

# 論文審査の結果の要旨

氏名 森 山 崇

本論文は、2つの章と序文、結論からなる。序文で述べられているように、動物や酵母のミトコンドリアゲノムの複製酵素として知られていた DNA ポリメラーゼは、ゲノム塩基配列が決定されたシロイヌナズナ、イネ、および紅藻などには存在しない。先行するいくつかの研究では、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I と類似の酵素がいくつかの植物から報告され、オルガネラ局在が示唆されていたが、組換え酵素での研究にとどまり、植物や藻類から酵素を単離した研究は行われていなかった。これらの DNA ポリメラーゼは、細菌の DNA ポリメラーゼ I とは姉妹群をつくり、明確に区別できる酵素であるため、論文提出者は、改めて植物と藻類のオルガネラ局在型 DNA ポリメラーゼに対し、POP (plant organellar DNA polymerase) という名称を提案した。本論文第 1 章では、紅藻からの POP の精製とその性質の解析について述べられ、さらに第 2 章では、細胞周期における発現に基づき、POP がオルガネラの複製に重要な役割を果たす酵素であることが推論されている。

第 1 章では、紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* のもつ POP を PolB と名付け、その局在と精製および性質について述べられている。*C. merolae* には他に細菌の DNA ポリメラーゼ I のホモログである PolA も存在する。まず精製に先立ち、2つの酵素の細胞内局在を、免疫ブロット法と緑色蛍光タンパク質法により調べ、PolB が葉緑体とミトコンドリアの両方に局在することと、PolA は葉緑体に局在することを結論している。次に、POP を精製するのに最適な生物材料として *C. merolae* を選んだ理由として、POP 遺伝子が 1 コピーであることと、細胞が好熱性で増殖が活発であることが挙げられている。論文提出者は、組換え PolB に対する抗体による検出を利用して、細胞破碎液から PolB をいくつかのクロマトグラフィーの組み合わせによりほぼ純粋な形で精製するのに成功した。精製度は約 1,000 倍であった。得られた酵素は、高い比活性と高い基質親和性を示した。また、一度開始した合成反応でどれだけの長さの DNA が合成できるかというプロセスビティの測定の結果、1300 塩基という高い値が得られた。また、アミノ酸配列からの推定どおり、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性も検出され、PolB はプルーフリーディング活性をもつ DNA 合成酵素であることがわかった。これらの結果から、*C. merolae* の PolB はオルガネラゲノムの複製酵素としてふさわしい性質を備えていると判断された。

第 2 章では、*C. merolae* の新しい同調培養系を構築し、明期の長さを短くしたうえで二酸化炭素の供給量を調節することにより、光によって誘導される遺伝子発現を、細胞分裂にともなう遺伝子発現と分離できるようにした。この系を用いて培養した細胞から RNA を抽出し、細胞周期における 58 個の遺伝子の発現量を、定量的 PCR によって測定した。その結果、光によって発現誘導が起きる遺伝子のグループ (クラスター 1) と細胞分裂時に発

現誘導が起きる遺伝子のグループ（クラスター2と3）にわけられた。また DNA 合成期(S 期)は, 明期開始後 3 時間以内に完了することがわかった。PolB はクラスター2に含まれた。他の DNA 関連酵素や細胞周期制御関連遺伝子の多くもクラスター2に含まれた。クラスター3にはヒストン遺伝子と CDKB などが含まれていた。多くの生物ではヒストン遺伝子の発現が起きるのは S 期であるので, この紅藻の場合は特別である。次の S 期に必要なヒストンを予め M 期に合成しておくものと考えられた。これらの解析を通じて, PolB が細胞周期依存的な制御を受けることがわかり, オルガネラゲノムの複製に関わる機能を持つことを示唆する結果と考えられた。

以上のように, 本研究では, オルガネラ局在型 DNA ポリメラーゼ(POP)を細胞から初めて精製することに成功し, その性質を調べることにより複製酵素として適格であることを示すとともに, 細胞周期におけるこの酵素の発現を調べることによって, オルガネラの複製に関与することを強く示唆する結果を得たことは高く評価される。

本論文の第1章の内容と第2章のDNAポリメラーゼ関係の部分を含む論文は, 寺澤公宏, 藤原誠, 佐藤直樹との共著として, 2008年に FEBS Journal 誌に掲載された。また, 第2章の残りの内容も同じ共著者との共著として近日中に再投稿の予定である。これらの内容の大部分は, 論文提出者が主体となって実験を行ったもので, 論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって, 博士(理学)の学位を授与できると認める。

