

論文内容の要旨

申請者氏名 池田 美央

申請者は、DNA 損傷が DNA 複製に与える影響とその際に働く修復・複製再開機構の関わりの研究の一環として、損傷乗り越え DNA 合成(以下 TLS)を介した複製再開の実証とその分子機構の解明を目指してきた。複製型の DNA ポリメラーゼは基本的に損傷を受けた DNA を複製できないため、特にリーディング鎖上に存在する DNA 損傷に遭遇すると複製を停止してしまうと考えられる。TLS とは、TLS 型と呼ばれる DNA ポリメラーゼが停止した複製型と一時的に入れ替わり損傷部の複製を行うと言う機構であるため、上述のように損傷により複製が停止した際に働く複製再開機構の一つではないかと考えられてきた。しかし、これまで行われてきた生菌数や変異頻度を指標とした解析では TLS が複製再開に働くことを直接的には示せておらず、また、複製後修復と言った機構も存在することから、TLS の複製再開への寄与は疑問視されていた。そこで本論文では、TLS が複製再開に働くのか否かを直接的に検証し、再開可能であるならばその分子機構の一端を明らかにすることを目的として、大腸菌の染色体複製機構を再構成できる *oriC* プラスミド *in vitro* DNA 複製反応を用いた解析を行った。

TLS 型 DNA ポリメラーゼとして、大腸菌の DNA ポリメラーゼ IV(以下 Pol IV)を採用し、鋳型として、*oriC* プラスミドの反時計回りの複製フォークのリーディング鎖上に単一の損傷としてベンツピレンによる(-)-*trans-anti-benzo[a]pyrene-N²-dG* 損傷を組み込んだものを用いた。そして、損傷により複製が停止したところに Pol IV を添加することで、複製が正常に再開するかを検証した。

まず、リーディング鎖伸長反応について解析を行ったところ、恐らく損傷に遭遇した全ての鋳型において DNA 合成が一度停止し、そして、Pol IV の添加により伸長を再開したと考えられる結果が得られた。次に、複製フォークの進行そのものが損傷により停止しているのかを調べるため、複製産物を二次元ゲル電気泳動により解析したところ、全ての鋳型についてではないものの、損傷近傍で進行を停止した複製フォークが一定の割合で存在することが示された。そして、これらについては、Pol IV の添加により進行が再開・完了すると考えられる結果が得られた。更に、Pol IV の添加により複製フォークの進行が再開した際、ラギング鎖伸長反応も正常に再開するのかを、サザンブロッティングにより損傷前後の *Okazaki fragment* の合成を検出してそのサイズを指標に解析した。その結果、長くても損傷から 500 bp までの間にラギング鎖合成も正常に回復していることが強く示唆された。加えて、TLS による複製再開後の DNA 合成の大部分は複製型である DNA ポリメラーゼ III が担っており、両鎖が協調した正常な DNA 複製が行われていること、および、二度のポリメラーゼ交換反応を介した TLS による複製再開は、かなり迅速な反応であることが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 池田 美央

本論文は、鋳型 DNA 上の DNA 損傷により進行が停止した複製フォークを、損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ (TLS Pol) が複製型 DNA ポリメラーゼである Pol III と協調的に作用して進行の再開を行うことを明らかにし、その分子機構を生化学的に解析したものである。

DNA 損傷が修復されずに DNA 複製が進行した場合、大部分の DNA 損傷は複製型の DNA ポリメラーゼによる DNA 鎖伸長反応をブロックするために、複製フォークの進行が強く阻害される。細胞の DNA 損傷応答により、複製フォークの進行阻害が様々な反応経路で回復されるが、その一つとして TLS Pol による損傷乗り越え DNA 合成が知られている。しかしながら、複製フォークの進行阻害に TLS Pol が直接関与することを示す証拠はなく、他の複数の経路が存在する *in vivo* での解析には限界があった。

申請者は、複製フォークの挙動を生化学的に解析できる唯一の再構成系である大腸菌の *oriC* プラスミド DNA 複製系を用いて、大腸菌の TLS Pol である Pol IV が特異的に乗り越えることができるベンツピレンの DNA 付加体による複製フォーク進行阻害を試験管内で再現し、それを Pol IV が解消することを示すことに成功している。詳細な生化学的解析から、Pol IV は Pol III と入れ替わり、損傷をバイパスする DNA 合成の後に、再度 Pol III が Pol IV と入れ替わって、損傷により停止していた複製装置がそのまま複製フォークの進行を再開することを明らかにした。複製フォークの進行速度を反映する岡崎フラグメントの長さを複製フォーク進行が阻害された時と回復される過程とで比較することにより、TLS Pol による複製フォークの回復過程は短時間に起きることも示すことができた。これらの結果は、TLS Pol が複製フォークの進行阻害の回復を極めてスムーズに起こしうることを世界で初めて示したものであり、DNA 損傷応答に依存しない通常の細胞内濃度で Pol IV が DNA 損傷に対処していることを強く示唆する。

以上のように、本論文は TLS Pol の DNA 複製における働きを初めて生化学的に実証し、それを基盤として、複製フォークの進行阻害の回復過程の詳細を解明したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。