The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	超好熱古細菌Pyrococcus furiosus由来DNA複製因子の機能と構造に関する研究
Author(s)	石野, 園子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/44579
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【2】

氏　　名	石野園子（いしの　その　こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　18057　号
学位授与年月日	平成15年7月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来DNA複製因子の機能と構造に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　土井　健史 （副査） 教　授　小林　祐次　　教　授　西原　　力　　教　授　花岡　文雄

論文内容の要旨

DNA 複製、修復、組換えなどの生命現象に関わるタンパク質の分子認識機構を解明することは、がんや種々の遺伝病などの病理を理解することに繋がると共に、遺伝子治療や様々な生命科学技術の開発という薬学領域における応用研究を進めるために必須である。

著者は古細菌が原核生物で真正細菌と類似した形態をとりながらも、遺伝情報伝達系に関係するタンパク質因子の構造が、真正細菌よりも真核生物のものによく類似していることに注目し、高等真核生物における DNA の複製過程における分子認識機構を解明するために、古細菌をモデルとして利用することを考えた。

本研究において著者は *Pyrococcus furiosus* を用い、DNA 複製の分子機構の中で特に鋳型 DNA に従って新生鎖が合成される DNA 複製の伸長過程に関わるタンパク質分子の機能と構造について詳細な解析を行った。

DNA 複製の伸長過程では、複製を担う DNA ポリメラーゼを DNA 鎖上に留めておくクランプと呼ばれる分子が必要である。クランプはリング構造を形成し、輪の中を DNA 鎖が滑るように移動しながら合成反応が進行していくと考えられている。DNA 鎖がクランプの輪の中に組み込まれるためには、クランプローダーとよばれる分子が働く。真核生物では、増殖細胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen : PCNA）、複製因子 C（replication factor C : RFC）がそれぞれクランプ、クランプローダーの働きをすることがわかっている。

P. furiosus ゲノム DNA から真核生物の PCNA の類似配列をコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させて産生されたタンパク質（*Pfu*PCNA）を精製して分子機能解析を行った。*Pfu*PCNA は、真核生物の PCNA と同様に三量体を形成すること、および DNA ポリメラーゼである PolBI、PolD と相互作用することがわかった。また *Pfu*PCNA は単独で PolBI および PolD の DNA 合成活性を促進した。

古細菌では RFC は大小二種類のタンパク質が存在することがわかった。*P. furiosus* のゲノム DNA から二種類の RFC 遺伝子を別々にクローニングし、それぞれの遺伝子を大腸菌で発現させ、産生された２種類のタンパク質（RFCS、RFCL）をそれぞれ精製し *in vitro* における性質を調べた。

RFCS と RFCL は４：１の割合でそれぞれの分子が会合していると予想された。*Pfu*RFC と *Pfu*PCNA は ATP 存在下で DNA と *Pfu*RFC-*Pfu*PCNA-DNA 複合体を形成した。RFCS と *Pfu*RFC は ATP 加水分解活性を有し、その活性は DNA と PCNA が同時に加わると約 10 倍～15 倍に促進された。

*Pfu*PCNA による PolBI, PolD の DNA 合成活性の促進効果は、*Pfu*RFC を加えることでさらに増大した。この結

果は、PCNA、RFC という真核生物で働く因子と同様な複製因子が古細菌でも実際に機能していることを示すものである。また、古細菌のタンパク質が実際に真核生物の複製関連タンパク質と機能的に相互作用することがわかった。

*Pfu*PCNA の構造決定が行なわれた結果、全体的な立体構造は先に報告されていたヒトや出芽酵母の PCNA の構造と高い類似性を示す三量体を形成していることが判明した。

クランプローダーの *Pfu*RFC 複合体の構造解析を試みたが解析可能な結晶が得られなかった。そこで各サブユニットの構造解析を試みた結果 RFCS の結晶が得られ、解析を行い 2.8 Å分解能の構造を得た。RFCS サブユニットは三日月型の分子骨格を有していた。C-末端領域は隣り合ったサブユニットの C-末端領域と非常に強固な相互作用をしていることがわかり、機能的複合体の構造保持に重要な役割を果たすことが推定された。解析を行った結晶中では、六個の RFCS サブユニットが存在し、二個の半円型三量体単位が二回回転対称で配置されたユニークな会合状態をとっていた。

前述した複製関連のタンパク質について、構造と機能の関係をより詳細に理解するために、様々な変異体解析および複合体の構造解析を行った。

一般に PCNA 結合タンパク質には PIP（PCNA Interacting Protein）ボックスと呼ばれる共通性の高いアミノ酸配列が見つかることが多い。*P. furiosus* では、DNA ポリメラーゼ I（PolBI）の C-末端、RFC 大サブユニット（RFCL）の C-末端にそれぞれ PIP ボックス様の配列が存在している。この部位が実際に PCNA との相互作用に関係するか否かについて調べた。

PolBI の C-末端から PIP ボックスを含む 30 残基を欠失させた変異体 PolBIΔを作製し *Pfu*PCNA 依存性の PolBI の DNA 合成活性を調べた結果、この PIP ボックスが実際に相互作用しているものと推定された。RFCL では、PIP ボックス配列を含むペプチドと *Pfu*PCNA との複合体の結晶を作製し、得られた 2.3 Å分解能までのデータに基づいて構造解析を行った。RFCL ペプチド-*Pfu*PCNA の複合体の構造はヒト PCNA や、ファージ gp45 が PIP ボックスと結合した状態の構造と類似しており、結合様式が各生物界を通じて保存されていることが明らかになった。

RFCS 由来の相互作用について考察を行った。RFCS 複合体の結晶構造解析の結果判明した、中心部分の負に荷電した領域で、原因になっている酸性アミノ酸 5 残基を Ala に変換した RFCSm5 と、比較のため 2 残基だけを変換した RFCSm2 を作製した。また、RFCS は複合体を形成するのに C-末端が重要と考えられたので、C-末端 22 残基を欠失させた変異体 RFCSΔを作製し、これらの性質を調べた。

その結果、RFCSΔは重合体を形成できず、DNA 結合活性も消失したが、RFCSm2、RFCSm5 は野生型の RFCS と同様に重合体を形成し DNA 結合活性を有していた。*Pfu*PCNA 依存性の PolBI の DNA 合成活性に対する効果を調べてみると、野生型 *Pfu*RFC に見られる促進効果は RFCSΔでは全く見られなかった。また RFCSm5 を含む *Pfu*RFC 変異体の DNA 合成反応促進効果も明らかに低下していた。これらの結果から、RFC 複合体の中央に局在する負の荷電は、PCNA 分子上の正に荷電した部分との相互作用に貢献していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

石野さんは、本論文において、古細菌 *P. furiosus* における真核生物の PCNA、RFC に相当するタンパク質の機能と構造に関する研究を行った。

まず、*P. furiosus* ゲノム DNA からこれらタンパク質の遺伝子のクローニングを行い、大腸菌でタンパク質（*Pfu*PCNA、*Pfu*RFC）を発現させ、*Pfu*PCNA は単独でポリメラーゼによる DNA 合成活性を促進すること、*Pfu*RFC はその促進効果をさらに増大させることを示した。

次に、立体構造について調べるために、*Pfu*RFC の小サブユニット（RFCS）の結晶構造解析を行った結果、半円形をした 3 量体が 2 つ会合した状態の構造をとっていることがわかり、これより *Pfu*RFC の機能構造を提案した。*Pfu*PCNA については、ヒト PCNA と類似した 3 量体環状構造を形成しており、*Pfu*PCNA の機能の特徴（self-loading）をその構造から説明できた。

最後に、*Pfu*PCNA、*Pfu*RFC、DNA ポリメラーゼ（PolBI）の相互作用について解析を行った。その結果、PolBI

の PIP-ボックスを含む C 末端が *Pfu*PCNA との相互作用に必須であり、*Pfu*PCNA の大サブユニット（RFCL）の PIP-ボックスでは、*Pfu*PCNA との結合に関与するが、それ以外の部位も関係することがわかった。さらに、*Pfu*PCNA と RFCL の PIP-ボックス由来ペプチドとの複合体における結晶構造解析を行い、その相互作用様式を示した。また、RFCS の変異体を種々作成し、RFCS の C 末端 α ヘリックスが複合体形成に必須であること、RFCS 複合体の中心の負に荷電した領域が *Pfu*PCNA との相互作用に寄与することを示した。

以上の結果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。