

論文審査の結果の要旨

和田賢人

本論文は 1 章からなり、DNA 複製を直接担う DNA ポリメラーゼに着目して研究している。特にその中でも第 2 サブユニット DPE2 を介したマウスの DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) と Sin3 複合体との相互関係について述べられている。

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。

そこで和田氏は 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 2 サブユニット DPE2 と相互作用する因子の検索を行った。酵母 two-hybrid 法によってマウス DPE2 と相互作用する因子の検索を 2 回行った結果、288 個の陽性クローンが得られた。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たので、SAP18 を解析の対象にして研究を進めた。

そこで、DPE2 と SAP18 の相互作用を確認するために吸着樹脂を用いた共沈実験を行い、確かに DPE2 と SAP18 が相互作用する結果を得た。

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 2 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。

更に 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。その結果、GAL4 サイトを持ったレポータープラスミドと GAL4 サイトに結合する dbdDPE2 (DNA binding domain DPE2) 発現させるプラスミドを導入した細胞では、レポーター遺伝子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トリコスタチン A 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、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 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。その結果、活性サブユニットの 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。

これらをもとに 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。

そこで実際に 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。その結果、FM3A 細胞抽出液を用いた免疫沈降で内在性の 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初めて明らかになった。

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。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にかなりの一致があった。

以上のような研究過程から和田氏は 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。このことは DNA 複製において DNA ポリメラーゼ ϵ と Sin3 複合体とが相互作用をし、しかもその相互作用は第 2 サブユニット DPE2 を介していることを示した。これらの結果はこの分野への貢献が大きいと思われる。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。