

氏名	さはし りつこ <b>佐橋 律子</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第687号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	<b>Cell biological and genetical studies on DNA replication enzyme and protein modification enzyme in <i>Drosophila</i></b> (ショウジョウバエ DNA 複製酵素及びタンパク質修飾酵素の細胞生物学・遺伝学的解析)
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 伊藤雅信 教授 亀井加恵子

### 論文内容の要旨

申請論文は「序論」第1章「ショウジョウバエ DNA ポリメラーゼ $\alpha$ は Pr-Set7 と相互作用しヒストン H4-K20 のメチル化を介在する」、第2章「ショウジョウバエ DNA ポリメラーゼ $\epsilon$  p58 サブユニットの機能解析」、第3章「ショウジョウバエトランスグルタミナーゼ-B の標的発現はトランスグルタミナーゼ-A と同様の特徴的な表現型を誘導する」から構成されている。

序論では、本論文の背景と目的が述べられている。最初に真核生物 DNA 複製の仕組みとそれに関わるタンパク質因子について概説している。そのあと3つの DNA 複製酵素 DNA ポリメラーゼ (pol)  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  の複製フォークでの役割について述べられている。引き続いてヒストンの翻訳後修飾についての解説とヒストン H4 の 20 番目のリシン残基 (H4-K20) に特異的なヒストンメチル基転移酵素 Pr-Set7 についてのこれまでの知見をまとめている。Pr-Set7 の H4-K20 メチル化活性が複製開始複合体のクロマチンへのローディングに必要であり、S 期に PCNA と Cui4-Ddb1 に依存した分解を受け、Pr-Set7 のショウジョウバエホモログ dPr-Set7 の P-エレメント挿入変異系統は幼虫で致死となり、H4-K20 メチル化レベルが低下すること、また dPr-Set7 レベルの低下は DNA ダメージチェックポイントを活性化することが報告されている。また序論において、カルシウム依存性タンパク質修飾酵素トランスグルタミナーゼのショウジョウバエホモログ dTG に二つのスプライシングバリエント (dTG-A と dTG-B) が存在し、それらの機能的な違いが明らかでないことを解説している。このような背景のもとに申請者はショウジョウバエをモデルとして用いて、DNA ポリメラーゼ $\alpha$  と Pr-Set7 が相互作用することの生物学的な意味を明らかにした。また DNA ポリメラーゼ $\epsilon$  p58 サブユニットの機能解析を行い、それがショウジョウバエの生存に必須であり、また通常の分裂サイクルとエンドサイクルの進行にも重要であることを明らかにした。さらに dTG-B 遺伝子導入ショウジョウバエを作製し、その表現型の解析から dTG-A と dTG-B が同様の機能を持つことを示唆した。

第1章では DNA 複製とヒストン H4-K20 メチル化との関係及び、pol  $\alpha$  と Pr-Set7 の相互作用について焦点をあてている。翅原基特異的に pol  $\alpha$  180kDa サブユニット (dpol  $\alpha$  p180) をノックダ

ウンすると成虫翅の萎縮が見られ、 $\text{dpol } \alpha \text{ p180}$  と  $\text{dPr-Set7}$  のダブルロックダウン系統では、それが増強する。また、 $\text{dpol } \alpha \text{ p180}$  ノックダウン系統の翅原基では DNA 合成の低下がみられ、 $\text{dpol } \alpha \text{ p180}$  と  $\text{dPr-Set7}$  のダブルロックダウン系統では、それがさらに増強する。これらのことより、申請者は  $\text{dPr-Set7}$  が  $\text{dpol } \alpha$  との相互作用を介して DNA 複製の制御に関与することを示唆している。また  $\text{dpol } \alpha \text{ p180}$  をノックダウンした翅原基で H4-K20 モノメチル化のシグナルが減少することから、 $\text{Pr-Set7}$  のメチル化活性制御に  $\text{dpol } \alpha$  が重要な働きを担っている可能性も示唆している。

第2章では、ショウジョウバエ  $\text{pol } \epsilon \text{ 58 kD}$  サブユニット ( $\text{dpol } \epsilon \text{ p58}$ ) の機能解析について記載している。 $\text{pol } \epsilon$  はヘテロ4量体であることが報告されているが、ショウジョウバエでは、触媒サブユニットである  $255\text{kD}$  サブユニット ( $\text{dpol } \epsilon \text{ p255}$ ) と  $\text{dpol } \epsilon \text{ p58}$  サブユニットだけが同定されている。 $\text{dpol } \epsilon \text{ p58}$  変異系統は、蛹で致死となり、3 齢幼虫の成虫原基や唾腺が野生型と比較して小型化することから  $\text{dpol } \epsilon \text{ p58}$  が組織の成長、細胞増殖および生存に必須であると示唆している。 $\text{dpol } \epsilon \text{ p58}$  変異系統の複眼原基では、形態形成溝の後極側における S 期が減少し、通常は増殖が停止している後極側の細胞で M 期のシグナルが増加していた。これらの結果より、 $\text{dpol } \epsilon \text{ p58}$  が S 期の進行に重要であることが明らかとなった。また、唾腺の核が野生型と比較して小型化している事が観察され、 $\text{dpol } \epsilon \text{ p58}$  のエンドサイクルへの関与も示唆された。さらに、変異系統を用いて他の複製関連因子の抗体でウエスタン免疫プロットを行った結果、複製開始因子である  $\text{dOrc2}$  レベルの顕著な減少が見られたことから  $\text{dpol } \epsilon \text{ p58}$  と  $\text{dOrc2}$  が細胞内で相互作用することも示唆している。

第3章では、トランスグルタミナーゼ B ( $\text{dTG-B}$ ) 過剰発現系統を作製し、その表現型の解析について記載している。トランスグルタミナーゼは、タンパク質間の架橋反応を触媒するタンパク質間翻訳後酵素で、様々な生物学的プロセスに関わっている。 $\text{dTG-B}$  過剰発現系統では、成虫複眼形態異常と翅脈の過形成が観察された。これらの表現型は、先行研究により報告されているトランスグルタミナーゼ A ( $\text{dTG-A}$ ) の過剰発現系統において観察された表現型と同様であり、 $\text{dTG-A}$  と同様に  $\text{dTG-B}$  も複眼と翅脈の形成に関わっていると考察している。

## 論文審査の結果の要旨

DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  ( $\text{pol } \alpha$ 、 $\text{pol } \delta$ 、 $\text{pol } \epsilon$ ) はゲノムの DNA 複製を担う酵素である。 $\text{pol } \alpha$  が RNA プライマーとそれに引き続く 20~30 塩基の DNA を合成し、その後、 $\text{pol } \alpha$  と置き換わった  $\text{pol } \delta$  と  $\text{pol } \epsilon$  が、それぞれラギング鎖とリーディング鎖の合成を行うことがわかっている。

申請者は DNA 複製とヒストン H4-K20 メチル化との関係及び、 $\text{pol } \alpha$  とヒストンメチル化酵素  $\text{Pr-Set7}$  の相互作用に注目した。ショウジョウバエの翅原基特異的に  $\text{pol } \alpha \text{ 180kDa}$  サブユニット ( $\text{dpol } \alpha \text{ p180}$ ) をノックダウンすると成虫翅の萎縮が見られ、 $\text{dpol } \alpha \text{ p180}$  と  $\text{dPr-Set7}$  のダブルロックダウン系統では、それが増強する。また、 $\text{dpol } \alpha \text{ p180}$  ノックダウン系統の翅原基では DNA 合成の低下がみられ、 $\text{dpol } \alpha \text{ p180}$  と  $\text{dPr-Set7}$  のダブルロックダウン系統では、それがさらに増強する。これらのことより、申請者は  $\text{dPr-Set7}$  が  $\text{dpol } \alpha$  との相互作用を介して DNA 複製の制御に関与することを明らかにした。また  $\text{dpol } \alpha \text{ p180}$  をノックダウンした翅原基で H4-K20 モノメチル化のシグナルが減少することから、 $\text{Pr-Set7}$  のメチル化活性制御に  $\text{dpol } \alpha$  が重要な働きを担っている可能性も示した。さらにショウジョウバエ  $\text{pol } \epsilon \text{ 58kD}$  サブユニット ( $\text{dpol } \epsilon \text{ p58}$ ) 変異系統が、蛹で致死となり、3 齢幼虫の成虫原基や唾腺が野生型と比較して小型化することから  $\text{dpol } \epsilon$

p58 が組織の成長、細胞増殖および生存に必須であることを明らかにした。また dpol  $\epsilon$  p58 変異系統の複眼原基細胞での解析により、dpol  $\epsilon$  p58 が S 期の進行に重要であることを明らかにした。また dpol  $\epsilon$  p58 のエンドサイクルへの関与や複製開始因子 d0rc2 との相互作用も示唆している。またタンパク質間の架橋反応を触媒するタンパク質間翻訳後修飾酵素トランスグルタミナーゼの二つのスプライシングバリエント dTG-A と dTG-B がショウジョウバエ生体内で同様の機能を持つことを明らかにしている。これらの研究は、生物個体内での DNA 複製酵素やタンパク質修飾酵素の重要性を明らかにすることとなり、その学問的意義は高く評価できる。学位論文は英文で丁寧な作成されており、論旨も明解であった。本論文の内容は、申請者が筆頭著者である 1 編を含む、査読制のある国際的学会誌にすでに発表済みの下記の 2 編の論文を基礎としている。

- 1) Sahashi, R., Matsuda, R., Suyari, O., Kawai, M., Yoshida, H., Cotterill, S. and Yamaguchi, M.: Functional analysis of *Drosophila* DNA polymerase  $\epsilon$  p58 subunit. Am. J. Cancer Res. 3(5), 478-489, 2013.
- 2) Ichikawa, A., Kotaki, M., Sahashi, R., Yoshioka, Y., Yamaguchi, M. and Ikura, K.: Targeted overexpression of *Drosophila* transglutaminase-B induced characteristic phenotypes in a similar manner as transglutaminase-A. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75, 1402-1404, 2011.

また、以下の論文も投稿中である。

- 1) Sahashi, R., Crevel, G., Pasko, J., Suyari, O., Nagai, R., Saura, M. M., Yamaguchi, M. and Cotterill, S.: DNA polymerase  $\alpha$  interacts with PrSet7 and mediates H4K20 monomethylation in *Drosophila*. submitted