

Thermus thermophilus HB8 由来 DNA ポリメラーゼ X の機能ドメイン解析
Functional domain analysis of DNA polymerase X from *Thermus thermophilus* HB8

中根修平¹, 中川紀子^{1,2}, 増井良治^{1,2} 倉光成紀^{1,2}

Shuhei Nakane¹, Noriko Nakagawa^{1,2}, Ryoji Masui^{1,2} and Seiki Kuramitsu^{1,2}

(¹阪大院理・生物, ²理研・播磨研)

(¹Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., ²RIKEN SPring-8 Center, Harima Inst.)

e-mail: shuhei@bio.sci.osaka-u.ac.jp

DNA ポリメラーゼは 1 本鎖の核酸 (DNA, RNA) を鋳型にして DNA を合成する酵素であり, DNA の関わる多くのシステムで必須の酵素であるため, 全ての生物がこの酵素を持っている。DNA ポリメラーゼは鋳型に相補的な dNTP を重合していくが, 反応を開始するためには, 鋳型に対合した短いオリゴヌクレオチド断片であるプライマーとその 3' 末端の OH 基, 金属イオン (通常は Mg) が必要である。また, より正確に DNA を合成するため, 間違った塩基を取り込んだときに働く 3' -5' エキソヌクレアーゼ活性を持つ DNA ポリメラーゼも多く存在し, この活性は校正活性 (プルーフリーディング活性) と呼ばれる。

DNA ポリメラーゼは, アミノ酸配列の相同性により, A, B, C, D, X, Y, 逆転写酵素 (RT) の 7 つのファミリーに分類される (近年アーキアで E ファミリーにあたる DNA ポリメラーゼも発見された)。各生物ドメインの持つ DNA ポリメラーゼの種類と, その DNA ポリメラーゼの分類されるファミリーを図 1 にまとめた。真核生物では, 発見された順に $\alpha, \beta, \gamma \dots$ と命名され, バクテリアでは, 発見された順に I, II, III \dots と命名された。

A ファミリーは, DNA 修復や DNA 複製に関わる。真核生物の Poly は, ミトコンドリアの DNA 複製を行い, バクテリアの PolII は, 岡崎フラグメントの成熟 (RNA プライマーの除去) や DNA 修復で働いている。B ファミリーは, 主に DNA 複製で働いており, 多くの DNA ポリメラーゼが校正活性を持っている。C ファミリーはバクテリアの DNA 複製に関わるファミリーで, 高度好熱菌の PolIII は 7 個のサブユニットから成る。D ファミリーは, アーキアで発見されたファミリーで, DNA 複製に関わると考えられている。X ファミリーについては後述する。Y ファミリーは, 損傷乗り越え合成 (translesion synthesis) により複製, 修復に関わることが知られており, 合成の正確さは一般に低い。RT は RNA を鋳型に DNA を合成する。レトロウイルスが持っており, 真核生物ではテロメラーゼが該当する。

	真核生物	バクテリア	アーキア	主な機能
A	γ (ガンマ), θ (シータ), ν (ニュー)	I		DNA 修復, 複製
B	α (アルファ), δ (デルタ), ϵ (イプシロン), ζ (ゼータ)	II	B1, B3	DNA 複製
C		III		DNA 複製
D			D	DNA 複製
X	β (ベータ), μ (ミュー), λ (ラムダ), σ (シグマ), TdT	X	X	DNA 修復
Y	η (イータ), ι (イオタ), κ (カッパ), Rev1	IV, V	Dbh, Dpo4	損傷乗り越え合成
RT	テロメラーゼ			テロメア合成

図1. 各生物の持つ DNA ポリメラーゼとそのファミリー

X ファミリーに属する DNA ポリメラーゼ (PolX) は主に DNA 修復に関わっていることが真核生物では知られている。真核生物の PolX には X ファミリー共通のコアドメイン (POLXc ドメイン) のみからなるタイプ (Pol β) や, POLXc ドメインに加えて N 末端側に他のタンパク質との相互作用に必要な BRCT ドメインを持つタイプ (Pol λ , Pol μ) が存在し (図 2), それぞれ塩基除去修復, DNA 二重鎖切断修復といった DNA 修復システム内のサブシステムにおいて働くことが明らかにされている。

近年のゲノム解析の結果により, バクテリアにも PolX が存在することが判明したが, その詳細な活性や細胞における働きは不明である。バクテリア PolX は POLXc ドメインに加えて, 真核生物の PolX にはない PHP ドメインを持ち (図 2), 3'-5' エキソヌクレアーゼ (3-5 エキソ) 活性を有する。しかし, この活性がどちらのドメインに由来するのかは明瞭でなく, 3-5 エキソ活性も含めてバクテリア PolX が DNA 修復システム, あるいは他のシステム内のどのようなサブシステムで働いているのかもよく分かっていない。

そこで本研究では, *T. thermophilus* HB8 由来の PolX (ttPolX) を用いて, まずは機能ドメインの同定を中心とした解析を行った。プロテアーゼ限定分解の結果および配列保存性より, POLXc, PHP 各ドメインを調製し, 全長 ttPolX とともに活性測定を行った。その結果, ポリメラーゼ活性は POLXc ドメインに存在したが, 3-5 エキソ活性はどちらのドメインにも存在しなかった。そこで, 金属イオン結合部位と推測される PHP ドメイン内の 9 残基をそれぞれアラニンに置換したところ, 全ての変異体で 3-5 エキソ活性が顕著に低下した。さらに, 2 つのドメインを混合すると 3-5 エキソ活性を示し, ドメイン間の相互作用をゲルろ過により確認した。また, ゲルシフトアッセイにより, PHP ドメイン単独では DNA に結合できないことが分かった。以上の結果より, ttPolX の PHP ドメインは 3-5 エキソ活性に必須の部位を含むが, 単独では DNA に結合できないため, その活性の発現には POLXc, PHP 両方のドメインが必要であると考えられた。

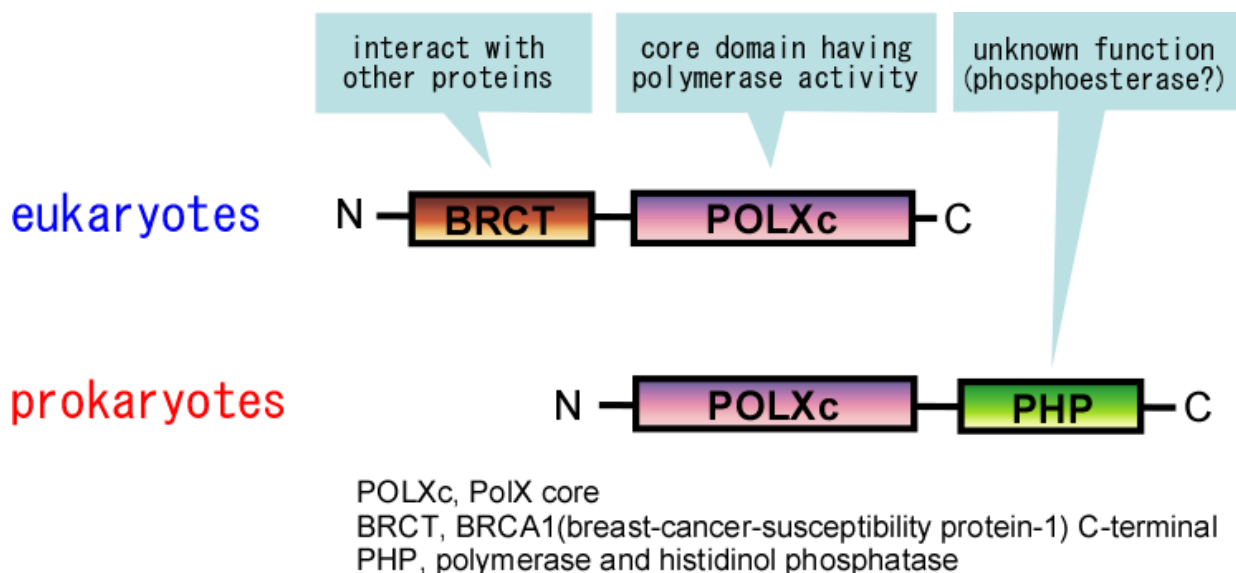


図 2. PolX のドメイン構造の比較