excision repair in vitro is catalyzed by DNA polymerase epsilon and is influenced by DNA polymerases alpha and delta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 1051-1058.
- Weinert, T., and L. Hartwell, 1989 Control of G2 delay by the rad genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci Suppl* **12**: 145-148.
- Winzor, D. J., J. P. Loke and L. W. Nichol, 1968 Consideration of kinetic data on alpha-chymotrypsin in terms of oligomer activities. *Biochem J* **108**: 159-160.