

## 論文の内容の要旨

論文題目 変異型 DNA ポリメラーゼ・イータを用いた

損傷乗り越え複製の分子機構の解析

(Analyses of molecular mechanism of translesion  
synthesis using mutant DNA polymerase  $\eta$ )

氏 名 伊藤 若菜

損傷乗り越え複製 (TLS; translesion synthesis) は、損傷のある DNA 鎖を鋳型として複製を行なうことのできない通常の複製 DNA ポリメラーゼから、損傷のある鋳型鎖でも複製を行なうことのできる TLS ポリメラーゼに入れ替わることで損傷による複製阻害を回避し、細胞死を防ぐ機構である。DNA ポリメラーゼ・イータ (Pol $\eta$ ) は TLS において、紫外線 (UV) による主な DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) を正確に効率よく乗り越えることができる TLS ポリメラーゼであり、色素性乾皮症バリエーション群 (XP-V) の原因遺伝子産物として同定された。XP-V は Pol $\eta$  に変異があるため、CPD に対して正確な TLS ができず UV 過敏性を示し、高頻度に皮膚癌を発症する疾患である。Pol $\eta$  は自身の TLS ポリメラーゼ活性に加え、REV1 などの他の TLS ポリメラーゼと相互作用することが知られている。哺乳類においては Pol $\eta$ 、 $\iota$ 、 $\kappa$ 、 $\zeta$ 、REV1 が、損傷の種類に応じて協調的に TLS を行なうと考えられており、その過程で TLS ポリメラーゼ間相互作用が重要な役割を担うと推測されている。これらのことから、XP-V 患者で見られる UV 感受性の原因が Pol $\eta$  欠損による CPD の正確な乗り越えが出来ないことに加え、Pol $\eta$  を中心とした TLS ポリメラーゼ間でのネットワークの破綻も関与する可能性があると考えた。これまでの研究で Pol $\eta$  欠損、Pol $\eta$ ・Pol $\iota$  二重欠損、及び Pol $\eta$ ・Pol $\iota$ ・Pol $\kappa$  三重欠損マウスが作成され、UV 誘発皮膚発がんを主徴とする XP-V 群患者のモデル動物として利用できることが明らかになっている。更にこれらのマウスからマウス胚性線維芽細胞 (MEF) が樹立され、XP-V 患者由来培養細胞と同様に UV 感受性を示すことが分かっている。本研究では、これらの MEF

に野生型及びタイプの異なる 3 種類の変異型 Polη (ポリメラーゼ活性に必須なアミノ酸残基 2 箇所に  
変異を導入した不活性型 Polη、REV1 との相互作用に必須な 4 個のフェニルアラニンに変異を導入し  
た REV1 非結合同型 Polη、この両変異を併せ持つ不活性型/REV1 非結合同型 Polη) を個別に発現させ、  
UV 感受性と突然変異率を解析した。

まず Polη 欠損及び Polη・Polι 二重欠損 MEF に各種変異型 Polη を発現するプラスミドをエレクトロ  
ポレーションによってトランスフェクションして過剰発現させ、ハイグロマイシン含有培地でセレク  
ションを行い安定発現株を得た。次にこれらの細胞株を用いてコロニー形成法を主として UV 照射後  
の生存率を調べた。その結果、Polη 欠損及び Polη・Polι 二重欠損 MEF では野生型 MEF に比べ著し  
く UV 感受性が高く、UV 照射量依存的に生存率の低下がみられた。これらの細胞に野生型 Polη を発  
現させるとその UV 感受性は野生型 MEF 程度にまで回復した。不活性型 Polη を発現した MEF では、  
部分的であるが明らかな UV 感受性の回復がみられた。一方、REV1 非結合同型 Polη を発現させた場合、  
その UV 感受性は野生型 MEF と同程度にまで回復した。しかし、不活性型/REV1 非結合同型 Polη の発  
現では UV 感受性の回復は全くみられなかった。これらのことから、Polη-REV1 の相互作用は Polη に  
活性がある場合には UV 感受性回復に必要なが、Polη 自身に活性がなく CPD を乗り越えられない場  
合、REV1 と相互作用することによって部分的に UV 感受性を回復させるのではないかと考えられる。  
また、Polη 欠損 MEF と Polη・Polι 二重欠損 MEF ではその UV 感受性に大きな差がみられないことか  
ら、この不活性型 Polη-REV1 相互作用を介する TLS 経路は Polι に依存しないと思われる。

次に、Polκ は XP-V 群患者由来細胞において誤りがちな TLS を行うとの報告から、Polκ が不活性型  
Polη による部分的な UV 感受性の回復に関わる可能性が考えられた。そこで、Polη 欠損 MEF、及び  
Polη・Polι・Polκ 三重欠損 MEF の UV 感受性をコロニー形成法により調べた。さらに、Polη・Polι・Polκ  
三重欠損 MEF に Polη 欠損、Polη・Polι 二重欠損 MEF と同様に各種変異型 Polη を発現させ、同様に  
UV 感受性を調べた。その結果、Polκ 欠損 MEF はわずかな UV 感受性を示した。一方、Polη・Polι・  
Polκ 三重欠損 MEF は Polη 欠損、Polη・Polι 二重欠損 MEF と比較しても非常に高い UV 感受性を示し  
た。野生型 Polη、REV1 非結合同型 Polη の発現により Polη・Polι・Polκ 三重欠損 MEF の UV 感受性は  
野生型 MEF と同レベルまでの回復はみられないものの、Polκ 欠損 MEF と同レベルにまで回復した。  
しかし不活性型 Polη の発現により Polη 欠損、Polη・Polι 二重欠損 MEF では部分的な UV 感受性の回  
復がみられたにも関わらず、Polη・Polι・Polκ 三重欠損 MEF の UV 感受性は回復しなかった。また同  
様に、不活性型/REV1 非結合同型 Polη の発現によっても UV 感受性は回復しなかった。これらのことか  
ら、Polη 欠損、Polη・Polι 二重欠損 MEF でみられた不活性型 Polη 発現による部分的な UV 感受性の  
回復には Polκ の関与が示唆された。

次に各種変異型 Pol $\eta$  の発現が UV により誘発される突然変異率を抑制するかを調べるため、各種変異型 Pol $\eta$  を発現させた Pol $\eta$  欠損 MEF の UV 照射後の突然変異率を ouabain 耐性 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子変異体の出現頻度により解析した。その結果、UV 非照射の各 MEF の変異率に統計的有意差がないのに対して、Pol $\eta$  欠損 MEF では UV 照射後に変異率が大きく上昇した。この変異率の上昇は、野生型 Pol $\eta$ 、及び REV1 非結合型 Pol $\eta$  の発現により野生型 MEF と同程度にまで抑制された。一方、不活性型 Pol $\eta$  を発現した Pol $\eta$  欠損 MEF では Pol $\eta$  欠損 MEF に比べ変異率の上昇がみられた。不活性型 /REV1 非結合型 Pol $\eta$  では不活性型 Pol $\eta$  レベルまでの変異率の上昇は見られないものの、依然として Pol $\eta$  欠損 MEF と同等の高い変異率を示していた。このことから、不活性型 Pol $\eta$ -REV1 相互作用で誘導される TLS 経路は突然変異率が高い、すなわち誤りがちな TLS を行うと考えた。同様に、不活性型 Pol $\eta$  を発現した Pol $\eta$ ・Pol $\iota$  二重欠損 MEF でも Pol $\eta$ ・Pol $\iota$  二重欠損 MEF に比べて変異率が上昇したことから、UV 誘発性突然変異の上昇においても Pol $\iota$  の関与は除外できると思われる。一方で、Pol $\eta$ ・Pol $\iota$ ・Pol $\kappa$  三重欠損 MEF では UV 照射後の変異率の上昇は殆どみられなかった。各種変異型 Pol $\eta$  を発現した Pol $\eta$ ・Pol $\iota$ ・Pol $\kappa$  三重欠損においても変異率の上昇はみられなかったことから、Pol $\eta$  欠損時における突然変異率の上昇に Pol $\kappa$  が寄与していることが示唆された。

以上のことから、次のようなモデルを考えた。通常、CPD の TLS は Pol $\eta$  により正確に効率よく行われる。Pol $\eta$  の非存在下では Pol $\iota$ 、Pol $\kappa$ 、Pol $\zeta$  により誤りがちな TLS が行われることが報告されている。しかし、Pol $\eta$  が存在しても TLS ポリメラーゼ活性の欠如により CPD の TLS を行うことのできない場合には REV1 との相互作用を介して Pol $\kappa$  を損傷の場へと引き寄せ、誤りがちな TLS を行うことで細胞死という最悪の事態を回避しようと試みるのではないかと予想した。XP-V 患者における *POLH* 遺伝子の変異の中には、ミスセンス変異により TLS ポリメラーゼ活性に重要とされるアミノ酸が別のアミノ酸に置換した不活性型変異が複数報告されている。今回、新たな TLS 機構として、不活性型 Pol $\eta$  が CPD を乗り越えられない場合には REV1 との相互作用を介して他の TLS ポリメラーゼと Pol $\eta$  を交換し、代わりに誤りがちに CPD を乗り越えることを示した。この新たな TLS 機構の詳細を明らかにすることで、一部の XP-V 患者でみられる不活性型変異による発癌機構の解明に重要な手がかりが得られることが期待される。また、生化学的解析により Pol $\kappa$  単独では CPD を乗り越えられず Pol $\zeta$  が必要であるとの報告から、Pol $\kappa$  に加え Pol $\zeta$  もこの経路に協調的に働いていると予想される。今後、さらに Pol $\zeta$  の寄与についても不活性型変異体などを利用した解析を行う必要があると思われる。一方、哺乳類以外の TLS ポリメラーゼについても REV1 との相互作用について解析することで、TLS における REV1 と他の TLS ポリメラーゼの相互作用意義の普遍性あるいは特殊性について重要な知見が得られると期待される。