YファミリーDNAポリメラーゼと突然変異生成機構

太田敏博*

ヒトのゲノム解読が完了し、新たな微生物のゲノム解読くらいでは驚かなくなった昨今であるが、遺伝学的解析が進んでいる大腸菌でさえ、4,288 遺伝子のうち機能が確認されているのは半数にすぎない。1999 年、その大腸菌において新たな 2 種類の DNA ポリメラーゼが見つかった。時を同じくして、真核生物の酵母、ヒトにおいても類似の DNA ポリメラーゼが相次いで見つかり、1986 年以降 5 種類とされていた真核生物の DNA ポリメラーゼは、この 2 年間ですでに 13 種類に増えた。その多くは、従来の DNA ポリメラーゼとはアミノ酸配列の相同性がなく、新しいファミリーを構成している。ヌクレオチドの連続重合能力と正確な塩基対合を形成する能力は低いが、鋳型 DNA に損傷部位があっても、適当な塩基を挿入して損傷部位を乗り越えて複製を行なってしまうという特徴を有する。その結果として突然変異頻度は上昇するが、なぜこのような DNA ポリメラーゼが存在するのか。ガンの原因として、また、免疫グロブリンの超可変領域にみられる高い突然変異頻度との関連からも注目されている。

これまで、大腸菌では 3 種類の DNA ポリメラーゼが知られていた。最初の DNA ポリメラーゼ I は 1957 年に、DNA ポリメラーゼ II が 1970 年に、3 番目の DNA

ポリメラーゼ III は 1972 年に発見された。その後の研究で、DNA ポリメラーゼ I は DNA 除去修復と複製の一部（ラギング鎖合成における隣接する岡崎フラグメント間のプライマー RNA の除去と DNA 合成）、DNA ポリメラーゼ III は染色体の複製に関与することが明らかにされた。DNA ポリメラーゼ II の機能に関しては未だに詳細は不明であるが、静止期における DNA 修復や複製反応の再スタートへの関与が報告されている。一方、真核生物では 80 年代までに 5 種類の DNA ポリメラーゼの存在が報告されており、哺乳類では DNA ポリメラーゼ α , β , γ , δ , ϵ と呼ばれている。このうち核の DNA 複製には DNA ポリメラーゼ α , δ , ϵ が、ミトコンドリアの DNA 複製には DNA ポリメラーゼ γ が関与し、DNA ポリメラーゼ β は DNA 修復に使われている（表 1）。

大腸菌においては DNA ポリメラーゼ III の発見後、DNA 複製や修復に関与する未発見の DNA ポリメラーゼの存在を断定できるデータがなかったこともあって、90 年代末になるまでの 25 年間、DNA ポリメラーゼは 3 種類とされてきた。1999 年になって、鋳型 DNA に損傷があるという特殊な条件下でも DNA 複製を行なうことが可能な、DNA ポリメラーゼ IV (DinB タンパク質) と DNA ポリメラーゼ V (UmuD'・UmuC タンパク質複合

Y-Family of DNA Polymerases and Mutagenesis

*Toshihiro OHTA, 東京薬科大学生命科学部

表 1 ■ 90 年代の教科書に載っている大腸菌と真核生物の DNA ポリメラーゼ

DNA ポリメラーゼ	主な機能	エキソヌクレアーゼ活性
大腸菌		
DNA ポリメラーゼ I	DNA 修復	3'→5' と 5'→3'
DNA ポリメラーゼ II	DNA 修復, DNA 複製反応の再スタート	3'→5'
DNA ポリメラーゼ III	DNA 複製 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ など 10 種のサブユニットで構成)	3'→5'
真核生物		
DNA ポリメラーゼ α	DNA 複製開始 (DNA プライマーゼ活性をもつ)	なし
DNA ポリメラーゼ β	DNA 修復	なし
DNA ポリメラーゼ γ	ミトコンドリアの DNA 複製	3'→5'
DNA ポリメラーゼ δ	DNA 複製 (リーディング鎖, ラギング鎖合成)	3'→5'
DNA ポリメラーゼ ϵ	DNA 複製 (ラギング鎖合成)	3'→5'

(注) 大腸菌の DNA ポリメラーゼ III のサブユニット α, β, γ などは、真核生物の DNA ポリメラーゼ α, β, γ などと混同しやすいが、関連はないので注意が必要である。

体) が相次いで見つかった。同様な活性を示し、DinB/UmuC とアミノ酸配列の相同性をもつ DNA ポリメラーゼが真核生物でも見つかり、ヒトでは DNA ポリメラーゼ η, ι, κ などが次々と単離されている。新しい DNA ポリメラーゼはいずれも正確な塩基対合を形成させる能力が低く、酵素のプロセッシビティー*¹ も低いことが特徴で、じたがってポリメラーゼ活性が著しく弱く、通常の方法では検出が困難であったことが発見の遅れた理由である。本稿では、この新規 DNA ポリメラーゼの機能と、その存在意義について解説する。

1,000/秒

新規 DNA ポリメラーゼについて説明する前に、DNA 複製と DNA 修復機構について、これまで大腸菌とヒトの研究で得られた知見をもとに概説しておく⁽¹⁾。

細胞が分裂するためには、それに先立ってゲノムの完全なコピーが作られなければならない。細菌の環状ゲノムの複製起点は 1 個で、この起点からの複製反応は両方向性で、DNA 上を反対方向に進んでいく。4.6×10⁶ 塩基対 (4.6 Mb) のゲノムをもつ大腸菌では、約 40 分で DNA 複製が完了する。計算すると複製速度は 1 秒間におよそ 1,000 塩基対という、想像しがたいスピードである。ヌクレオソーム構造をもつ真核細胞のゲノムでは多数の複製起点が存在し、ヒトではおよそ 1.5×10⁵ 塩基対 (150 kb) に 1 つの割合で複製起点が存在すると言われていた。すなわち、真核細胞においても 1 秒間に 50~100 塩基対という速度で複製が行なわれる。いずれにしても、DNA 複製反応には複雑な不連続合成をしているラギン

グ鎖が含まれていることを考えれば、複製速度は驚異的である。一方で、ゲノムの複製においては、突然変異が生じるのを防ぐために複製には格段の正確さが要求される。大腸菌の DNA 複製時におけるエラーのレベルは、10⁻¹⁰~10⁻¹¹ の間である。つまり、4.6 Mb の大腸菌ゲノムの複製では、2,000~20,000 回につき 1 塩基対の複製の誤りしか起こらないことになる。

では、この正確さとスピードを合わせもった DNA 複製装置が働いているときに、鋳型 DNA に損傷があった場合はどのように対処しているのか、その結果として複製エラーは生じるのか、という疑問がわいてくる。最近、大腸菌、酵母、ヒトで相次いで発見された一連の DNA ポリメラーゼは、DNA 損傷を乗り越えて複製を行なう能力を有していることで注目を集めている。しかし、この損傷乗り越え複製の際には、塩基対合の正確さが緩んでいるために高い頻度で突然変異が生じる。この新しい DNA ポリメラーゼの存在は、塩基対合において正確さを要求されてきたこれまでの DNA ポリメラーゼの概念を、大きく変えるものである。

ゲノムの複製反応を触媒する酵素は、大腸菌では DNA ポリメラーゼ III であること、DNA 複製におけるエラーのレベルは 10⁻¹⁰~10⁻¹¹ の間であることはすでに述べた。しかし、DNA ポリメラーゼ III の合成反応だけでは、塩基の誤対合の発生が 10⁷ ヌクレオチドに 1 個の割合で起こってしまうので、誤対合した塩基を取り除いて入れ直す校正作業 (proofreading) をすることで、エラー頻度を下げている。DNA ポリメラーゼ III は 10 種類のサブユニットから構成され、コア酵素を構成する α, ϵ, θ の 3 種のサブユニットのうち、 α サブユニットが DNA ポリメラーゼ活性、 ϵ サブユニットが 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性をもっている。また、 β サブユニットはクランプ (留め金) の役目をもち、ポリメラーゼ複合体が鋳型から離れないように固定する結果、酵素のプ

*¹ プロセッシビティー (processivity) : DNA ポリメラーゼが基質の鋳型 DNA に結合したとき、1 回の結合あたり、連続して何個のヌクレオチドを重合することができるかという DNA 鎖合成能力の指標。

ロセッシビティーが格段に向上する。さて、DNA ポリメラーゼIIIのもつ校正機能は3'→5'エキソヌクレアーゼ活性によるものである。DNA複製の反応で誤ったヌクレオチドの挿入が起こると、正しい塩基対が形成されない。したがって、5'→3'ポリメラーゼ活性による鎖の伸長反応が進まないため、この酵素の3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が優勢に働き、塩基対が形成されていない3'末端のヌクレオチドを除去する。正しいヌクレオチドが挿入されて塩基対を形成すると、エキソヌクレアーゼ活性よりもポリメラーゼ活性が勝り合成反応が進んでいく。

しかし、この校正機能をもってしてもすべての誤対合が除けるわけではない。これは塩基の互変異性体(tautomer)に起因し、たとえばチミン塩基は通常ケト型として存在してアデニンと対合するが、平衡状態で稀に存在するエノール型チミンはグアニンと対合する。DNA複製反応が進んでしまった後で見いだされる塩基の誤対合は、ミスマッチ修復と呼ばれる修復機構で直される。ミスマッチ修復は細菌からヒトまで存在し、誤対合を認識して新生鎖のポリヌクレオチドの一部を切り出し、DNAポリメラーゼIでギャップを埋める。大腸菌ではMutH, MutL, MutSの3つのタンパク質の複合体が関与し、MutHのエンドヌクレアーゼ活性で新生鎖に切れ目が入る。ところで新生鎖の識別方法であるが、大腸菌ではDNAが複製されてしばらくしてからDNAのメチル化が起こり、5'-GATC配列中のアデニンが6-メチルアデニンに修飾される。この時間的ズレを利用して、メチル化されている鋳型鎖とメチル化されていない新生鎖とが区別されている。MutHタンパク質はメチル化されていない5'-GATC配列に結合して、誤対合の部位で切断する。このDNAのメチル化を利用した識別は、大腸菌など一部の細菌に特有のものである可能性が高く、真核生物では鎖の識別には異なる機構が関与していると考えられているが、詳細はよくわかっていない。

10,000/日

DNA複製時の誤対合に対しては、上述の校正機能とミスマッチ修復機構で誤りを修復しているが、ゲノムは細胞の内外から種々の要因によってDNAの化学構造変化、すなわちDNA損傷を絶え間なく受けている。例を挙げれば、ヌクレオチドの塩基と糖をつないでいるβ-N-グリコシド結合の非酵素的な加水分解で塩基の欠落が生じる。塩基が欠落した部位はAP部位(脱プリン/脱ピリミジン部位)と呼ばれるが、ヒトの細胞では1日1細胞あたり10,000ものAP部位が形成されているといわれている。また、塩基の脱アミノ反応によってシトシンはウラシルに、アデニンは一ヒポキサンチンに変化するし、細胞内の代謝で生じた活性酸素の作用によって、グアニンから8-オキシグアニンが、チミンからはチミングリコールといった酸化塩基が生じる。これらの酸化塩基の生成も細胞内では頻繁に起こり、1日1細胞あたり10,000以上ともいわれている。このような細胞内の要因だけでなく、ゲノムは放射線、紫外線、環境中の様々な化学変異原などの外的要因によっても損傷を受けている。DNA損傷はDNA複製や転写を阻害して細胞死をもたらすばかりでなく、時として突然変異をひき起こし細胞機能に重大な影響を与える。このような状況に対処するために、細胞は様々なDNA修復系をもっていて、複製が始まる前にこの損傷を取り除いて元通りに直している⁽²⁾。

損傷部分を取り除く修復機構には、塩基の切り出しを伴わない直接修復、塩基除去修復、およびヌクレオチド除去修復がある(表2)。直接修復の例として、大腸菌のO⁶-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼは、メチル化剤によって生じたDNA中のO⁶-メチルグアニンとO⁴-メチルチミンからメチル基を酵素自身のシステイン残基に移すことによってメチル化塩基の修復を行なっている。また、DNAフォトリアーゼは紫外線によるDNA損傷の一つであるシクロブタン型ピリミジン

表2 ■ DNAの損傷部分を取り除く修復酵素と基質特異性

損傷塩基を認識する修復酵素	タンパク質		基質特異性
	大腸菌	ヒト	
①直接修復			
O ⁶ -メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ	Ada, Ogt	MGMT	O ⁶ -メチルグアニン, O ⁴ -メチルチミン
DNAフォトリアーゼ	Phr	—	ピリミジン2量体
②塩基除去修復			
ウラシル-DNAグリコシラーゼ	Ung	UNG	ウラシル
8-オキシグアニン-DNAグリコシラーゼ	MutM	OGG1	8-オキシグアニン
3-メチルアデニン-DNAグリコシラーゼ	AlkA	MPG	3-メチルアデニン
③ヌクレオチド除去修復			
エンドヌクレアーゼ	UvrABC	XPG, XPF, ERCC1	広範囲のDNA損傷

(注) DNAフォトリアーゼ活性は植物、脊椎動物を含む真核生物にあるが、哺乳動物にはない。

図 1 ■大腸菌における塩基除去修復 (A) とヌクレオチド除去修復 (B) の機構

塩基は四角で示し (G, C, T, A はそれぞれグアニン, シトシン, チミン, アデニン), グレーの四角は新しく合成されたヌクレオチドを示す。異常塩基 (ウラシル塩基, シクロブタン型チミン 2 量体) は丸で示してある。いずれも複製を行っていないときの修復機構であり, 突然変異は生じない。

2 量体^{*2}に結合して, 可視光のエネルギーを利用して結合を切断し元の単量体に修復する。塩基除去修復においては, 損傷塩基を認識して β -N-グリコシド結合を切断する DNA グリコシラーゼが関与する。DNA グリコシラーゼは 10 種類以上が知られており, それぞれ基質特異性が異なる。これらの DNA グリコシラーゼによって脱アミノ化塩基のウラシル, メチル化塩基の 3-メチルアデニン, 酸化塩基のチミングリコールや 8-オキシグアニンが除去される。塩基除去の結果生じた AP 部位には, AP エンドヌクレアーゼにより 5' 側に一本鎖切断が入り, DNA ポリメラーゼ I による修復合成と DNA リガーゼによる連結で修復が行なわれる (図 1-A)。細胞内

で頻繁に生じる損傷塩基に対しては, これらの DNA グリコシラーゼで速やかな修復が可能になっているが, 化学変異原などの結合による不特定の損傷塩基, DNA 分子の二本鎖間に架橋が形成された塩基, 紫外線照射で生じるシクロブタン型ピリミジン 2 量体や 6,4-結合型ピリミジン 2 量体に対しては, ヌクレオチド除去修復が働いている。大腸菌ではエンドヌクレアーゼ活性をもつ酵素複合体 (エクシヌクレアーゼまたは UvrABC エンドヌクレアーゼと呼ばれる) が, DNA 損傷で生じる二重らせんのゆがみを認識して結合し, 損傷鎖に切れ目を入れて 12~13 ヌクレオチドを除去する。生じたギャップは塩基除去修復と同じく DNA ポリメラーゼ I と DNA リガーゼによって埋められる (図 1-B)。

^{*2} ピリミジン 2 量体: 紫外線照射によって隣り合った 2 つのピリミジン塩基の 5 位と 5 位, 6 位と 6 位の 2 箇所がそれぞれ結合した 2 量体が生じる。これをシクロブタン型ピリミジン 2 量体と呼ぶ。この他にも, 隣接するピリミジンの 4 位と 6 位の炭素間に共有結合が生じた (6,4) 光生成物とも呼ばれる 6,4-結合型ピリミジン 2 量体が生じる。本稿で紹介する研究では, ピリミジン塩基としてチミンが使われているので, それぞれシクロブタン型チミン 2 量体, 6,4-結合型チミン 2 量体と表記する。

SOS 応答と損傷乗り越え複製

DNA 複製開始前にすべての損傷の修復が完了すれば問題はないが, ゲノムが極度の DNA 損傷を受けるような状況下では, 複製中の鋳型鎖に損傷が生じることもあ

る。多細胞生物ではゲノム損傷のひどい細胞は捨てて、損傷をもたない細胞を分裂させることで対処することも可能であるが、細菌のような単細胞生物では DNA 複製の阻害は細胞死を意味する。それでは、細菌はどのような手段で損傷 DNA の複製を行ない生存率を高めているのであろうか。この過程は大腸菌で詳しく研究されており、SOS 応答と呼ばれている。SOS 応答機構は、後述の新しい DNA ポリメラーゼとも深く関連してくるので少し詳しく説明しておく⁽³⁾。

大腸菌に紫外線を照射したり、変異原処理によって DNA に損傷を与えると、30 種以上の遺伝子の発現が誘導される。これらの遺伝子は SOS 遺伝子と呼ばれ、大部分は DNA 修復に関与する遺伝子である。たとえば、ヌクレオチド除去修復に関与する遺伝子 (*uvrA*, *uvrB*, *uvrD*)、組換え修復に関与する遺伝子 (*recA*, *recN*, *ruvA*, *ruvB*)、フォトリアーゼ遺伝子 (*phr*)、DNA ポリメラーゼ II の遺伝子 (*polB*) などである。SOS 遺伝子は、そのプロモーター部位に SOS ボックスと呼ばれる共通配列をもち、LexA リプレッサーと結合することで発現が抑制されている。DNA の損傷によって DNA 複製が停止したり、ヌクレオチド除去修復でギャップが形成されて一本鎖 DNA 領域が露出すると、RecA タンパク質が一本鎖 DNA 領域に結合してフィラメントを形成する。この状態の RecA タンパク質は活性型 RecA* と呼ばれ、LexA リプレッサーの自己切断反応を促進する。その結果、SOS 遺伝子が発現し、生産された修復酵素によって DNA 修復反応が活発になる。ゲノムの DNA 損傷に応答してこれらの DNA 修復酵素の発現を誘導する SOS 応答は、非常に理にかなったシステムといえる。

ところでこの SOS 遺伝子には、*umuC*, *umuD*, *dinB* という突然変異生成に関与するタンパク質をコードする遺伝子が含まれている。UmuD タンパク質もまた活性型 RecA* タンパク質によってプロセッシングを受け、N 末端から 24 ペプチドが取り除かれた活性型の UmuD' が形成される。UmuD' タンパク質は 2 量体を作り、さらに UmuC タンパク質と結合して UmuD'C 複合体を作る。このタンパク質複合体の存在下で、DNA ポリメラーゼ III の複製反応を *in vitro* で行なった結果、鋳型 DNA に損傷部位が存在しても塩基が挿入され合成反応が継続されることが示された。この損傷部位を乗り越えてヌクレオチドを合成する反応は、損傷乗り越え複製 (translesion synthesis; TLS) と呼ばれている (図 2)。当初、UmuD'C 複合体は DNA ポリメラーゼ III の校正機能を阻害する因子と考えられ、DNA の損傷部位で DNA ポリメラーゼ III が鋳型から離れないようにし、適当な塩

図 2 ■大腸菌における損傷乗り越え複製の機構と突然変異の生成

DNA ポリメラーゼ III による複製反応は、損傷塩基 (シクロブタン型チミン 2 量体) の前で止まる。DNA ポリメラーゼ V によって、損傷塩基の部分に塩基が挿入され乗り越え合成が行なわれる。この際にグアニンが挿入される頻度が高いために、突然変異が生じることになる。DNA ポリメラーゼ V はプロセスビティが低いので、すぐに外れて DNA ポリメラーゼ III に置き換わり、DNA 複製が続行される。DNA 複製中における DNA 損傷の回避法として働く (記号の説明は図 1 に同じ)。

基を挿入して損傷部位を乗り越えて複製を継続させていると解釈されていた。

複製機構の詳細部分はともかく、重要なことは、損傷塩基に対して対合の厳密性を緩めて、どの塩基でも挿入する (大腸菌ではアデニンを挿入することが多い) ということである。したがって、誤った塩基を重合して損傷を乗り越える頻度が高いので突然変異を誘発しやすい。この強引ともいえるやり方で DNA を複製して、大腸菌は生き残りに賭けていると思われる。その代償は高い変異率であるが、単純に考えれば 1/4 の確率で正しい塩基が挿入されることになり、また間違った塩基が挿入されて塩基対置換変異が起こったとしてもアミノ酸が変化しない同義変異であったり、1 アミノ酸が変化した場合でもタンパク質の活性に顕著な影響が現われるのは稀であるため、単細胞生物にとっては必ずしも無謀な戦略ではなさそうである。SOS 応答はゲノムの変異率を高めて不利な環境に適応していくための進化的な意味をもつと

いう説もあるが、DNA 複製阻害という致死作用から回避するための緊急的な DNA 複製手段であるという説が一般的である。一方、DinB タンパク質は過剰発現すると自然突然変異頻度が高くなり、特に-1 のフレームシフト変異が特異的に誘発されることが知られている。また、DinB タンパク質は UmuC タンパク質とアミノ酸配列レベルで弱い相同性が認められている。

新規 DNA ポリメラーゼの発見

1. DNA ポリメラーゼ IV

能美 (国立衛生研) と Fuchs (IRCAD, フランス) らのグループの共同研究で、前述の DinB タンパク質が精製されて生化学的な解析が行なわれた結果、DinB タンパク質が DNA ポリメラーゼ活性をもつという驚くべき結果が示された⁽⁴⁾。DinB タンパク質は DNA ポリメラーゼ IV (PolIV) と命名され、その特性として校正機能 (3'→5' エキソヌクレアーゼ活性) をもたないこと、プロセシビティがきわめて低いこと (1 回の結合で 1 ヌクレオチドの重合)、1 塩基欠損が引き起こされることが多いことが明らかにされた。ただし、DNA ポリメラーゼ III の β サブユニットが存在するとプロセシビティが改善され、300~400 ヌクレオチドの重合ができるようになると報告されている⁽⁵⁾。脱塩基部位 (AP 部位) やチミン 2 量体部位に塩基を挿入して乗り越え複製を行なう活性は有していないが、ベンゾ[a]ピレンの結合したグアニン塩基にはシトシンを対合させて乗り越える (表 3)。シトシンが挿入されれば変異は起こらないが、その後の伸長反応で 1 塩基欠損が起こりやすい。Pol IV の作用で-1 のフレームシフト変異が高頻度で誘発されると、それが遺伝子内であればタンパク質機能は失われることが多いはずで、非コード領域が少ない大腸菌ゲノムにおいて、SOS 応答でこの Pol IV の発現を誘導して働かせる意義についてははっきりわかっていない。

2. DNA ポリメラーゼ V

一方、米国の Goodman (Southern California 大) と Woodgate (NIH) の共同研究グループ、および Livneh (Weizmann 研, イスラエル) のグループが独立に、UmuD'C 複合体が DNA ポリメラーゼ活性をもつことを明らかにした^(6,7)。DNA ポリメラーゼ V (Pol V) と命名された UmuD'C 複合体タンパク質は、鋳型 DNA に存在する AP 部位やチミン 2 量体部位に塩基を挿入して乗り越え複製を行なう活性を有するが、プロセシビティは低く (1 回の結合で 6 ヌクレオチド以下の重合)、校正機能をもたない。シクロブタン型チミン 2 量体部位には 2 つのアデニンを正しく挿入する頻度が高いが、6, 4-結合型チミン 2 量体部位ではグアニンを挿入する頻度が高いため、変異を誘発しやすい。また、AP 部位にはアデニンが最も挿入されやすい (表 3)。

3. DNA ポリメラーゼ η

大腸菌で新規ポリメラーゼが発見されたのと同じ時期に、真核生物の酵母でも Rad30 タンパク質に DNA ポリメラーゼ活性があることが、米国の Prakash (Texas 大) のグループの研究で明らかにされ、真核生物における 7 番目のポリメラーゼということで DNA ポリメラーゼ η (イータ) (Pol η) と命名された⁽⁸⁾。Rad30 タンパク質は大腸菌の DinB タンパク質、UmuC タンパク質と相同性を有し、鋳型 DNA 鎖に存在するシクロブタン型チミン 2 量体部位を乗り越えて DNA 合成を行なう活性がある。

ヒトの遺伝病である色素性乾皮症 (XP) は、A~G の遺伝的相補性群とバリエーション群 (XP-V) に分類されている。XP-A~G 群ではヌクレオチド除去修復機構に異常があり、XP-V 細胞では紫外線照射後の DNA 複製阻害が認められるが、ヌクレオチド除去修復活性は正常である。いずれも紫外線照射により突然変異頻度が上昇する。花岡 (阪大) らのグループは XP-V 群の原因遺伝子

表 3 ■ UmuC/DinB スーパーファミリーの DNA ポリメラーゼの特性^(16~26)

DNA ポリメラーゼ	損傷乗り越え時に挿入されやすい塩基						
	AP 部位	T = T	T (6, 4) T	Oxo-G	BP-G	AAF-G	ϵ dA
DNA ポリメラーゼ IV	×	×	×		C, (-1)		
DNA ポリメラーゼ V	A>G	AA>GA	GA>AA				
DNA ポリメラーゼ η	A, G	AA	×	C, A	A>T	C	T>A>G
DNA ポリメラーゼ ι	G>T>A	×	×	C		C	
DNA ポリメラーゼ κ	A	×	×	A	C	T>C	T>A, (-1)

AP 部位: 脱塩基部位, T = T: シクロブタン型チミン 2 量体部位, T (6, 4) T: 6, 4-結合型チミン 2 量体部位, Oxo-G: 8-オキシグアニン塩基, BP-G: ベンゾ[a]ピレンが結合したグアニン塩基, AAF-G: アセチルアミノフルオレンが結合したグアニン塩基, ϵ dA: 1, N⁶-エチノデオキシアデノシン。×: 乗り越え不可, A>G: アデニンが挿入される頻度が最も高く、次いでグアニンが挿入される頻度が高いことを示す, GA: チミン 2 量体の部位に 1 塩基目がグアニン, 2 塩基目にアデニンが挿入されることを示す, C, A: シトシンまたはアデニンが挿入されることを示す, -1: 1 塩基欠失のフレームシフト変異の生成。太字は突然変異の原因となりうる挿入塩基を示す。

XPV を同定し、正常細胞から精製した XPV タンパク質に DNA ポリメラーゼ活性があること、シクロブタン型チミン 2 量体部位を乗り越えて DNA 合成を行なう活性があることを見いだした。その後 XPV タンパク質は酵母の Rad30 タンパク質とアミノ酸配列の相同性が高いことがわかり、ヒトの Pol η と命名された⁽⁹⁾。精製された Pol η はプロセッシビティーが低く (1 回の結合で 3~4 ヌクレオチドの重合)、校正機能をもたず、また塩基対合の厳密性が低いポリメラーゼ (複製エラーの発生は 10^{-2} ~ 10^{-3} レベル) であることが明らかにされた。興味あることに、Pol η は正確な塩基対合を形成する能力が低いにもかかわらず、細胞内では突然変異を抑制する方向に働いている。これは、Pol η によってシクロブタン型チミン 2 量体部位には 2 つのアデニンが正しく挿入され、また、アセチルアミノフルオレンが結合したグアニン塩基にも正しくシトシンが対合されるためである。しかし、AP 部位やベンゾ[a]ピレンの結合したグアニン塩基にはアデニンを挿入する頻度が高いこと、6,4-結合型チミン 2 量体部位に対しては乗り越えられないことも知られており (表 3)、細胞内での Pol η の使い分けの機構については詳しくはわかっていない。

4. DNA ポリメラーゼ ι

酵母の RAD30 遺伝子に対するヒトの相同遺伝子は、上述の XPV 遺伝子以外にも RAD30B 遺伝子が Woodgate らのグループによって見いだされ、その遺伝子産物に DNA ポリメラーゼ活性があることが示され、DNA ポリメラーゼ ι (イオタ) (Pol ι) と命名されている⁽¹⁰⁾。チミン 2 量体部位を乗り越えて DNA 合成を行なう活性はないが (1 塩基の挿入は起こるが、2 つ目の塩基の挿入が起こらない)、AP 部位にはグアニン、チミンなどが挿入される。また、アセチルアミノフルオレンが結合したグアニン塩基にもシトシンを対合させる (表 3)。しかし、いずれの場合も塩基挿入後の伸長反応は触媒できず、別の損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ ζ (ゼータ) が関与している。

5. DNA ポリメラーゼ κ

大森 (京大) のグループおよび米国の Friedberg (Texas 大) のグループは、それぞれヒトの DinB ホモログの検索を行なった結果、DINB1 タンパク質を単離した^(11,12)。精製された DINB1 タンパク質に DNA ポリメラーゼ活性があることがわかり、DNA ポリメラーゼ κ (カッパ) (Pol κ) と命名されている。この DNA ポリメラーゼも、培養細胞中で過剰発現されると突然変異頻度

が上昇し、大腸菌の DinB タンパク質 (Pol IV) の過剰発現の場合と同様に、フレームシフト変異の誘発がみられる。Pol κ はチミン 2 量体部位を乗り越えて DNA 合成を行なう活性はないが、AP 部位には主にアデニンを挿入して乗り越え合成をすることができる。一方、アセチルアミノフルオレンが結合したグアニン塩基には、シトシンよりもチミンを対合しやすい (表 3)。ヒトの DinB ホモログは Prakash のグループも独立に単離したが⁽¹³⁾、DNA ポリメラーゼ θ (シータ) と命名したため混乱が生じている。

Y ファミリー DNA ポリメラーゼとその存在意義

DNA ポリメラーゼは、その系統樹解析における類似性からこれまで 5 つのグループに分類されてきた。近年相次いで発見された UmuC/DinB スーパーファミリーに属する DNA ポリメラーゼ (UmuC, DinB, Rad30 タンパク質) は、既存の DNA ポリメラーゼファミリーとはアミノ酸配列の相同性がほとんどない。これらの新規ポリメラーゼは、いずれもプロセッシビティーと塩基対合の厳密性が低く、鋳型 DNA の損傷を乗り越えて複製を行なうことができるという特徴を有しており、新たに Y ファミリー DNA ポリメラーゼと分類することが提唱されている⁽¹⁴⁾。プロセッシビティーが低いため、損傷塩基部位を含む数ヌクレオチドの重合にのみ関与し、その後は通常の DNA ポリメラーゼに引き継がれるものと考えられる (図 2)。Y ファミリー DNA ポリメラーゼには UmuC と相同性をもつ酵母の Rev1 タンパク質 (dCMP トランスフェラーゼ) も含めて、さらに 4 つのサブグループに分類されている (表 4)。

80 年代後半から 90 年代初めにかけて、大腸菌で SOS 応答の分子機構の研究が進み、UmuD'C タンパク質の存在下では損傷部位を乗り越えて複製を行なう TLS 機構が存在し、これがもともと高頻度に突然変異が生成するというモデルが提唱された。この機構が明らかにされた当初は、細菌や酵母などの単細胞生物に特有のものであると予想されていた。これは先にも述べたように、単細胞生物において DNA 複製が途中で阻害されることは致死的であるため、完全な修復ができない場合は DNA ポリメラーゼの塩基対合の厳密性を下げてでも複製反応を続行させ、突然変異誘発というリスクを負いながらも、ひとまず生き残ることを優先する機構と解釈された。したがって、高等真核生物ではこのような機構は存在しないと推定されていた。多細胞生物においては、突然変異が生じる可能性が高い複製を強行しなくても、損傷をもた

表 4 ■ DNA ポリメラーゼの分類

分類	ヒトの DNA ポリメラーゼ
A ファミリー：大腸菌 DNA ポリメラーゼ I 型	Pol γ
B ファミリー：大腸菌 DNA ポリメラーゼ II 型	Pol α , Pol δ , Pol ϵ , Pol ζ
C ファミリー：大腸菌 DNA ポリメラーゼ III の α サブユニット型	
D ファミリー：古細菌 DNA ポリメラーゼ型	
X ファミリー：真核生物 DNA ポリメラーゼ β 型	Pol β , Pol λ , Pol μ
Y ファミリー	
・ DinB サブグループ：大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV 型 細菌, 古細菌, 真核生物に広く存在	Pol κ (Pol θ)
・ UmuC サブグループ：大腸菌 DNA ポリメラーゼ V 型 細菌に存在, グラム陽性菌タイプとグラム陰性菌タイプ	
・ Rev1 サブグループ：酵母の dCMP トランスフェラーゼ型 真核生物のみに存在, Pol ζ と共同で損傷乗り越え複製を行なう	REV1
・ Rad30 サブグループ：酵母の DNA ポリメラーゼ η 型 真核生物のみに存在	Pol η , Pol ι

ない幹細胞を分裂させて新しい細胞を作る手段があるからである。事実、真核生物では重度の DNA 損傷をもった染色体が複製サイクルに入らないように、DNA 損傷が完全に修復されるまで細胞分裂を中止させるチェックポイント機能が働いている。それでも修復が完了しない場合には、最後はプログラム細胞死（アポトーシス）へと導かれる。

しかし、現実には、細菌からヒトにいたるまで、損傷を乗り越えて複製できる Y ファミリー DNA ポリメラーゼをもっていることが明らかになった。しかも、その 1 つである Pol η の欠損はヒトの色素性乾皮症の直接の原因となる⁽¹⁵⁾ことから、細胞にとって必須の酵素と考えられる。では、損傷乗り越え複製は真核生物のゲノムに対して、遺伝子の突然変異という重大な影響を及ぼすことはないのだろうか。細菌のゲノムとは対照的に、真核生物のゲノムでは遺伝子をコードしない部分が大半である。ヒトのゲノムの 97% 近くは非コード領域であり、この部分では塩基置換変異の影響はまず現われないと考えられる。また、コード領域の塩基置換変異の場合でも、タンパク質の生物活性に影響を与えるアミノ酸での変異、イントロンの切断部位の変異、プロモーターなど DNA のタンパク質結合部位での変異以外は、その機能に顕著な影響を示さないと予想される。しかし、確率は低いとはいえ、ガン化のイニシエーションに結びつくような遺伝子の突然変異が生じるリスクがあり、長期的に考えれば有効な対処方法とは思えない。実際、DNA 複製途中での損傷部位の回避法には、DNA 組換え修復経路(図 3)という突然変異を伴わない有効な手段があり、多くの場合はこの組換えで DNA 複製を終えた後に、鋳型鎖に残された損傷部位をヌクレオチド除去修復で除いていると考えられている。それでも、特殊な

図 3 ■ 大腸菌における組換え修復機構

組換えの結果、複製は完了するが損傷塩基（シクロブタン型チミン 2 量体）は残る。その後ヌクレオチド除去修復機構（図 1-B 参照）が働き、損傷部分が取り除かれて修復される。組換え修復は DNA 複製中における DNA 損傷の回避法として重要な機構であるが、損傷乗り越え複製とは異なり、突然変異は生じない（記号の説明は図 1 に同じ）。

DNA ポリメラーゼによって損傷を乗り越えて DNA 複製を完了させてしまうという機構が、生物の種を越えて存在するという事実は、逆に考えれば、生命活動においては様々なタイプの DNA 損傷が恒常的に多量に生じていて、これらのすべてを複製前に完全に修復することや、組換え修復経路で損傷部位を回避して複製していくことが不可能であることを意味していると捉えられることができる。

*

新しい DNA ポリメラーゼはその後も次々と見つかり、真核生物の DNA ポリメラーゼの種類はすでに 13 種ほどに増えている。今後もその数は増え、同時に各々の DNA ポリメラーゼが乗り越えられる損傷に関しても、種々の変異原が結合した塩基について詳細に調べられていくと思われる。これらの DNA ポリメラーゼの生理学的機能については、コードする遺伝子を破壊したノックアウトマウスの作製が進められており、次第に明らかになってくると期待されている。今後は複数の損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼ間の相互作用 (Pol IV と Pol V, Pol ξ と Pol η ・Pol ι ・Pol κ)、通常の複製型 DNA ポリメラーゼとの連携、そしてゲノムの複製と修復のシステム全体の制御機構が研究の中心になっていくであろう。

一方、突然変異を生じやすい DNA ポリメラーゼの発見は、DNA 修復とは直接関係のない免疫系の研究分野にも影響を与えている。免疫グロブリンの多様性に寄与している V 遺伝子断片では、他のゲノム領域よりも突然変異頻度が高く (10^{-3} レベル)、Pol η などのヌクレオチド重合反応で見られるエラーレベルと同程度であることから、損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼとの関連について強い関心がもたれている。

文献

1998 年以前の研究については 1)~3) の書籍・総説を参照し、直接の文献引用は 1999~2001 年 7 月までのものに留めた。また、21)~26) はごく最近の総説である。

- 1) T.A. Brown: "Genomes" (ゲノム: 新しい生命情報システムへのアプローチ, 松村正實(監訳), メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2000) (DNA ポリメラーゼ, DNA 複製機構)
- 2) E.C. Friedberg, G.C. Walker & W. Siede: "DNA Repair and Mutagenesis", ASM Press, 1995 (DNA 修復系の酵素, SOS 応答の調節機構, 突然変異生成機構)
- 3) B.T. Smith & G.C. Walker: *Genetics*, **148**, 1599 (1998) (SOS 応答, 損傷乗り越え複製)
- 4) J. Wagner, P. Cruz, S.R. Kim, M. Yamada, K. Matsui, R. P.P. Fuchs & T. Nohmi: *Mol. Cell*, **4**, 281 (1999).
- 5) J. Wagner, S. Fujii, P. Cruz, T. Nohmi & R.P.P. Fuchs:

EMBO Reports, **1**, 484 (2000).

- 6) M. Tang, X. Shen, E.G. Frank, M. O'Donnell, R. Woodgate & M.F. Goodman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8919 (1999).
- 7) N.B. Reuven, G. Arad, A. Maor-Shashani & Z. Livneh: *J. Biol. Chem.*, **274**, 31763 (1999).
- 8) R.E. Johnson, S. Prakash & L. Prakash: *Science*, **283**, 1001 (1999).
- 9) C. Masutani, R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio & F. Hanaoka: *Nature*, **399**, 700 (1999).
- 10) J.P. McDonald, V. Rapic-Otrin, J.A. Epstein, B.C. Broughton, X. Wang, A.R. Lehmann, D.J. Wolgemuth & R. Woodgate: *Genomics*, **60**, 20 (1999).
- 11) T. Ogi, T. Kato Jr., T. Kato & H. Ohmori: *Genes Cells*, **4**, 607 (1999).
- 12) V.L. Gerlach, L. Aravind, G. Gotway, R.A. Schultz, E.V. Koonin & E.C. Friedberg: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11922 (1999).
- 13) R.E. Johnson, S. Prakash & L. Prakash: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3838 (2000).
- 14) H. Ohmori, E.C. Friedberg, R.P.P. Fuchs, M.F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T.A. Kunkel, C.W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G.C. Walker, Z. Wang & R. Woodgate: *Mol. Cell*, **8**, 1 (2001).
- 15) A. Yamada, C. Masutani, S. Iwai & F. Hanaoka: *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2473 (2000).
- 16) K. Baynton & R.P.P. Fuchs: *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 74 (2000).
- 17) U. Hubscher, H.P. Nasheuer & J.E. Syvaoja: *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 143 (2000).
- 18) M.F. Goodman: *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 189 (2000).
- 19) M.F. Goodman & B. Tiffin: *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 162 (2000).
- 20) R.L. Levine, H. Miller, A. Grollman, E. Ohashi, H. Ohmori, C. Masutani, F. Hanaoka & M. Moriya: *J. Biol. Chem.*, **276**, 18717 (2001).
- 21) 安井 明, 花岡文雄, 田中亀代次(編): "DNA 修復ネットワークとその破綻の分子病態", 蛋白質 核酸 酵素(増刊号), 共立出版, 2001.
- 22) M.D. Sutton, B.T. Smith, V.G. Godoy & G.C. Walker: *Annu. Rev. Genet.*, **34**, 479 (2001).
- 23) Z. Livneh: *J. Biol. Chem.*, **276**, 25639 (2001).
- 24) Z. Wang: *Mutation Res.*, **486**, 59 (2001).
- 25) M.D. Sutton & G.C. Walker: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8342 (2001).
- 26) P. Pham, S. Rangarajan, R. Woodgate & M.F. Goodman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8350 (2001).