

# 論文内容の要旨

申請者氏名 Le Thi Thanh

大腸菌の染色体 DNA 複製に關与する DNA ポリメラーゼ III (Pol III) は連続的な DNA 鎖伸長を早い速度で行い、その DNA 合成の忠実度は極めて高い。しかし、鑄型 DNA 上に DNA 損傷が存在する場合には、Pol III は損傷部位で DNA 鎖伸長を停止してしまう。損傷による DNA 鎖伸長の停止を回復する細胞機能の一つとして損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) が知られている。この過程では、特殊な TLS 型 DNA ポリメラーゼが損傷部位で停止した複製型 DNA ポリメラーゼと置き換わり、損傷部位に対して DNA 鎖伸長を行い、さらに、もう一度 TLS 型 DNA ポリメラーゼが複製型 DNA ポリメラーゼと置き換わることで、正常な DNA 鎖伸長反応が再開する (ポリメラーゼスイッチ)。大腸菌では 3 種類の TLS 型 DNA ポリメラーゼが報告されている。その内、DNA ポリメラーゼ IV (Pol IV) は、そのホモログが原核生物のみならず真核生物にも広く保存されていることから、TLS 型 DNA ポリメラーゼのプロトタイプと考えられている。申請者が所属する研究室では、Pol IV の生化学的および細胞生物学的な解析から、Pol IV が DNA 上の  $\beta$  クランプと結合した Pol III を  $\beta$  クランプから解離させる能力を有していることや、細胞内で DNA 複製フォークの進行速度を制御していることなどを明らかにしてきた。これらのことから、必ずしも DNA 損傷部位でのみポリメラーゼスイッチが起きるのではなく、無傷の DNA 上でもポリメラーゼスイッチが起きると考えられてきたが、ポリメラーゼスイッチの分子機構には不明な点が多い。

本研究では、Pol III と Pol IV の間でのポリメラーゼスイッチの分子機構に対する理解をさらに深めるために、試験管内 DNA 合成系を用いて詳細な生化学的解析を行った。まず、ポリメラーゼスイッチが生じる現象に鑄型 DNA 上の特定の構造が關与する可能性を考え、短い逆向き反復配列を含む一本鎖 DNA を鑄型にした Pol III による DNA 鎖伸長反応に及ぼす Pol IV の影響を解析した。その結果、逆向き反復配列により生じるヘアピン構造が Pol III の DNA 鎖伸長を阻害する時に Pol IV とのポリメラーゼスイッチが生じることが見出された。ヘアピン構造の代わりに、鑄型 DNA 上に部分的な二本鎖構造を導入した場合にも Pol IV が Pol III と高い効率で置き換わることも判明した。さらに、鑄型 DNA との親和性が強くなった変異型 Pol III を用いた場合、ヘアピン構造での Pol IV とのポリメラーゼスイッチが顕著に低下することが分かった。この変異型 Pol III は DNA 鎖伸長モードと校正機構モードの変換が起こらず、常に DNA 鎖伸長モードの状態であることから、正常な Pol III が鑄型 DNA 上の特異的な構造や DNA 損傷により DNA 鎖伸長モードから校正機構モードに変換する過程を介してポリメラーゼスイッチを引き起こすことが示唆された。また、二本鎖 DNA 上に複製フォークを再構成した実験系を用い、Pol IV とのポリメラーゼスイッチ後における Pol III の挙動を解析した。その結果、複製フォークから Pol III は排除されることが明らかになり、Pol IV がどのようにして複製フォーク速度を制御しているかについてのモデルを提唱した。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Le Thi Thanh

本論文は、遺伝情報の安定な維持および変異誘発の両方に関わる損傷乗り越え DNA 合成 (translesion DNA synthesis, TLS) の長年未解明であった複製型 DNA ポリメラーゼと TLS 型 DNA ポリメラーゼの間でのポリメラーゼスイッチの分子機構について、大腸菌の DNA ポリメラーゼ Pol III と Pol IV を用いた詳細な生化学的解析を行ったものである。申請者が所属している研究室でのこれまでの研究から、Pol III と Pol IV の間でのポリメラーゼスイッチは DNA 上の  $\beta$  クランプを介して Pol IV の積極的な作用により Pol III と  $\beta$  クランプの結合が解離することが示されていた。しかし、どのようにして Pol IV がそのような作用を及ぼすのかは不明であった。本研究により、鋳型 DNA 上での Pol III の挙動がポリメラーゼスイッチを引き起こす鍵となっていることが初めて明らかになった。申請者は、一本鎖の鋳型 DNA 中に短い逆向き反復配列を導入すると、極めて高い効率で Pol IV による Pol III とのポリメラーゼスイッチが誘導されることを見出した。反応系に SSB が存在する場合としない場合とで、Pol III による DNA 鎖伸長反応が短い逆向き反復配列中でどのように進行するのかを詳細に解析した。その結果、逆向き反復配列が作るヘアピン DNA 構造が Pol III の DNA 鎖伸長反応を阻害して、Pol III の DNA 上での挙動を通常モードから strand displacement モードに変換させることを明らかにした。さらに、DNA 合成中の DNA 鎖伸長と校正機構の変換が起こらなくなった変異型 Pol III を用いた実験結果より、Pol III が校正機構を働かせる時の  $\beta$  クランプとの相互作用の状態が Pol IV によるポリメラーゼスイッチを誘導するモデルを提唱した。DNA 鎖伸長反応の解析とは別に、*in vitro oriC* プラスミド DNA 複製系での複製フォーク中の Pol III の挙動を解析する実験系を新たに開発し、ポリメラーゼスイッチの後で Pol III が複製フォークから解離することも初めて明らかにした。

以上のように、本論文は TLS におけるポリメラーゼスイッチの開始過程を詳細に解析したものであり、TLS を理解する上で極めて重要な発見を含むものである。原核生物と真核生物の両方で、校正機構を有する複製型 DNA ポリメラーゼが DNA クランプタンパク質を介して TLS 型 DNA ポリメラーゼとスイッチを起こすことが TLS の第一段階と考えられている。本研究によって、鋳型 DNA の高次構造や DNA 損傷により複製型 DNA ポリメラーゼとクランプタンパク質の相互作用が変換する過程が TLS の開始を誘導する可能性が初めて示された。また、DNA 損傷応答の一環として、Pol IV が複製フォークの進行速度を制御する分子機構の理解にも新たな知見をもたらし、TLS 型 DNA ポリメラーゼが TLS 以外にも DNA 複製や細胞増殖の制御に関わる仕組みの理解をさらに深めるなど、本研究の成果は遺伝学および細胞生物学の基本的な概念の深化などの学術上、応用上の点で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。