

(別紙1)

論文内容の要旨

申請者氏名 山本 崇史

細胞が持つ複数の DNA ポリメラーゼは、DNA 複製や DNA 修復、DNA 損傷応答の様々な局面で機能するように、それぞれ異なる生化学的機能を持つ。大腸菌 DNA Pol III のサブユニットとして最初に見出された movable DNA clamp (原核生物では β -clamp、真核生物では PCNA) は、複製のみならず修復や損傷乗り越え DNA 複製において、様々な DNA ポリメラーゼと相互作用して重要な役割を果たしている。しかし、原核生物においては、岡崎断片のプロセッシングと DNA 修復に関与する DNA Pol I の働きには β -clamp を必要としないと考えられており、原核生物と真核生物の DNA ポリメラーゼとの大きな違いと認識されてきた。今回、大腸菌細胞内で校正機能を欠損した変異型 Pol I を過剰発現した場合に染色体 DNA 複製の複製エラーが高頻度で発生することを見出したことを契機に、Pol I も β -clamp と相互作用する可能性を検討した。その結果、Pol I のアミノ酸配列中の ⁵⁸⁷QTILF⁵⁹¹ を介して Pol I が β -clamp と相互作用することが判明した。この配列は原核生物の Pol I に高度に保存されていることから、何らかの生理的役割を果たしていることが予想された。そこで、自然突然変異に影響を与える人為的な過剰発現ではなく、通常発現レベルでの Pol I と β -clamp との相互作用の生理的意義について調べることにした。

染色体上の *polA* の ⁵⁹⁰LF⁵⁹¹→AA 置換型変異株を作成して、DNA 複製での岡崎断片のプロセッシングと DNA 修復への影響に関する解析を進めた。まず、LF→AA 変異導入により Pol I のポリメラーゼ活性が失活していないかどうかを確認するため、精製した変異型 Pol I のポリメラーゼ活性を測定したところ、野生型 Pol I と同程度の比活性が見られた。このことから、LF→AA 変異型 Pol I は β -clamp との相互作用だけを失っていることが示唆された。LF→AA 置換型変異株の培養では、*polA1* 株と同程度に細胞増殖速度が低下することがわかり、*polA1* 株は岡崎断片の蓄積が報告されていることから (Okazaki *et al.*, 1971)、岡崎断片のプロセッシングの遅延が、細胞増殖速度の低下につながることを示唆された。このことは、岡崎断片のプロセッシングに Pol I が働く際には β -clamp との相互作用が重要な役割を果たしている可能性を示唆する。また、ColE1 型プラスミドの形質転換実験の結果より、ColE1 型プラスミドの複製開始に必要な Pol I による DNA 鎖伸張には β -clamp との相互作用は必要ではないことが明らかになった。さらに、紫外線や H₂O₂ の感受性試験の結果から、ヌクレオチド除去修復と塩基除去修復の両方に Pol I と β -clamp の結合が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 山本 崇史

原核生物、真核生物を問わず、細胞は複数の DNA ポリメラーゼを有することにより、DNA 複製や DNA の維持の様々なプロセスで多様なやり方での DNA 合成を可能にしている。原核生物の β -clamp と、それと同様の働きをする真核生物の PCNA は、複数種の DNA ポリメラーゼの DNA 合成の様態を多様化する上で重要である。これまで、真核生物では Pol δ と FEN1 が PCNA との相互作用を介して岡崎断片のプロセッシングが進行するのに対して、原核生物では、Pol I が単独で行うとされてきた。また、ヌクレオチド除去修復と塩基除去修復の修復 DNA 合成でも、真核生物では Pol δ や Pol ϵ とともに PCNA が関与するが、原核生物では Pol I が単独で行い、 β -clamp は関与しないと考えられてきた。本研究は、DNA Pol I が自然突然変異の発生にどの程度の関与を持つかを明らかにするために行った分子遺伝学的研究の結果から、Pol I が β -clamp と相互作用する能力を有している可能性を着想し、その検証を行うとともに、Pol I と β -clamp との相互作用の生理学的意義を解析したものであり、以下の研究成果を得ている。1) Pol I と β -clamp の物理的相互作用を発見し、Pol I のアミノ酸配列中に β -clamp との相互作用に関与する配列を同定した。2) Pol I は濃度依存的に、 β -clamp を介した Pol III とのポリメラーゼスイッチを起こして、染色体 DNA 複製全般に参加することが示唆された。3) Pol I と β -clamp の相互作用が阻害されると、細胞の増殖遅延を起こすことから、岡崎フラグメントのプロセッシングに Pol I と β -clamp の相互作用が関与することが示唆された。4) ColE1 型プラスミド複製開始での Pol I の働きには β -clamp との相互作用は不必要であることが示された。5) ヌクレオチド除去修復および塩基除去修復の修復 DNA 合成において Pol I と β -clamp の相互作用が重要な役割を果たすことが示唆された。これらの研究成果より、原核生物での岡崎断片のプロセッシングおよびヌクレオチド除去修復と塩基除去修復の修復合成には Pol I と β -clamp の結合が重要な役割を果たしていることが示され、DNA ポリメラーゼの特異性は異なっても、これらの生理機能には、原核生物と真核生物の両方に共通の仕組みとして、DNA ポリメラーゼと β -clamp/PCNA の相互作用が不可欠であることが示唆された。

以上のように、本論文は原核生物での岡崎断片のプロセッシングやヌクレオチド除去修復・塩基除去修復に関する定説を大きく変更させる発見に成功し、新たな研究領域を開拓したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。