

京都大学	博士（	医	学）	氏 名	成田 岳雄
論文題目	Human replicative DNA polymerase δ can bypass T-T (6-4) ultraviolet photoproducts on template strands (ヒト複製ポリメラーゼ δ は 6-4 型光産物の損傷乗越えをする)				
(論文内容の要旨)					
1. 序文					
真核生物で正確な複製を担う DNA ポリメラーゼ δ は、他の誤りがちな DNA ポリメラーゼと異なる 2 つの構造上の特徴を備えている。1 つ目の特徴は狭い触媒ドメインであり、鋳型 DNA に歪みを生じさせる損傷があったり、ワトソン-クリック塩基対以外の DNA 鎖が形成されたりすると、以後の DNA 合成が阻害される。2 つ目は触媒ドメインに隣接したエクソヌクレアーゼドメインであり、これにより誤った塩基対は取り除かれる。この特徴のために、DNA ポリメラーゼ δ は損傷のある DNA、例えば紫外線により生じるシクロブチルピリミジンダイマー (CPD) や 6-4 型光産物 (6-4 PP) を鋳型として複製を行うことはできないと考えられてきた。 しかし、DNA ポリメラーゼ δ を形成するサブユニットの 1 つ p66 を破壊したトリ B リンパ球由来 DT40 細胞株では野生型と比べ、紫外線を始め種々の DNA 変異原暴露により生存率の低下が認められ、野生型 DNA ポリメラーゼ δ が、損傷部位を乗り越えている可能性が示唆された。また近年、生化学的解析により、DNA ポリメラーゼ δ は無塩基部位および CPD 部位において、損傷を乗り越えて DNA 合成を行うことが報告された。無塩基部位や CPD 部位では DNA 鎖の歪みは小さいのに対し、6-4 PP は DNA 骨格に大きな歪みを生じさせ、複製を行う上でより大きな障害となる。事実、今まで単一の DNA ポリメラーゼが 6-4PP を乗り越えて DNA 合成を行ったという報告はなかった。歪みの大きな DNA 損傷部位における DNA ポリメラーゼ δ の酵素学的特性を検証するために、6-4PP を用いて生化学的な解析を行った。					
2. 結果					
(1) DNA ポリメラーゼ δ は 6-4PP 部位を乗り越える					
ヒト DNA ポリメラーゼ δ を昆虫細胞 High Five で発現させて精製し、生化学的に損傷塩基に対する複製能を調べた。DNA ポリメラーゼ δ は CPD のみならず 6-4PP を有した鋳型に対しても DNA 合成反応を行うことが確認できた。					
(2) 6-4PP 部位における DNA 合成産物の変異スペクトラムの解析					
6-4PP 部位における変異スペクトラムを調べるため伸長産物を濃縮し、配列解析を行った。CPD に対する乗り越え産物は 58% が A から T への変異を含んでいるのに対し、6-4PP では 80% が 3 ヌクレオチドの欠失を伴っており、DNA ポリメラーゼ δ はスリッページによって歪みの大きな DNA 損傷部位を乗り越えていることがわかった。					
(3) DNA ポリメラーゼ δ によるスリッページ機構の解明					
スリッページを行うためには鋳型鎖又は新生鎖をループアウトさせた状態で複製を行う必要がある。様々な配列の鋳型を用いて解析した結果、DNA ポリメラーゼ δ は 6-4PP 部位で A を挿入し、損傷塩基より 5' 側にある T と塩基対を形成させることで鋳型鎖をループアウトしスリッページを行うこと、ループアウトできる					

のは 3 ヌクレオチド以内であることがわかった。
3. 結論と考察
複製を担い、正確な塩基対形成を要求する DNA ポリメラーゼ δ は、DNA 損傷部位を乗り越えることができ、鋳型上の損傷の種類によって異なった乗り越え機構を用いることがわかった。歪みの小さな CPD では誤りを許容した DNA 合成を行うのに対し、歪みの大きな 6-4PP の場合には損傷部位を最大 3 ヌクレオチドループアウトすることで損傷部位をバイパスする。合成された新生鎖は欠失を伴っており、変異となる。本研究では複製ポリメラーゼ δ の新たな酵素学的特性を示したが、細胞内で同様の現象が見られるのかはさらなる解析が必要である。
(論文審査の結果の要旨)
真核生物で複製を担う DNA ポリメラーゼ δ は、正確性が高く、損傷のある DNA を鋳型に複製を行うことはできないと考えられてきた。本論文においては、UV によって生じる歪みの大きな DNA 損傷部位での DNA ポリメラーゼ δ の酵素学的特性を検証するために、6-4PP を用いて生化学的な解析を行った。 <i>in vitro</i> において DNA ポリメラーゼ δ は CPD のみならず、6-4PP を有した鋳型に対しても DNA 合成を行いうることが示された。DNA 合成産物の変異スペクトラムの解析により CPD に対する合成産物は A から T への変異を生じるのに対し、6-4PP では 3 ヌクレオチドの欠失を伴っており、DNA ポリメラーゼ δ はスキッピングによって歪みの大きな 6-4PP 損傷部位を乗り越えていることがわかった。スキッピングを行うためには鋳型鎖をループアウトさせた状態で複製を行う必要がある。様々な配列の鋳型を用い、DNA ポリメラーゼ δ が 6-4PP 部位で A を挿入し、損傷塩基より 5' 側にある T と塩基対を形成させることで鋳型鎖をループアウトし DNA 損傷部位をバイパスしていること、ループアウトされる DNA は 3 塩基までであることを示した。 本論文により、複製ポリメラーゼ δ が欠失を伴いながら、DNA 損傷部位を乗り越える機構が明らかとなった。
以上の研究は複製 DNA ポリメラーゼ δ の、鋳型スキッピングによる損傷乗り越え機構の解明に貢献し、欠失を伴う遺伝子変異の発現機構の理解に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 2 月 26 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日：平成 年 月 日以降