

論文の内容の要旨

論文題目

第2サブユニット DPE2 を介したマウス DNA polymerase ϵ と Sin3 複合体との相互作用に関する研究

氏名 和田 賢人

真核細胞の核内では、DNA はヒストン 8 量体に巻き付いたヌクレオソーム構造をとり、さらに高次に凝縮し染色体を形成している。複製、修復、転写、組換えといった DNA を介した生命現象は、高次に凝縮した構造の変換を必要とする。DNA 複製は遺伝情報の維持という観点から基本的で重要な現象であり、私は、その DNA 複製を直接担う DNA ポリメラーゼに着目し研究を行った。

真核細胞において DNA 複製を担う DNA ポリメラーゼ α 、 δ 、および ϵ (Pol α 、 δ 、 ϵ) は、いずれも大腸菌 polB に相同な構造を持ち、B タイプ DNA ポリメラーゼと呼ばれるグループに属する。いずれも複数のサブユニットから構成されている。一番大きなサブユニットにポリメラーゼ活性が存在し、Pol δ および Pol ϵ の場合には更に 3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を有している。また、第二サブユニットに関しても B タイプ DNA ポリメラーゼ間で 12 の保存領域が存在しており、重要な機能があることが推測されるが、第二サブユニットの機能の解析は未だに十分にはなされていないのが現状である。

DNA 複製を担う 3 つの DNA ポリメラーゼの中で、Pol ϵ は複製のほかに DNA

修復や細胞周期のチェックポイント機構にも関与しているが、その分子レベルでの解析が不十分で明らかにすべき点が多い。そこで私は Pol ϵ の未知の部分も含めた機能を解析するために、マウス Pol ϵ の第二サブユニット DPE2 と相互作用する因子の検索を行った。DPE2 を bait にした酵母 two-hybrid 法による 2 回の検索の結果、288 個の陽性クローンが得られ、その 2 回のいずれにもヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)複合体中の Sin3 複合体を構成する SAP18 が陽性クローンとして得られ、SAP18 を解析の対象に選択した。

次に、DPE2 と SAP18 の相互作用を確認するために共沈実験を行った。T7 と 6xHis タグを融合した DPE2 と HA タグを融合させた SAP18 を COS7 細胞中で発現させて、6xHis タグに対する affinity resin を用いた共沈実験を行ったところ、確かに DPE2 と SAP18 が相互作用する結果が得られた。

また、DPE2 の部分欠損タンパク質を用いた同様の共沈実験より、DPE2 と SAP18 との結合に関与する領域が、12 箇所ある第二サブユニットの保存領域のうち 1 番から 3 番を含む領域であることを明らかにした。

HDAC はヒストンの脱アセチル化を行うことにより、クロマチン構造を凝縮させる。SAP18 は Sin3-HDAC 複合体の構成因子であることから、DPE2 すなわち Pol ϵ が Sin3-HDAC 複合体を DNA 上に呼び込み、DNA 複製時に呼び込まれた HDAC がクロマチンの構造を変換すると考えられる。

そこで、DPE2 が *in vivo* で、HDAC 活性を DNA 上に呼び込む機能があるかどうかを確かめるためにレポーターアッセイを行った。チミジンキナーゼ(TK)のプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、さらに TK プロモーターの上流に GAL4 サイトを 5 つタンデムに挿入したレポータープラスミドを作製した。また、この GAL4 サイトを認識し結合できる GAL4 結合ドメインと DPE2 との融合タンパク(dbdDPE2)を発現するプラスミドを作製し、マウス NIH3T3 細胞にレポータープラスミドと同時に導入した。細胞内でプロモーターの上流に結合した dbdDPE2 の転写活性をモニターすることで HDAC の呼び込みを検討できるアッセイ系である。

その結果、GAL4 サイトを持ったレポータープラスミドと dbdDPE2 を入れた細胞では、ルシフェラーゼの発現が抑えられた。またその抑制は SAP18 との共発現でより強められた。さらにこの抑制が HDAC の効果によるものかどうかを調べるために、HDAC の特異的阻害剤である trichostatin A (TSA)で処理したところ、抑制された転写の回復がみられた。したがって、この抑制には、HDAC

が関与していること、すなわち DPE2 が *in vivo* で、HDAC 活性を DNA 上に呼び込む機能があることが示された。

次に、この DPE2 と SAP18 の相互作用の細胞内での生理的な役割を明らかにする手がかりを得るために、内在性のタンパク質の挙動を解析した。

マウス FM3A 細胞を 0.1% TritonX-100 を含むバッファーで処理し、細胞質を除くと同時に、核膜の透過性をあげて可溶性のタンパク質を分画した。残った画分をクロマチン結合画分とした。そのクロマチン結合画分を DNaseI によって処理し、その後さらに 2 M NaCl で処理した。その結果、Pol ϵ の活性サブユニット POLE は TritonX-100 処理と DNaseI 処理によってその多くが溶出されたのに対し、SAP18 は TritonX-100 処理と DNaseI 処理ではあまり溶出されず、2 M 塩処理画分や沈殿画分に多くが残った。Sin3 はどの画分にもよく検出され多様な因子との結合が示された。この結果からそれぞれの因子の挙動が異なり、複合体を形成していても、色々な様式の複合体が存在することが示唆された。

Pol ϵ が DNA 複製に関わる因子であることから細胞周期との関連を調べるために、細胞周期の各時期でのクロマチンへの結合の様子を調べた。マウス FM3A 細胞をチミジンとヒドロキシ尿素による二段階の同調を行い、G1/S の境界に細胞を揃えた。ヒドロキシ尿素除去後、継時的に細胞を集め、TritonX-100 処理しクロマチンへの結合の様子を調べた。その結果 POLE は Pol δ および Pol ϵ の補助因子である PCNA と同様に細胞周期 S 期にクロマチンへ結合し他の時期には結合量が減少していた。SAP18 と Sin3 も POLE や PCNA と同様に細胞周期の S 期ではない時期にクロマチンへの結合量が減少しており、細胞周期による結合量の変化があることがわかった。しかしその変化量は小さく、SAP18 と Sin3 はその多くが細胞周期を通じてクロマチンに結合しており、細胞周期と連動して挙動している分子は少量であると考えられた。

次に、FM3A 細胞の核抽出液を調製し、グリセロール密度勾配遠心法によって Pol ϵ と Sin3 複合体との巨大複合体の検出を試みた。その結果、ホロ酵素として予想されるよりも早く沈降する POLE を検出し、Pol ϵ が巨大複合体を形成している可能性を示した。また、全体の中での割合が少なかったが、POLE のピークと同じ位置に SAP18 のピークを検出した。Sin3 は広範囲にわたって検出され、その存在様式に多様性があることを示した。この実験においても Pol ϵ と Sin3 複合体からなる巨大複合体の存在を示唆したが、その割合は Pol ϵ と Sin3 のそれぞれの一部であると考えられた。

実際に Pol ϵ と Sin3 とが複合体を形成しているかを抗 DPE2 血清を用いた免疫沈降法で調べた。FM3A 細胞抽出液中で内在性の DPE2 と Sin3 が共沈した。この免疫沈降では POLE も効率的に沈殿することから、Sin3 と結合する Pol ϵ のサブユニットはわからないものの内在性の Pol ϵ が Sin3 とともに確かに相互作用することが明らかとなった。

また、各因子の細胞内での局在を調べるため、マウス Swiss3T3 細胞を間接蛍光抗体法で染色した。染色前に細胞を 0.1% TritonX-100 で処理してクロマチンへ結合していない成分を排除した。Pol ϵ や DPE2 抗体は細胞染色法に向かないために Pol ϵ の補助因子の PCNA と Sin3 および SAP18 の局在を調べた。その結果、細胞周期 S 期の初期の核でそれぞれの局在が似ていたが完全には一致しなかった。また、その他の時期では局在部位は一致しなかった。Sin3 と SAP18 は Sin3 複合体として同じ細胞内局在をするものと予想されたが、Sin3 と SAP18 の二重染色像では核内で似たような分布を示すものの、必ずしもすべての局在が重なるようには見えなかった。

以上本研究から、DPE2 と SAP18 および Pol ϵ と Sin3 が相互作用することを示した。また、一部の分子だが、Pol ϵ と Sin3 複合体が巨大複合体を形成している可能性を示した。さらに Pol ϵ の機能として、Sin3 複合体を DNA 上に呼び込むことを新たに見いだした。Pol ϵ は DNA 合成を行う因子であることから、見いだした機能の生理的な意味として、DNA 複製直後にヒストンの脱アセチル化を行い、DNA 複製後のクロマチン構造の再構築を行っていることが考えられる。

現在、DNA 複製と DNA のメチル化維持との関連や、DNA のメチル化とヒストンのアセチル化との関連に関する研究が進んでいるが、本研究で Pol ϵ と Sin3 複合体が相互作用すること、DNA 複製とヒストンの脱アセチル化の機構が直接的に関わることを示し、DNA のみの複製機構にとどまらず、ヒストンを含む高次の染色体の構造の複製・維持の機構の解明につながるものと期待される。