



研究ノート

真核生物 DNA ポリメラーゼの機能

荒木 弘之*

Functions of eukaryotic DNA polymerases

Key words : DNA polymerase : DNA replication : Eukaryote : Yeast : POL2

1. はじめに

生物は、その遺伝子 DNA を親から子へ正確に伝えて行く。また、細胞の増殖にともなって、やはり遺伝子 DNA を娘細胞に正確に伝えていかないと、親の形質を備えた固体は作られない。そのためには、まず遺伝子 DNA の正確な複製が起こらなければならない。遺伝子工学的技術によりベクターと共に導入された外来遺伝子も、等しくこの DNA 複製の恩恵にあずかっている。DNA 複製は分子生物学の主要な課題として、研究が進められてきているが、まだ不明の部分もおおい。とくに、真核生物ではやっと分子レベルのメカニズムが分かりだしたところである。本稿では、DNA 複製の中心的酵素である DNA ポリメラーゼについて述べる。

2. DNA ポリメラーゼの種類

現在までに知られている DNA ポリメラーゼはすべて、DNA を鋳型にして $5' \rightarrow 3'$ 方向にその相補鎖を合成する。その DNA 合成能は、DNA 複製だけでなく、紫外線や化学物質で傷ついた DNA を修復する際や、遺伝的組換えにも要求される。実際、原核生物の大腸菌からは 3 種の DNA ポリメラーゼが精製されてきている

が、DNA 複製フォークでは DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素がヘテロダイマーをつかって DNA 合成を行なっていると考えられている。他の 2 つの DNA ポリメラーゼの DNA 合成活性は DNA 複製には直接必要ないものと思われている。

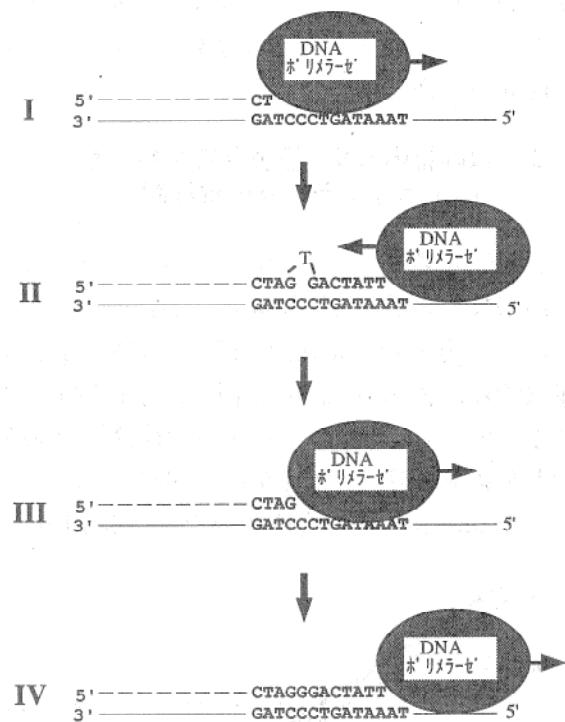


図1 DNA ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性による DNA 合成ミスの修復
DNA ポリメラーゼは $5' \rightarrow 3'$ に DNA を合成して行く(I)。その際に間違った塩基を取り込むと、 $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼの働きにより間違っ取り込まれた塩基を含む部分が分解される(II)。そしてまた $5' \rightarrow 3'$ 方向に DNA は合成され(III)、正しい塩基が取り込まれる(IV)。

*Hiroyuki ARAKI

1955年1月6日生

昭和57年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了

執筆時、大阪大学工学部応用生物工学科、助手(現：大阪大学微生物病研究所・助教授)、理学博士、分子遺伝学

TEL 06-877-5121 (内線 3180)



動物細胞からは、主要な核内DNAポリメラーゼとしてDNAポリメラーゼ α , δ , ϵ が精製されてきている¹⁾。DNAポリメラーゼ α は4つのサブユニットからなり、そのうち2つのサブユニットはDNAの鋳型の上にDNA複製のプライマーとなるRNAを合成するDNAポリメラーゼの活性を持つ。そのため、DNA複製フォークでの短鎖DNA(岡崎フラグメント)の合成や複製開始部位でのプライマーRNAの合成に関与していると考えられている。DNAポリメラーゼ δ を特長づけるのは、PCNA(Proliferating Cellular Nuclear Antigen)により、一度に連続して長い鎖を合成できるようになることである。DNAポリメラーゼ ϵ は、前出のPCNAがなくとも長鎖を合成することができる。また、DNAポリメラーゼ δ と ϵ は合成方向とは逆の3'→5'方向へのエキソヌクレアーゼ活性をもつ。このエキソヌクレアーゼは、DNAポリメラーゼが合成ミスをおかしたときに、その部分をすぐに分解し再合成するのに役立つ(図1)。

3. 試験管内DNA複製反応を用いたDNAポリメラーゼの機能解析

DNA複製フォークでは、DNAポリメラーゼがDNAを5'→3'方向にしか合成できないため、一方の鎖(leading鎖)のDNA合成は連続的に、他方(lagging鎖)は不連続的に起こる(図2)。動物ウイルスSV40DNAの試験管内複製系を用いた研究から、DNAポリメラーゼ α がlagging鎖の合成を行ない、leading鎖

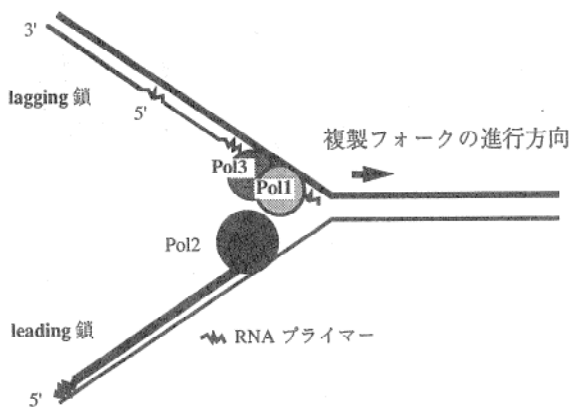


図2 DNA複製フォークでの3つのDNAポリメラーゼ

の合成は主としてPCNAと複合体を作ったDNAポリメラーゼ δ により行なわれることを支持する結果が得られた²⁾。従って、2つのDNAポリメラーゼがDNA複製に関与していることになる。DNAポリメラーゼ α の変異株ではDNA合成に欠損があることは分かっているが、一般に動物細胞の系では変異株を得ることは難しく、細胞内で同様のことが起こっているかどうかは分からない。

4. DNAポリメラーゼの細胞内での機能

細胞内の機能を知るうえで、真核生物のモデル系として注目を浴びているのが、酵母である。酵母では、遺伝解析系が確立しており、しかも容易に特定遺伝子の変異を作り出すことも可能であるため、細胞内の機能を直接調べることができる。酵母からは、DNAポリメラーゼ α , δ , ϵ に対応するI, III, IIのDNAポリメラーゼが分離精製され、それぞれの活性サブユニットをコードする遺伝子もクローニングされている。DNAポリメラーゼIの活性サブユニットをコードするPOL1遺伝子の温度感受性変異株では、高温でDNA合成が停止する³⁾。DNAポリメラーゼIIIの活性サブユニットをコードする遺伝子⁴⁾⁵⁾の変異株では、野生株に比較して約2/3しかDNA複製が行なわれていないことが報告されている⁶⁾。これらのことは、DNAポリメラーゼI, IIIがDNA複製に関与していることを意味し、SV40ウイルスDNAの試験管内複製系で得られた結果を強く支持する。

一方、DNAポリメラーゼIIは4つのサブユニットからなり、そのうち3つのサブユニットをコードする遺伝子POL2, DPB2, DPB3がクローンされている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。活性サブユニットをコードするPOL2または2番目に大きなサブユニットをコードするDPB2遺伝子を破壊すると細胞が死ぬ。さらに、クローンしたPOL2, DPB2遺伝子内に変異を導入し、高温で致死になる株が分離された。それら変異株では、実際に染色体複製が温度感受性になっていた⁸⁾¹⁰⁾。しかもPOL2変異株から部分精製したDNAポリメラーゼIIは温度感受性のポリメラーゼ活性を示した¹⁰⁾。従って、DNAポリメラーゼII

のポリメラーゼ活性が細胞増殖に必須であり、DNA複製にこのDNAポリメラーゼ活性が必要であることが結論できる。これらの結果は、3つのDNAポリメラーゼが酵母染色体DNAの複製に必要であることを示している。動物細胞と酵母の類似性が高いことを考えれば、動物細胞のDNAポリメラーゼもまたDNA複製に関与していると思われる。

さらに、DNAポリメラーゼIIとIIIのエキソヌクレアーゼ欠損変異株が、部位特異的突然変異法により分離された。それらは、高い突然変異率を示し、DNAポリメラーゼによるDNA合成が不正確になるだろうという予想と一致した¹¹⁾¹²⁾。

5. 各DNAポリメラーゼの役割

3つのDNAポリメラーゼがどのようにDNA合成を行なっているかは不明である。各ポリメラーゼ独自の性質からは、DNAポリメラーゼIとIIIがlagging鎖の合成に、DNAポリメラーゼIIがむしろleading鎖の合成に関与しているのではないかと考えられる(図2)。逆にBurgersらは、プライマーDNAを認識するときに必要なDNAポリメラーゼIIを含んだ複合体がDNAポリメラーゼIIIのものに比較して不安定であることから、DNAポリメラーゼIIはlagging鎖の合成に適していると考えている¹³⁾。いずれにしても細胞内での証明が必要である。

参 考 文 献

1) T. S.-F. Wang : Annu. Rev. Biochem. 60, 513 (1991).

- 2) T. Tsurimoto, T. Melendy & B. Stillman : Nature, 346, 534 (1990).
- 3) M. Budd & J. L. Campbell : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2838 (1987).
- 4) K. C. Sitney, M. E. Budd & J. L. Campbell : Cell, 56, 599 (1989).
- 5) A. Boulet, M. Simon, G. Faye, G. A. Bauer & P. M. J. Burgers : EMBO J., 8, 1849 (1989).
- 6) M. N. Conrad & C. S. Newlon : Mol. Cell. Biol., 3, 1000 (1983).
- 7) A. Morrison, H. Araki, A. B. Clark, R. K. Hamatake & A. Sugino : Cell, 62, 1143 (1990).
- 8) H. Araki, R. K. Hamatake, L. H. Johnston & A. Sugino : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4601 (1991).
- 9) H. Araki, R. K. Hamatake, A. Morrison, A. L. Johnson, L. H. Johnston & A. Sugino : Nucl. Acids Res. 19, 4867 (1991).
- 10) H. Araki, P. A. Ropp, A. L. Johnson, L. H. Johnston, A. Morrison & A. Sugino : EMBO J. 11, 733 (1992).
- 11) A. Morrison, J. B. Bell, T. A. Kunkel & A. Sugino : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9473 (1991).
- 12) M. Simon, L. Giot & G. Faye : EMBO J. 10, 2165 (1991).
- 13) P. M. J. Burgers : J. Biol. Chem. 266, 22698 (1991).